

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA
DA ASSOCIAÇÃO EM REDE DE IES

Avaliação do potencial de lipossomas para *co-delivery* de rapamicina e *trans-resveratrol* na terapia do câncer de mama

Leidiana Rocha dos Reis

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Coorientadora: Dra. Viviane Aline Oliveira Silva

ARARAQUARA – SP

2022

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA
DA ASSOCIAÇÃO EM REDE DE IES

Avaliação do potencial de lipossomas para *co-delivery* de rapamicina e *trans-resveratrol* na terapia do câncer de mama

Leidiana Rocha dos Reis

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nanotecnologia
Farmacêutica da Associação em Rede IES,
para obtenção do título de
Doutora em Nanotecnologia Farmacêutica

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli
Coorientadora: Dra. Viviane Aline Oliveira Silva

ARARAQUARA – SP

2022

-
- R715a** Reis, Leidiana Rocha dos.
Avaliação do potencial de lipossomas para co-delivery de rapamicina e trans-resveratrol na terapia do câncer de mama / Leidiana Rocha Reis.
– Araraquara: [S.n.], 2022.
93 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica da Associação em REDE de IES. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.
- Orientador: Marlus Chorilli.
Coorientadora: Viviane Aline Oliveira Silva.
1. Rapamicina. 2. Resveratrol. 3. Lipossomas. 4. Câncer de Mama. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Silva, Viviane Aline Oliveira, coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação do potencial de lipossomas para *co-delivery* de rapamicina e *trans-resveratrol* na terapia do câncer de mama

AUTORA: LEIDIANA ROCHA DOS REIS

ORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA, área: Nanotecnologia Aplicada às Ciências Farmacêuticas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Profa. Dra. MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Profa. Dra. CRISTIANE DE BONA DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Farmácia Industrial / Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. JOSIMAR DE OLIVEIRA ELOY (Participação Virtual)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. MARCELO BISPO DE JESUS (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual / Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas

Araraquara, 28 de janeiro de 2022

Sumário

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
RESUMO	14
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Câncer de Mama	18
1.2 Rapamicina e o sinergismo com <i>trans</i> -resveratrol	20
1.3 Lipossomas	23
2.0 Justificativa.....	27
3.0 Objetivo Geral	28
3.1 Objetivos específicos.....	28
4.0 Materiais e Métodos	29
4.1 Desenvolvimento dos Lipossomas com RAPA e/ou RESV.....	29
4.2 Caracterização físico-química das formulações	30
4.2.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), Índice de Polidispersão (IPD) e Potencial Zeta (PZ)	30
4.2.2 Estabilidade das Formulações	30
4.2.3 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação de RAPA e RESV utilizando CLAE	30
4.2.4 Linearidade	31
4.2.5 Seletividade	32
4.2.6 Precisão Intermediária	32
4.2.7 Exatidão	32
4.2.8 Limite de Detecção.....	32
4.2.9 Limite de Quantificação	33
4.2.10 Robustez	33
4.2.11 Avaliação da Eficiência de Encapsulação da RAPA e do RESV em Lipossomas.....	35
4.2.12 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	35
4.2.13 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)	35
4.2.14 Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (HR-TEM)	36
4.2.15 Estudo de solubilidade da RAPA e do RESV	36
4.2.16 Ensaio de liberação <i>in vitro</i> da RAPA e RESV em lipossomas	36
5.0 Análise <i>in vitro</i> do perfil de citotoxicidade das formulações lipossomais de RAPAe/ou RESV	37
5.1 Cultivo Celular	37
5.3 Análise da internalização celular dos lipossomas por Citometria de Fluxo	38
6.0 Análises estatísticas	38
7.1 Desenvolvimento dos lipossomas com RAPA e/ou RESV	39

7.2 Análises do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), Índice de Polidispersão (IPD), Potencial Zeta (PZ) e Estudo de Estabilidade	44
7.3 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação de RAPA e RESV utilizando CLAE	49
7.3.1 Linearidade	50
7.3.2 Seletividade	52
7.3.3 Exatidão	54
7.3.4 Precisão Intermediária	55
7.3.5 Limite de Detecção	56
7.3.6 Limite de Quantificação	57
7.3.7 Robustez	57
7.4 Avaliação da eficiência de encapsulação da RAPA e do RESV em Lipossomas	58
7.5 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	59
7.6 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) Nanosight NS300.....	64
7.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (HR-TEM)	65
7.8 Estudo de Solubilidade RAPA e RESV	66
7.9 Ensaio de liberação <i>in vitro</i> da RAPA e RESV em lipossomas	66
8.0 Análise <i>in vitro</i> do perfil de citotoxicidade das formulações lipossomais de RAPA e/ou RESV.....	71
8.1 Internalização Celular por Citometria de Fluxo	74
9.0 Conclusões.....	76
9.1 Considerações finais	77
10. Referências Bibliográficas.....	78

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura Química da Rapamicina.	20
Figura 2: Estrutura Química do Resveratrol.	23
Figura 3: Distribuição de tamanho vesus % Intensidade para amostras do Lipossomas vazio após 1h de homogeneização no turrax.....	41
Figura 4: Sequencialmente: Lipossomas vazio; Lipossoma com RAPA; Lipossoma com RESV e Lipossoma com RAPA e RESV.	41
Figura 5: Lipossoma após 24h do preparo respectivamente: composto de PC+Água para Injetáveis e Lipossomas composto de PC+ Vitamina E + Vitamina C +Água para Injetáveis.	42
Figura 6: Fotografia do aspecto das suspensões de lipossomas após 30 dias do preparo constituídas de PC+ Vitamina E + Vitamina C +água para injetáveis (à esquerda) e PC+Água para injetáveis (à direita).	43
Figura 7: Diâmetro Hidrodinâmico Médio (DHM) durante 60 dias no LV:Lipossoma Vazio; LRAPA: Lipossoma Rapamicina; LRESV: Lipossoma Resveratrol; LRR: Lipossoma Rapamicina Resveratrol.....	47
Figura 8: Índice de Polidispersão (IPD) obtidos durante 60 dias no LV:Lipossoma Vazio; LRAPA: Lipossoma Rapamicina; LRESV: Lipossoma Resveratrol; LRR: Lipossoma Rapamicina Resveratrol.....	47
Figura 9: Potencial Zeta (PZ) obtidos durante 60 dias para as formulações: LV:Lipossoma Vazio; LRAPA: Lipossoma Rapamicina; LRESV: Lipossoma Resveratrol; LRR: Lipossoma Rapamicina Resveratrol.....	48
Figura 10: % de teor de fármaco realizadas durante a estabilidade com 1, 30 e 60 dias nos: LRAPA: Lipossoma Rapamicina; LRESV: Lipossoma Resveratrol; LRR: Lipossoma Rapamicina Resveratrol.....	48
Figura 11: Cromatograma do RESV com Tempo de Retenção de 2.922 minutos detecção no comprimento de onda de 305,7nm	49
Figura 12: Espectro UV do Resveratrol obtido pelo detector DAD no CLAE.	49
Figura 13: Cromatograma do RAPA com Tempo de Retenção de 8.378 minutos detecção no comprimento de onda de 277,1nm.	50
Figura 14: Espectro UV da RAPA obtido pelo detector DAD no CLAE.	50
Figura 15: Curva Analítica do RESV obtida por CLAE onde o eixo Y= área cromatográfica e o eixo X Concentração em µg/mL.....	51
Figura 16: Curva Analítica do RAPA obtida por CLAE onde o eixo Y= área cromatográfica e eixo X Concentração em µg/mL.....	51
Figura 17: Curva Analítica do RAPA obtida por CLAE para quantificação no ensaio de liberação in vitro onde o eixo Y= área cromatográfica e eixo X Concentração em µg/mL.....	52
Figura 18: Curva Analítica do RESV obtida por CLAE para quantificação no ensaio de liberação in vitro onde o eixo Y= área cromatográfica e eixo X Concentração em µg/mL.....	52
Figura 19: Cromatograma da Acetonitrila sem interferentes em 277,1nm e 306,1nm.	53
Figura 20: Cromatograma da Acetonitrila com PBS pH 7,4 e lauril sulfato de sódio a 2% sem interferentes em 277,1nm e 305,6nm.	53
Figura 21: Cromatograma lipossoma vazio sem interferentes em 305,6nm.	54
Figura 22: Cromatograma lipossoma vazio em 277,1 nm.	54
Figura 23: Perfil do DSC obtido da RAPA.....	61
Figura 24: Perfil do DSC obtido do RESV	61
Figura 25: Perfil do DSC obtido lipossoma vazio.....	62
Figura 26: Perfil do DSC obtido lipossoma com RAPA.....	62

Figura 27: Perfil do DSC obtido lipossoma com RESV.	63
Figura 28: Perfil do DSC obtido lipossoma com RAPA e RESV.....	63
Figura 29: Imagem dos lipossomas obtidas na Microscopia Eletrônica Transmissão.	65
Figura 30 : Perfil de Liberação da RAPA livre e da RAPA lipossomal.	67
Figura 31: Perfil de Liberação do RESV livre e do RESV lipossomal.....	68
Figura 32: Perfil de Liberação da RAPA e do RESV em associação e da RAPA e do RESV lipossomal.....	68
Figura 33: Viabilidade Celular nas concentrações de 4.5, 9.1, 13.6, 22.7, 45.5 e 91 μ M de RESV. (*) diferença estatística LIP: lipossomas.....	73
Figura 34: Viabilidade Celular nas concentrações de 1,2,3,5,10,20 μ M de RAPA. (*) diferença estatística LIP: lipossomas.....	73
Figura 35: Controle Negativo e Internalização dos Lipossomas nas células MCF7. Q1: células mortas; Q2: Células mortas com lipossomas internalizados, Q3: Células Vivas, Q4: Células vivas com lipossomas internalizados.....	74

Índice de Tabelas

Tabela 1 Parâmetros cromatográficos utilizados na validação analítica da RAPA e RESV...	31
Tabela 2: Condições cromatográficas que foram variadas.	34
Tabela 3: Combinações realizadas das condições nominais com as condições variáveis, as letras maiúsculas de A a G representam as condições Nominais e as respectivas letras minúsculas representam as condições variáveis.	34
Tabela 4: Diâmetro Hidrodinâmico Médio (DHM); Índice de Polidispersividade (IPD); Potencia Zeta (PZ) medidos após 24horas, 30 dias e 60 dias do preparo da formulação.....	39
Tabela 5: Diâmetro Hidrodinâmico Médio (DHM); Índice de Polidispersividade (IPD); Potencial Zeta (PZ) medidos após 24horas e 30 dias do preparo das formulações.....	43
Tabela 6: Valores de DHM, IPD e PZ obtidos dos lipossomas durante 60 dias.	45
Tabela 7: Resultado obtidos nas análises de recuperação da RAPA	55
Tabela 8: Resultado obtidos nas análises de recuperação da RESV.	55
Tabela 9: Precisão Intermediária do RESV obtidas em análises em diferentes dias.....	56
Tabela 10: Precisão Intermediária do RESV obtidas em análises em diferentes dias.....	56
Tabela 11: Robustez analítica do Resveratrol	57
Tabela 12: Robustez analítica da Rapamicina.....	58
Tabela 13: Concentração total de fármaco e eficiência de encapsulação (%).	58
Tabela 14: Valores de ΔH obtidos nas análises de DSC.	60
Tabela 15: Diâmetro Hidrodinâmico Médio (DHM) e Concentração de Partículas realizadas no NTA.....	64
Tabela 16: Resultados obtidos no teste de solubilidade	66
Tabela 17: Modelos matemáticos e seus respectivos coeficientes de determinação R^2 utilizados para determinar a cinética de liberação.....	69
Tabela 18: Tabela com as concentrações de IC_{50} . LV: lipossoma vazio; LRAPA: lipossomas com RAPA; LRESV: lipossomas com RESV; LRR: lipossomas com RAPA e RESV.	73

Índice de Equações

Equação 1: $DPR = (\text{Desvio Padrão} / \text{Média das Concentrações obtidas}) * 100$	32
Equação 2: $\text{Recuperação} = (\text{Concentração Média Experimental} * 100) / \text{Concentração Teórica}$	32
Equação 3: Limite de Detecção = $3,3 \sigma / (\text{Inclinação da curva})$	32
Equação 4: Limite de Detecção = $10 \sigma / (\text{Inclinação da curva})$	33
Equação 5: $A/a = (\text{a soma de todos os resultados com } A/4) - (\text{a soma de todos os resultados com } a/4) $	34
Equação 6: $EE (\%) = [(\text{quantidade de fármaco na fração lipossômica}) * 100] / (\text{quantidade total de fármaco encontrada no lipossoma total})$	35
Equação 7: Equação definida por Korsmeyer-Peppas para cinética de liberação dos fármacos.	69
Equação 8: Equação utilizada para o modelo matemático cinético de primeira ordem.	70

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial

IPD: Índice de Polidispersão

ATCC: *American Type Culture Collection*

CH: Colesterol

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD: Arranjo de Diodos

DHM: Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio Índice de Polidispersão

DPR: Desvio Padrão Relativo

EE: Eficiência de Encapsulação

h: Horas

HR-TEM: Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução

LRAPA: Lipossomas com Rapamicina

LRESV: Lipossomas com Resveratrol

LV: Lipossomas Vazio

p/v: peso/volume

PBS: Tampão Fosfato

PC: Fosfatidilcolina de Soja

PZ : Potencial Zeta

RAPA: Rapamicina

RESV: Resveratrol

SDS: Lauril Sulfato de Sódio

Agradecimentos

Agradeço à Deus pela minha VIDA e por exatamente TUDO que vivenciei até chegar neste grande PRESENTE HOJE!

Meu muito OBRIGADA POR TUDO aos meus PAIS e toda minha ANCESTRALIDADE por tudo que fizeram para que a VIDA chegasse até mim. À todas as matriarcas analfabetas da minha família este doutorado é dedicado a vocês que são minha inspiração de força, garra e inteligência.

Agradeço ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, por fazer parte do PROGRAMA de NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA e pela oportunidade de ser orientada por ti, muito obrigada de todo coração pela atenção dedicada, pela orientação, pela sensibilidade, pela excelência com muita eficiência em seu trabalho, minha eterna GRATIDÃO. Agradeço por ser o anfitrião na abertura das portas da FCFAR na UNESP, agradeço também a esta grande instituição pela oportunidade de crescimento.

À Professora Dra. Maria Palmira Daflon Gremião por compartilhar vosso conhecimento e disponibilizar o laboratório e os equipamentos durante o período de realização deste trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Viviane Aline Oliveira Silva pela co-orientação por fazer parte no nosso projeto, pela dedicação em tornar realidade este sonho.

Meu MUITO OBRIGADA é também para os amigos de laboratório: Eliete Von Zuben, Maurício Palmeira, Mariza Aires, Amanda Silvestre, Bruno Fonseca, Jonatas Lobato, Leonardo Delello, Bruno Fiod, Andressa Pironi, Francesca Victorelli, Franciele Baveloni, Victor Hugo, Rafael Miguel, Marcela Tavares, Camila Roderio, Taís Ribeiro, Leda Robusti, Fernanda Boni, Amélia Roca, Gabriel Marena, Gabriela Carvalho, Aline Martins dos Santos, Suzana Carvalho, Bruna Furquim, Mateus Ramos, Lígia Fernandes, Larissa Spósito, Paula Scanavez, Andréia Meneguim, Agnes Magri obrigada pelo convívio, obrigada pela disponibilidade e MUITO OBRIGADA pela AJUDA que COLABOROU para tornar realidade este trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado que permitiu minha dedicação para realizar este trabalho e corroborar com a expansão e consolidação da pós-graduação stricto sensu em nosso país.

Muito OBRIGADA as psicólogas e terapeutas: Ana Lúcia Braga, Denise Ulian, Juliana Guimarães, Emiliana Abrão, Rosa Silvestre, Ivaneide Bruno, Fabiana Oliveira, Bruna Hosaki, Ingrid Simielli sem palavras para expressar meu ETERNO MUITO OBRIGADA.

MUITO OBRIGADA à Banca Examinadora pela disponibilidade em agregar vossos conhecimentos e potencializar nossos resultados.

*“Me levanto sobre o sacrifício
de um milhão de mulheres que vieram antes e penso:
O que é que eu faço para tornar esta montanha mais alta
para que as mulheres que vierem depois de mim possam ver além?”*

Rupi Kaur

*“Eu me levanto Trazendo comigo o dom de meus antepassados,
Eu carrego o sonho e a esperança do homem escravizado.
E assim, Eu me levanto, Eu me levanto, Eu me levanto. ”*

Maya Angelou

RESUMO

Considerando os principais tipos de câncer diagnosticados com mais frequência está o câncer de mama, que afeta principalmente as mulheres. Foram estimados em 2020 no Brasil, 66.280 novas ocorrências de câncer de mama. A rapamicina (RAPA) é um fármaco que pode ser empregado na terapia do câncer de mama, como inibidor da rede de sinalização mecânica do mTOR membro da família da proteína quinase relacionada à fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que é comumente desregulada no câncer de mama, especialmente em tumores ER-positivos. Apesar da efetividade, este fármaco é instável, possui baixa solubilidade aquosa, podendo promover resistência no tratamento mediante sua utilização. Uma estratégia a ser utilizada na tentativa de diminuir essa resistência ao tratamento é a associação com moléculas com potencial antitumoral que atuem de forma sinérgica com a RAPA, como o *trans*-resveratrol (RESV), que mantém a inibição da sinalização da proteína mTORC1, ao mesmo tempo que impede a regulação positiva da ativação de AKT e a autofagia, promovendo apoptose nas células cancerígenas. Embora o RESV apresente bioatividade, sua biodisponibilidade é baixa. Desta forma, considerando as características de ambas as moléculas, a coencapsulação em sistemas nanoestruturados, como lipossomas, torna-se uma interessante ferramenta, pois, não há até o momento na literatura descrita a associação destas moléculas em sistemas nanoestruturados. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar o potencial *in vitro* de lipossomas contendo RAPA e RESV na terapia do câncer de mama. Utilizando a metodologia de homogeneização de alta pressão foi possível obter lipossomas acrescidos de RAPA e RESV, associados ou não, com diâmetro hidrodinâmico na faixa de 75-99 nm. Análises de NTA e microscopia eletrônica de transmissão sugerem tamanho aproximado de 135nm e 100nm, respectivamente, para as diferentes composições estudadas. A eficiência de encapsulação (EE%) das formulações obtidas foi de aproximadamente 63 a 76%. O índice de polidispersão das formulações foi menor que 0,250 e o potencial zeta na faixa de -15,40 a -18,66 mV. O método analítico desenvolvido possibilitou analisar simultaneamente a RAPA e o RESV, apresentando-se linear, seletivo, robusto e preciso. No ensaio de liberação *in vitro*, após 72h de ensaio, observou-se a liberação de $21,92 \pm 1,87\%$ e $30,99 \pm 3,72\%$ de RAPA e RESV, respectivamente, associado nos lipossomas. Os ensaios de viabilidade celular evidenciaram que a formulação de lipossomas vazios não apresentou citotoxicidade frente às células MCF7 e que os lipossomas contendo os fármacos co-encapsulados apresentaram citotoxicidade maior que para os fármacos livres. Os resultados de citometria de fluxo

demonstraram a internalização de 34,2% de lipossomas nas células da linhagem MCF-7. Em conjunto, as abordagens desenvolvidas no presente estudo sugerem o potencial do sistema como terapia adjuvante no tratamento do câncer de mama. Ensaios *in vivo* serão necessários para melhor verificação da eficácia do sistema obtido.

Palavras chave: Rapamicina, Resveratrol, Lipossomas, Câncer de Mama.

ABSTRACT

Among the main types of cancers most commonly diagnosed is breast cancer, covering mainly women. In 2020, 66,280 new cases of breast cancer were estimated in Brazil. Rapamycin (RAPA) is a drug that can be used in breast cancer therapy as an inhibitor of the mTOR mechanistic signaling network, a member of the phosphatidylinositol 3-kinase protein kinase family (PI3K), which is commonly deregulated in breast cancer, especially in ER-positive tumors. Despite the effectiveness of RAPA in breast cancer, this drug is unstable, has low aqueous solubility, and can promote resistance in the treatment through its use. One strategy to be used in an attempt to reduce this resistance to treatment is the association with molecules with antitumor potential that act synergistically with RAPA. Among these molecules, trans-resveratrol (RESV) stands out, which maintains the inhibition of mTORC1 protein signaling, while preventing the upregulation of AKT activation and autophagy, promoting apoptosis in cancer cells. Despite the bioactivity of RESV, its bioavailability is low. Thus, considering the characteristics of both molecules, coencapsulation in nanostructured systems, then now there is no literature associating these molecules in nanostructured systems such as liposomes, becomes an interesting tool in antitumor therapy. In this sense, the objective of this work was to develop, characterize and evaluate the *in vitro* potential of multifunctional liposomes containing RAPA and RESV in breast cancer therapy. Using the high-pressure homogenization methodology, it was possible to obtain liposomes added with RAPA and RESV, associated or not, with a hydrodynamic diameter in the range of 75-99 nm. NTA and transmission electron microscopy analyzes suggest an approximate size of 135nm and 100nm, respectively, for the different compositions studied. The encapsulation efficiency (EE%) of the formulations obtained was approximately 63 to 76%. The polydispersity index of the formulations was less than 0.250 and the zeta potential ranged from -15.40 to -18.66 mV. The analytical method developed made it possible to analyze the drug RAPA and RESV simultaneously, presenting themselves as linear, selective, robust, and accurate. In the *in vitro* release assay after 72 hours of testing, the release of $21.92 \pm 1.87\%$ and $30.99 \pm 3.72\%$ of RAPA and RESV associated in the liposomes. Cell viability assays against a formulation of empty liposomes did not show MCF7 cytotoxicity and the liposomes loaded with the drugs showed cytotoxicity similar to the solution containing both drugs and higher than for the free drugs. In addition, flow cytometry results demonstrated the cellular internalization of 34.2% of liposomes in MCF7 cells. Taken together, the approaches developed in the present study suggest the potential of the system as

adjuvant therapy in the treatment of breast cancer. *In vivo* assays will be necessary to better verify the efficiency of the obtained system.

Keywords: Rapamycin, Resveratrol, Liposomes, Breast Cancer.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Mama

O câncer é uma doença causada por múltiplos fatores de risco, tais como idade, obesidade, alimentação inadequada, problemas endócrinos, fatores ambientais, comportamentais e principalmente herança genética, os quais colaboram para que ocorram mutações gênicas na replicação celular, resultando no crescimento celular desordenado chamado de neoplasia, que pode ser benigna ou maligna (INCA 2011; *World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research* 2007). O tumor benigno normalmente possui um crescimento lento, organizado, expansivo, com limite bem definido; portanto, não é invasivo, mas pode deprimir tecidos e órgãos adjacentes, enquanto que o câncer maligno é invasivo pode migrar, proliferar rapidamente, e causar metástase em outros órgãos e tecidos (INCA, 2011).

Segundo Ferlay et al. (2019), o GLOBOCAN da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, estimou que por ano 9,6 milhões de pessoas morrem por causa do câncer e dentre os principais cânceres mais comumente diagnosticados está o câncer de mama (15%), abrangendo principalmente as mulheres.

Considerando o período de 2020 a 2022, há uma estimativa de 66.280 novos casos de câncer de mama no Brasil por ano. Esse valor corresponde a 29% de casos novos de câncer, quando contabilizada a estimativa do total de neoplasias (INCA, 2020).

A sobrevida média de mulheres acometidas pelo câncer de mama, após cinco anos do diagnóstico, é de 61%, sendo que pode ser ainda menor a taxa de sobrevida em pacientes com diagnóstico de câncer de mama com metástase (DIAS et al., 2018; ACS, 2015).

O câncer de mama normalmente promove mais mortes, devido à dificuldade de detecção da metástase inicial, que favorece a invasão para outros órgãos e tecidos, causando assim severos danos e consequente morte da paciente (MARSDEN et al., 2012; ALLAN et al., 2008). Contudo, destaca-se a importância da realização de exames precoces, tais como mamografia e em alguns casos a biópsia, de forma a identificar o estágio da doença e ter mais chances de cura com a devida terapia (PASHAYAN et al., 2020; TRUFELLI et al., 2008).

Dentre os fatores de risco para o câncer de mama tem-se: predisposição genética, obesidade, pós-menopausa, distúrbios endócrinos, ingestão de álcool e sedentarismo (INUMARU et al., 2011).

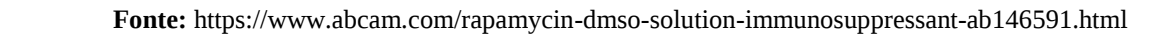
O tratamento para o câncer de mama é complexo, podendo ser iniciado por intervenção cirúrgica para realização da mastectomia total ou parcial com remoção dos gânglios linfáticos de regiões adjuntas. Também pode incluir o tratamento radioterápico, quimioterápico, imunoterápico, terapias citotóxicas, hormonais, entre outras (TANAKA et al., 2009).

No caso do câncer de mama, há divisões por categoria baseadas em suas características clínicas, expressão de marcadores tumorais e seu tipo histológico (JAFARI et al. 2022, LI et al. 2005).

A avaliação e identificação dos marcadores tumorais específicos auxiliam no diagnóstico e no tratamento do câncer de mama. Dentre os principais marcadores estão: receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor epidérmico humano 2 (HER2) e a combinação destes marcadores como RE+ (RE+/ HER2-), HER2+ (RE-/HER2+), triplo negativo (RE-RP-HER2-) e triplo positivo (RE+RP+HER2+), tornando assim subclassificações bem específicas (JAFARI et al. 2022, BERTOS & PARK 2011).

Para câncer de mama que expressa marcadores RE é possível utilizar o tratamento hormonal ou anti-estrogênico, considerando os inibidores de aromatase ou antagonista de RE, como o tamoxifeno, que reduzem consideravelmente possíveis reincidências e mortalidade que podem ser causadas pela doença (JORDAN; BRODIE, 2007). Quando o tratamento hormonal torna resistente em casos positivos para receptores hormonais, ou até mesmo em câncer de mama diagnosticado como triplo negativo, pode ser utilizada a quimioterapia que reduz o tumor com relativa rapidez; em contrapartida, a paciente sofre muitos efeitos colaterais, pois normalmente este tratamento destrói também as células saudáveis, sendo pouco seletivo a neoplasias. Desta forma, justifica-se a necessidade de novos tratamentos ou adjuvantes com maior seletividade às células tumorais (TESTA & MANO, 2010; MUSGROVE & SUTHERLAND, 2009).

Dessa forma, a rapamicina (RAPA), é um fármaco promissor que atua na proteína mTOR, especificamente no complexo mTOR1, um membro da família da proteína quinase relacionada à fosfatidilinositol 3- quinase (PI3K), que é comumente desregulada no câncer de mama, especialmente em tumores RE positivos (OZATES et al.2021) (Figura 1).



A RAPA está atualmente aprovada para uso oral na forma farmacêutica de comprimidos com a dosagem de 1mg ou 2mg, e em solução oral na concentração de 1mg/mL com o nome comercial de Rapamune[®]. Sua biodisponibilidade oral é de 14%. É utilizada como um fármaco imunossupressor na prevenção da rejeição de transplantes de órgãos, tratamento de doentes com linfangioleiomiomatose (LAM), uma doença dos pulmões progressiva e rara, que afeta mulheres em idade fértil e como um adjuvante terapêutico após a colocação de certos stents coronários (EMEA 2021; DUPONT & WARRENS 2003; MOSES et al., 2003).

Além de suas propriedades imunossupressoras, verificou-se que a RAPA também possui atividade antiinflamatória, antifibrótica, antiproliferativa e antiangiogênica, sendo assim uma alternativa promissora no tratamento do câncer de mama (SHAPIRA et al., 2006; MONDESIRE, et al., 2004).

A proteína mTOR atua na formação de dois complexos, mTORC1 e mTORC2. A sinalização de mTOR é conhecida por ser um regulador central do crescimento, proliferação, metabolismo e sobrevivência celular, podendo ser ativada de forma irregular durante processos celulares como formação de tumor e angiogênese, causando doenças como câncer e diabetes tipo 2. Esta função irregular de mTOR é um dos principais motivos na patogênese do câncer, assim sendo, os processos oncogênicos de mTOR podem ser inibidos pela RAPA (SAXTON & SABATINI 2017). A RAPA possui capacidade de formar um complexo intracelular com FKBP-12 (FK506-binding Protein-12) que se liga ao domínio FRB (FKB12-rapamycin binding) da proteína mTOR, que induz a apoptose celular e reduz os fatores de crescimento tumoral (ARRIOLA & LAMMING 2016; LIU et al., 2012; ZHOU et al., 2010; LIU et al., 2009). Estudos utilizando a RAPA para avaliar a concentração necessária que inibe o crescimento da célula de câncer de mama (MDA-MB-231) revelaram que após 24h, a concentração de 100 nM de RAPA em contato com a célula MDA-MB-231 (5×10^5 cels/mL) causou 85% de inibição da cascata e diminuição da fase celular G1, demonstrando que a RAPA possui uma atividade significativa sobre as células de câncer de mama (ADVANI et al., 2010; SHAPIRA et al., 2006).

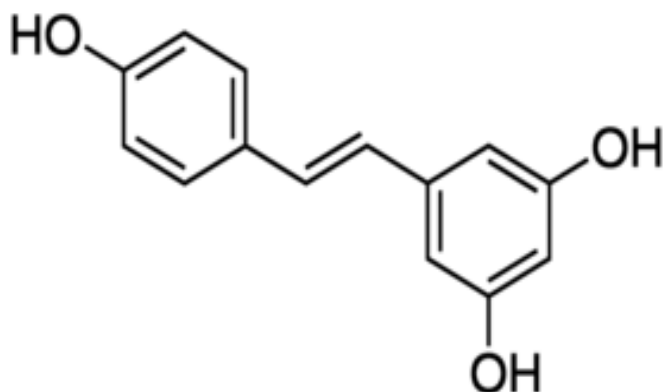
Apesar da efetividade da RAPA no câncer de mama, este fármaco é instável, têm baixa solubilidade aquosa e pode causar resistência ao tratamento, devido à ativação da sinalização AKT oncogênica e a regulação positiva da autofagia, que protege as células cancerosas da apoptose (ZHANG et al., 2016; LIN et al., 2015; MITA et al., 2003).

Grande parte dos estudos sobre a via mTOR no tratamento do câncer é direcionado principalmente a RAPA e seus derivados tais como everolimus e tensirolimus, que são

conhecidos por inibir seletivamente mTORC1. Todavia, a eficácia da monoterapia da RAPA e seus derivados é limitada, pois, a inibição de mTORC2 pela RAPA não impede o aumento da fosforilação da proteína AKT, favorecendo assim a resistência ao fármaco (FELDMAN et al., 2009). Esta resistência pode ocorrer devido ao fato de que a RAPA não bloqueia completamente o mTORC1 e por consequência é incapaz de inibir efetivamente o mTORC2 para desencadear a ativação da sinalização de AKT e atenuar a atividade antitumoral (HSIEH et al., 2010).

Num estudo de tratamento de mieloma múltiplo (câncer hematológico), observou-se que a associação de RAPA com o composto resveratrol (RESV) foi eficaz em inibir a proliferação e aumentar a apoptose celular, uma vez que o composto inibe de forma eficaz a sinalização de mTORC2 (JIN et al. 2018). ALAYEV et al. (2015) verificaram que a combinação do RESV com a RAPA impede o mecanismo de resistência ao tratamento da RAPA no câncer de mama, pois, mantém a inibição da sinalização mTORC1, ao mesmo tempo que impede a regulação positiva da ativação de AKT promovendo apoptose nas células cancerígenas. PARK et al. 2016 verificaram que o RESV induz a autofagia e inibe a atividade do mTOR em células de câncer de mama da linhagem MCF-7.

O RESV (Figura 2) é um composto natural que em estudos apresentou vários efeitos antitumorais, atuando desde a gênese tumoral até a sua progressão. Dentre os resultados obtidos com o RESV estão: o aprisionamento do ciclo celular levando as células tumorais a apoptose, a ação antioxidante prevenindo os danos no DNA das células saudáveis, a prevenção da expressão da síntese de óxido nítrico derivado da neoplasia e supressão da atividade de ligação no DNA do fator nuclear κB (NF- κB) em células cancerígenas. Este é um fator de transcrição conhecido por *upregulated* em cânceres e pode impulsionar a transcrição de genes que promovem o crescimento tumoral. O RESV colabora para bloquear este crescimento e migração do tumor (BENITEZ et al. 2009; CSAKI et al., 2009; ROY et al., 2009; KALRA et al., 2008; GARVIN et al., 2006; MURAKAMI et al., 2003; NAKAGAWA et al., 2001; HOLMES-MCNARY & BALDWIN 2000; TSAI et al., 1999; CLEMENTE et al., 1998).



Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/r5010>

Figura 2: Estrutura Química do Resveratrol.

Embora a bioatividade do RESV, sua biodisponibilidade é baixa (TOME-CARNEIRO et al.2013). Uma melhor eficácia na entrega e ou efeito de agentes antineoplásicos tem sido obtida com a utilização de nanopartículas naturais ou sintéticas, como lipossomas, o qual vem se tornando uma área promissora na bio-nanomedicina. Sendo assim, justifica-se como estratégia ao tratamento a associação da RAPA com o RESV em sistemas nanoestruturados, de forma a possibilitar a incorporação destes fármacos e aumentar a biodisponibilidade (WANG & THANOU, 2010). Além disso, há um grande interesse em compostos naturais bioativos para quimioterapia e quimioprevenção em vários tipos de câncer com um foco para o desenvolvimento e consequente utilização terapêutica de nanoformulações (NAVYA et al. 2019).

Estudos verificaram o papel citotóxico do resveratrol encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) contra células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231 e constataram uma diminuição da viabilidade celular, a indução da apoptose e a parada do ciclo celular em G0/G1 (MEDINA-AGUILAR et al. 2016).

Meng et al. (2016) utilizaram RESV associado a paclitaxel em lipossomas e obtiveram reversão da resistência do tratamento com paclitaxel em células de câncer de mama.

1.3 Lipossomas

A quimioterapia é um tratamento usado para muitos tipos de câncer. No entanto, tem limitações significativas, como falta de especificidade, efeitos colaterais tóxicos e

desenvolvimento de resistência a medicamentos. (BAKHSHAIESH et al. 2015; GHANBARI et al. 2014).

A maioria dos fármacos para o tratamento quimioterápico contra neoplasias atua sistemicamente de forma inespecífica. Essa biodistribuição do fármaco resulta em ação farmacológica anticâncer e também potencializa a ocorrência de efeitos adversos. A terapia combinada, usando a associação de diferentes fármacos, é utilizada como uma estratégia sinergicamente favorável para o tratamento do câncer. As vantagens da terapia combinada são corroboradas por estudos clínicos que mostram efeitos sinérgicos com maior eficácia que quando comparado a eficácia terapêutica de cada fármaco isolado (GHASEMI et al.2013; BORISY et al.2003). Embora a coadministração de fármacos quimioterápicos potencialize a ação antineoplásica, sua utilização é principalmente prejudicada pela ação inespecífica dos fármacos nos tecidos onde prevalece o câncer, exigindo altas doses, porém com baixa solubilidade e biodisponibilidade inadequada. Portanto, para reduzir as dificuldades associadas às quimioterapias tradicionais e associações, é importante o desenvolvimento de um sistema de liberação de fármacos que possa potencializar o efeito terapêutico dos fármacos e, reduzir ou até mesmo evitar seus efeitos adversos (CAMERON et al., 2016)

Neste contexto, os sistemas nanoestruturados estão sendo pesquisados para o tratamento de neoplasias, dentre eles lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, sistemas poliméricos, micelas, dendrímeros, nanocápsulas, carreadores lipídicos nanoestruturados, nanoesferas e sistemas inorgânicos (WANG; THANOU, 2010).

Os lipossomas são vesículas compostas por uma ou mais camadas concêntricas lipídicas, denominadas como unilamelares ou multilamelares, com capacidade de encapsular tanto fármacos hidrofílicos quanto lipofílicos. Esses carreadores têm recebido grande atenção no que diz respeito ao uso como sistemas de liberação de fármacos, uma vez que possuem alta biocompatibilidade e longo tempo de circulação no organismo permitindo a administração de doses muito menores do fármaco, resultando em diminuição da cardiotoxicidade (MALAM et al., 2009). Além disso, os lipossomas podem fornecer proteção contra a fotodegradação de vários fármacos e produtos bioquímicos, como por exemplo, o RESV encapsulado em lipossomas permaneceu íntegro quando exposto à luz UV em comparação com o fármaco livre (COIMBRA et al. 2011).

Os lipídeos mais utilizados nas formulações de lipossomas são as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomielina, que tendem a formar uma bicamada estável em meio aquoso. Geralmente, as fosfatidilcolinas são mais utilizadas em estudos de formulação

de lipossomas, devido à sua semelhança estrutural com os fosfolipídios da membrana celular, sendo um fosfolipídeo interessante para ser usado no desenvolvimento de formulações quimioterápicas, uma vez que pode favorecer o aumento da atividade antitumoral. Além disso, apresentam estabilidade frente a variações de pH ou em meios salinos. Os fosfolipídeos são caracterizados por uma temperatura de transição, na qual a membrana passa de uma fase sólida para uma fase de cristal-líquido onde a cadeia de hidrocarbonetos do lipídeo fica numa estrutura molecular ordenada, com movimentos mais livres e os radicais hidrofílicos ficam agrupados de forma a facilitar a hidratação destes (LLADÓ et al. 2014, BATISTA et al. 2007, LASIC 1998)

A quantidade de bicamadas fosfolipídicas afeta a quantidade fármaco a ser encapsulado nos lipossomas. O tamanho do lipossoma pode variar de vesículas muito pequenas (25 nm) a grandes (2,5 µm). Além disso, com base no tamanho e número de bicamadas, os lipossomas são agrupados em dois tipos: vesículas unilamelares e vesículas multilamelares (MUV). As vesículas unilamelares também podem ser classificadas em dois subgrupos: vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes (LUV). Em lipossomas unilamelares, a vesícula tem uma única bicamada fosfolipídica esférica; em lipossomas multilamelares, as vesículas têm uma estrutura semelhante a cebola, ou seja, várias vesículas unilamelares serão formadas dentro da outra vesícula, formando uma estrutura multilamelar de esferas fosfolipídicas concêntricas separadas por moléculas de água (AKBARZADEH et al., 2013).

Os lipossomas apresentam várias características distintas em comparação com outros sistemas de liberação de fármacos, incluindo biocompatibilidade pois sua composição é similar a da célula, capacidade de carregar compostos hidrofílicos e hidrofóbicos e melhorar sua solubilidade, capacidade de proteger de agentes externos as substâncias encapsuladas, a capacidade de reduzir a toxicidade do fármaco encapsulado e reduzir a quantidade a ser administrada, além da capacidade de direcionamento ao local específico e melhora na penetração nos tecidos. Certamente, dentre os sistemas de entrega, os lipossomas são o tipo de nanopartícula mais versátil, uma vez que têm a capacidade de entregar vários compostos e macromoléculas biologicamente ativas (MUKHERJEE et al., 2015, NASERI et al., 2015, TORCHILIN et al., 2005).

Os lipossomas podem ser direcionados passivamente através de PEG para promover a endocitose mediada por receptores ligantes de direcionamento ativos, tais como anticorpos, peptídeos, proteínas e carboidratos (ARGENZIANO et al., 2021).

Os sistemas *co-delivery* consistem na encapsulação de múltiplas substâncias resultando em uma ação sinérgica, de forma que atuam por mecanismos de ação diferentes e geram terapias inovadoras que são mais eficazes, menos invasivas e menos tóxicas que as convencionais (TORCHILIN, 2014; SRINIVASAN et al., 2015).

Estudos recentes indicam que as formulações com associações de fármacos em sistemas baseados em lipossomas aumentam os efeitos antitumorais dos fármacos, pois os lipossomas podem acumular-se no local do tumor pelo efeito de aumento da permeabilidade e retenção (EPR) e liberar uma quantidade de fármaco relativamente alta na célula tumoral, este fato, pode sobrecarregar os mecanismos de efluxo de fármaco das células cancerígenas, aumentando assim o efeito antitumoral do fármaco e corroborando com a apoptose de células tumorais. Além disso, o sistema *co-delivery* lipossomal de associação de fármacos quimioterápicos pode destruir a resistência da célula cancerosas aos medicamentos (ELOY et al., 2016, ALAYEV et al., 2015, LEE & NAN 2012, XIN et al., 2011)

2.0 Justificativa

O câncer de mama é um dos principais problemas de saúde pública mundial. Apesar da existência de tratamentos para o câncer de mama, algumas barreiras precisam ser solucionadas, tais como o diagnóstico tardio na fase mais avançada e efeitos secundários indesejáveis causados pelos agentes quimioterápicos, resistência do tumor ao tratamento, resultando em um tratamento inconveniente. Uma estratégia importante para atenuar ou impedir a resistência tumoral aos tratamentos, é a associação de fármacos antitumorais que tenham efeitos sinérgicos. Os sistemas *co-delivery* consistem em ferramentas capazes de promover a encapsulação de múltiplas substâncias resultando em uma ação sinérgica, representando, portanto, terapias inovadoras que são mais eficazes, menos invasivas e menos tóxicas que as convencionais. Dentro deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar o potencial do lipossomas *co-delivery* do fármaco RAPA e do RESV como estratégia para facilitar a ação sinérgica, possibilitando a liberação no local de ação, reduzindo efeitos colaterais e aumentando a eficácia terapêutica das moléculas na terapia do câncer de mama.

3.0 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar o efeito biológico *in vitro* do sistema de lipossomas para *co-delivery* de RAPA e RESV com potencial aplicação na terapia adjuvante do câncer de mama.

3.1 Objetivos específicos

- Desenvolver e caracterizar os lipossomas incorporados com RAPA e/ou RESV;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação da RAPA e do RESV por Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar a eficiência de incorporação nos lipossomas de RAPA e/ou RESV;
- Realizar estudos físico-químicos para caracterização dos lipossomas: determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, potencial zeta, eficiência de encapsulação, microscopia eletrônica de transmissão, análise de calorimetria exploratória diferencial e análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA);
- Realizar estudos de liberação *in vitro* de RAPA e/ou RESV dos lipossomas;
- Avaliar o efeito biológico *in vitro* da incorporação dos fármacos, RAPA e/ ou RESV em lipossomas na viabilidade de células tumorais de mama;
- Avaliar a internalização celular dos lipossomas.

4.0 Materiais e Métodos

4.1 Desenvolvimento dos Lipossomas com RAPA e/ou RESV

Os lipossomas foram preparados conforme Eloy et al. (2017) e Meng et al. (2016), com adaptações. Fosfatidilcolina de soja (PC) e 1,2-distearoyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino (polietileno glicol) -2000] (DSPE-PEG2000) foram adquiridos da *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, AL, EUA), colesterol (CH) Sigma[®], α tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (Vitamina C), RESV (Infinity Pharma) e RAPA (Hubei Vanz Pharm Co., Ltda). Para desenvolver os lipossomas, verificou-se experimentalmente as razões molares (%) de 10:2:0,5, 10:2:1 e 10:2 de PC, CH e DSPE-PEG2000, respectivamente, sendo avaliada a estabilidade por 15 dias por meio da avaliação dos parâmetros de diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (PZ) e o aspecto da suspensão. Após determinar as razões molares de lipídios a serem utilizadas na preparação dos lipossomas, testou-se experimentalmente diferentes concentrações dos fármacos RAPA e RESV, até obter-se lipossomas sem fármacos precipitados e com melhor eficiência de encapsulação.

Durante o desenvolvimento dos lipossomas, foi necessário adicionar 100 mM de vitamina C e 70 nM de Vitamina E para proteger a PC do possível stress oxidativo (MURIPITI et al., 2019; RICHARD et al., 1997).

A técnica do preparo do lipossoma foi realizada conforme a metodologia de Brandl et al. (1993), com adaptações e em parceria da startup LIPID Ingredients & Technologies localizada em Ribeirão Preto/SP. A técnica consistiu em realizar inicialmente uma dispersão com todas as matérias-primas anteriormente citadas, tanto para desenvolver o lipossoma vazio (LV), como para desenvolver o lipossoma com a RAPA e/ou RESV, utilizando um agitador magnético a 60RPM e mantendo a temperatura da dispersão da suspensão de 55°C a 60°C por 1h. Após este período, a dispersão foi colocada no Ultra- Turrax[®] modelo T 25 marca IKA a 15.250 RPM com a temperatura de 60°C por 50 minutos, em seguida foram realizados 4 ciclos nos lipossomas com o homogeneizador de alta pressão Emulsiflex- C3, utilizando a pressão de 1500bar. Posteriormente, foi realizada a filtração do lipossoma utilizando um filtro de Politetrafluoroetileno (PTFE) estéril de 0,22 μ m utilizado como processo de esterilização do lipossoma (BARNADAS-RODRÍGUEZ R., SABÉS M. 2001, BRANDL et al. 1993, BETAGERI et al.,1993).

4.2 Caracterização físico-química das formulações

4.2.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), Índice de Polidispersão (IPD) e Potencial Zeta (PZ)

O DHM e o IPD das vesículas foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e o PZ pela técnica de mobilidade eletroforética utilizando o equipamento Zetasizer Nano NS (Supplier-Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). Ambas as medidas foram realizadas a temperatura 25°C. As amostras de suspensão lipossomal foram diluídas em água ultra-purificada (1:10), homogeneizadas no vórtex por 15 segundos mantidas em vial fechado. Aproximadamente 900µL da amostra diluída foram inseridos na cubeta e colocados na célula eletroforética. Para cada amostra foram realizadas 3 determinações DHM, IPD e PZ (NEMEN et al., 2011; BRAND et al 1993).

4.2.2 Estabilidade das Formulações

Para verificar a estabilidade das formulações foram realizadas análises de pH, DHM, IPD e PZ nos tempos 1, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 dias após o preparo das formulações. Para o teor de fármacos das formulações, as análises foram realizadas nos tempos 1, 30 e 60 dias. As formulações foram mantidas em refrigerador com temperatura de 2 a 8°C, durante todo o período da análise.

4.2.3 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação de RAPA e RESV utilizando CLAE

A validação da metodologia foi realizada conforme a RDC 166/17 (BRASIL, 2017) e ICH (2005), sendo avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. O equipamento empregado foi um CLAE do modelo Waters e2695 com detector de arranjo de diodos (DAD). O método analítico validado foi utilizado para a quantificação de RAPA e RESV em amostras de lipossoma total, no ensaio de eficiência de encapsulação e liberação *in vitro*. Realizou-se uma curva analítica de RAPA e RESV utilizando como solvente tampão fosfato pH 7,4, mantendo os mesmos parâmetros cromatográficos, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 Parâmetros cromatográficos utilizados na validação analítica da RAPA e RESV

Fase Móvel	Solução Aquosa com 2% de Ácido Acético(A):	
	Acetonitrila (B)	
	Tempo; Gradiente;	0 min a 3.09 min; 35% A: 65%B; 1mL/min
	Fluxo	3.10 min a 8.00min; 3% A: 97%B; 1,5mL/min
		8.01 min a 10 min: 35% A: 65%B; 1,5mL/min
Tempo de corrida	10 minutos	
Temperatura do Forno de Coluna	40°C	
Deteccção		
(Comprimento de Onda)	277,1nm (RAPA) e 305,6 (RESV)	
Volume de Injeção	10µL	
Coluna	C18 Eclipse XDB 4,6mm x 250mm, 5µm tamanho da partícula.	

4.2.4 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção de três curvas analíticas com sete níveis de concentrações da RAPA e do RESV em três dias diferentes. Foram preparadas soluções padrões nas seguintes concentrações tanto de RAPA como de RESV: 3,5 µg/mL, 4,0 µg/mL, 4,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 5,5 µg/mL, 6,0 µg/mL e 6,5 µg/mL utilizando-se acetonitrila como diluente. Para cada concentração foram realizadas três análises cromatográficas, nas quais as amostras foram previamente filtradas em membranas de 0,45µm antes de injetar no CLAE.

Realizou-se também a linearidade para quantificar os fármacos no ensaio de liberação *in vitro* e foram construídas as curvas analíticas nas concentrações de RAPA e RESV 0,6 µg/mL, 3,1 µg/mL, 6,3 µg/mL, 7,4 µg/mL e 9,3 µg/mL. A diluição das amostras foi em tampão fosfato (PBS) pH 7,40 com lauril sulfato a 2%. A partir dos valores médios das áreas e das concentrações testadas para três curvas foram determinadas a equação da reta com estudo de

regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e calculada por meio da análise da variância ANOVA, com nível $\alpha=0,05$ (95% do intervalo de confiança).

4.2.5 Seletividade

Realizou-se análises do lipossoma, da acetonitrila, do tampão fosfato pH 7,4 com lauril sulfato de sódio (SDS) 2% e a fase móvel para garantir que estes componentes não interferem nas análises quantitativas dos fármacos que foram analisadas no CLAE, nas condições cromatográficas descritas na Tabela 1, com o objetivo de verificar alguma interferência dos placebos nos cromatogramas dos fármacos.

4.2.6 Precisão Intermediária

A precisão intermediária foi realizada nas mesmas condições, em dias diferentes e consecutivos. A similaridade entre os resultados obtidos foi verificada, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) – Equação 1, que deve ser menor que 5.

Equação 1: $DPR = (\text{Desvio Padrão} / \text{Média das Concentrações obtidas}) * 100$

4.2.7 Exatidão

A exatidão foi determinada pela adição de RAPA e RESV no placebo do lipossoma nas seguintes concentrações: 4,0 µg/mL, 5,0 µg/mL e 6,0 µg/mL. As amostras foram preparadas em triplicata. O grau de concordância entre os resultados obtidos em relação aos valores teóricos foi avaliado através do cálculo de recuperação de acordo com a Equação 2:

Equação 2: $\text{Recuperação} = (\text{Concentração Média Experimental} * 100) / \text{Concentração Teórica}$

4.2.8 Limite de Detecção

O limite de detecção foi calculado baseado na obtenção de três curvas analíticas do fármaco, a partir da fórmula descrita na literatura (BRASIL, 2017), considerando o desvio padrão do intercepto (σ) e na inclinação da curva analítica. A fórmula usada para o cálculo está representada na Equação 3:

Equação 3: $\text{Limite de Detecção} = 3,3 \sigma / (\text{Inclinação da curva})$

4.2.9 Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi calculado baseado na obtenção de três curvas analíticas dos fármacos e a partir da fórmula descrita na literatura (BRASIL, 2017), considerando o desvio padrão do intercepto (σ) e na inclinação da curva analítica. A fórmula usada para o cálculo está representada na Equação 4:

$$\text{Equação 4: Limite de Detecção} = 10 \sigma / (\text{Inclinação da curva})$$

4.2.10 Robustez

A robustez é um parâmetro utilizado no desenvolvimento analítico para indicar a capacidade que o método tem em resistir a pequenas variações nas condições analíticas cromatográficas nominais (BRASIL, 2017). Para avaliar a robustez do método, usou-se o método proposto por Youden e Steiner (TAN; XU; ZHENG, 1995, YODEN 1975) que segue nas tabelas 2 e 3. Este teste pode avaliar a robustez e também o impacto de cada variação realizada nas análises. Para determinar a mudança de um fator, quatro valores correspondentes a letras maiúsculas foram encontrados e em letras minúsculas, foi realizada uma comparação das médias dos dois grupos. A Tabela 2 mostra quais fatores foram usados para determinar a robustez. Fatores nominais de A a G com as letras maiúsculas são correspondentes as condições nominais, as letras minúsculas são correspondentes as condições variadas. Para realizar a robustez, foram realizadas diversas variações, presentes nas tabelas 2 e 3:

Tabela 2: Condições cromatográficas que foram variadas.

Fatores		Condições Nominais		Condições com Variações	Elementos de Variação
NOMINAL	A	C18 Eclipse XDB 4,6mm x 250mm, 5µm tamanho da partícula.			<u>Colunas cromatográficas</u>
Variação	A	C18 Zorbax Eclipse Plus 4,6mm x 250mm, 5µm tamanho da partícula.			
NOMINAL	B	2,00%			<u>% Ácido Acético fase aquosa</u>
Variação	B	1,90%			
NOMINAL	C	97:03			<u>Fase Móvel</u>
Variação	C	95:05			
NOMINAL	D	Ohaus			<u>Balanças Analíticas</u>
Variação	D	Marte			
NOMINAL	E	40			<u>Temperatura do Forno (°C)</u>
Variação	E	38			
NOMINAL	F	1,5			<u>Fluxo (mL/min)</u>
Variação	F	1,2			
NOMINAL	G	305,6		277,1	<u>Comprimento de onda (nm)</u>
Variação	G	303		279	

Tabela 3: Combinações realizadas das condições nominais com as condições variáveis, as letras maiúsculas de A a G representam as condições Nominais e as respectivas letras minúsculas representam as condições variáveis.

Combinações de Condições Nominais com Condições Variáveis								
Nominais, variáveis	S	T	U	V	X	Z	W	Y
A,a	A	A	A	A	a	a	a	a
B,b	B	B	B	b	B	B	b	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C	c
D,d	D	D	D	d	d	d	D	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e	E
F,f	F	f	F	F	F	f	f	F
G,g	G	g	G	G	g	G	G	g

Para calcular a mudança de A para a, de B para b, e assim por diante, respectivamente, utilizou-se a Equação 5:

Equação 5: $A/a = I$ (a soma de todos os resultados com A/4) - (a soma de todos os resultados com a/4) I

4.2.11 Avaliação da Eficiência de Encapsulação da RAPA e do RESV em Lipossomas

Para avaliação de eficiência de encapsulação foi realizada a extração do lipossoma com o fármaco encapsulado do fármaco não encapsulado por cromatografia em gel na Sepharose CL-4B. Foi adicionado 1mL do lipossoma total (antes da separação do fármaco não encapsulado) na Sepharose CL-4B, e utilizou-se como fase móvel tampão fosfato pH 7,4. Foram coletadas 15 frações de 1mL cada. Cada uma destas 15 frações foi separada e analisada. As frações que apresentaram melhor IPD foram homogenizadas e quantificadas os fármacos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Para avaliar a quantidade total de fármaco no lipossoma utilizou-se método devidamente validado conforme a metodologia descrita anteriormente no item 4.2.1 (FERNANDES et al., 2020; ELOY et al., 2017; GRABIELLE-MADELMONT et al., 2003). Pesou-se aproximadamente 60mg do lipossoma com RAPA e/ou RESV e diluiu-se para 5mL de acetonitrila. Colocou-se no ultrassom por 10 minutos para realizar a dissolução total dos lipossomas, os quais foram analisados por CLAE conforme a metodologia anteriormente validada. As análises foram realizadas em triplicata.

A eficiência de encapsulamento (EE) foi calculada de acordo com a equação 6:

Equação 6:
$$EE (\%) = [(\text{quantidade de fármaco na fração lipossômica}) * 100] / (\text{quantidade total de fármaco encontrada no lipossoma total})$$

4.2.12 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de DSC usando o equipamento Thermal Analysis Workstation com o software Thermal Analysis Workstation (Perkin Elmer, EUA). As formulações foram liofilizadas (lipossoma vazio; lipossoma RAPA e/ou RESV), pesadas em cadinho de alumínio e aquecidas de 3 a 200 ° C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

4.2.13 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

O tamanho das partículas e a concentração dos lipossomas foram avaliadas pelo NTA, utilizando o equipamento NanoSight NS300 (Malvern Instruments) que contém uma câmara de amostra e um laser de 638nm. Todas as amostras foram diluídas 1:1000 em água Mili-Q.

As medidas foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente (25°C) (Fernandes et al., 2020; Filipe et al., 2010).

4.2.14 Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (HR-TEM)

As amostras de suspensão de lipossomas foram diluídas em água de forma que a concentração final de lipídios se mantivesse em 0,5mg/mL. Após, as amostras foram colocadas na grade de cobre de 400mesh e mantidas em repouso para ocorrer a adsorção, sendo o excesso retirado com auxílio de um papel de filtro. Em seguida, foi adicionado 3µL de uma solução de acetato de uranila 2%(p/v) e, depois de 2 minutos o excesso foi removido e a amostra submetida a secagem em temperatura ambiente. O procedimento com o agente de contraste fora repetido novamente e as grades foram secas a temperatura ambiente para posterior análise. As análises foram realizadas em microscópio JEOL modelo JEM-2100 com tensão de aceleração de 100 kV, disponível no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) IQSC-USP, São Carlos.

4.2.15 Estudo de solubilidade da RAPA e do RESV

A solubilidade da RAPA e do RESV foi determinada no meio que foi utilizado para o ensaio de liberação, sendo soluções de tampão fosfato (PBS, pH 7,4) contendo 1% ou 2% de lauril sulfato de sódio. Foram adicionadas quantidades de 50mg de RAPA e RESV em 0,5mL do meio e submetidas à agitação mecânica por 24 horas, em velocidade constante de 100RPM a 37°C e ao abrigo de luz. Após este período, a solução foi centrifugada a 13240 xg por 30 min e o sobrenadante filtrado em membrana de acetato de celulose 0,45 µm. Os sobrenadantes foram diluídos, analisados pelo método de CLAE validado e quantificados a partir da equação da reta para o meio testado. O teste foi realizado em triplicata (LIU et al.2013).

4.2.16 Ensaio de liberação *in vitro* da RAPA e RESV em lipossomas

O estudo *in vitro* do perfil de liberação, para avaliar a quantidade dos fármacos liberados em relação ao tempo, foi desenvolvido e adaptado conforme estudos de Eloy e colaboradores (2016) e estudos de Fernandes e colaboradores (2020). Foi utilizado o método com uma membrana de diálise de 12-14kDa (Fisherbrand), previamente hidratada na solução receptora constituída por tampão fosfato pH 7,4 (PBS 1X) com 2% de lauril sulfato de sódio. Para cada

mL das amostras de lipossoma com RAPA e/ou RESV, ou, das soluções com fármacos, foram colocadas em uma pequena bolsa feita com a membrana de diálise sendo n=6 de cada amostra.

As bolsas de diálise foram transferidas para tubos de polipropileno (tubo falcon) contendo 50 mL de uma solução receptora PBS (pH 7,4) com 2% de lauril sulfato de sódio para garantir as *sink conditions* definidas no teste de solubilidade. Os tubos foram colocados em uma incubadora de agitação orbital (Nova técnica) mantendo a temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 100 rpm. Durante 72h foram realizadas coletas de 1mL do meio receptor de cada amostra, realizando logo em seguida a reposição do meio. Os tempos coletados foram 0h, 0,5h, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 36h, 48h e 72h. Após a coleta as amostras foram analisadas por CLAE conforme a metodologia validada.

Os dados obtidos foram analisados usando modelos matemáticos e software estatístico para caracterizar a cinética de liberação dos lipossomas obtidos.

5.0 Análise *in vitro* do perfil de citotoxicidade das formulações lipossomais de RAPAe/ou RESV

5.1 Cultivo Celular

Neste trabalho foi utilizada a linhagem tumoral de mama, MCF7 obtida comercialmente a partir da coleção de culturas celulares da *American Type Culture Collection* (ATCC). De uma forma geral, as células foram cultivadas em meio DEMEM (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Sigma) e 1% de Penicilina/ Streptomicina (Sigma) em frascos de cultura de 25 ou 75cm² de polietileno ou em placas de cultura, na densidade média de 1×10^6 , à 37°C, 5% de CO₂ e 90% de umidade, até atingirem confluência. Após confluência, as células foram dissociadas em solução tripsina (0,25%, m/v) (Sigma), plaqueadas e mantidas nas condições acima descritas para os estudos de viabilidade e internalização celular.

5.2 Determinação da viabilidade celular

O efeito *in vitro* das formulações na viabilidade celular foi na linhagem de câncer de mama (MCF-7) utilizando o ensaio com resazurina. Neste procedimento, 4×10^3 células foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas à 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após adesão das células, o meio de cultivo foi substituído por 200 µL de meio de cultivo incompleto (DMEM sem adição de soro fetal bovino (SFB) contendo as amostras diluídas nas concentrações de RAPA de 1, 2, 3, 5, 10 e 20 µM. O lipossoma vazio e o lipossoma contendo

somente RESV foram diluídos nas mesmas proporções que os lipossomas contendo RAPA. Poços contendo somente meio de cultura e meio de cultura com DMSO (30% m/v) foram utilizados como controles negativos e positivo, respectivamente. Após 72 horas de tratamento, os poços foram lavados com tampão fosfato salino (PBS 1X), em seguida, foi adicionado 100 µL de meio de cultura contendo resazurina (0,01 mg/mL). As placas foram incubadas novamente à 37°C, 5% de CO₂ por 3 horas. Após esse período, a leitura da viabilidade celular foi determinada em leitora de placas Biotek (modelo Synergy) utilizando o comprimento de onda de excitação de 570 nm e emissão de 600 nm. Os resultados foram expressos através da viabilidade celular (%) e da concentração de substância necessária para produzir 50% de redução de viabilidade celular (IC₅₀). A análise estatística dos resultados foi realizada em Software GraphPad Prism® 8.0 utilizando ANOVA two-way seguido de pós-teste de Tukey, amostras com valores de $p < 0,05$ foram consideradas significativamente diferentes, $n=8$.

5.3 Análise da internalização celular dos lipossomas por Citometria de Fluxo

A análise da internalização celular dos lipossomas foi realizada na linhagem celular MCF-7 por citometria de fluxo. Para a realização desta abordagem foi preparada uma formulação de lipossomas contendo o fluoróforo DiO (20 µg/mL) sem a incorporação de RAPA e RESV. A formulação foi diluída 25 vezes para obtenção de uma formulação com concentração de DiO de 0,8 µg/mL. Para a execução do experimento, 2×10^5 células foram adicionadas em placa de 12 poços, que foi incubada por 24 horas à 37°C e 5% CO₂. Após 24 horas, o meio de cultivo foi substituído por meio de cultivo incompleto contendo a formulação diluída. Após 24 horas de incubação com a formulação, o meio de cultivo foi removido, os poços lavados com PBS 1x e as células dissociadas dos poços com o uso de 100 µL de tripsina (0,25%, m/v). Em seguida, a tripsina foi inativada com 300 µL de meio de cultivo completo. Foram adicionados 2 µL de iodeto de propídio (50 µg/mL) em cada amostra, que foi imediatamente analisada em citômetro de fluxo (BD Accuri™ C6 flow cytometer, Singapore) utilizando os comprimentos de onda de $\lambda_{\text{excitação}} = 488 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 530 \text{ nm}$ para o DiO e $\lambda_{\text{excitação}} = 488$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 670 \text{ nm}$ para o Iodeto de propídio.

6.0 Análises estatísticas

Foram realizados testes para determinar o tipo de distribuição dos dados e a homogeneidade das variâncias. Foram empregados para os testes paramétricos análise e variância seguida do teste de Tukey para análise dos resultados.

7. Resultados e Discussão

7.1 Desenvolvimento dos lipossomas com RAPA e/ou RESV

No desenvolvimento dos lipossomas, foram realizados experimentos com diferentes concentrações de lipídeos diluindo 1:10 as amostras em água ultrapura. Foram verificados o DHM, o IPD, o PZ na estabilidade da suspensão lipossomal, mantendo as amostras na temperatura de 2 a 8°C. A tabela 4 apresenta os resultados obtidos nesta primeira etapa do desenvolvimento dos lipossomas.

Tabela 4: Diâmetro Hidrodinâmico Médio (DHM); Índice de Polidispersividade (IPD); Potencia Zeta (PZ) medidos após 24horas, 30 dias e 60 dias do preparo da formulação.

Composição dos Lipossomas (Razões Molares%)	<u>DHM / IPD / PZ</u>			Estabilidade
	Após 24h	30 dias	60 dias	
PC/CH (10:2) - 200mg	155,93 ±7,48/ 0,357±0,004/ 5,83±0,668	295,9 ±310,11 / 0,526±0,148 / 2,27±1,241	497,4±242,57 / 0,765±0,044 / 0	<i>Aumento do DHM e IPD</i>
PC/CH/ DESPEG PEG 2000 (10:2:0,5) – 100mg	127,83±7,69/ 0,257±0,007/ -26,30±0,668	122,21± 5,37 / 0,271±0,088 / -25,51±0,058	118,43±2,64 / 0,263±0,012 / -25,27±0,668	<i>Manteve estável por 2 meses</i>
PC/CH/ DESPEG PEG 2000 (10:2:1)-100mg	128,3±6,00/ 0,389 ± 0,011 / -34,33±0,784	<i>Formulação Descartada</i>	<i>Formulação Descartada</i>	<i>Houve precipitação após 3 dias</i>

O lipossoma PC/CH/ DESPEG PEG 2000 (10:2:0,5) foi o que apresentou melhor estabilidade mantendo o DH, IPD e o PZ com valores próximos no tempo 24h, 30 dias e 60dias após o preparo da formulação, além do aspecto da suspensão lipossomal. Este apresentou concentração final de 6,67mg/mL de lipídeo.

Um dos principais fosfolipídios utilizados na obtenção de lipossomas é a fosfatidilcolina de soja (PC), para a qual a organização das moléculas de fosfolipídios na água é impulsionada principalmente por um efeito hidrofóbico, que organiza espacialmente as moléculas de fosfolipídios anfifílicos para minimizar as interações adversas de entropia entre a cadeia acila hidrofóbica e a fase aquosa circundante. Além disso, a presença do CH na bicamada lipídica corrobora a estabilidade da vesícula (WALDE et al., 2007, LASIC &

PAPAHADJOPOULOS 1998, KIRBY et al., 1980). O CH é uma molécula anfifílica que também compõe as membranas celulares, e possui maior ponto de fusão, tornando a vesícula lipossômica mais rígida dificultando a agregação entre elas (ALBUQUERQUE et al., 2018, VIRDEN & BERG 1992). Apesar do lipossoma ser um sistema de entrega para fármacos lipofílicos e hidrofílicos, verificou-se que após sua entrada na circulação sistêmica os lipossomas podem ser desestabilizados por interações com fosfolipases e proteínas (LA-BECK et al., 2021, BONTÉ & JULIANO 1986).

O DSPEG-PEG 2000 auxilia na formação e estabilidade das vesículas e favorece para um maior tempo de meia-vida dos fármacos, pois ele impede que o lipossoma seja opsonizado pelos macrófagos, permanecendo por mais tempo no sangue e principalmente nos tumores, assim sendo, são chamados também de lipossomas estericamente estabilizados (NAG, AWASTHI 2013, EMMANUEL et al., 2010). A estabilização estérica de lipossomas envolve a estabilização física, química e biológica, com isso além do CH moléculas de DESPEG PEG 2000 se ligam covalentemente a PC na superfície dos lipossomas que reduz fortemente as forças de atração (van der Waals) entre as partículas e, aumenta as forças repulsivas (estérica, eletrostática e hidratação) (BELSITO et al., 2001).

A formulação PC/CH/ DESPEG PEG 2000 (10:2:1) apresentou precipitado com aparência de um pó branco o qual possivelmente pode ser DESPEG PEG 2000, pois, a formulação PC/CH/ DESPEG PEG 2000 (10:2:0,5) não apresentou precipitado e a única diferença na composição entre uma e outra é a concentração do DESPEG PEG 2000. É possível que ocorra a precipitação de DESPEG PEG 2000, pois esta quantidade pode estar saturada em relação à quantidade de PC e CH presentes nas vesículas dos lipossomas, essencial para ocorrer a ligação molecular entre a PC e o DESPEG PEG 2000 (CALVIN & WAFA 2019, GARBUZENKO et al., 2005, EDWARDS et al., 1997).

A técnica de preparo deste lipossoma envolve homogeneização de alta pressão, comumente utilizada em escala industrial. O processo de homogeneização inicia-se com o uso de agitador magnético e turrax, que levam à formação de vesículas multilamelares (MUV), seguido pela passagem das amostras em homogeneizador de alta pressão, que promove redução para vesícula unilamelares (SUV) (WORSHAM et al., 2018, BARNADAS-RODRÍGUEZ R., SABÉS M. 2001, LAMPRECHT et al., 1999, BRANDL et al., 1993). Após o processo de homogeneização do lipossomas vazio realizamos análises para verificar o DHM e o IPD dos lipossomas obtidos, por conseguinte obtivemos os seguintes resultados médios de 3 análises DHM: 380,83nm e IPD: 0,416. O valor do DHM comprova ser amostra de vesículas

unilamelares grandes (LUV) as vesículas que obtêm esta determinação são na faixa de 100-1000nm e o valor de IPD acima de 0,4 representa uma amostra heterogênea (KASSEM et al., 2018; AKBARZADEH et al., 2013). Segue na figura 3 o gráfico de distribuição de tamanho obtido referente as três análises realizadas do lipossomas vazio após o processo de homogeneização no turrax. E, na 4 figura são apresentadas imagens das preparações lipossomais desenvolvidas.

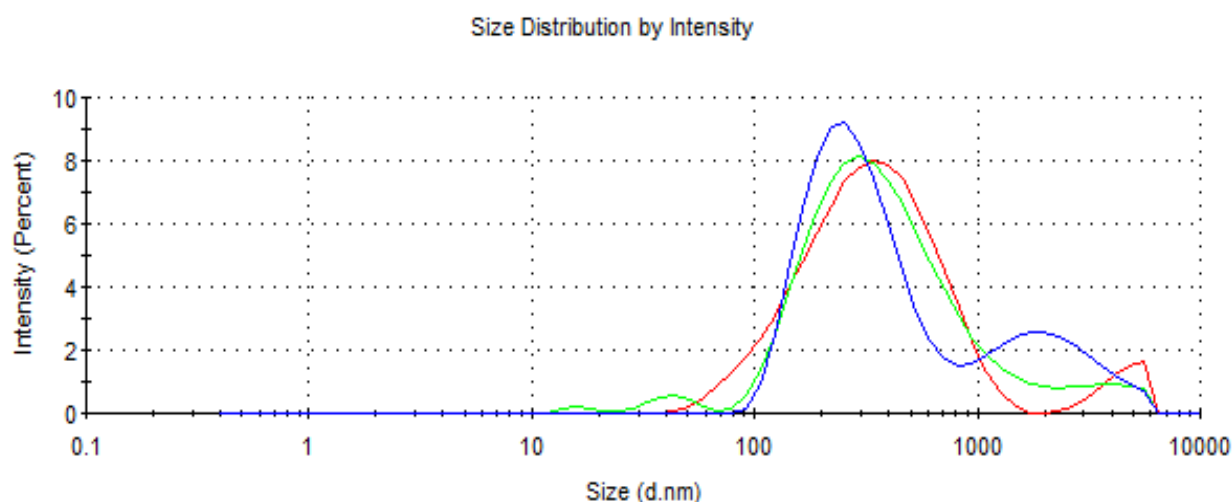


Figura 3: Distribuição de tamanho vesus % Intensidade para amostras do Lipossomas vazio após 1h de homogeneização no turrax



Figura 4: Sequencialmente: Lipossomas vazio; Lipossoma com RAPA; Lipossoma com RESV e Lipossoma com RAPA e RESV.

Durante a preparação dos lipossomas, com RESV, percebeu-se uma coloração levemente amarelada que ocorria durante o preparo da formulação, e acentuava uma semana, adquirindo coloração marrom. A PC é suscetível à oxidação lipídica em meio aquoso e o RESV pode conter em sua composição resíduos de íons metálicos responsáveis pela formação de

radicais livres, fato que potencializa o processo de oxidação lipídica (CAI et al., 2013, CHING-YI & TIMOTHY, 1995).

Com isso, decidiu-se adicionar nas formulações como antioxidantes a vitamina E que atua para impedir a peroxidação lipídica e a vitamina C, que potencializa esta ação no microambiente do lipossoma, pois a vitamina C regenera a vitamina E no processo de peroxidação lipídica que a vitamina E sofre na bicamada lipídica, durante o processo de preparo dos lipossomas e até mesmo durante o armazenamento (SCARPA, 1984). Assim sendo, foi realizado um teste experimental, em que produziu-se lipossomas somente com 10 mol% PC (fosfatidilcolina de soja) qsp água para injetáveis, e outro com 10mol% PC, 70nM vitamina E, 100mM vitamina C qsp água para injetáveis (Figura 5). Verificou-se a estabilidade destas duas formulações armazenadas nas temperaturas de 2°C a 8°C, considerando o aspecto da suspensão dos lipossomas, DH, IPD e PZ, diluindo 1:10 as amostras em água ultrapura nos tempos de 24h e 30 dias após o preparo das formulações, conforme a tabela 5.

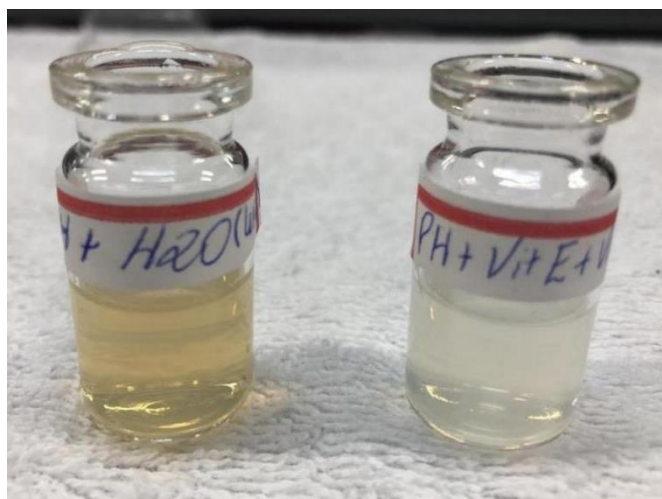


Figura 5: Lipossoma após 24h do preparo respectivamente: composto de PC+Água para Injetáveis e Lipossomas composto de PC+ Vitamina E + Vitamina C +Água para Injetáveis.

Tabela 5: Diâmetro Hidrodinâmico Médio (DHM); Índice de Polidispersividade (IPD); Potencial Zeta (PZ) medidos após 24 horas e 30 dias do preparo das formulações

Composição dos Lipossomas	DHM / IPD / PZ		Estabilidade
	Após 24h	30 dias	
PC (10M)+Água para Injetáveis	630,80±30,53/ 0,532±0,005/ 13,9±0,142	765,3±267,22/ 0,678 ± 0,0537 / -15,63±0,895	Ocorreu separação em 2 fases
PC (10M)+ Vitamina E (70 nM)+ VitaminaC (100 mM)+ Água para Injetáveis(q.s.p.)	132,7 ± 9,00/ 0,433 ± 0,005/ 15,46±0,498	160,5 ± 7,67/ 0,418 ± 0,007/ 15,76 ± 0,262	Aspecto da suspensão lipossômica foi mantido.

Considerando a Figura 6, é possível verificar diferentes aspectos visuais das suspensões lipossômicas, onde suspensão com PC+ água para injetáveis apresenta uma coloração amarela e levemente turva, enquanto a suspensão PC +Vitamina E +Vitamina C+ água para injetáveis apresenta uma coloração levemente esbranquiçada e turva.

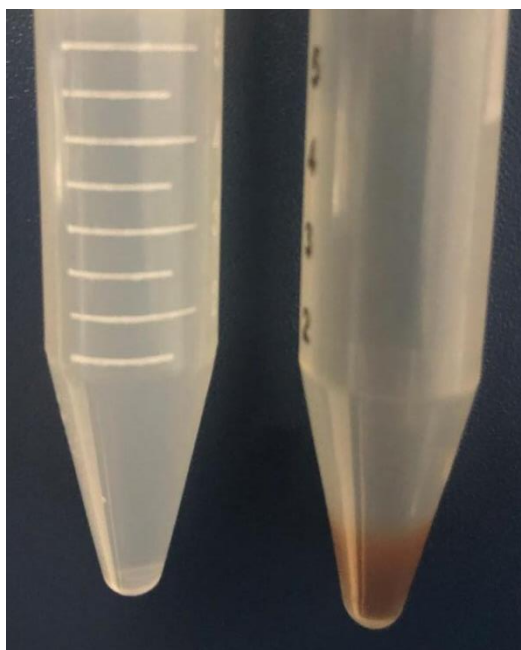


Figura 6: Fotografia do aspecto das suspensões de lipossomas após 30 dias do preparo constituídas de PC+ Vitamina E + Vitamina C +água para injetáveis (à esquerda) e PC+Água para injetáveis (à direita).

Considerando a figura 6, é possível verificar que ocorreu uma instabilidade do aspecto do lipossoma composto somente por PC + água para injetáveis. Pode-se observar também, na

Tabela 5, o aumento do DHM de 630,80 nm para 765,30 nm, do IPD de 0,532 para 0,678 e do PZ de +13,9 para -15,63. Considerando os relatórios de qualidade obtidos pelo software do Zetasizer, tais resultados foram considerados inadequados, os quais podem ser justificados pela presença de partículas grandes e amostras muito polidispersas para análise de distribuição.

A vantagem de ter antioxidantes de fase lipídica e aquosa é que a vitamina C presente na fase aquosa da suspensão lipossômica, apesar de não ter ação no processo de peroxidação lipídica, através de uma reação de oxi-redução, o ascorbato (Asc) consegue reduzir o radical tocoferoxil (produzido para impedir a peroxidação lipídica) regenerando assim o α tocoferol (Vitamina E) (MURIPITI et al., 2019, BURSAC-MITROVIĆ et al., 2016, HONGLIAN et al., 1999, RICHARD et al., 1997).

Assim sendo, foi possível verificar experimentalmente que o lipossoma composto de PC+Vitamina C+ Vitamina E + água para injetáveis manteve a estabilidade durante o tempo de 30 dias, conforme verificado na tabela 5. É provável que a presença dos antioxidantes pode ter impedido a peroxidação lipídica da PC favorecendo a estabilidade dos lipossomas em comparação com a outra formulação composta apenas de PC+ água para injetáveis.

7.2 Análises do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), Índice de Polidispersão (IPD), Potencial Zeta (PZ) e Estudo de Estabilidade

As formulações foram mantidas na temperatura de 2°C a 8°C durante 60 dias. Realizaram-se análises de DHM, IPD e PZ em diferentes tempos, nas amostras do lipossoma vazio (LV), lipossoma com RAPA (LRAPA), lipossoma com RESV (LRESV) e lipossoma com RAPA e RESV (LRR) diluindo 1:10 as amostras em água Ultrapura. Estas análises foram realizadas em triplicata e o resultado médio encontra-se na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de DHM, IPD e PZ obtidos dos lipossomas durante 60 dias.

Estudo de Estabilidade												
Tempo	LV			LRAPA			LRESV			LRR		
	DHM (nm)	IPD	PZ (mV)	DHM (nm)	IPD	PZ (mV)	DHM (nm)	IPD	PZ (mV)	DHM (nm)	IPD	PZ (mV)
1 dia	95,52	0,2083	-15,57	86,23	0,2323	-14,50	93,61	0,221	-17,41	72,70	0,2210	-17,37
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,481	0,003	0,153	0,390	0,008	0,529	0,990	0,003	0,257	1,368	0,003	0,569
5 dias	98,95	0,214	-14,50	85,77	0,2163	-17,87	93,41	0,229	-19,40	74,88	0,2190	-15,60
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1,433	0,007	0,656	1,095	0,004	2,515	2,032	0,007	0,436	1,423	0,010	0,265
10 dias	98,23	0,2187	-15,07	87,82	0,214	-14,90	95,88	0,230	-18,53	73,72	0,2180	-15,23
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,245	0,003	0,153	1,667	0,008	0,529	1,687	0,008	0,351	1,448	0,018	0,503
15 dias	100,1	0,219	-15,33	86,95	0,219	-16,03	95,52	0,2260	-18,67	73,93	0,2187	-15,73
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1,090	0,006	0,416	1,409	0,008	0,306	0,505	0,006	0,153	1,385	0,003	0,115
30 dias	99,09	0,2090	-16,30	86,58	0,2233	-15,00	95,28	0,227	-19,10	73,59	0,2187	-15,30
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,875	0,002	0,054	1,279	0,010	0,557	0,593	0,006	0,200	0,897	0,004	0,436
45 dias	102,03	0,225	-15,45	90,82	0,2469	-15,34	97,03	0,2372	-18,80	75,43	0,2267	-15,48
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,231	0,004	0,048	0,855	0,020	0,621	0,033	0,004	0,340	0,113	0,011	0,251
60 dias	100,01	0,252	-15,63	89,97	0,2381	-15,21	98,15	0,2364	-18,76	74,26	0,2328	-15,66
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,364	0,012	0,015	0,523	0,012	0,204	0,093	0,014	0,269	0,412	0,009	0,211

Para os lipossomas, no período de 60 dias, obteve-se os seguintes valores médios de DHM: LV-100nm; LRAPA-89,97nm, LRESV-98,15nm e LRR-74,26nm. As diferenças dos tamanhos de partículas devem-se possivelmente ao processo de encapsulamento, pois pode ocorrer uma redução na lamelaridade dos lipossomas. Conforme a entrada do fármaco na estrutura fosfolipídica, as bicamadas sofrem rompimentos e se reorganizam, formando novas vesículas e encapsulando mais fármacos (ELOY et al., 2014, HOPE et al., 1985). Este resultado do estudo de estabilidade realizado mostra que todos os lipossomas obtiveram DHM ≤ 100 nm, caracterizando assim os lipossomas SUV como nanocarreadores alvo para agentes quimioterápicos. SUVs com tamanhos $< 20 - 100$ nm podem se acumular nos tumores bem vascularizados por seu efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentada (EPR), em contraste com os tecidos normais (HSIEH et al., 2020, STEICHEN et al., 2013, NAGAYASU et al., 1999, BRANDL et al., 1993). As interações e a eficiência dos sistemas de liberação, tais como a caracterização é fundamental na avaliação para o controle de qualidade e a determinação da estabilidade do sistema (BANERJE et al., 2016, He et al., 2012).

Os valores obtidos de IPD de todos os lipossomas mantiveram-se na faixa de 0,200 a 0,250 e apresentaram características monodispersas, pois valores maiores que 0,4 de IPD indicam partículas heterogêneas (KASSEM et al., 2018, ZEISIG et al., 2016). Conforma a figura 8, pode-se verificar que durante os 60 dias não foram detectadas grandes variações no IPD das formulações.

O PZ é um parâmetro físico-químico que determina a força das interações intrapartículas e o valor <-30 mV ou > 30 mV é capaz de manter a repulsão interpartícula, corroborando para uma suspensão de lipossomas estável. A presença do DSPEG-PEG 2000 potencializa a carga negativa no PZ da partícula. Além disso, é capaz de proteger a carga lipídica potencializando assim a estabilidade do lipossoma. (SMITH et al., 2017, HONARY & ZAHIR 2013, FREITAS & MULLER 1998). O PZ médio obtido conforme os dados da Tabela 6 foram: LV -15,63mV; LRAPA -15,21mV; LRESV -18,76mV e LRR -15,66mV.

Foram realizadas análises de teor de RAPA e RESV para as formulações mantidas em estudo de estabilidade nos tempos 1, 30 e 60 dias. Comparando com o dia 01 que foi analisado os teores iniciais dos fármacos nas suspensões lipossômicas em porcentagem massa/massa com os seguintes resultados 0,043% para LRAPA, 0,025% para LRESV, e para LRR a RAPA obteve 0,040% e o RESV 0,023%, quando comparados com os teores de fármacos com 60 dias as maiores porcentagens de decréscimo de teores dos fármacos analisados nas formulações foram LRAPA com 3,26%, LRESV com 4,80%, LRR com RAPA 2,75% e RESV 4,65%.

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) seguida de teste Tukey utilizando o software Graphpad Prism. Os dados analisados foram comparados em relação ao dia 1 para todas as formulações e conforme as figuras 7, 8, 9, e 10 obtidos, não houveram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) em nenhum dos resultados obtidos na estabilidade das formulações quando avaliados os respectivos parâmetros físico-químicos durante 60 dias.

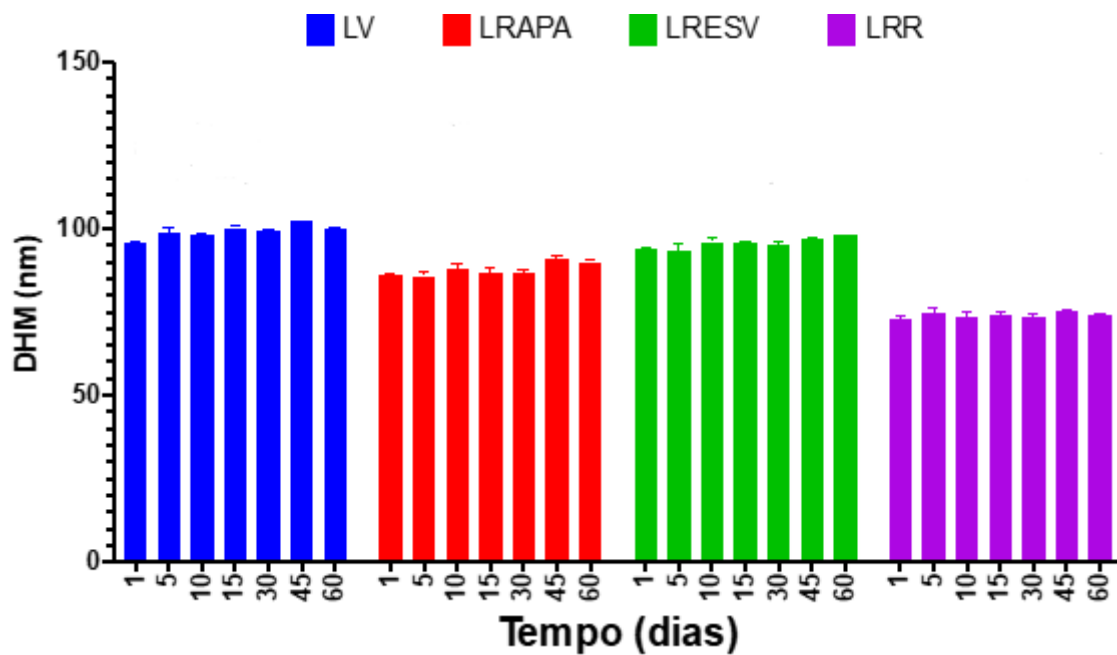


Figura 7: Diâmetro Hidrodinâmico Médio (DHM) durante 60 dias no LV: Lipossoma Vazio; LRAPA: Lipossoma Rapamicina; LRESV: Lipossoma Resveratrol; LRR: Lipossoma Rapamicina Resveratrol.

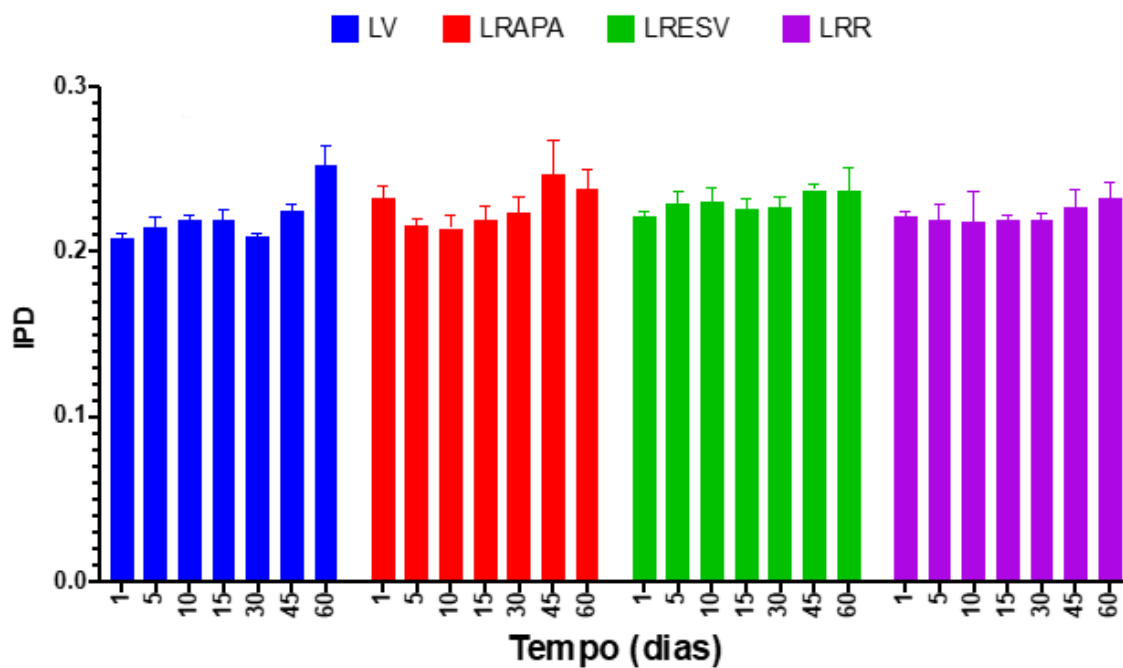


Figura 8: Índice de Polidispersão (IPD) obtidos durante 60 dias no LV: Lipossoma Vazio; LRAPA: Lipossoma Rapamicina; LRESV: Lipossoma Resveratrol; LRR: Lipossoma Rapamicina Resveratrol.

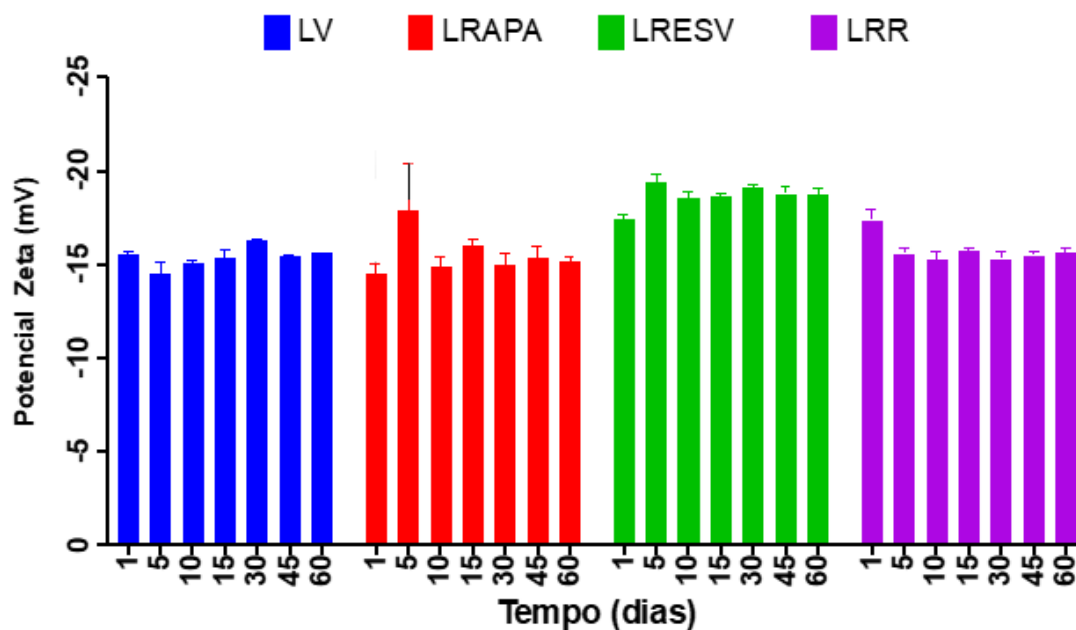


Figura 9: Potencial Zeta (PZ) obtidos durante 60 dias para as formulações: LV: Lipossoma Vazio; LRAPA: Lipossoma Rapamicina; LRESV: Lipossoma Resveratrol; LRR: Lipossoma Rapamicina Resveratrol.

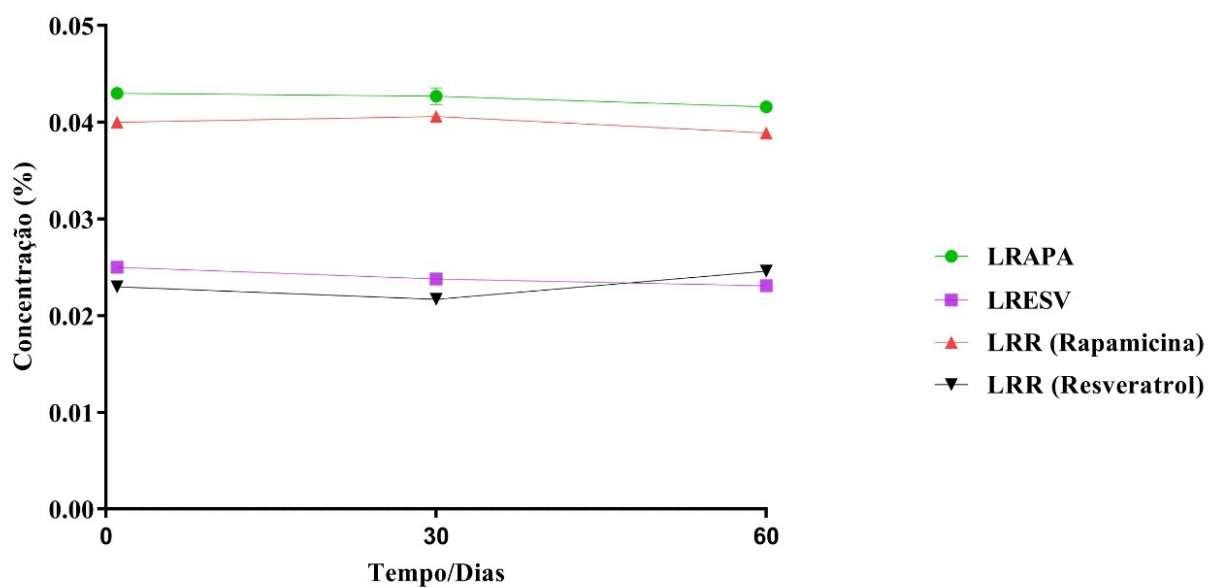


Figura 10: % de teor de fármaco realizadas durante a estabilidade com 1, 30 e 60 dias nos: LRAPA: Lipossoma Rapamicina; LRESV: Lipossoma Resveratrol; LRR: Lipossoma Rapamicina Resveratrol

7.3 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação de RAPA e RESV utilizando CLAE

O método analítico utilizado para quantificação do RESV e RAPA, conforme as condições cromatográficas da Tabela 1, permitiu a quantificação simultânea dos dois fármacos. Os cromatogramas obtidos estão demonstrados nas Figuras 11 e 13, com os respectivos espectros em UV detectados pelo DAD (Figuras 12 e 14).

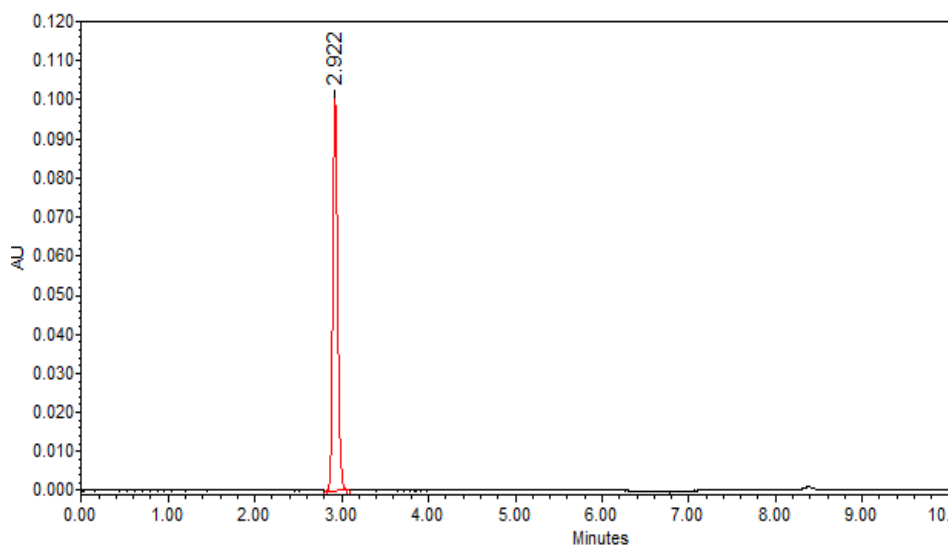


Figura 11: Cromatograma do RESV com Tempo de Retenção de 2.922 minutos detecção no comprimento de onda de 305,7nm

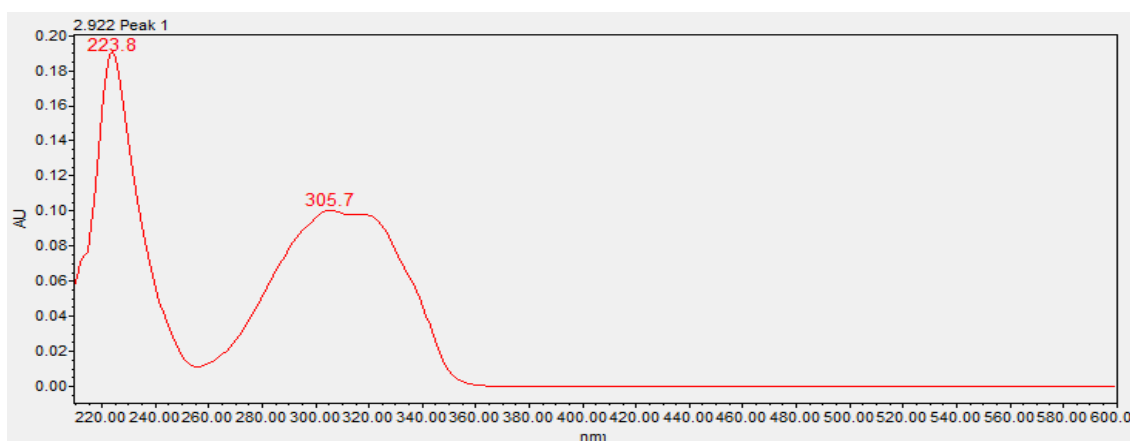


Figura 12: Espectro UV do Resveratrol obtido pelo detector DAD no CLAE.

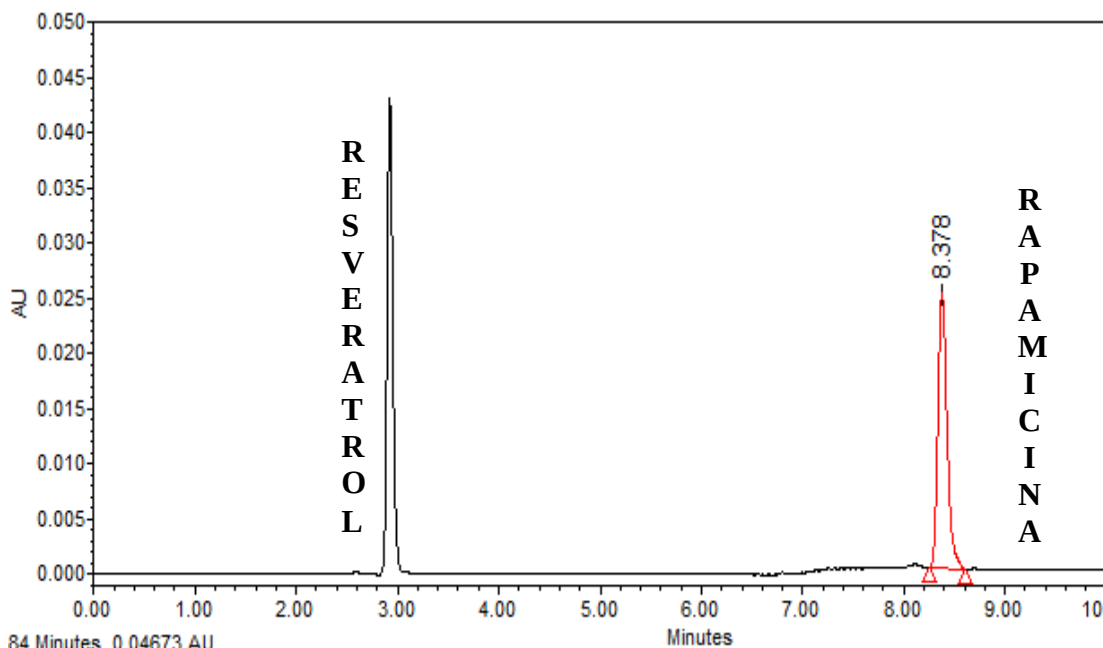


Figura 13: Cromatograma do RAPA com Tempo de Retenção de 8.378 minutos detecção no comprimento de onda de 277,1nm.

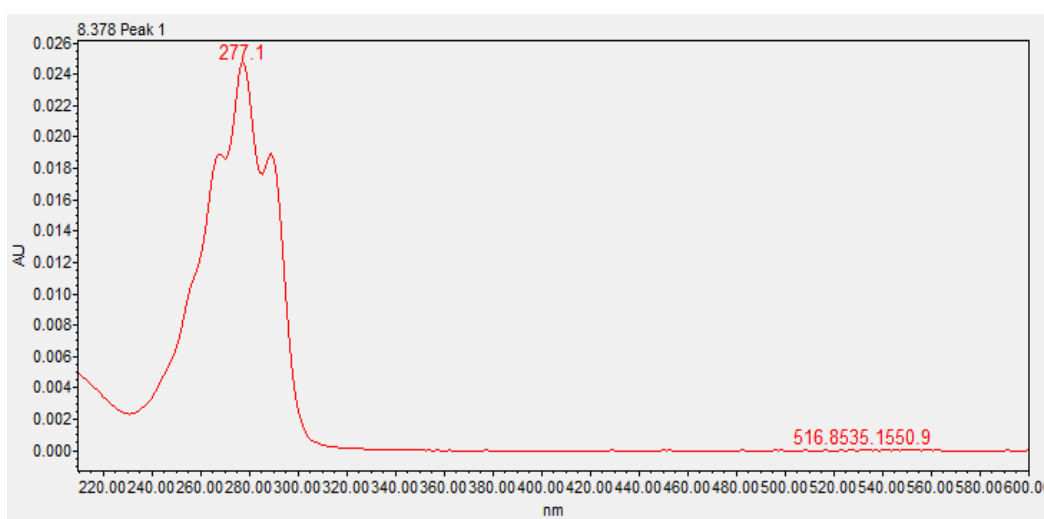


Figura 14: Espectro UV da RAPA obtido pelo detector DAD no CLAE.

7.3.1 Linearidade

A linearidade foi obtida a partir de soluções com RAPA e RESV dissolvidos em acetonitrila nas seguintes concentrações: 3,50 µg/mL, 4,00 µg/mL, 4,50 µg/mL, 5,00 µg/mL, 5,50 µg/mL, 6,00 µg/mL e 6,50 µg/mL. Para cada concentração foram realizadas as análises em triplicata (cada análise em dia diferente) e os resultados médios obtidos através das áreas cromatográficas foram utilizados para obter a curva analítica e os estudos de regressão linear a partir do método dos mínimos quadrados e a equação da regressão linear representada por

$y=ax+b$ onde y = resposta medida; x = concentração; a = inclinação da curva de calibração b = interseção com o eixo y (BRASIL, 2017). Sendo assim, a curva analítica do RESV e da RAPA para a validação do método, conforme as figuras 15 e 16 demonstraram linearidade no intervalo de 3,50µg/mL a 6,50µg/mL resultando na equação da regressão linear $y=67258x+659,33$ com $R^2= 0,9976$ para o RESV, e, para a RAPA a equação regressão linear foi $y=27285x+ 65,209$ $R^2= 0,9996$.

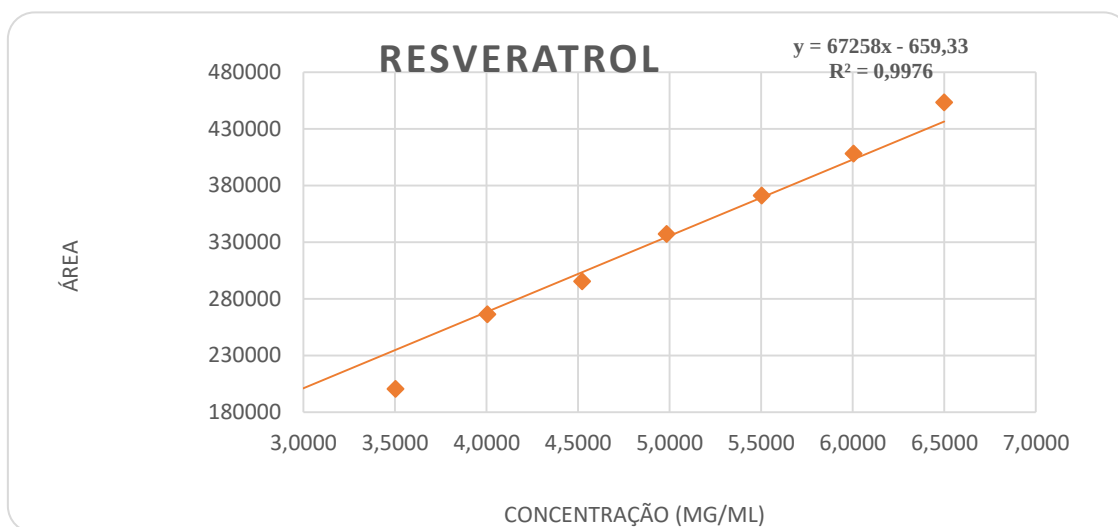


Figura 15: Curva Analítica do RESV obtida por CLAE onde o eixo Y= área cromatográfica e o eixo X Concentração em µg/mL.

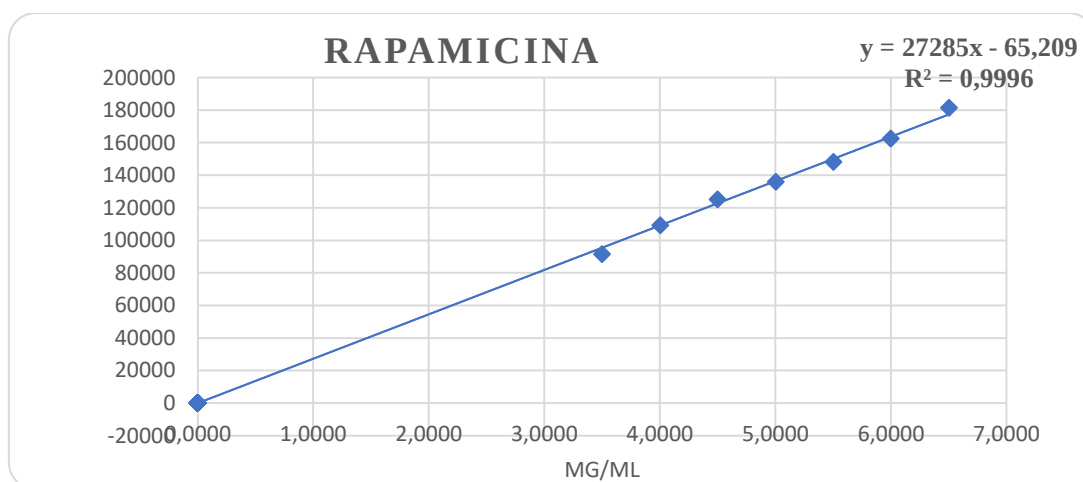


Figura 16: Curva Analítica do RAPA obtida por CLAE onde o eixo Y= área cromatográfica e eixo X Concentração em µg/mL.

Considerando a curva analítica desenvolvida para a quantificação em PBS pH 7,40 dos fármacos para os ensaios de liberação *in vitro* nas concentrações de 0,6 µg/mL, 3,1 µg/mL, 6,3 µg/mL, 7,4 µg/mL e 9,3 µg/mL de RAPA e RESV resultou-se na seguinte equação de regressão

linear $y = 67586x - 2768,4$ com $R^2 = 1$ para o RESV, e, para a RAPA a equação regressão linear foi $y = 31442x + 5988,1$ com $R^2 = 0,9991$, demonstrado nos figura 17 e 18.

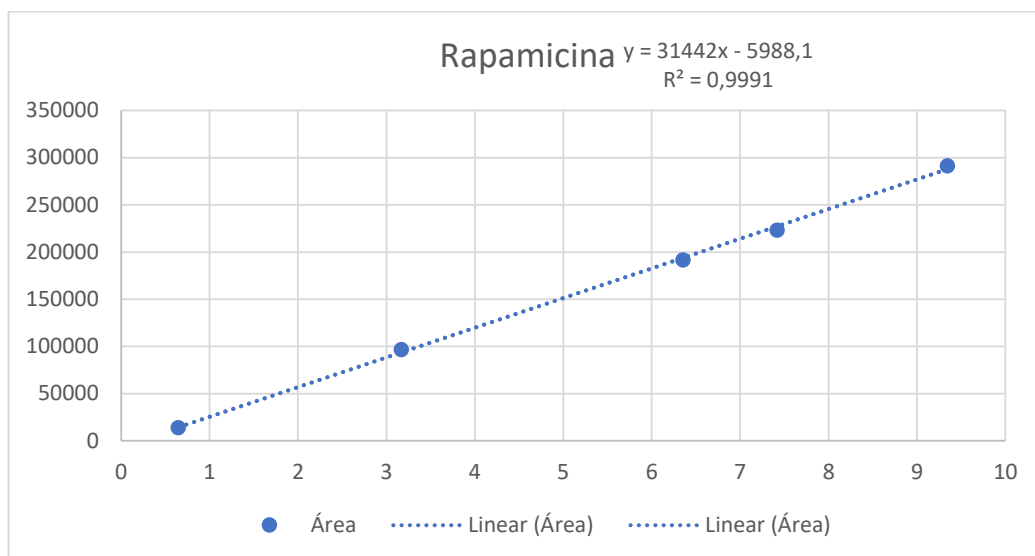


Figura 17: Curva Analítica do RAPA obtida por CLAE para quantificação no ensaio de liberação *in vitro* onde o eixo Y= área cromatográfica e eixo X Concentração em µg/mL.

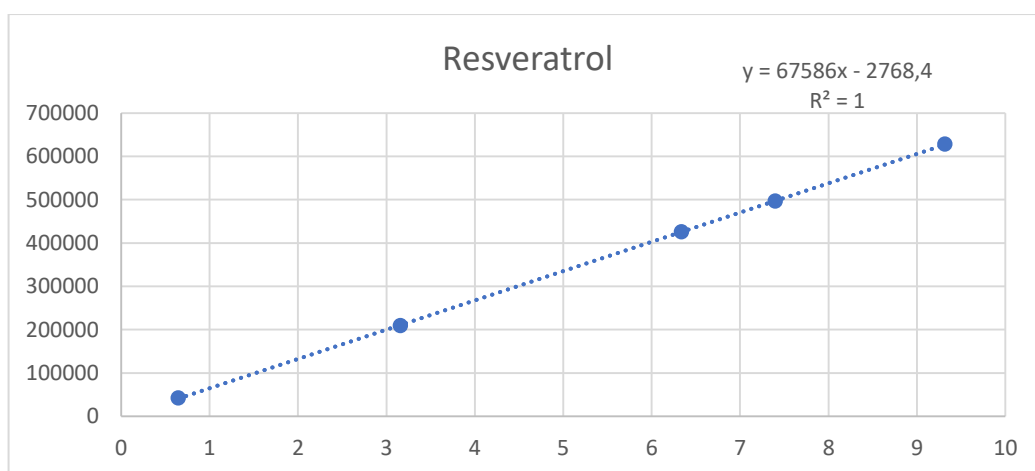


Figura 18: Curva Analítica do RESV obtida por CLAE para quantificação no ensaio de liberação *in vitro* onde o eixo Y= área cromatográfica e eixo X Concentração em µg/mL.

7.3.2 Seletividade

Foram realizadas análises separadamente da acetonitrila, tampão fosfato pH 7,4 com lauril sulfato de sódio (SDS) 2% e lipossoma vazio. Os ensaios foram realizados em triplicata. No cromatograma do lipossoma vazio houve a presença de um pico no tempo de 2,611 minutos em 277,1nm (comprimento de onda de detecção da RAPA), apresentando um espectro de

absorção máxima de 243,9 nm. O tempo de retenção deste pico não permite interferência no tempo de retenção do pico da RAPA que aparece aproximadamente em 8 minutos, e este pico cromatográfico não foi detectado no comprimento de onda de detecção do RESV (305,6nm), conforme mostra a figura 19. Portanto, nos cromatogramas não foram observadas interferências no pico do RESV e da RAPA conforme apresentam as figuras 19, 20, 21 e 22.

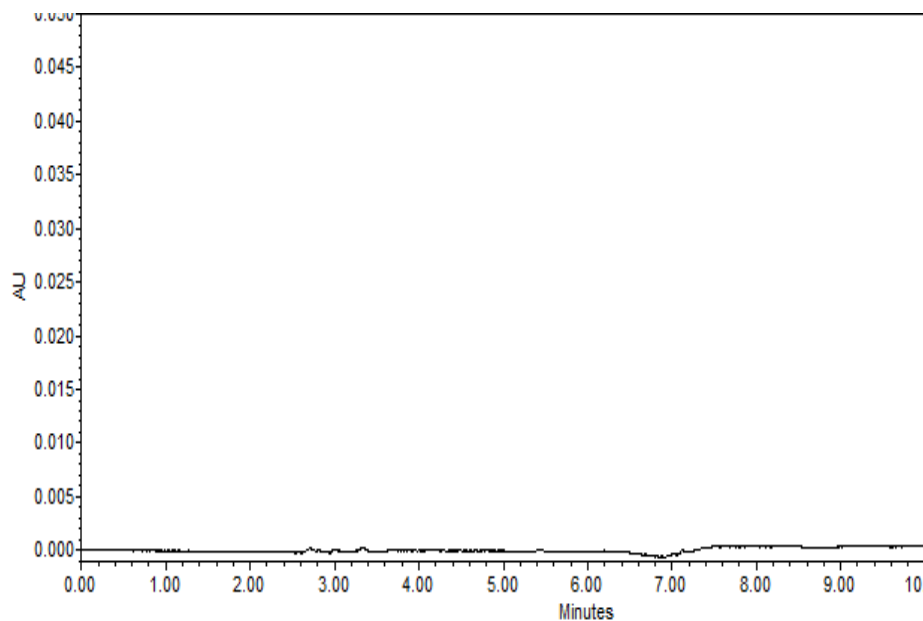


Figura 19: Cromatograma da Acetonitrila sem interferentes em 277,1nm e 306,1nm.

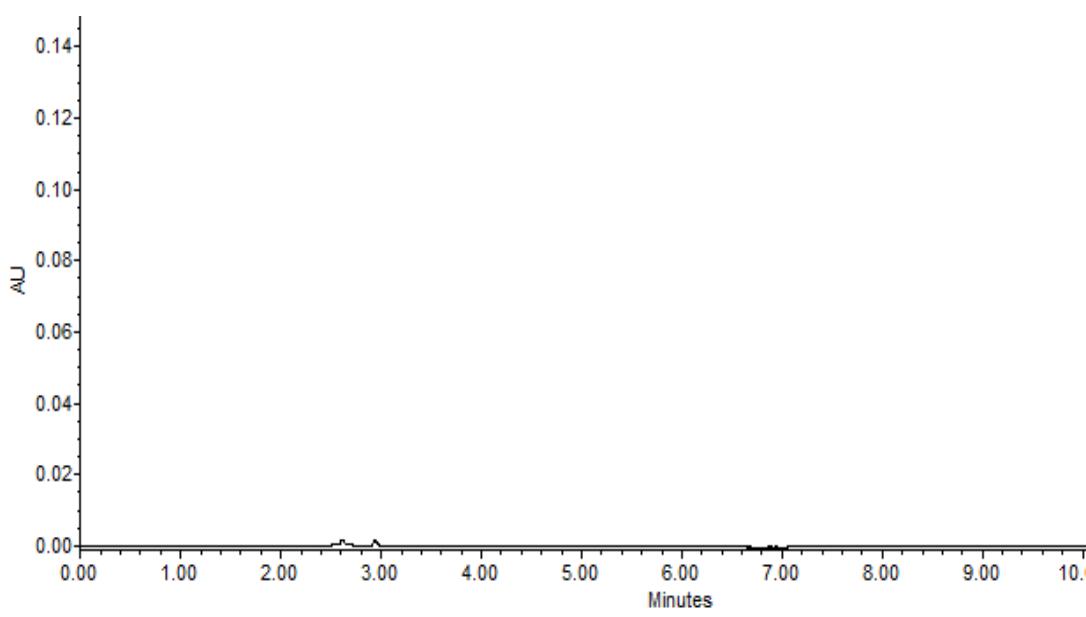


Figura 20: Cromatograma da Acetonitrila com PBS pH 7,4 e lauril sulfato de sódio a 2% sem interferentes em 277,1nm e 305,6nm.

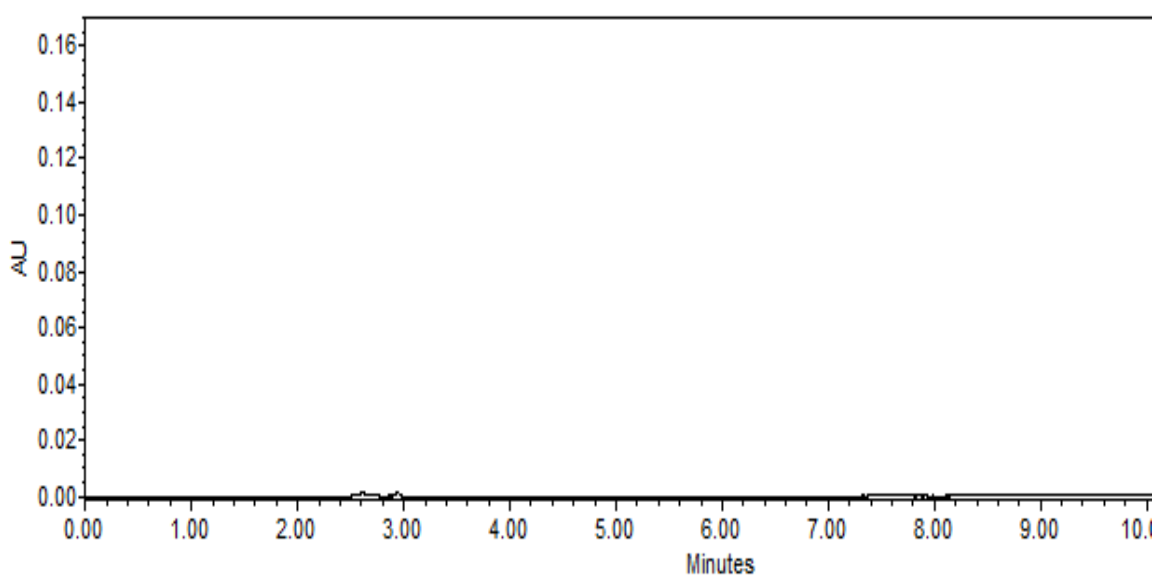


Figura 21: Cromatograma lipossoma vazio sem interferentes em 305,6nm.

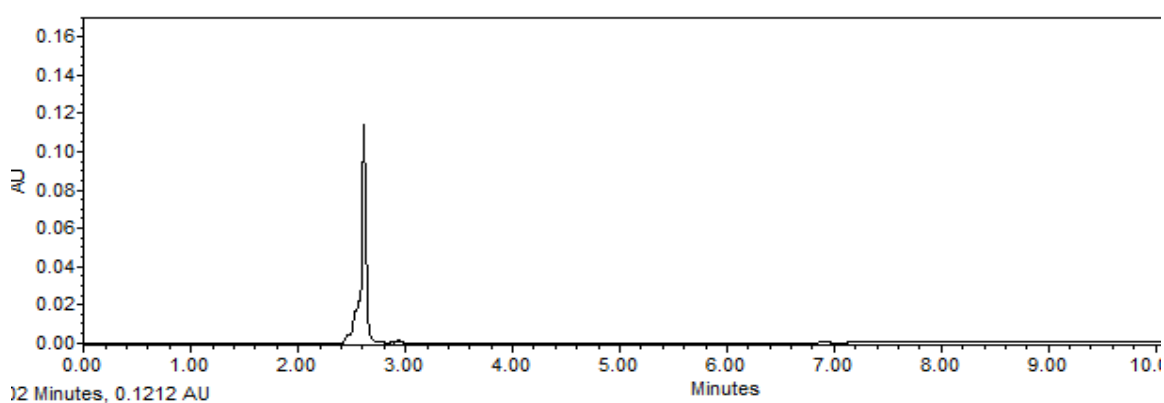


Figura 22: Cromatograma lipossoma vazio em 277,1 nm.

7.3.3 Exatidão

Foram adicionadas amostras de RAPA e RESV no placebo do lipossoma nas concentrações de 4,0 µg/mL, 5,0 µg/mL e 6,0 µg/mL diluídas em acetonitrila. As amostras foram analisadas em triplicata. Aplicando-se a Equação 2, os resultados para RAPA e RESV obtidos na recuperação estão na faixa de 95% a 105% conforme preconizado em BRASIL,2017 e ICH (2005), de acordo com as tabelas 7 e 8.

Tabela 7: Resultado obtidos nas análises de recuperação da RAPA

<u>RAPAMICINA</u>					
Concentração Nominal (µg/mL)	Concentração obtida (µg/mL)	% de Recuperação	Média	DP	DPR
4,0	4,09	102,09	102,90	1,48	1,44
	4,19	104,60			
	4,09	102,00			
5,0	5,20	103,74	103,66	0,78	0,75
	5,23	104,39			
	5,15	102,84			
6,0	6,21	103,42	103,44	0,62	0,60
	6,25	104,06			
	6,17	102,82			

Tabela 8: Resultado obtidos nas análises de recuperação da RESV.

<u>RESVERATROL</u>					
Concentração Nominal (µg/mL)	Concentração obtida (µg/mL)	% de Recuperação	Média	DP	DPR
4,0	4,15	103,51	101,89	1,71	1,68
	4,01	100,10			
	4,09	102,05			
5,0	5,02	100,22	101,99	1,63	1,60
	5,13	102,33			
	5,18	103,42			
6,0	6,23	103,84	103,95	0,42	0,40
	6,27	104,41			
	6,22	103,60			

7.3.4 Precisão Intermediária

Foram realizadas análises nas mesmas condições, em dias diferentes e consecutivos. A precisão foi verificada através dos resultados obtidos em porcentagem de recuperação das amostras analisadas na concentração de 5µg/mL, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) que deve ser menor que 5 (Tabelas 9 e 10), com o DPR (Equação 1) menor que 5 das recuperações das análises realizadas para o RESV e a RAPA.

Tabela 9: Precisão Intermediária do RESV obtidas em análises em diferentes dias.

Resveratrol	Precisão intermediária			
	% Recuperação	Média	DP	DPR
Precisão (Dia A)	103,99	101,94	1,30	1,27
	99,84			
	101,22			
	101,31			
	103,21			
	101,05			
Precisão (Dia B)	100,42			
	102,54			
	103,21			
	101,75			
	101,34			
	103,33			

Tabela 10: Precisão Intermediária do RESV obtidas em análises em diferentes dias.

Rapamicina	Precisão intermediária			
	% Recuperação	Média	DP	DPR
Precisão (Dia A)	103,55	101,69	1,41	1,49
	101,96			
	102,48			
	99,95			
	100,02			
	103,18			
Precisão (Dia B)	100,13			
	100,32			
	100,99			
	103,44			
	102,97			
	101,25			

7.3.5 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) é utilizado para medir a sensibilidade do método, e representa a menor quantidade de fármaco presente na amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado (BRASIL, 2017) e considerando a Equação 3, foram obtidos os valores de LD para RESV de 0,110 µg/mL e 0,100 µg/mL para RAPA.

7.3.6 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade de fármaco na amostra que pode ser medido com precisão, conforme o método aplicado (BRASIL, 2017). Aplicando a Equação 4, foram obtidos os valores de LQ para RESV de 0,150 µg/mL e para RAPA de 0,130 µg/mL.

7.3.7 Robustez

Verificou-se a robustez do método para determinação de RESV e RAPA por CLAE, aplicando o teste de Youden (YOUTEN E STEINER, 1975). Os resultados dos ensaios das combinações das variações estão descritos na tabela 11 e 12. O parâmetro que apresentou maior interferência tanto para a RAPA como para o RESV estão demonstrados nas tabelas 11 e 12, onde, foi o efeito B/b que representa a concentração de ácido acético na solução aquosa da fase móvel onde o A= ácido acético 2% e a= ácido acético 1,90%, enquanto que o efeito D/d que representa a variação nas balanças analíticas, teve menor interferência na robustez do RESV, e o efeito A/a que representa a troca das colunas cromatográficas apresentou menor interferência na robustez da RAPA.

Tabela 11: Robustez analítica do Resveratrol

Robustez Resveratrol			
Efeito	% Recuperação Nominal (letras maiúsculas)	% Recuperação com as Variações (letras minúsculas)	Interferência
Efeito A/a	99.22	98.93	0.2886
Efeito B/b	99.75	98.40	1.3444
Efeito C/c	99.19	98.96	0.2362
Efeito D/d	99.11	99.04	0.0627
Efeito E/e	98.98	99.17	0.1861
Efeito F/f	99.36	98.79	0.5623
Efeito G/g	99.23	98.92	0.3087

Parâmetro que mais intefериu

Parâmetro que menos intefериu

Tabela 12: Robustez analítica da Rapamicina

Robustez Rapamicina			
Efeito	% Recuperação Nominal (letras maiúsculas)	% Recuperação com as Variações (letras minúsculas)	Interferência
Efeito A/a	98.95	99.23	0.2783
Efeito B/b	99.89	98.29	1.6041
Efeito C/c	99.23	98.95	0.2785
Efeito D/d	99.44	98.75	0.6928
Efeito E/e	98.94	99.24	0.2994
Efeito F/f	99.86	98.33	1.5269
Efeito G/g	98.75	99.43	0.6779

7.4 Avaliação da eficiência de encapsulação da RAPA e do RESV em Lipossomas

A eficiência de encapsulação representa a porcentagem de fármaco que permanece somente dentro do lipossoma em relação à concentração total adicionada na formulação e confirmada analiticamente (PERKINS et al., 1993).

Os valores médios encontrados nas análises de teor total dos fármacos e na eficiência de encapsulação estão representados na tabela 13.

Tabela 13: Concentração total de fármaco e eficiência de encapsulação (%).

Formulações	Teor total de Fármaco em % (peso/ volume)		Eficiência de Encapsulação %	
LRAPA	0,043% ± 0,0015		68,42% ± 0,0188	
LRESV	0,025% ± 0,0009		76,13% ± 0,0021	
LRR	<u>RAPA</u> = 0,040% ± 0,0025	<u>RESV</u> = 0,023 % ± 0,0017	<u>RAPA</u> = 58,87% ± 0,0144	<u>RESV</u> = 63,22% ± 0,0083

Nos resultados obtidos de teor total, obtivemos um decréscimo aproximado de 27% no valor do teor total da RAPA, tanto no LRAPA quanto no LRR, fato este que pode ter ocorrido durante o processo de fabricação. A eficiência do processo de encapsulação do fármaco de um lipossoma depende da otimização de alguns parâmetros como a força iônica e o pH da fase aquosa e a razão molar do lipídio/fármaco, pois o aumento na razão lipídio/fármaco pode ocorrer a redução da eficiência de encapsulação e o excesso de fármaco durante a produção dos lipossomas favorece a formação de cristais que ficam em suspensão na fase aquosa ou

podem sedimentar durante o processo de homogeneização de alta pressão, os quais podem ficar retidos nas tubulações do equipamento (NAJLAH et al., 2019).

Eloy et al. (2016) observaram 73,31% na eficiência de encapsulação da RAPA em lipossomas com tamanho de 136,95nm, utilizando a metodologia de hidratação do filme lipídico para produzir o lipossoma. Chen et al. (2021) obtiveram lipossoma com RAPA no tamanho de 100nm e 80% na eficiência de encapsulação da RAPA pelo método de injeção de etanol. Yoon et al. (2019) obtiveram 42% de eficiência de encapsulação da RAPA em lipossomas com tamanho de partícula de aproximadamente 155nm. Nandi et al. (2021) observaram resultado de 80% de eficiência de encapsulação da RAPA em lipossomas numa faixa de 170nm a 200nm de tamanho.

Meng et al. (2016) obtiveram 92% de eficiência encapsulação do RESV em lipossomas com tamanho de partícula médio de 50nm. VIJAYAKUMAR et al. (2016) observaram eficiência de encapsulação de 79,47% para RESV em lipossomas peguilhados. Jagwani et al. (2020) relataram eficiência de encapsulação de 78,14% do RESV em lipossomas com tamanho de 145,8nm.

Os valores de eficiência de encapsulação observados para LRR foram menores quando comparados aos valores de eficiência de encapsulação do LRAPA e LRESV. Este fato pode ocorrer devido às características lipofílicas das moléculas de RAPA e RESV, que podem competir na interação molecular com a bicamada lipídica dos lipossomas (HE et al., 2016).

7.5 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O DSC é uma técnica utilizada para verificar os parâmetros termodinâmicos dos fármacos e dos lipossomas, os quais podem estar associados às interações dos fármacos com o sistema lipídico (DEMETZOS, 2008).

De acordo com as análises de DSC (figuras 23 e 24), foi verificado um evento endotérmico característico em 185,93 e 267,05°C para RAPA e RESV, respectivamente, atribuídos à fusão dos fármacos. Adicionalmente, um evento exotérmico pode ser observado na sequência, possivelmente atribuído a degradação dos fármacos (SURIE et al., 2021, JAGWANI et al., 2020, ELOY et al., 2017, VIJAYAKUMAR et al., 2016, O'NEIL et al., 2014).

Nas análises de DSC para o lipossoma vazio verificou-se um evento endotérmico com pico máximo em 183,03°C e um evento exotérmico com pico máximo em 205,58°C.

Para as formulações LRESV, LRAPA e LRR (RAPA e RESV), as respectivas análises de DSC apresentaram eventos endotérmicos e exotérmicos com picos de temperaturas análogos aos obtidos no lipossoma vazio, que podem ser verificados nas curvas presentes nas figuras 25, 26, 27, 28.

Apesar de não ser possível distinguir eventos atribuídos a matriz e aos fármacos lipossomais apenas observando as curvas de DSC, é possível verificar uma variação na entalpia delta H (ΔH) quando comparamos todos os sistemas avaliados. Os valores de ΔH atribuídos aos eventos endotérmicos e exotérmicos são apresentados na tabela 14.

Tabela 14: Valores de ΔH obtidos nas análises de DSC.

	RAPA	RESV	LV	LRAPA	LRESV	LRR
DH evento endotérmico (J/g)	204,72	239,05	67,90	84,25	94,64	124,31
DH evento exotérmico (J/g)	-	-	-50,96	-73,26	-80,82	-93,70

A entalpia é quantidade máxima de energia térmica que pode ser transferida para um composto químico sofrer a mudança de estado como sólido para líquido, ou seja, a fusão de uma substância. Esta entalpia pode apresentar uma energia com resultado positivo para o evento endotérmico, ou, uma carga negativa para o evento exotérmico, por exemplo uma degradação oxidativa ou decomposição (HÖHNE et al., 2003). Mediante os valores de entalpia obtidos, é possível verificar um aumento da ΔH dos lipossomas contendo fármaco quando comparado ao lipossoma vazio (LV), sendo os maiores valores obtidos para a amostra contendo os dois fármacos, a RAPA e o RESV (LRR), tanto para o ΔH do evento endotérmico (124,31 J/g) quanto para o ΔH do evento exotérmico (-93,70 J/g). Este aumento de ΔH possivelmente está associado a presença dos fármacos na bicamada lipídica (BARRIOCANAL et al., 2004, ONYESOM et al., 2013). Assim sendo, estes resultados sugerem o sucesso no processo de encapsulação dos fármacos nos lipossomas, uma vez que a presença dos fármacos nos lipossomas exige maior energia para a ocorrência dos eventos endotérmicos (fusão dos fármacos + matriz) e dos eventos exotérmicos (degradação dos fármacos + matriz).

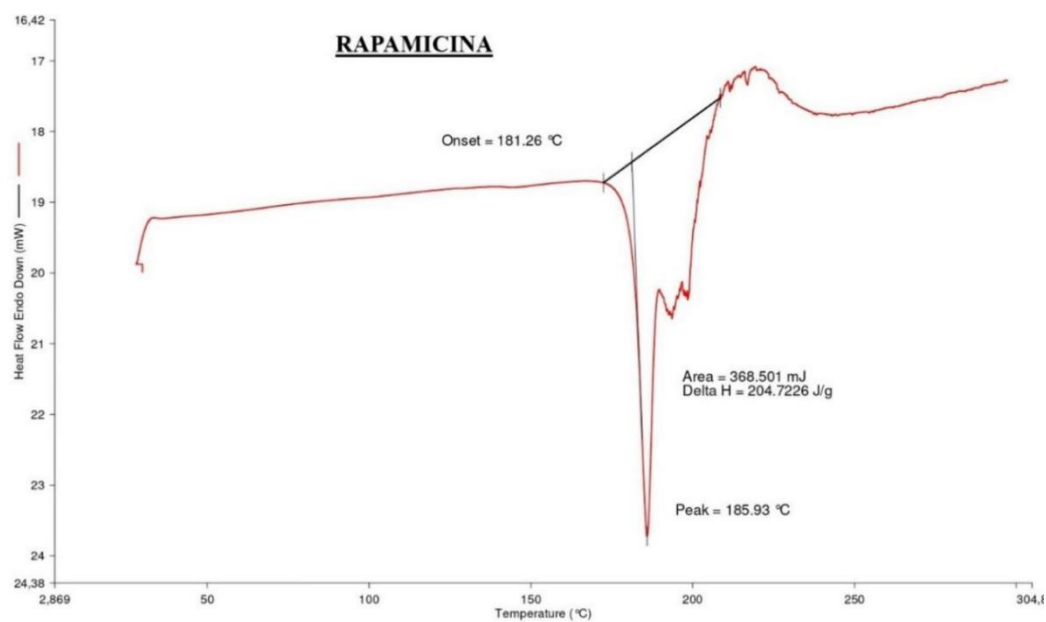


Figura 23: Perfil do DSC obtido da RAPA

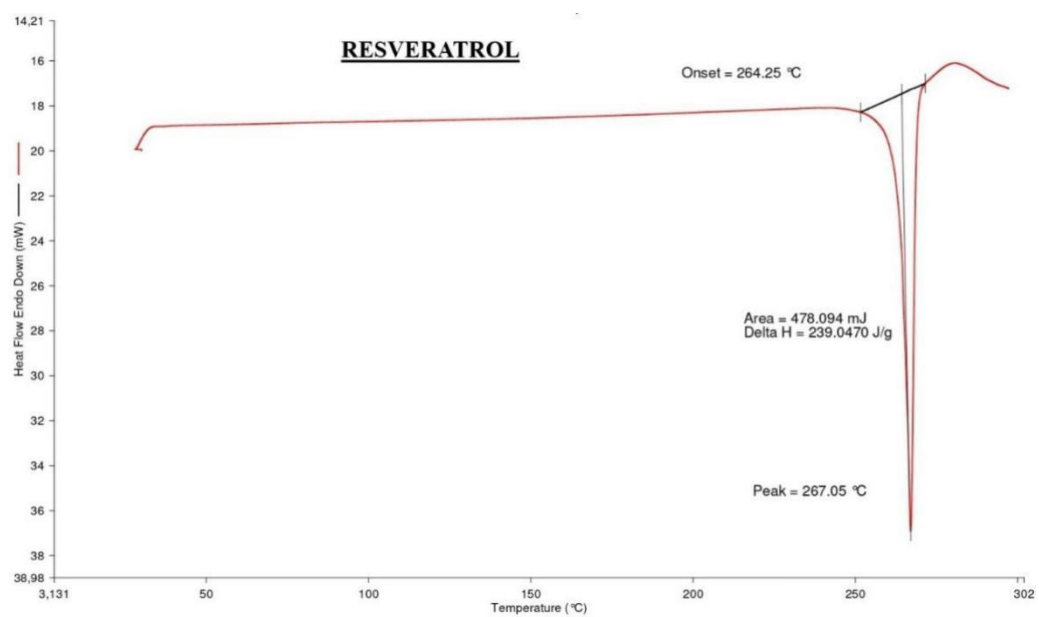


Figura 24: Perfil do DSC obtido do RESV

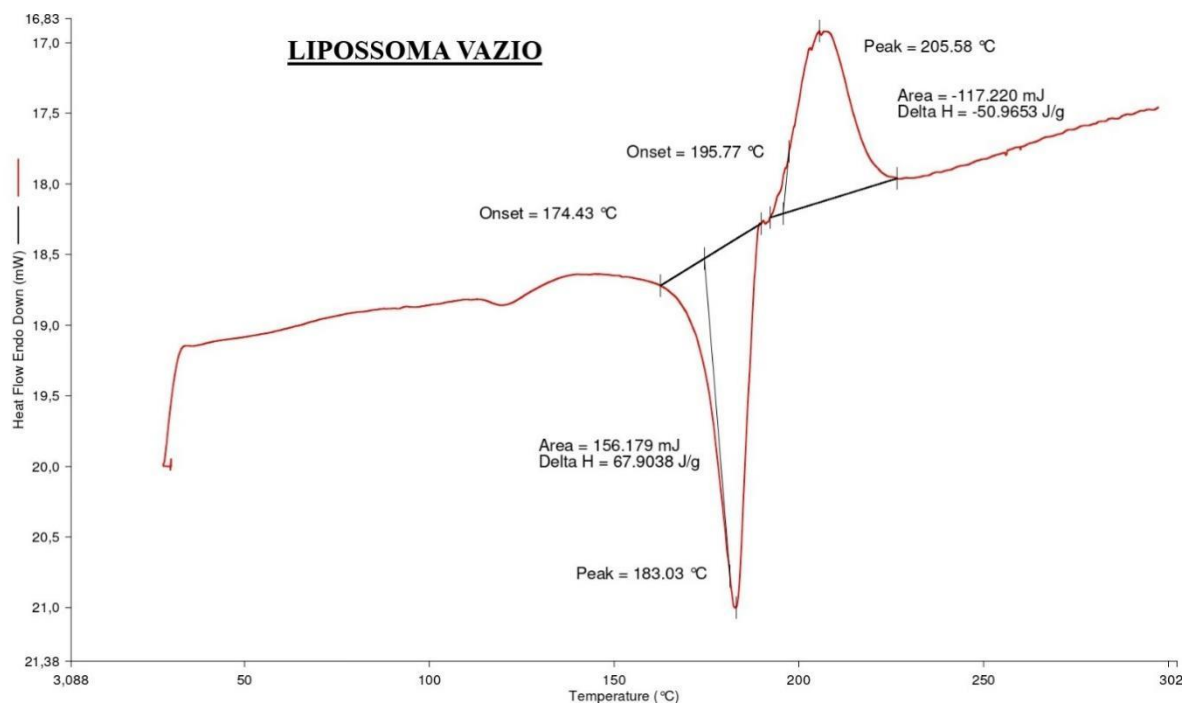


Figura 25: Perfil do DSC obtido lipossoma vazio.

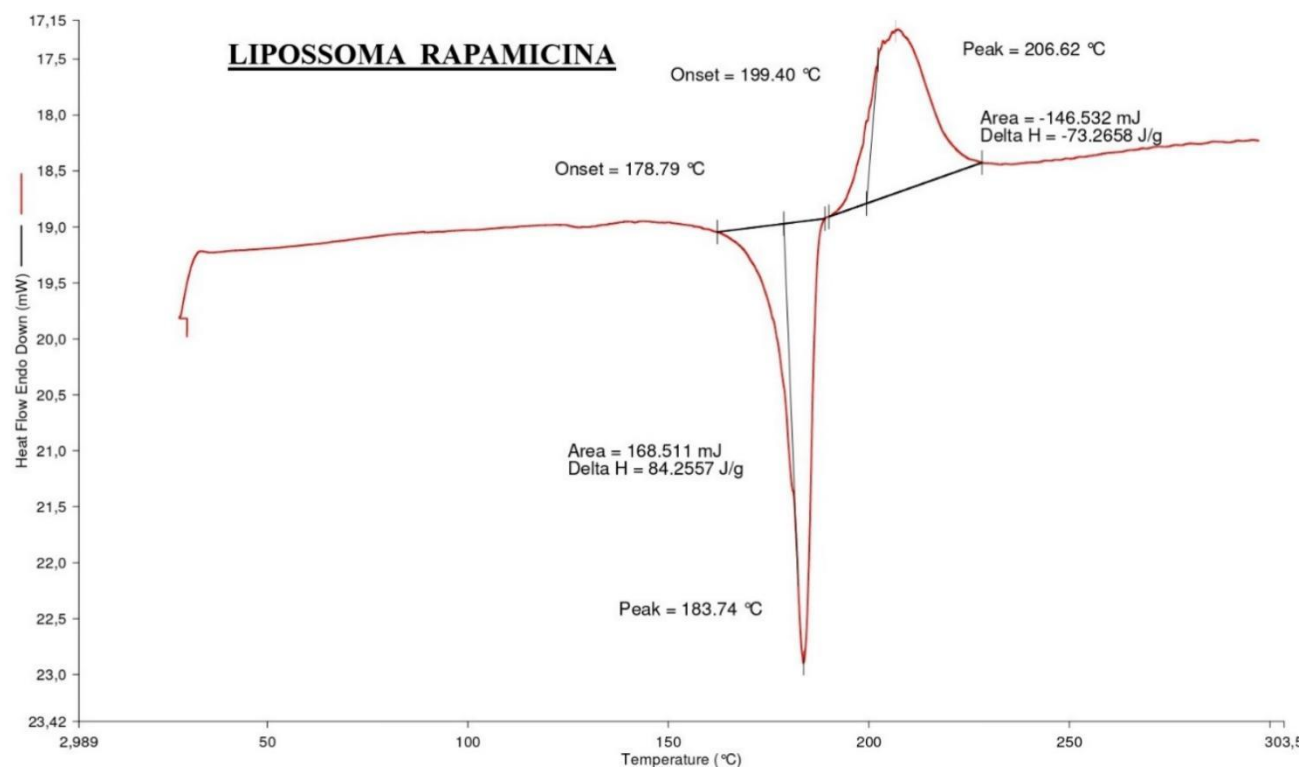


Figura 26: Perfil do DSC obtido lipossoma com RAPA.

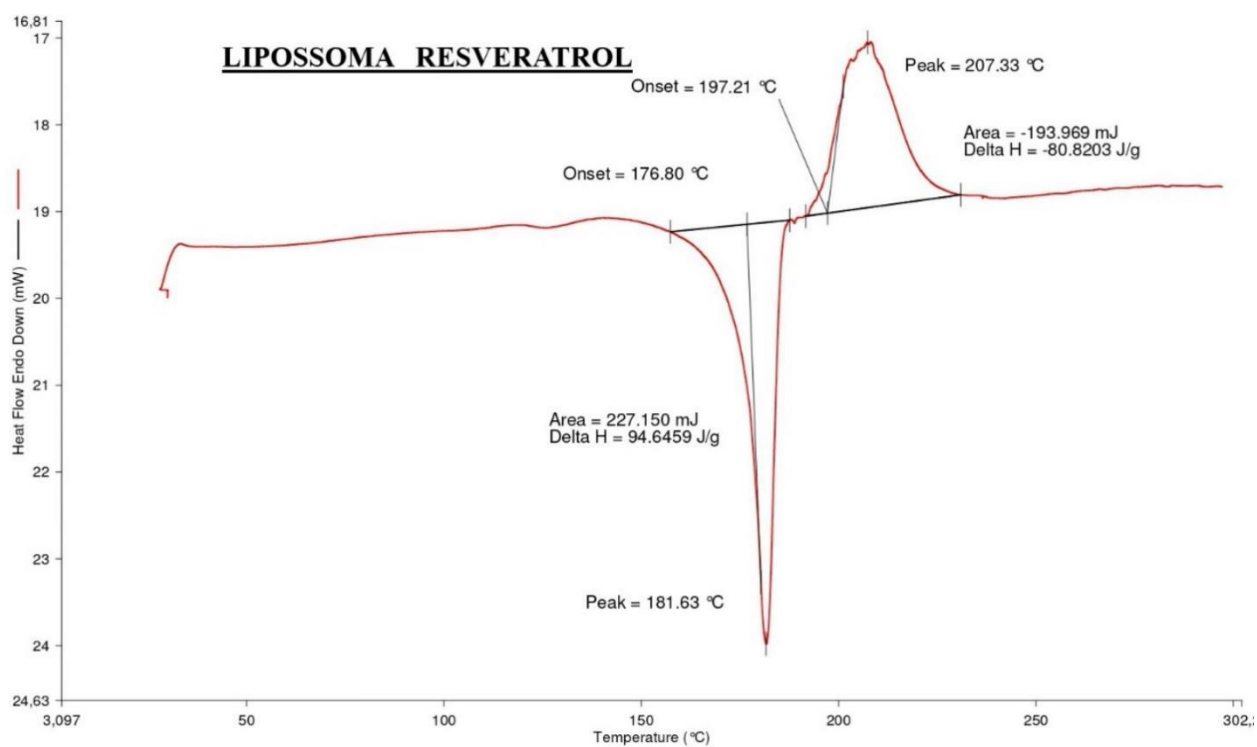


Figura 27: Perfil do DSC obtido lipossoma com RESV.

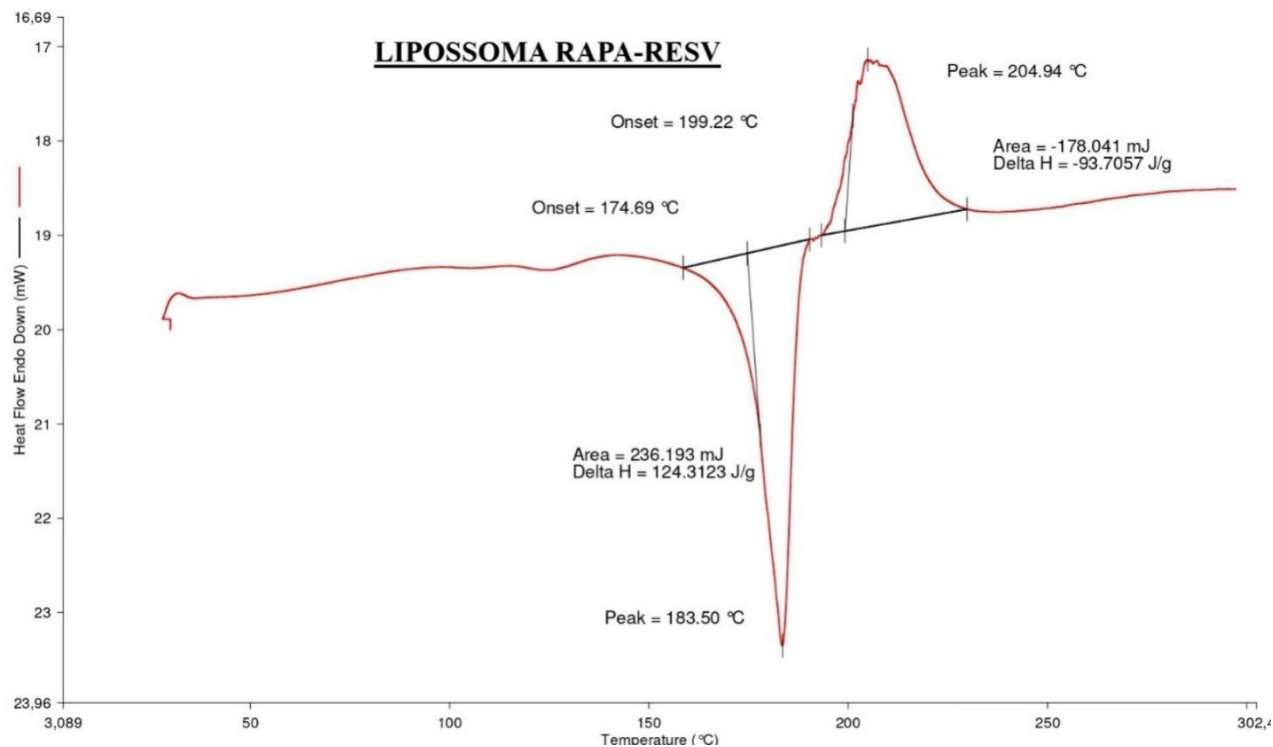


Figura 28: Perfil do DSC obtido lipossoma com RAPA e RESV.

7.6 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) Nanosight NS300

Os lipossomas podem ser caracterizados tanto pela técnica de análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) como por espalhamento dinâmico de luz (DLS) no estudo da caracterização lipossomal. Sua concentração de partículas deve ser avaliada para entender seu desempenho em sistemas biológicos, como ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade (RIBEIRO et al., 2018).

A diferença de medição entre o DLS e o NTA é que o DLS verifica a mudança de intensidade da luz espalhada durante o movimento Browniano das partículas e determina seu coeficiente de difusão, e o NTA calcula o coeficiente de difusão com base nos movimentos brownianos individuais das partículas. Por meio de sucessivas imagens de ópticas de vídeo, o NTA consegue emitir os dados de DHM e a quantidade de partículas por mL num sistema (FILIPE et al., 2010, MALLOY & CARR 2006).

A Tabela 15 apresenta os valores médios das concentrações de partículas e tamanhos médios obtidos conforme as análises no NTA.

Tabela 15: Diâmetro Hidrodinâmico Médio (DHM) e Concentração de Partículas realizadas no NTA.

Formulações	DHM (nm)	Concentração (partículas/mL)
Lipossomas Vazio	145,8 ± 6,00	1,43 x 10 ⁹
Lipossomas com RAPA	158,3 ± 0,90	5,34 x 10 ⁸
Lipossomas com RESV	146,5 ± 3,50	1,38 x 10 ⁹
Lipossomas com RESV e RAPA	135,0 ± 1,00	3,17 x 10 ⁸

Os valores obtidos de DHM no NTA mostraram que os lipossomas com RAPA e RESV apresentaram DHM menor quando comparado com as outras formulações, assim como nas análises obtidas no DLS. Apesar disso, os resultados médios obtidos no DLS foram menores quando comparado aos resultados de DHM obtidos no NTA.

Altas diferenças nas contagens de partículas diferentes podem ser explicadas principalmente entre cada medição para a mesma amostra (RIBEIRO et al., 2018)

Em estudos de caracterização de análises de nanopartícula realizado por Boyd, Pichaimuthu e Cuenat (2011) que utilizaram três técnicas de caracterização para verificar a

distribuição de tamanho e diâmetro médio das partículas os autores encontraram diferença significativa entre as técnicas avaliadas.

Felipe, Hawe e Jiskoot (2010) realizaram a caracterização de nanopartículas através dessas duas técnicas (NTA e DLS) e observaram que o NTA requer otimização dos parâmetros para uma análise confiável. Apesar disso é uma ferramenta útil para complementar a análise feita através do DLS.

7.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (HR-TEM)

A técnica de HR-TEM foi utilizada para fornecer informações mais detalhadas em relação à morfologia dos lipossomas e tem como finalidade corroborar a caracterização mediante a avaliação do diâmetro, além da verificação de alterações relacionadas aos fenômenos de agregação e fusão das partículas. Entretanto, o processo de desidratação durante o preparo da amostra pode causar o encolhimento ou até mesmo distorção no diâmetro da partícula e o pré-tratamento da amostra com corantes específicos pode gerar artefatos que causam alterações na estrutura original da vesícula (BIBI et al., 2011; PATIL & JADHAV, 2014).

Na figura 29 estão evidenciadas as formulações lipossomais com formato aproximadamente esférico e com diâmetro aproximado de 100nm o que corrobora os resultados obtido pela técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS) e NTA.

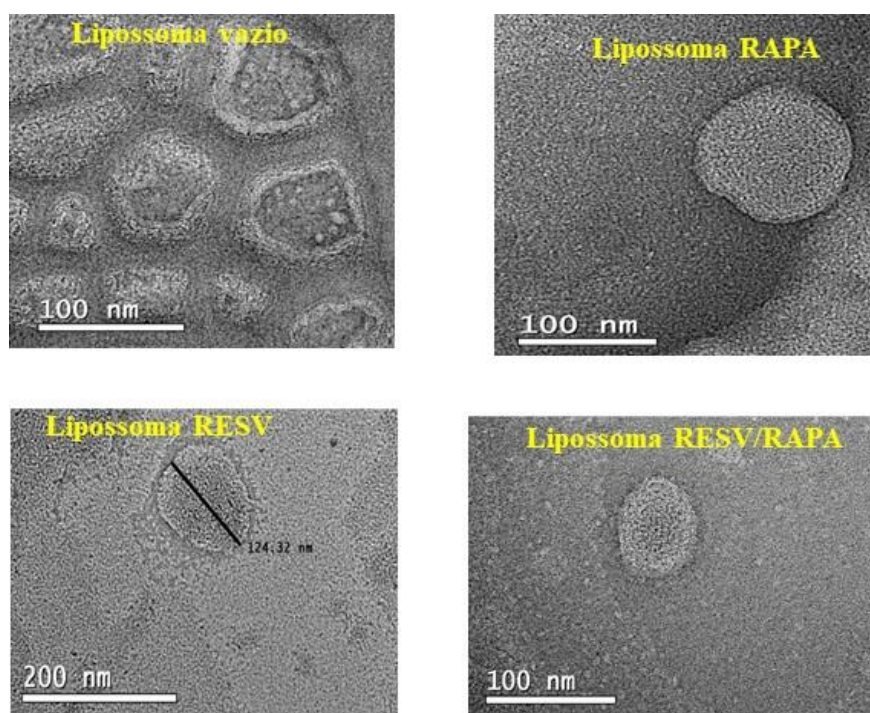


Figura 29: Imagem dos lipossomas obtidas na Microscopia Eletrônica Transmissão.

7.8 Estudo de Solubilidade RAPA e RESV

O estudo de solubilidade dos fármacos é necessário para definir as condições *sink* para realização do ensaio de liberação *in vitro*, onde o volume do meio de liberação deve ser de três a dez vezes maior que o necessário para formar uma solução saturada (LIU et al., 2013).

A solubilidade da RAPA e do RESV foi verificada em soluções de tampão fosfato pH 7,4 com diferentes concentrações de lauril sulfato de sódio (SDS) 1% e 2% e a quantidade de RAPA e RESV solubilizadas foram expressos em porcentagem conforme demonstrado na tabela 16. Foi verificado que o meio com tampão fosfato pH 7,4 e SDS 2% apresenta maior solubilidade principalmente da RAPA e para RESV.

Tabela 16: Resultados obtidos no teste de solubilidade

Meios de Liberação	% [RAPA]	% [RESV]
Tampão Fosfato 7,4 com 1% SDS	0,75 ± 0,031	0,94 ± 0,078
Tampão Fosfato 7,4 com 2% SDS	1,26 ± 0,102	1,67 ± 0,063

7.9 Ensaio de liberação *in vitro* da RAPA e RESV em lipossomas

Para que um fármaco incorporado num sistema de liberação seja absorvido após sua administração, é necessário que ocorra a dissolução deste fármaco, ou seja, que suas moléculas sejam liberadas da forma farmacêutica como uma dispersão molecular. A dissolução pode ser avaliada através de estudos matemáticos da cinética do perfil de liberação *in vitro* do fármaco, que é de suma importância, pois visa determinar a velocidade e eficiência do processo de interação entre a dissolução, a difusão e os mecanismos de erosão, possibilitando, desta forma, identificar as características de determinada formulação em pHs semelhantes aos fisiológicos (FREIBERG et al., 2004, RODRIGUES & SILVA, 2005).

Utilizou-se a solução receptora PBS pH 7,4 com SDS a 2% para este ensaio de liberação *in vitro* feito por um período de 72h, e, as concentrações dos fármacos expressadas em porcentagem em relação a quantidade inicial de fármacos adicionadas na bolsa de diálise. Nos resultados obtidos verificou-se que após 0,5h de ensaio foram liberados: solução de RAPA livre 18,00±1,6%, solução de RESV livre 24,50 ± 1,38% e solução de RAPA/RESV 14,18±1,09% e 19,24±1,09%. Após 4 horas do ensaio as soluções com fármacos livres atingiram o platô

mantendo as seguintes concentrações de fármacos até as 72h de ensaio: $90,15\% \pm 1,09\%$ da solução de RAPA livre $87,24 \pm 2,03\%$ da solução de RESV livre $82,38 \pm 1,52\%$ de RAPA e $80,45 \pm 1,76\%$ de RESV na solução com os dois fármacos livres.

Nas formulações lipossômicas foi possível verificar uma liberação mais lenta, quando comparadas as soluções com fármacos livres. Verificou-se inicialmente as seguintes concentrações de fármacos com 1 h de ensaio: lipossomas RAPA $0,50 \pm 1,96\%$, lipossomas RESV $0,72 \pm 1,09\%$ e lipossomas RAPA e RESV 0% e $0,35 \pm 3,44\%$, respectivamente. Para os lipossomas com RAPA e RESV foi verificada a liberação inicial de RAPA no tempo 2h sendo verificada a concentração de RAPA de $0,628 \pm 4,37\%$. Após 72h de ensaio foram obtidas as seguintes concentrações de fármacos das formulações lipossômicas: lipossomas RAPA $23,71 \pm 5,22\%$, lipossomas RESV $32,60 \pm 7,91\%$ e lipossomas RAPA/RESV $21,92 \pm 1,87\%$ e $30,99 \pm 3,72\%$ respectivamente. Nandi et al. 2020 demonstraram a liberação de 10% a 12% de RAPA nos sistemas lipossomais peguilados obtidos em seus experimentos.

Os lipossomas peguilados apresentam uma liberação mais lenta, pois são capazes de reter o fármaco encapsulado por mais tempo, principalmente na circulação sanguínea, favorecendo a liberação lenta no local de ação (ELOY et al., 2016, PANWAR et al., 2010).

Os perfis de liberação das formulações lipossômicas com a soluções de fármacos livres estão representados nas figuras 30, 31 e 32.

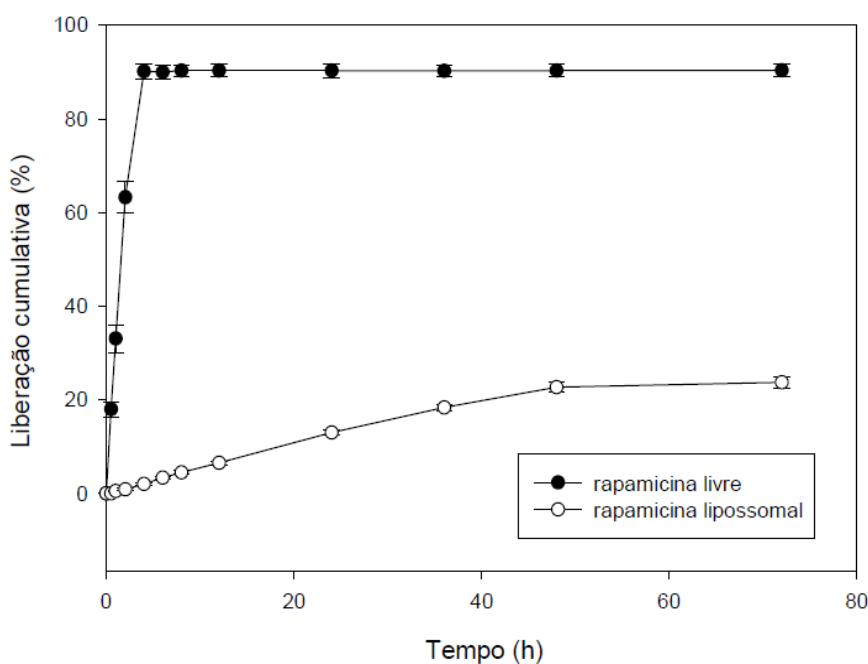


Figura 30 : Perfil de Liberação da RAPA livre e da RAPA lipossomal.

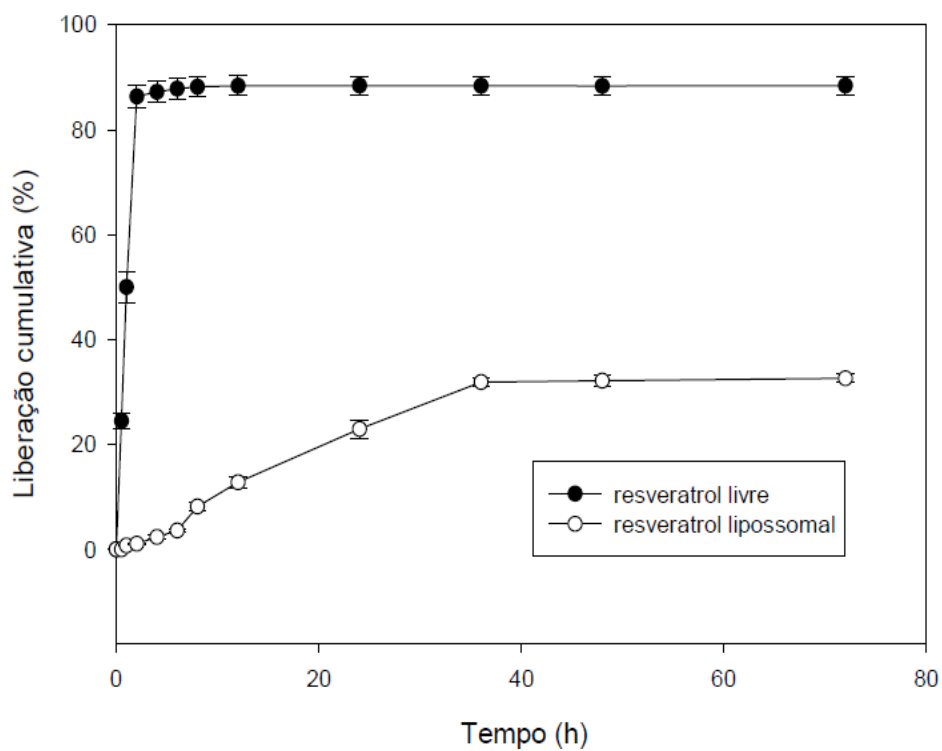


Figura 31: Perfil de Liberação do RESV livre e do RESV lipossomal.

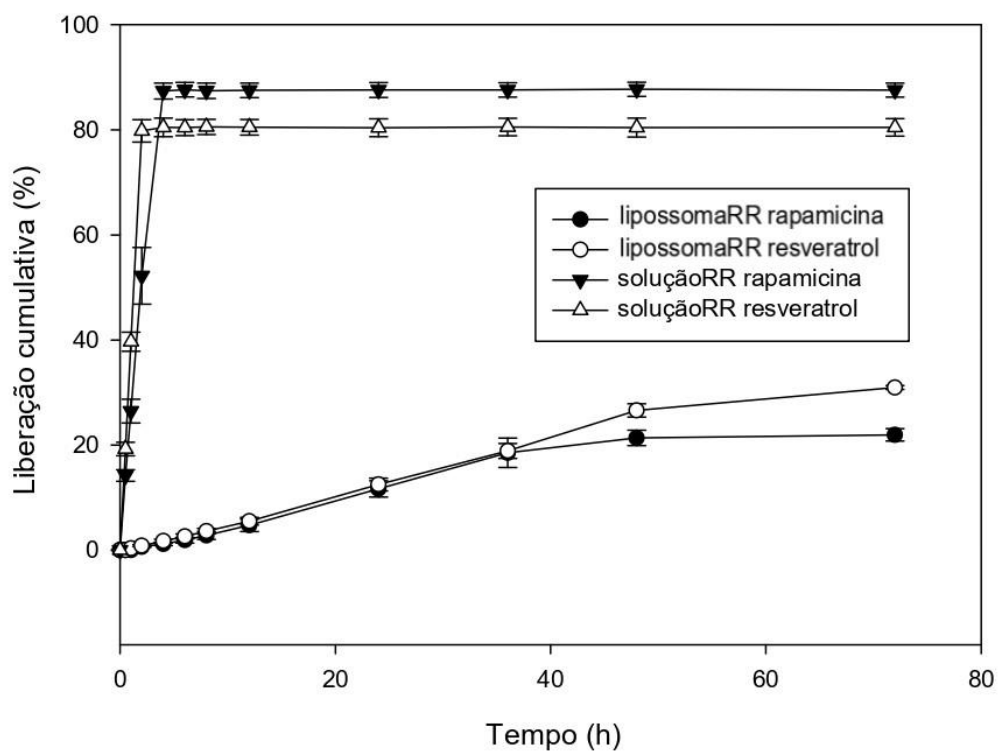


Figura 32: Perfil de Liberação da RAPA e do RESV em associação e da RAPA e do RESV lipossomal

Foi verificada a cinética de liberação dos lipossomas com associação RAPA/ RESV utilizando os modelos matemáticos de Ordem Zero, Primeira Ordem, Higuchi, Hixon & Crowell, Korsmeyer-Peppas apresentado na tabela 17. Para esse estudo o modelo Korsmeyer-Peppas foi considerado como mais adequado para o perfil de liberação da RAPA, e o modelo de Primeira Ordem foi o mais adequado para o perfil de liberação do RESV. Estes modelos matemáticos foram definidos porque apresentaram os valores de coeficiente de determinação (R^2) mais próximos de 1,00, conforme demonstrado na tabela 17.

Tabela 17: Modelos matemáticos e seus respectivos coeficientes de determinação R^2 utilizados para determinar a cinética de liberação.

Modelo	Rapamicina			Resveratrol		
	k	R^2	N	K	R^2	n
Ordem zero	0,0001	0,8586		0,0002	0,8531	
Primeira ordem	0,0043	0,9395		0,0056	0,9873	
Higuchi	2,5017	0,8666		3,099	0,8662	
Hixson-Crowel	0,0014	0,9334		0,0018	0,9853	
Korsmeyer-Peppas	0,8858	0,9441	0,7848	0,7278	0,9829	0,8937

O modelo matemático descrito por Peppas de forma simplificada descreve os mecanismos de liberação de fármacos a partir da equação 7:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n$$

Equação 7: Equação definida por Korsmeyer-Peppas para cinética de liberação dos fármacos.

Nesta equação 7 o M_t representa a quantidade em mg do fármaco liberado no tempo t , e o M_∞ é a quantidade total em mg de fármaco encapsulado, e K representa uma constante cinética que incorpora as características estruturais e geométricas do sistema de liberação controlada, e o n é o expoente da difusão que caracteriza o mecanismo de transporte da liberação do fármaco. Para a cinética de liberação de solutos a partir de sistemas intumescíveis com geometria esférica, o valor do expoente de liberação de $n \leq 0,43$ evidência que mecanismo de liberação analisado é de difusão do soluto através de camadas da matriz, também conhecido como mecanismo de liberação Fickiano ou “Caso I”. O valor de $n = 0,85$ adverte que a liberação do soluto é controlada apenas pelo intumescimento/relaxação da cadeia polimérica, isto é,

independentemente do tempo, e este mecanismo é conhecido como “Caso II” de transporte e, quando $0,43 < n < 0,85$, obtém-se um transporte não-Fickiano ou anômalo, onde ocorre a superposição dos dois fenômenos, sendo que a liberação é controlada pela difusão e intumescimento, simultaneamente, e, para valores de $n > 0,85$ tem-se um super-caso II de transporte, no qual ocorre a contribuição simultânea de processos como difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica (BRUSCHI, 2015, PEPPAS & SAHLIN 1989)

A cinética de liberação da RAPA a partir dos lipossomas apresentou $n = 0,7848$ e é baseada num transporte não-Fickiano ou anômalo, onde a liberação é controlada pela ocorrência simultânea de difusão dos fármacos no meio receptor e intumescimento das partículas lipossomais. A adição de PEG à matriz possivelmente favoreceu maior nível de organização estrutural, de forma que as taxas de difusão do fármaco através dessa estrutura mais estável e organizada pode ter sido responsável pela parcial liberação controlada por difusão (ELOY et al., 2016).

Porém considerando o modelo cinético de Primeira Ordem obtido para RESV lipossomal, este modelo é caracterizado por apresentar a liberação do fármaco de forma proporcional à quantidade encapsulada no sistema de liberação utilizado, de modo que a quantidade de fármaco liberada diminui conforme o tempo, e o gráfico obtém o perfil com uma característica curva semi-logarítmica e a equação 8 é utilizada para descrever este modelo matemático de primeira ordem. (BRUSCHI, 2015).

$$\log M_t = \log M_\infty + \frac{k_1 t}{2,303}$$

Equação 8: Equação utilizada para o modelo matemático cinético de primeira ordem.

Na equação 8 M_t representa a quantidade do fármaco liberado no tempo t , e o M_∞ é a quantidade inicial de fármaco na solução, e K_1 é a constante de liberação de primeira ordem.

8.0 Análise *in vitro* do perfil de citotoxicidade das formulações lipossomais de RAPA e/ou RESV.

Para verificar se a incorporação dos compostos RAPA e RESV em lipossomas é capaz de potencializar o efeito biológico destes compostos, o efeito das formulações foi avaliado na linhagem MCF7 e a viabilidade celular avaliada. Os resultados evidenciaram que de uma maneira geral é possível observar uma diminuição da viabilidade celular de forma dose-dependente a partir de todos os tratamentos avaliados.

Os valores de IC_{50} encontrados para os fármacos na sua forma livre foram de 5,67 μM para RAPA, 51,75 μM para RESV e quando associados 5,051 μM e 22,99 μM para RAPA e RESV, respectivamente (Tabela 18). Estes valores corroboram com a informação de que estes fármacos quando associados promovem uma ação antitumoral na célula. Foi possível ainda verificar que RESV tem maior citotoxicidade quando associado a RAPA, pois, observamos uma redução na concentração do IC_{50} de RESV quando está associado a RAPA, livres ou em lipossomas (29,11 μM) comparado ao IC_{50} de RESV livre ou RESV lipossomal (49,61 μM), justificando assim a diferença estatística $p > 0,05$ nas concentrações do IC_{50} de RESV ou LRESV quando comparados com a associação RAPA e RESV livre ou lipossomal. Estudos reportam que o fármaco RESV tem potencial de aumentar a atividade antitumoral da RAPA uma vez que ambos os fármacos atuam na proteína mTOR e corroboram com o processo de indução da apoptose celular (XIN et al., 2011; ALAYEV et al., 2015).

Fu et al. (2014) verificaram que o RESV não é citotóxico para células de mama normais, MCF10A, porém, para MCF7 a concentração de 40 μM de RESV reduziu aproximadamente 60% da viabilidade celular. Chen et al. 2019 verificou e redução aproximada de 50% das células de MCF7 com 50 μM RESV.

A formulação com lipossomas vazio apresentou maior viabilidade celular (ver figura 31 e 32) e maior concentração necessária para atingir IC_{50} quando considerado em massa molar de RAPA (29,97 μM) e RESV (136,40 μM) e, comparado com a IC_{50} dos fármacos livres e dos fármacos nos lipossomas, estes resultados demonstram que somente o lipossoma não é capaz de interferir na ação antitumoral da RAPA e/ou RESV lipossomal, pois, apresentou menor citotoxicidade que comparado aos fármacos livres RAPA e /ou RESV.

Os resultados ainda evidenciaram diferença estatística significativa $p > 0,05$ para LRAP quando comparado com o fármaco RAPA livre associado ou não ao RESV e também quando comparado com o LRR, conforme os resultados obtidos na tabela 18 o valor de IC_{50} da RAPA livre (5,67 μM) é menor quando comparado com a RAPA nas formulações lipossomais, assim

sendo a RAPA livre é mais citotóxica que a LRAPA que LRR. Além disso, o fármaco RAPA associado ao RESV (livre) apresentou maior citotoxicidade que as formulações lipossomais com RAPA associada ao RESV ou não.

Em outro estudo, Xin et al. (2011) analisaram a associação de RAPA e RESV e verificaram a IC_{50} respectivamente em linhagens de células MCF-7, e para células MDA-MB-231 resistentes ao tratamento da RAPA foi encontrado a IC_{50} de 10 μ M para RAPA e 10nM RESV. Nandi et al. 2020 verificaram a redução da viabilidade de células de câncer de mama BT-474 em concentrações de RAPA acima de 40 μ g/mL, enquanto Rouf et al. 2009 obtiveram 46,85% de morte das células MCF-7 na concentração de 25nM de RAPA em lipossomas peguilados, e 66,02% de morte das células MCF-7 na mesma concentração de RAPA porém em lipossomas não peguilados, ou seja, os lipossomas peguilados podem reduzir a citotoxicidade. Em outro estudo a peguilação de lipossomas reduziu significativamente a taxa de liberação do fármaco e também reduziu significativamente a potência de citotoxicidade em linhagens de células MCF7 (75% para 25%) do anastrozol quando comparado com o fármaco livre após 72 h (SHAVI et al., 2016).

É importante ressaltar que as formulações lipossomais possuem uma cinética de liberação prolongada, conforme observado no ensaio de liberação *in vitro*, e mesmo que estas formulações obtenham valores de citotoxicidade maiores que os fármacos livres, os lipossomas peguilados circulam por períodos prolongados e não são capturados pelas células fagocíticas do sistema do retículo endotelial. A doxorubicina lipossomal peguilada tem uma meia-vida 30 a 90h na circulação sanguínea e atinge uma concentração cerca de 10 a 15 vezes maior nos tecidos tumorais em comparação com os tecidos normais, o que indica que a doxorubicina lipossomal peguilada se acumula no tecido tumoral pelo aumento de permeabilidade e o efeito de retenção (EPR) (GABIZON et al., 2003).

Além disso, os tamanhos das partículas dos lipossomas 77 a 100nm corroboram também para um efeito que facilita a permeabilidade passiva nos tumores, pois, faixa de 10 ~ 200 nm são consideradas o tamanho ideal para alcançar o efeito EPR em tumores em formas esféricas, podem alcançar melhores resultados de acúmulo dentro dos tumores (WU, 2021, CHEN et al., 2021, KALYANE et al., 2019, SUK et al., 2016, BLANCO et al., 2015, TORCHILIN 2005).

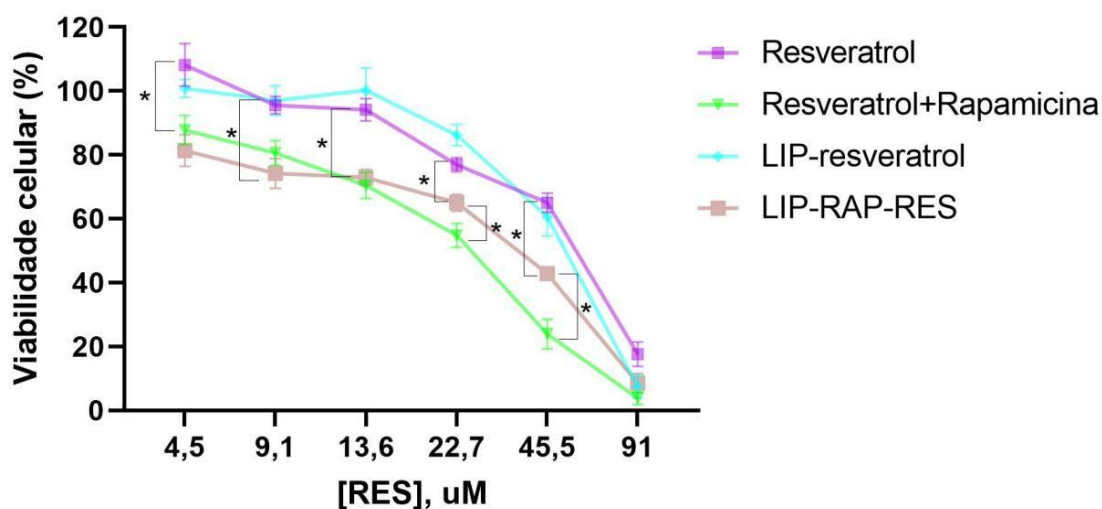


Figura 33: Viabilidade Celular nas concentrações de 4,5, 9,1, 13,6, 22,7, 45,5 e 91 μM de RESV. (*) diferença estatística LIP: lipossomas

Tabela 18: Tabela com as concentrações de IC_{50} . LV: lipossoma vazio; LRAPA: lipossomas com RAPA; LRESV: lipossomas com RESV; LRR: lipossomas com RAPA e RESV.

Formulações	IC_{50} [RAPA], μM	IC_{50} [RESV], μM
RAPA	5,68 _a	-
RESV	-	51,75 _{f,g}
RAPA+RESV	5,05 _{b,d}	22,99 _{f,h}
LV	29,97	136,40
LRAPA	8,82 _{a,b,c}	-
LRESV	-	49,61 _{h,i}
LRR	6,40 _{c,d}	29,11 _{g,i}

**As letras a,b,c,d,f,g,h,i representam as formulações que houveram diferença estatística significativa nos valores de IC_{50} .

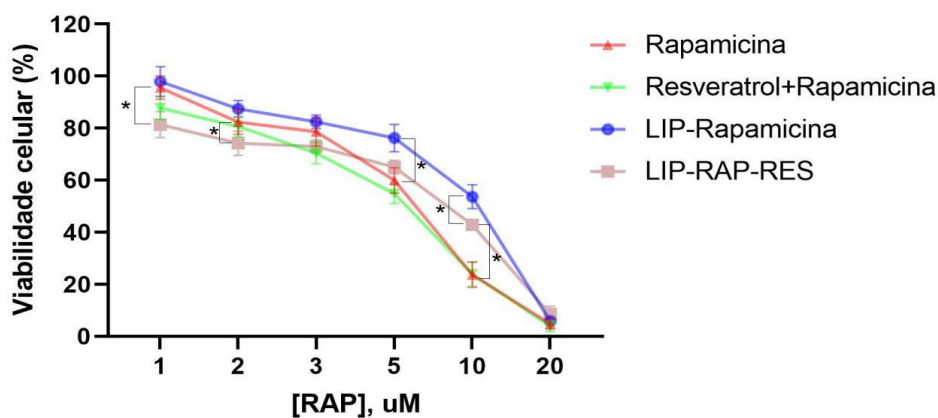


Figura 34: Viabilidade Celular nas concentrações de 1,2,3,5,10,20 μM de RAPA. (*) diferença estatística LIP: lipossomas

8.1 Internalização Celular por Citometria de Fluxo

Para entender os resultados obtidos ressalta-se a importância de analisar o perfil de fluorescência de acordo com cada quadrante, sendo que os quadrantes Q1 e Q2 representam células coradas com iodeto de propídio (IP) e que perderam a viabilidade. O IP é um marcador fluorescente que possibilita a análise da integridade da membrana plasmática celular, portanto para este ensaio foi utilizado para marcação de células necróticas/mortas. No caso dos quadrantes Q3 e Q4 estão as células vivas e estão marcadas ou não com o DiO, respectivamente (YEFIMOVA et al., 2012). Nas análises de internalização dos lipossomas no período de 24h nas células de linhagem MCF7 obtivemos um valor médio de $34,2 \pm 1,90\%$ de lipossomas internalizados em células vivas (*uptake* celular) e aproximadamente 4% de lipossomas internalizados em células mortas, conforme demonstrado na figura 35.

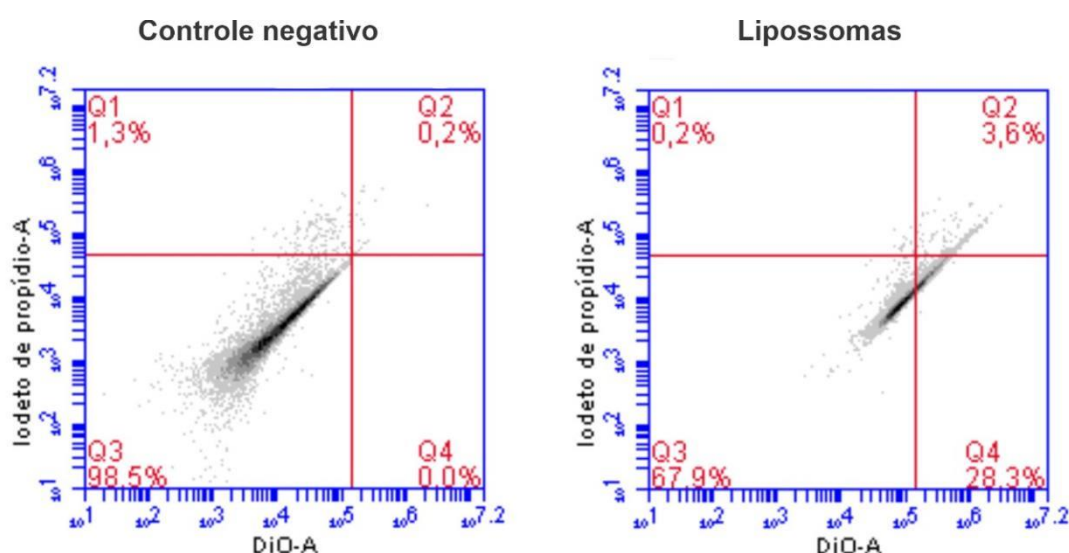


Figura 35: Controle Negativo e Internalização dos Lipossomas nas células MCF7. Q1: células mortas; Q2: Células mortas com lipossomas internalizados, Q3: Células Vivas, Q4: Células vivas com lipossomas internalizados.

Diversos estudos relatam que a inclusão de PEG na membrana do lipossoma também inibe a absorção de lipossomas pelas células tumorais HeLa. (MAEKAWA-MATSUURA et al., 2019). A endocitose pode ser influenciada pela carga dos lipossomas, estudos sugerem que lipossomas peguillados carregados positivamente tiveram maior *uptake* celular que lipossomas carregados negativamente contendo PEG (HATAKEYAMA et al., 2013, DÜZGÜNEŞ & NIR 1999). Talvez fosse necessário a introdução de ligantes alvos para corroborar com o aumento do *uptake* celular (HATAKEYAMA et al. 2013).

Eloy et al. 2017 em seus estudos sobre o *uptake* celular em lipossomas e imunolipossomas em células da linhagem SKBR3 de câncer de mama, verificaram o *uptake* celular de ambas as formulações com valores próximos a 90%, porém os imunolipossomas indicaram ter maior *uptake* celular pela intensidade de fluorescência obtida na análise.

Em estudos com lipossomas peguilados contendo albumina ligada a paclitaxel, verificou-se *uptake* em células de câncer de mama de 76,1 % para células da linhagem MCF7 e 85,3% para células MDA-MB-231 (OKAMOTO et al. 2019).

Yoon et al. (2019) observaram que captação celular dos lipossomas mediados pelo receptor folato tiveram o dobro de aumento na uptake celular quando comparado com lipossomas convencional em células de carcinoma urotelial 5637, HT1376.

9.0 Conclusões

- ✓ Os lipossomas foram desenvolvidos pela técnica de homogeneização de alta pressão com as seguintes razões molares 10:2:2:10,5 sendo PC: CH: RESV: RAPA:DSPE-PEG2000 respectivamente, e para melhorar a estabilidade da suspensão lipossomal adicionou-se antioxidantes (100 mM de Vitamina C e 70nM de Vitamina E). Apresentaram estabilidade de 60 dias.
- ✓ Os ensaios de caracterização evidenciaram diâmetro hidrodinâmico médio de 74nm a 100nm estes valores foram confirmados pelas análises de NTA e TEM-HR, o IPD manteve na faixa de 0,200 a 0,250 e o PZ de -15,63 a -18,76 para as formulações lipossômicas obtidas
- ✓ O método de quantificação simultânea nos lipossomas de RAPA e RESV por CLAE DAD foi validado e o mesmo apresentou-se linear, seletivo, com exatidão e precisão além de robusto.
- ✓ A eficiência de encapsulação nas formulações foi de 58,87% e 63,22% para RAPA/RESV respectivamente associado no lipossoma, e, 68,42% de RAPA lipossomal, e 76,13% de RESV lipossomal.
- ✓ Nas análises de DSC obtida das formulações lipossomais, foi observado o aumento nos valores de entalpia indicou a presença dos fármacos dispersos nas camadas fosfolipídicas dos lipossomas.
- ✓ Na liberação *in vitro* após 72h do ensaio verificou-se que os lipossomas com associação RAPA/RESV apresentam liberação prolongada com a cinética de liberação de Korsmeyer-Peppas para o perfil de liberação prolongada da RAPA, e o modelo de Primeira Ordem para liberação do RESV.
- ✓ O lipossoma vazio não apresentou citotoxicidade quando comparados com os fármacos lipossomais associados ou não.
- ✓ Nas análises de internalização dos lipossomas nas células de linhagem MCF7 obtivemos o valor médio de $34,2 \pm 1,90\%$.

9.1 Considerações finais

Os lipossomas com a associação de RAPA e/ou RESV foram desenvolvidos empregando a técnica de homogeneização de alta pressão, com a técnica que não utiliza solvente orgânico. Utilizou-se a água como um agente dispersor, uma estratégia importante na química verde tornando assim um projeto mais sustentável e também de fácil escalonamento industrial. As formulações lipossomais estericamente estabilizadas com RAPA e/ou RESV apresentaram efeitos citotóxicos para células de câncer de mama, porém em menor potência quando comparado com os fármacos livres. Uma vez que são formulações peguiladas de ação prolongada, talvez a adição de um ligante num receptor específico de célula de câncer de mama permita melhor internalização dos lipossomas nas células e consequentemente melhor eficiência antitumoral. Ensaios *in vivo* serão de fundamental importância para elucidar o potencial efeito antineoplásico das formulações lipossomais com RAPA e/ou RESV para terapia do câncer de mama.

10. Referências Bibliográficas

- ADVANI, S. H. (2010) Targeting mTOR pathway: A new concept in cancer the Rapamycin. *Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 31,132-136.
- ARGENZIANO M, ARPICCO S, BRUSA P, CAVALLI R, CHIRIO D, DOSIO F, GALLARATE M, PEIRA E, STELLA B, UGAZIO E. (2021) Developing Actively Targeted Nanoparticles to Fight Cancer: Focus on Italian Research. *Pharmaceutics*. 13(10):1538.
- ARRIOLA APELO, S. I., & LAMMING, D. W. (2016). Rapamycin: An Inhibitor of Aging Emerges From the Soil of Easter Island. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 71(7), 841–849.
- AKBARZADEH A., REZAEI-SADABADY R., DAVARAN S., JOO S.W., ZARGHAMI N., HANIFEHPOUR Y., SAMIEI M., KOUHI M., NEJATI-KOSHKI K. (2013) Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale Res. Lett.* 8-102.
- ALBUQUERQUE, H., SANTOS, C., & SILVA, A. (2018). Cholesterol-Based Compounds: Recent Advances in Synthesis and Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(1), 116.
- ALAYEV, A., BERGER, S. M., KRAMER, M. Y., SCHWARTZ, N. S., & HOLZ, M. K. (2015). The Combination of Rapamycin and Resveratrol Blocks Autophagy and Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116, 450–457.
- ALLAN A.L., VANTYGHM S.A., TUCK A.B., CHAMBERS A.F.(2006) Latência de tumores e células estaminais de câncer: implicações para a biologia e tratamento de metástases de câncer de mama. *Breast Dis.*26: 87-98.
- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). (2015) *Cancer Facts & Figures 2015*. Atlanta: American Cancer Society. p.26.
- BAKHSHAIESH T.O., ARMAT M., SHANEHBANDI D., SHARIFI S., BARADARAN B., HEJAZI M.S., SAMADI N. (2015) Arsenic trioxide promotes paclitaxel cytotoxicity in resistant breast cancer cells, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 16, 5191–5197.
- BANERJEE, A., QI, J. P., GOGOI, R., WONG, J. & MITRAGOTRI, S. (2016) Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. *J Control Release* 238, 176–185.
- BARNADAS-RODRÍGUEZ R., SABÉS M.(2001)Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer *Int. J. Pharm.*, 213, pp. 175-186

BARRIOCANAL L., TAYLOR K.M.G., BUCKTON G. (2004) A study of liposome formation using a solution (isoperibol) calorimeter. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 287, Issues 1–2.

BATISTA, C. M., CARVALHO, C. M. B. M., NEREIDE S. S. (2007) Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* v. 43, n. 2 pp. 167-179.

BELSITO S., BARTUCCI R., SPORTELLI L. (2001) Lipid chain length effect on the phase behaviour of PSC/PEG:2000-pes mixtures. A spin label electron spin resonance and spectrophotometric study. *Biophys. Chem.*, 93, pp. 11-22

BENITEZ D.A., HERMOSO M.A., POZO-GUISADO E., FERNANDEZ-SALGUERO P.M., CASTELLON E.A. (2009) Regulation of cell survival by resveratrol involves inhibition of NF κ B-regulated gene expression in prostate cancer cells. *Prostate*. 69,1045–1054.

BERTOS NR, PARK M.(2011) Breast cancer — one term, many entities? *The Journal of Clinical Investigation*.121, 3789-3796.

BETAGERI, G.V., JENKINS, S.A., PARSONS, D.L., 1993. *Liposome Drug Delivery Systems*, Technomic Publishing Co., Pennsylvania, pp. 109-125.

BLANCO, E., et al.(2014) Colocalized delivery of RAPAmycin and paclitaxel to tumors enhances synergistic targeting of the PI3K/Akt/mTORpathway. *Molecular TheRAPAy*, 22, 1310-1319.

BLANCO E., SHEN H., FERRARI M. (2015) Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.*33:941–951.

BOYD, R. D.; PICHAIMUTHU, S. K.; CUENAT, A. (2011) New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.387, n. 1-3, p.35–42.

BORISY A.A., ELLIOTT P.J., HURST N.W, LEE M.S., LEHAR J., PRICE E.R., SERBEDZIJA G., ZIMMERMANN G.R., FOLEY M.A., STOCKWELL B.R., KEITH C.T. (2003) Systematic discovery of multi-component therapeutics, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100.

BIBI, S.; KAUR, R.; HENRIKSEN-LASEY, M.; McNEIL, S. E.; WILKHU, J.; LATTMANN, E.; CHRISTENSEN, D.; MOHAMMED, A.R.; PERRIE, Y. (2011). Microscopy imaging of liposomes:from coverslips to environmental SEM. *International Journal of Pharmaceutics*, v.417, p. 138-150.

BONTÉ F, JULIANO RL.(1986) Interactions of liposomes with serum proteins. *Chem Phys Lipids*. Jun-Jul;40(2-4):359-72. doi: 10.1016/0009-3084(86)90079-4.

BRANDL, M., BACHMANN, D., DRECHSLER, M. AND BAUER, K.H.(1993) Liposome preparation using high pressure homogenizers. In Gregoriadis, G., (Ed.), *Liposome Technology*, 2nd Edn, Vol. I, CRC Press, Boca Raton,, pp. 49-65

BRASIL. (2017) Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada N°166, de 24 de julho de 2017. Diário Oficial da União de 24/07/2017.

BRUSCHI, L.M. (2015) Mathematical models of drug release.Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems, 74-75.

BURSAĆ-MITROVIĆ M., MILOVANOVIĆ DR., MITIĆ R., JOVANOVIĆ D., SOVRLIĆ M., VASILJEVIĆ P., TOMOVIĆ J., MANOJLOVIĆ N.(2016) Effects Of L-Ascorbic Acid And Alpha-Tocopherol On Biochemical Parameters Of Swimming-Induced Oxidative Stress In Serum Of Guinea Pigs. *Afr J Tradit Complement Altern Med*.13(4):29-33. doi: 10.21010/ajtcam.v13i4.5. PMID: 28852717

CAI, Z., KASTELL, A., SPEISER, C. et al. (2013) Enhanced Resveratrol Production in *Vitis vinifera* Cell Suspension Cultures by Heavy Metals Without Loss of Cell Viability. *Appl Biochem Biotechnol* 171, 330–340.

CAMERON A.C., TOUYZ R.M., LANG NN. (2016) Vascular Complications of Cancer Chemotherapy. *Can J Cardiol*. Jul;32(7):852-62.

CALVIN C.L.C., WAFA T.A.J. (2019) Sterically stabilized liposomes production using staggered herringbone micromixer: Effect of lipid composition and PEG-lipid content, *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 566, pp 687-696.

CHEN K-Y, CHEN C-C, CHANG Y-C, CHANG M-C (2019) Resveratrol induced premature senescence and inhibited epithelial-mesenchymal transition of cancer cells via induction of tumor suppressor Rad9. *PLoS ONE* 14(7).

CHEN, Y.-Q., ZHU, W.-T., LIN, C.-Y., YUAN, Z.-W., LI, Z.-H., & YAN, P.-K. (2021). Delivery of Rapamycin by Liposomes Synergistically Enhances the Chemotherapy Effect of 5-Fluorouracil on Colorectal Cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 269.

CHING-YI C., TIMOTHY D. H.(1995) Rapid diffusion of the lipid phosphorus of phosphatidylglycerol liposomes through polycarbonate membranes is caused by the oxidation of the unsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1239:168-176.

CLEMENT MV, HIRPARA JL, CHAWDHURY SH, PERVAIZ S. (1998) Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from gRAPAes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood*. 92:996–1002

COIMBRA M, ISACCHI B, VAN BLOOIS L, et al. (2011) Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *Int J Pharm.* ; 416(2): 433- 442

CSAKI C., MOBASHERI A., SHAKIBAEI M. (2009) Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1 β -induced NF- κ B-mediated inflammation and apoptosis. *Arthritis Research & TheRAPAY*. 11:165.

DEMETZOS, C. (2008). Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability. *Journal of Liposome Research*, 18(3), 159–173.

DIAS J.P., MARTINS N.S., GRADIM C.V.C. (2018). Análise de Sobrevida de Mulheres com Câncer de Mama. *Revista de Enfermagem UFPE online*. 12, 59-65.

DUMONT F.J., SU Q. (1996) Mecanismo de ação do imunossupressor RAPAamicina. *Life Sci*. 58: 373–95.

DUPONT P., WARRENS A.N. (2003) A evolução do papel do sirolimus no transplante renal. *QJM*. 96: 401–9.

DÜZGÜNEŞ D., SHLOMO NIR S. (1999) Mechanisms and kinetics of liposome–cell interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, V. 40, pp 3-18.

EDWARDS K., JOHNSSON M., KARLSSON G., AND SILVANDER M. (1997). Effect of Polyethyleneglycol-Phospholipids on Aggregate Structure in Preparations of Small Unilamellar Liposomes. *Biophysical Journal* Vol.73 July 258-266.

EMA, EUROPEAN MEDICINE AGENCY (2021) ANNEX I SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS. pp. 1-83. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/RAPAamune-epar-product-information_en.pdf

ELOY, J.O., CLARO, S.M., PETRILLI, R., BARCELLOS, J.P.A., LEE, R.J. , MARCHETTI, J.M. (2014) Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 123,345–363.

ELOY, J. O.; PETRILLI, R.; TOPAN, J. F.; ANTONIO, H. M. R.; BARCELLOS, J. P. A.; CHESCA, D. L.; SERAFINI, L. N.; TIEZZI, D. G.; LEE, R. J.; MARCHETTI, J. M. (2016). Co-loaded paclitaxel/RAPAmycin liposomes: development, characterization and in vivo evaluation for breast cancer theRAPAy. *Colloids and Surfaces B; Biointerfaces*, 141, 74-82.

ELOY, J. O., PETRILLI, R., BRUEGGEMEIER, R. W., MARCHETTI, J. M., & LEE, R. J. (2017). RAPAmycin-loaded Immunoliposomes Functionalized with Trastuzumab: A Strategy to Enhance Cytotoxicity to HER2-positive Breast Cancer Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 17, 48–56.

EMMANUEL H. A, RAMSAY E, GINJ M, ANANTHA M, BREGMAN I, SY J, WOO J, OSOOLY-TALESH M, YAPP DT, BALLY MB(2010). Characterization of cationic liposome formulations designed to exhibit extended plasma residence times and tumor vasculature targeting properties. *J Pharm Sci.*,99(6):2839-53. doi: 10.1002/jps.22043.

FAIVRE, S.; KROEMER, G.; RAYMOND, E. (2006) Current developments of mTOR inhibitors as anticancer agents, *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 671-88.

FAN, Y., MARIOLI, M., ZHANG, K. (2021) Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 192, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113642>.

FELDMAN M.E., APSEL B., UOTILA A., LOEWITH R., KNIGHT Z.A., RUGGERO D., SHOKAT K.M.(2009) Active-site inhibitors of mTOR target RAPAmycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol.*;7:e38. doi: 10.1371/journal.pbio.1000038

FELIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W.(2010) Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharmaceutical Research*, v. 27, n.5, p. 796–810.

FERNANDES, M. A.; ELOY, J.O.; LUIZ, M.L.; JUNIOR, S. L. R.; BORGES J. C.; DE LA FUENTE, L. R.; LUIS, C. O.S.; MARCHETTI, J. M.; MARTINEZ, M.J.S.; CHORILLI, M. (2020). Transferrin-functionalized liposomes for docetaxel delivery to prostate cancer cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125806>.

FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, MATHERS C, PARKIN DM, PIÑEROS M, ZNAOR A, BRAY F (2019). Estimando a incidência e mortalidade global por câncer em 2020: fontes e métodos GLOBOCAN. *Int J Câncer*. 144(8):1941-1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937> PMID:30350310.

FILIFE V., HAWE A., JISKOOT W. (2010) Critical evaluation of Nanoparticle tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates *Pharm. Res.*, 27, pp. 796-810

FREIBERG, S.; ZHU, X.(2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 282, p. 1-18.

FORREST, M. L.; WON, C. Y.; MALICK, A. W.; KWON, G. S. (2006) In vitro release of the mTor inhibitor RAPAmycin from poly(ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone) micelles. *Journal of Controlled Release*, 110, 370-37.

FREITAS, C., MULLER R.H. (1998) Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN (TM)) dispersions *Int. J. Pharm.*, 168 (1998), pp. 221-229

FU Y, CHANG H, PENG X, BAI Q, YI L, et al. (2014) Resveratrol Inhibits Breast Cancer Stem-Like Cells and Induces Autophagy via Suppressing Wnt/b-*atenin* Signaling Pathway. *PLoS ONE* 9(7): e102535.

GARBUZENKO O., BARENHOLZ Y., PRIEV A. (2005) Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer. *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol. 135, Issue 2.

GABIZON A, SHMEEDA H, BARENHOLZ Y. (2003) Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin Pharmacokinet.* 42(5):419-36.

GARVIN S, OLLINGER K, DABROSIN C. (2006) Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts *in vivo*. *Cancer Letters*. 231:113–122.

GHANBARI P., MOHSENI M., TABASINEZHAD M., YOUSEFI B., SAEI A.A, SHARIFI S., RASHIDI M.R., SAMADI N. (2014) Inhibition of survivin restores the sensitivity of breast cancer cells to docetaxel and vinblastine. *Appl. Biochem. Biotechnol.* vol. 174 667–681.

GHASEMI S., DAVARAN S., SHARIFI S., ASGARI D., ABDOLLAHI A., SHAHBAZI MOJARRAD J. (2013) Comparison of cytotoxic activity of L778123 as a Farnesyltransferase inhibitor and doxorubicin against A549 and HT-29 cell lines, *Adv. Pharm. Bull.* ,3,73–77.

GRABIELLE-MADELMONT, C.; LESIEUR, S.; OLLIVON, M. (2003) Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography *J. Biochem. Biophys. Methods*, 56, pp. 189-217.

HALFORD, B. (2016) From its exotic origins to its revival as a potential antiaging compound, rapamycin continues to fascinate. A version of this story appeared. *Vol. 94, Issue 29*.

HATAKEYAMA H, AKITA H, HARASHIMA H. (2013) The polyethyleneglycol dilemma: advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors. *Biol Pharm Bull.* 36(6):892-9.

HE, C. B., YIN, L. C., TANG, C. & YIN, C. H. (2012) Size-dependent absorption mechanism of polymeric nanoparticles for oral delivery of protein drugs. *Biomaterials* 33, 8569–8578

HE C. , TANG Z. , TIAN H. , CHEN X.(2016) Co-delivery of chemotherapeutics and proteins for synergistic therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 98, pp. 64-76

HSIEH A.C., COSTA M., ZOLLO O., DAVIS C., FELDMAN M.E., TESTA J.R., MEYUHAS O., SHOKAT K.M., RUGGERO D.(2010) Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell*. 2010;17:249–261. doi: 10.1016/j.ccr.2010.01.021.

HSIEH, A.H., CORTI, D. S., FRANCES, E. I. (2020) Rayleigh and Rayleigh-Debye-Gans light scattering intensities and spectroturbidimetry of dispersions of unilamellar vesicles and multilamellar liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science*, Volume 578.

HOEKSTRA D., DUZGUNES N. (1993) Lipid mixing assays to determine fusion in liposome systems *Methods Enzymol.*, 220, pp. 15-32.

HOLMES-MCNARY M., BALDWIN AS., J.R. (2000) Chemopreventive properties of *trans*-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I κ B kinase. *Cancer Research*.60:3477–3483.

HONARY, S., ZAHIR, F. (2013) Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review (Part 2) *Trop. J. Pharm. Res.*, 12, pp. 265-273

HÖHNE G.W.H. , HEMMINGER W.F. , FLAMMERSHEIM H.J. (2003) *Differential Scanning Calorimetry* (second ed.), Springer, Berlin, pp 1-63.

HONGLIAN S., NORIKO N., ETSUO N. (1999) Comparative Study On Dynamics Of Antioxidative Action Of α -Tocopheryl, Hydroquinone, Ubiquinol, And α -Tocopherol Against Lipid Peroxidation *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 27, pp. 334–346.

HOPE, M.J., BALLY, M.B., WEBB, G., CULLIS, P.R. (1985) Production of large unilamellar vesicles by a RAPAid extrusion procedure. Characterization of size distribution, tRAPAped volume and ability to maintain a membrane potential, *Biochim. Biophys. Acta* 812, 55–65.

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, (2005)- Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1).

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER(INCA), (2011) ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro, p.18

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER(INCA), (2015) Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro:

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), (2020) Brasil - estimativa dos casos novos, <https://www.inca.gov.br/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios> Acesso em:02/12/2020 às 10:10h

INUMARU, L. E.; SILVEIRA, É. A.; NAVES, M. M. V.(2011) Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 27, 1259-1270. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2011000700002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 25 Fev. 2018.

JAFARI, S. H., JAHANMIR, A., BAHRAMVAND, Y., TAHMASEBI, S., DALLAKI, M., & NASROLLAHI, E. (2022). Association of Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Expression with Breast Cancer Metastasis in Iran. *Iranian journal of medical sciences*, 47(1), 40–47.

JIN, H. G., WU, G. Z., WU, G. H., & BAO, Y. G. (2018). Combining the mammalian target of RAPAmycin inhibitor, RAPAmycin, with resveratrol has a synergistic effect in multiple myeloma. *Oncology letters*, 15(5), 6257–6264.

JORDAN V.C., BRODIE A.M.H. (2007) Development and Evolution of TheRAPAies Targeted to the Estrogen Receptor for the Treatment and Prevention of Breast Cancer. *Steroids*,72, 7-25.

JAGWANI, S., JALALPURE, S. S., DHAMECHA, D., JADHAV, K., & BOHARA, R. A. (2020). Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of resveratrol loaded cationic liposomes for targeting hepatocellular carcinoma. *ACS Biomaterials Science & Engineering*

KASSEM, M.A., ABOUL-EINIEN, M.H., EL TAWHEEL M.M. Dry Gel Containing Optimized Felodipine-Loaded Transfersomes: a Promising Transdermal Delivery System to Enhance Drug Bioavailability *AAPS PharmSciTech.*, 19 (5) (2018), pp. 2155-2173.

KALYANE D, RAVAL N, MAHESHWARI R, TAMBE V, KALIA K, TEKADE RK (2019). Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*;98:1252-1276.

KALRA N, ROY P, PRASAD S, SHUKLA Y. (2008) Resveratrol induces apoptosis involving mitochondrial pathways in mouse skin tumorigenesis. *Life Sciences*. 82:348–358

KIRBY, C.J., CLARKE, J., GREGORIADIS G. (1980) Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro *Biochem. J.*, 186, pp. 591-598

LA-BECK, N. M., ISLAM, M. R., & MARKIEWSKI, M. M. (2021). Nanoparticle-Induced Complement Activation: Implications for Cancer Nanomedicine. *Frontiers in immunology*, 11, 603039. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.603039>

LAMPRECHT A., UBRICH N., HOMBREIRO PEREZ M., LEHR C., HOFFMAN M., MAINCENT P.(1999) Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification *Int. J. Pharm.*, 184 (1) , pp. 97-105.

LASIC D.D. (1998) Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16, 7.

LLADÓ V., LÓPEZ D.J., IBARGUREN M., ALONSO M., SORIANO J.B., ESCRIBÁ P.V., BUSQUETS X. (2014) Regulation of the cancer cell membrane lipid composition by NaChOleate: Effects on cell signaling and therapeutical relevance in glioma. *Biochim. Biophys. Acta*. 1838:1619–1627

LEE, J. H. & NAN (2012) A Combination drug delivery approaches in metastatic breast cancer. *J Drug Deliv.* 915375.

LI CI, URIBE DJ, DALING JR.(2005) Características clínicas de diferentes tipos histológicos de câncer de mama. *British Journal of Cancer* , 93, 1046-1052.

LIN, T.-J., LIANG, W.-M., HSIAO, P.-W., M. S, P., WEI, W.-C., LIN, H.-T., YANG, N.-S. (2015). RAPAmycin Promotes Mouse 4T1 Tumor Metastasis that Can Be Reversed by a Dendritic Cell-Based Vaccine. *PLoS ONE*, 10(10), e0138335. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0138335>

LIU, P.; CHENG, H.; THOMAS, M.; ROBERTS, T. M.; ZHAO, J. J.(2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer, *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 627-644.

LIU, P., WULF, O., LARU, J., HEIKKILÄ, T., VAN VEEN, B., KIESVAARA, J., HIRVONEN, J., PELTONEN, L., & LAAKSONEN, T. (2013). Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. *AAPS PharmSciTech*, 14(2), 748–756.

LUYIMBAZI, D.; AKCAKANAT, A.; McAULIFFE, P. F.; ZHANG, L.; SINGH, G.; ANGULO, A. G.; CHEN, H.; DO, K. A.; ZHENG, Y.; HUNG, M. C.; MILLS, G. B.; BEMSTAM, F. M.(2010) RAPAmycin Regulates Stearoyl CoA Desaturase 1 expression in Breast Cancer. *Molecular Cancer TherAPAEutics*, 28, 2770-2784.

MAEKAWA-MATSUURA M., FUJIEDA K., MAEKAWA Y., NISHIMURA T., NAGASE K., KANAZAWA H. (2019) LAT1-Targeting Thermoresponsive Liposomes for Effective Cellular Uptake by Cancer Cells. *ACS Omega* (4), 6443-6451 .

MALAM, Y., LOIZIDOU, M., SEIFALIAN, A.M. (2009) Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30,592-599.

MALLOY, A. & CARR, B. (2006) NanoParticle tracking analysis - The Halo™ system. *Part Part Syst Charact* 23, 197–204.

MARSDEN C.G., WRIGHT M.J., CARRIER L., MOROZ K., POCHAMPALLY R., ROWAN B.G. (2012)“A novel in vivo model for the study of human breast cancer metastasis using primary breast tumor-initiating cells from patient biopsies.” *BMC Cancer*. 12:10. doi:10.1186/1471-2407-12-10.

MEDINA-AGUILAR, R., MARCHAT, L. A., OCAMPO, E. A., GARIGLIO, P., MENA, J. G., SEPÚLVEDA, N. V., et al. (2016). Resveratrol inhibits cell cycle progression by targeting Aurora kinase A and Polo-like kinase 1 in breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 35, 3696–3704.

MENG, J., GUO, F., XU, H., LIANG, W., WANG, C., & YANG, X.-D. (2016). Combination TheRAPAY using Co-encapsulated Resveratrol and Paclitaxel in Liposomes for Drug Resistance Reversal in Breast Cancer Cells in vivo. *Scientific Reports*, 6, 22390. doi.org/10.1038/srep22390

MERAZ, I. M.; SAVAGE, D. J.; IBARRA, V. S.; LI, J.; RHUDY, J.; GU, J.; SERDA, R.(2014) Adjuvant cationic liposomes presenting MPL and IL-12 induce cell death, suppress tumor growth, and alter cellular phenotype of tumors in a murine model of breast cancer. *Molecular Pharmaceutics*, 11, 3484-3491.

MITA M.M., MITA A., ROWINSKY E.K. (2003) Mammalian Target of RAPAamycin: A New Molecular Target for Breast Cancer *Clinical Breast Cancer*, 4, 126 – 13.

MOHAMMED, A.R., WESTON, N., COOMBES, A.G., FITZGERALD, M., PERRIE, Y. (2004) Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability *Int. J. Pharm.*, 285, pp. 23-34.

MONDESIRE, W.H. et al. (2004) Targeting mammalian target of RAPAamycin synergistically enhances chemotherAPAY induced cytotoxicity in breastcancer cells. *Clinical Cancer Research*, 14, 7031- 7042.

MOSES JW, LEON MB, POPMA JJ, et al. Stents com eluição de sirolimus versus stents padrão em pacientes com estenose em uma artéria coronária nativa. *N Engl J Med*. 2003; 349: 1315–23.

MUKHERJEE B., MONDAL L., CHAKRABORTY S., PAUL P., CHOUDHURY A., BHATTACHARYA S., HOSSAIN C.M. (2015) Size dependent variations of phospholipid based vesicular drug carriers in systemic drug activity, *Curr. Pharm. Biotechnol.* (16)380–391.

MUSGROVE EA, SUTHERLAND RL. (2009) Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 631-643.

MURIPITI V., BRIJESH L., RACHAMALLA H. K., MAREPALLY S. K., BANERJEE R., PATRI V. S. (2019) α -Tocopherol-ascorbic acid hybrid antioxidant based cationic amphiphile for gene delivery: Design, synthesis and transfection. *Bioorganic Chemistry*. Vol. 82, pp 178-191.

MURAKAMI A, MATSUMOTO K, KOSHIMIZU K, OHIGASHI H. (2003) Effects of selected food factors with chemopreventive properties on combined lipopolysaccharide- and interferon- γ -induced I κ B degradation in RAW264.7 macrophages. *Cancer Letters*. 195:17–25

NAG, O.K., AWASTHI, V. (2013). Engenharia de superfície de lipossomas para comportamento furtivo. *Pharmaceutics*, 5 (4), 542–569. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5040542>

NAGAYASU A, UCHIYAMA K, KIWADA H. The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and the therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Adv Drug Deliv Rev*. 1999 Nov 10;40(1-2):75-87. doi: 10.1016/s0169-409x(99)00041-1. PMID: 10837781.

NAJLAH M., SULIMAN A.S., TOLAYMAT I., KURUSAMY S., KANNAPPAN V., ELHISSI A.M.A., WANG W. (2019) Development of injectable PEGylated liposome encapsulating disulfiram for colorectal cancer treatment *Pharmaceutics*, 11, pp. 1-16.

NANDI U., ONYESOM I., DOUROUMIS D. (2021) An in vitro evaluation of antitumor activity of sirolimus-encapsulated liposomes in breast cancer cells, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Volume 73, Issue 3, pp 300–309.

NASERI N., VALIZADEH H., ZAKERI-MILANI P. (2015) Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application, *Adv. Pharm. Bull.* 5 305–313.

NAKAGAWA H, KIYOZUKA Y, UEMURA Y, SENZAKI H, SHIKATA N, HIOKI K, TSUBURA A. (2001) Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 127:258–264

NAVYA, P. N., KAPHLE, A., SRINIVAS, S. P., BHARGAVA, S. K., ROTELLO, V. M., AND DAIMA, H. K. (2019). Current trends and challenges in cancer management and therapy using designer nanomaterials. *Nano Conver.* 6, 1–30.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. (2011). Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. *Química Nova*, 34, 408-413.

O'NEIL, M.J., HECKELMAN, P.E., KOCH, C.B. AND ROMAN, K.J. (2014). The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals Edited by Maryadele J. V. 14 pp 1876-1984.

PANWAR, P.; PANDEY, LAKHERA, P.C.; SINGH, K.P.(2010) Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosized liposomes. *International Journal of Nanomedicine*. v.5, p. 101–108.

ONYESOM I., LAMPROU D.A., SYGELLOU L., OWUSU-WARE S.K., ANTONIJEVIC M., CHOWDHRY B.Z., DOUROUMIS D.(2013) Sirolimus encapsulated liposomes for cancer therapy: physicochemical and mechanical characterization of sirolimus distribution within liposome bilayers. *Mol Pharm*. 10(11):4281-93.

OZATES, N.P.; SOĞUTLU, F.; LERMINOGLU, F.; DEMIR, B.; GUNDUZ, C.; SHADEMAN, B.; AVCI, C.B.(2021) Effects of rapamycin and AZD3463 combination on apoptosis, autophagy, and cell cycle for resistance control in breast cancer. *Life Sci.*, 264, doi:10.1016/j.lfs.2020.118643

PARK J.W., NEVE R.M., SZOLLOSI J., et al. (2008) Unraveling the biologic and clinical complexities of HER2. *Clin Breast Cancer*.8, 392–401.

PARK, D., JEONG, H., LEE, M et al. (2016) Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. *Sci Rep* 6, 21772.

PASHAYAN, N., ANTONIOU, A. C., IVANUS, U., ESSERMAN, L. J., EASTON, D. F., FRENCH, D., SROCZYNSKI, G., HALL, P., CUZICK, J., EVANS, D. G., SIMARD, J., GARCIA-CLOSAS, M., SCHMUTZLER, R., WEGWARTH, O., PHAROAH, P., MOORTHIE, S., DE MONTGOLFIER, S., BARON, C., HERCEG, Z., TURNBULL, C., WIDSCHWENDTER, M. (2020) Personalized early detection and prevention of breast cancer: ENVISION consensus statement. *Nature reviews. Clinical oncology*, 17(11), 687–705.

PATIL, Y. P.; JADHAV, S. (2014) Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and physics of lipids, Chemistry and Physics of Lipid* v. 177, p. 8-18.

PEPPAS, N.A., & SAHLIN, J.J. (1989). A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*, 57, 169-172.

PERKINS, W.R., MINCHEY, S.R., AHL, P.L., JANOFF A.S. (1993) The determination of liposome captured volume. *Chem. Phys. Lipids*, 64, pp. 197-217.

RIBEIRO, L. N. DE M.; COUTO, V. M.; FRACETO, L. F.; & DE PAULA, E. (2018) Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Scientific Reports**, v. 8, Article 982.

RICHARD E. WATERS II, LAURA L. WHITE & JAMES M. MAY (1997) Liposomes Containing α -Tocopherol and Ascorbate are Protected from an External Oxidant Stress, *Free Radical Research*, 26:4, 373-379

RODRIGUES, P. O.; SILVA, M. A. S.(2005) Avaliação in vitro de medicamentos de liberação prolongada: aplicação de métodos estatísticos, modelos dependentes e independentes de análise. *Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas*, v. 34, n. 1, p. 13-23.

ROUF MA, VURAL I, RENOIR JM, HINCAL AA. (2009) Development and characterization of liposomal formulations for rapamycin delivery and investigation of their antiproliferative effect on MCF7 cells. *J Liposome Res.*19(4):322-31.

ROY P., MADAN E., KALRA N., NIGAM N., GEORGE J., RAY R.S., HANS R.K., PRASAD S., SHUKLA Y. (2009) Resveratrol enhances ultraviolet B-induced cell death through nuclear factor- κ B pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*384:215–220.

SCARPA, M., RIGO, A., MAIORINO, M., URSINI, F., GREGOLIN C. (1984) Formation of α -tocopherol radical and recycling of α -tocopherol by ascorbate during peroxidation of phosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 801, 215-219.

SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M.(2017), mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, [s. l.], v. 168, n. 6, p. 960–976.

SEHGAL SN, BAKER H, VEZINA C. (1975), RAPAmycin (AY-22.989), um novo antibiótico antifúngico. II. Fermentação, isolamento e caracterização. *J Antibiot.*; 28: 727–32

SEHGAL SN. (1998) RAPAamine (RAPAA, RAPAamicina, sirolimus): mecanismo de ação efeito imunossupressor resultante do bloqueio da transdução do sinal e inibição da progressão do ciclo celular. *Clin Biochem.*; 31: 335–40

SMITH, M.C., CRIST, R.M., CLOGSTON, J.D., MCNEIL S.E. (2017), Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes *Anal. Bioanal. Chem.*, 409, pp. 5779-5787

SRINIVASAN, M.; RAJAB, M.; MOUSA, S.A. (2015) Multifunctional nanomaterials and their applications. *Drug Delivery and Cancer Therapeutics Nanomaterials*, 5, 1690-1703.

SHAPIRA, M.; KAKIASHVILI, E.; ROSENBERG, T.; HERSHKO, D(2006) The mTOR inhibitor RAPAmycin down-regulates the expression of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in breast cancer cells. *Breast Cancer Research.*8,1-9.

SHAVI G.V., REDDY M.S., RAGHAVENDRA R., NAYAK U.Y., KUMAR A.R., DESHPANDE P.B., UDUPA N., BEHL G., DAVE V., KUSHWAHA K. PEGylated liposomes of anastrozole for long-term treatment of breast cancer: In vitro and in vivo evaluation. *J. Liposome Res.* 2016;26:28–46.

SUN D, TAN S, XIONG Y, PU W, LI J, WEI W, HUANG C, WEI YQ, PENG Y.(2019) MicroRNA Biogenesis is Enhanced by Liposome-Encapsulated Pin1 Inhibitor in Hepatocellular Carcinoma. *Theranostics* 9(16).

SURI, R., NEUPANE, Y.R., MEHRA, N., NEMATULLAH, M., KHAN, F., ALAM, O., IQUBAL, A., JAIN, G.K., KOHLI, K. (2021) Sirolimus loaded chitosan functionalized poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles for potential treatment of age-related macular degeneration. *International Journal of Biological Macromolecules* 191, pages 548-559.

STEICHEN, S.D., CALDORERA-MOORE, M., PEPPAS, N.A. (2013) A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 48 (3), pp. 416-427

TAI W, MAHATO R, CHENG K. (2010) The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* 146, 264-275. doi:10.1016/j.jconrel.2010.04.009.

TANAKA T, DECUZZI P, CRISTOFANILLI M, et al. (2009) Nanotechnology for breast cancer therapy. *Biomed Microdevices.* 11:49–63.

TAN, H. S. I.; XU, J.; ZHENG, Y. (1995) Cation-exchange high-performance liquid chromatographic assay of piperazine in some pharmaceutical formulations. *Journal of chromatography A*, v. 2, n. 693, p. 307-314.

TESTA L., MANO M.S.(2010) Quimioterapia em câncer de mama. *Rev Bras Mast.*, 20, 190-8.

TOME-CARNEIRO J, LARROSA M, GONZALEZ-SARRIAS A, TOMAS-BARBERAN FA, GARCIA-CONESA MT, ESPIN JC. (2013) Resveratrol and clinical trials: the crossroad from *in vitro* studies to human evidence. *Current Pharmaceutical Design.* 19:6064–6093.

TORCHILIN, V.(2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 4, 145–160.

TORCHILIN, V.P. (2014) Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nature Reviews*, 13, 813-827.

TRUFELLI DC, MIRANDA VC, SANTOS MBB, FRAILE NMP, PECORONI PG, GONZAGA SFR et al.(2008) Análise do atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de mama em um hospital público. *Rev Assoc Med Bras*, 54, 72-6.

TSAI S.H., LIN-SHIAU S.Y., LIN J.K.(1999) Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFκB in macrophages by resveratrol. *British Journal of Pharmacology.* 126:673–680. [doi:10.1038/sj.bjp.0702357](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702357)

VIJAYAKUMAR M. R., KOSURU R., VUDDANDA P. R., SINGH S. K., SINGH S. (2016) Trans resveratrol loaded DSPE PEG 2000 coated liposomes: An evidence for prolonged systemic circulation and passive brain targeting. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* Vol. 33, pp 125-135.

VIRDEN J.W., BERG J.C. (1992) NaCl-induced aggregation of dipalmitoylphosphatylglycerol small unilamellar vesicles with varying amounts of incorporated cholesterol. *Langmuir*.8:1532–7.

VENUGOPAL, R.; LIU, R. H. (2012) Phytochemicals in diets for breast cancer prevention; the importance of resveratrol and ursolic acid. *Scverse Sciencedirect*,1,1-13.

XIN H., YU W., JINHONG Z., MOHAMMED O., CHARIS E. (2011) Resveratrol enhances the anti-tumor activity of the mTOR inhibitor rapamycin in multiple breast cancer cell lines mainly by suppressing rapamycin-induced AKT signaling, *Cancer Letters*, Vol. 301, pp 168-176.

ZEISIG, R., SHIMADA, K., HIROTA, S., ARNDT D. (1996) Effect of sterical stabilization on macrophage uptake in vitro and on thickness of the fixed aqueous layer of liposomes made from alkylphosphocholines *BBA*, 1285 (2) , pp. 237-245

ZHANG, X. G.; MIAO, J.; DAI, Y. Q.; DU, Z. Z.; YUAN, H.; HU, F. Q.(2008). Reversal activity of nanostructured lipid carriers loading cytotoxic drug in multi-drug resistant cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*.361, 239-244.

ZHANG M, CHEN H, GU J. (2016) Analysis of factors affecting endocrine theRAPAY resistance in breast cancer. *Oncology Letters*.11,379-384. doi:10.3892/ol.2015.3887.

ZHANG, S.; LU, C.; ZHANG, X.; LI, J.; JIANG, H. (2016) Targeted delivery of etoposide to cancer cells by folate-modified nanostructured lipid drug delivery system. *Drug Delivery*. 23,1838-1845.

ZHOU, C.; SHEN, H.; GUO, Y.; XU, L.; NIU, J.; ZHANG, Z.; DU, Z.; CHEN, J.; LI, L. S. (2010) A versatile method for the preparation of water-soluble amphiphilic oligomer-coated semiconductor quantum dots with high fluorescence and stability. *Journal Colloid Interface Science*, 344, 279 -285.

WALDE, P., NAMAMI, T., MORIGAKI, K., HELMUT, H. (2007) Formation and Properties of Fatty Acid Vesicles (Liposome). *Liposome Technology*, I, 1-19.

WANG, M.,THANOU, M.(2010) Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research* v. 62, 90-99.

WIEDUWILT M.J., MOASSER M.M. (2008) The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted theRAPAeutics. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 65,1566-1584. doi:10.1007/s00018-008-7440-8.

WORSHAM R.D., THOMAS V., FARID S.S.(2018) Potential of Continuous Manufacturing for Liposomal Drug Products. *Biotechnology Journal* 14,2.

WORLD CANCER RESEARCH FUND / AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH (2007) Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC: AICR, p. 31.

WU J. (2021) The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *Journal of Personalized Medicine*. 11(8):77.

YEFIMOVA, S.K.; KURILCHENKO, I. Y.; TKACHEVA, T. N.; ROZHKOV, V. A.; SOROKIN, A. V.; LUKIANOVA, N. Y.; BEZDENEZHNYKH, N. A.; MALYUKIN, Y. V.; CHEKHUN, V. F.(2012) Comparative study of dye-loaded liposome accumulation in sensitive and resistant human breast cancer cells. *Experimental Oncology*, v.34, n. 2, p. 101-106.

YOON H.Y., CHANG I.H., GOO Y.T., KIM C.H., KANG T.H., KIM S.Y., LEE S.J., SONG S.H., WHANG Y.M., CHOI Y.W. (2019) Intravesical delivery of rapamycin via folate-modified liposomes dispersed in thermo-reversible hydrogel. *Int J Nanomedicine*.14:6249-6268.

YOU DEN, W.J.; STEINER E.H.(1975)The Association of Official Analytical Chemistry. Washington, DC, 88 p.