

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de *beads* de alginato de cálcio contendo nanocápsulas de núcleo lipídico para entrega oral de paclitaxel

TAIANE MEDEIRO CIOCHETA

PORTO ALEGRE, 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de *beads* de alginato de cálcio contendo nanocápsulas de núcleo lipídico para entrega oral de paclitaxel

Tese apresentada por **Taiane Medeiro Ciocheta**  
para obtenção do TÍTULO DE DOUTORA em  
Ciências farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Porto Alegre, 2022

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no dia 29 de março de 2022 e avaliado pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Faculdade de Farmácia

Profa. Dra. Karina Paese

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Faculdade de Farmácia

Profa. Dra. Letícia Cruz

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) - Faculdade de Farmácia

Profa. Dra. Maria Palmira Gremião

Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Faculdade de Farmácia

Profa. Dra. Valquiria Linck Bassani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Faculdade de Farmácia

#### CIP - Catalogação na Publicação

Ciocheta, Taiane Medeiro  
Desenvolvimento de beads de alginato de cálcio  
contendo nanocápsulas de núcleo lipídico para entrega  
oral de paclitaxel / Taiane Medeiro Ciocheta. -- 2022.  
95 f.  
Orientadora: Adriana Raffin Pohlmann.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2022.

1. beads de alginato de cálcio. 2. nanocápsulas de  
núcleo lipídico. 3. Câncer de mama. 4. MCF-7. I.  
Pohlmann, Adriana Raffin, orient. II. Título.

## **Descrição**

Este trabalho foi realizado no laboratório 405, do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Imunobioquímica do Câncer do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Foram também realizadas análises no Instituto de Química e no Centro de Microscopia e Microanálise, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Agradecimentos ao CNPq e FAPERGS pelo financiamento que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Adriana Pohlmann, que me orientou durante a execução deste trabalho, agradeço pelas oportunidades concedidas e por seus ensinamentos.

Agradeço aos colaboradores da Bioquímica, ao Prof. Dr. Fabrício Figueiró por disponibilizar seu laboratório, materiais e sua equipe de alunos, em especial ao aluno de doutorado Augusto Weber pelo acompanhamento direto.

Agradeço a todos atuais e antigos colegas dos laboratórios K204 e 405 pela receptividade e amizade. Em especial gostaria de agradecer a pós-doutoranda Aline de Cristo Alves, pelo auxílio na execução deste trabalho, além de sua amizade e apoio, da mesma maneira a aluna de doutorado Danieli Rosane Dallemole.

Agradeço aos membros da banca examinadora, por aceitarem avaliar o trabalho e certamente contribuir para o enriquecimento do mesmo.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, pela infraestrutura e ensino de qualidade. Ao CNPq pela bolsa concedida. Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento e conclusão desta tese.

*“And now that you don't have to be perfect, you can be good.”*

*John Steinbeck, East of Eden*



## RESUMO

O câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, causando milhões de morte anualmente. O paclitaxel (PTX) é um dos principais medicamentos quimioterápicos utilizados no tratamento de tumores, aprovado pela FDA para tratamento de câncer de mama metastático. Apesar de sua eficácia, o PTX pode causar efeito adverso. Essas desvantagens favorecem o desenvolvimento de novos sistemas de entrega de PTX. Uma estratégia interessante para superar essas limitações é a administração oral de fármacos em sistemas nanométricos combinados com *beads* de alginato de cálcio. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma formulação farmacêutica oral sólida, incorporando nanocápsulas de núcleo lipídico (LNCs) carregadas com PTX em *beads* de alginato de cálcio. A formulação líquida de LNC contendo PTX (PTX-LNC) foi preparada por deposição interfacial do polímero pré-formado e adicionada em *beads* de alginato de cálcio (PTX-LNC-Bead). Além disso, o potencial citotóxico do PTX livre e LNCs contendo PTX sobre a linhagem MCF-7 foi verificado. Os *beads* de alginato de cálcio foram preparados pelo método de gelificação iônica simples. As distribuições de tamanho de partícula LNC-PTX foram unimodais, com diâmetros médios de  $161 \pm 3$  nm. Através da análise morfológica dos *beads* supomos a presença das LNCs em toda massa do *bead*. Os *beads* apresentaram resistentência a pH mais ácido (1,2) e em pH 6,8, os *beads* mostraram uma alta taxa de expansão, conseqüente desintegração após 80 min, e uma liberação de medicamento de 60% após 10h. A análise de tamanho dos meios confirmou que as nanocápsulas foram liberadas dos *beads* no pH 6,8. Os ensaios *in vitro* em cultura de células MCF-7 mostrou o potencial citotóxico em 24 e 48h das LNCs desenvolvidas. As análises de ciclo celular evidenciaram um número significativo das células tratadas PTX e PTX-LNC (57nM) na fase G2/M do ciclo celular. Portanto, as PTX-LNC apresentam redução na viabilidade celular em linhagem de células MCF-7, com parada do ciclo celular na fase G2/M. O *bead* desenvolvido apresentou características satisfatórias dentro do objetivo do estudo, sendo assim, considerado um bom carreador sólido para o transporte de PTX-LNC para a administração oral.

**Palavras-chave:** *beads* de alginato de cálcio; nanocápsulas de núcleo lipídico; Câncer de mama, MCF-7.



## ABSTRACT

Breast cancer is the most incident among women, causing millions of deaths annually. Paclitaxel (PTX) is one of the main chemotherapy drugs used in the treatment of tumors, approved by the FDA for the treatment of metastatic breast cancer. Despite its effectiveness, PTX can cause adversely affect. These disadvantages favor the development of new PTX delivery systems. An interesting strategy to overcome these limitations is the oral administration of drugs in nanometric systems combined with calcium alginate beads. Thus, the objective of this study was to develop a solid oral pharmaceutical formulation, incorporating lipid core nanocapsules (LNCs) loaded with PTX in calcium alginate beads. The liquid formulation of LNC containing PTX (PTX-LNC) was prepared by interfacial deposition of the preformed polymer and added to calcium alginate beads (PTX-LNC-Bead). Furthermore, the cytotoxic potential of free PTX and LNCs containing PTX on the MCF-7 strain was verified. Calcium alginate beads were prepared by the simple ionic gelation method. LNC-PTX particle size distributions were unimodal, with mean diameters of  $161 \pm 3$  nm. Through the morphological analysis of the beads, we assumed the presence of LNCs in the entire mass of the bead. The beads showed resistance to more acidic pH (1.2) and at pH 6.8, the beads showed a high expansion rate, consequent disintegration after 80 min, and a drug release of 60% after 10 h. Media size analysis confirmed that the nanocapsules were released from the beads at pH 6.8. In vitro assays in MCF-7 cell culture showed the cytotoxic potential at 24 and 48h of the developed LNCs. Cell cycle analyzes showed a significant number of PTX and PTX-LNC treated cells (57nM) in the G2/M phase of the cycle cell phone. Therefore, PTX-LNC show reduced cell viability in MCF-7 cell lines, with cell cycle arrest in the G2/M phase. The Bead developed presented satisfactory characteristics within the objective of the study, thus, it is considered a good solid carrier for the transport of PTX-LNC for oral administration.

**Keywords:** calcium alginate beads; lipid core nanocapsules; Breast cancer, MCF-7

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Propriedades físico-químicas de PTX-LNC e B-LNC (n = 3). Os resultados são expressos como média $\pm$ DP.....	39
<b>Tabela 2.</b> Propriedades físico-químicas de PTX-LNC em diferentes concentrações de fármaco. ....	51
<b>Tabela 3.</b> Valores IC50 da solução de paclitaxel (PTX) e nanocápsulas de núcleo lipídico carregadas com PTX na linhagem celular MCF7.....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das etapas experimentais.....	26
Figura 2. Figura 1. Imagens MET de PTX-LNC. (A) ampliação = 100.000x (barra = 200 nm) e (B) ampliação = 200.000x (barra = 200 nm). ....	39
Figura 3. Perfil de liberação do fármaco IND a partir de IND-LNC- <i>Beads</i> em pH 1,2 e 6,8. ....	42
Figura 4. Microfotografias obtidas através de microscopia óptica (100x). (A) PTX- <i>Bead</i> antes da secagem; (B)PTX- <i>Bead</i> após a secagem; (C)PTX-LNC- <i>Bead</i> antes da secagem; (D)PTX-LNC- <i>Bead</i> após a secagem.....	43
Figura 5. Imagens obtidas por MEV. (A) Superfície do PTX- <i>Bead</i> (1.700x); (B) Imagens de cortes transversais de PTX- <i>Bead</i> (370x) e (C) ampliação de 10.000x; (D) Superfície do PTX-LNC- <i>Bead</i> (1.700x); (E) Imagens de cortes transversais de PTX-LNC- <i>Bead</i> (370x) e (F) ampliação 10.000x.....	45
Figura 6. Perfis de inchamento (p/p) de grânulos carregados com PTX. Fluido gástrico simulado (pH = 1,2, -○-) e fluido intestinal simulado (pH 6,8; -■-). Os valores são média ± DP (n = 3). ....	46
Figura 7. Perfis de liberação de PTX-LNC- <i>Bead</i> e PTX- <i>Bead</i> em (A) pH 1,2 e (B) pH 6,8. (C) PTX remanescente no bead (análise dos resíduos de liberação em pH 6,8). ....	48
Figura 8. Distribuição do tamanho de partícula via DLS de PTX-LNC e PTX-LNC- <i>Bead</i> após (A) 1, (B) 4, (C) 6 e (D) 10 h de imersão em fluido intestinal simulado (pH = 6,8 ). PTX-LNC é a distribuição de tamanho de partícula original da suspensão líquida. PTX-LNC- <i>Bead</i> está em triplicado a pH 6,8 (n = 3). ....	50
Figura 9. Microfotografica de cristal de PTX na formulação de LNC contendo 1 mg/mL de PTX. ....	52
Figura 10. Viabilidade celular de células MCF-7 submetidas a diferentes concentrações de PTX, PTX-LNC e B-LNC. ....	53
Figura 11. Análise do ciclo celular. Os tratamentos ocorreram por 48 h nas concentração de 57 nM.....	55
Figura 12. Mecanismo de morte de células MCF-7 tratadas por 48h na concentração de 57 nM de PTX. ....	56
Figura 13. Índice de fluorescência média de expressão de Ki-67 em células MCF-7 tratadas com PTX, PTX-LNC, B-LNC por 48h na concentração de 57 nM. ....	57

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivo Geral .....	20
2.2 Objetivos Específicos .....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
3.1 Câncer.....	23
3.2 Nanocápsulas de núcleo lipídico .....	24
3.3 Paclitaxel.....	25
3.4 Beads como mecanismo de entrega de fármacos por via oral.....	28
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	30
4.1 Materiais.....	34
4.2 Equipamentos .....	34
4.3 Métodos .....	35
4.3.1 Preparação das suspensões nanocápsulas de núcleo lipídico .....	35
4.3.2 Caracterização físico-química das nanocápsulas de núcleo lipídico .....	35
4.3.3 Preparação e caracterização de <i>beads</i> de alginato de cálcio contendo LNC	38
4.3.4 Avaliação <i>in vitro</i> das PTX-LNC em cultura de células de câncer de mama MCF-7 .....	43
4.3.5 Análise estatística .....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	46
5.1 Preparação e caracterização das PTX-LNC .....	47
5.2 Preparação e caracterização dos beads de alginato de cálcio .....	49
5.2.1 Preparação e caracterização dos <i>beads</i> de alginato de cálcio contendo LNC	49
5.2.2 Perfil de liberação dos <i>beads</i> contendo LNC e fármaco modelo .....	49

5.2.3	Preparação e caracterização dos <i>beads</i> de alginato de cálcio contendo LNC carregadas com paclitaxel.....	50
5.2.4	Estudo de entumescimento .....	53
5.2.5	Liberação <i>in vitro</i> de PTX.....	55
5.2.6	Liberação <i>in vitro</i> de nanocápsulas.....	57
5.3	Avaliação das PTX-LNC <i>in vitro</i> em células de câncer de mama MCF-7.....	59
5.3.1	Preparação de LNCs e teste de concentração de saturação de PTX nas LNCs	59
5.3.2	Ensaio de Viabilidade Celular por ensaio por MTT .....	60
5.3.3	Análise de ciclo celular.....	62
5.3.4	Análise de morte celular.....	63
5.3.5	Análise de proliferação celular por Ki67 .....	64
6.	CONCLUSÕES .....	66
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69
	ANEXO I.....	80



## 1. INTRODUÇÃO

---





A incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando no mundo sendo um dos principais problemas de saúde e causa de morte prematura na maioria dos países (BRAY & PIÑEROS et al., 2016). Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer. O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente entre as mulheres e a estimativa anual são de que ocorrerão 66 mil novos casos (INCA, 2018). Quando diagnosticado e tratado precocemente é considerado um câncer de bom prognóstico, porém em estágios avançados com metástases sistêmicas a cura não é possível (INCA, 2018).

Segundo a portaria N° 4, de 23 de janeiro de 2018 do Ministério da saúde as opções terapêuticas do câncer de mama incluem cirurgia do tumor primário, avaliação do acometimento axilar e radioterapia como forma de tratamento local e o tratamento medicamentoso sistêmico (quimioterapia e hormonioterapia). O tratamento sistêmico pode ser neoadjuvante ou adjuvante (após a cirurgia e a radioterapia). A combinação de terapias pode ter intento curativo ou paliativo, sendo que todas elas podem ser usadas isoladamente com o intuito paliativo (BRASIL, 2018).

Dentre os agentes antitumorais, o paclitaxel (PTX) foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de câncer de mama metastático em 1994, sendo um dos fármacos mais utilizados devido seu potencial citotóxico (FENG et al., 2007). O PTX tem como uma das principais limitações de uso a sua baixa solubilidade em água que acarreta em dificuldades na administração do fármaco. Levando isso em consideração, a primeira formulação comercial disponível é uma dispersão micelar, o Taxol<sup>®</sup>, que foi desenvolvida utilizando óleo de rícino polietoxilado (Cremophor EL<sup>®</sup>) e etanol como co-solventes para aumentar a solubilidade do fármaco em meio aquoso, uma vez que o produto é administrado por via intravenosa embora a formulação melhore a solubilidade, cerca de 30% dos pacientes tratados apresentam algum efeito colateral relacionado ao Cremophor EL<sup>®</sup> (WEISS et al., 1990; BAKRANIA et al., 2016).

Essas limitações abriram espaço para o desenvolvimento de novas formulações para o transporte de PTX, principalmente fazendo uso de nanotecnologia. Os sistemas nanométricos apresentam inúmeras vantagens, tais

como: aumento da solubilidade aquosa de fármacos, estabilidade química, eficácia e segurança, biodistribuição prolongada, redução de efeitos adversos e ainda acúmulo em tumores sólidos (BERNABEU et al., 2016). Sendo assim, nos últimos anos, diferentes veículos baseados em nanotecnologia para o transporte de PTX foram desenvolvidos e aprovados, são eles: nanopartículas à base de albumina (Abraxane® aprovado pela FDA em 2005 e EMA em 2008), nanopartículas lipídicas poliméricas (PICN®, aprovado na Índia em 2004), micelas poliméricas (Cynviloq®, aprovado na Coreia do Sul em 2007, Nanoxel®, aprovado na Índia em 2008, Paclical® aprovado na Rússia em 2015) e lipossomas (Lipusu®, aprovado na China em 2006), e muitos outros ainda estão em fases de ensaio clínico (GALLEGO-JARA et al., 2020).

As formulações disponíveis, em sua maioria, têm sido administradas por via intravenosa, fato esse que aparece relacionado a baixa disponibilidade oral do PTX (FENG et al., 2017). No entanto, há relatos de formulações de PTX associado a nanopartículas que apresentam aumento da biodisponibilidade oral do fármaco (HAHN et al., 2014; LEE et al., 2016; ZHANG et al., 2018).

Em se tratando da administração oral de fármacos, *beads* de alginato de cálcio apresentam-se como promissores transportadores, dada a sua natureza biodegradável e capacidade de proteger os fármacos da região superior mais ácida do trato gástrico. Seu uso combinado com diferentes sistemas de transporte de fármacos em escala micro e nanométrica já demonstraram eficiência (FENG et al., 2014; REYNAUD et al. 2015; GIRI et al., 2017). Alguns sistemas de entrega de PTX associados com *beads* foram desenvolvidos e comprovaram a eficiência de entrega e transporte do fármaco através desse sistema. Os *beads* de alginato de cálcio são capazes de carregar microesferas de poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) contendo PTX para entrega local do fármaco, sem mudar a morfologia original destas microesferas e mantendo uma distribuição uniforme dentro da matriz de gel (RANGANATH et al., 2009). Além disso, o revestimento de alginato de cálcio em lipossomas carregados com PTX para administração oral melhora a estabilidade física dos lipossomas contra o estresse de processamento, aumenta a capacidade de transporte do fármaco e melhora a integridade estrutural dos lipossomas em fluidos gástricos e intestinais simulados (WANG et al., 2015).

Diante do exposto, o uso de diferentes nanocarreadores para transporte de PTX mostra-se como a principal alternativa para contornar os problemas relacionados a administração do fármaco, bem como, a possibilidade da entrega de fármacos por via oral utilizando nanocápsulas combinadas com *beads* de alginato de cálcio apresenta resultados promissores. Consideramos para levantar nossa hipótese de trabalho a potencialidade da combinação de sistemas nanométricos para entrega de fármacos com *beads* de alginato de cálcio e os avanços descritos na literatura a respeito dessa combinação.

Sendo assim, neste estudo, desenvolvemos nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) carregadas com PTX e avaliamos sua citotoxicidade *in vitro* frente a linhagem de células de câncer de mama MCF-7, além disso, essas LNC foram encapsuladas em *beads* de alginato de cálcio visando o desenvolvimento de um sistema de entrega por via oral do PTX em LNC.

## **2. OBJETIVOS**

---



## 2.1 Objetivo Geral

O objetivo desta tese foi desenvolver *beads* de alginato de cálcio contendo LNCs para entrega oral do fármaco paclitaxel e avaliar *in vitro* a citotoxicidade do fármaco nanoencapsulado em linhagem celular de câncer de mama MCF-7 .

## 2.2 Objetivos Específicos

### ➤ Para nanocápsulas de núcleo lipídico contendo PTX

- Preparar e caracterizar LNC carregadas com o fármaco PTX;
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade das LNCs carregadas com o fármaco PTX em linhagem celular de câncer de mama MCF-7;

### ➤ Para *beads* de alginato de cálcio contendo PTX

- Produzir *beads* de alginato de cálcio contendo LNCs carregada com PTX;
- Determinar a taxa de intumescimento dos *beads* carreadores de LNCs contendo PTX em meio gástrico e intestinal simulado (pH 1,2 e 6,8);
- Avaliar a morfologia dos *beads* contendo LNCs através de Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Avaliar o perfil de liberação do fármaco PTX dos *beads* contendo LNC ou apenas o fármaco em pH 1,2 e 6,8;
- Identificar a presença de LNC no meio de liberação pH 6,8.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---





### 3.1 Câncer

Câncer é um conjunto de doenças causadas pelo crescimento desordenado de células que são capazes de invadir tecidos e órgãos, com a possibilidade de se espalharem para diversas regiões do corpo, formando tumores (BRAY & PIÑEROS, 2016). O câncer pode ser considerado uma doença genômica, uma vez que, as células tumorais são provenientes de células normais que sofreram mutações iniciais e levaram a formação de clones que foram acumulando outras mutações até se tornarem malignas, em um processo chamado carcinogênese (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

No Brasil para cada ano do triênio 2020–2022 foram estimados a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer. Exceto o câncer de pele não melanoma, os cânceres mais incidentes serão os de próstata em homens (29,2%) e de mama nas mulheres (29,7%), sendo este último predominante nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (INCA, 2019). Além disso, em 2019 os óbitos por câncer de mama ocupam o primeiro lugar no país, representando 16,1% do total (INCA, 2021).

A idade é o principal fator de risco para o câncer de mama feminino e além deste, fatores como vida reprodutiva da mulher, histórico familiar, alta densidade do tecido mamário e urbanização são outros fatores de risco estabelecidos. Esse tipo de câncer quando diagnosticado precocemente é passível de tratamento, porém quando o diagnóstico é feito em estágios onde metástases sistêmicas são detectadas a cura não é possível. A sobrevida da doença no Brasil é de aproximadamente 80% (INCA, 2018).

O tratamento para câncer vai variar de acordo com o tipo e a gravidade da doença. A cirurgia ainda é considerada a forma mais eficaz de tratamento, principalmente quando o tumor encontra-se em estágio inicial e não sofreu metástase (ALMEIDA et al., 2005). A radioterapia é comumente associada a outras modalidades no intuito de incrementar a eficiência do tratamento e, mesmo usada de forma isolada, pode diminuir o tamanho de tumores considerados grandes, a recorrência e sua respectiva chance de metástase (ALMEIDA et al., 2005). A quimioterapia, diferente da cirurgia e da radioterapia, é utilizada em tratamento

sistêmico, à base de fármacos que impedem a reprodução celular e, levam as células malignas à morte. Estes fármacos podem ser ministrados isoladamente ou combinados, sendo que a combinação de fármacos apresenta maior resposta a cada aplicação, diminuindo o risco de resistência aos fármacos e conseguindo atingir as células em diferentes fases do seu ciclo (SOUZA, 2004).

Para estudos *in vitro* diferentes linhagens celulares de câncer de mama têm sido utilizadas. As linhagens celulares de carcinomas mamários podem ser derivadas de várias fontes, incluindo derrames pleurais (MDA.MB.231 e MCF-7), tumores de mama primários (SUM149 e SUM159), recorrências de tumor primário (SUM225), e nódulos metastáticos xenoenxertados (SUM1315). Sendo que, a maioria dos estudos utilizam MCF-7 e MDA.MB.231 (LACROIX & LECLERCQ, 2004). A popularidade da utilização de células MCF-7 na pesquisa sobre câncer de mama se deve à alta expressão do receptor de estrogênio alfa (ER- $\alpha$ ), assemelhando-se à maioria dos cânceres humanos invasivos (LEE et al., 2015).

### **3.2 Nanocápsulas de núcleo lipídico**

Na área farmacêutica, a nanotecnologia é aplicada principalmente no desenvolvimento de sistemas para carrear novos fármacos ou melhorar a entrega daqueles já usados convencionalmente (KOLISHETTI et al., 2010; BANDEKAR et al., 2012). A estratégia de carregamento de fármacos em sistemas nanométricos pode conferir a esses fármacos a propriedade de controlar suas características fundamentais sem alterar sua composição química, possibilitando melhorias nas formulações. Diversos tipos de sistemas nanoestruturados têm sido desenvolvidos e caracterizados como: lipossomas (YANG et al., 2007), nanopartículas lipídicas sólidas (KANG et al., 2018), nanocápsulas e nanoesferas poliméricas (STELLA et al., 2007; MORA-HUERTAS et al., 2010; OURIQUE et al., 2010; FRANK et al., 2018), micelas poliméricas (CAI et al., 2007), dentre outros.

As nanopartículas têm a capacidade de acumular-se preferencialmente em tumores sólidos, isso ocorre devido aos mecanismos de vetorização passiva e ativa. Quando a vetorização é passiva o acúmulo se dá devido à fisiologia anormal dos vasos presentes nos tumores sólidos, o endotélio vascular é composto por

fenestrações de tamanho entre 5 e 10 nm, enquanto que os tumores sólidos, têm fenestrações bem maiores (100 a 780 nm) ( WICKI et al., 2015; JIANG et al., 2018).

Dentre os sistemas nanométricos utilizados para vetorização de fármacos, as nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) são nanocápsulas poliméricas com um núcleo modificado. Este núcleo é composto por um organogel de lipídios sólidos e líquidos, como monoestearato de sorbitano (MS) e triglicerídeo caprílico/cáprico (TCC), e cercado por um poliéster biodegradável. Essas nanocápsulas são estabilizadas em água por micelas de polissorbato 80 (P80), formando uma coroa hidrofílica (JORNADA et al., 2012). Essa organização supramolecular inovadora e complexa da LNC aumenta a capacidade de carga do fármaco para mais de 40 vezes do que as nanocápsulas convencionais (POLETTTO et al., 2015), além de uma liberação controlada e sustentada do fármaco devido à viscosidade do núcleo, que promove resistência à difusão do fármaco (JÄGER et al., 2009).

As LNCs mostram-se carreadores eficientes para o transporte de fármacos frente a diferentes linhagens de tumores como, por exemplo: indometacina, reveratrol, curcumina e metotrexato em células de glioma (BERNARDI et al., 2013; FIGUEIRÓ et al., 2013; ZANOTTO-FILHO et al., 2013; FIGUEIRÓ et al., 2015), doxorubicina, licopeno e éster dietílico do metotrexato em células de adenocarcinoma de mama (YURGEL et al., 2014; ANTONOW et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2020), erlotinibe e tretinoína em células de câncer de pulmão (SCHULTZE et al., 2014; BRUINSMANN et al., 2020), acetileugenol e floretin em células de melanoma (CASARINI et al., 2020; GAZZI et al., 2020).

### **3.3 Paclitaxel**

Descoberto há mais de 50 anos, o PTX tornou-se um dos quimioterápicos mais utilizados em todo o mundo para tratar diferentes tipos de tumores (WHANG et al., 2011). O fármaco é derivado de fonte natural, obtido da casca do Teixo (*Taxus brevifolia*), sendo essa inicialmente a maior limitação de uso. Para a obtenção de 1 kg do PTX eram necessários aproximadamente 10.000 kg da casca da *Taxus brevifolia*, o que equivale a cerca de 3.000 árvores (KINGSTON, 2000).

Avanços foram feitos e um método de semi-síntese foi desenvolvido para obtenção do PTX. As folhas da árvore *Taxus baccata* são utilizadas para extração da molécula 10-desacetilbacatina-III que apresenta o esqueleto básico e as funcionalidades do PTX e em poucas etapas o fármaco é obtido pela acetilação da posição 10 da 10-desacetilbacatina-III e pela introdução da cadeia lateral em posição C-13 (PANCHAGNULA, 1998). Além disso, o PTX pode ser obtido pelo processo de fermentação de células vegetais, em que o fármaco é extraído de culturas de células de *Taxus*, purificado por cromatografia e isolado por cristalização (GUO et al., 2006).

Este agente antitumoral foi desenvolvido comercialmente pela empresa Bristol-Myers Squibb, que fez o registro do nome “Taxol” e atribuiu o nome genérico “paclitaxel”. Atualmente, suas indicações rotuladas pela FDA incluem: Sarcoma de Kaposi (segunda linha), câncer de mama (metastático ou não metastático), câncer de ovário avançado (primeira linha), neoplasia maligna pulmonar microcítica (metastática ou não metastática) (BERNABEU et al., 2016).

O PTX tornou-se conhecido por apresentar um mecanismo de ação que difere de outros agentes quimioterápicos, o PTX atua como agente quimioterápico ligando-se seletivamente à subunidade  $\beta$  das proteínas tubulina, promovendo sua polimerização e montagem, estabilizando assim a formação dos microtúbulos. Este efeito leva à formação de um fuso mitótico disfuncional, que causa parada mitótica na fase G2/M e pode resultar em morte celular através de uma via de apoptose (BAND HORWITZ, 1992; SNYDER et al., 2001; BRAKANIA et al., 2016; SURAPANENI et al., 2012). Além disso, há relato de que o paclitaxel não apenas induz a parada do ciclo celular tumoral, mas também promove imunidade antitumoral (WANDERLEY et al., 2018).

Apesar de sua eficácia terapêutica comprovada, o tratamento com PTX pode causar sérios efeitos adversos, como mielossupressão, mialgia, artralgia, cardiotoxicidade, reações de hipersensibilidade, toxicidade hematológica e neuropatia sensorial periférica (LEIVA et al., 2017; CHOU et al., 2020). A primeira formulação de PTX foi desenvolvida utilizando óleo de rícino polietoxilado (Cremophor EL<sup>®</sup>) e etanol como co-solventes para aumentar a solubilidade do

fármaco em meio aquoso para administração intravenosa. No entanto, além da toxicidade do PTX, os efeitos colaterais clínicos observados do produto também estão relacionados ao Cremophor EL<sup>®</sup> (BAKRANIA et al., 2016). Como alternativa, a nanotecnologia tem sido utilizada para melhorar a solubilidade do PTX, diminuindo assim sua toxicidade. Abraxane<sup>®</sup> (nanopartículas conjugadas com PTX-albumina), Genexol-PM<sup>®</sup> (micelas poliméricas carregadas com PTX) e Lipusu<sup>®</sup> (lipossomos PTX) são produtos sem Cremophor EL<sup>®</sup> aprovados como alternativas ao Taxol; esses produtos apresentam alta dosagem tolerável (ZHANG et al., 2013).

Os desafios relacionados a administração IV de PTX foi um dos motivos de diversos grupos científicos direcionarem seus estudos ao desenvolvimento de formulações para administração oral de PTX. Como já relatado a neurotoxicidade periférica é um dos grandes problemas do PTX administrado por via IV, além de diversas reações anafiláticas relacionadas ao *cremaphor*, necessidade de medicação com esteróide, visitas hospitalares para administração de quimioterapia, e custos associados à administração intravenosa (IV) de paclitaxel (FENG et al., 2017).

A administração oral pode manter uma concentração ótima de PTX no sangue, melhorando assim a eficácia e diminuindo os efeitos colaterais correspondentes do fármaco; portanto, a administração oral de PTX pode ser mais vantajosa do que a via intravenosa (FENG et al., 2017). Além disso, esse método leva a uma melhor aceitação do paciente, menor tempo de internação, risco mínimo de infecção e supervisão médica (HAHN et al., 2017). Liporaxel<sup>®</sup> é o primeiro PTX oral aprovado para câncer gástrico na Coreia em 2016 e está atualmente em estudo como terapia de primeira linha para câncer de mama recorrente ou metastático (PLUARD et al., 2020). Oraxol<sup>®</sup> é outro paclitaxel oral. Este medicamento é combinado com HM30181 (Encequidar), um novo inibidor oral da glicoproteína P intestinal que permite a administração oral de PTX. Esta formulação produziu uma maior taxa de resposta global e menor neuropatia em comparação com o PTX intravenoso padrão (UMANZOR et al., 2019). Até o momento, nenhuma nanoformulação oral de PTX está comercialmente disponível, apesar dos inúmeros avanços. As formulações baseadas em nanopartículas biodegradáveis podem resolver notavelmente os problemas com a segurança e eficácia da entrega de PTX.

Estudos pré-clínicos relataram resultados satisfatórios para PTX em nanocarreadores orais, esses resultados foram relacionados à uma melhor biodisponibilidade oral, toxicidade reduzida e inibição do crescimento tumoral (CHOUDHURY et al., 2017; BAEK et al., 2012). Micelas de N-desoxicólico-N e O-hidroxiethyl quitosana carregadas com PTX foram obtidas e melhoraram em até três vezes a absorção de PTX por via oral em ratos quando comparada a formulação de Taxol também via oral (LI et al., 2010). Em outro estudo, nanopartículas lipídicas carregadas com PTX preparadas por emulsificação por fusão, onde monoestearato de glicerila foi usado como lipídio sólido e óleo de soja como lipídio líquido, foram administrados oralmente em ratos e mostraram um aumento de até 6,8 vezes a área na curva e concentração sérica máxima do fármaco quando comparada à formulação comercial (Intaxel®) (HARSHITA, et al., 2019). Assim, os nanocarreadores lipídicos são bons candidatos para o transporte oral de PTX; tais nanocarreadores apresentam estabilidade contra o muco intestinal, sem alterar as propriedades reológicas do muco, e melhoram a difusão do PTX em baixas concentrações (GROO et al., 2013).

### **3.4 Beads como mecanismo de entrega de fármacos por via oral**

O alginato de sódio é um biopolímero amplamente utilizado devido ao fato de ser atóxico não imunogênico e biodegradável, além disso, é solúvel em água e tornar-se insolúvel na presença de cátions bivalentes (SALAMA et al., 2018). O alginato para a administração oral é considerado pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (US FDA) como um material seguro (GEORGE & ABRAHAM, 2006).

O alginato é um polissacarídeo linear não ramificado de origem natural, extraído de algas marinhas e algumas bactérias do solo (PAWAR e EDGAR, 2012). Esse biopolímero é constituído de sais de ácidos algínicos por unidades monoméricas de ácido poliurônico como ácido  $\beta$ -Dmanurônico (M) e ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (G), ácidos que se ligam, formando blocos homopoliméricos M-M e G-G ou heteropoliméricos M-G. (MARTINS et al., 2007; CERCIELLO et al., 2017). A proporção dos blocos é dependente da espécie de alga marinha da qual se extrai o

alginato. O comprimento e o número de blocos presentes determinam as propriedades físicas do material extraído (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008)

O alginato em solução aquosa tem a capacidade de formar géis à temperatura ambiente quando em contato com cátions divalentes, sendo o cálcio um dos agentes reticulantes mais utilizados na reticulação de alginato (DRAGET e TAYLOR, 2011). Os íons de cálcio interagem preferencialmente com os resíduos G do alginato de maneira bidimensional planar, formando um gel mais rígido e partículas volumosas com alta porosidade (CHAN et al., 2002). O método mais utilizado para preparação de beads de alginato é gelificação ionotrópica, onde a solução de alginato é gotejada no agente reticulante e as esferas são formadas instantaneamente. Ocorre a formação de estruturas gelatinosas, geralmente no formato esférico (CERCIELLO et al., 2017). O mecanismo da formação do complexo envolve a interação do íon divalente (geralmente o íon  $\text{Ca}^{2+}$ ) com átomos de oxigênio de duas unidades de ácido gulurônico adjacentes, em ambas as cadeias envolvidas na ligação divalente, como adotado no modelo “egg-box” (BRACINI, 2001).

Essa estrutura formada é sensível a estímulos externos de pH. Para um pH abaixo do seu pKa ( $\text{pH} < 3,4$ ), os grupos ácido carboxílico estão na forma não ionizada levando a uma estrutura insolúvel. Em  $\text{pH} > 4,4$  o grupo carboxílico torna-se ionizado, resultando em um aumento da repulsão eletrostática desses cargas negativas causando expansão da cadeia polimérica e inchaço da matriz hidrofílica (AGÜERO et al., 2015). Abordagens sobre as variações de pH ao longo do trato gastrointestinal e a resposta ao pH do alginato têm sido exploradas para o desenvolvimento de liberação de fármacos (BAJPAI, & SHARMA, 2004).

Esses *beads* são biodegradáveis por natureza e tem como características a estabilidade em meio ácido que protege o fármaco no estômago, comportamento responsivo ao pH que promove a liberação do fármaco dependente do pH do meio, a hidrofílicidade e propriedades mucoadesivas, isso faz dos *beads* de alginato uma boa plataforma para o transporte de fármacos (PATEL et al., 2016). Considerando as características favoráveis do uso de *beads* de alginato, esse sistema tem sido combinado com diferentes sistemas micro e manométricos para entrega oral de

fármacos (GIRI et al., 2017; BANSAL et al., 2016; FENG et al., 2014; RANGANATH et al., 2009).

#### **4. PARTE EXPERIMENTAL**

---





As etapas experimentais desenvolvidas durante este estudo estão simplificadas no fluxograma apresentado na Figura 1.

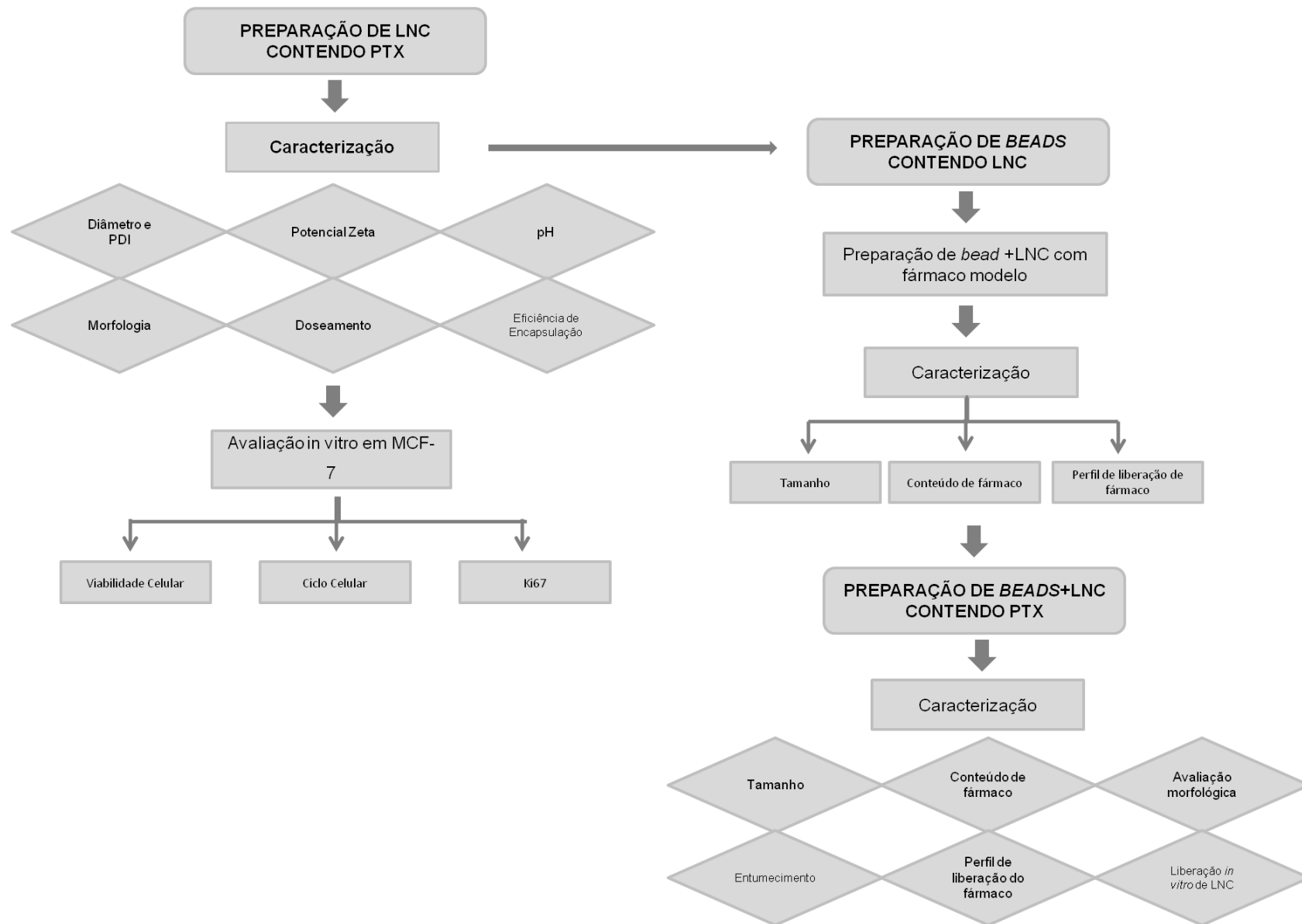


Figura 1. Fluxograma das etapas experimento.

**O conteúdo presente nos tópicos materiais, métodos, resultados e discussão - *ainda não publicados* - foram excluídos nesta versão parcial da tese. Entretanto, foram inseridas a seguir as principais considerações dos conteúdos retirados. No total, para essas seções, foi suprimido o conteúdo presente em 34 páginas da versão total da tese.**

Na seção de metodologia o texto suprimido continha a metodologia utilizada na produção das suspensões de nanocápsulas (deposição interfacial do polímero pré-formado) e as metodologias utilizadas na caracterização destes sistemas nanométricos (diâmetro de partícula, potencial zeta, pH das suspensões, eficiência de encapsulação, teor dos fármacos).

Em relação aos *beads* de alginato de cálcio foi suprimido o processo de produção dos *beads* pelo método de geleificação ionotrópica tanto dos *beads* preparados com fármaco modelo indometacina quanto com fármaco objetivo do estudo, paclitaxel, ambos nanoencapsulados. Foi suprimido também o as metodologias de caracterização em relação a tamanho dos *beads*, processo de análise por microscopia eletrônica de varredura, conteúdo de fármaco, entumescimento e perfil de liberação de nanocápsulas de núcleo lipídico e fármaco paclitaxel dos *beads* em meios simulados pH 1,2 e 6,8.

Ainda na sessão de metodologia foram suprimidos os diferentes protocolos utilizados nos estudos de avaliação da citotoxicidade em células de câncer de mama MCF-7 das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo fármaco o paclitaxel. Esta sessão continha a metodologia de avaliação de viabilidade celular, ciclo celular, morte celular e proliferação celular por Ki67 e a análise estatística dos resultados.

Para os resultados de caracterização das suspensões de nanocápsulas foi visto que todas as formulações possuíam um perfil de distribuição nanométrico, sem a presença de partículas micrométricas, potencial zeta negativo, teor de fármaco próximo de 100% e alta eficiência de encapsulação de fármaco. Os *beads* apresentaram conteúdo de fármaco dentro do esperado para o sistema desenvolvido.

Para o ensaio de entumescimento o fármaco apresentou resistência em pH ácido (1,2) e alto índice de entumescimento e desintegração em pH 6,8. Corroborando com isso, o fármaco paclitaxel foi liberado de maneira significativa dos *beads* em pH 6,8 e em pH 1,2 apenas pequenas concentrações foram quantificadas. O ensaio de liberação de nanocápsulas mostrou as partículas sendo liberadas de maneira intacta dos *beads* em pH 6,8. As análises de microscopia realizadas nos *beads* de alginato de cálcio mostraram a presença de nanocápsulas em toda massa dos *beads* desenvolvidos. As nanocápsulas de núcleo lipídico contendo paclitaxel apresentaram citotoxicidade em linhagem celular de câncer de mama MCF-7 em 24h e 48h. Parada do ciclo celular em G2/M e mecanismo de morte por apoptose.









































































## **5. CONCLUSÕES**

---



- As formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico carregadas com PTX (PTX-LNC) apresentaram características físico-químicas adequadas em relação ao tamanho, pH e conteúdo de fármaco para a aplicação do objetivo do estudo;
- Foi possível incorporar a LNC contendo PTX com sucesso em *beads* de alginato de cálcio, sendo a presença das LNCs identificadas por microscopia eletrônica de varredura em toda a matriz polimérica do *bead*;
- O estudo de intumescimento provou inicialmente resistência a pH 1,2 e a capacidade do PTX-LNC-*Bead* de expandir e desintegrar em pH 6,8;
- A formulação PTX-LNC-*Bead* mostrou liberação de fármaco dependente do pH, tolerando o pH 1,2 e liberando grandes concentrações de fármaco e LNCs intactas em pH 6,8;
- O ensaio de liberação de LNCs comprovou que nanocápsulas carregadas de fármaco foram liberadas dos *beads*;
- As LNCs-PTX foram incorporadas em *beads* de alginato de cálcio e liberadas de maneira intacta, carregadas com fármaco em meio simulado intestinal pH 6,8.
- As LNCs-PTX apresentaram redução da viabilidade celular em linhagem celular MCF-7, parada do ciclo celular em G2/M e expressão de ki67 em células tratadas na concentração de 57 nM.



## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



Aguero, L, Zaldivar-silva, D., Peña, L., Dias, L. M. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 15; n. 168, p.32-43, 2017.

Almeida, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, 2005, v. 28, n. 1 pp. 118-129.

Altmann, K.H., Gertsh, J. Anticancer drugs from nature- natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. **The Royal Society of Chemistry** 2007, 24; 327-357.

Antonow, M. B., Asbahr, A. C. C., Raddatz, Beckenkamp P. A. , Buffon A., Guterres, S. S., Pohlmann A. R., Liquid formulation containing doxorubicin-loaded lipid-core nanocapsules: Cytotoxicity in human breast cancer cell line and in vitro uptake mechanism, **Materials Science and Engineering C**. vol.76, p. 2017.

Baek, J.S., et al. Solid lipid nanoparticles of paclitaxel strengthened by hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as an oral delivery system, **International journal of molecular medicine**, 2012, 30, 953-959.

Bajpai S.K., Sharma S., Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  ions, **Reactive and Functional Polymers**, 2004, 59, 2; 129-140.

Bakrania, A.K., Variya B. C., Patel S. S. Novel targets for paclitaxel nano formulations: hopes and hypes in triple negative breast cancer, **Pharmacological Research**. v. 111, p. 577-591, 2016.

Bansal, D., Gulbake, A., Tiwaric, J. Development of liposomes entrapped in alginate beads for the treatment of colorectal cancer, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.82, p. 687–695, 2016.

Bernabeu, E., Cagel, M., Lagomarsino, E., Moretton, M., Chiappetta, D. A., Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead. **International Journal of Pharmaceutics**. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.016>.

Bernardi A. Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by  $\text{A}\beta_{1-42}$  in Alzheimer's disease models. **Int J Nanomedicine**. 2012; 7:4927-42.

Bernardi, A., Frozza, R. L., Hoppe, J. B., Salbego, C., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., 2013. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 711.

Bracini, I. Pérez S. Molecular Basis of  $\text{Ca}^{2+}$ -Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited, **Biomacromolecules**, 2001, 2, 4, 1089–1096.

BRASIL - **Ministério da Saúde / Secretaria de Atenção à Saúde** PORTARIA CONJUNTA Nº 4, DE 23 DE JANEIRO DE 2018.

Bray, F. Piñeros, M. Cancer patterns, trends and projections in Latin America and the Caribbean: a global context. Cancer Surveillance Section, International Agency for Research on Cancer, 2016, France.

Brum, A.A.S, et al. Lutein-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability evaluation, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** 2017, 522, 477–484.

Bruno S., Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells, **Cell proliferation** 1992, 25 , 1: 31-40.

Bruinsmann F.A, et al. Chitosan-Coated Nanoparticles : Effect of Chitosan Molecular Weight on Nasal Transmucosal Delivery 2019, 11, 86: 1–19.

Cai et al., Paeonol reverses paclitaxel resistance in human breast cancer cells byregulating the expression of transgelin 2, **Phytomedicine** 2014, 21; 984–991.

Cai LL, et al. RGD peptide-mediated chitosan-based polymeric micelles targeting delivery for integrin-overexpressing tumor cells. **Int J Nanomedicine**. 2011, 6;3499-508.

Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. **J Pathol**. 1992 168(4):357-63.

Casarini, T. P. A, Frank, L. A., Benin, T., Onzi, G., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., 2020. Innovative hydrogel containing polymeric nanocapsules loaded with phloretin: Enhanced skin penetration and adhesion. **Mater. Sci. Eng. C**. 2020, 111681.

Calgaroto, S., et al. Chemical stability, mass loss and hydrolysis mechanism of sterile and nonsterile lipid-core nanocapsules: The influence of the molar mass of the polymer wall, **Reactive and Functional Polymers** 2018, 133, 161–172.

Carvalho, P.; Tirnauer, J. S.; Pellman, D.; Trends Cell. Biol. 2003, 5, 229; Nicolau, K. C.; Roschangar, F.; Vourloumis, D.; Angew Chem., Int. Ed. 1997, 37, 2014; Unger C.; Drugs Fut. 1998, 22, 1337.

Cerciello et al., Prednisolone Delivery Platforms: Capsules and Beads Combination for a Right Timing Therapy , **Pharm. Res**. 2017, 34(2); 438-452

Chaves, P.S., Ourique, A. F., Frank, L. A., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., Beck, R. C. R Carvedilol-loaded nanocapsules: Mucoadhesive properties and permeability across the sublingual mucosa, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 114, p. 88-95, 2017.

Chan L.W., Jin Y., Heng P.W.S. Cross-linking mechanisms of calcium and zinc in production of alginate microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, 2002, 242; 255–258.

Chou PL, Huang YP, Cheng MH, Rau KM, Fang YP. Improvement of Paclitaxel-Associated Adverse Reactions (ADRs) via the Use of Nano-Based Drug Delivery Systems: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Int J Nanomedicine*. 2020 12;15;1731-1743.

Choudhury, H., et al. Safety against nephrotoxicity in paclitaxel treatment: Oral nanocarrier as an effective tool in preclinical evaluation with marked in vivo antitumor activity, **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 2017, 91, 179–189.

Costa B., Matos R., Amorim I., Gartner F., Vale N. New Insight into Breast Cancer Cells Involving Drug Combinations for Dopamine and Serotonin Receptors **Appl. Sci.** 2021, 11; 6082.

Demidenko ZN, Kalurupalle S, Hanko C, Lim CU, Broude E, Blagosklonny MV. Mechanism of G1-like arrest by low concentrations of paclitaxel: next cell cycle p53-dependent arrest with sub G1 DNA content mediated by prolonged mitosis, **Oncogene**. 2008 24;27(32);4402-10.

Dierendonck J.H.V., et al. Nuclear Distribution of the Ki-67 Antigen during the Cell Cycle: Comparison with Growth Fraction in Human Breast Cancer Cells, **Cancer Res.** (1989) 49 (11): 2999–3006.

Draget K. I., Taylor, C.. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 2, p. 2011. 251-256.

Feng, C., Song, R., Sun, G., Kong, M., Bao, Li, Y., Cheng, X., Cha, D., Park., H., Chen, X. Immobilization of Coacervate Microcapsules in Multilayer Sodium Alginate Beads for Efficient Oral Anticancer Drug Delivery, **Biomacromolecules**, 2014, 15, p. 985-96.

Feng, C., Li, J., Mu, Y., Kong, M., Li, Y., Raja, M. A., Cheng, X. J., Liu, Y., Chen, X. G. Multilayer micro-dispersing system as oral carriers for co-delivery of doxorubicin hydrochloride and P-gp inhibitor, **International Journal of Biological Macromolecules**. n.94, p.170–180, 2017.

Figueiró, F., Bernardi, A., Frozza, R.L., Terroso, T., Zanotto-Filho, A., Jandrey, E.H.F., Moreira, J.C.F., Salbego, C.G., Edelweiss, M.I., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Battastini, A.M.O., 2013. Resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules treatment reduces in vitro and in vivo glioma growth. *J. Biomed. Nanotechnol.* 9, 516–526.

Figueiró, F., Oliveira, C.P. de, Rockenbach, L., Mendes, F.B., Bergamin, L.S., Jandrey, E.H.F., Edelweiss, M.I., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., Battastini, A.M.O., 2015. Pharmacological improvement and preclinical evaluation of methotrexate-loaded lipid-core nanocapsules in a glioblastoma model. *J. Biomed. Nanotechnol.* 11, 1808–1818.

Frank, L.A., Gazzi, R.P., Mello, P., Buffon, A., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S. Imiquimod-loaded nanocapsules improve cytotoxicity in cervical cancer cell line. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 136, p. 9-17, 2019.

Fundueanu, G. et al. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. *Biomaterials* 1999, 20, 1427-1435.

Gallego-Jara, J., Lozano-Terol, G., Sola-Martínez, R. A., Cánovas-Díaz, M., Puente, T. D. A Compressive Review about Taxol®: History and Future Challenges. **Molecules**. doi:10.3390/molecules25245986.

Garcia-Cruz C.H., Foggetti U. and Silva A.N. Bacterial alginate: technological aspects, characteristics and production. **Química Nova**, 2008, 31,7;1800-1806.

Gazzi, R.P., Frank, L.A., Onzi, G., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., 2020. New pectin-based hydrogel containing imiquimod-loaded polymeric nanocapsules for melanoma treatment. **Drug Deliv. and Transl. Res.** 10,1829–1840.

George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan: a review. **J Control Release**. 2006, 10;114(1); 1-14.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer**. 1983, 15;31(1); 13-20.

Giri, T. K., Bhowmick, S., Maity, S. Entrapment of capsaicin loaded nanoliposome in pH responsive hydrogel beads for colonic delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, n. 39, p. 417-422, 2017.

Groo, A.C., et al. Fate of paclitaxel lipid nanocapsules in intestinal mucus in view of their oral delivery, **International Journal of Nanomedicine**, 2013, 8, 4291–4302.

Guo et al. An endophytic Taxol-producing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*, **African Journal of Biotechnology**, 2006, 5 (10), 875-877.

Haghnavaaz N., et al. HER2 positivity may confer resistance to therapy with paclitaxel in breast cancer cell lines, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2018, 46:3; 518-523.

Hahn H.S. et al., Metronomic oral paclitaxel shows anti-tumor effects in an orthotopic mouse model of ovarian cancer. **J. Gynecol Oncol**, 2014, 25, 2;130-135.

Hahn, H.S., Lee, K. H., Lee, I. H., Lee, J. H., Whang, C. S., Jo, Y. W., Kim, T. J. Metronomic oral paclitaxel shows anti-tumor effects in an orthotopic mouse model of ovarian cancer, **Journal Gynecologic Oncology**. 25, 130-135. (NCT03326102) *Cancer Res.* 80 (4 Suppl):Abstract nr OT1-05-02, 2017.

Haldar S., Chintapalli J., Croce C. M. Taxol induces bcl-2 Phosphorylation Death of Prostate Cancer Cells. **Cancer Research** 1996, 56; 1253-1255.

Harshita, Barkat, M. A., Rizwanullah, M., Beg, S., Pottoo, F. H., Siddiqui, S., Ahmad, F. J. Paclitaxel-loaded Nanolipidic Carriers with Improved Oral Bioavailability and Anticancer Activity against Human Liver Carcinoma. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 2, p. 87, 2019.

Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, Wacker HH, Parwaresch R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. **Cell Prolif.** 1996, 29(7);413-25.

ICH, 1996 - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guideline for good clinical practice E6(R1). 10 jun 1996.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativas 2018. Disponível em: <[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em: 30 de março de 2021.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Tipos de câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar. Informativo Vigilância do Câncer no Brasil n. 8: MAGNITUDE DO CÂNCER NO BRASIL: INCIDÊNCIA, MORTALIDADE E TENDÊNCIAS. 2021 Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//informativo-vigilancia-do-cancer-n8-2020.pdf>

Jiang J., Pi J., Cai J. The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications Bioinorganic, **Chemistry and Applications** 2018,18, ID 1062562.

Kang, Y. K., et al. Efficacy and safety findings from DREAM: a phase III study of DHP107 (oral paclitaxel) versus i.v. paclitaxel in patients with advanced gastric cancer after failure of first-line chemotherapy. **Ann Oncol.** n. 5, p.1220-1226. 2018. doi: 10.1093/annonc/mdy055. PMID: 29438463.

Kingston, D. G. Taxol, a molecule for all seasons. **Chemical Communications** 2001, 10; 867-880.

Kolishetti N, Dhar S, Valencia PM, Lin LQ, Karnik R, Lippard SJ, Langer R, Farokhzad OC. Engineering of self-assembled nanoparticle platform for precisely controlled combination drug therapy. **Proc Natl Acad Sci.** 2010, 19; 107 (42): 17939-44.

Kumari K., et al., Transcriptome analysis of genes associated with breast cancer cell motility in response to Artemisinin treatment, **BMC Cancer**, 2017, 17:858.

Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. **Breast Cancer Res Treat.** 2004, 83(3);249-89.

Lee I.H., et al. Development, Optimization and Absorption Mechanism of DHP107, Oral Paclitaxel Formulation for Single-Agent Anticancer Therapy, **Institute of Science and Technology and Daehwa Pharmaceutical Korea**, 2012.

Lee A.V., Oesterreich S., Davidson. MCF-7 cells changing the course of breast cancer research and care for 45 years, **J. Natl. Cancer Inst.** 2015, (7) 31;107.

Leiva et al. Tripalmitin nanoparticle formulations significantly enhance paclitaxel antitumor activity against breast and lung cancer cells in vitro, **Scientific reports** 2017, 7: 13506.

Li H, Huo M, Zhou J, Dai Y, Deng Y, Shi X, Masoud J. Enhanced oral absorption of paclitaxel in N-deoxycholic acid-N, O-hydroxyethyl chitosan micellar system. **J Pharm Sci.** 2010, Nov;99(11):4543-53.

Liebmann JE, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, Fisher J, Mitchell JB. Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines. **Br J Cancer.** 1993, 68(6):1104-9.

Lim, H.P., et al. Controlled delivery of oral insulin aspart using pH-responsive alginate/ $\kappa$ -carrageenan composite hydrogel beads. **Reactive and Functional Polymers** 2017,120, 20-29.

Martins, S., Sarmiento, B., Souto, E. B., & Ferreira, D. C. Insulin-loaded alginate microspheres for oral delivery – Effect of polysaccharide reinforcement on physicochemical properties and release profile. **Carbohydrate Polymers** 2007 69(4), 725–731.

Manoir et al., Ki-67 Labeling in Postmitotic Cells Defines Different Ki-67 Pathways Within the 2c, **Compartment Cytometry**, 1991, 12; 455-463 .

Mora-Huertas C.E., Fessi H Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery **International Journal of Pharmaceutics** 2010, 385; 113–142.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** 1983, 16;65 (1-2); 55-63.

Ourique, A. F., Melero, A., de Bona da Silva, C., Schaefer, U. F., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., Lehr, C. M., Kostka, K. H., Beck, R. C. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: development of a semisolid nanomedicine. **Eur J Pharm Biopharm.** V. 79, n. 1, p. 95-101. 2010.

Panchagnula R. Pharmaceutical aspects of paclitaxel, **International Journal of Pharmaceutics** 1998, 172 (1–2);1-15

Patel, N., Lalwani, D., Goller, S., Injeti, E., Sari, Y., Nesamony, J. Development and evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxone sodium formulation, **Prog Biomater.** n. 5, p.117-133, 2016.

Pawar, S.N. and Edgar, K.J. Alginate Derivatization: A Review of Chemistry, **Properties and Applications.** **Biomaterials**, 2012, 33, 3279-3305.



Peltier, S., Oger, J. M., Lagarce, F., Couet, W., Benoiôt, J. P. Enhanced Oral Paclitaxel Bioavailability After Administration of Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 6, 2006.

Pluard, T. J., et al. A phase II study to evaluate the efficacy, safety and pharmacokinetics of DHP107 (Liporaxel®, oral paclitaxel) compared to IV paclitaxel in patients with recurrent or metastatic breast cancer: OPERA (NCT03326102), **Cancer Res.** 2020, 80 (4 Suppl):Abstract nr OT1-05-02.

Poletto, F.S., Oliveira, C. P., Wender, H., Regent, D., Donida, B., Teixeira, S. R., Guterres, S. S., Rossi-Bergmann, B., Pohlmann, A. R. How Sorbitan Monostearate Can Increase Drug-Loading Capacity of Lipid-Core Polymeric Nanocapsules, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. n. 15, p. 827–837, 2015.

Ranganath, S.H., Kee, I., Krantz, W. B., Chow, P. K. H., Wang, C. H. Hydrogel Matrix Entrapping PLGA-Paclitaxel Microspheres: Drug Delivery with Near Zero-Order Release and Implantability Advantages for Malignant Brain Tumour Chemotherapy, **Pharmaceutical Research**.v. 26, n. 9, 2009.

Reynaud, F., Tsapis, N., Guterres, S. S., Pohlmann, A. R., Fattal, E. Pectin beads loaded with chitosan-iron microspheres for specific colonic adsorption of ciprofloxacin. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 1-7, 2015.

Umanzor, G. et al. Oral paclitaxel with encequidar: The first orally administered paclitaxel shown to be superior to IV paclitaxel on confirmed response and survival with less neuropathy: A phase III clinical study in metastatic breast cancer. **In: San Antonio Breast Cancer Symposium**. Abstract GS6-01, 2019.

Rodrigues, S. F., Fiel, L. A., Shimada, A. L., Pereira, N. R., Guterres, S. S., Pohlmann, A. R., Farsky, S. H. Lipid-Core Nanocapsules Act as a Drug Shuttle Through the Blood Brain Barrier and Reduce Glioblastoma After Intravenous or Oral Administration. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, vol. 12, p. 986–1000, 2016.

Salama et al., 2018).- Salama, H.E.; Abdel Aziz, M.S.; Sabaa, M.W. Novel biodegradable and antibacterial edible films based on alginate and chitosan biguanidine hydrochloride. **Int. J. Biol. Macromol.** 2018, 116, 443–450.

Santos, P.P., et al. Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study, **Journal Nanoparticle Research** 2015, 17, 107.

Schultze, E., Ourique, A., Yurgel, V.C., Begnini, K.R., Thurow, H., De Leon, P.M.M., Campos, V.F., Dellagostin, O.A., Guterres, S.R., Pohlmann, A.R., Seixas, F.K., Beck, R.C.R., Collares, T., 2014. Encapsulation in lipid-core nanocapsules overcomes lung cancer cell resistance to tretinoin. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 87, 55–63.

Scholzen T, Endl E, Wohlenberg C, van der Sar S, Cowell IG, Gerdes J, Singh PB. The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1

(HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure. **J Pathol.** 2002 196(2):135-44.

Souza, G.D. et al. Expressão citofotométrica do fator de proliferação celular ki-67 no bócio colóide e no carcinoma papilífero da tireóide. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões** 2009,36, 2;105-109.

Snyder J.P, Nettles J.H., Cornett B., Downing K.H. Nogales E. The binding conformation of Taxol in  $\beta$ -tubulin: A model based on electron crystallographic density, **PNAS**, 2001, 98; 95312 5316.

Stella et al., Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsule, **International Journal of Pharmaceutics**, 2007, 344 (1-2), 71-77.

Tassone P., et al., BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells, **British Journal of Cancer** 2003, 88; 1285 – 1291.

Vasconcelos, A.G et al. Cytotoxic activity of poly-  $\epsilon$  -caprolactone lipid-core nanocapsules loaded with lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L .) on breast cancer cells. **Food Res. Int.** 2020, 136, 109548.

Venturini, C. G., Jäger, E., oliveira, C. P., Bernardi, A., Battastini A. M., Guterres, S. S., Pohlmann, A. R. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects (Print)**, v. 375, p. 200-208, 2011.

Xu, R., Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement, **Particuology** 2008, 6, 112-115.

Weaver. B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Nat Commun**, n. 8, v, 25, 2014.

Weiss, R.B., Donehower, R.C., Wiernik, P.H., Ohnuma, T., Gralla, R.J., Trump, D.L., Baker, J.R., Echo, D.A. Van, Hoff, D.D. Von, Leyland-jones, B. Hypersensitivity Reactions From. **Taxol. J. Clin. Oncol.** n.8, p.1263–1268, 1990.

Yang, T. et al. Antitumor effect of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposome against Human Breast cancer cells. **Pharmaceutical Research**, 2007, 24, 12;2402-2422.

Yin, Z.; Wang, Y.; Wang, K. A pH-responsive composite hydrogel beads based on agar and alginate for oral drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. 2018, 43;12 e 18.

Yurgel, V.C., et al. Methotrexate diethyl ester-loaded lipid-core nanocapsules in aqueous solution increased antineoplastic effects in resistant breast cancer cell line. **Int. J. Nanomedicine** 9, 2014 1583–1591.

Wanderley C.W., et al. Paclitaxel Reduces Tumor Growth by Reprogramming Tumor-Associated Macrophages to an M1 Profile in a TLR4-Dependent Manner, **Cancer Res.**, 2018 78 (20): 5891–5900.

Wang, L., Hu, X., Shen, B., Xie, Y., Shen, C., Lu, Y., Qi, J., Yuan, H., Wu, W. Enhanced stability of liposomes against solidification stress during freeze-drying and spray-drying by coating with calcium alginate, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. 2015, n.30, p. 163-170.

Wang H, Zhao Y, Wu Y, Hu YL, Nan K, Nie G, Chen H. Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLGA copolymer nanoparticles. **Biomaterials** 2011, 32(32); 8281-90.

WICKI A., et al. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. **Journal of Controlled Release** 2015, 200 (28); 138-157.

Zanotto-filho et al., 2013; Zanotto-Filho, A., Coradini, K., Braganhol, E., Schröder, R., De Oliveira, C.M., Simões-Pires, A., Battastini, A.M.O., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Forcelini, C.M., Beck, R.C.R., Moreira, J.C.F., 2013. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 83, 156–167.

Zhang, Z., et al. Paclitaxel drug delivery systems, *Expert Opin. Drug Deliv.* DOI: 10.1517/17425247.2013.752354, 2013.

Zhang, M., Tang, Y., Zhu, Z., Zhao, He, Yao, J., sun, D. Paclitaxel and etoposide-loaded Poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres fabricated by coaxial electrospraying for dual drug delivery. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, n. 29, v. 16, p. 1949-1963, 2018.



O Conteúdo do ANEXO I que corresponde as páginas 85 a 95 foram suprimidos desta versão, pois trata-se de um manuscrito elaborado a partir dos dados relacionados a preparação e caracterização de *beads* de alginato de cálcio contendo paclitaxel intitulado “*Development of calcium alginate beads containing paclitaxel-loaded lipid-core nanocapsules for oral delivery*” e submetidos para publicação.





















