

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Emilio Ramos Cintra

Título do trabalho: Liberação Controlada por Magnetohipertermia de Doxorubicina em Magnetolipossomas Direcionados ao Receptor de Superfície Celular Folato

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹


Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) 
Prof. Titular - Nano/Tecnologia Farmacêutica
Centro de PD&I Farmatec
Fac. Farmácia - UFG

Data: 11 / 03 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

EMILIO RAMOS CINTRA

LIBERAÇÃO CONTROLADA POR MAGNETOHIPERTERMIA DE
DOXORRUBICINA EM MAGNETOLIPOSSOMAS DIRECIONADOS AO
RECEPTOR DE SUPERFICIE CELULAR FOLATO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Martins Lima

Goiânia – GO

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Cintra, Emilio Ramos

Liberação Controlada por Magnetohipertermia de Doxorrubicina em Magnetolipossomas Direcionados ao Receptor de Superfície Celular Folato [manuscrito] / Emilio Ramos Cintra. - 2018.
120 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Martins Lima.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Goiânia, 2018.
Bibliografia.

1. Magnetolipossomas. 2. Doxorrubicina. 3. Magnetohipertermia.
4. Acido Folido. I. Lima, Eliana Martins, orient. II. Título.

CDU 615.1



Ministério da Educação
UFG/UFRGS/UFMS/UFSC/USP-RP/UNESP-Ar/UFOP/UFRN/UFPE
Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica

ATA DA DEFESA DE TESE

No dia 08 de outubro de 2018, ocorreu a Defesa de Tese do aluno Emílio Ramos Cintra no **Programa de Pós-graduação em Nanotecnologia Farmacêutica**, em sessão presidida e registrada pela Orientadora **Profa. Dra. Eliana Martins Lima**. A Tese tem como título: Liberação controlada por magnetohipertermia de doxorubicina em magnetolipossomas direcionados ao receptor de superfície celular folato.

De acordo com o Regimento do Programa, o processo de defesa de tese constou de duas etapas: na primeira ocorreu a apresentação oral do estudo realizado e na segunda a sustentação do mesmo frente à arguição dos membros da Banca Examinadora. A Presidente da Banca Examinadora deu início aos trabalhos, com a abertura formal às 14:00 horas, no Auditório da Faculdade de Farmácia da UFG, com a leitura da **Portaria nº. 02/2014**, de designação da Banca Examinadora, assinada pela Coordenadora Geral do **PGNANOFARMA**. A seguir, passou a palavra ao doutorando, que apresentou seu trabalho, durante 45 minutos. Após sua exposição, foi dada a palavra aos membros da Banca Examinadora, para que procedessem à arguição do doutorando, com respostas a cada um dos examinadores. Concluída esta fase, registraram-se as possíveis sugestões de alterações necessárias ao texto. De acordo com a avaliação dos membros da Banca Examinadora, o doutorando Leonardo Gomes Souza foi **aprovado(a)**; **aprovado(a) com alterações** ou **reprovado(a)**. A aprovação será válida desde que sejam satisfeitas as condições exigidas pelos membros da Banca Examinadora, com entrega da versão final da tese, referendada pela Professora Orientadora, até o prazo máximo de **30 (trinta)** ou **60 (sessenta)** dias na Secretaria Local do Programa, a contar da presente data. O doutorando está ciente de que somente poderá usufruir de todos os direitos e prerrogativas que o Título de Doutor lhe confere quando da Homologação da Ata em Reunião da Coordenadoria Geral do **PGNANOFARMA**, após entrega da documentação exigida para formação do processo de concessão do Diploma de Doutor na Universidade Federal de Goiás.

Goiânia, 08 de outubro de 2018.

Nome e Assinatura da Banca Examinadora:

Titulares	Assinaturas
Profa. Dra. Eliana Martins Lima (PPG NanoFarma/FF/UFG) - Presidente	
Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna (PPG NanoFarma/UFSC)	
Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis (IF/UFG)	
Prof. Dr. Sebastião Antônio Mendanha Neto (IF/UFG)	
Dra. Ana Luíza Ribeiro de Souza (FF/UFG)	
Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda (ICB/UFG) - Suplente	

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Celia, que junto comigo sonhou, viveu e sofreu, mas que acima de tudo sempre foi meu modelo de coragem e minha inspiração pelo vencer. Obrigado por cada conselho, cada investimento, cada luta travada e cada batalha vencida. Você sempre será a minha base.

À minha família pelo carinho e apoio em todos os momentos de minha vida.

À minha esposa Lucicleya por sua dedicação e incansável apoio. Ao longo dos anos de maneira muito pessoal compartilhou comigo as alegrias, sucessos, frustrações e desafios. Agradeço a meu amado filho Miguel, que é para mim uma fonte inesgotável de coragem e perseverança. A paternidade tem sido para mim um exercício contínuo de aprendizado.

À Profa Dra Eliana Martins Lima, pelo incentivo e confiança no meu trabalho, por estar sempre disposta a discutir os resultados e esclarecer as dúvidas, por ter me proporcionado a oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis pelos anos de dedicada orientação e experiências compartilhadas que fortaleceram muito meu caráter profissional.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, pelo apoio e companheirismo em todos os momentos.

Agradeço ao Msc. Relton Romeis de Oliveira e ao Dr. Luis Antônio Dantas Silva pelas discussões conceituais que ajudaram, grandemente, no refinamento das estratégias de medida e análise dos resultados obtidos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, pela oportunidade de minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo.

À banca examinadora pela atenção dedicada a este trabalho.

RESUMO

A Doxorubicina é um dos antineoplásicos mais utilizado no tratamento de tumores sólidos, incluindo os tumores de tecidos moles e osteossarcomas. Mas a elevada ocorrência de efeitos colaterais de caráter cardiotoxico decorrente de seu uso prolongado prejudica a adesão e a efetividade terapêutica. Visando diminuir os efeitos colaterais, no presente trabalho foram desenvolvidos magnetolipossomas (lipossomas que contem nanopartículas magnéticas encapsuladas em seu interior aquoso) coencapsulando doxorubicina em seu interior aquoso vetorizados para o receptor folato para a liberação controlada por magnetohipertermia. Esse trabalho foi dividido em quatro etapas: otimização e validação de metodologia analítica para quantificar a doxorubicina, síntese dos fluidos magnéticos com diferentes camadas de cobertura, desenvolvimento de magnetolipossomas coencapsulando doxorubicina com e sem vetorização a fim de comparar a efetividade da vetorização e estudos *in vitro* para se verificar a efetividade quimioterápica da formulação lipossomal frente à linhagem de melanoma B16F10. Os magnetolipossomas foram preparados pelo método de hidratação de filme lipídico seguido de extrusão e as análises físico-químicas e morfológicas mostraram que as formulações lipossomais têm um tamanho médio próximo a 150 nm. As partículas magnéticas compostas de ferrita de manganês com diferentes camadas de coberturas apresentaram tamanho médio de 13 nm, alta magnetização de saturação e comportamento superparamagnético. Os magnetolipossomas foram capazes de gerar calor através da magnetohipertermia com campo magnético alternado (AC). A formulação de magnetolipossomas contendo doxorubicina vetorizada ao receptor folato apresentou atividade antitumoral superior à da formulação não vetorizada e o teste com hipertermia demonstrou que o aumento da temperatura está diretamente relacionado à potencialização do efeito citotóxico. Esses resultados sugerem, portanto, a obtenção de uma formulação lipossomal cuja atividade antitumoral representa uma alternativa promissora associando o *codelivery* do quimioterápico e de nanopartículas magnéticas direcionadas ao tecido tumoral.

Palavras chaves: Magnetolipossomas, Doxorubicina, Magnetohipertermia, Ácido Fólico.

ABSTRACT

Doxorubicin is one of the most commonly used antineoplastic agents in the treatment of solid tumors, such as soft tissue tumors and osteosarcomas. However, the high occurrence of cardiotoxic side effects due to its prolonged use causes damages to adherence and therapeutic efficacy. In order to diminish the side effects, during the present research magnetoliposomes with magnetic nanoparticles coencapsulating doxorubicin were developed in their aqueous interior vectors for the folate receptor aiming controlled release by magnetohyperthermia. This work was divided in four stages: optimization and validation of analytical methodology to quantify doxorubicin; synthesis of magnetic fluids with different layers of coverage; development of magnetoliposomes coencapsulating doxorubicin with and without vectorization in order to compare if the effectiveness of the vectorization and in vitro studies for the chemotherapy effectiveness of the liposomal formulation against the B16F10 cell was verified. The magnetoliposomes were prepared by the lipid film hydration method followed by extrusion and the physical-chemical and morphological results showed that the liposomal formulations have an average size close to 150 nm. The magnetic particles have an average size of 13 nm, high saturation magnetization, superparamagnetic behavior and are composed by manganese ferrite with different layers of coverings. The magnetoliposomes were able to generate heat through magnetohyperthermia with alternating magnetic field. The liposomal formulation of magnetoliposome with vectorized doxorubicin to the folate receptor showed higher antitumor activity when compared to formulation without vectorization. When compared to hyperthermia test, it showed that the increase in temperature is linked to a better effect with the drug for a greater cytotoxic effect. These results suggest, therefore, that the obtaining of a liposomal formulation towards the antitumor activity represents a promising alternative associated to the codelivery chemotherapeutic and magnetic nanoparticles directed at the tumor tissue.

Keywords: Magnetoliposomes, Doxorubicin, magnetic hyperthermia, Folic Acid

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da doxorubicina.....	18
Figura 2 - Representação esquemática do preparo de lipossomas pelo método de hidratação de filme lipídico.....	20
Figura 3 - Representação esquemática de pré-inserção (A) e pos-inserção (B) do lipídio peguulado.....	22
Figura 4 - Representação esquemática de lipossomas de circulação prolongada (A) e lipossomas de superfície modificada (B).	24
Figura 5 - Representação esquemática da endocitose via receptor folato de nanopartículas vetorizadas.....	25
Figura 6 - Representação esquemática dos diferentes tipos de repulsão para as partículas magnéticas. (A) dispersa em solvente apolar, com uma camada de surfactante de cobertura (FM sulfactado), (B) dispersão em solvente polar (pH>7), onde o meio básico ocasiona uma distribuição superficial de cargas logo as contra-íons da solução são atraídos formando a dupla camada iônica (FM iônico) e (C) dispersão em solvente polar, mas com recobrimento da NPM por uma molécula polar (FM iônico-sulfactado).....	29
Figura 7 - Espectro de varredura de absorção no UV/VIS da solução de doxo a 0,01 mg/mL em metanol.....	36
Figura 8 - Perfil cromatográfico da doxo e cromatogramas referente ao ensaio de seletividade frente aos componentes da formulação lipossomal, obtidos sob as seguintes condições cromatográficas: fase móvel Acetonitrila:Água acidificada com 0,1% TFA, fluxo de 1 mL/min, comprimento de onda em 233 nm, volume de injeção de 20 µL. (A) Cromatograma da Doxo na concentração de 50 µg/mL; Linha de base obtida a partir da análise: (B) dos lipossomas brancos, (C) dos lipossomas contendo partícula magnética e (D) da fase móvel.....	37
Figura 9 - Curva analítica de calibração da doxo na faixa de 1 a 50 µg/mL. Foram preparadas para a análise soluções de Doxo em metanol, nas concentrações de 1, 2, 5, 10, 20 e 50 µg/mL. Condições cromatográfica utilizadas: fase móvel ACN:Água acidificada com 0,1% TFA, fluxo de 1 mL/min, comprimento de onda em 233 nm, volume de injeção de 20 µL.	38
Figura 10 - Perfil cromatográfico da doxo referente ao ensaio de limite de quantificação e detecção, obtidos sob as seguintes condições cromatográfica: fase móvel	

ACN:Água acidificada com 0,1% TFA, fluxo de 1 mL/min, comprimento de onda em 233 nm, volume de injeção de 20 µL. (A) Cromatograma da Doxo a 0,25 µg/mL; (B) Cromatograma da Doxo a 0,5 µg/mL; (C) Cromatograma da Doxo a 1 µg/mL; (D) Cromatograma da Doxo a 2 µg/mL.	40
Fonte: dados da pesquisa.	40
Figura 11 - Representação esquemática de um sistema de magnetometria de amostra vibrantes.....	46
Figura 12 - Representação esquemática do preparo de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico e posterior extrusão.	51
Figura 13 - Representação esquemática da separação das partículas magnéticas não encapsuladas nos magnetolipossomas pela técnica de cromatografia de exclusão por tamanho.	52
Figura 14 – Imagem da membrana de policarbonato com poro 100 nm colocada no extrusor mostrando o processo de retenção e obstrução da membrana pelos sistemas.	55
Figura 15 - Difratoograma de Raios-X do pó de ferrita de manganês passivada secada a 70°C. Ângulo de Bragg 2θ, no intervalo de 10 a 80°.	55
Figura 16 - Curva de magnetização do pó de ferrita de manganês (A) e do fluido de ferrita de manganês recoberto com dextrana na diluição 1:3 (v/v) em tampão sulfato de amônia pH 3.0 (B) obtidos pela técnica de magnetometria de amostras vibrantes (MAV).	57
Figura 17 - Perfil de magnetohipertermia do pó de NPM de ferrita de manganês (A). Perfil de magnetohipertermia do fluido magnético de ferrita de manganês na diluição 1:3 (v/v) em tampão sulfato de amônia pH 3.0 (B). Foi analisada a variacao de campo magnetico para cada leitura e o tempo de analise durou 40 segundos para a amostra em pó e 100 segundo para a amostra do fluido magnetico.....	59
Figura 18 - Cromatografia de exclusão de tamanho, magnetolipossomas eluídos na coluna de Sephadex G50 em tampão HEPES pH 7,4.	61
Figura 19 – Frações coletadas na eluição do magnetolipossomas na coluna de Sephadex G50.	62
Figura 20 – Caracterização dos magnetolipossomas antes da eluição pela coluna (A) e após eluição pela coluna (B) de Sephadex G50, pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS)	62

Figura 21 – Curva de magnetização do fluido magnético, magnetolipossomas antes e depois da coluna de Sephadex G-50. (Quadrado Preto) - fluido magnético de NPM de ferrita de manganês recoberta com dextrana na proporção 1:3 (FM:Tampão sulfato de amônio pH3.0), (Triangulo Azul) – magnetolipossoma após o preparo e antes de passar pela coluna de Sephadex e (Círculo Vermelho) – magnetolipossoma após o preparo e depois de passar pela coluna de Sephadex.	64
Figura 22 – Curva de magnetização específica do magnetolipossoma (círculos vermelhos) e fluido magnético (quadrados pretos) obtidas pela técnica de magnetometria de amostra vibrante (MAV).....	65
Figura 23 – Perfil de magnetohipertermia do fluido magnético de ferrita de manganês revestida com dextrana na concentração de 1:3 (linha preta). Perfil de magnetohipertermia do magnetolipossoma (linha vermelha). Foi aplicado o campo magnético alternado de 342 Oe na frequência de 334 kHz. A leitura e o tempo de análise durou 800 segundos. (A) Valor da temperatura medida ao longo do tempo de exposição ao campo magnético alternado, (B) Variação da temperatura ao longo do tempo (ΔT).....	66
Figura 24 – Formula molecular do Ácido fólico (massa molar = 441,37 g/mol).....	70
Figura 25 – Formula molecular do DSPE-PEG(2000)-NH ₂ (massa molar = 2788,79 g/mol)	70
Figura 26 – Síntese do conjugado DSPE-PEG(2000)-AF (massa molar = 3228,95 g/mol)	71
Figura 27 – Espectro de FTIR do DSPE-PEG(2000)-NH ₂ puro.....	78
Figura 28 – Espectro de FTIR do Ácido Fólico puro.....	79
Figura 29 – Espectro de FTIR do produto da reação DSPE-PEG(2000)-AF.....	79
Figura 30 – Curvas de distribuição de tamanho das formulações desenvolvidas após preparo.....	82
Figura 31 - Representação esquemática da encapsulação da doxo nos lipossomas. No meio externo, a Doxo está em equilíbrio entre sua forma neutra (doxo) e o sal cloridrato de doxorubicina (doxo ⁺ Cl ⁻). A doxo livre é capaz de difundir pela membrana lipossomal. No interior do lipossoma, o sulfato de amônio se dissocia em NH ₃ que se difunde pela membrana enquanto os íons H ⁺ e SO ₄ ²⁻ podem reagir com a doxo, formando sulfato de doxorubicina (Doxo) ₂ SO ₄ , que é um sólido e precipita no interior do lipossoma (Barenholz, 2001).....	83
Figura 32 – Microscopia de transmissão com crioprocessamento	84

Figura 33 – Curvas de magnetização específica. (A) LipoDoxoPegMag; (B) LipoDoxoPegMagVet.....	85
Figura 34 – Ensaio de magnetohipertermia para as formulações lipossomais. O equipamento utilizado é o modelo nanoTherics™ fabricado pela empresa Magnetherm TM do Laboratório de Física Térmica do IF-UFG. Nas configurações de campo 342 Oe e frequência de 334 kHz.....	88
Figura 35 – Ensaio de liberação da Doxo por magnetohipertermia. O equipamento utilizado é o modelo Nanotherics fabricado pela empresa Magnetherm TM do Laboratorio de Fisica Termica do IF-UFG. Nas configurações de campo 342 Oe e frequência de 334 kHz.	89
Figura 36 - Cromatografia de exclusão de tamanho para magnetolipossomas eluído na coluna de Sephadex G50 antes e após Magnetohipertermia. (A) LipoMagPegDoxo sem a aplicação de magnetohipertermia, (B) LipoDoxoPegMag após a aplicação da magnetohipertermia, (C) LipoDoxoPegMagVet após a aplicação da magnetohipertermia.	90
Figura 37– Desenho experimental para realização do ensaio de citotoxicidade usando o método de redução do sal tetrazólio para as formulações propostas.	95
Figura 38 – Desenho experimental para realização do ensaio experimental para avaliar a influência da temperatura na atividade biológica das formulações.....	97
Fonte: dados da pesquisa.	97
Figura 39 - Viabilidade das células de adenocarcinoma da glândula mamária MCF7 após exposição às diferentes formulações avaliadas. As células foram expostas a concentrações decrescentes dos lipossomas (100 – 1,56µg/mL) por 24 horas, de modo que a viabilidade celular foi determinada utilizando-se o método de redução do MTT, mediante a avaliação de três experimentos independentes. (Linha preta) – LipoDoxoPegMag – IC ₅₀ = 4,3 µg/mL, (Linha vermelha) – LipoDoxoPegMagVet – IC ₅₀ = 4,2 µg/mL.	99
Figura 40 - Viabilidade das células de melanoma murino B16F10 após exposição às diferentes formulações avaliadas. As células foram expostas a concentrações decrescentes dos lipossomas (200 – 1,56µg/mL) por 24 horas, de modo que a viabilidade celular foi determinada utilizando-se o método de redução do MTT, mediante a avaliação de três experimentos independentes. (Linha preta) – LipoPegMag – IC ₅₀ = 50,0 µg/mL, (Linha vermelha) – LipoPegMagVet – IC ₅₀ = 12,0	

$\mu\text{g/mL}$, (Linha azul) – LipoDoxoPegMag – $\text{IC}_{50} = 4,9 \mu\text{g/mL}$, (Linha amarela) – LipoDoxoPegMagVet – $\text{IC}_{50} = 1,0 \mu\text{g/mL}$, 101

Figura 41 - Viabilidade das células B16F10 após exposição aos magnetolipossomas.

Para este ensaio as formulações LipoDoxoPegMag (que está na concentração do IC_{50} $4,9 \mu\text{g/mL}$) e LipoDoxoPegMagVet (concentração $1 \mu\text{g/mL}$). As células foram incubadas com a formulação nos tempos de 1, 2 e 4 horas, nas temperaturas de 37°C (A) e 43°C (B)..... 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores do desvio padrão relativo e erro, obtidos na análise de precisão e exatidão do método analítico desenvolvido.....	39
Tabela 2 - Valores do desvio padrão relativo e exatidão, obtidos na análise de exatidão e precisão do método analítico.....	41
Tabela 3 - Diluições para o preparo dos magnetolipossomas contendo partícula magnética em seu núcleo aquoso.....	50
Tabela 4 - Valor de diâmetro médio da nanopartícula magnética por DRX utilizando a equação de Debye-Scherrer.	56
Tabela 5 - Fração volumétrica do fluido magnético de ferrita de manganês recoberto com dextrana na diluição 1:3 (v/v) em tampão sulfato de amônia pH 3.0 e a concentração do fluido magnético.....	57
Tabela 6 - Dados de SLP para a amostra de FM de ferrita de manganês revestida com dextrana na diluição 1:3 (v/v) em tampão sulfato de amônia pH 3.0 para diferentes campos magnéticos aplicados.	59
Tabela 7 – Diâmetro médio e Pdl dos magnetolipossomas antes e depois da eluição pela coluna de Sephadex G50 preparados com 64mM de fosfolipídios estruturais e na proporção de diluição 1:3 fluido magnético de dextrana para tampão sulfato de amônio pH 3.0.....	63
Tabela 8 – Formulações lipossomais desenvolvidas.	72
Tabela 9 – Valores de diâmetro médio, Pdl e número de partículas dos magnetolipossomas com e sem superfície modificada com ácido fólico. Lipossomas foram preparados com 69mM de fosfolipídios estruturais e na proporção de diluição 1:3 fluido magnético com nanopartículas magnéticas de ferrita de manganês recobertas com dextrana para tampão sulfato de amônio pH 3.0.....	81
Tabela 10 – Determinação de eficiência de encapsulação da doxorubicina nos magnetolipossomas pela técnica de gradiente de pH e íons amônio.....	84
Tabela 11 – Valores de magnetohipertermia de magnetolipossomas com e sem vetorização para o receptor folato e com ou sem a coencapsulação de Doxo.....	87
Tabela 12 – Determinação de eficiência de encapsulação da doxo nos magnetolipossomas pela técnica de gradiente de pH e íons amônio.....	91
Tabela 13 – Valores de tempo e temperatura o ensaio experimental para avaliar a influência da temperatura na atividade biológica das formulações.	96

Tabela 14 – Concentração Inibitória de 50% de melanoma murino B16F10 após exposição às diferentes formulações avaliadas.	102
---	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	NEOPLASIA	16
2.2	TRATAMENTO PARA O CÂNCER.....	16
2.3	DOXORRUBICINA	17
2.4	LIPOSSOMAS.....	18
2.4.1	Métodos de preparo de lipossomas.....	19
2.4.2	Lipossomas de circulação prolongada	21
2.4.3	Lipossomas de superfície modificada.....	23
2.4.4	Formulações lipossomais de doxorubicina aprovadas para aplicação clínica.....	26
2.5	FLUIDO MAGNÉTICO	26
2.5.1	Características Gerais	26
2.5.2	Vetorização de nanopartículas magnéticas.....	30
2.5.3	Magnetohipertermia.....	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	GERAL	32
3.2	ESPECÍFICOS	32
4	OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA DOXORRUBICINA.....	33
4.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1.1	Material.....	33
4.1.2	Equipamentos.....	33
4.1.3	Metodologia analítica para quantificação da doxorubicina	34
4.1.3.1	Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da doxo por espectrofotometria UV-VIS.....	34
4.1.3.2	Método analítico para a quantificação da doxorubicina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência seguindo o guia RDC 166 de 2017	34
4.1.3.3	Seletividade.....	35
4.1.3.4	Linearidade.....	35
4.1.3.5	Limite de quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)	35

4.1.3.6	Precisão e exatidão	35
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.2.1	Determinação dos parâmetros analíticos para quantificação da doxorubicina em lipossomas por CLAE	36
4.2.1.1	Doxorrubicina	36
4.2.1.2	Seletividade	37
4.2.1.3	Linearidade.....	38
4.2.1.4	Limite de quantificação e detecção	39
4.2.1.5	Precisão e exatidão	40
4.3	CONCLUSÃO.....	41
5	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA INCORPORAÇÃO EM MANGNETOLIPOSSOMAS	42
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1.1	Materiais.....	42
5.1.2	Equipamentos.....	42
5.1.3	Método	43
5.1.3.1	Síntese das nanopartículas de ferrita de manganês	43
5.1.3.2	Síntese das nanopartículas de $MnFe_2O_4$ revestidas por citrato	44
5.1.3.3	Recobrimento da partícula magnética por fosfato	44
5.1.3.4	Recobrimento da partícula magnética por dextrana	45
5.1.3.5	Difração de Raios-X	45
5.1.3.6	Magnetometria de amostra vibrante (MAV).....	46
5.1.3.7	Calculo da fração volumétrica de nanopartículas magnéticas.....	47
5.1.3.8	Magnetohipertermia das nanopartículas magnéticas: Teoria de Resposta Linear.....	49
5.1.3.9	Preparação de magnetolipossomas sem o fármaco.....	49
5.1.3.10	Separação das nanopartículas magnéticas não encapsuladas nos magnetolipossomas	51
5.1.3.11	Determinação de tamanho e distribuição de tamanho dos magnetolipossomas sem fármaco.....	53
5.1.3.12	Caracterização dos magnetolipossomas.....	53
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.2.1	Caracterização das nanopartículas magnéticas de ferrita de manganês ($MnFe_3O_4$) pela técnica de difração de Raios-X.....	55

5.2.2	Caracterizações das nanopartículas magnéticas por técnica de magnetometria de amostra vibrante.....	56
5.2.3	Estudo de magnetohipertermia das nanopartículas magnéticas de ferrita de manganês ($MnFe_2O_4$).....	58
5.2.4	Caracterização dos magnetolipossomas.....	60
5.3	CONCLUSÕES.....	67
6	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MAGNETOLIPOSSOMAS CONTENDO DOXORRUBICINA E SUPERFÍCIE MODIFICADA COM ÁCIDO FÓLICO.....	68
6.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
6.1.1	Materiais.....	68
6.1.2	EQUIPAMENTOS.....	68
6.1.3	MÉTODO.....	69
6.1.3.1	Síntese do produto DSPE-PEG(2000)-Ácido Fólico.....	69
6.1.3.2	Caracterização do produto da síntese DSPE-PEG(2000)-AF por FTIR.....	71
6.1.3.3	Preparo dos magnetolipossomas com superfície modificada.....	72
6.1.3.4	Encapsulação da doxorubicina no magnetolipossoma com superfície modificada.....	73
6.1.3.5	Distribuição de tamanho e índice de polidispersão.....	73
6.1.3.6	Nanosight – NTA.....	74
6.1.3.7	Eficiência de encapsulação (EE%).....	75
6.1.3.8	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	76
6.1.3.9	Magnetometria de amostra vibrante e cálculo da fração volumétrica.....	76
6.1.3.10	Magnetohipertermia do magnetolipossoma com superfície modificada.....	76
6.1.3.11	Ensaio de liberação do magnetolipossoma por magnetohipertermia.....	77
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
6.2.1	Caracterização por FTIR do DSPE-PEG(2000)-Ácido Fólico.....	78
6.2.2	Caracterização dos magnetolipossomas contendo doxo e com superfície modificada com ácido fólico.....	80
6.2.3	Eficiência de encapsulação.....	82
6.2.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	84
6.2.5	Magnetometria de amostra vibrante e cálculo da fração volumétrica.....	85
6.2.6	Magnetohipertermia do magnetolipossoma com superfície modificada.....	86
6.2.7	Ensaio de liberação do magnetolipossoma por magnetohipertermia.....	88

6.3	CONCLUSÕES	92
7	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VITRO.....	93
7.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	93
7.1.1	Material.....	93
7.1.2	Equipamento	93
7.1.3	Metodologia	93
7.1.3.1	Linhagem celular e cultivo celular.....	93
7.1.3.2	Avaliação da citotoxicidade pelo método de redução do sal de tetrazólio – MTT.....	93
7.1.3.3	Avaliação de atividade biológica.....	94
7.1.3.4	Avaliação da temperatura.....	96
7.1.3.5	Análise estatística.....	98
7.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
7.2.1	Avaliação de atividade biológica.....	99
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS..... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
9	PUBLICAÇÕES DECORRENTES DO TRABALHO DURANTE O DOUTORADO	107
10	REFERÊNCIAS	109

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das maiores preocupações da saúde pública para o século 21 não só no Brasil, mas no mundo. Estima-se que somente para o biênio 2018-2019 mais de 300 mil novos casos de câncer afetarão a população brasileira, das quais cerca de mais de 6 mil novos casos serão de melanoma. Mas, se considerarmos o câncer de pele não melanoma podemos chegar a 165 mil novos caso de câncer. Este alto índice de câncer se dá, principalmente, pela exposição ao sol, mas também pode estar relacionado à exposição a luz artificial (como exemplo a câmara de bronzeamento) (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2018).

Terapias convencionais do câncer, devido à distribuição e interação não específica do fármaco, apresentam inconvenientes como: efeitos adversos pronunciados, desenvolvimento de resistência ao fármaco pelas células tumorais e, muitas vezes, ineficiência do tratamento (FENG et al., 2007). A escolha de uma estratégia para o tratamento do câncer depende do tipo do tumor, sua localização no corpo e do estágio de desenvolvimento da doença no momento do diagnóstico (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2018).

Os procedimentos mais estabelecidos para o tratamento, até o momento, é a cirurgia em pacientes com câncer localizado e em condições para a intervenção cirúrgica. Estes procedimentos são acompanhados, ainda, da utilização de quimioterapia, com uso dos fármacos já conhecidos e para os diferentes tipos de cânceres, e/ou a radioterapia.

Entretanto, estes procedimentos apresentam muitos efeitos colaterais. Para contornar esta situação, novos fármacos, sistemas de liberação contendo estes agentes têm sido estudados, a fim de se estabelecer novas estratégias para o tratamento das neoplasias. A nanotecnologia tem papel fundamental no desenvolvimento de novos sistemas para a liberação de fármacos no alvo tumoral específicos, melhorando a eficácia terapêutica do fármaco, diminuindo a liberação nos tecidos normais, o que reduz os efeitos adversos e até mesmo tóxicos, além de promoverem liberação controlada dos fármacos nanoencapsulados (MENDES; LIMA; TORCHILIN, 2018)

Para procedimentos temos as terapias térmicas que objetivam a realização de hipertermia em tumores sólidos, promovendo a elevação da temperatura tumoral na faixa de 43 – 46°C em intervalo de 20-30 min. Podem ser realizadas diferentes

técnicas no tratamento térmico: radio frequência (RF) (LAESEKE et al., 2007; LEPETIT-COIFFÉ et al., 2010), por micro-ondas (RHIM, 2004; RYAN; TURNER; HAMILTON, 2010), por ultrassom focalizada de alta intensidade (MALONEY; HWANG, 2015), ou ainda a crioablação (neste caso não se trata de uma aquecimento, mas sim o resfriamento abaixo de -40°C e mantido por alguns minutos) (BAUST et al., 2014). E, um dos procedimentos que têm sido mais pesquisados nos últimos tempos, e tem tido um grande desenvolvimento na área da nanotecnologia nas últimas décadas, é a hipertermia magnética (MH) (ITO; HONDA; KOBAYASHI, 2006; RODRIGUES et al., 2017; WICKI et al., 2015).

Trabalhando com o conhecimento agregado de diferentes áreas, sendo considerada multidisciplinar, a MH faz uso das nanopartículas magnéticas, e propõe perspectiva diferencial para o tratamento tumoral, possibilitando alta eficiência e seletividade no tratamento tumoral (JAIN et al., 2008). Utiliza-se as nanopartículas magnéticas para a geração localizada de calor, e com este calor gerado no local pode-se ter controle sobre a liberação de um fármaco coencapsulado no inteiro do nanocarreador, a exemplo dos lipossomas. Os lipossomas já vêm sendo explorados há alguns anos com o intuito de diminuir os efeitos colaterais e melhorar a eficácia dos medicamentos amplamente utilizados na terapia antitumoral, como exemplo o Doxil[®] (BARENHOLZ, 2012; CHANGES, 1995). O Doxil[®] é uma formulação lipossomal contendo doxorubicina (doxo) em seu interior aquoso. A doxo convencional, quando utilizada por longo período, pode causar cardiotoxicidade aguda, e a encapsulação em lipossomas tem tornado sua ação mais seletiva e com menos efeitos adversos (PAI; NAHATA, 2000).

Sendo assim, a combinação da técnica de MH com nanossistemas tem se mostrado promissora no tratamento de tumores tanto superficiais, quanto de difícil acesso no corpo. Diante disto propomos neste trabalho preparar lipossomas vetorizados para o receptor celular folato, contendo partículas magnéticas coencapsulados em seu interior aquoso com a doxo, e através da magnetohipertermia avaliar a liberação controlada e sítio-específica do fármaco.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEOPLASIA

A neoplasia também conhecido como câncer é o crescimento desordenado das células que invadem os tecidos e órgãos, podendo ser causado por fatores internos e externos. Em geral o fator interno pode ser geneticamente pré-determinado. Já os fatores externos estão ligados ao estilo de vida da pessoa como o tabagismo, a hábitos alimentares como o consumo de muita carne e comida gordurosas e pouca ingestão de vegetais, frutas e fibras, ao alcoolismo e à exposição excessiva ao sol.

É considerado uma das maiores preocupações da saúde pública para o século 21. Segundo o Instituto Nacional de Câncer somente para o biênio de 2018-2019 devem apresentar mais de 580 mil novos casos de câncer no Brasil, sendo que entre os que apresentam maiores incidências estão o câncer de próstata com 22,7% para homens e o de mama com 21,1 % para mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2018).

Dentre as neoplasias com maior incidência temos também o melanoma que é mais raro comparado a outro câncer de pele, se origina dos melanócitos da camada basal da epiderme. Que apesar de representarem apenas 0,9% e 1,2% dos homens e mulheres respectivamente (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2018). Nas mulheres tem-se um aumento devido aos hábitos de exposição solar com maior frequência quando comparado aos homens. Os melanomas são responsáveis por 80% das mortes decorrentes desse tipo de neoplasia (ZHENG et al., 2016).

2.2 TRATAMENTO PARA O CÂNCER

As principais modalidades para o tratamento de neoplasias são cirurgia, radioterapia e quimioterapia. As terapias convencionais apresentam algumas limitações, tais como, a remoção cirúrgica de células saudáveis em torno do tumor para precaver uma reincidência (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2018). Na radioterapia, emprega-se radiações ionizantes, bastante energéticas, ao longo de sessões, num volume de tecido que engloba o tumor, com o intuito de matar as células tumorais com o menor dano possível para as células normais. Porém, devido ao fato de não conseguir se distinguir as células tumorais das saudáveis, a radiação acaba

matando as células saudáveis ao redor do tumor, e causando efeitos secundários indesejáveis (MORENO et al., 2013).

Quando estudamos a quimioterapia apresenta-se como a mais utilizada dentre os tratamentos convencionas onde a partir de um quimioterápico como é o caso da doxorubicina (Doxo), amplamente utilizada no tratamento de diferentes linhagens celulares, procura-se a morte celular das células tumorais. Apesar de ser a mais utilizada apresenta limitações onde devido à rápida eliminação do fármaco resultam, conseqüentemente, numa ação terapêutica com baixa biodisponibilidade. Para contornar esta baixa biodisponibilidade, administram-se concentrações mais elevadas dos fármacos, de modo a garantir que estes atinjam as células alvo. Desta forma elevando assim os níveis de toxicidade e produzindo vários efeitos colaterais indesejáveis ao tratamento. Estes efeitos devem-se a falta de especificidade dos fármacos, que atinge tanto células saudáveis como células tumorais.

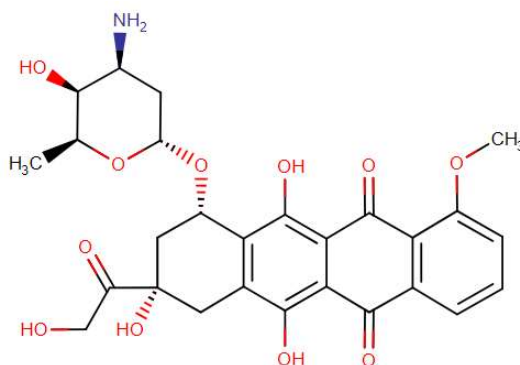
2.3 DOXORRUBICINA

A doxo é uma antraciclina, derivada da daunorrubicina. O efeito antitumoral das antraciclina se dá principalmente pela a sua ação inibidora da topoisomerase II α . Que estabiliza esse complexo, depois de ter quebrado a cadeia de replicação do DNA, conseqüentemente, impedindo a dupla hélice de ser liberada e levando a interrupção do processo de replicação (D'ARPA; LIU, 1989).

As antraciclina possuem um anel quinona, um anel aromático planar e rígido ligado, por uma ligação glicosídica, ao anel amino (Figura 1). Devido a esta estrutura aromática complexa, as antraciclina absorvem luz visível e ultravioleta, o que lhes confere coloração vermelha – alaranjada. O grupo quinona é responsável tanto pelo efeito colateral cardiotoxico quanto pela ação antitumoral das moléculas das antraciclina (ARCAMONE et al., 1997).

Vale ressaltar que a doxo é administrada, na forma de cloridrato, por via endovenosa por possuir baixa absorção por via oral. Possui baixo índice terapêutico, e seu uso é limitado devido à mielossupressão, calvície, náusea aguda, vômito e, principalmente, à cardiotoxicidade cumulativa irreversível (ARCAMONE et al., 1997).

Figura 1 - Estrutura química da doxorubicina.



Fonte: Drugbank - <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00997> acessado em 22-08-18.

A doxo foi originalmente isolada a partir da bactéria *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, na década de 60, e apresenta uma ação terapêutica maior que a daunorrubicina (DOROSHOW et al., 2001). A doxo é usada no tratamento de vários tipos de tumores, incluindo linfomas de Hodgkins e não-Hodgkins, melanomas, sarcoma de ovário, pulmão e mama (BOOSER; HORTOBAGYI, 1994).

Mesmo um fármaco amplamente utilizado apresenta efeitos colaterais na utilização prolongada. Com isto tem-se procurado novas formas alternativas para se minimizar os efeitos colaterais e evitar os diversos incômodos que a administração deste fármaco provoca. Uma alternativa seria a utilização da nanotecnologia para a encapsulação do fármaco diminuindo assim a biodistribuição e tentando a uma maior especificidade do fármaco. Com isto encontrou nos lipossomas, uma promissora resposta a estas dificuldades (ÇAĞDAŞ; SEZER; BUCAK, 2014).

2.4 LIPOSSOMAS

Onde os lipossomas são vesículas esféricas que podem ter o tamanho médio variando de nanômetros a alguns micrometros, podendo ser constituído de uma ou mais bicamadas lipídicas formando um interior aquoso (MARTÍ et al., 1991).

A primeira vez que se teve notícia dos lipossomas foi com Alec Bangham e colaboradores em meados da década de 60, porém só teve relatos de sua utilização como carreadores de fármaco em meados da década de 70 (GREGORIADIS, 1995).

Os lipossomas são formados de bicamadas lipídicas que se assemelham a membrana biológica (VEMURI; RHODES, 1995). São compostas de materiais biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos e não imunogênicos, podendo ser empregados na sua preparação lipídicos sintéticos ou naturais como a fosfatidilcolina de soja (PC) ou de ovo (PE) (GREGORIADIS, 1995; SHARMA et al., 1997). Estas vesículas lipídicas têm sido utilizadas como eficientes carreadoras de fármacos.

Devido a característica bifásica, os lipossomas podem agir como carreadores de fármaco hidrofílicos ou lipofílicos. Dependendo da solubilidade e das características de partição, os fármacos podem ficar localizadas em diferentes regiões nos lipossomas, na interface lipídeo meio aquoso, na da bicamada, ou no interior aquoso da vesícula (BARENHOLZ, 2001).

Mesmo sua composição se assemelhando a das membranas biológicas, os lipossomas podem se apresentar como agentes estranhos para o sistema mononuclear fagocitário, resultando assim na sua rápida opsonização e eliminação do organismo (OLUSANYA et al., 2018). Afim de se contornar esta opsonização, uma maneira de se aumentar a meia vida dos lipossomas na circulação é através da modificação da membrana fosfolipídica acrescentando polímeros hidrofílicos como o polietilenoglicol (PEG), fazendo com que os lipossomas fiquem “invisíveis” ao sistema imunológico (MENDES; LIMA; TORCHILIN, 2018).

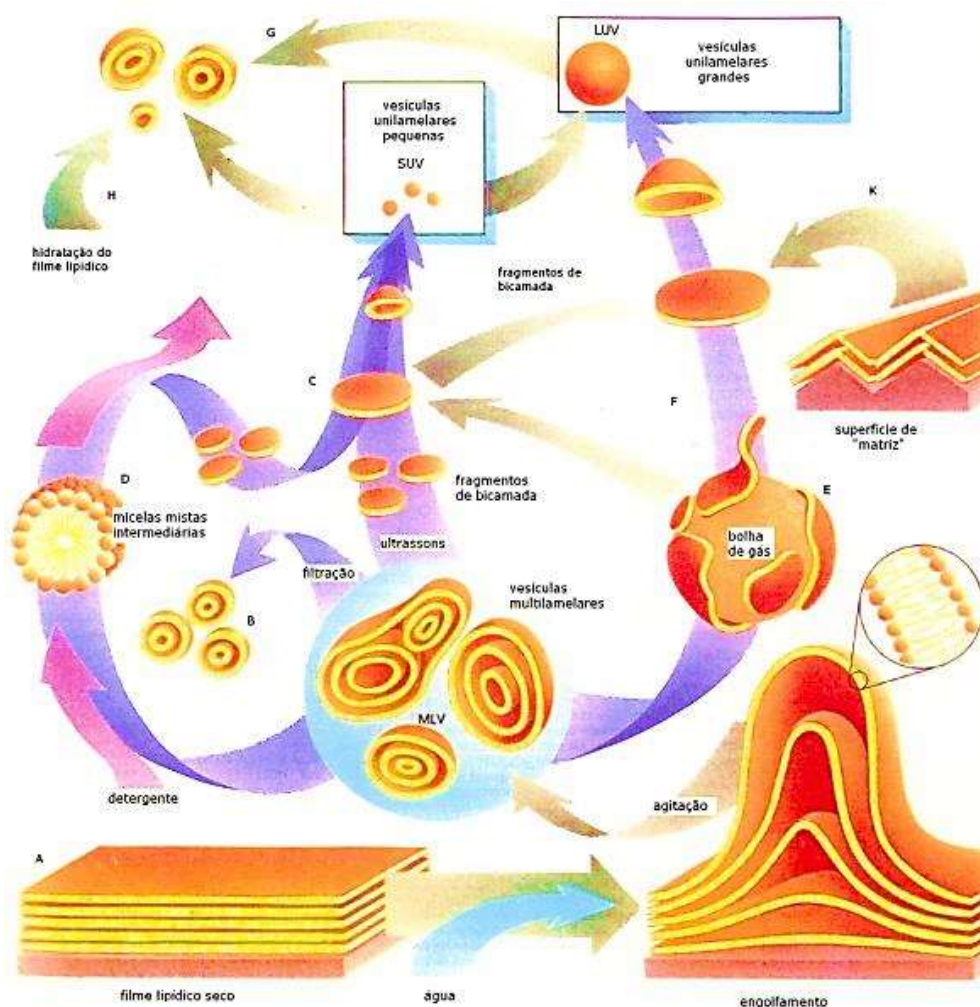
2.4.1 Métodos de preparo de lipossomas

Dentre os métodos preconizados para o preparo de formulações lipossomais estão: injeção de solvente, hidratação de filme lipídico seguido de sonicação ou extrusão, injeção de clorofórmio, entre outros. Estas técnicas possibilitam a obtenção de lipossomas com diferentes tamanhos e características (SHARMA; SHARMA, 1997).

Dentre os mais utilizados está o método de hidratação do filme lipídico, que é um método simples para a obtenção de lipossomas multilamelares. Nesta técnica, o filme lipídico é hidratado com tampão aquoso, em temperatura acima da temperatura de transição de fase do lipídio. Pode ser incorporado os fármacos hidrofílicos no

momento de hidratação do filme, juntamente com o tampão aquoso, ou durante o preparo do filme lipídico, para fármacos lipofílicos (representação esquemática para a hidratação do filme lipídico é apresentado na Figura 2) (GREGORIADIS, 1995; SHARMA; SHARMA, 1997).

Figura 2 - Representação esquemática do preparo de lipossomas pelo método de hidratação de filme lipídico.



Fonte: Adaptado de <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/liposome-preparation.html>.

Depois do método de hidratação são produzidas populações heterogêneas de vesículas multilamelares, que após passarem pelo processo de extrusão, através de membranas de policarbonato, originam vesículas unilamelares pequenas (HOPE et al., 1985; MAYER; HOPE; CULLIS, 1986).

2.4.2 Lipossomas de circulação prolongada

Após a administração dos lipossomas não peguilados *in vivo*, proteínas, conhecidas como opsoninas, são adsorvidas na superfície dos lipossomas, pelo processo de opsonização, que aumentam o reconhecimento dos lipossomas pelo sistema mononuclear fagocitário. Esta ação leva a rápida eliminação dos sistemas da circulação sanguínea (KHAWAR; KIM; KUH, 2015).

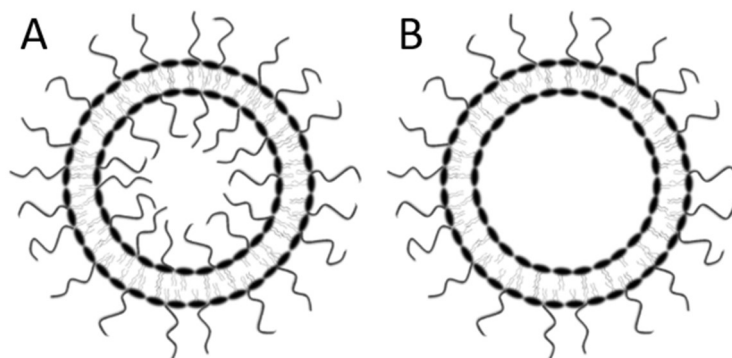
Afim de se contornar esta opsonização, uma maneira de se aumentar a meia vida dos lipossomas na circulação é através da modificação da membrana fosfolipídica acrescentando polímeros hidrofílicos como o polietilenoglicol (PEG), ou então polímeros já acoplados ao lipídio, a exemplo do diestearoil fosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀), fazendo com que os lipossomas fiquem “invisíveis” ao sistema imunológico podendo vir a ficar mais tempo em circulação (MENDES; LIMA; TORCHILIN, 2018).

A incorporação do PEG na superfície dos lipossomas aumenta sua hidrofiliabilidade fazendo com que interações entre as células do sistema mononuclear fagocitário sejam reduzidas. Ao adsorver PEG na superfície dos lipossomas cria-se um efeito estérico, o que evita a adsorção das opsoninas. O efeito estérico pode ser obtido com a concentração na faixa de 4 a 10 %mol de lipídios que irão compor a estrutura lipossomal, enquanto que quantidades superiores de 15 a 20 %mol promovem a perda da estabilidade da vesícula lipossomal (BARENHOLZ, 2001).

Para a incorporação do lipídio peguilado nos lipossomas utiliza-se das técnicas de pré-inserção ou pós-inserção (NAKAMURA et al., 2012a; SAUL et al., 2003; USTER et al., 1996), como apresentado na Figura 2. Na pré-inserção o lipídio peguilado é incorporado no preparo do filme lipídico antes da hidratação com a fase aquosa. A parte hidrofóbica da molécula do lipídio peguilado se insere na bicamada lipídica e a parte hidrofílica se posiciona na fase aquosa. Por esta técnica é possível que o lipídio peguilado esteja tanto no interior quanto no exterior (Figura 3A). Apesar deste método ser relativamente simples, apresenta algumas desvantagens atribuídas ao método de pré-inserção. Primeiramente, este método requer uma quantidade excessiva de lipídios peguilados, aumentando assim a viscosidade do lipossoma, dificultando a sua extrusão (NAKAMURA et al., 2012b). Segundo, devido a

encapsulação no interior do lipossoma, a modificação da membrana interna não é desejada, pois, além de ocupar o espaço interno do lipossoma, não contribui para a estabilidade estérica dos mesmos (AWASTHI et al., 2004; SZLEIFER; GERASIMOV; THOMPSON, 1998).

Figura 3 - Representação esquemática de pré-inserção (A) e pos-inserção (B) do lipídio peguilado.



Fonte: Adaptado de (NAG; AWASTHI, 2013).

Para se resolver os problemas apresentados na pré-inserção na incorporação do PEG à bicamada lipídica, uma técnica de inserção na bicamada lipídica em lipossomas já pré-formados foi desenvolvida. Esta técnica é conhecida como pós-inserção (Figura 3B). A partir de uma formulação de lipossomas pré-formados, faz-se a adição do PEG ligado ao lipídio à formulação na temperatura próxima à transição de fase dos lipídios constituintes (NAKAMURA et al., 2012b). Este processo de inserção é espontâneo, ocorrendo através da interação hidrofóbica dos lipídios da membrana com a parte hidrofóbica dos lipídios peguilados. Assim, diferente da pré-inserção onde se tinha lipídios peguilados na parte interna dos lipossomas, por este método os lipídios peguilados se distribuem apenas na parte externa, como apresentado no esquema da Figura 3B, mantendo todas as propriedades do lipídio peguilado.

A aplicabilidade dessas formulações para tratamento do câncer tem sido demonstrada por diferentes estudos. Um exemplo de maior sucesso foi o desenvolvimento do produto Doxil[®] (BARENHOLZ, 2012), que é uma formulação lipossomal composta de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol (Col) e DSPE-PEG₂₀₀₀ (na razão molar 55:40:5, respectivamente). Estudos pré-clínicos demonstraram maior atividade do Doxil[®] contra tumores de mama, ovário e melanoma

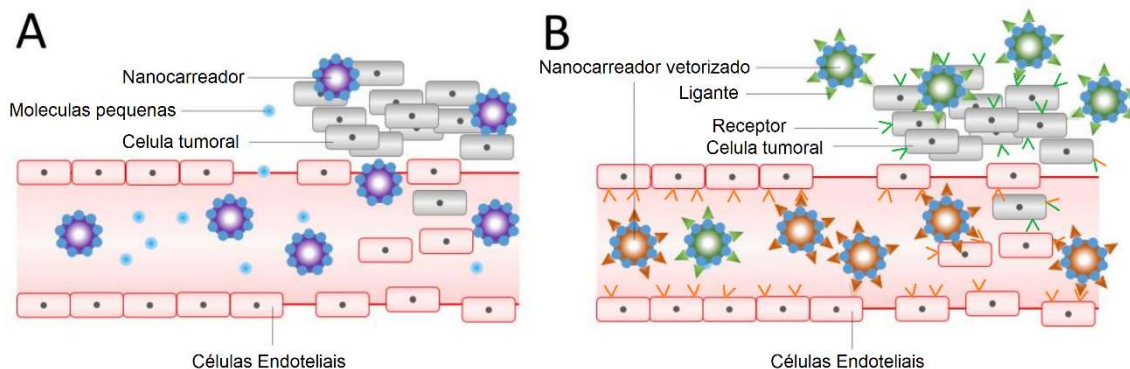
humanos. Após a administração do Doxil[®] os níveis do fármaco na região tumoral apresentaram picos entre 3 e 7 dias após a administração, o que significa que a exposição ao fármaco nas células tumorais é maior quando comparado com a doxo livre (BARENHOLZ, 2012). Nos estudos clínicos, o Doxil[®] apresentou menor clearance plasmático (0,1 L/h para o Doxil[®] e 45 L/h para a doxo livre) e menor volume de distribuição (4 L para Doxil[®] e 200 L para a Doxo livre) (GABIZON; SHMEEDA; BARENHOLZ, 2003). Esse medicamento é, atualmente, aprovado pelo FDA e pela Agência Reguladora de Medicamentos Europeia (EMA) para o tratamento de sarcoma de Kaposi e câncer de ovário.

Apesar de aumentar o tempo de circulação dos lipossomas, estes ainda apresentam rápida eliminação sanguínea e dificuldades para atingirem as regiões tumorais, com isso, novas estratégias podem ser associadas para o aumento do efeito terapêutico (SAUL et al., 2003). Dentre essas estratégias, podem-se destacar a modificação da superfície lipossomal com ligantes para tecidos ou estruturas específicas das regiões tumorais.

2.4.3 Lipossomas de superfície modificada

A modificação da superfície lipossomal é baseada na conjugação de ligantes em sua superfície o que permite a interação específica com receptores ou antígenos presentes nas células tumorais (Figura 4B) (FORSSSEN; WILLIS, 1998; VAN DER MEEL et al., 2013), como representado de forma esquemática Figura 4. Além disso, as moléculas-alvo devem estar ausentes ou minimamente expressas em tecidos ou estruturas celular sadias. A utilização de vitaminas, anticorpos, fragmentos de anticorpos, pequenas moléculas, peptídeos como ligantes têm demonstrado induzir vetorização de nanopartículas para a região tumoral (OLUSANYA et al., 2018; WU et al., 2014).

Figura 4 - Representação esquemática de lipossomas de circulação prolongada (A) e lipossomas de superfície modificada (B).

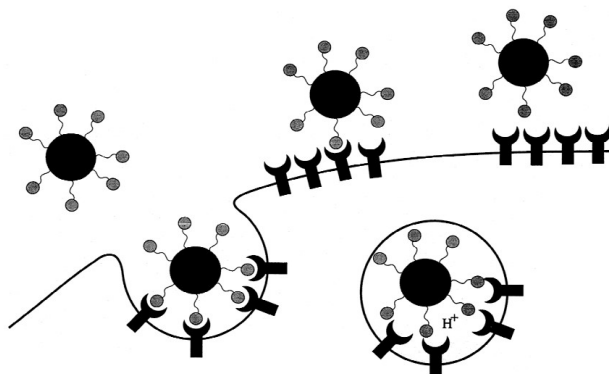


Fonte: Adaptado de (OLUSANYA et al., 2018).

Com este tipo de vetorização, combinando a possibilidade do nanossistemas de carrear fármacos antitumorais, espera-se maior eficiência e especificidade do fármaco e uma maior concentração nas células alvo (GAZZANO et al., 2018; PERES-FILHO et al., 2017).

A seleção do receptor ou antígeno celular apropriado é crucial para o desenvolvimento de nanopartículas vetorizadas. O direcionamento baseia-se, portanto, em biomarcadores com expressão modificada ou explorar processos associados com o desenvolvimento tumoral como a captura aumentada de nutrientes. Com base nisto, um conjugado ligado ao ácido fólico, pode ser endocitado para o interior celular quando ocorrer a ligação ao receptor folato na superfície celular (Figura 4). Com o endossomo formado, o fármaco pode ser liberado sobre ação do pH e lisozimas no interior do endossomo. O receptor folato, é liberado do conjugado, retornando a membrana celular para começar novamente uma nova ligação (Figura 5) (MOHANTY et al., 2011).

Figura 5 - Representação esquemática da endocitose via receptor folato de nanopartículas vetorizadas.



Fonte: Adaptado de (SUDIMACK; LEE, 2000).

A literatura apresenta alguns exemplos de vetorização por superfície modificada apresentando estudos *in vitro* e *in vivo*. Lipossomas vetorizados para o receptor folato contendo doxo conjugada com óxido nítrico apresentaram redução tumoral maior quando comparado a lipossomas não vetorizado em teste *in vivo*, realizados com linhagem celular de câncer de mama de camundongo (TUBO) com alta expressão para o receptor folato (GAZZANO et al., 2018).

Chen et al (2017) utilizando nanogel encapsulando doxo e vetorizado para o receptor folato apresentaram citotoxicidade aumentada quando utilizando a vetorização para células tumorais que expressam o receptor folato. Neste estudo, compararam a vetorização para duas linhagens celulares tumorais B16F10, que expressa o receptor folato, e A549 que não expressa o receptor folato. Para a célula tumoral B16F10 foi observado maior citotoxicidade quando se utilizou nanogel com vetorização, e quando se estudou a célula tumoral A549 não apresentou diferença estatística na análise dos resultados para os nanogéis com e sem vetorização. Foi demonstrado, então, que a vetorização depende se a célula apresenta alta ou baixa sinalização para o receptor folato (CHEN et al., 2017).

Pode ser citado ainda outra maneira diferente de se vetorizar para o receptor folato, Wu et al (2014) utilizando nanopartículas de PLGA encapsuladas com doxo e utilizando a vetorização para o receptor folato acoplado a nanopartícula, estudou *in vivo* os efeitos terapêuticos da doxo frente a vetorização para a linhagem celular de carcinoma humano (células KB) como modelo. Observou-se aumento significativo

quando comparado às nanopartículas não vetorização, diminuindo o volume do tumor para a formulação de nanopartículas vetorizadas para o receptor folato (WU et al., 2014).

2.4.4 Formulações lipossomais de doxorrubicina aprovadas para aplicação clínica

Em 1995 foi aprovado para uso terapêutico pelo FDA (U.S. Food & Drug Administration) o primeiro lipossoma para uso terapêutico contendo a doxo, Doxil[®], que é um lipossoma peguilado. Em 1996 na União Europeia foi aprovada o Caelyx[®], também um lipossoma peguilado. Posteriormente foi aprovado na União Europeia o Myocet[™], um lipossoma não peguilado contendo doxo. Somente em 2010 após a patente do Doxil[®] expirar que foi-se ter o primeiro lipossoma com doxo genérico sendo produzido, o Nudoxa[®] (BARENHOLZ, 2012; OLUSANYA et al., 2018). E, mais recente, em 2017, tem sido realizado estudos clínicos, em fase 3, com um novo lipossoma termicamente ativado, ThermoDox, um lipossoma peguilado que para ativar a liberação do fármaco na região tumoral é ativado por: ablação por radiofrequência (RFA) ou por hipertermia por micro-onda (WICKI et al., 2015).

2.5 FLUIDO MAGNÉTICO

2.5.1 Características Gerais

O fluido magnético é uma suspensão coloidal estável de nanopartículas magnéticas (NPM), com diâmetro da ordem de 5 – 30 nm dispersas em líquido, podendo ser um fluido polar (como a água) ou apolar (como óleo mineral ou vegetal). As nanopartículas magnéticas podem ser compostas, principalmente, de ferritas (como as magnetitas (Fe_3O_4), maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)) (MORAIS et al., 2005) e, devido sua dimensão reduzida, podem ser modelada matematicamente como monodomínios magnético e sua resposta à aplicação de um campo magnético externo, ou seja, a sua curva de magnetização é superparamagnético (com ausência de campo coercitivo) (ROSENSWEIG, 1985).

Em geral, na preparação do fluido magnético, a estabilidade coloidal é obtida por dois mecanismo físicos: a repulsão eletrostática e/ou a repulsão estérica que se

contrapõem à atração dipolar magnética e de Van der Waals existente entre as nanopartículas (ROSENSWEIG, 1985).

A energia de interação van der Waals entre duas partículas magnéticas esféricas idênticas é dada por (HAMAKER, 1937)

$$U_V = -\frac{A}{6} \left[\frac{2}{s^2 - 4} + \frac{2}{s^2} + \ln \left(\frac{s^2 - 4}{s^2} \right) \right] \quad \text{Equação 1}$$

onde A é o coeficiente de Hamaker e $s = 2(x/d + 1)$ com x sendo a distância entre as superfícies das partículas e d o diâmetro de cada partícula. O coeficiente de Hamaker, por sua vez, depende das propriedades da partícula magnética e do solvente no qual está suspensa podendo ser escrito por

$$A = \frac{3}{4} k_B T \left(\frac{\varepsilon_p - \varepsilon_s}{\varepsilon_p + \varepsilon_s} \right)^2 + \frac{3h\nu_C(n_p^2 - n_s^2)}{16\sqrt{2}(n_p^2 - n_s^2)^{2/3}} \quad \text{Equação 2}$$

onde ε_p é a constante dielétrica da partícula, ε_s é a constante dielétrica do solvente, h a constante de Plank, ν_C é a frequência característica de absorção, n_p o índice de refração da partícula e n_s é o índice de refração do solvente. A interação à distância, no limite de partículas muito próximas, é proporcional a x^{-1} e proporcional a x^{-6} quando distantes uma da outra.

A energia de interação por van der Waals é considerada uma energia atrativa. Já a interação dipolar magnética entre duas partículas depende tanto da posição quanto da orientação de seus momentos magnéticos e pode ser considerada uma energia sendo atrativa e repulsiva (ROSENSWEIG, 1985), sendo dada por

$$U_d = \frac{\mu_0}{4\pi} \left[\frac{\vec{\mu}_i \cdot \vec{\mu}_j}{r^3} - \frac{3(\vec{\mu}_i \cdot \hat{r})(\vec{\mu}_j \cdot \hat{r})}{r^5} \right] \quad \text{Equação 3}$$

Com $\mu = \frac{\pi}{6} M_s d^3$ sendo o módulo do momento magnético de uma nanopartícula magnética, M_s a magnetização de saturação da amostra e μ_0 a permeabilidade magnética do meio e r sendo a distância entre o centro de duas partículas magnéticas.

Dependendo da orientação das partículas magnéticas pode-se favorecer a formação de aglomerados. Portanto, faz-se necessário introduzir de alguma forma interações repulsivas entre partículas. Isto pode ser feito através de repulsão estérica, repulsão eletrostática ou uma combinação das duas.

Na repulsão estérica o fluido magnético que utiliza deste mecanismo para se manter em suspensão é denominado, em geral, surfactado (representado na Figura 6A). A repulsão entre duas partículas esféricas idênticas é dada por (ROSENSWEIG, 1985)

$$\frac{U_{re}}{k_B T} = \begin{cases} \frac{\pi d^2 \xi}{2} \left[2 - \frac{l+2}{t} \ln \left(\frac{1+t}{1+l/2} \right) - \frac{l}{t} \right]; & \text{se } x \leq 2\delta \\ 0 & ; \text{ se } x > 2\delta \end{cases} \quad \text{Equação 4}$$

Com $l = 2x/d$ e $t = 2\delta/d$ sendo δ a espessura da camada de cobertura. Na equação acima, ξ é um parâmetro chamado de *grafting* que descreve a densidade superficial de moléculas absorvidas na superfície da nanopartícula.

Já fluidos magnéticos que utilizam a repulsão eletrostática como mecanismo de estabilidade para a suspensão coloidal é denominado iônico e caracterizam-se pela presença de uma densidade de cargas em torno da superfície das partículas. Apresentam em torno da superfície da nanopartícula uma dupla camada elétrica, que se caracteriza por duas regiões distintas, uma adsorvida na superfície da partícula magnética e outra formada por contra-íons, formando uma camada iônica (representado na Figura 6B) (ROSENSWEIG, 1985).

A interação eletrostática entre duas partículas idênticas com dupla camada elétrica pode ser descrita como

$$U_{el} = 4\varepsilon_{liq}d^2 \left(\frac{k_B T}{q} \gamma \right)^2 \frac{e^{-\kappa(r-d)}}{r}$$

Equação 5

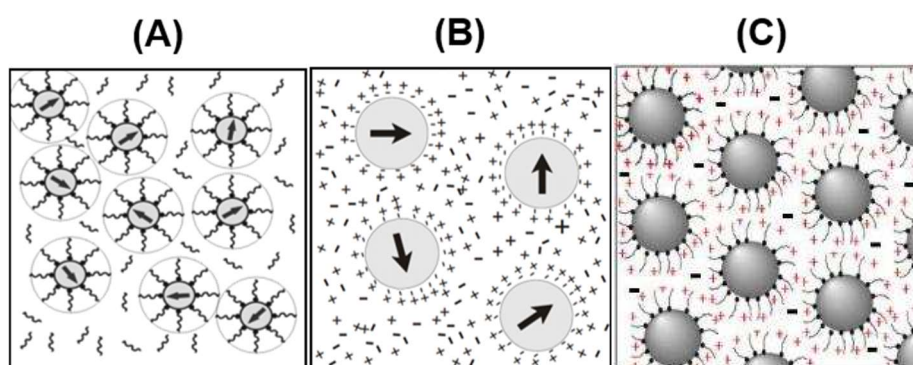
$$\gamma = \tanh\left(\frac{q\Psi_s}{4k_B T}\right)$$

onde ε é a permissividade do liquido carreador, q a carga do contra-íon da dupla camada elétrica, k o inverso do raio de Debye, Ψ_s é o potencial de Stern (Potencial Zeta), r sendo a distância entre o centro de duas partículas magnéticas e d o diâmetro de uma partícula magnética (ROSENSWEIG, 1985).

A Figura 6 é uma representação esquemática dos diferentes tipos de repulsão para as partículas magnéticas em meio carreadores e com diferentes revestimentos.

Na Figura 6A é um fluido magnético surfactado onde se adsorve na superfície da NPM uma camada molecular surfactante que pode ter funcionalização, na Figura 6B é um fluido magnético iônico, que cria uma densidade superficial de cargas elétricas envolta da NPM dando a estabilidade coloidal ao fluido magnético e a Figura 6C é um fluido magnético iônico-surfactado, onde ambas as estratégias são empregadas na estabilidade coloidal.

Figura 6 - Representação esquemática dos diferentes tipos de repulsão para as partículas magnéticas. (A) dispersa em solvente apolar, com uma camada de surfactante de cobertura (FM surfactado), (B) dispersão em solvente polar (pH>7), onde o meio basico ocasiona uma distribuicao superficial de cargas logo os contra-íons da solucao são atraídos formando a dupla camada iônica (FM iônico) e (C) dispersão em solvente polar, mas com recobrimento da NPM por uma molecula polar (FM iônico-surfactado).



Fonte: Adaptado de (RODRIGUES, 2017)

2.5.2 Vetorização de nanopartículas magnéticas

Desde quando Freeman em 1960 (FREEMAN; ARROTT; WATSON, 1960) propôs que partículas finas de ferro podem ser transportadas pelo sistema vascular e se concentrarem em uma região específica do corpo com o auxílio de um campo magnético externo, o uso de nanopartículas magnéticas tem sido estudada para a entrega controlada de fármacos ou anticorpos em um sítio específico (ASÍN et al., 2012; CHEN; BOSE; BOTHUN, 2010; PRADHAN; SRIVASTAVA; BAHADUR, 2014).

O direcionamento magnético se baseia na atração das nanopartículas magnéticas por um gradiente de campo magnético externo. Os nanossistemas fármaco/carreador deve ser injetado via intravenosa ou arterial, e garantir que os nanossistemas não sejam rapidamente retirados de circulação pelo sistema fagocitário, um campo magnético externo aplicado na região alvo desejado a concentrar o fármaco. O agente terapêutico pode ser então liberado via enzimática ou através de mudanças fisiológicas tais como pH, osmolaridade e/ou magnetohipertermia (ALEXIOU et al., 2000).

Zhang et al. (2005) conseguiram demonstrar que magnetolipossomas podem ser direcionados para uma região tumoral com ajuda de um campo magnético externo, aumentando a eficácia do fármaco antitumoral e promovendo a diminuição dos efeitos tóxicos do fármaco quando administrado de forma livre (ZHANG et al., 2005). Dandamudi e Campbell (2007) usando magnetolipossomas catiônicos mostraram ser capazes de acumular uma maior retenção na região tumoral com a aplicação de um campo externo (DANDAMUDI; CAMPBELL, 2007).

2.5.3 Magnetohipertermia

A magnetohipertermia (MH) com nanopartículas magnéticas (NPM) consiste no aumento da temperatura das NPM (centros de calor) como consequência da interação dos seus momentos de dipolo magnéticos com um campo magnético alternado (LAURENT et al., 2011). A dissipação de energia térmica por perda histórica depende do tamanho, da magnetização, da anisotropia, da polidispersão (propriedades intrínsecas da constituição das NPM), e pode ocorrer através do mecanismo de relaxação de Néel (BROWN, 1979, 1963; NÉEL, 1950) (com a rápida reorientação da magnetização, dentro dessa partícula magnético, sem a rotação da mesma), assim

como pelo aquecimento friccional devido à rotação física das NPM (mecanismo de relaxação browniano) (FRENKEL, J., 1955; SHLIOMIS, 1974). Estes fenômenos ocorrem em função da frequência e amplitude de excitação periódica de um campo magnético alternado externamente aplicado.

A ideia de usar magnetohipertermia para o tratamento do câncer não é nova, o cirurgião Robert Gilchrist *et al.* (no St. Luke's Hospital, Chicago, Illinois) publicaram em 1957 resultados de um estudo pioneiro com cães que apresentavam carcinoma colorretal metastático (GILCHRIST *et al.*, 1957). Foi utilizado nanopartículas magnéticas de diâmetro na faixa de 0,02 – 0,1 μm . Foram realizadas injeções nos tecidos subcutâneo e subperitoneal, na expectativa de que as nanopartículas pudessem acumular nos linfonodos com células metastáticas. Após a retirada dos tumores foi aplicado campo magnético *ex vivo* na faixa de 200 – 240 Oe e frequência 1,2MHz promovendo um aumento de 14°C por três minutos. Concluíram que a concentração no tecido a ser tratado, o desempenho de aquecimento e o tamanho das NPM eram inadequadas para o proporcionar o aquecimento suficiente para o tratamento.

Com base nestes resultados pode se identificar as possíveis dificuldades de implementação definitiva do procedimento de MH com NPM.

A fim de se ter elucidação de como podemos contornar estas questões a vetorização para um sítio alvo através de nanossistemas contendo NPM encapsuladas dentro de um lipossoma vetorizado tem ganhado bastante interesse de pesquisa para se contornar as eventuais dificuldades de se atingir o tumor (CHANG *et al.*, 2018; HUANG; LOVELL, 2017).

Uma vez que combater o processo da neoplasia é tão complexo quanto a própria doença, neste trabalho buscou-se combinar pelo menos três estratégias distintas para a obtenção de um nanocarreador multifuncional: a vetorização para o receptor folato de magnetolipossomas coencapsulando doxorubicina afim de se alcançar melhor resposta antitumoral.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Preparar lipossomas alvo-específicos, direcionados ao receptor de superfície celular para ácido fólico, contendo doxorubicina e nanopartículas magnéticas coencapsuladas e avaliar a atividade antitumoral em modelos in vitro.

3.2 ESPECÍFICOS

- Obter fluido magnético com partículas magnéticas de ferrita de manganês com diferentes camadas de cobertura e caracterizar quanto ao tamanho das partículas por difração de Raios-X, concentração do fluido e quantificar a potência específica dissipada das NPM e do fluido magnético quando aplicado campo magnético AC;
- Obter lipossomas contendo partículas magnéticas de ferrita de manganês pela técnica de gradiente de pH e íons. Caracterizar quanto ao tamanho dos lipossomas, índice de polidispersão, fração volumétrica de partículas magnéticas encapsuladas nos lipossomas e quantificar a potência específica dissipada da formulação lipossomal quando aplicado campo magnético AC;
- Obter lipossomas peguados com partículas magnéticas e coencapsulando doxorubicina. Caracterizar quanto a eficiência de encapsulação, tamanho dos lipossomas, índice de polidispersão, fração volumétrica das partículas magnéticas;
- Obter lipossomas alvo específicos para o receptor folato com partículas magnéticas e coencapsulando doxorubicina. Caracterizar quanto a eficiência de encapsulação, tamanho dos lipossomas, índice de polidispersão, fração volumétrica das partículas magnéticas;
- Avaliar a citotoxicidade dos lipossomas sobre células de melanoma da linhagem B16F10;

4 OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA DOXORRUBICINA

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Material

Doxorrubicina (pureza >99%, LC Laboratories, USA), ácido trifluoracético (TFA)(Sigma-Aldrich®, Brasil), fosfatidilcolina de soja (LIPOID®, Alemanha), colesterol (Sigma-Aldrich®, Brasil), Diesteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)-2000] – DSPE-mPEG-(2000) (Avanti Polar Lipids®, EUA), 1,2-diesteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[folato(polietilenoglicol)-2000] – DSPE-mPEG-(2000)-AF (sintetizado no laboratório), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico - HEPES (>99,5%, Sigma-Aldrich®, Brasil), acetonitrila e metanol (J.T.Baker, grau HPLC, EUA), filtro de seringa 0,45 µm (Millex®, Merck, Alemanha), água ultra pura Milli-Q (Milli-Q, Merck, Alemanha). Todos os outros solventes utilizados foram grau analítico.

4.1.2 Equipamentos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), marca Varian Pro Star, módulos: Sistema de injeção automático- 410; Bomba quaternária- 240; Detector UV-Visível- 310;
- Coluna zorbax SB-C18 (250x4,6mm) 5µm, marca Agilent, EUA;
- Balança analítica, modelo AG-200, marca: Gehaka, Brasil;
- Agitador tipo vórtex, modelo AP-56, marca: Phoenix;
- Agitador magnético, modelo TE-085, marca: Tecnal, Brasil;
- Centrifuga, modelo mini spin plus®, marca: Eppendorf, Alemanha;
- Evaporador rotativo, modelo RV 10, marca: IKA®, Alemanha;
- Extrusor, marca: Northen Lipids, Canadá;
- Bomba a vácuo, modelo TE-0581, marca: Tecnal, Brasil;
- pHmetro digital, modelo pg1800, marca: Gehaka, Brasil;
- Centrifuga, modelo mini spin plus, marca: Eppendorf, Alemanha;
- Sistema de purificação de água MiliQ, modelo Direct 8, marca MiliQ, EUA;

- Chapa aquecedora, modelo C-Mag HS7, marca: IKA®, Alemanha;
- Espectrômetro 640-IR (Varian, EUA).

4.1.3 Metodologia analítica para quantificação da doxorubicina

4.1.3.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da doxo por espectrofotometria UV-VIS

Para se obter o valor máximo de absorção para a doxo foi realizada varredura de uma solução de Doxo em metanol (0,01 mg/mL), em espectrofotômetro UV-VIS (Espectrômetro 640-IR, Varian, EUA), no intervalo de comprimento de onda de 200 a 800 nm.

4.1.3.2 Método analítico para a quantificação da doxorubicina por Cromatografia Líquido de Alta Eficiência seguindo o guia RDC 166 de 2017

A quantificação da doxorubicina foi obtida por cromatografia líquido de alta eficiência (CLAE) e detecção por UV-Vis. Foram realizadas diferentes composições de fase móvel e fluxo com base em métodos analíticos encontrados na literatura (AL-ABD et al., 2009; BERMINGHAM et al., 2010; DHARMALINGAM et al., 2014; URVA et al., 2009).

As análise para a quantificação da doxo foram realizadas em equipamento cromatógrafo (Varian Pro Star), com sistema de injeção automático modelo 410, bomba quaternária modelo 240 e detector UV-Visível modelo 310 (Varian Pro Star). A separação cromatográfica foi realizada em coluna Sele A fase móvel escolhida foi constituída pela mistura acetonitrila:água acidificada com ácido trifluoracético (TFA) 1% na proporção volumétrica de 38:62, respectivamente. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL, com tempo de corrida de 7 minutos, sendo mantida a velocidade de fluxo da fase móvel igual a 1,0 mL/min. Foi utilizado o comprimento de onda de absorção máxima da Doxo que foi obtido pelo espectrofotômetro UV-Vis.

O método foi validado segundo a RDC n° 166 de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017).

4.1.3.3 Seletividade

Lipossomas sem doxo (brancos) e lipossomas brancos contendo partícula magnética em seu interior foram produzidos de forma a avaliar a performance do método em quantificar o fármaco na presença dos componentes da formulação lipossomal.

Uma alíquota (200 μ L) de cada uma das dispersões lipossomais foi diluída em 2000 μ L de metanol, submetida a agitação em vórtex por 2 minutos e, em seguida, centrifugada e filtrada em filtro de seringa 0,45 μ m (Millex[®]).

Posteriormente, foram analisadas as amostras nas mesmas condições cromatográficas descritas para o fármaco. A solução de Doxo também foi analisada, separadamente, na concentração de 50 μ g/mL.

4.1.3.4 Linearidade

Foram preparadas curvas analíticas, em triplicata, para a análise de soluções de doxorubicina nas concentrações de 1, 2, 5, 10, 20 e 50 μ g/mL, preparadas em metanol. O desvio padrão relativo entre as áreas dos picos foi calculado e o coeficiente de correlação (r) da curva foi determinado.

4.1.3.5 Limite de quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)

Os limites de quantificação e detecção foram avaliados experimentalmente pela análise de soluções com concentrações decrescente de Doxo (2 a 0,25 μ g/mL), em metanol, preparadas em quintuplicata. O LQ foi estabelecido como sendo a menor concentração em que o desvio padrão relativo entre as replicatas foi menor que $\pm 5\%$ em relação à concentração teórica. O LD foi estabelecido como sendo o menor valor da concentração detectada, sem precisão e exatidão (desvios maiores que $\pm 5\%$).

4.1.3.6 Precisão e exatidão

A partir dos valores obtidos na curva de linearidade foram preparadas 3 concentrações (baixa, média e alta) em triplicata. Para se avaliar a precisão e exatidão, o ensaio foi feito em triplicata. Para o método ser considerado exato a média das replicatas deve estar entre 95,0 e 105,0% e o desvio padrão relativo entre elas deve ser menor que $\pm 5\%$.

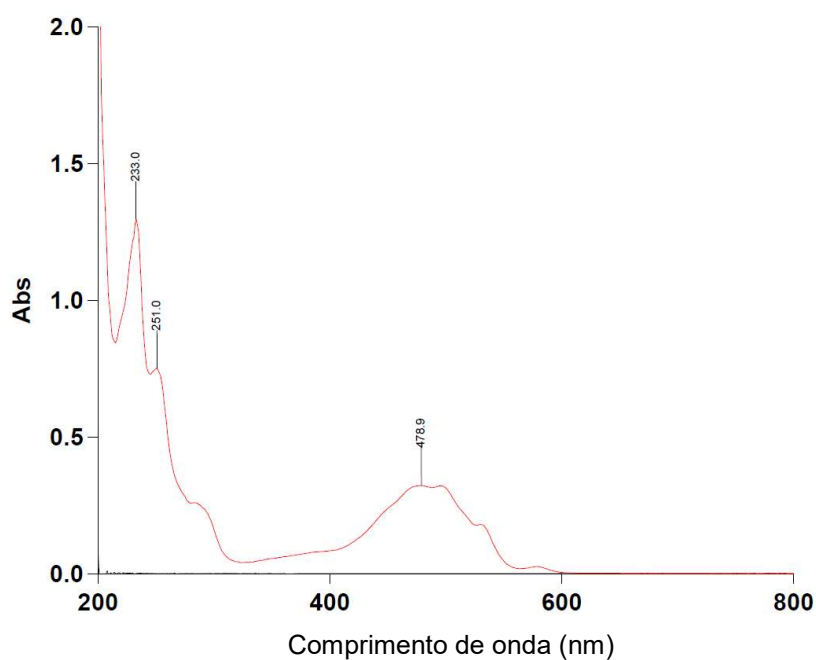
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Determinação dos parâmetros analíticos para quantificação da doxorubicina em lipossomas por CLAE

4.2.1.1 Doxorubicina

A doxo apresentou máxima absorção no comprimento de onda de 233 nm (Figura 7), estando de acordo com o valor encontrado por Dharmalingam (2014). O comprimento de onda de 233 nm foi utilizado para a quantificação da Doxo nas análises posteriormente realizadas.

Figura 7 - Espectro de varredura de absorção no UV/VIS da solução de doxo a 0,01 mg/mL em metanol.



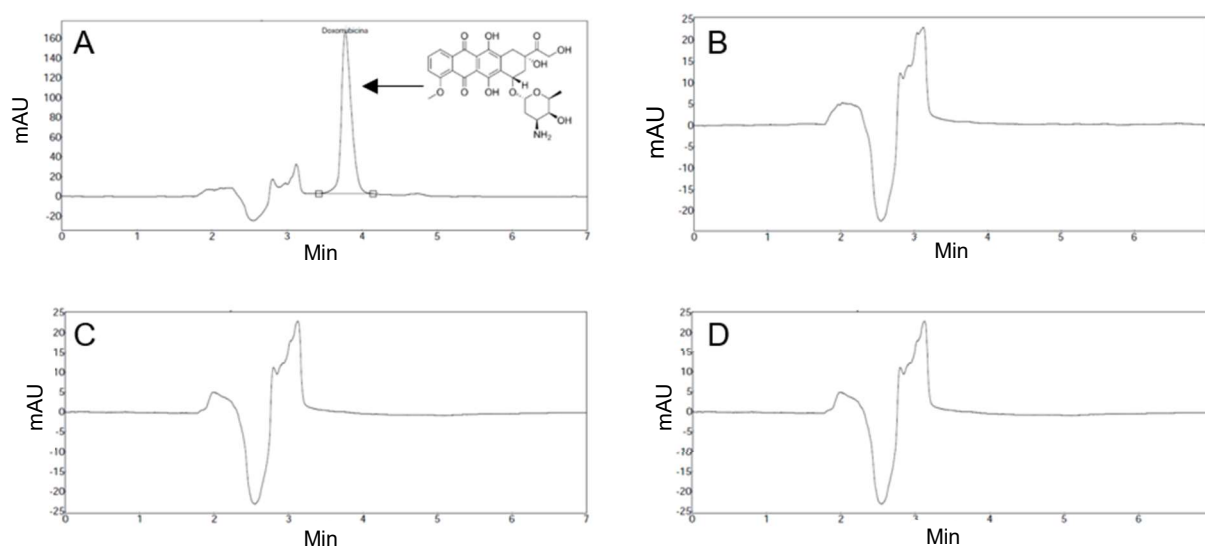
Fonte: dados da pesquisa

4.2.1.2 Seletividade

De acordo com os curvas cromatográficas apresentados na Figura 8 (A a D), é possível observar que nenhum dos componentes da formulação (fase móvel, lipossoma branco) apresentou picos de interferentes no mesmo tempo de eluição da doxo (3,70 min).

Desse modo, foi confirmada a seletividade do método proposto para quantificar a doxo de forma confiável na presença dos demais componentes da formulação.

Figura 8 - Perfil cromatográfico da doxo e cromatogramas referente ao ensaio de seletividade frente aos componentes da formulação lipossomal, obtidos sob as seguintes condições cromatográficas: fase móvel Acetonitrila:Água acidificada com 0,1% TFA, fluxo de 1 mL/min, comprimento de onda em 233 nm, volume de injeção de 20 μ L. (A) Cromatograma da Doxo na concentração de 50 μ g/mL; Linha de base obtida a partir da análise: (B) dos lipossomas brancos, (C) dos lipossomas contendo partícula magnética e (D) da fase móvel.



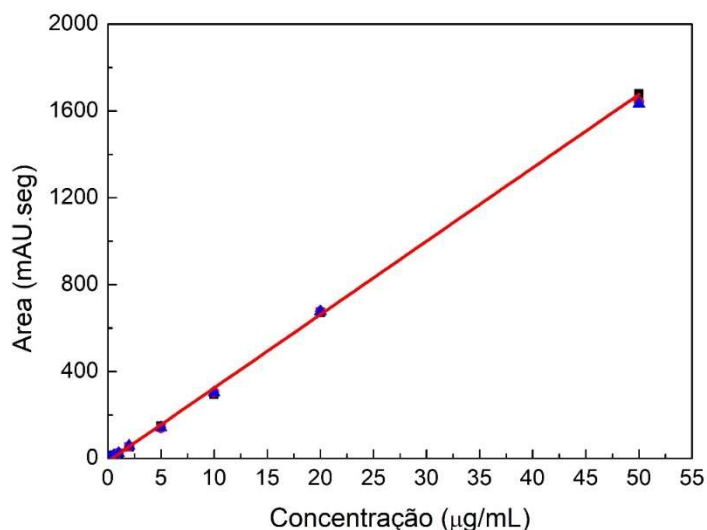
4.2.1.3 Linearidade

A curva analítica obtida referente à concentração de doxo (Figura 9) no intervalo de 1 a 50 µg/mL está matematicamente representada pela Equação 6:

$$y = 33,2761x - 9,1816 \quad \text{Equação 6}$$

em que y corresponde à área do sinal analítico e x, à concentração (µg/mL).

Figura 9 - Curva analítica de calibração da doxo na faixa de 1 a 50 µg/mL. Foram preparadas para a análise soluções de Doxo em metanol, nas concentrações de 1, 2, 5, 10, 20 e 50 µg/mL. Condições cromatográfica utilizadas: fase móvel ACN:Água acidificada com 0,1% TFA, fluxo de 1 mL/min, comprimento de onda em 233 nm, volume de injeção de 20 µL.



Fonte: dados da pesquisa.

O coeficiente de correlação linear obtido (r^2) foi de 0,9995. Segundo o guia de validação (BRASIL, 2017), o valor mínimo aceitável para o coeficiente de correlação é 0,99. Neste trabalho o método foi considerado linear, demonstrando que os resultados de absorvância obtidos são diretamente proporcionais a concentração da doxo na amostra.

4.2.1.4 Limite de quantificação e detecção

O LQ representa a menor concentração da substância analisada que pode ser determinada com precisão e exatidão (BRASIL, 2017). Os dados para as concentrações analisadas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores do desvio padrão relativo e erro, obtidos na análise de precisão e exatidão do método analítico desenvolvido

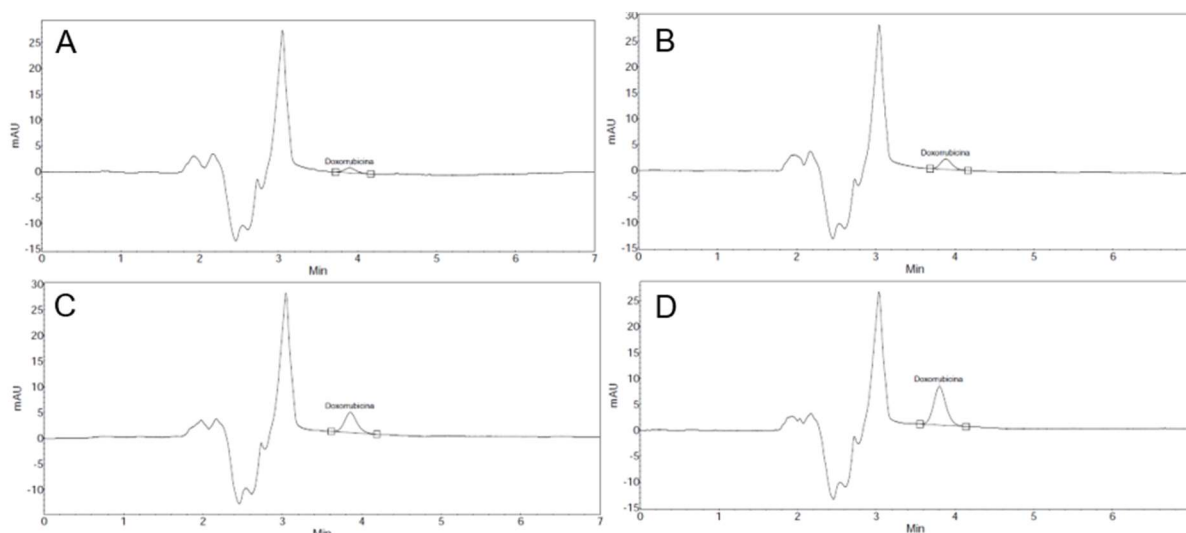
Concentração teórica	Concentração real*	Desvio padrão relativo	Erro
0,25 µg/mL [#]	0,48 µg/mL	13,6%	98,5%
0,5 µg/mL	0,69 µg/mL	2,0%	41,3%
1 µg/mL ^{**}	1,02 µg/mL	2,1%	4,0%
2 µg/mL	1,97 µg/mL	3,4%	- 0,8%

*Valor correspondente à média de três replicatas das concentrações testadas. ** Concentração definida como limite de quantificação do método analítico. # concentração definida como limite de detecção do método analítico.

A Figura 10 apresenta o perfil cromatográfico para a doxo nas concentrações de 0,25 – 2 µg/mL.

Apesar de ser possível a detecção nas concentrações menores que 1 µg/mL, o erro na medida apresenta valores maiores que 5%. Portanto, o LQ ficou definido como sendo 1 µg/mL (Tabela 1). O LD encontrado foi de 0,25 µg/mL (Tabela 1), ou seja, a menor concentração detectada (Fig. 10A), segundo as condições cromatográficas estabelecidas, mas que não podem ser quantificadas com confiabilidade.

Figura 10 - Perfil cromatográfico da doxo referente ao ensaio de limite de quantificação e detecção, obtidos sob as seguintes condições cromatográfica: fase móvel ACN:Água acidificada com 0,1% TFA, fluxo de 1 mL/min, comprimento de onda em 233 nm, volume de injeção de 20 µL. (A) Cromatograma da Doxo a 0,25 µg/mL; (B) Cromatograma da Doxo a 0,5 µg/mL; (C) Cromatograma da Doxo a 1 µg/mL; (D) Cromatograma da Doxo a 2 µg/mL.



Fonte: dados da pesquisa.

4.2.1.5 Precisão e exatidão

Os valores obtidos na análise de precisão e exatidão do método desenvolvido estão apresentados na Tabela 2.

Para a determinação da precisão de um método analítico, o guia de validação (BRASIL, 2017) recomenda a avaliação da proximidade dos resultados obtidos de uma série de medidas para uma mesma amostra (recomenda-se no mínimo três medidas).

Para a exatidão o guia preconiza que sejam feitas 3 concentrações, baixa média e alta, com três replicatas cada, e que os valores médios encontrados com as replicatas sejam o mais próximo possível do valor teórico, ou seja, a variação aceitável entre o valor real e o teórico deve ser menor que $\pm 5\%$. É preciso que o desvio padrão relativo (DPR) seja menor que $\pm 5\%$.

Adotou-se a variação menor que mais ou menos 5% nos valores de exatidão e precisão calculados. Dessa forma, foi possível concluir que o método se mostrou preciso e exato, nas condições avaliadas, como pode ser visto com os valores apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores do desvio padrão relativo e exatidão, obtidos na análise de exatidão e precisão do método analítico.

Concentração (µg/mL)	Concentração Real* (µg/mL)	Precisão	Exatidão
1	1,02	2,1%	102,1%
5	4,89	1,0%	98,0%
50	49,92	1,5%	99,8%

*Valor correspondente à média de três replicatas das concentrações testadas.

4.3 CONCLUSÃO

O método para quantificação da doxo por CLAE foi otimizado e covalidado, apresentando-se como método seletivo e com tempo de corrida reduzido (apenas 7 min) para a determinação da doxo nas amostras.

Por meio de um preparo simples e rápido das amostras, foi possível extrair o fármaco a partir da formulação lipossomal e realizar a sua quantificação.

Este método para a quantificação da Doxo por CLAE, foi covalidado com base no guia de validação (BRASIL, 2017) e apresentou seletividade, exatidão, precisão e linearidade para a faixa de 1 a 50 µg/mL. Sendo, portanto, eficaz para a quantificação confiável da doxo nos estudos posteriores.

5 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA INCORPORAÇÃO EM MANGNETOLIPOSSOMAS

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Materiais

Fosfatidilcolina de soja (LIPOID[®], Alemanha), colesterol (Sigma-Aldrich[®]), Diesteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)-2000] – DSPE-mPEG-(2000) (Avanti Polar Lipids[®], EUA), 1,2-diesteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[folato(polietilenoglicol)-2000] – DSPE-mPEG-(2000)-AF (sintetizado no laboratório), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico - HEPES (>99,5%, Sigma, Brasil), metilamina (CH₃NH₂) (solução aquosa 40%, Sigma-Aldrich), cloreto de manganês tetra hidratado (MnCl₂.4H₂O) (Sigma-Aldrich), citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇) (Sigma-Aldrich), trifosfato de sódio (Na₅P₃O₁₀)(Sigma-Aldrich), cloreto férrico hexa hidratado (97%, Sigma-Aldrich), ácido clorídrico (HCl) (37% Qhemis, Brasil), ácido nítrico (HNO₃) (65% PA, Qhemis, Brasil), nitrato de ferro monohidratado (Fe(NO₃))₃ (98%, Sigma-Aldrich, Brasil), Trietilamina (99%, Sigma-Aldrich, Brasil), Dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Brasil), acetonitrila e metanol (J.T.Baker, grau HPLC, EUA), ácido trifluoracético (TFA), filtro de seringa 0,45 µm (Millex[®], Merck, Alemanha), água ultra pura Mili-Q (Milli-Q, Merck, Alemanha). Todos os outros solventes utilizados foram grau analítico.

5.1.2 Equipamentos

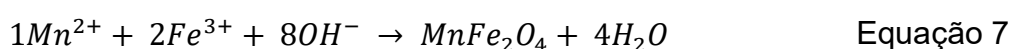
- Balança analítica, modelo AG-200, marca: Gehaka, Brasil;
- Agitador tipo vórtex, modelo AP-56, marca: Phoenix;
- Agitador magnético, modelo TE-085, marca: Tecnal, Brasil;
- Centrífuga, modelo mini spin plus, marca: Eppendorf, Alemanha;
- Evaporador rotativo, modelo RV 10, marca: IKA[®], Alemanha;
- Extrusor, marca: Northen Lipids, Canadá;
- Bomba a vácuo, modelo TE-0581, marca: Tecnal, Brasil;
- pHmetro digital, modelo pg1800, marca: Gehaka, Brasil;
- Banho de ultrasson, modelo UltraSonic Cleaner, marca Unique, Brasil;
- Centrífuga, modelo mini spin plus, marca: Eppendorf, Alemanha;

- Sistema de purificação de água MiliQ, modelo Direct 8, marca MiliQ, EUA;
- Chapa aquecedora, modelo C-Mag HS7, marca: IKA®, Alemanha;
- Misturador por tombamento, modelo RT 10 power Werke, marca: IKA®, Alemanha;
- Secador de amostra por nitrogênio, modelo RapidVap, marca: Labconco, EUA;
- Raios-X, modelo XRD6000, marca: Shimadzu, Japão.

5.1.3 Método

5.1.3.1 Síntese das nanopartículas de ferrita de manganês

O fluido magnético (FM) utilizado nos experimentos consistiu em nanopartículas magnéticas (NPM) de ferrita de manganês ($MnFe_2O_4$) revestida e suspensas em água, as quais foram preparadas pelo método de coprecipitação em meio alcalino (NUNES et al., 2014; RODRIGUES et al., 2013), cuja reação está representada pela Equação 7:



A partir da estequiometria da reação foram calculadas as massas dos reagentes a serem utilizados nesta síntese, com solução de sais de Mn^{2+} e Fe^{3+} na proporção molar de 1:2, respectivamente.

Primeiramente, foi preparada uma solução de $FeCl_3$ 1 mol/L e $MnCl_2$ 0,5 mol/L ambos dissolvidos em 100mL de HCl 3% (m/m).

Em seguida, em um frasco contendo 400 mL de água ultrapurificada foram adicionados 90 mL de metilamina (2mol/L) em ebulição. Adicionou-se, concomitantemente, 50 mL de solução de $FeCl_3$ e 50 mL de solução de $MnCl_2$.

A mistura foi mantida em ebulição durante 30 min. Nesse processo foi formado precipitado de cor preta.

As partículas foram separadas magneticamente do sobrenadante, o qual foi descartado, e o precipitado foi então lavado, por três vezes, com água ultrapurificada.

Após esta etapa, as NPM ficaram prontas para receber a camada de cobertura.

Para a obtenção do pó sem a camada de cobertura, após lavar, antes de se acrescentar água, parte da amostra foi retirada e levada à estufa para a secagem a 70°C. Em seguida, utilizou-se o almofariz para triturar a amostra e obter um pó fino. O

pó foi, posteriormente, usado para as medidas de Raios-X e de magnetização de amostra vibrante (MAV).

Neste trabalho, foram estudadas três tipos de camada de cobertura: citrato de sódio, fosfato e dextrana, os quais foram utilizados para conferir estabilidade coloidal às nanopartículas magnéticas.

5.1.3.2 Síntese das nanopartículas de $MnFe_2O_4$ revestidas por citrato

Para o revestimento das NPM com citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$) (NUNES et al., 2014), primeiramente, as nanopartículas obtidas pelo processo de coprecipitação já apresentados na seção 5.1.3.1 foram acidificadas com uma solução de HNO_3 a 0,5 mol/L e separadas magneticamente do sobrenadante, o qual foi descartado.

Depois, adicionou-se o citrato de sódio na proporção de 1 mol de citrato de sódio para 10 mols de Fe presentes na amostra. Ao acrescentar o citrato, a amostra tornou-se turva e de coloração marrom. Após o acréscimo do citrato, a amostra foi aquecida até $80^\circ C$ e mantida nesta temperatura sob agitação durante 30 minutos.

Em seguida, separou-se as partículas magnéticas magneticamente, descartando-se o sobrenadante e se obtendo um precipitado de NPM.

Finalmente, o precipitado obtido foi lavado três vezes em acetona.

Então, foram adicionados 50 mL de água e o excesso de acetona foi evaporado. O sistema final foi constituído de fluido magnético de NPM de ferrita de manganês revestidas com citrato ($MnFe_2O_4$ – Citrato).

5.1.3.3 Recobrimento da partícula magnética por fosfato

Para o revestimento das partículas magnéticas com fosfato (NUNES et al., 2014), foram utilizadas as nanopartículas preparadas anteriormente como descrito na seção 5.1.3.1. Para cada 10 g de cloreto férrico hexahidratado utilizado para o preparo da nanopartícula da seção 5.1.3.1 utilizou-se 25 mL de uma solução de 0,15 mol/L de $Na_5P_3O_{10}$ (trifosfato de sódio).

Deixou-se sob agitação magnética por 60 min e corrigiu-se o pH da solução para 8.

Após este período, o material foi submetido a diálise utilizando membrana de poro de 12-14 kDa. O sistema de diálise foi colocado dentro de um becker contendo

1000 mL de água Mili-Q, e foi mantido sob agitação magnética por 72 horas com troca de água a cada 12 horas para a remoção do fosfato livre.

O sistema final, removido do interior do saco de diálise, é constituído de fluido magnético de NPM de ferrita de manganês revestidas com fosfato ($\text{MnFe}_2\text{O}_4 - \text{PO}_4$)

5.1.3.4 Recobrimento da partícula magnética por dextrana

Para a preparo do fluido magnético com NPM de ferrita de manganês (MnFe_2O_4) revestidas com dextrana, as nanopartículas obtidas na seção 5.1.3.1 foram diluídas em 50 mL de água ultrapura e adicionados 9,2 g de dextrana na proporção de 1:2 (m:m) de nanopartículas magnéticas, sendo mantida sob agitação magnética por 30 minutos.

Após a agitação, a amostra foi mantida sob homogeneização por tombamento por 24 horas. Posteriormente, foi colocada dentro de um saco de diálise de poro de 12-14 kDa. O saco foi posicionado dentro de um becker contendo 1000 mL de água Mili-Q que foi mantido sob agitação magnética por 72 horas com troca de água a cada 12 horas para a remoção de toda dextrana livre.

O sistema final, removido do interior do saco de diálise, é constituído de fluido magnético de NPM de ferrita de manganês revestidas com dextrana ($\text{MnFe}_2\text{O}_4 - \text{dextrana}$)

5.1.3.5 Difração de Raios-X

A estrutura cristalina, bem como o diâmetro do cristalito das NPM de ferrita de manganês (MnFe_2O_4), foi avaliada por difratometria de Raios-X, em difratômetro de Raios-X (XRD 6000, Shimadzu) em modo de reflexão, com radiação $\text{CuK}\alpha$ (40 kV e 20 mA) de comprimento de onda 1,54 Å com *default* em ângulos entre 10° e 80°. A amostra de NPM de ferrita de manganês foi secada a 70°C, obtendo assim o pó para a análise de difratometria. Para cálculo do diâmetro médio foi utilizada a equação de Debye-Scherrer, (Equação 8) tendo como base o padrão de silício analisado nas mesmas condições.

$$D = \frac{k \lambda}{\Delta \cos \theta} \quad \text{Equação 8}$$

onde, k é uma constante que depende da forma das partículas (assumida aqui como sendo esférica, $k = 0,93$), λ é o comprimento de onda da radiação eletromagnética

utilizada ($\lambda_{CuK\alpha} = 1,54 \text{ \AA}$), Θ é o ângulo de difração de Bragg utilizado (2Θ), e Δ é a largura a meia altura do pico de maior intensidade comparado com o padrão de silício conforme Equação 9.

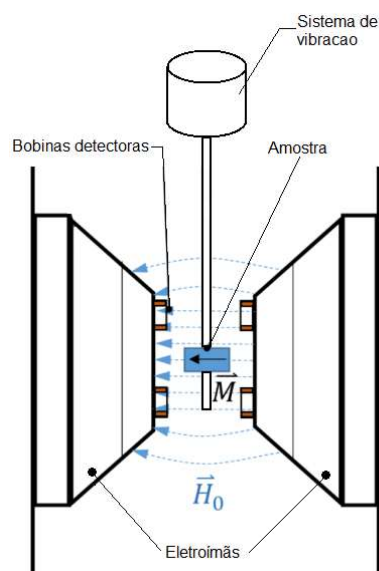
$$\Delta = \sqrt{\Delta^2_{Ferrita} - \Delta^2_{silício}} \quad \text{Equação 9}$$

5.1.3.6 Magnetometria de amostra vibrante (MAV).

O magnetômetro de amostra vibrante foi desenvolvido por S. Foner em 1955. Devido a sua funcionalidade e ao baixo custo, é umas das técnicas mais utilizadas para medidas de magnetização (RODRIGUES et al., 2013).

A técnica consiste em uma haste rígida e fixa colocada entre dois eletroímãs. A haste vibra perpendicularmente ao campo aplicado. Se a amostra possuir um momento magnético, uma indução de corrente é gerada em um conjunto de bobinas detectoras, posicionadas em torno da amostra, com isto é possível se quantificar tal propriedade. A Figura 11 apresenta, de forma esquemática, um sistema de magnetometria de amostra vibrante.

Figura 11 - Representação esquemática de um sistema de magnetometria de amostra vibrantes.



Fonte: Adaptada do manual do usuário do sistema MAV serie 7300 (2001).

A caracterização magnética foi feita utilizando o magnetômetro de amostra vibrante (MAV) operado numa faixa de intensidade de campo magnético igual a -20

$kOe \leq H \leq 20 kOe$ (em unidade do CGS) e frequência de oscilação da amostra igual a 100 Hz.

Para a amostra em pó foi utilizada 60 μg do pó colocada no porta-amostra.

E, para as amostras líquidas do fluido magnético e da formulação lipossomal, foram utilizadas alíquotas de 60 μL que foram colocadas no porta-amostra e inseridas no equipamento para a leitura das amostras, obtendo-se um gráfico de momento magnético por campo magnético.

Com isto foi possível calcular a fração volumétrica do fluido magnético e da formulação lipossomal.

5.1.3.7 Calculo da fração volumétrica de nanopartículas magnéticas

Em um sistema superparamagnético, o comportamento da curva de magnetização é uma Langevin de primeira ordem, apresentado na Equação 10 (RODRIGUES, 2017):

$$M_{FM} = \phi M_s^b L(\xi) \quad \text{Equação 10}$$

Na saturação, ou seja, quando o campo magnético é muito grande podemos afirmar que a Langevin tende a um valor unitário ($L(\xi) \rightarrow 1$). Logo:

$$M_{FM} = \phi M_s^b \quad \text{Equação 11}$$

esta equação fornece uma relação para o cálculo da fração volumétrica (ϕ) de nanopartícula magnéticas. Logo:

$$\phi = \frac{M_{FM}}{M_s^b} \quad \text{Equação 12}$$

com M_s^b sendo a magnetização de saturação da nanopartícula e M_{FM} é o valor da magnetização de saturação do fluido medido no MAV. As magnetizações estão em unidade de emu/cm^3 , que podem ser convertidas em emu/g (magnetização específica).

As curvas de magnetização medidas no MAV são dadas em unidades de momento magnético (emu). Se dividir pela massa total da amostra obtém-se a curva de magnetização em unidade de emu/g . Lembrando que o momento magnético médio da amostra é dado por

$$\langle \mu \rangle = N \mu_p L(\xi) \quad \text{Equação 13}$$

onde N e μ_p são o número total de partículas e o momento magnético de uma partícula, se dividir pela massa total obtém-se

$$\frac{\langle \mu \rangle}{m_T} = \frac{1}{m_T} N \mu_p L(\xi) \quad \text{Equação 14}$$

Na Equação 14 podem-se identificar os valores de magnetização da amostra (M_{FM}) em emu/g, ou seja, pode-se escrever esta equação como

$$M_{FM} = \frac{1}{m_T} N \mu_p L(\xi) \quad \text{Equação 15}$$

Para avaliar os dados medidos em termos de valores conhecidos, pode-se reorganizar a equação

$$FM = \frac{m_p \mu_p}{m_T m_p} N L(\xi) = \frac{m_p}{m_T} M_p N L(\xi) = \frac{\rho_p v_p}{\rho_T v_T} M_p N L(\xi) \quad \text{Equação 16}$$

Sabendo que a ϕ é a fração volumétrica de partículas magnéticas. Logo

$$M_{FM} = \frac{N v_p}{v_T} M_p L(\xi) \frac{\rho_p}{\rho_T} = \phi M_p L(\xi) \frac{\rho_p}{\rho_T} \quad \text{Equação 17}$$

Em condições de alto campo magnético aplicado, a função de Langevin $L(\xi) \rightarrow 1$, de onde é possível calcular teoricamente a magnetização do fluido magnético. Admitindo que a densidade do fluido magnético possa ser escrita em termos das NPM e da densidade do líquido carreador (ρ_{liq}) segundo a relação $\rho_{FM} = (\rho_p - \rho_{liq})\phi + \rho_{liq}$; e como fração volumétrica de um fluido magnético geralmente é muito pequena ($\sim 10^{-6} - 10^{-3}$), então, fazendo a aproximação de $\phi \rightarrow 0$ implica dizer que $\rho_{FM} \approx \rho_{liq}$.

A partir dessa aproximação e no limite em que $L(\xi) \rightarrow 1$ (quando atingida a magnetização de saturação) é possível calcular a fração volumétrica de cada amostra como sendo:

$$\phi = \frac{M_{FM} \rho_p}{M_p \rho_c} \quad \text{Equação 18}$$

Utilizou-se para cálculos a densidade do líquido carreador $\rho_c = 1g/cm^3$, e a densidade da ferrita de manganês utilizada neste trabalho foi de $\rho_p = 5,1g/cm^3$.

Os valores da magnetização de saturação tanto do fluido magnético (M_{FM}) quanto do pó (que corresponderá a magnetização de saturação das nanopartículas M_p) são determinados experimentalmente a partir das medidas de MAV.

5.1.3.8 Magnetohipertermia das nanopartículas magnéticas.

Magnetohipertermia (MH) é o fenômeno do aumento da temperatura de um material magnético devido a ação de campo magnético alternado (AC). Esta eficiência de aquecimento em fluidos e materiais magnéticos é quantificado pela potência específica dissipada (SLP – Specific Loss Power), que é a potência térmica dissipada por unidade de massa quando está sob ação de um campo magnético AC. O SLP de uma amostra é dado experimentalmente por (NATIVIDAD; CASTRO; MEDIANO, 2008):

$$SLP = \frac{\rho_{FM} C_{FM}}{\rho_p \phi_m} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right)_{t \rightarrow 0} \quad \text{Equação 19}$$

onde $\rho_{FM} = 1 \text{ g/cm}^3$ é a densidade do carreador (água), $C_{FM} = 4,181 \frac{\text{J}}{\text{g}^\circ\text{C}}$ é o calor específico da água, $\rho_p = 5,1 \text{ g/cm}^3$ é densidade da partícula e ϕ_m é a fração volumétrica magnética. Utilizando a inclinação da curva temperatura *versus* tempo fornece uma estimativa do SLP em unidade de W/g, pois perdas iniciais ainda são desprezíveis e a distribuição de temperatura dentro da amostra é homogênea (NATIVIDAD; CASTRO; MEDIANO, 2008).

Com o intuito de se calcular o SLP de cada amostra foi utilizado o equipamento de MH modelo Nanotherics. Foi utilizado uma bobina cilíndrica de 17 voltas. As bobinas são refrigeradas por um circuito fechado com água a temperatura de 10°C quando o sistema está desligado a fonte de energia e atinge a temperatura de 33 graus quando ligado. A frequência utilizada de campo magnético alternado foi igual a 334 kHz, que dependendo da corrente utilizada pode se gerar vários campos magnéticos. Foi utilizado intensidade de campo magnético de 100, 142, 223, 305, 342 Oe. Para a medida da amostra em pó foi aplicado o campo magnético por 40 segundos e posteriormente desligado. Para a amostra de fluido magnético foi aplicado campo magnético por 100 segundos. Foi monitorado por um sensor de fibra ótica o aquecimento da amostra e coletado os dados em um software no computador, o que permite que se extraia curvas de temperatura *versus* tempo.

5.1.3.9 Preparação de magnetolipossomas sem o fármaco

Os lipossomas foram preparados empregando-se a metodologia de hidratação do filme lipídico seguida de extrusão (Figura 12)(MAYER; HOPE; CULLIS, 1986).

Para a preparação dos lipossomas foi utilizada fosfatidilcolina de soja (PC) e colesterol (Col) na proporção molar de 64:32.

Os componentes estruturais dos lipossomas foram dissolvidos em clorofórmio, constituindo a fase orgânica da preparação.

A fase aquosa da formulação foi composta pela diluição do fluido magnético com diferentes camadas de cobertura em tampão sulfato de amônio 300 mM pH 3,0, que são apresentadas na Tabela 3.

Utilizou-se este tampão com intuito de se criar um gradiente de pH e íons no interior do lipossoma.

Tabela 3 - Diluições para o preparo dos magnetolipossomas contendo partícula magnética em seu núcleo aquoso.

Revestimento da nanopartícula magnética	Concentração (v/v)*		
Citrato	1:1	1:2	1:3
Fosfato	1:1	1:2	1:3
Dextrana	1:1	1:2	1:3

*Relação (Fluido magnético: Tampão sulfato de amônio 300mM pH 3.0) (v:v)

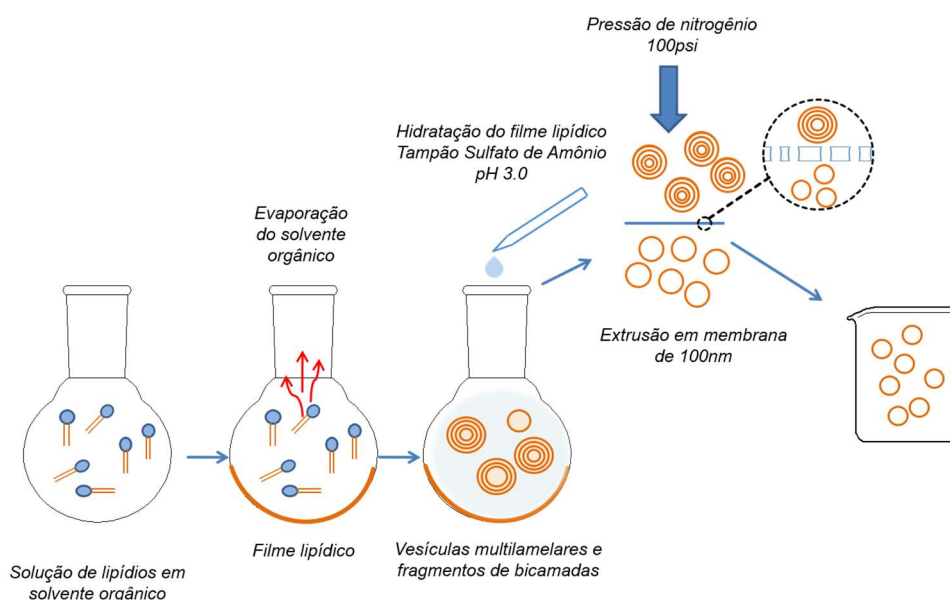
Inicialmente, foi preparada uma solução estoque (SE) de fosfatidilcolina em clorofórmio na concentração de 100 mg/mL, e uma solução estoque de colesterol na concentração de 50 mg/mL. Uma alíquota de 2 mL da solução estoque de fosfatidilcolina e uma alíquota de 1 mL da solução estoque de colesterol foram retiradas e colocadas em balão de fundo redondo. A mistura foi, em seguida, levada para rotoevaporador, na temperatura ambiente e pressão reduzida, até completa remoção do solvente orgânico, e, conseqüente, formação do filme lipídico.

O filme foi hidratado com 4 mL de fase aquosa por 45 minutos e, em seguida, a preparação foi levada ao agitador tipo vórtex, obtendo-se vesículas multilamelares (MLV).

Após 8 ciclos de extrusão em extrusor de aço inox, equipado com membrana de policarbonato com poros de 600, 200 e 100 nm e sob pressão de 150 psi de nitrogênio, foram obtidos magnetolipossomas unilamelares pequenos (SUV) na concentração de 64 mM de lipídio.

O processo de preparo dos lipossomas está esquematicamente representado na Figura 12.

Figura 12 - Representação esquemática do preparo de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico e posterior extrusão.



Fonte: Representação esquemática pertencente ao grupo de pesquisa.

5.1.3.10 Separação das nanopartículas magnéticas não encapsuladas nos magnetolipossomas

Para separar as partículas não encapsuladas dentro dos lipossomas utilizou-se da técnica de cromatografia de exclusão por tamanho, também chamada de filtração em gel.

Para realizar a separação, as partículas passam através do gel empacotado em uma coluna, para que a filtração seja realizada. O gel empacotado dentro da coluna possui uma matriz porosa, que permite a separação das partículas por diferença de tamanho. As partículas menores entram nos poros da matriz, fazendo com que a sua eluição fique retardada. As partículas maiores não são capazes de entrar nos poros da matriz do gel, desta forma sua eluição é mais rápida em comparação as partículas menores.

Pode-se utilizar vários tipos de gel de exclusão como Sephadex® G10, G25 ou G50 (HEALTHCARE, 2010). Para este trabalho foi utilizado para o empacotamento da coluna o gel Sephadex® G50. O tampão utilizado para equilibrar a coluna foi o

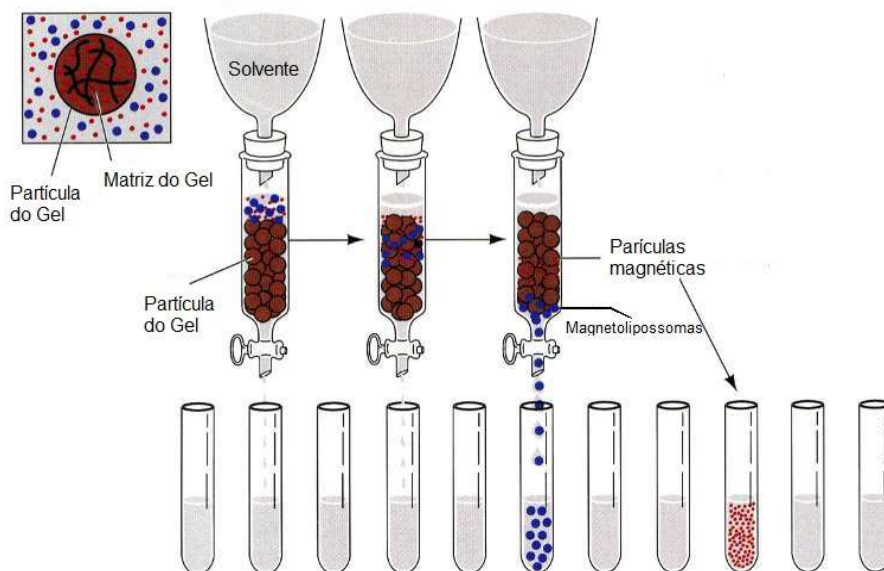
tampão HEPES pH 7,4, que preenche os poros da matriz e o espaço entre as partículas.

As amostras foram eluídas isocraticamente, e ao final da separação, para remoção de alguma partícula remanescente foi passado 10 vezes o volume da coluna, para sua lavagem e preparação para o próximo ensaio.

Neste trabalho, utilizou-se uma coluna com altura de 12 cm e diâmetro de 2 cm, com volume total de 150 cm³ (150 mL). Para ter alta resolução de fracionamento, o volume da amostra deve corresponder a cerca de 0,5 - 4% do volume da coluna. Portanto pode-se utilizar 0,75 - 6 mL de amostra (HEALTHCARE, 2010).

Adicionou-se 1 mL da formulação lipossomal sobre a coluna de Sephadex lentamente sob as paredes da coluna com o intuito de evitar a perturbação da parte superior da coluna. Após adicionar a formulação, frações de 1mL foram coletadas, sendo coletadas 15 frações para magnetolipossomas. O processo de separação está representado esquematicamente na Figura 13.

Figura 13 - Representação esquemática da separação das partículas magnéticas não encapsuladas nos magnetolipossomas pela técnica de cromatografia de exclusão por tamanho.



Fonte: Modificado de: <https://comis.med.uvm.edu>. Acesso em : 24.agosto.2018

5.1.3.11 Determinação de tamanho e distribuição de tamanho dos magnetolipossomas sem fármaco

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho das vesículas foram determinados utilizando-se a técnica de espalhamento de luz em equipamento Zeta Sizer Nano S.

Uma alíquota de 0,05 mL de cada amostra foi diluída com tampão HEPES pH 7,4 para 1 mL, a dispersão foi transferida para uma cubeta que foi inserida no equipamento para a análise da amostra a temperatura ambiente. Em cada leitura foi obtido o diâmetro médio dos magnetolipossomas (nm) e o índice de polidispersão (PDI), que é a medida da distribuição do tamanho dos lipossomas na amostra.

5.1.3.12 Caracterização dos magnetolipossomas

Os magnetolipossomas foram caracterizados quanto a concentração de NPM encapsuladas já apresentado no subitem 5.1.3.7, para magnetohipertermia já apresentada no subitem 5.1.3.8.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram sintetizadas 3 amostras de fluidos magnético de ferrita de manganês recobertos por citrato de sódio, fosfato de sódio e dextrana.

Após a síntese dos fluidos magnéticos, foram preparados lipossomas contendo partículas magnéticas encapsuladas pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de extrusão.

Para se obter a coencapsulação da doxo, no interior dos lipossomas contendo as NPM, através do método de gradiente de pH e íons amônio, as formulações preparadas foram submetidas à técnica de mudança de pH externo utilizando-se, para isso, a técnica de cromatografia de exclusão de tamanho. Porém ao iniciar os estudos não foi possível obter um lipossoma estável durante o preparo com os fluidos magnéticos recobertos com citrato e fosfato.

Ao mudar o pH do fluido magnético para pH 3 (pH interno do lipossoma) para os fluidos magnéticos recoberto por citrato e fosfato, ocorreu a perda dos íons que estão envolta das NPM gerando a instabilidade eletrostática nas partículas em dispersão. Assim observou-se agregação das partículas formando um precipitado no fundo do tubo (GADALLAH; AZAB; ALI, 2018; PFEIFFER et al., 2014). Esta instabilidade com as partículas magnéticas não foi observada quando se utilizou o fluido magnético recoberto com dextrana.

Avaliou-se a melhor concentração de fluido magnético frente à obtenção dos lipossomas, mudando a concentração tampão sulfato de amônio para a diluição do fluido magnético.

Para as concentrações 1:1 e 1:2 no processo de obtenção dos magnetolipossomas estes ficaram retidos na membrana de policarbonato com poro 100 nm, inviabilizando sua produção (como apresentado na Figura 14 uma membrana do extrusor com a coloração amarronzada). Esta característica não foi observada para a concentração 1:3, ou seja, 1 fração de fluido magnético para 3 de tampão sulfato de amônio 300mM pH 3,0.

Com isto, esta concentração foi a utilizada para os estudos de caracterização de partícula magnética e caracterização dos magnetolipossomas. E posteriormente utilizada para o preparo de lipossomas para encapsulação da doxo.

Figura 14 – Imagem da membrana de polycarbonato com poro 100 nm colocada no extrusor mostrando o processo de retenção e obstrução da membrana pelos sistemas.

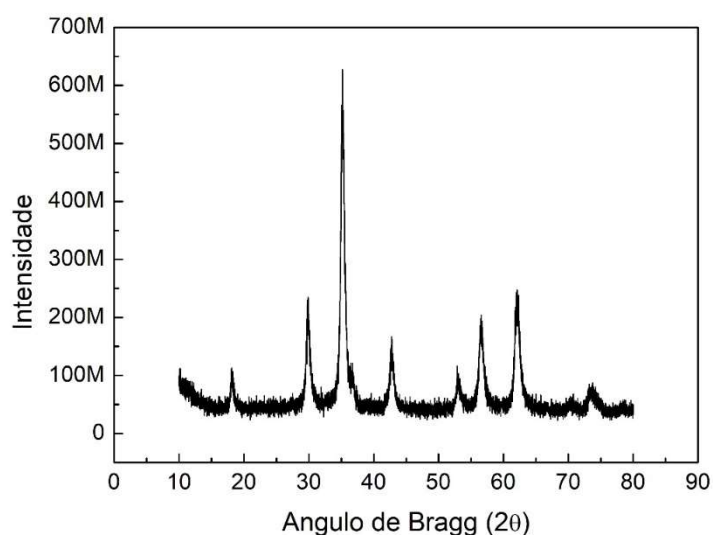


Fonte: dados da pesquisa.

5.2.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas de ferrita de manganês ($MnFe_3O_4$) pela técnica de difração de Raios-X

Os padrões de difração de Raios-X das NPM de ferrita de manganês estão apresentados na Figura 15, o que confirma a estrutura espinélio cúbico dessas nanopartículas (RODRIGUES et al., 2017).

Figura 15 - Difratoograma de Raios-X do pó de ferrita de manganês passivada secada a 70°C. Ângulo de Bragg 2θ , no intervalo de 10 a 80°.



Fonte: dados da pesquisa.

Usando a Equação 9 e o valor do $\Delta_{\text{silício}}$ do padrão de silício de $1,25 \times 10^{-3}$ e substituindo na Equação 8. Foi possível determinar o diâmetro médio da partícula de ferrita de manganês sintetizada. Esse diâmetro está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Valore de diâmetro médio da nanopartícula magnética por DRX utilizando a equação de Debye-Scherrer.

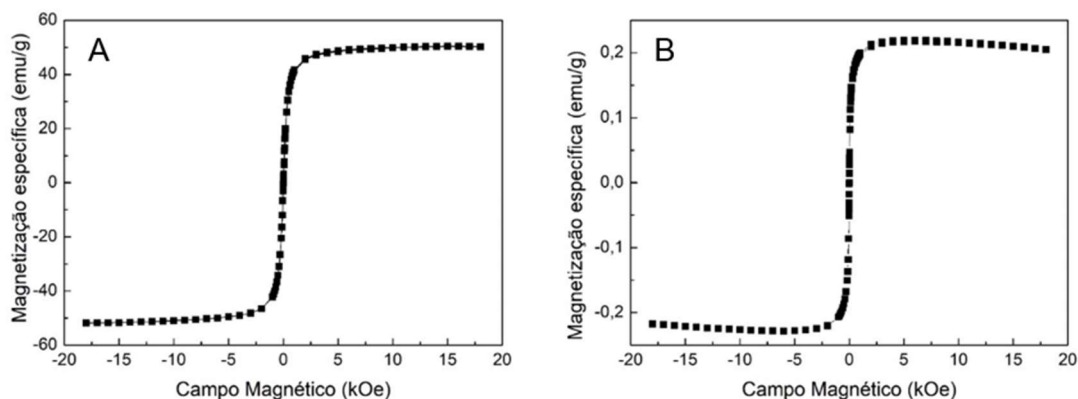
Amostra	Δ_{ferrita} (rad)	Diâmetro médio (nm)
Ferrita de manganês	$1,06 \times 10^{-2}$	13,5

Rodrigues (2017) preparou partículas magnéticas de ferrita de manganês recobertas com DMSA (Ácido dimercaptossuccínico) e Nunes (2014) preparou partículas de ferrita de manganês recobertas com citrato e fosfato, encontraram tamanhos semelhantes para partícula magnética de ferrita de manganês estudadas neste estudo. Apesar de as NPM apresentarem diâmetros médios muitos pequenos, é importante destacar que geralmente sofrem a formação de aglomerados devido interações de atração (van der Wals), atração e repulsão (dipolar magnética), repulsão (repulsão estérica e repulsão eletrostática). Devido a este problema normalmente as NPM são recobertas com surfactantes, ou seja, moléculas ou ions, capazes de manter sua estabilidade de superfície. Formando assim um fluido magnético. Com isto neste presente trabalho, foi utilizado fluido magnético de ferrita de manganês recoberto por dextrana. Onde a dextrana atua como surfactante para manter a estabilidade coloidal.

5.2.2 Caracterizações das nanopartículas magnéticas por técnica de magnetometria de amostra vibrante

A técnica de MAV fornece a informação sobre a concentração de partículas magnéticas no meio, a fração volumétrica e a susceptibilidade de equilíbrio (BRANQUINHO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2017). A Figura 16 apresenta as curvas de magnetização do pó (A) e do fluido magnético (B) já na concentração 1:3 que será utilizada para se preparar os magnetolipossomas, respectivamente. Através da curva de magnetização, pôde-se obter o valor da magnetização específica da amostra.

Figura 16 - Curva de magnetização do pó de ferrita de manganês (A) e do fluido de ferrita de manganês recoberto com dextrana na diluição 1:3 (v/v) em tampão sulfato de amônia pH 3.0 (B) obtidos pela técnica de magnetometria de amostras vibrantes (MAV).



Fonte: dados da pesquisa.

Através dos valores de saturação obtidos das curvas de magnetização do pó e fluido magnético, foi possível calcular a fração volumétrica do fluido magnético e a concentração. A amostra em pó que possui massa igual a $m_p = (0,05827 \pm 0,00005)g$, foi medido valor de magnetização específica igual a $M_p = 51,7 \text{ emu/g}$ e sem campo coercitivo. Ou seja, essa amostra responde ao campo magnético do MAV no regime superparamagnético. Também foi medida a magnetização do fluido magnético recoberto com dextrana (alíquota de volume igual a $60 \mu\text{L}$ com massa igual a $m_{FM} = (0,06083 \pm 0,00005)g$ para o fluido) e o valor obtido da magnetização se verifica na Tabela 5.

Tabela 5 - Fração volumétrica do fluido magnético de ferrita de manganês recoberto com dextrana na diluição 1:3 (v/v) em tampão sulfato de amônia pH 3.0 e a concentração do fluido magnético.

	Magnetização do fluido (emu/g)	Fração volumétrica	Concentração (mg/mL)
FM	0,23	0,09	4,5

A fração volumétrica de um fluido magnético determina o percentual de seu volume total que corresponde às nanopartículas magnéticas. Portanto, substituindo os valores experimentais obtidos para fluido magnético de ferrita de manganês recoberta com dextrana na Equação 18, a fração volumétrica calculada foi igual a $\phi = 0,09 \%$. A partir da fração volumétrica pode-se determinar a concentração de partículas no fluido magnético multiplicando o valor da fração volumétrica vezes a

densidade e o diâmetro da nanopartícula magnética obteve-se a concentração de 4,5 mg/mL.

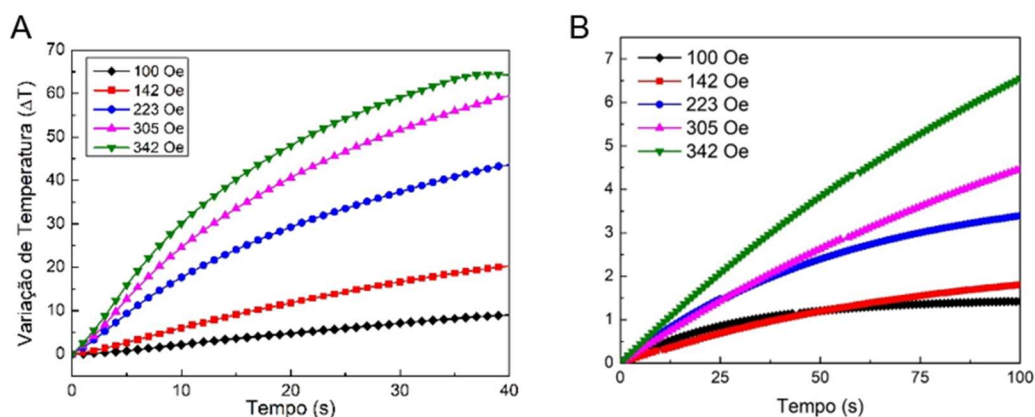
Rodrigues et al. (2017) encontra para um fluido magnético de ferritas de manganês recobertas com ácido dimercaptossuccínico (DMSA) valores de fração volumétrica na ordem de 0,0046 e concentração no valor de 23 mg/mL. Entretanto em seu estudo ele utiliza apenas as partículas magnéticas para a aplicação oncológica. Já neste trabalho está sendo utilizado um fluido magnético com características semelhantes porém para a coencapsulação com a doxorubicina teve-se que fazer a diluição do fluido magnético na proporção de 1:3 para o tampão sulfato de amônio com isto diminuindo a concentração das partículas magnéticas (RODRIGUES et al., 2017).

5.2.3 Estudo de magnetohipertermia das nanopartículas magnéticas de ferrita de manganês ($MnFe_2O_4$)

Medidas de magnetohipertermia (MH) foram realizadas com a amostra de fluido magnético (FM) diluído na concentração 1:3. Os dados foram obtidos em diferentes amplitudes de campo magnético alternado de 100, 142, 223, 305, 342 Oe e com frequência de fixa de 334 kHz.

A Figura 17 mostra o valor experimental da taxa de aquecimento (inclinação inicial $\Delta T/\Delta t$) das curvas de MH. É possível observar que, inicialmente, a temperatura de aquecimento da amostra cresce linearmente com o tempo sob a ação do campo magnético alternado externo.

Figura 17 - Perfil de magnetohipertermia do pó de NPM de ferrita de manganês (A). Perfil de magnetohipertermia do fluido magnético de ferrita de manganês na diluição 1:3 (v/v) em tampão sulfato de amônia pH 3.0 (B). Foi analisada a variação de campo magnético para cada leitura e o tempo de análise durou 40 segundos para a amostra em pó e 100 segundos para a amostra do fluido magnético.



Fonte: dados da pesquisa.

Para valores de Δt bem pequeno (primeiros 10 s com campo magnético ligado) podemos utilizando uma metodologia experimental conhecida na literatura como método calorimétrico (BORDELON et al., 2011; HILGER et al., 2001), onde para valores iniciais da curva se comporta linearmente podendo assim calcular o valor do SLP (W/g) do fluido magnético estimado através dos coeficientes angulares (*fit* linear e utilizando a Equação 19). O SLP foi experimentalmente determinado nesse procedimento *in vitro*. Os valores obtidos para o SLP estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Dados de SLP para a amostra de FM de ferrita de manganês revestida com dextrana na diluição 1:3 (v/v) em tampão sulfato de amônia pH 3.0 para diferentes campos magnéticos aplicados.

Campo (Oe)	SLP (W/g)
100	12,8
142	11,4
223	26,1
305	46,6
342	59,6

Comercialmente, já existem pelo menos dois fluidos magnéticos disponíveis para esse tipo de aplicação, chamados BNF-starch® (nanopartícula de magnetita com diâmetro de 15-20 nm) e Nanomag-D-spion® (nanopartícula de magnetita com

diâmetro de 15-20 nm), (BORDELON et al., 2011). Diferenciando-se, portanto, da usada neste trabalho, no qual se utiliza a ferrita de manganês.

De acordo com a literatura, sob ação de um campo magnético alternado de 201 Oe e frequência (~ 141 kHz), o BNF-starch[®] apresenta um valor de SLP *in vitro* em torno de 22,8 W/g e o Nanomag-D-spion[®] perto de 61 W/g (BORDELON et al., 2011; DENNIS et al., 2009).

Comparativamente, a nanopartícula magnética de ferrita de manganês recoberta com dextrana (MnFe₂O₄) conseguiu (*in vitro*) produzir um SLP no valor de 26,1 W/g para um campo de 223 Oe na frequência de 334 kHz. E quando o campo magnético é igual a 342 Oe o valor do SLP *in vitro* é igual a 59,6 W/g para a mesma frequência de 334 kHz.

Obteve-se eficiência comparativa na geração de calor obtida com a nanopartícula magnética de ferrita de manganês quando comparada à eficiência térmica da comercializada BNF-starch[®] porem quando comparamos com a Nanomag-D-spion[®] apresenta uma menor eficiência térmica, apesar de possuírem tamanho próximos, podendo estar ligado a estrutura cristalina da nanopartícula magnética e na composição da nanopartícula magnética (BORDELON et al., 2011; CARRIÃO; BAKUZIS, 2016).

5.2.4 Caracterização dos magnetolipossomas

Os magnetolipossomas são constituídos de partículas magnéticas encapsuladas no interior aquoso de vesículas fosfolipídicas. Neste trabalho os magnetolipossomas foram preparados a partir da hidratação do filme lipídico e com o fluido magnético de ferrita de manganês recoberta com dextrana na concentração 1:3 (diluído em tampão sulfato de amônio pH 3).

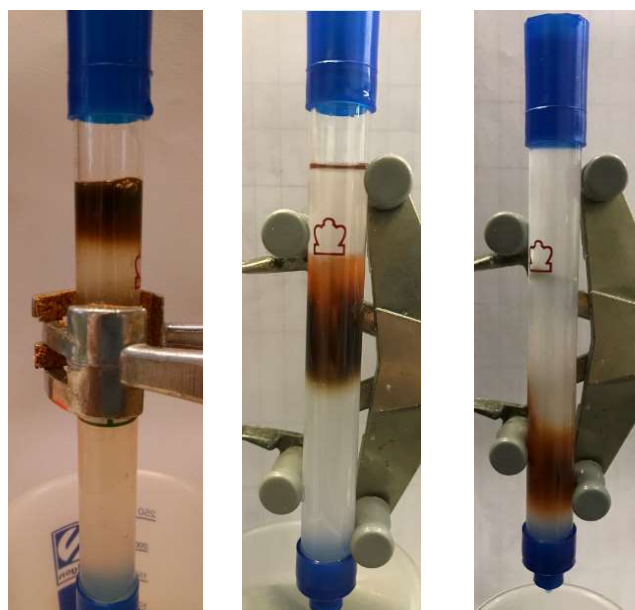
Os lipossomas foram preparados na concentração de fosfatidilcolina e colesterol na proporção 64:32 mM. A fim de separar as partículas não encapsuladas no magnetolipossoma, utilizou-se a técnica de cromatografia de exclusão de tamanho. A amostra foi eluída na coluna de Sephadex G50.

Adicionou-se 1 mL da formulação lipossomal e alíquotas de 1mL foram coletadas. As primeiras frações foram descartadas, pois não se observava a coloração marrom, sendo que apenas a partir da quarta fração foi observada a eluição de lipossomas contendo NPM.

Coletou-se até a fração 15, porém a partir da fração 12 não se observou mais a coloração amarronzada, característica dos magnetolipossomas.

Na Figura 18, é possível observar a amostra de magnetolipossomas sendo eluída na coluna de Sephadex® G50.

Figura 18 - Cromatografia de exclusão de tamanho, magnetolipossomas eluídos na coluna de Sephadex G50 em tampão HEPES pH 7,4.



Fonte: dados da pesquisa.

É importante ressaltar que a Sephadex G50 tem uma porosidade em torno de 30000 Daltons, que se convertermos para nanômetros seria igual a 25nm (ERICKSON, 2009), sabe-se que o gel empacotado dentro da coluna possui uma matriz porosa, que permite a separação das partículas por diferença de tamanho. Partículas menores como é o caso das NPM que tem tamanho da ordem de 13,5 nm, ficarão retidas na matriz do gel tendo o sua eluição retardada. Portanto consegue-se a separação das partículas não encapsuladas das não encapsuladas nos magnetolipossomas.

Na Figura 19 são observadas as alíquotas obtidas na eluição do magnetolipossomas. Pode-se observar que a amostra está concentrada em 7 frações, com 1 mL em cada. Após a obtenção das frações coletadas, foi feito um *pull* com estas amostras obtendo assim a amostra que foi analisada e quantificada posteriormente.

Figura 19 – Frações coletadas na eluição do magnetolipossomas na coluna de Sephadex G50.

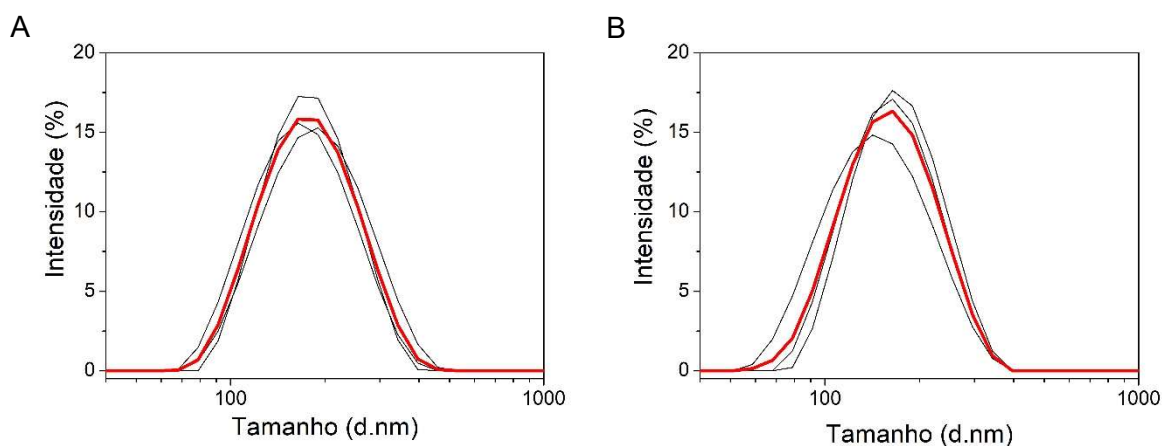


Fonte: dados da pesquisa.

Após a coleta, a amostra foi quantificada quanto o tamanho de partículas pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (dynamic laser scattering – DLS Figura 20 A e B).

A curva em vermelho que está representada em cada gráfico representa a média de três leituras. A amostra foi quantificada antes da eluição pela coluna (LipoMag A), onde o pico de máxima intensidade determina o diâmetro hidrodinâmico médio do magnetolipossomas cujo valor foi igual a 165 nm, e depois da eluição pela coluna (LipoMag D) o diâmetro hidrodinâmico médio foi de 149 nm.

Figura 20 – Caracterização dos magnetolipossomas antes da eluição pela coluna (A) e após eluição pela coluna (B) de Sephadex G50, pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS)



Fonte: dados da pesquisa.

A Tabela 7 relaciona o nome das amostras, os valores de diâmetro médio e polidispersão das amostras analisadas.

Tabela 7 – Diâmetro médio e Pdl dos magnetolipossomas antes e depois da eluição pela coluna de Sephadex G50 preparados com 64mM de fosfolipídios estruturais e na proporção de diluição 1:3 fluido magnético de dextrana para tampão sulfato de amônio pH 3.0.

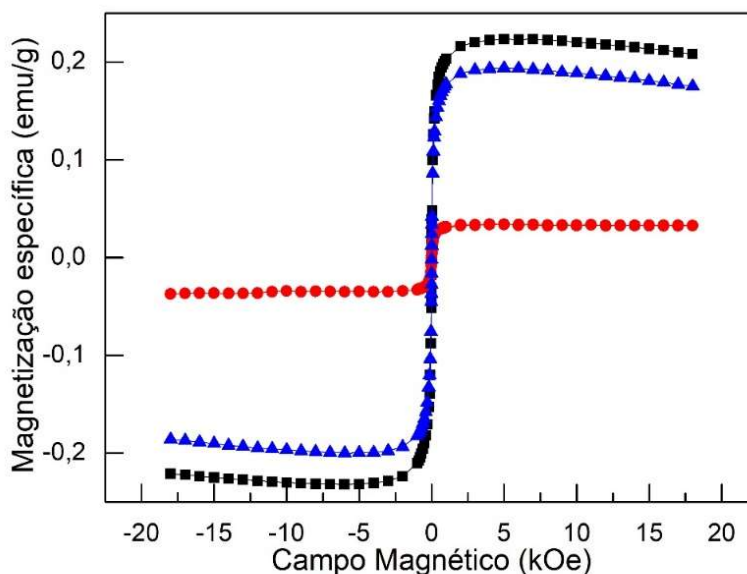
Amostra	Diâmetro (nm)*	PDI*
LipoMag A	165 ± 7	0,105 ± 0,019
LipoMag D	149 ± 13	0,097 ± 0,021

*Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. (n = 3).

Na figura 21, são mostradas as curvas de magnetização do fluido magnético de NPM de ferrita de manganês recoberta com dextrana na proporção de 1:3 (FM: tampão sulfato de amônio pH 3.0) apresentado na curva preta. A curva em azul representa o magnetolipossoma após a extrusão e antes da eluição pela coluna de Sephadex[®] G50 e a curva em vermelho representa a curva de magnetização do magnetolipossomas após a extrusão e após a eluição pela coluna.

Nota-se que houve uma diluição da amostra após a eluição pela coluna diminuindo-se assim, o sinal magnético das partículas encapsuladas dentro dos magnetolipossomas devido a diluição pela coluna. 1 mL da formulação lipossomal foi colocado na coluna e se coletou 7 mL de amostra após eluição.

Figura 21 – Curva de magnetização do fluido magnético, magnetolipossomas antes e depois da coluna de Sephadex G-50. (Quadrado Preto) - fluido magnético de NPM de ferrita de manganês recoberta com dextrana na proporção 1:3 (FM:Tampão sulfato de amônio pH3.0), (Triângulo Azul) – magnetolipossoma após o preparo e antes de passar pela coluna de Sephadex e (Círculo Vermelho) – magnetolipossoma após o preparo e depois de passar pela coluna de Sephadex.



Fonte: dados da pesquisa.

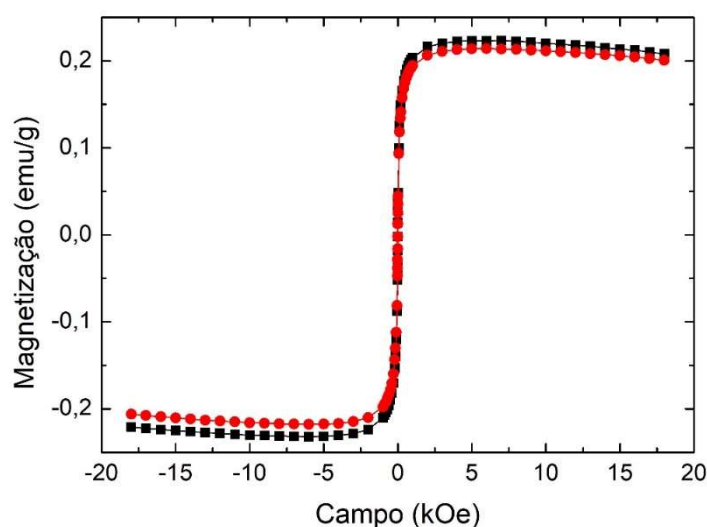
Com isto, procurou-se formas de concentrar os magnetolipossomas que foram eluídos pela coluna. O secador de amostra por nitrogênio é uma forma viável de se concentrar a amostra para um volume requerido, a fim de se obter uma amostra com maior concentração de partícula magnética.

Colocou-se o volume de 7 mL (coletados após eluição pela coluna de Sephadex) em um tubo de ensaio e foi posto dentro do concentrador de amostra. Deixou-se sob agitação e incidência de nitrogênio afim de se reduzir o volume de 7 mL para 1 mL. Após a concentração da formulação lipossomal, foi realizada uma nova leitura de magnetização para se determinar a nova concentração de partículas magnéticas dos magnetolipossoma. Este resultado está apresentado na Figura 22.

Pode-se observar que após a concentração da amostra para o volume de 1 mL, obteve-se valor de magnetização de saturação igual a 0,21 emu/g. Este valor fica próximo ao obtido se comparar ao fluido magnético na concentração de 1:3 onde a magnetização específica foi igual a 0,23 emu/g.

A partir do valor da magnetização específica pode-se calcular a fração volumétrica de NPM encapsuladas dentro do magnetolipossoma que foi igual a 0,08% e a concentração de NPM encapsuladas no magnetolipossoma foi de 4,0 mg/mL.

Figura 22 – Curva de magnetização específica do magnetolipossoma (círculos vermelhos) e fluido magnético (quadrados pretos) obtidas pela técnica de magnetometria de amostra vibrante (MAV).



Fonte: dados da pesquisa.

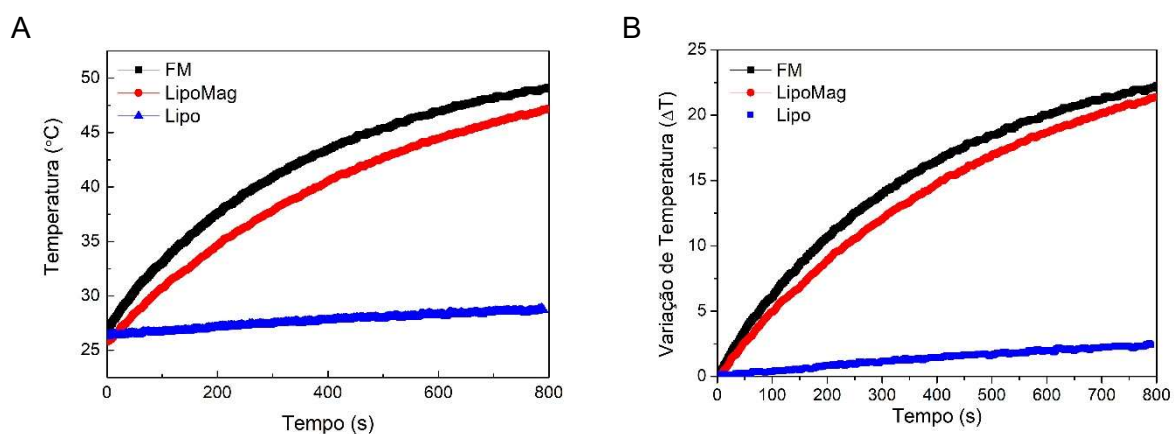
As medidas de magnetohipertermia (MH) foram realizadas com as amostras de fluido magnético e com o magnetolipossoma preparado após a concentração. A amostra de fluido magnético recoberto com dextrana estava na concentração de 1:3 (diluído com o tampão sulfato de amônio pH 3,0).

A amostra de magnetolipossoma foi passada pela coluna e posteriormente concentrada para o volume de 1 mL. Uma alíquota de 500 μ L foi colocada no equipamento de magnetohipertermia. O campo magnético alternado aplicado foi de 342 Oe com frequência de 334 kHz. Os valores de SLP (eficiência magnetotérmica) foram calculados após a análise das curvas de temperatura em função do tempo, foi utilizado um tempo padrão de 30 segundos para o cálculo do SLP.

Foram obtidos os valores de SLP de 59,5 W/g e 56,4 W/g, respectivamente para o fluido magnético e para o magnetolipossoma. A curva de magnetohipertermia para a amostra de fluido magnético e magnetolipossoma está apresentada na Figura 23. Onde a Figura 23 A representa a curva de magnetohipertermia a partir da temperatura ambiente. Já a Figura 23 B apresenta o mesmo comportamento de curva

porem a curva foi normalizada para a temperatura ambiente. Começando assim a partir do valor 0 demonstrando a variação de temperatura obtida para os sistemas estudados.

Figura 23 – Perfil de magnetohipertermia do fluido magnético de ferrita de manganês revestida com dextrana na concentração de 1:3 (linha preta). Perfil de magnetohipertermia do magnetolipossoma (linha vermelha). Foi aplicado o campo magnetico alternado de 342 Oe na frequencia de 334 kHz. A leitura e o tempo de analise durou 800 segundos. (A) Valor da temperatura medida ao longo do tempo de exposição ao campo magnético alternado, (B) Variação da temperatura ao longo do tempo (ΔT).



Fonte: dados da pesquisa.

5.3 CONCLUSÕES

Fluidos magnéticos contendo NPM de ferrita de manganês recobertas com dextrana foram sintetizados pelo método de coprecipitação, os quais foram investigados por diferentes técnicas experimentais. A técnica de difração de Raios-X comprovou a presença de ferritas com estrutura cristalina do tipo espinélio. Através do Raios-X do padrão de difração foi possível obter o diâmetro médio do cristalito de 13,5 nm.

A caracterização magnética foi obtida em temperatura ambiente por meio da magnetometria de amostra vibrante. As NPM apresentaram magnetização específica de $M_p = 51,7$ emu/g. Medidas em alto campo do fluido magnético permitiram a obtenção da concentração de partículas no fluido magnético.

Os magnetolipossomas, que são lipossomas contendo nanopartículas de ferrita de manganês recobertas com dextrana, foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de extrusão. Apresentaram diâmetro médio de 165 nm e polidispersão de 0,105. Através da técnica de magnetometria de amostra vibrante foi possível determinar a fração volumétrica de NPM encapsuladas no magnetolipossoma, a qual foi de 0,08%. A concentração de partícula encapsuladas dentro do magnetolipossoma que foi igual a 4,0 mg/mL.

As medidas de magnetohipertermia do fluido magnético e do magnetolipossoma, em 334kHz e campo de 342 Oe, apresentou SLP para o fluido magnético de 59,5 W/g e 56,4W/g para o magnetolipossoma.

6 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MAGNETOLIPOSSOMAS CONTENDO DOXORRUBICINA E SUPERFÍCIE MODIFICADA COM ÁCIDO FÓLICO

6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1 Materiais

Doxorrubicina (pureza >99%, LC Laboratories, USA), Fosfatidilcolina de soja (LIPOID[®], Alemanha), colesterol (Sigma-Aldrich[®]), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amina(polietilenoglicol)-2000] DSPE-PEG(2000)-NH₂ (Avanti[®] Polar Lipids, EUA), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)-2000] – DSPE-mPEG-(2000) (Avanti[®] Polar Lipids, EUA), 1,2-diesteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[folato(polietilenoglicol)-2000] – DSPE-mPEG-(2000)-AF (sintetizado no laboratório), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico - HEPES (>99,5%, Sigma, Brasil), Trietilamina (99%, Sigma-Aldrich[®], Brasil), Dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma-Aldrich[®], Brasil), acetonitrila e metanol (J.T.Baker, grau HPLC, EUA), ácido trifluoracético (TFA) (Sigma-Aldrich[®], Brasil), filtro para seringa 0,22 µm (Millex[®], Merck, Alemanha), água ultra pura Mili-Q (Milli-Q, Millipore, EUA), N-hidroxissuccinimida (Sigma-Aldrich[®]), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (Sigma-Aldrich[®]), tubo de dialise 3,5 kDa (Fisher Scientific), tubo de dialise 12-14 kDa (Fisher Scientific). Todos os outros solventes utilizados foram grau analítico.

6.1.2 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica, modelo AG-200, marca: Gehaka, Brasil;
- Agitador tipo vórtex, modelo AP-56, marca: Phoenix;
- Agitador magnético, modelo TE-085, marca: Tecnal, Brasil;
- Centrifuga, modelo mini spin plus, marca: Eppendorf, Alemanha;
- Evaporador rotativo, modelo RV 10, marca: IKA[®], Alemanha;
- Extrusor, marca: Northen Lipids, Canadá;
- Bomba a vácuo, modelo TE-0581, marca: Tecnal, Brasil;
- pHmetro digital, modelo pg1800, marca: Gehaka, Brasil;
- Banho de ultrassom, modelo UltraSonic Cleaner, marca Unique, Brasil;
- Centrifuga, modelo mini spin plus, marca: Eppendorf, Alemanha;

- Sistema de purificação de água MiliQ, modelo Direct 8, marca MiliQ, EUA;
- Chapa aquecedora, modelo C-Mag HS7, marca: IKA®, Alemanha;
- Misturador por tombamento, modelo RT 10 power Werke, marca: IKA®, Alemanha;
- Liofilizador (Thermo Electron Corporation, EUA);
- Espectrômetro 640-IR (Varian, EUA).

6.1.3 MÉTODO

Neste capítulo, será apresentada a encapsulação da doxo em magnetolipossomas com superfície modificada com DSPE-PEG2000 e vetorizada para o receptor folato.

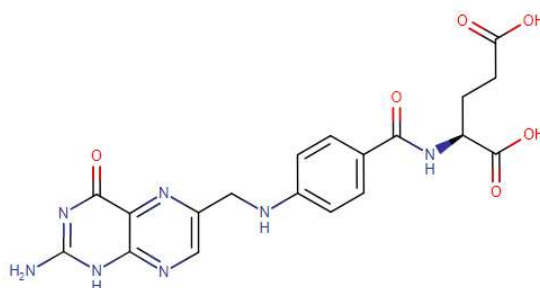
Para a encapsulação da doxo utilizou-se da técnica de encapsulação por gradiente de pH e gradiente de íons amônio. Para a vetorização para o receptor folato, procurou-se uma síntese para ancorar o ácido fólico ao lipídio peguilado, esta síntese foi desenvolvida anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa integrado por este pesquisador (PERES-FILHO et al., 2017) obtendo um processo de síntese mais fácil e com melhor rendimento para o lipídio peguilado vetorizado.

6.1.3.1 Síntese do produto DSPE-PEG(2000)-Ácido Fólico

Tem-se relatos, há mais de 20 anos na literatura de métodos para a funcionalização de lipídios para a ancorar o ácido fólico (AF) (Figura 24) na superfície lipossomal via sua conjugação a lipídio peguilado (DSPE-PEG(2000)) (Figura 25) (LEE; LOW, 1995).

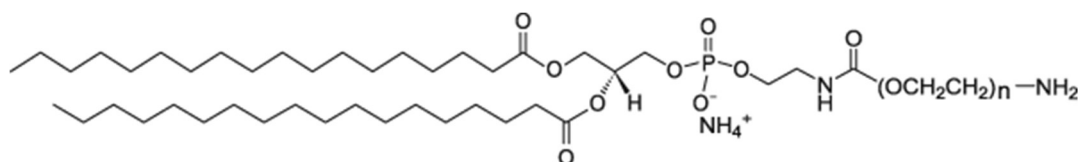
Com isto, o objetivo é que o ligante AF possa interagir com células que superexpressam o receptor folato e seja preferencialmente internalizado por estas células em comparação a células que não expressam o receptor folato (GABIZON et al., 1999). Para a obtenção do DSPE-PEG(2000)-Ácido fólico foi utilizada a metodologia descrita por Peres-Filho (2017), cuja síntese proposta foi baseada em métodos encontrados na literatura (CHAN et al., 2007; ZHANG; YAO, 2012).

Figura 24 – Formula molecular do Ácido fólico (massa molar = 441,37 g/mol).



Fonte: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00158>. Acesso em: 25.julho.2018.

Figura 25 – Formula molecular do DSPE-PEG(2000)-NH₂ (massa molar = 2788,79 g/mol)



Fonte: Avanti® Polar Lipids, <https://avantilipids.com/product/880128>. Acesso em: 25.julho.2018.

Na síntese, 100 mg de ácido fólico foram adicionados à mistura de DMSO anidro (4mL) contendo aproximadamente 1,25% (50 µL) de Trietilamina (TEA), para serem dissolvidos, sob agitação e em condições anidras, ao abrigo da luz, durante 12 horas.

Posteriormente, à mistura descrita acima, foi acrescida diciclohexilcarbodiimida (DCC) e N-Hidroxisuccinimida (NHS), mantendo-se a agitação e as condições anidras, ao abrigo da luz, por outras 18 horas. A proporção molar entre AF, DCC e NHS foi de 1:1:2. Foram, então, adicionados 46,75 mg de DCC e 52,16 mg de NHS. Nesta etapa, observou-se a formação de precipitado formado a partir desta reação, a diciclohexilureia (DCU). Para removê-la, o meio reacional foi filtrado em filtro para seringa de 0,22 µm.

Depois deste período, adicionou-se à mistura de ácido fólico ativado 400 mg de DSPE-PEG-NH₂, foram mantidos sob agitação ao abrigo da luz por 12 horas.

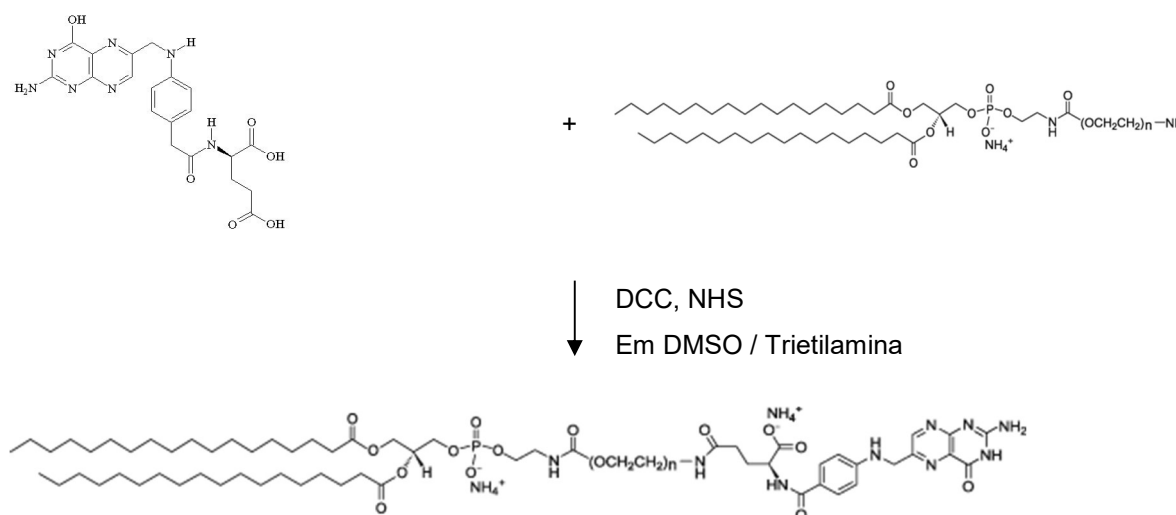
Em seguida, a reação pôde ser confirmada pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), com eluente composto por clorofórmio:metanol:água (75:36:6 v:v:v), comparando-se o meio reacional com a solução padrão de DSPE-PEG-NH₂.

Foram adicionados 50 mL de água Mili-Q ao meio reacional e, posteriormente, a amostra foi centrifugada para remover traços de substâncias insolúveis.

O sobrenadante foi dialisado usando tudo de diálise 3,5 kDa, contra salina (50 mM), duas vezes, e água Milli-Q, três vezes, para remover traços de DMSO e o ácido fólico que não reagiu. O dialisado foi, em sequência, congelado a -20°C e liofilizado por 36h sob baixa pressão e baixa temperatura.

Com isto obteve-se o produto DSPE-PEG(2000)-AF, cuja síntese está representada de forma esquemática na Figura 26.

Figura 26 – Síntese do conjugado DSPE-PEG(2000)-AF (massa molar = 3228,95 g/mol)



Fonte: (PERES-FILHO et al., 2017).

6.1.3.2 Caracterização do produto da síntese DSPE-PEG(2000)-AF por FTIR

Neste estudo, o ensaio utilizado para caracterização do produto após a síntese foi a Espectroscopia no Infravermelho com Transformada Fourier (FT-IR).

As amostras foram analisadas em FT-IR utilizando o aparato de Refletância Total Atenuada (ATR). Analisou-se, separadamente, os reagentes ácido fólico e DSPE-PEG(2000)-NH₂ e o produto da reação. Obteve-se na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e com 126 scans por análise.

6.1.3.3 Preparo dos magnetolipossomas com superfície modificada

As formulações lipossomais foram preparadas pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de extrusão (GREGORIADIS; SENIOR, 1980; KIRBY; CLARKE; GREGORIADIS, 1980; SHARMA; SHARMA, 1997).

Inicialmente, por esta técnica, produz-se populações heterogêneas de vesículas multilamelares que após seguidas repetições de extrusão (Figura 4) são obtidas vesículas unilamelares de tamanho reduzido (80 a 200 nm) (SHARMA; SHARMA, 1997; VEMURI; RHODES, 1995). Este método tem sido bastante empregado por ser simples, relativamente rápido e facilmente reprodutível.

Os magnetolipossomas foram previamente preparados seguindo os métodos descritos no item 5.1.3.5 e 5.1.3.6, utilizando o fluido magnético de ferrita de manganês recoberto por dextrana.

A Tabela 8 apresenta a composição dos magnetolipossomas desenvolvidos neste estudo.

Tabela 8 – Formulações lipossomais desenvolvidas.

Formulação	Concentração				
	PC (mM)	Col (mM)	PEG (mM)	PEG-AF (mM)	Doxo (mg)
LipoPegMag	64mM	32mM	5,0	-	-
LipoPegMagVet	64mM	32mM	4,5	0,5	-
LipoDoxoPegMag	64mM	32mM	5,0	-	2
LipoDoxoPegMagVet	64mM	32mM	4,5	0,5	2

Legenda: Lipo : lipossoma, Doxo: doxorubicina, Peg: peguilado, Vet: vetorizado, Mag: fluido magnético ferrita de manganês, PC: fosfatidilcolina, Col: colesterol.

Para a incorporação do lipídio peguilado nos magnetolipossomas utilizou-se da técnica de pós-inserção (NAKAMURA et al., 2012b; USTER et al., 1996). Para isto dissolveu-se 14 mg de DSPE-PEG em 1 mL de clorofórmio, em um frasco de vidro. O clorofórmio foi eliminado do sistema sob fluxo de gás nitrogênio. Uma alíquota de 1 mL da formulação lipossomal foi colocada em um frasco contendo o lipídio peguilado, que havia sido previamente preparado. O sistema foi colocado sob agitação lenta (50 rpm), em agitador orbital, por 24 horas. Ao final, foram obtidas a formulação LipoPegMag, conforme apresentado na Tabela 8.

Para o magnetolipossoma vetorizado com ácido fólico foi dissolvido 12,6 mg de DSPE-PEG e 1,6 mg de DSPE-PEG-AF em 1 mL de clorofórmio, em frasco de vidro. O clorofórmio foi eliminado do sistema sob fluxo de gás nitrogênio. Depois da extrusão, foi retirada uma alíquota de 1 mL da formulação lipossomal. A alíquota foi adicionada ao frasco com o DSPE-PEG e DSPE-PEG-AF seco. O sistema foi colocado no agitador orbital por 24 horas, sob agitação lenta. Ao final, foram obtidas a formulação LipoPegMagVet, conforme apresentado na Tabela 8.

Todas as formulações foram feitas em pelo menos três lotes diferentes.

6.1.3.4 Encapsulação da doxorubicina no magnetolipossoma com superfície modificada

Para a encapsulação da Doxo, utilizou-se o método de gradiente de pH e íons amônio (BARENHOLZ, 2001). Neste método, é criado um gradiente, entre a fase externa (tampão HEPES pH 7,4) e o interior do lipossoma com tampão sulfato de amônio pH3.0. A Doxo, uma vez no interior dos lipossomas, reage com o sulfato formando um sal insolúvel (sulfato de doxorubicina), que precipita no interior da cavidade lipossomal. Este método de preparo possibilita taxa de encapsulação próximo de 93% (HARAN et al., 1993; ZUCKER et al., 2009).

Esta alta taxa de encapsulação leva a eliminação de uma purificação final, que tem o objetivo de eliminar o fármaco que não foi encapsulado na formulação lipossomal.

Para a encapsulação da Doxo nos magnetolipossomas com e sem superfície modificada, a uma alíquota de 1 mL da formulação lipossomal já preparada no subitem 6.1.3.3 adicionou-se a 2 mg de cloridrato de Doxo liofilizado, ficando a amostra mantida por 12 h sob refrigeração a 4°C.

6.1.3.5 Distribuição de tamanho e índice de polidispersão

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho das vesículas foram determinadas utilizando-se a técnica de espalhamento de luz em equipamento Zeta Sizer NanoS (*Malvern Instruments*, Inglaterra). Uma alíquota de 0,05 ml de cada amostra foi diluída em 1mL de tampão HEPES pH 7,4, a dispersão foi transferida para uma cubeta que foi inserida no equipamento para a análise da amostra na temperatura ambiente. Em cada leitura, foi obtido o diâmetro médio dos magnetolipossomas (nm)

e o índice de polidispersão (Pdi), que é a medida da distribuição do tamanho dos lipossomas na dispersão. A análise foi realizada em triplicata, na temperatura de 25°C e os valores foram expressos como média ± desvio-padrão (DP).

6.1.3.6 Nanosight – NTA

A análise de localização de partícula (NTA – Nanoparticle Tracking Analysis) é um método usado para analisar em tempo real nanopartículas em um meio, que se baseia no movimento Browniano das partículas. Este método permite analisar partículas com tamanho entre 10 nm a 2000 nm. O movimento Browniano realizado por estas partículas é avaliado em tempo real por uma câmera digital científica, em que é cada partícula que visualizada é monitorada (rastreada) e através do software do equipamento faz-se a gravação do rastreamento da partícula (LTD; CARR; WRIGHT, 2012). A visualização da partícula em escala nano é possível devido à dispersão da luz quando iluminada por um laser. A intensidade da luz espalhada pela partícula é captada pela câmera e o movimento monitorado frame a frame. Neste método a taxa de movimento das partículas está relacionada ao raio hidrodinâmico equivalente a uma esfera, calculado através da equação de Stokes-Einstein.

Este método permite calcular o tamanho da partícula, a concentração da população das partículas de mesmo tamanho, e o potencial zeta da partícula. Cada partícula rastreada tem o seu caminho monitorado e a distância média percorrida de cada partícula (no eixo x e y) é calculado automaticamente pelo software. A partir deste valor, é possível calcular o coeficiente de difusão da partícula (D_t), a partir da viscosidade do meio (η) e o diâmetro hidrodinâmico (d) e a temperatura (T) e a espessura do porta amostra. O software fazendo uso da equação de Stokes-Einstein (Equação 20), onde K_B é a constante de Boltzmann (LTD; CARR; WRIGHT, 2012) calcular o tamanho da partícula.

$$\frac{[(x, y)]^2}{4} = D_t = \frac{K_B T}{3\pi\eta d}$$

Equação 20

6.1.3.7 Eficiência de encapsulação (EE%)

Para cálculo de eficiência de encapsulação, inicialmente, foi realizada a quantificação da Doxo por CLAE, utilizando método já validado (seção 4).

Para quantificar o total de fármaco, 100 µL de cada formulação (magnetolipossoma peguilado e magnetolipossoma vetorizado) foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL. Em seguida, foram adicionados 2 mL de metanol e posteriormente levados a um banho de ultrassom, sem aquecimento, por 20 minutos. Após esse período, os balões foram aferidos com metanol, para se obter uma concentração teórica de Doxo igual a 40 µg/mL. Colocou-se o volume dos balões em um tubo falcon e levou-se a centrifuga a 2000g por 10 minutos. Cada amostra foi analisada em triplicata.

Para a quantificação da Doxo encapsulada, primeiramente foi necessário separar a Doxo livre da Doxo encapsulada. Para isto, utilizou-se da técnica de cromatografia de exclusão de tamanho utilizando Sephadex® G50. 1 mL da suspensão lipossomal foi inserido lentamente na coluna de Sephadex, pelas paredes da coluna, com o intuito de evitar perturbação da parte superior da coluna. A eluição da amostra aplicada foi feita com tampão HEPES pH 7,4. Após a aplicação, frações de 1mL foram coletadas.

Posteriormente, foi feito um *pull* com os 7 eppendorf que continham as frações dos magnetolipossomas com Doxo encapsulada. 700 µL de cada formulação (magnetolipossoma peguilado e magnetolipossoma vetorizado) foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL.

Em seguida, foram adicionados 2 mL de metanol e posteriormente levados a um banho de ultrassom, sem aquecimento, por 20 minutos. Após esse período, os balões foram aferidos com metanol, a fim de se obter uma concentração teórica de Doxo igual a 40 µg/mL.

Colocou-se o volume dos balões em um tubo falcon e levou-se a centrifuga a 2000g por 10 minutos.

Cada amostra foi analisada em triplicata. O cálculo da eficiência de encapsulação (EE%) é dado pela Equação 21.

$$E.E. \% = \frac{\text{massa de doxo encapsulado (mg)}}{\text{massa de doxo inicial (mg)}} \times 100 \quad \text{Equação 21}$$

6.1.3.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A amostra de lipossoma com Doxo foi preparada para microscopia eletrônica de transmissão por crioprocessamento (crio-MET). As imagens foram obtidas em microscópio Tecnai F20 Twin (FEI, Hillsboro, OR, EUA). A amostra foi preparada usando protocolo já estabelecido anteriormente (BANIZS et al., 2014). Para a criomicroscopia, uma gotícula de amostra é colocada na telinha de microscopia e o excesso de líquido é removido com papel de filtro. Em seguida, utilizando uma haste, a amostra é imediatamente imersa em etano líquido. A transferência para o microscópio de transmissão foi feita utilizando um porta-amostra contendo nitrogênio líquido.

Esta etapa do estudo foi realizada pela Profa. Dra. Eliana Martins Lima em colaboração do laboratório Molecular Electron Microscopy Core na Universidade da Virginia, EUA.

6.1.3.9 Magnetometria de amostra vibrante e cálculo da fração volumétrica

A caracterização magnética foi feita utilizando o magnetômetro de amostra vibrante (MAV) operado numa faixa de intensidade de campo magnético igual a $-20 \text{ kOe} \leq H \leq 20 \text{ kOe}$ (em unidade do CGS) e frequência de oscilação da amostra igual a 100 Hz. Para as formulações de magnetolipossomas foram utilizadas alíquotas de 60 μL que foram colocadas no porta-amostra e inseridas no equipamento para a leitura, obtendo um gráfico emu/campo magnético.

A partir do gráfico foi possível calcular a fração volumétrica das formulações lipossomais através da Equação 18.

6.1.3.10 Magnetohipertemia do magnetolipossoma com superfície modificada

Foi determinada a resposta magnetotérmica para as amostras de magnetolipossomas com superfície modificada e coencapsulando Doxo. Um eppendorf contendo 500 μL de magnetolipossoma foi posicionado no interior da bobina do equipamento de magneto hipertemia. Estabeleceu-se na bobina uma corrente elétrica alternada de 8,2 A com frequência de 334 kHz gerando um campo magnético de 342 Oe no ponto aonde a amostra estava localizada.

6.1.3.11 Ensaio de liberação do magnetolipossoma por magnetohipertermia

Utilizou-se da técnica de magnetohipertermia para se fazer a liberação da Doxo coencapsulada nos magnetolipossomas com superfície modificada. Um eppendorf contendo 500 μL de magnetolipossoma foi posicionado no interior da bobina do equipamento de magnetohipertermia. Foi estabelecido na bobina uma corrente elétrica alternada de 8,2 A com frequência de 334 kHz gerando um campo magnético de 342 Oe no ponto aonde a amostra está localizada.

Para propósitos terapêuticos (terapia térmica), a temperatura dever ser mantida acima de 43°C por um intervalo de tempo da ordem de 20 – 30 minutos (DEWHIRST et al., 2003; VAN RHOON, 2016). Esperou-se a amostra atingir a temperatura de 43°C o que ocorreu por volta de 10 min e logo após, fez-se o controle do campo com objetivo de se manter a temperatura por 30 minutos.

Após a aplicação do campo, passou-se a amostra pela coluna de cromatografia de exclusão de tamanho utilizando Sephadex® G50 para separar a Doxo liberada. 500 μL da suspensão lipossomal foram inseridos lentamente na coluna de Sephadex, pelas paredes da coluna, com o intuito de evitar perturbação da parte superior da coluna. A eluição da amostra aplicada foi feita com tampão HEPES pH 7,4. Após a aplicação, frações de 500 μL foram coletadas.

Posteriormente, foi feito um *pull* com os 7 eppendorf que continham as frações dos magnetolipossoma com Doxo que não foi liberada. Em seguida, congelou-se a amostra e liofilizou-se para concentrar o volume dos 7 eppendorf.

O pó liofilizado foi ressuspenso em volume de 500 μL . Após, foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL. Em seguida, foram adicionados 2 mL de metanol e levados a um banho de ultrassom, sem aquecimento, por 20 minutos.

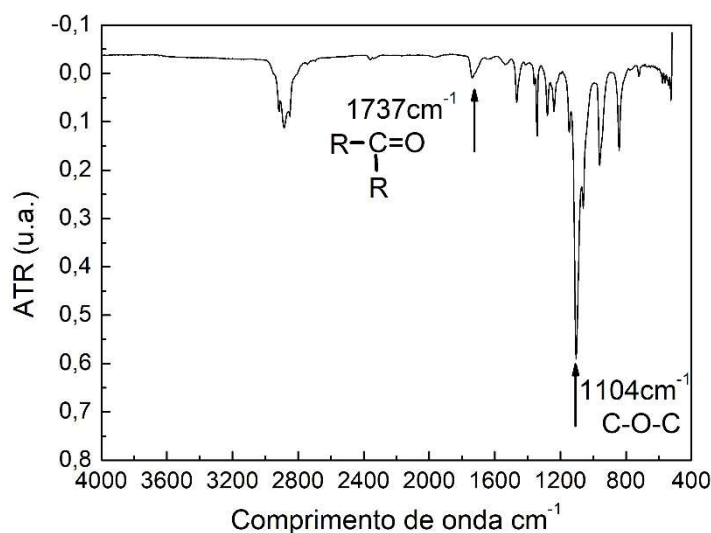
Após esse período, o volume dos balões foram completados com metanol. Colocou-se o volume dos balões em um tubo falcon e levou-se a centrifuga a 2000g por 10 minutos. Cada amostra foi analisada em triplicata. O cálculo da eficiência de encapsulação é dado pela Equação 19, apresentada na seção 5.1.3.6.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 Caracterização por FTIR do DSPE-PEG(2000)-Ácido Fólico

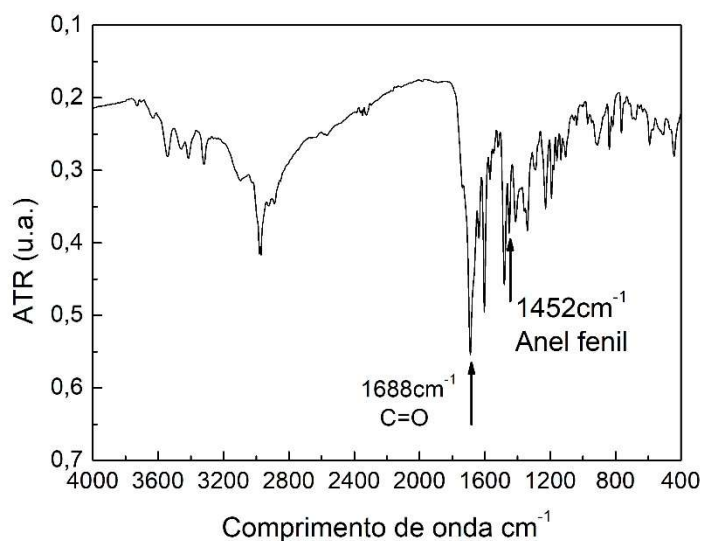
Os espectros na região do infravermelho (IV) obtidos do DSPE-PEG(2000)-NH₂, ácido fólico, respectivamente puros e do produto da reação estão indicados nas Figuras 27 a 29. O espectro do DSPE-PEG(2000)-NH₂ (Figura 27) apresenta uma banda larga, característica do estiramento de grupos atribuíveis às ligações C-O-C das unidades monoméricas do polietilenoglicol, que aparecem em 1104 cm⁻¹, (CRAPARO et al., 2011; HE et al., 2012). Houve, ainda, uma banda de carbonila de cetona em 1737 cm⁻¹, que aparece em citações na literatura como banda característica para o DSPE-PEG(2000)-NH₂ (ABDULLA; TAN; DARWIS, 2010).

Figura 27 – Espectro de FTIR do DSPE-PEG(2000)-NH₂ puro.



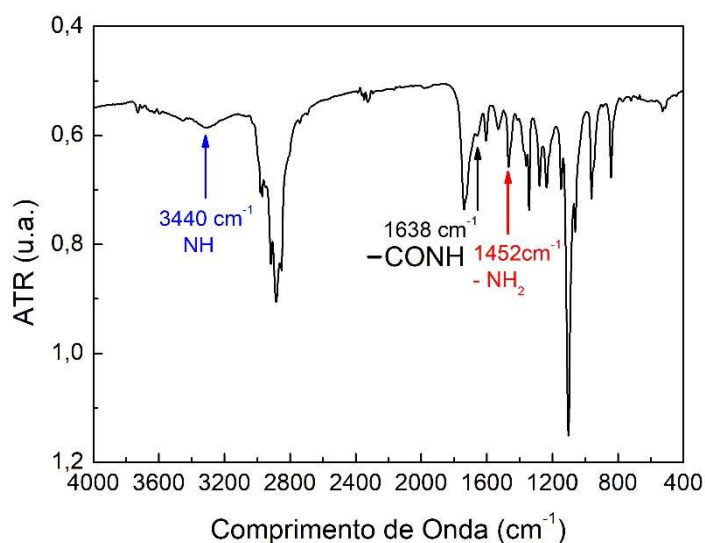
Fonte: dados da pesquisa.

No espectro referente ao ácido fólico (Figura 28) pode-se visualizar a banda característica do estiramento de grupos carbonila C=O em 1688 cm⁻¹. Foi possível observar também a banda que é atribuída ao anel fenil em 1452 cm⁻¹ (VARSHOSAZ et al., 2014).

Figura 28 – Espectro de FTIR do Ácido Fólico puro.

Fonte: dados da pesquisa.

Com base nestes resultados pode-se verificar que os reagentes estavam puros e próprios para a utilização na reação. Com isto os compostos foram utilizados na reação e obteve-se o produto DSPE-PEG(2000)-AF. A análise por FTIR foi realizada para comprovar a ligação do ácido fólico ao DSPE-PEG(2000), sendo que na Figura 29 foi apresentado o gráfico do espectro na região do infravermelho.

Figura 29 – Espectro de FTIR do produto da reação DSPE-PEG(2000)-AF.

Fonte: dados da pesquisa.

Foi possível observar bandas características de estiramento NH e C=O do grupamento $-\text{CONH}_2$, em 3440 cm^{-1} e 1638 cm^{-1} . Houve ainda uma banda relacionada ao $-\text{NH}_2$ em 1452 cm^{-1} . Desta forma, os dados obtidos indicam a presença de interações entre as moléculas sugerindo a reação entre as duas moléculas (HEIDARI MAJD et al., 2013; PERES-FILHO et al., 2017).

O rendimento foi calculado como a diferença do peso de soluto colocado antes da reação total para o peso obtido do pó liofilizado e o rendimento para esta reação foi de 82%. Peres-Filho et al. (2017) obteve como rendimento 87% para esta reação, que apesar de ser uma reação que demora-se 78 horas para a obtenção do produto da síntese. O produto da síntese tem um alto rendimento. Podendo assim ser usado como um lipídio peguilado vetorizado para o receptor folato.

6.2.2 Caracterização dos magnetolipossomas contendo doxo e com superfície modificada com ácido fólico

Os valores de diâmetro médio, PDI e número de magnetolipossomas estão representados na Tabela 9 e os gráficos relativos à distribuição do tamanho dos magnetolipossomas estão representados na Figura 30.

Para todas as formulações, o diâmetro médio foi inferior a 200 nm, com cerca de 90% da distribuição de tamanho estando abaixo de 250 nm.

As formulações apresentaram valores de PDI menores que 0,3 o que indica boa homogeneidade dos sistemas. O PDI reflete a distribuição do tamanho dos magnetolipossomas e pode variar de 0,0 a 1,0 para sistemas mono e polidispersos, respectivamente. O diâmetro médio dos magnetolipossomas com vetorização foi ligeiramente superior ao dos magnetolipossomas sem vetorização. A encapsulação da Doxo, entretanto, gerou magnetolipossomas de diâmetro médio similar àqueles sem adição do fármaco. Para todas as formulações, o número de partículas se manteve, devido ao método de preparo. Uma vez que os lipossomas são extrusados e somente após a extrusão que o lipídio peguilado com vetorização e sem vetorização é adicionado, não muda as características dos magnetolipossomas já preparados.

Essa reprodução relacionada ao tamanho dos lipossomas foi possível devido ao método de extrusão que é uma forma relativamente rápida de se produzir lipossomas com populações monodispersas de vesículas unilamelares de tamanho médio controlado. Uma vez que os lipossomas passam por uma membrana de poro pré-definida de 100 nm sobre pressão de nitrogênio. Por esses motivos, o método é

amplamente usado para aplicações farmacêuticas e na pesquisa. Uma vez que ao preparar os lipossomas possuímos vesículas multilamelares grandes, formadas após a hidratação do filme lipídico, e extrusadas pelo poro da membrana de policarbonato, elas se reorganizam formando vesículas menores e de distribuição de tamanho mais estreita após sucessivas passagens pela membrana, atingindo distribuição final comparável ao tamanho do poro (ÇAĞDAŞ; SEZER; BUCAK, 2014; PERES-FILHO et al., 2017; SPERA et al., 2015).

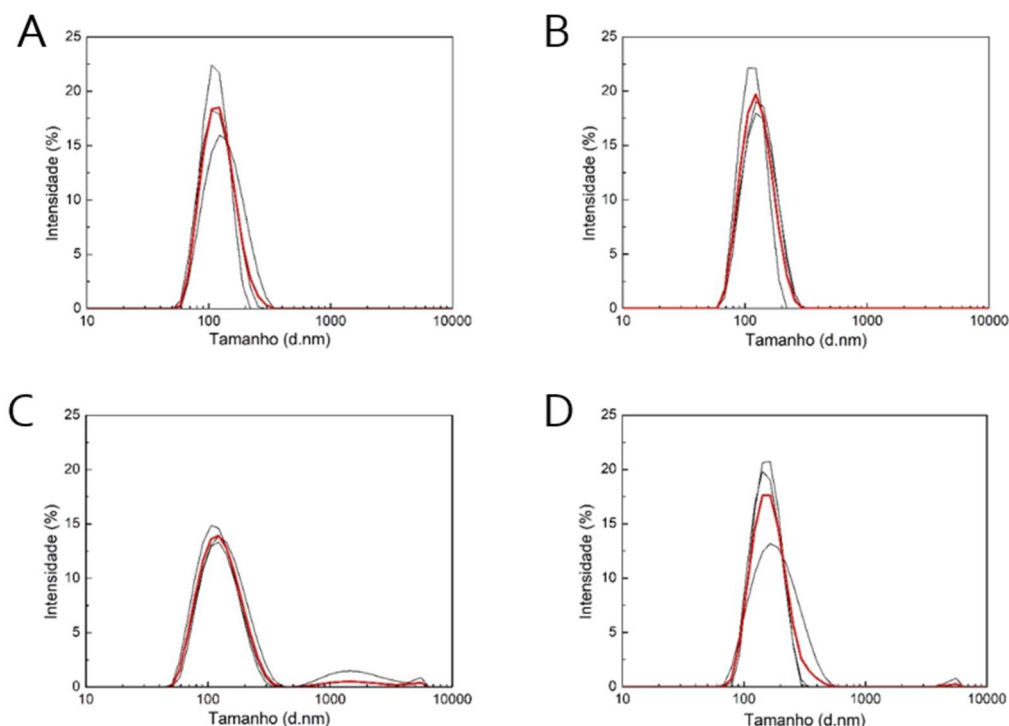
Tabela 9 – Valores de diâmetro médio, Pdl e número de partículas dos magnetolipossomas com e sem superfície modificada com ácido fólico. Lipossomas foram preparados com 69mM de fosfolípidios estruturais e na proporção de diluição 1:3 fluido magnético com nanopartículas magnéticas de ferrita de manganês recobertas com dextrana para tampão sulfato de amônio pH 3.0.

	Diâmetro (nm)	Pdl	Concentração partícula/mL
LipoPegMag	116 ± 8	0,134	3,8 ± 0,6 E14
LipoPegMagVet	125 ± 10	0,201	4,6 ± 0,3 E14
LipoDoxoPegMag	121 ± 7	0,144	2,5 ± 0,2 E14
LipoDoxoPegMagVet	156 ± 14	0,103	5,1 ± 0,5 E14

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. (n = 3).

Vale ressaltar que os magnetolipossomas vetorizados foram obtidos pela técnica de pós-inserção, onde envolve uma agitação lenta das vesículas para que a ancora lipídica que está acoplada ao ácido fólico se insira na bicamada lipídica dos lipossomas. Dessa forma, ficando posicionada exclusivamente no lado externo ao magnetolipossoma. Com isto apresentando um tamanho para o diâmetro hidrodinâmico maior para as formulações com vetorização (GAZZANO et al., 2018; PERES-FILHO et al., 2017).

Figura 30 – Curvas de distribuição de tamanho das formulações desenvolvidas após preparo.



Fonte: dados da pesquisa. (A) LipoPegMag; (B) LipoDoxoPegMag; (C) LipoPegMagVet; (D) LipoDoxoPegMagVet.

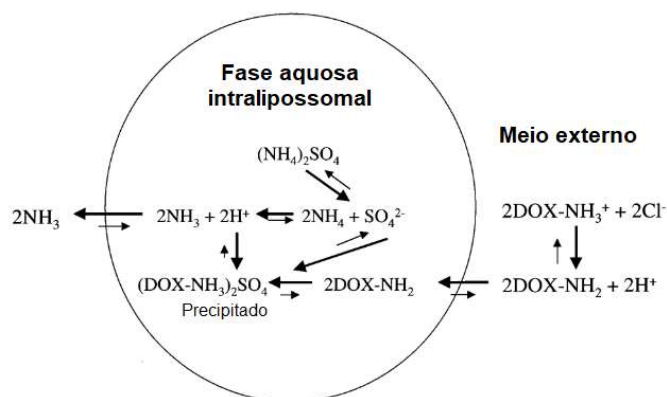
6.2.3 Eficiência de encapsulação

Para a encapsulação, a fase externa do magnetolipossoma está em tampão HEPES pH 7,4 enquanto a fase interna do magnetolipossoma continha o tampão sulfato de amônio 300 mM pH 3,0.

A doxo é capaz de atravessar a membrana lipossomal por difusão passiva e atingir o seu interior aquoso, onde interage com os íons sulfato formando sulfato de doxorubicina, que é um sal insolúvel(BARENHOLZ, 2001).

Na Figura 31, mostra-se a representação esquemática da encapsulação da Doxo nos lipossomas. Com isso, há geração de um gradiente que permite a encapsulação de praticamente toda a quantidade de moléculas de doxo (BARENHOLZ, 2001).

Figura 31 - Representação esquemática da encapsulação da doxo nos lipossomas. No meio externo, a Doxo está em equilíbrio entre sua forma neutra (doxo) e o sal cloridrato de doxorubicina (doxo^+Cl^-). A doxo livre é capaz de difundir pela membrana lipossomal. No interior do lipossoma, o sulfato de amônio se dissocia em NH_3 que se difunde pela membrana enquanto os íons H^+ e SO_4^{2-} podem reagir com a doxo, formando sulfato de doxorubicina $(\text{DOX})_2\text{SO}_4$, que é um sólido e precipita no interior do lipossoma (Barenholz, 2001).



Fonte: adaptado (BARENHOLZ, 2001).

A eficiência de encapsulação (EE%) da Doxo nas formulações lipossomais foi de $92 \pm 2\%$ para o LipoDoxoPegMag e $94 \pm 3\%$ para o LipoDoxoPegMagVet, com resultados para a eficiência de encapsulação apresentados na Tabela 10.

Qui et al. (2012) observou uma eficiência de encapsulação de $\sim 97\%$ para encapsulação de Doxo juntamente com difosfato de cloroquina que é um fármaco amplamente utilizado para o tratamento de antimalárica e agentes reumatóides, porém é considerado tóxico quando usado por um prolongado tempo, mas que recentemente teve novos estudos comprovando a sua eficácia para tumores que apresentam resistência a múltiplos fármacos. Os fármacos foram coencapsulados em uma formulação de lipossomas tendo com diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas próximo de 130 nm (QIU et al., 2012).

Em comparação ao já comercializado Doxil[®] que apresenta eficiência de encapsulação de 95% para um lipossoma peguilado e de tamanho próximo a 100 nm (BARENHOLZ, 2012), nosso lipossoma além de encapsular a Doxo em seu interior aquoso também torna viável a coencapsulação de partículas magnéticas em seu interior aquoso. Observando que as NPM não competem com o fármaco pelo espaço dentro do lipossoma podendo ser coencapsulados.

Tabela 10 – Determinação de eficiência de encapsulação da doxorubicina nos magnetolipossomas pela técnica de gradiente de pH e íons amônio.

	Eficiência (%)*
LipoDoxoPegMag	92 ± 2
LipoDoxoPegMagVet	94 ± 3

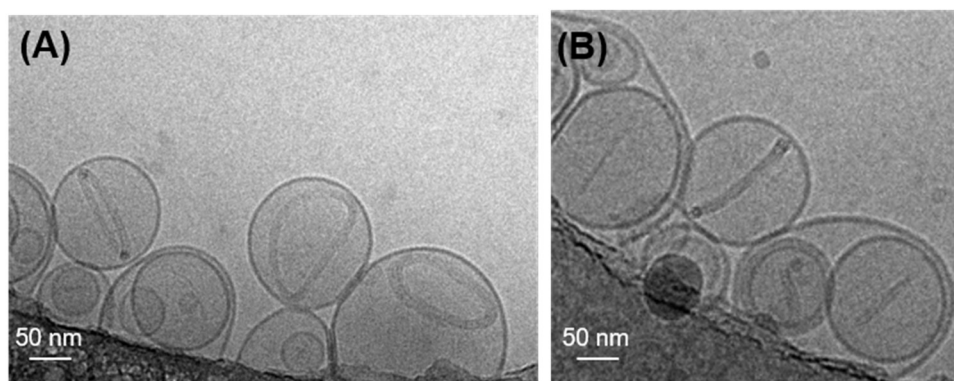
Fonte: dados da pesquisa. *Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. (n = 3).

6.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Um modo eficiente de se obter as características dos lipossomas com Doxo encapsulada em seu interior aquoso é utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de transmissão com processamento da amostra por congelamento (Crio-TEM). Imagens de Crio-TEM de lipossomas foram obtidas a fim de confirmar a encapsulação da DOXO no interior dos lipossomas.

As Figuras 32 A e B são imagens de Crio-TEM de lipossomas produzidos pelo método de hidratação do filme lipídico seguido por extrusão e gradiente de pH e íons. Observou-se que foi formado o cristal de Doxo no interior dos lipossomas comprovando assim que o método escolhido para a produção dos lipossomas pode ser utilizado para a coencapsulação de NPM e doxo em seu interior aquoso. Resultados já apresentados na literatura obtiveram as mesmas características ao encapsular a Doxo em lipossomas (BARENHOLZ, 2012).

Figura 32 – Microscopia de transmissão com crioprocessamento



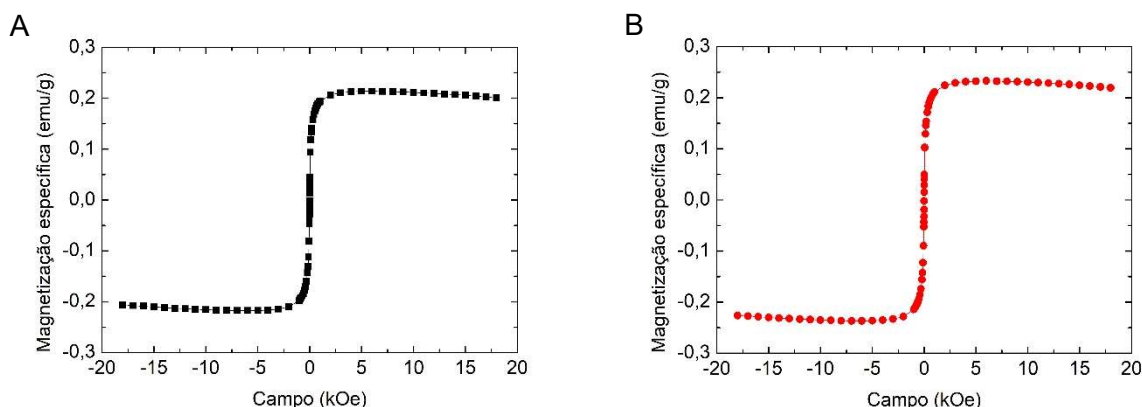
Fonte: dados da pesquisa.

6.2.5 Magnetometria de amostra vibrante e cálculo da fração volumétrica

Os magnetolipossomas foram avaliados quanto à magnetização de saturação e concentração de partículas magnéticas por técnica de magnetometria de amostra vibrante, a partir das curvas de magnetização das formulações lipossomais de magnetolipossoma contendo NPM de ferrita de manganês recoberta com dextrana coencapsulando doxorubicina em seu interior aquoso com e sem direcionamento para o receptor folato.

Os dois gráficos apresentados na Figura 33 mostram o comportamento de curva de magnetização.

Figura 33 – Curvas de magnetização específica. (A) LipoDoxoPegMag; (B) LipoDoxoPegMagVet.



Fonte: dados da pesquisa.

Através das curvas de magnetização foi possível calcular a fração volumétrica da formulação lipossomal através da Equação 18. Obteve-se valores de fração volumétrica de 0,08% e 0,09% para as formulações lipossomais LipoDoxoPegMag e LipoDoxoPegMagVet, respectivamente, e concentração de NPM de 4,2 e 4,5 mg/mL para as formulações lipossomais LipoDoxoPegMag e LipoDoxoPegMagVet, respectivamente.

Houve-se valores parecidos já obtidos em estudos anteriores apresentados neste trabalho (seção 5.2.4). Verificando assim que mesmo após a coencapsulação da Doxo e a adição da vetorização, as propriedades magnéticas das NPM encapsuladas nos magnetolipossomas se manteve.

Shirmardi et al. (2017) preparou magnetolipossomas com 1-myristoyl-2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (MPPC) e diferentes concentrações de NPM com tamanho de 3,9nm, neste estudo ele estima que devido ao tamanho das

partículas, elas podem estar não no interior aquoso, mas sim na membrana lipídica pois devido ao tamanho molécula de MPPC ser de 3 nm estima se que a membrana lipídica deva ter da ordem de 6,5 nm de espessura. Podendo a NPM está na membrana lipídica. Para preparar os lipossomas o mesmo não utiliza o método de hidratação de filme lipídico seguido de extrusão, em seu trabalho utiliza a hidratação seguida de sonicação conseguindo um tamanho do magnetolipossoma por volta de 32,5 nm e encapsulando em seu interior calceína como fármaco modelo encapsulado em seu interior (SHIRMARDI SHAGHASEMI; VIRK; REIMHULT, 2017).

Chen et al. (2010) preparou magnetolipossoma com concentração de partícula magnética de 0,38 mg/mL e tamanho de partícula de 5 nm, os lipossomas apresentam tamanho próximo de 101 nm, e foram preparados para estudos de liberação por magnetohipertermia, em seus estudos obteve eficiência de liberação de 80% para o fluoróforo como modelo de liberação (CHEN; BOSE; BOTHUN, 2010).

Apesar de nossa proposta de trabalho seja a coencapsulação no interior aquoso com a Doxo, podemos ter uma previsão de como o nanocarreador irá se comportar quanto aos estudos de MH, pois mesmo em concentrações baixa a literatura conseguiu produzir lipossomas que possam ser usados para liberar localmente o antineoplásico.

6.2.6 Magnetohipertermia do magnetolipossoma com superfície modificada

O tratamento por hipertermia magnética tem sido uma promissora alternativa para liberação, redução e inibição de tumores, sendo já relatada a maior sensibilidade de células tumorais ao aumento de temperatura (AL-AHMADY et al., 2012; KATAGIRI; NAKAMURA; KOUMOTO, 2010; SANSON et al., 2011).

Neste sentido, foram realizadas medidas de magnetohipertermia nas formulações lipossomais com aplicação de um campo magnético alternado de 342 Oe com frequência de 334 kHz, na temperatura inicial de 25°C, atingindo uma temperatura máxima de 43°C. Esse limite de temperatura foi ajustado por ser a temperatura que a literatura reporta como sendo a faixa de temperatura empregada em hipertermia para causar o início da morte celular (ITO; HONDA; KOBAYASHI, 2006; KOSSATZ et al., 2015).

Para cada uma das formulações lipossomais foi utilizado um tempo padrão de medida de 100 segundos para o cálculo do SLP. Ou seja, por meio destes dados obteve-se a taxa de variação temporal da temperatura. A massa de material

magnético foi obtida pela análise dos dados de magnetometria. Utilizando a Equação 19, estimou-se o valor de SLP a partir dos dados extraídos após a análise das curvas de temperatura em função do tempo para cada formulação.

A Tabela 11 apresenta os dados de SLP para cada formulação, observou-se que a variação de SLP entre as amostras não apresentaram diferença análise estatística significativa. Esta variação não foi suficiente para haver diferença no aquecimento das formulações, com isto, pode-se verificar que a coencapsulação da Doxo e a vetorização não altera a eficiência de aquecimento da formulação.

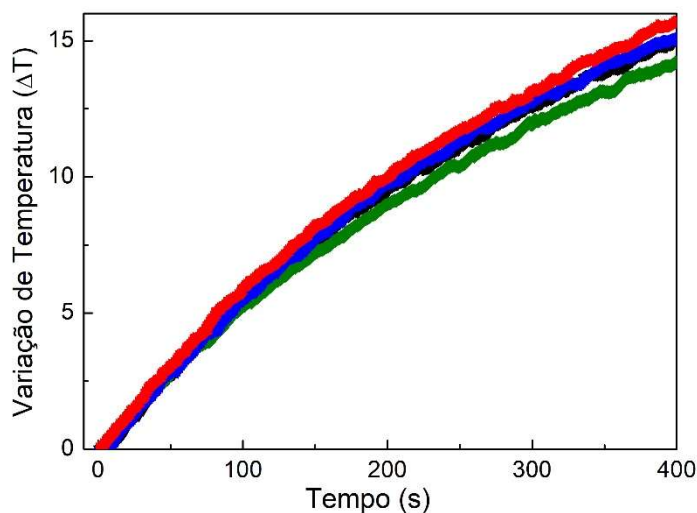
Tabela 11 – Valores de magnetohipertermia de magnetolipossomas com e sem vetorização para o receptor folato e com ou sem a coencapsulação de Doxo.

	SLP (W/g)
LipoPegMag	56,1
LipoPegMagVet	55,4
LipoDoxoPegMag	57,3
LipoDoxoPegMagVet	54,9

Fonte: dados da pesquisa.

Analisando a Figura 34 verifica-se que as formulações lipossomais atingem a temperatura de 43°C em 400 segundos, apresentando resultados de aquecimento para as amostras de magnetolipossomas. Assim, esses dados demonstram que as NPM encapsuladas nas formulações lipossomais preparadas podem ser promissoras para o uso em magnetohipertermia.

Figura 34 – Ensaio de magnetohipertermia para as formulações lipossomais. O equipamento utilizado é o modelo nanoTherics™ fabricado pela empresa Magnetherm TM do Laboratório de Física Térmica do IF-UFG. Nas configurações de campo 342 Oe e frequência de 334 kHz.

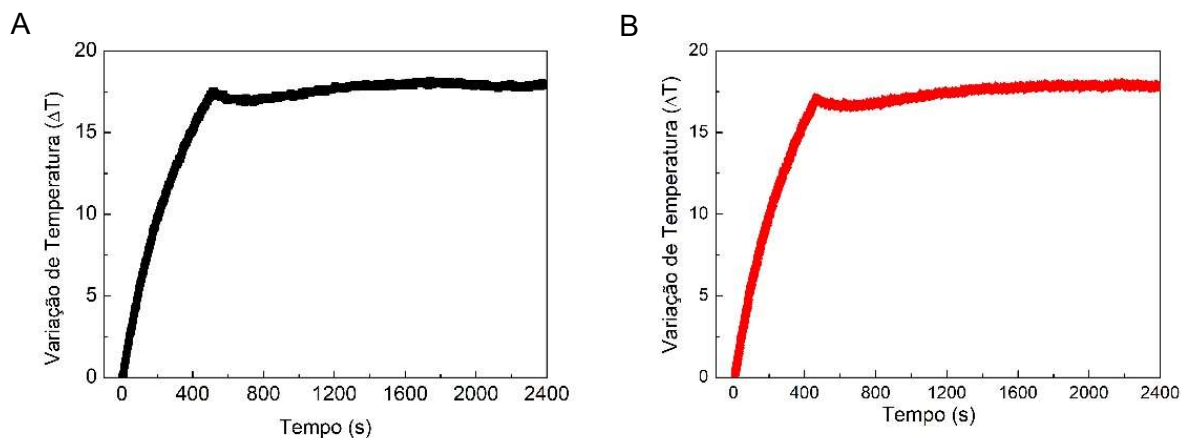


Fonte: dados da pesquisa. (linha preta) LipoPegMag; (linha verde) LipoPegMagVet, (linha azul) LipoDoxoPegMag; (linha vermelha) LipoDoxoPegMagVet.

6.2.7 Ensaio de liberação do magnetolipossoma por magnetohipertermia

Um dos focos principais deste trabalho é a liberação controlada por magnetohipertermia de doxorrubicina de magnetolipossomas com direcionamento para o receptor folato. Para propósitos terapêuticos, a temperatura deve ser mantida acima de 43°C e por um intervalo de tempo da ordem de 20 – 30 minutos (DEWHIRST et al., 2003; VAN RHOON, 2016). Por isto, no ensaio de liberação por magnetohipertermia aplicou-se um campo magnético AC de 342 Oe com frequência de 334 kHz, esperou-se a amostra atingir a temperatura 43°C e logo após, fez-se o controle do campo afim de se manter a temperatura em 43°C e manteve-se a temperatura por mais 30 minutos, como apresentado na Figura 35 A e B.

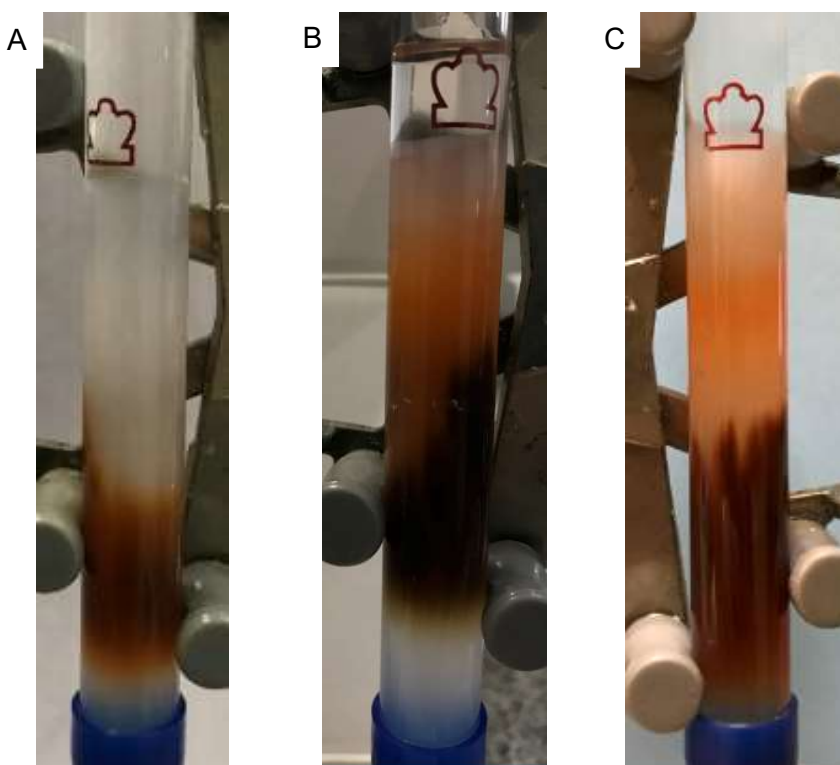
Figura 35 – Ensaio de liberação da Doxo por magnetohipertermia. O equipamento utilizado é o modelo Nanotherics fabricado pela empresa Magnetherm TM do Laboratório de Física Termica do IF-UFG. Nas configurações de campo 342 Oe e frequência de 334 kHz.



Fonte: dados da pesquisa. (A) LipoDoxoPegMag; (B) LipoDoxoPegMagVet.

Após a aplicação da magnetohipertermia, a formulação lipossomal foi eluída pela coluna de Sephadex com intuito de se separar o fármaco que foi liberado pela técnica de magnetohipertermia. Para efeito de comparação uma formulação LipoDoxoPegMag sem a aplicação de magnetohipertermia foi eluída pela coluna de Sephadex (Figura 36-A), observou-se que a formulação eluída não apresentou coloração avermelhada após a eluição na coluna como observado quando foram eluídas as formulações após a aplicação do campo magnético AC nas formulações lipossomais LipoDoxoPegMag e LipoDoxoPegMagVet (Figura 36 B e C).

Figura 36 - Cromatografia de exclusão de tamanho para magnetolipossomas eluído na coluna de Sephadex G50 antes e após Magnetohipertermia. (A) LipoMagPegDoxo sem a aplicação de magnetohipertermia, (B) LipoDoxoPegMag após a aplicação da magnetohipertermia, (C) LipoDoxoPegMagVet após a aplicação da magnetohipertermia.



Fonte: dados da pesquisa.

Com base em trabalhos na literatura pode-se inferir que a ação de campo magnético AC é capaz de promover a liberação de fármacos encapsulados em nanossistemas contendo nanopartículas magnéticas por ação de magnetohipertermia (OLIVEIRA et al., 2013; SANSON et al., 2011). Em sistemas que combinam peptídeos a bicamada lipídica de magnetolipossomas, a ação de magnetohipertermia pode promover a mudança na conformação desses dos lipídios da estrutura lipossomal aumentando a fluidez da membrana facilitando a liberação (AL-AHMADY et al., 2012). Já em nanossistemas que apresentam bicamada lipídica, como a utilizada neste trabalho, o aquecimento proveniente das NPM altera a transição de fase dos lipídios desestruturando a bicamada e liberando o fármaco (KATAGIRI; NAKAMURA; KOUMOTO, 2010).

Os valores da liberação de doxo por magnetohipertermia nos magnetolipossomas são apresentados na Tabela 12. Os resultados mostraram uma liberação de 53% para LipoDoxoPegMag e 54% LipoDoxoPegMagVet.

No estudo desenvolvido por Hayashi (2014) com nanopartícula de PVA encapsulando doxo e coencapsulando NPM de ferrita, foram obtidos valores de liberação próximos de 60% de fármaco depois de magnetohipertermia com campo magnético alternado aplicado por 30 min alcançando temperatura aplicada a 44°C, com configurações de frequência igual a 230kHz e campo magnético AC de 100 Oe (HAYASHI et al., 2014).

Assim, esses dados demonstram que os magnetolipossomas com NPM e coencapsulando doxo podem ser promissores para a liberação controlada da doxo no *sítio* alvo.

Tabela 12 – Determinação de eficiência de encapsulação da doxo nos magnetolipossomas pela técnica de gradiente de pH e íons amônio.

	Concentração inicial	Concentração após MH	Liberação
LipoDoxoPegMag	1840 ± 40 µg/mL	984 ± 36 µg/mL	53%
LipoDoxoPegMagVet	1870 ± 60 µg/mL	1020 ± 24 µg/mL	54%

Fonte: dados da pesquisa. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Para todas as formulações utilizou-se n = 3.

A magnetohipertermia é relatada como uma terapia adjuvante ou de combinação no tratamento de diferentes tipos de câncer (KOSSATZ et al., 2015). Estudos promissores mostram o benefício notável com o uso de magnetohipertermia no tratamento de neoplasia cerebral em camundongos (LEE et al., 2011). Os resultados deste estudo indicaram que apesar da reincidência de tumores depois do tratamento, os animais tiveram uma boa resposta quando comparados ao tratamento apenas com quimioterápico.

Sendo promissora no auxílio da liberação controlada no *sito* alvo. Diminuindo assim os efeitos colaterais do fármaco e tendo uma maior eficiência terapêutica.

6.3 CONCLUSÕES

O procedimento de síntese da ancora lipídica com ácido fólico ligado que foi desenvolvido dentro do nosso laboratório foi bem-sucedido. Os dados da análise de espectro de FT-IR indicam a presença da interação entre os compostos analisados. O rendimento dessa reação foi entorno de 82%. Podendo assim ser utilizado nos lipossomas vetorizados para o receptor do ácido fólico.

O diâmetro médio para os magnetolipossomas preparados neste trabalho foi de 121 nm para LipoDoxoPegMag e 156 nm para LipoDoxoPegMagVet e o índice de polidispersão de 0,144 e 0,103, respectivamente, (sendo verificada sua monodispersão). A E.E% foi de 92 e 94 % para as formulações lipossomais LipoDoxoPegMag e LipoDoxoPegMagVet, respectivamente, indicando que os lipossomas obtidos possuem alta carga de fármaco.

A aplicação da magnetohipertermia levou a liberação do fármaco em ~ 54% para ambas as formulações. Sugerindo uma potencial aplicação terapêutica, podendo ser comprovar de grande eficiência o controle da liberação do fármaco por magnetohipertermia.

7 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO*

7.1 MATERIAL E MÉTODOS

7.1.1 Material

Linhagem celular B16F10, linhagem celular MCF7, proveniente do Banco de Célula do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil), meio DMEN Sigma-Aldrich™, soro fetal bovino (Sigma-Aldrich™), penicilina (Gibco™), estreptomicina (Gibco™), garrafa de cultivo celular de 75 cm², tripsina (Sigma-Aldrich™), EDTA (Sigma-Aldrich™), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich™), microplacas de 96 poços, DMSO (Syn®),

7.1.2 Equipamento

- Estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂, modelo , marca: , Alemanha;
- Espectrofotômetro, modelo Multiskan Spectrum, marca: Thermo Scientific, USA;

7.1.3 Metodologia

7.1.3.1 Linhagem celular e cultivo celular

Foi utilizada duas linhagens celulares B16F10 e MCF7 para investigar a possível atividade biológica das formulações propostas. A linhagem B16F10 é de origem tumoral de melanoma murino com características fusiformes e epiteliais. A linhagem MCF7 é de origem tumoral de adenocarcinoma mamário. As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 1% de penicilina e estreptomicina cultivadas em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Foram estabelecidas em garrafas de cultivo celular de 75 cm² na concentração de 5x10⁵ células por garrafa. Para a desagregação celular, foi utilizada tripsina/EDTA (0,25%/0,03%). As manutenções das linhagens foram realizadas com o intervalo de um dia.

7.1.3.2 Avaliação da citotoxicidade pelo método de redução do sal de tetrazólio – MTT

O método tem como princípio a incorporação do sal de brometo de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio por células viáveis que, em virtude da alta

atividade metabólica mitocondrial, são capazes de converter o sal incorporado em cristais de formazan que apresentam uma cor violeta própria. A conversão é realizada pela enzima succinato desidrogenase presente em mitocôndrias. Células não viáveis não são capazes de converter o sal. Assim, é possível determinar, de maneira proporcional, a viabilidade celular quando comparada a um controle (D'ARPA; LIU, 1989).

Após o desenvolvimento e caracterização das formulações, o MTT foi escolhido para estabelecer a citotoxicidade. Para isso, foram propostas duas etapas.

A primeira foi correlacionar concentração e tempo de exposição caracterizando, assim, a citotoxicidade. Já na segunda etapa, a proposta era estabelecer correlação entre a concentração exposta de cada uma das formulações com o aumento da temperatura mimetizando, dessa maneira, a exposição em um organismo submetido à magnetohipertermia.

7.1.3.3 Avaliação de atividade biológica

Na primeira etapa, foi estudado a linhagem celular MCF7 para as formulações de LipoDoxoPegMag e LipoDoxoPegMagVet, cada uma das formulações foi testada em sete concentrações obtidas por diluições seriadas a partir da concentração de doxorubicina encapsulada de 1,84 mg/mL e 1,88 mg/mL para as formulações LipoDoxoPegMag e LipoDoxoPegMagVet, respectivamente, (0,0078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0) preparadas em meio RPMI-1640 sem folato. Para a realização desse ensaio, foram usadas microplacas de 96 poços e foi estabelecida a concentração de 5.000 células por poço respeitando as margens que foram preenchidas com meio. Foram realizados três experimentos independentes sendo que, para cada concentração, foram definidas três replicatas.

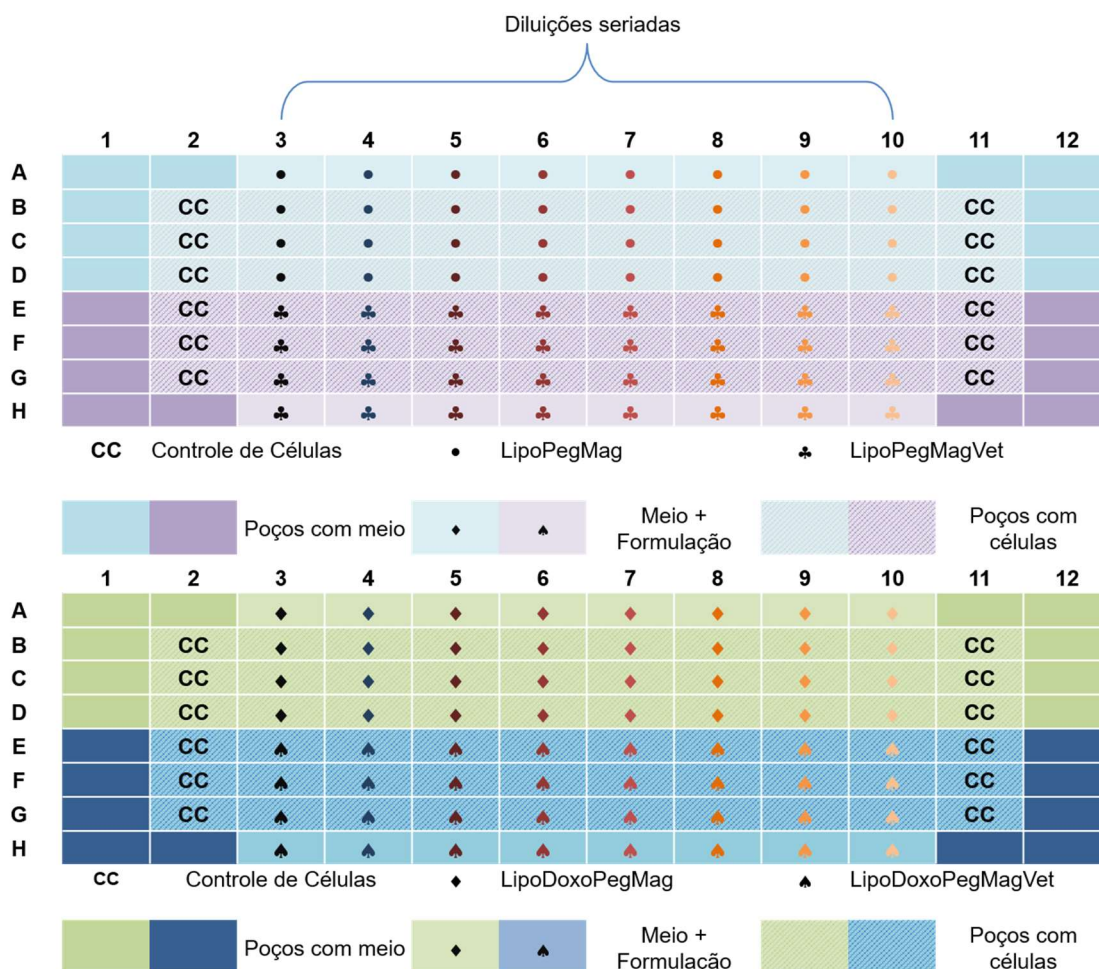
Após 24 horas do plaqueamento da linhagem MCF7, as células foram expostas às concentrações de cada formulação, pelo período de 24 horas. As placas foram mantidas em estufa úmida com 5% de CO₂, a 37°C.

Na segunda etapa, foi estudado a linhagem celular B16F10 onde cada uma das formulações foi testada em oito concentrações obtidas por diluições seriadas a partir da concentração de doxorubicina encapsulada de 1,84 mg/mL e 1,88 mg/mL para as formulações LipoDoxoPegMag e LipoDoxoPegMagVet, respectivamente, (0,0078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0 e 10%) preparadas em meio RPMI-1640 sem folato. Foi utilizado o volume equivalente para as formulações se doxo, LipoPegMag

e LipoPegMagVet. Para a realização desse ensaio, foram usadas microplacas de 96 poços e foi estabelecida a concentração de 5.000 células por poço respeitando as margens que foram preenchidas com meio. Foram realizados três experimentos independentes sendo que, para cada concentração, foram definidas três replicatas.

Após 24 horas do plaqueamento da linhagem B16F10, as células foram expostas às concentrações de cada formulação, pelo período de 24 horas. As placas foram mantidas em estufa úmida com 5% de CO₂, a 37°C. O desenho experimental está ilustrado na Figura 37:

Figura 37– Desenho experimental para realização do ensaio de citotoxicidade usando o método de redução do sal tetrazólio para as formulações propostas.



Fonte: dados da pesquisa.

Após o período de tratamento de 24 horas ambas as células MCF7 e B16F10, em fluxo laminar, foi adicionado, a cada poço, o volume de 10 µL de solução de MTT a 5 mg/mL e mantidas em estufa de cultivo celular a 37°C por mais 3 horas.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e parando à lise celular com isto à solubilização dos cristais de formazan. Foram adicionados, a cada poço, 100 µL de DMSO e agitou-se as placas. Por fim, as placas foram lidas em espectrofotômetro Multiskan Spectrum Thermo Scientific (RISS et al., 2004).

A citotoxicidade de cada formulação foi determinada em função da média da absorbância das células do controle que são tidas como viabilidade de 100%. A Equação 21:

$$Viabilidade \% = \frac{Média\ da\ absorbância\ de\ cada\ concentração}{Média\ da\ absorbância\ do\ CC\ (RPMI)} \quad \text{Equação 21}$$

7.1.3.4 Avaliação da temperatura

Com o intuito de avaliar a influência da temperatura na atividade biológica das formulações, foi proposto um ensaio que comparasse o desempenho destas em temperaturas diferentes. Para isso, o ensaio foi realizado nas temperaturas de 37 e 43°C. Foram definidos quatro tempos de tratamento - 1; 2 e 4 horas - para avaliar a cinética da resposta citotóxica na condição de hipertermia (Tabela 13).

Tabela 13 – Valores de tempo e temperatura o ensaio experimental para avaliar a influência da temperatura na atividade biológica das formulações.

Tempo de tratamento	Temperatura
1 hora	37°C
	43°C
2 horas	37°C
	43°C
4 horas	37°C
	43°C

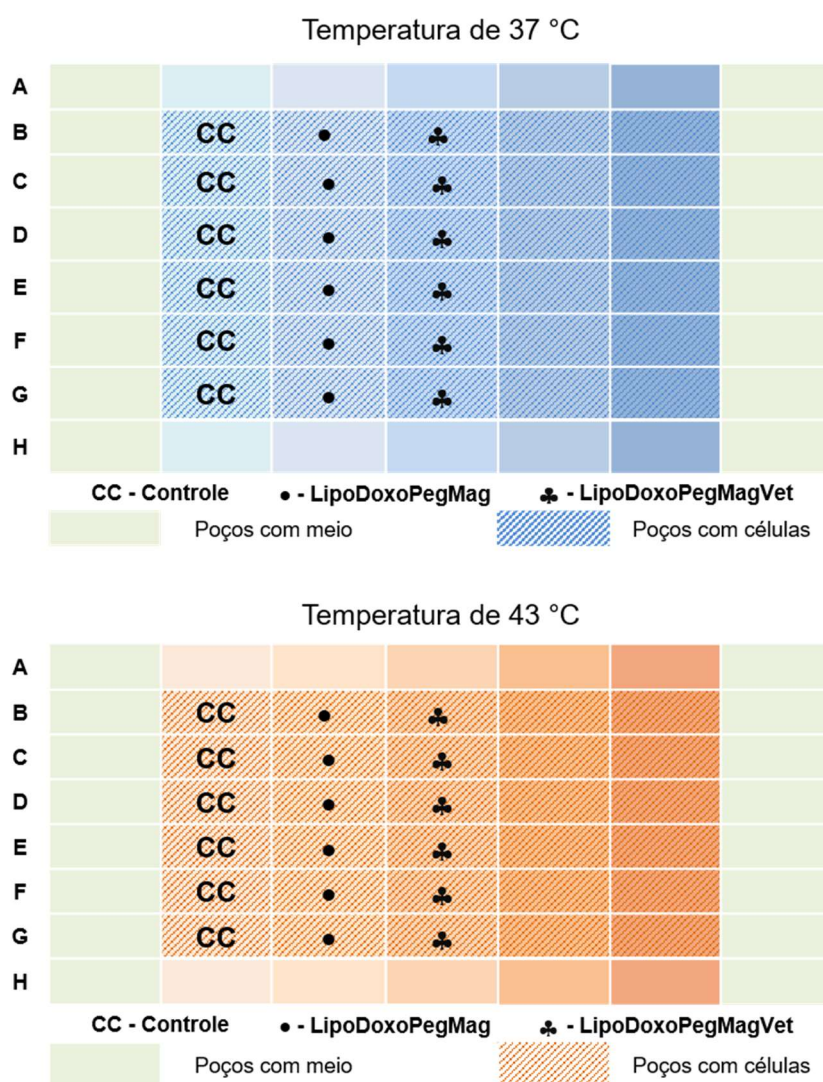
Fonte: dados da pesquisa.

A concentração a ser testada foi definida a partir da avaliação da atividade citotóxica das formulações em linhagem B16F10, na qual foi obtido o valor da concentração inibitória de 50% da população (IC₅₀) para as condições estabelecidas, como já descrito no subitem 7.1.3.3.

Assim, foram usadas microplacas de 96 poços com concentração celular 10.000 células por poço respeitando as margens que foram preenchidas com meio RPMI-1640 sem folato. Após 24 horas do plaqueamento da linhagem B16F10, as células foram expostas às diferentes formulações.

As placas foram mantidas em estufa úmida com 5% de CO₂ pelo tempo e temperatura estabelecidos. Foram realizados três experimentos independentes sendo que para cada formulação, foram definidas seis replicatas. O desenho experimental está ilustrado na Figura 38.

Figura 38 – Desenho experimental para realização do ensaio experimental para avaliar a influência da temperatura na atividade biológica das formulações.



Fonte: dados da pesquisa.

7.1.3.5 Análise estatística

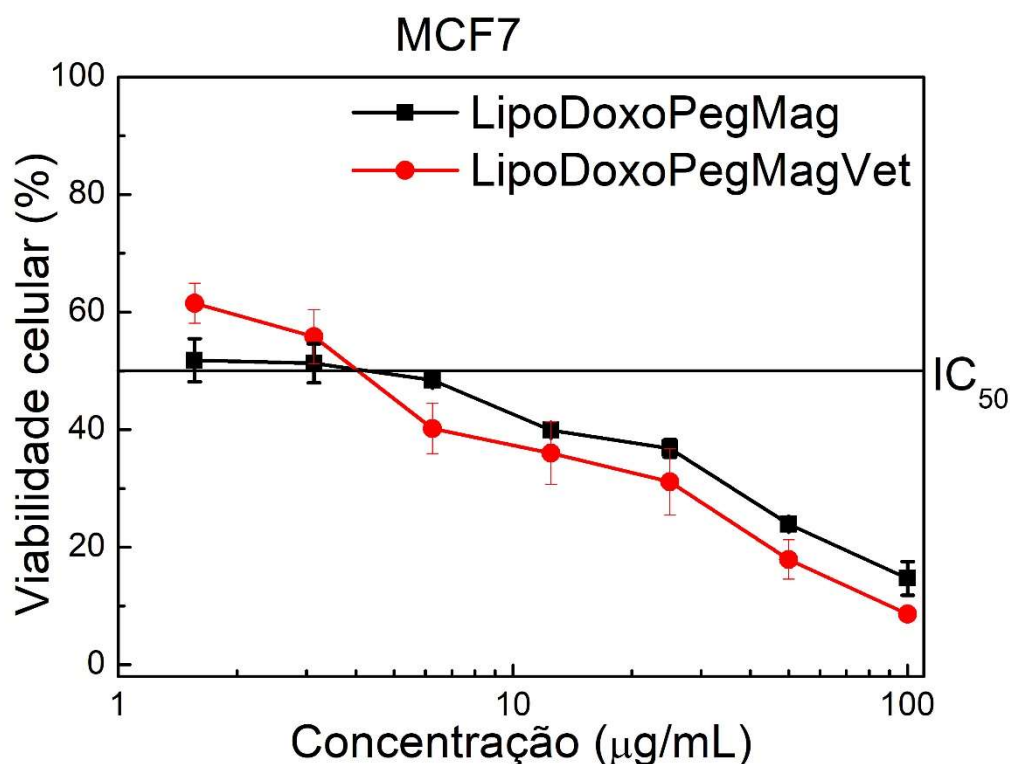
Os valores de viabilidade celular foram expressos como média \pm desvio padrão das análises realizadas. Os valores de CI_{50} foram calculados por meio de regressão não-linear, a partir das curvas de citotoxicidade. Os resultados de viabilidade celular para os ensaios de variação de temperatura, por sua vez, foram comparados mediante análise de variância (ANOVA) para comparação entre os diferentes tempos de incubação, de modo que o teste “t” de student foi utilizado para avaliar a diferença entre as formulações avaliadas. As análises supracitadas foram feitas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0.

7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.2.1 Avaliação de atividade biológica

Após o tratamento das células de adenocarcinoma mamário MCF7 com as diferentes formulações, verificou-se que todas ocasionaram citotoxicidade de modo concentração-dependente, conforme demonstrado na Figura 39.

Figura 39 - Viabilidade das células de adenocarcinoma da glândula mamária MCF7 após exposição às diferentes formulações avaliadas. As células foram expostas a concentrações decrescentes dos lipossomas (100 – 1,56 µg/mL) por 24 horas, de modo que a viabilidade celular foi determinada utilizando-se o método de redução do MTT, mediante a avaliação de três experimentos independentes. (Linha preta) – LipoDoxoPegMag – $IC_{50} = 4,3 \mu\text{g/mL}$, (Linha vermelha) – LipoDoxoPegMagVet – $IC_{50} = 4,2 \mu\text{g/mL}$.



Fonte: dados da pesquisa.

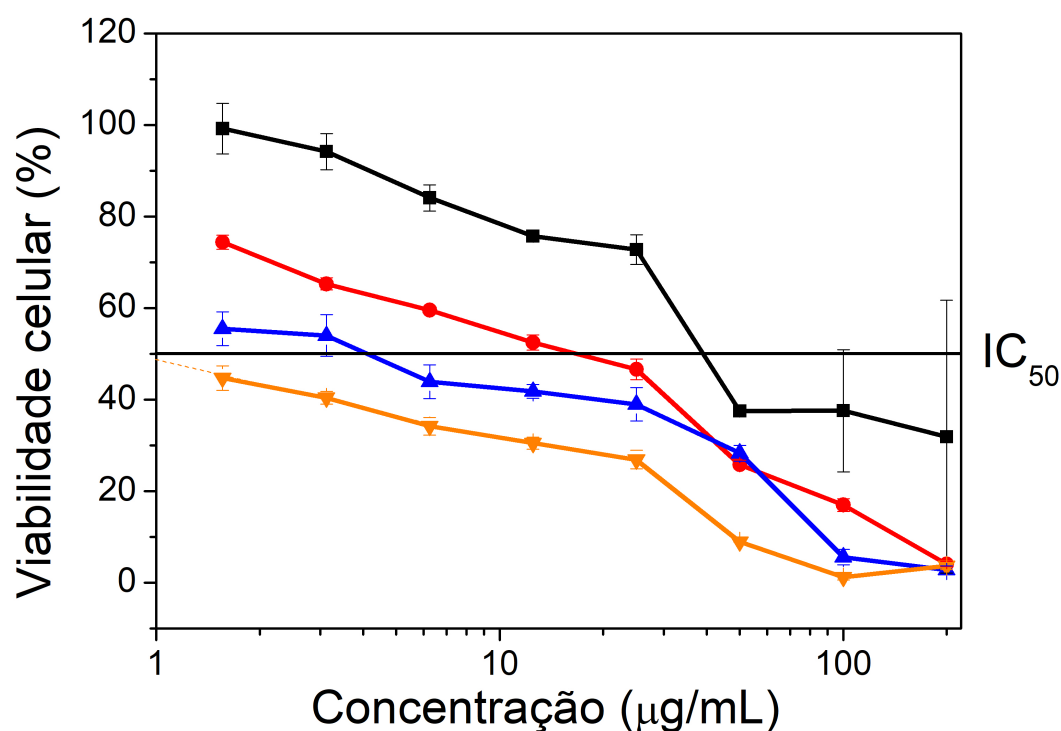
A doxo é um agente citotóxico potente usado contra vários cânceres resistentes e metastáticos (YANG et al., 2014). Conforme a Figura 39 permite visualizar, após a exposição às formulações contendo doxorubicina e nanopartícula magnética com direcionamento ou não para o receptor folato, foram obtidos valores idênticos para o

IC₅₀ (4,2 µg/mL) para as formulações LipoDoxoPegMag e LipoDoxoPegMagVet, no tempo 24h.

Era esperado uma diminuição no IC₅₀ para a formulação com vetorização devido à superexpressão do receptor folato na superfície da célula MCF7, o que não foi observado. Com isto é interessante apontar que a literatura apresenta ampla contradição entre autores que afirmam que a linhagem celular MCF7 superexpressa o receptor folato (LICCIARDI et al., 2010; PAN; FENG, 2009; ZHANG et al., 2012). Em contrapartida, há autores que afirmam que essa mesma linhagem apresenta baixa expressão do receptor folato (BASAL et al., 2009; CHEN et al., 2009; MANSOORI; BRANDENBURG; SHAKERI-ZADEH, 2010). Fica evidente que não há um consenso acerca da expressão do receptor folato na MCF7. Diante da controvérsia apresentada e dos resultados obtidos, também indicativos de que as células MCF7 parecem não superexpressar receptor folato, ensaios adicionais foram feitos com a linhagem celular B16F10.

Após o tratamento das células de melanoma B16F10 com as diferentes formulações, verificou-se que todas ocasionaram citotoxicidade de modo concentração-dependente, conforme demonstrado na Figura 40.

Figura 40 - Viabilidade das células de melanoma murino B16F10 após exposição às diferentes formulações avaliadas. As células foram expostas a concentrações decrescentes dos lipossomas (200 – 1,56µg/mL) por 24 horas, de modo que a viabilidade celular foi determinada utilizando-se o método de redução do MTT, mediante a avaliação de três experimentos independentes. (Linha preta) – LipoPegMag – IC₅₀ = 50,0 µg/mL, (Linha vermelha) – LipoPegMagVet – IC₅₀ = 12,0 µg/mL, (Linha azul) – LipoDoxoPegMag – IC₅₀ = 4,9 µg/mL, (Linha amarela) – LipoDoxoPegMagVet – IC₅₀ = 1,0 µg/mL,



Fonte: dados da pesquisa.

De acordo com tais resultados, observou-se que dentre as formulações, aquelas providas de funcionalização da superfície com ácido fólico foram as que demonstraram maior citotoxicidade, tanto para os lipossomas preparados apenas com o fluido magnético quanto para aqueles preparados com fluido juntamente com a doxorrubicina.

Além disso, pôde-se observar que a formulação contendo doxorrubicina em conjunto com o fluido magnético foi a que ocasionou maior percentual de morte celular, uma vez que o valor da Concentração Inibitória de 50% do crescimento celular (IC₅₀) foi menor quando comparado ao obtido para os demais lipossomas (Figura 40). Valores de IC₅₀ apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Concentração Inibitória de 50% de melanoma murino B16F10 após exposição às diferentes formulações avaliadas.

Formulações	IC ₅₀
LipoPegMag	50,0 µg/mL
LipoPegMagVet	12,0 µg/mL
LipoDoxoPegMag	4,9 µg/mL
LipoDoxoPegMagVet	1,0 µg/mL

Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados obtidos corroboram com outros estudos existentes na literatura, os quais propuseram o receptor de ácido fólico como alvo para *drug delivey* na terapia do melanoma invasivo.

Em um estudo conduzido por Chen e colaboradores (2017), foi evidenciado que a vetorização ativa de nanogéis poliméricos com ácido fólico aumenta significativamente a internalização e o efeito citotóxico da doxorubicina em células de melanoma B16F10 que apresenta receptor folato positivo versus receptor folato negativo apresentado na linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão humano A549 (CHEN et al., 2017).

Em outro estudo, Elkhodiry e colaboradores (2016) compararam o efeito de micelas poliméricas contendo doxorubicina e funcionalizadas com ácido fólico em células B16F10 e em fibroblastos murinos 3T3. Neste estudo, foi observado que a vetorização ativa aumentou em 80% a internalização de tais nanossistemas nas células que expressam o receptor de folato, a qual propiciou um maior acúmulo citoplasmático do fármaco e, conseqüentemente, um maior efeito citotóxico (ELKHODIRY; HUSSEINI; VELLUTO, 2016)

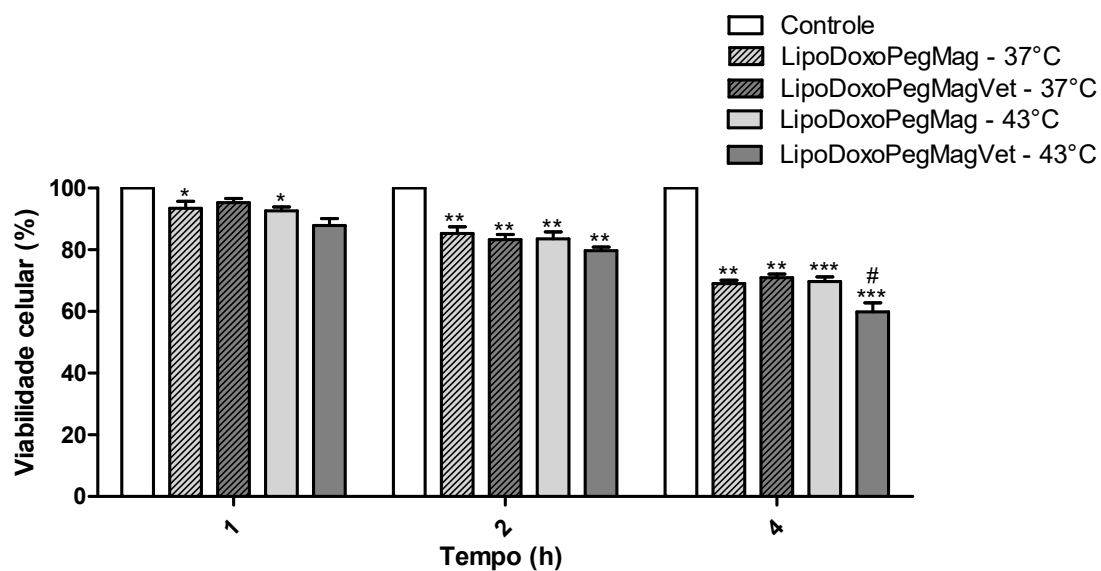
Adicionalmente, o efeito da temperatura na citotoxicidade desencadeada pelos magnetolipossomas também foi avaliado, visando-se simular as condições celulares induzidas pela magnetohipertermia após o tratamento com as formulações lipossomais.

Conforme demonstrado na Figura 41, observou-se aumento da citotoxicidade em função do tempo de tratamento, de modo que para o tempo de 4 horas, observou-se o maior percentual de morte celular. Paralelamente, notou-se ainda que a

temperatura também influenciou na atividade das formulações, de modo que as células incubadas a 43°C apresentaram valores menores de viabilidade quando comparadas às que permaneceram a 37°C. Pela análise do percentual de viabilidade celular dos controles, observa-se que não houve morte celular induzida apenas pela temperatura, ou seja, ambos os controles permanecem com 100% de viabilidade durante todo o experimento tanto na temperatura de 37°C quanto na temperatura de 43°C. É necessário ressaltar que, embora este experimento tenha sido executado empregando-se as concentrações de IC₅₀ definidas no ensaio anterior, o tempo de incubação das células com as formulações foi de, no máximo, 4h, enquanto que para a determinação da concentração inibitória 50%, o tempo de incubação é padronizado em 24h. Por esta razão, para este ensaio, os percentuais de morte celular não atingem os mesmos valores do ensaio anterior.

Além disso, observou-se ainda que na temperatura de 43°C, os magnetolipossomas vetorizados com ácido fólico demonstraram maior eficácia na indução de morte celular, de modo que no tempo de 4 horas, essa diferença foi estatisticamente significativa. Tal resultado confirma o encontrado para o ensaio de citotoxicidade, no qual a vetorização otimizou a atividade citotóxica dos nanossistemas avaliados.

Figura 41 - Viabilidade das células B16F10 após exposição aos magnetolipossomas. Para este ensaio as formulações LipoDoxoPegMag (que está na concentração do IC₅₀ 4,9 µg/mL) e LipoDoxoPegMagVet (concentração 1 µg/mL). As células foram incubadas com a formulação nos tempos de 1, 2 e 4 horas, nas temperaturas de 37°C (A) e 43°C (B).



Fonte: dados da pesquisa. Os resultados foram obtidos mediante avaliação de três experimentos independentes, utilizando-se o método de redução do MTT. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle negativo; # $p < 0,05$ comparado à formulação sem vetorização com ácido fólico.

8 CONCLUSÃO

Nos estudos *in vitro* com célula MCF7 os magnetolipossomas vetorizados demonstraram atividade citotóxica equivalente ao magnetolipossoma não vetorizados, podendo ser explicado devido a não expressão do receptor folato pela célula. Contudo, utilizando a linhagem celular B16F10 pode se demonstrar que os magnetolipossomas vetorizados apresentam maior citotoxicidade quando comparado aos lipossomas não alvo específicos. Para esta linhagem celular foi possível observar um IC 50, para a DOXO, de 1 µg/mL (80% menor) quando encapsulada em magneto lipossomas alvo específicos.

Quando associado a temperatura com os magnetolipossomas com superfície modificada e contendo doxorubicina encapsulada foi possível observar, para estes sistemas, maior citotoxicidade quando comparados aos magnetolipossomas não alvo específicos, uma vez que a concentração de fármaco foi 5 vezes menor. Desta forma, mostrou um efeito potencializado quando utilizado a magnetohipertermia.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram obtidos lipossomas com superfície alvo específica contendo partícula magnética coencapsulada com doxorubicina. Os magnetolipossomas apresentaram as mesmas características de tamanho, distribuição de tamanho e eficiência de encapsulação que os magnetolipossomas não alvo específicos.

Foi demonstrado neste trabalho que o sistema nanoestruturado e alvo específico desenvolvido apresenta potencial terapêutico, sendo promissor para ser empregado no tratamento de tumores, principalmente para aqueles com expressão aumentada para o receptor folato. A vetorização ativa dos magnetolipossomas, além do direcionamento específico para estas células tumorais, apresentou maior efeito citotóxico para a linhagem de célula de melanoma murino.

É importante enfatizar que a associação das estratégias usadas neste trabalho, hipertermia com os magnetolipossomas vetorizados para o receptor folato e contendo nanopartícula magnética e doxorubicina coencapsuladas, apresentou efeito sinérgico, promovendo maior citotoxicidade para as células tumorais. Sendo assim, os sistemas desenvolvidos mostram potencial para a terapia do câncer com a combinação de diferentes mecanismos antitumorais.

10 PUBLICAÇÕES DECORRENTES DO TRABALHO DURANTE O DOUTORADO

[1] L. Maione-Silva, E. G. de Castro, T. L. Nascimento, E. R. Cintra, L. C. Moreira, B. A. S. Cintra, M. C. Valadares and E. L. Lima, "Increased skin permeation, retention and effectiveness of collagen synthesis by encapsulation of ascorbic acid into negatively charged liposomes." *Scientific Reports*, 2019 vol: 9 (1) pp: 522. Doi: 10.1038/s41598-018-36682-9.

[2] L. A. D. Silva, E. R. Cintra, E. C. P. Alonso, G. L. Alves, E. M. Lima, S. F. Taveira, M. S. S. Cunha-Filho and R. N. Marreto, "Selection of excipientes for the development of carvedilol loaded lipid-based drug delivery systems." *J. Therm Anal Calorim* 130:1593-1604 (2017). Doi: 10.1007/s10973-017-6380-7.

[3] S. A. Mendanha, G. Capistrano, M. S. Carriao, C. Quini, E. R. Cintra, S. F. O. Santos, N. Zufelato, A. Alonso, E. M. Lima, J. R. A. Miranda, E. P. Silveira-Lacerda, and A. F. Bakuzis, "Erythrocyte-derived Magneto-Fluorescent Nanocarriers: Towards Therapeutic Agent Spatial Distribution and Cancer Hyperthermia Therapy." *Manuscript under preparation*.

[4] G. Capistrano, A. A. Sousa-Junior, S. Santos, N. Zufelato, A. L. S. Oliveira, E. R. Cintra, W. C. Pires, E. M. Lima, C. G. Cardoso, E. P. Silveira-Lacerda, and A. F. Bakuzis, "Intratumoral delivery efficiency kinetics of IR-780-albumin-based nanocarriers: analytical modeling, monitoring by fluorescence molecular tomography and tumor regression." *Manuscript under preparation*.

[5] E. R. Cintra, S. A. Mendanha, H. C. B. Silva, T. L. Nascimento, J. L. V. Anjos, A. Alonso, R. M. Martins and E. M. Lima, "Freeze-drying influences liposome flexibility: monitoring molecular dynamics of membrane phospholipids." *Manuscript under preparation*.

[6] S. Fernandes, R. X. Junior, T. L. Nascimento, E. R. Cintra and E. M. Lima, "Thermodynamic Interaction between transmembrane pH-gradient liposomes with a drug model by isothermal titration calorimetry." *Manuscript under preparation*.

11 REFERÊNCIAS

- ABDULLA, J. M. A.; TAN, Y. T.-F.; DARWIS, Y. Rehydrated lyophilized rifampicin-loaded mPEG-DSPE formulations for nebulization. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p. 663–71, 20 jun. 2010.
- AL-ABD, A. M.; KIM, N. H.; SONG, S. C.; LEE, S. J.; KUH, H. J. A simple HPLC method for doxorubicin in plasma and tissues of nude mice. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 4, p. 605–611, 2009.
- AL-AHMADY, Z. S.; AL-JAMAL, W. T.; BOSSCHE, J. V.; BUI, T. T.; DRAKE, A. F.; MASON, A. J.; KOSTARELOS, K. Lipid-peptide vesicle nanoscale hybrids for triggered drug release by mild hyperthermia in vitro and in vivo. **ACS nano**, v. 6, n. 10, p. 9335–46, 23 out. 2012.
- ALEXIOU, C.; ARNOLD, W.; KLEIN, R. J.; PARAK, F. G.; HULIN, P.; BERGEMANN, C.; ERHARDT, W.; WAGENPFEIL, S.; LÜBBE, A. S. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. **Cancer research**, v. 60, n. 23, p. 6641–8, 1 dez. 2000.
- ARCAMONE, F. et al. Doxorubicin disaccharide analogue: apoptosis-related improvement of efficacy in vivo. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 16, p. 1217–23, 20 ago. 1997.
- ASÍN, L.; IBARRA, M. R.; TRES, A.; GOYA, G. F. Controlled cell death by magnetic hyperthermia: Effects of exposure time, field amplitude, and nanoparticle concentration. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 5, p. 1319–1327, 2012.
- AWASTHI, V. D.; GARCIA, D.; KLIPPER, R.; GOINS, B. A.; PHILLIPS, W. T. Neutral and anionic liposome-encapsulated hemoglobin: effect of postinserted poly(ethylene glycol)-distearoylphosphatidylethanolamine on distribution and circulation kinetics. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 309, n. 1, p. 241–8, 16 abr. 2004.
- BANIZS, A. B.; HUANG, T.; DRYDEN, K.; BERR, S. S.; STONE, J. R.; NAKAMOTO, R. K.; SHI, W.; HE, J. In vitro evaluation of endothelial exosomes as carriers for small interfering ribonucleic acid delivery. **International journal of nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 4223–30, 2014.
- BARENHOLZ, Y. Liposome application: problems and prospects. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 6, n. 1, p. 66–77, fev. 2001.
- BARENHOLZ, Y. (CHEZY). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 117–134, 10 jun. 2012.

- BASAL, E.; EGHBALI-FATOURECHI, G. Z.; KALLI, K. R.; HARTMANN, L. C.; GOODMAN, K. M.; GOODE, E. L.; KAMEN, B. A.; LOW, P. S.; KNUTSON, K. L. Functional Folate Receptor Alpha Is Elevated in the Blood of Ovarian Cancer Patients. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. e6292, 20 jul. 2009.
- BAUST, J. G.; GAGE, A. A.; BJERKLUND JOHANSEN, T. E.; BAUST, J. M. Mechanisms of cryoablation: clinical consequences on malignant tumors. **Cryobiology**, v. 68, n. 1, p. 1–11, fev. 2014.
- BERMINGHAM, S.; O'CONNOR, R.; REGAN, F.; MCMAHON, G. P. Simultaneous determination of anthracyclines and taxanes in human serum using online sample extraction coupled to high performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of separation science**, v. 33, n. 11, p. 1571–9, jun. 2010.
- BOOSER, D. J.; HORTOBAGYI, G. N. Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance. **Drugs**, v. 47, n. 2, p. 223–58, fev. 1994.
- BORDELON, D. E.; CORNEJO, C.; GRÜTTNER, C.; WESTPHAL, F.; DEWEESE, T. L.; IVKOV, R. Magnetic nanoparticle heating efficiency reveals magneto-structural differences when characterized with wide ranging and high amplitude alternating magnetic fields. **Journal of Applied Physics**, v. 109, n. 12, p. 124904, 15 jun. 2011.
- BRANQUINHO, L. C.; CARRIÃO, M. S.; COSTA, A. S.; ZUFELATO, N.; SOUSA, M. H.; MIOTTO, R.; IVKOV, R.; BAKUZIS, A. F. Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: Implications for cancer hyperthermia. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 2887, 7 dez. 2013.
- BRASIL. Ministerio sa Saude. Agência Nacional de Vigilância Sanitaria. Resolução nº 166 Dispõe Sobre a validação de métodos anlíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 2017.
- BROWN, W. Thermal fluctuation of fine ferromagnetic particles. **IEEE Transactions on Magnetism**, v. 15, n. 5, p. 1196–1208, set. 1979.
- BROWN, W. F. Thermal fluctuations of a single-domain particle. **Physical Review**, v. 130, n. 5, p. 1677–1686, jun. 1963.
- ÇAĞDAŞ, M.; SEZER, A. D.; BUCAK, S. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. In: **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**. [s.l.] InTech, 2014. v. 7p. 202–14.
- CARRIÃO, M. S.; BAKUZIS, A. F. Mean-field and linear regime approach to magnetic hyperthermia of core-shell nanoparticles: Can tiny nanostructures fight cancer? **Nanoscale**, v. 8, n. 15, p. 8363–8377, 2016.

- CHAN, P.; KURISAWA, M.; CHUNG, J. E.; YANG, Y.-Y. Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery. **Biomaterials**, v. 28, n. 3, p. 540–549, 1 jan. 2007.
- CHANG, D.; LIM, M.; GOOS, J. A. C. M.; QIAO, R.; NG, Y. Y.; MANSFELD, F. M.; JACKSON, M.; DAVIS, T. P.; KAVALLARIS, M. Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and Limitations. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. August, 2018.
- CHANGES, M. DOXIL® (doxorubicin hydrochloride liposome injection) DOSAGE. **Interactions**, v. 50, n. July, p. 1–25, 1995.
- CHEN, H.; AHN, R.; VAN DEN BOSSCHE, J.; THOMPSON, D. H.; O'HALLORAN, T. V. Folate-mediated intracellular drug delivery increases the anticancer efficacy of nanoparticulate formulation of arsenic trioxide. **Molecular cancer therapeutics**, v. 8, n. 7, p. 1955–63, jul. 2009.
- CHEN, Y. et al. Overcoming multidrug resistance using folate receptor-targeted and pH-responsive polymeric nanogels containing covalently entrapped doxorubicin. **Nanoscale**, v. 9, n. 29, p. 10404–10419, 27 jul. 2017.
- CHEN, Y.; BOSE, A.; BOTHUN, G. D. Controlled release from bilayer-decorated magnetoliposomes via electromagnetic heating. **ACS Nano**, v. 4, n. 6, p. 3215–3221, 2010.
- CRAPARO, E. F.; TERESI, G.; BONDI', M. L.; LICCIARDI, M.; CAVALLARO, G. Phospholipid-polyaspartamide micelles for pulmonary delivery of corticosteroids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 406, n. 1–2, p. 135–144, 15 mar. 2011.
- D'ARPA, P.; LIU, L. F. Topoisomerase-targeting antitumor drugs. **BBA - Reviews on Cancer**, v. 989, n. 2, p. 163–177, 17 dez. 1989.
- DANDAMUDI, S.; CAMPBELL, R. B. Development and characterization of magnetic cationic liposomes for targeting tumor microvasculature. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1768, n. 3, p. 427–438, mar. 2007.
- DENNIS, C. L.; JACKSON, A. J.; BORCHERS, J. A.; HOOPES, P. J.; STRAWBRIDGE, R.; FOREMAN, A. R.; VAN LIEROP, J.; GRÜTTNER, C.; IVKOV, R. Nearly complete regression of tumors via collective behavior of magnetic nanoparticles in hyperthermia. **Nanotechnology**, v. 20, n. 39, p. 395103, 30 set. 2009.
- DEWHIRST, M. W.; VIGLIANTI, B. L.; LORA-MICHIELS, M.; HANSON, M.; HOOPES, P. J. Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia. **International journal of hyperthermia : the official journal of**

European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group, v. 19, n. 3, p. 267–94, 2003.

DHARMALINGAM, S.; RAMAMURTHY, S.; CHIDAMBARAM, K.; NADARAJU, S. A Simple HPLC Bioanalytical Method for the Determination of Doxorubicin Hydrochloride in Rat Plasma: Application to Pharmacokinetic Studies. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 3, p. 409, 2014.

DOROSHOW, J. H.; SYNOLD, T. W.; SOMLO, G.; AKMAN, S. A.; GAJEWSKI, E. Oxidative DNA base modifications in peripheral blood mononuclear cells of patients treated with high-dose infusional doxorubicin. **Blood**, v. 97, n. 9, p. 2839–45, 1 maio 2001.

ELKHODIRY, M. A.; HUSSEINI, G. A.; VELLUTO, D. Targeting the Folate Receptor: Effects of Conjugating Folic Acid to DOX Loaded Polymeric Micelles. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 16, n. 10, p. 1275–80, 2016.

ERICKSON, H. P. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. **Biological Procedures Online**, v. 11, n. 1, p. 32–51, 2009.

FENG, S. S.; ZHAO, L.; ZHANG, Z.; BHAKTA, G.; YIN WIN, K.; DONG, Y.; CHIEN, S. Chemotherapeutic engineering: Vitamin E TPGS-emulsified nanoparticles of biodegradable polymers realized sustainable paclitaxel chemotherapy for 168 h in vivo. **Chemical Engineering Science**, v. 62, n. 23, p. 6641–6648, 2007.

FORSSEN, E.; WILLIS, M. Ligand-targeted liposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 29, n. 3, p. 249–271, 1998.

FREEMAN, M. W.; ARROTT, A.; WATSON, J. H. L. Magnetism in Medicine. **Journal of Applied Physics**, v. 31, n. 5, p. S404–S405, 12 maio 1960.

FRENKEL, J. **The Kinetic Theory of Liquids**. New York: Dover Publications, Inc, 1955.

GABIZON, A.; HOROWITZ, A. T.; GOREN, D.; TZEMACH, D.; MANDELBAUM-SHAVIT, F.; QAZEN, M. M.; ZALIPSKY, S. Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: In vitro studies. **Bioconjugate Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 289–298, 1999.

GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; BARENHOLZ, Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. **Clinical pharmacokinetics**, v. 42, n. 5, p. 419–36, 2003.

GADALLAH, H.; AZAB, A. A.; ALI, H. M. Comparative study for the preparation of

superparamagnetic-citric coated magnetic nanoparticle and fodesalination application.

ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences, v. 13, n. 4, 2018.

GAZZANO, E. et al. Folate-targeted liposomal nitrooxy-doxorubicin: An effective tool against P-glycoprotein-positive and folate receptor-positive tumors. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 270, n. 1, p. 37–52, 28 jan. 2018.

GILCHRIST, R. K.; MEDAL, R.; SHOREY, W. D.; HANSELMAN, R. C.; PARROTT, J. C.; TAYLOR, C. B. Selective inductive heating of lymph nodes. **Annals of Surgery**, v. 146, n. 4, p. 596–606, out. 1957.

GREGORIADIS, G. **Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems** *Trends in Biotechnology*, 1995.

GREGORIADIS, G.; SENIOR, J. The phospholipid component of small unilamellar liposomes controls the rate of clearance of entrapped solutes from the circulation. **FEBS Letters**, v. 119, n. 1, p. 43–46, 22 set. 1980.

HAMAKER, H. C. The London—van der Waals attraction between spherical particles. **Physica**, v. 4, n. 10, p. 1058–1072, 1 out. 1937.

HARAN, G.; COHEN, R.; BAR, L. K.; BARENHOLZ, Y. Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. **BBA - Biomembranes**, v. 1151, n. 2, p. 201–215, 19 set. 1993.

HAYASHI, K.; NAKAMURA, M.; MIKI, H.; OZAKI, S.; ABE, M.; MATSUMOTO, T.; SAKAMOTO, W.; YOGO, T.; ISHIMURA, K. Magnetically responsive smart nanoparticles for cancer treatment with a combination of magnetic hyperthermia and remote-control drug release. **Theranostics**, v. 4, n. 8, p. 834–44, 2014.

HE, Q.; MA, M.; WEI, C.; SHI, J. Mesoporous carbon@silicon-silica nanotheranostics for synchronous delivery of insoluble drugs and luminescence imaging. **Biomaterials**, v. 33, n. 17, p. 4392–4402, jun. 2012.

HEALTHCARE, G. **Gel Filtration Principles and Methods**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.gelifesciences.com/protein-purification>. Acesso em: 24 ago. 2018.

HEIDARI MAJD, M. et al. Tamoxifen loaded folic acid armed PEGylated magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy of cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 106, p. 117–125, 2013.

HILGER, I.; ANDRÄ, W.; HERGT, R.; HIERGEIST, R.; SCHUBERT, H.; KAISER, W. A. Electromagnetic Heating of Breast Tumors in Interventional Radiology: In Vitro and in Vivo Studies in Human Cadavers and Mice. **Radiology**, v. 218, n. 2, p. 570–575,

fev. 2001.

HOPE, M. J.; BALLY, M. B.; WEBB, G.; CULLIS, P. R. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. **Biochimica et biophysica acta**, v. 812, n. 1, p. 55–65, 10 jan. 1985.

HUANG, H.; LOVELL, J. F. Advanced Functional Nanomaterials for Theranostics. **Advanced functional materials**, v. 27, n. 2, p. 165–171, 12 jan. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018 - Síntese de Resultados e Comentários**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>.

Acesso em: 14 set. 2018.

ITO, A.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of “heat-controlled necrosis” with heat shock protein expression. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 55, n. 3, p. 320–8, mar. 2006.

JAIN, T. K.; RICHEY, J.; STRAND, M.; LESLIE-PELECKY, D. L.; FLASK, C. A.; LABHASETWAR, V. Magnetic nanoparticles with dual functional properties: Drug delivery and magnetic resonance imaging. **Biomaterials**, v. 29, n. 29, p. 4012–4021, 2008.

KATAGIRI, K.; NAKAMURA, M.; KOUMOTO, K. Magneto-responsive smart capsules formed with polyelectrolytes, lipid bilayers and magnetic nanoparticles. **ACS applied materials & interfaces**, v. 2, n. 3, p. 768–73, mar. 2010.

KHAWAR, I. A.; KIM, J. H.; KUH, H. J. **Improving drug delivery to solid tumors: Priming the tumor microenvironment** *Journal of Controlled Release* Elsevier B.V., , 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.018>>

KIRBY, C.; CLARKE, J.; GREGORIADIS, G. Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. **The Biochemical journal**, v. 186, n. 2, p. 591–8, 15 fev. 1980.

KOSSATZ, S. et al. Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 66, 13 dez. 2015.

LAESEKE, P. F.; FREY, T. M.; BRACE, C. L.; SAMPSON, L. A.; WINTER, T. C.; KETZLER, J. R.; LEE, F. T. Multiple-Electrode Radiofrequency Ablation of Hepatic Malignancies: Initial Clinical Experience. **American Journal of Roentgenology**, v.

188, n. 6, p. 1485–1494, jun. 2007.

LAURENT, S.; DUTZ, S.; HÄFELI, U. O.; MAHMOUDI, M. **Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles** *Advances in Colloid and Interface Science* Elsevier B.V., , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2011.04.003>>

LEE, J.-H. et al. Exchange-coupled magnetic nanoparticles for efficient heat induction. **Nature nanotechnology**, v. 6, n. 7, p. 418–22, 26 jun. 2011.

LEE, R. J.; LOW, P. S. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. **BBA - Biomembranes**, v. 1233, n. 2, p. 134–144, 15 fev. 1995.

LEPETIT-COIFFÉ, M.; LAUMONIER, H.; SEROR, O.; QUESSON, B.; SESAY, M.-B.; MOONEN, C. T. W.; GRENIER, N.; TRILLAUD, H. Real-time monitoring of radiofrequency ablation of liver tumors using thermal-dose calculation by MR temperature imaging: initial results in nine patients, including follow-up. **European Radiology**, v. 20, n. 1, p. 193–201, 6 jan. 2010.

LICCIARDI, M.; PAOLINO, D.; CELIA, C.; GIAMMONA, G.; CAVALLARO, G.; FRESTA, M. Folate-targeted supramolecular vesicular aggregates based on polyaspartyl-hydrazide copolymers for the selective delivery of antitumoral drugs. **Biomaterials**, v. 31, n. 28, p. 7340–7354, out. 2010.

LTD, N.; CARR, B.; WRIGHT, M. **M505A M505B Nanoparticle Tracking Analysis A Review of Applications and Usage in the Analysis of Exosomes and Microvesicles Applications of NTA in Exosomes Research**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.nanosight.com>. Acesso em: 13 set. 2018.

MALONEY, E.; HWANG, J. H. Emerging HIFU applications in cancer therapy. **International Journal of Hyperthermia**, v. 31, n. 3, p. 302–309, 3 abr. 2015.

MANSOORI, G. A.; BRANDENBURG, K. S.; SHAKERI-ZADEH, A. A comparative study of two folate-conjugated gold nanoparticles for cancer nanotechnology applications. **Cancers**, v. 2, n. 4, p. 1911–28, 18 nov. 2010.

MARTÍ, A.; ARMENGOL, X.; ESTELRICH, J.; HERNÁNDEZ-BORRELL, J. Encapsulation of doxorubicin in neutral liposomes by passive methods: evidence of drug-lipid interaction at neutral pH. **Journal of microencapsulation**, v. 9, n. 2, p. 191–200, 1991.

MAYER, L. D.; HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. **BBA - Biomembranes**, v. 858, n. 1, p. 161–168, 13 jun. 1986.

- MENDES, L. P.; LIMA, E. M.; TORCHILIN, V. P. Targeted Nanotheranostics for Selective Drug Delivery in Cancer. In: **Handbook of Nanomaterials for Cancer Theranostics**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 245–277.
- MOHANTY, C.; DAS, M.; KANWAR, J. R.; SAHOO, S. K. Receptor mediated tumor targeting: an emerging approach for cancer therapy. **Current drug delivery**, v. 8, n. 1, p. 45–58, jan. 2011.
- MORAIS, P. C.; SANTOS, J. G.; SKEFF NETO, K.; PELEGRINI, F.; DE CUYPER, M. Magnetic resonance of magnetic fluid and magnetoliposome preparations. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, n. 1, p. 526–531, 2005.
- MORENO, C.; PAIVA, I.; GOMES, L.; RUAS, L.; CARVALHEIRO, M. Radioterapia nos tumores da hipófise – atualizações e controvérsias. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 8, n. 2, p. 89–96, 2013.
- NAG, O. K.; AWASTHI, V. Surface engineering of liposomes for stealth behavior. **Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 542–69, 25 out. 2013.
- NAKAMURA, K.; YOSHINO, K.; YAMASHITA, K.; KASUKAWA, H. Designing a novel in vitro drug-release-testing method for liposomes prepared by pH-gradient method. **International journal of pharmaceutics**, v. 430, n. 1–2, p. 381–7, 1 jul. 2012a.
- NAKAMURA, K.; YAMASHITA, K.; ITOH, Y.; YOSHINO, K.; NOZAWA, S.; KASUKAWA, H. Comparative studies of polyethylene glycol-modified liposomes prepared using different PEG-modification methods. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1818, n. 11, p. 2801–7, nov. 2012b.
- NATIVIDAD, E.; CASTRO, M.; MEDIANO, A. Accurate measurement of the specific absorption rate using a suitable adiabatic magnetothermal setup. **Applied Physics Letters**, v. 92, n. 9, p. 093116, 3 mar. 2008.
- NÉEL, L. Théorie du traînage magnétique des substances massives dans le domaine de Rayleigh. **Journal de Physique et le Radium**, v. 11, n. 2, p. 49–61, 1950.
- NUNES, A. D. C.; RAMALHO, L. S.; SOUZA, Á. P. S.; MENDES, E. P.; COLUGNATI, D. B.; ZUFELATO, N.; SOUSA, M. H.; BAKUZIS, A. F.; CASTRO, C. H. Manganese ferrite-based nanoparticles induce ex vivo, but not in vivo, cardiovascular effects. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 3299–3312, 2014.
- OLIVEIRA, H.; PÉREZ-ANDRÉS, E.; THEVENOT, J.; SANDRE, O.; BERRA, E.; LECOMMANDOUX, S. Magnetic field triggered drug release from polymersomes for cancer therapeutics. **Journal of Controlled Release**, v. 169, n. 3, p. 165–170, 2013.
- OLUSANYA, T.; HAJ AHMAD, R.; IBEGBU, D.; SMITH, J.; ELKORDY, A. Liposomal

Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 907, 14 abr. 2018.

PAI, V. B.; NAHATA, M. C. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. **Drug safety**, v. 22, n. 4, p. 263–302, abr. 2000.

PAN, J.; FENG, S.-S. Targeting and imaging cancer cells by Folate-decorated, quantum dots (QDs)- loaded nanoparticles of biodegradable polymers. **Biomaterials**, v. 30, n. 6, p. 1176–1183, fev. 2009.

PERES-FILHO, M. J.; DOS SANTOS, A. P.; NASCIMENTO, T. L.; DE ÁVILA, R. I.; FERREIRA, F. S.; VALADARES, M. C.; LIMA, E. M. Antiproliferative Activity and VEGF Expression Reduction in MCF7 and PC-3 Cancer Cells by Paclitaxel and Imatinib Co-encapsulation in Folate-Targeted Liposomes. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 10, p. 201–212, 5 jan. 2017.

PFEIFFER, C.; REHBOCK, C.; HÜHN, D.; CARRILLO-CARRION, C.; DE ABERASTURI, D. J.; MERK, V.; BARCIKOWSKI, S.; PARAK, W. J. Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles. **Journal of the Royal Society, Interface**, v. 11, n. 96, p. 20130931, 6 jul. 2014.

PRADHAN, L.; SRIVASTAVA, R.; BAHADUR, D. pH- and thermosensitive thin lipid layer coated mesoporous magnetic nanoassemblies as a dual drug delivery system towards thermochemotherapy of cancer. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 7, p. 2976–87, jul. 2014.

QIU, L.; YAO, M.; GAO, M.; ZHAO, Q. Doxorubicin and chloroquine coencapsulated liposomes: Preparation and improved cytotoxicity on human breast cancer cells. **Journal of Liposome Research**, v. 22, n. 3, p. 245–253, 2012.

RHIM, H. Review of asian experience of thermal ablation techniques and clinical practice. **International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group**, v. 20, n. 7, p. 699–712, nov. 2004.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. **Cell Viability Assays**. [s.l.] Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.

RODRIGUES, H. F.; MELLO, F. M.; BRANQUINHO, L. C.; ZUFELATO, N.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; BAKUZIS, A. F. Real-time infrared thermography detection of

magnetic nanoparticle hyperthermia in a murine model under a non-uniform field configuration. **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, n. 8, p. 752–767, 18 dez. 2013.

RODRIGUES, H. F. **Hipertermia magnética in vivo com nanopartículas de MnFe₂O₄ no tratamento de tumores sólidos e subcutâneos de Sarcoma 180**. [tese de doutorado] Universidade Federal de Goiás, 19 abr. 2017.

RODRIGUES, H. F.; CAPISTRANO, G.; MELLO, F. M.; ZUFELATO, N.; SILVEIRA-LACERDA, E.; BAKUZIS, A. F. Precise determination of the heat delivery during in vivo magnetic nanoparticle hyperthermia with infrared thermography. **Physics in medicine and biology**, v. 62, n. 10, p. 4062–4082, 21 maio 2017.

ROSENSWEIG, R. E. **Ferrohydrodynamics**. [livro] Courier Corporation, 1985.

RYAN, T. P.; TURNER, P. F.; HAMILTON, B. Interstitial microwave transition from hyperthermia to ablation: Historical perspectives and current trends in thermal therapy. **International Journal of Hyperthermia**, v. 26, n. 5, p. 415–433, 2 ago. 2010.

SANSON, C. et al. Doxorubicin Loaded Magnetic Polymersomes: Theranostic Nanocarriers for MR Imaging and Magneto-Chemotherapy. **ACS Nano**, v. 5, n. 2, p. 1122–1140, 22 fev. 2011.

SAUL, J. M.; ANNAPRAGADA, A.; NATARAJAN, J. V.; BELLAMKONDA, R. V. Controlled targeting of liposomal doxorubicin via the folate receptor in vitro. **Journal of Controlled Release**, v. 92, n. 1–2, p. 49–67, set. 2003.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. . 26 ago. 1997, p. 123–140.

SHARMA, U. S.; SHARMA, A.; CHAU, R. I.; STRAUBINGER, R. M. Liposome-Mediated Therapy of Intracranial Brain Tumors in a Rat Model. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 8, p. 992–998, 1997.

SHIRMARDI SHAGHASEMI, B.; VIRK, M. M.; REIMHULT, E. Optimization of Magneto-thermally Controlled Release Kinetics by Tuning of Magnetoliposome Composition and Structure. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

SHLIOMIS, M. I. Magnetic fluids. **Soviet Physics Uspekhi**, v. 17, n. 2, p. 153–169, fev. 1974.

SPERA, R.; APOLLONIO, F.; LIBERTI, M.; PAFFI, A.; MERLA, C.; PINTO, R.; PETRALITO, S. Controllable release from high-transition temperature magnetoliposomes by low-level magnetic stimulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 131, p. 136–140, 2015.

SUDIMACK, J.; LEE, R. J. Targeted drug delivery via the folate receptor. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 41, n. 2, p. 147–162, 2000.

SZLEIFER, I.; GERASIMOV, O. V.; THOMPSON, D. H. Spontaneous liposome formation induced by grafted poly(ethylene oxide) layers: theoretical prediction and experimental verification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 3, p. 1032–7, 3 fev. 1998.

URVA, S. R.; SHIN, B. S.; YANG, V. C.; BALTHASAR, J. P. Sensitive high performance liquid chromatographic assay for assessment of doxorubicin pharmacokinetics in mouse plasma and tissues. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 8–9, p. 837–841, 2009.

USTER, P. S.; ALLEN, T. M.; DANIEL, B. E.; MENDEZ, C. J.; NEWMAN, M. S.; ZHU, G. Z. Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. **FEBS letters**, v. 386, n. 2–3, p. 243–6, 20 maio 1996.

VAN DER MEEL, R.; VEHMEIJER, L. J. C.; KOK, R. J.; STORM, G.; VAN GAAL, E. V. B. **Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: Current status** *Advanced Drug Delivery Reviews* Elsevier B.V., , 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.08.012>>

VAN RHOON, G. C. Is CEM43 still a relevant thermal dose parameter for hyperthermia treatment monitoring? **International Journal of Hyperthermia**, v. 32, n. 1, p. 50–62, 2016.

VARSHOSAZ, J.; HASSANZADEH, F.; SADEGHI ALIABADI, H.; NAYEBSADRIAN, M.; BANITALEBI, M.; ROSTAMI, M. Synthesis and Characterization of Folate-Targeted Dextran/Retinoic Acid Micelles for Doxorubicin Delivery in Acute Leukemia. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–14, 2014.

VEMURI, S.; RHODES, C. . Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, n. 2, p. 95–111, 1 jul. 1995.

WICKI, A.; WITZIGMANN, D.; BALASUBRAMANIAN, V.; HUWYLER, J. **Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications** *Journal of Controlled Release* Elsevier B.V., , 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.030>>

WU, G.; WANG, Z.; BIAN, X.; DU, X.; WEI, C. Folate-modified doxorubicin-loaded

nanoparticles for tumor-targeted therapy. **Pharmaceutical biology**, v. 52, n. 8, p. 978–82, ago. 2014.

YANG, F.; TEVES, S. S.; KEMP, C. J.; HENIKOFF, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 1, p. 84–89, 2014.

ZHANG, D. et al. Folate-mediated targeted and intracellular delivery of paclitaxel using a novel deoxycholic acid-O-carboxymethylated chitosan–folic acid micelles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 325, jan. 2012.

ZHANG, J. Q.; ZHANG, Z. R.; YANG, H.; TAN, Q. Y.; QIN, S. R.; QIU, X. L. Lyophilized Paclitaxel Magnetoliposomes as a Potential Drug Delivery System for Breast Carcinoma via Parenteral Administration: In Vitro and in Vivo Studies. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 4, p. 573–583, 7 abr. 2005.

ZHANG, Z.; YAO, J. Preparation of Irinotecan-Loaded Folate-Targeted Liposome for Tumor Targeting Delivery and Its Antitumor Activity. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 3, p. 802–810, 26 set. 2012.

ZHENG, A. W.; JIA, D. D.; XIA, L. M.; JIN, G.; WU, H.; LI, T. Impact of carboplatin plus paclitaxel combined with endostar against A375 melanoma cells: An in vitro and in vivo analysis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1321–1326, 2016.

ZUCKER, D.; MARCUS, D.; BARENHOLZ, Y.; GOLDBLUM, A. Liposome drugs' loading efficiency: A working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties. **Journal of Controlled Release**, v. 139, n. 1, p. 73–80, 2009.