



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

KARINA CESCA

SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO DESENVOLVIDO EM MATRIZ DE  
NANOCELULOSE BACTERIANA PARA O TRATAMENTO DA RECIDIVA DE  
CÂNCER DE MAMA

Florianópolis – SC  
Novembro de 2016



Karina Cesca

**SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO DESENVOLVIDO EM MATRIZ DE  
NANOCELULOSE BACTERIANA PARA O TRATAMENTO DA RECIDIVA DE  
CÂNCER DE MAMA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Orientador:  
Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Coorientadora:  
Dr<sup>a</sup> Fernanda Vieira Berti

Florianópolis – SC  
Novembro de 2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cesca, Karina

Sistema de liberação de fármaco desenvolvido em matriz de nanocelulose bacteriana para o tratamento da recidiva de câncer de mama / Karina Cesca / Orientador, Luismar Marques Porto – Florianópolis, SC, 2016.

199 p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Sistema de liberação de fármacos 3. Nanocelulose bacteriana 4. Micropartículas de  $\text{CaCO}_3$  5. Citotoxicidade 6. Hemocompatibilidade 7. Câncer de mama. I. Porto, Luismar Marques II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química

Karina Cesca

**Sistema de liberação de fármaco desenvolvido em matriz de nanocelulose bacteriana para o tratamento da recidiva de câncer de mama**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção título de Doutor em Engenharia Química aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Prof. Dr. Luísmar Marques Porto  
**Orientador**

---

Dr<sup>a</sup> Fernanda Vieira Berti  
**Coorientadora**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cíntia Soares  
**Coordenadora do POSENQ**

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Luísmar Marques Porto  
**Orientador, Presidente**

---

Prof. Dr. Guillermo Raul Castro  
**Membro Externo**

---

Dr<sup>a</sup> Patrícia Dillemburg Pilla  
**Membro Externo**

---

Dr. Águedo Aragones  
**Membro Externo**

---

Dr<sup>a</sup> Júlia de Vasconcellos Castro  
**Membro Interno**

---

Dr<sup>a</sup> Daliana Muller  
**Membro Interno**

**Florianópolis, 30 de novembro de 2016**



*“Dedico este trabalho a minha família pois sem ela, nada disso seria possível, e a todos que de alguma forma, possam se beneficiar dos frutos deste trabalho.”*





## AGRADECIMENTOS

---

*Aos meus pais Olívio e Maria, por me ensinarem os verdadeiros valores e que mesmo estando longe, andam sempre em meus pensamentos.*

*Aos meus irmãos de sangue e coração Aléx, Kacia e Karyta, vocês me deram força para percorrer o longo caminho que culminou na realização deste trabalho, apoiando-me incondicionalmente e compreendendo todos os momentos de ausência.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Luismar Marques Porto, por sempre me desafiar a fazer melhor, pela oportunidade de trabalhar no Intelab e poder ter confiado esse projeto a mim*

*Ao Prof. Dr. Guillermo Raul Castro, agradeço profundamente a disponibilidade com que me recebeu no período de permanência na Universidade Nacional de La Plata, Argentina, e por sua orientação. Gostaria ainda de dizer que me sinto privilegiada por tê-lo conhecido.*

*À minha coorientadora, Dr<sup>a</sup> Fernanda Vieira Berti, pela orientação e todas as dicas e ensinamentos durante esse percurso.*

*Aos amigos Guilherme, Emily, Drielle, Maikon e Charles, vocês, dia após dia, construíram esta história comigo, tornando meus dias de experimentos muito mais agradáveis. Um agradecimento especial ao Guilherme, por me ajudar nos momentos de dúvidas. Aos integrantes do Intelab Camila S., Julia, Camila Q., Samara, Giovana, Andréa, seja por uma conversa, ou pelo auxílio na análise de dados, discussão de protocolo, um chimarrão, enfim, a todos que contribuíram de alguma forma.*

*Aos amigos André, Fabrício, Joanna, Letícia, Lya, David e Priscila, pelos momentos especiais e toda a ajuda prestada.*

*Aos alunos de iniciação científica pelos quais tenho muito carinho e carrego no coração: Isadora, Tuane, João, Vítor, Ana Carolina, Gabriel, Fernanda, Elaine, Vinícius, Letícia, Beatriz e Louise.*

*À Therezinha e à Erondina, vocês possuem o maior coração que já conheci; as considero uma extensão da minha Família e grandes amigas.*

*Às minhas queridas amigas Renata e Raquel, por estarem comigo durante o mestrado e mais estes 4 anos de doutorado. Amigas para a vida toda.*

*Um agradecimento especial ao Edivilson, secretário da pós-graduação em Engenharia Química, pela ajuda prestada nos assuntos acadêmicos.*

## Agradecimentos

---

*A todos que me ajudaram com as análises, sempre me atendendo com boa vontade e prazer.*

*Agradeço aos laboratórios, LCME, LAMEB, Central de Análises e LAMATE, pela disponibilidade de realização das caracterizações e análises realizadas.*

*Ao Professor Dr. Carlos Renato Rambo, responsável pelo LAMATE, agradeço pelas análises prestadas.*

*Um agradecimento especial à Eliana e à Susane pela amizade e por toda ajuda prestada na realização das análises de microscopia eletrônica. De uma maneira geral, mas não menos especial, agradeço a todos os membros do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LCME): Américo, Eduardo, Deise, Katina e Luciano, pelos ensinamentos e discussão na hora do café.*

*Aos funcionários do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB): Bibiana, Camille, Denis e Vanessa, pela disponibilidade e ajuda prestada na realização das análises e na interpretação de resultados.*

*Ao técnico da Central de análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Leandro, pela disponibilidade, sempre que solicitado.*

*Ao CNPq, à CAPES e à FINEP, pelo apoio financeiro.*

*Este trabalho é uma conquista não só minha, mas de todos vocês! É uma prova de que o investimento de vocês não foi em vão.*

*A todos vocês uma única palavra: Obrigada!*

*“A tarefa não é tanto ver aquilo  
que ninguém viu, mas pensar o  
que ninguém ainda pensou sobre  
aquilo que todo mundo vê.”  
(Arthur Schopenhauer)*



# Sistema de liberação de fármaco desenvolvido em matriz de nanocelulose bacteriana para o tratamento da recidiva de câncer de mama

## RESUMO

---

Esta tese relata o desenvolvimento de um sistema de liberação de fármaco (DDS), a doxorubicina (Dox), composto de micropartículas híbridas de carbonato de cálcio e carragenina ( $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ ), sintetizadas em matriz de nanocelulose bacteriana (BNC), aqui denominado CarDS. A caracterização do CarDS revelou uma distribuição uniforme das micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  entre as fibras de BNC, proporcionando alta incorporação de Dox (80%) e perfis de liberação modulados pela concentração de Dox incorporada, assim como pela variação do pH local. A razão entre as micropartículas e as fibras de BNC permanece a mesma, quando aumentadas as dimensões do sistema. A presença das micropartículas diminuiu a área superficial, a capacidade de absorção de água, a taxa de reidratação e altera as propriedades mecânicas. O CarDS é atóxico a células de fibroblastos da linhagem L929. As células de fibroblastos são capazes de aderir, proliferar e interagir com biomaterial (CarDS). Os índices hemolíticos permanecem dentro da normalidade, evidenciando a não citotoxicidade e hemocompatibilidade do CarDS. A bioequivalência da Dox liberada pelo sistema (DoxDS) em comparação com Dox em solução (DoxSol) na toxicidade de células de câncer de mama evidenciaram a atividade do fármaco pela diminuição da atividade metabólica e índices proliferativos, causando alterações características na morfologia, ciclo celular e morte celular por apoptose/necrose durante o tratamento com DoxDS quando cultivadas *in vitro*. Por fim, os resultados aqui relatados comprovam que o CarDS desenvolvido poderia ser uma alternativa para auxiliar na terapia adjuvante da recidiva do câncer de mama e, como consequência, na redução dos efeitos colaterais ocasionados pelo fármaco em nível sistêmico.

**Palavras-chave:** Sistema de liberação de fármacos, nanocelulose bacteriana, micropartículas de  $\text{CaCO}_3$ , citotoxicidade, hemocompatibilidade, doxorubicina, câncer de mama.



## Drug delivery system developed in bacterial nanocellulose matrix for recurrence treatment of breast cancer

### ABSTRACT

---

This thesis reports the development of a drug (doxorubicin) delivery system (DDS) with hybrid microparticles of calcium carbonate and carrageenin ( $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ ), synthesized in bacterial nanocellulose matrix (BNC), here called CarDS. Characterization of CarDS revealed a uniform distribution of the  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  hybrid microparticles between the BNC fibers, providing a high Dox incorporation (80%) and release profiles modulated by the incorporated Dox concentration, as well as by the variation of the local pH. The ratio of the microparticles to the BNC fibers remains the same when the system dimensions are increased. Presence of the microparticles decreased the surface area, its water absorption capacity and rehydration rate, that the presence of the microparticles altered its mechanical properties, making the biomaterial more malleable and easy to apply. CarDS is non-toxic to fibroblast cells of the L929 lineage. Fibroblast cells are able to adhere, proliferate and interact with the biomaterial (CarDS). Hemolytic indices remained within the normal values, showing its non cytotoxicity and hemocompatibility of CarDS. The bioequivalence of Dox released by the system (DoxDS) compared to Dox in solution (DoxSol) in the toxicity of breast cancer cells showed the activity of the drug by the decrease of the metabolic activity and proliferative indices, causing characteristic alterations in the morphology, cell cycle, and cell death by apoptosis/necrosis during the treatment with DoxDS when cultured in vitro. Finally, the results reported suggest that the developed CarDS could be used as an aid in the adjuvant therapy of recurrent breast cancer and consequently reduce the side effects caused by the drug at systemic level, and therefore be suitable for breast cancer therapies.

**Keywords:** drug delivery system, biomaterial, bacterial nanocellulose,  $\text{CaCO}_3$  microparticles, cytotoxicity, hemocompatibility, doxorubicin, breast cancer.





---

FIGURA 1 – MORTES POR CÂNCER DE MAMA NO MUNDO PARA O ANO DE 2013. ....	36
FIGURA 2 – NÚMERO DE MORTES POR CÂNCER DE MAMA NO BRASIL. ....	36
FIGURA 3 – DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER A PARTIR DO CRESCIMENTO DESCONTROLADO DAS CÉLULAS NORMAIS IN SITU ATÉ O RECRUTAMENTO DE NOVOS VASOS SANGUÍNEOS PARA A MANUTENÇÃO DOS NUTRIENTES (ANGIOGÊNESE) E POSTERIOR METÁSTASE DAS CÉLULAS TUMORAIS PARA OUTRAS PARTES DO CORPO. ....	46
FIGURA 4 – COMPOSIÇÃO DA MAMA FEMININA. ....	47
FIGURA 5 – PRINCIPAIS PONTOS DE DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE MAMA. ....	47
FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DA DOXORRUBICINA (DOX). ....	50
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS DOSES TERAPÊUTICAS, FÁRMACO LIVRE E LIBERAÇÃO CONTROLADA. ....	52
FIGURA 8 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. MICROGRAFIAS DE AMBOS OS LADOS DA BNC (A) LADO POROSO COM APLIAÇÃO DE 10000 ×, (B) LADO DENSO COM AMPLIAÇÃO DE 10000 ×, (C) LADO POOSO COM AMPLIAÇÃO DE 1000 × E (D) LADO DENSO COM AMPLIAÇÃO DE 1000 ×. ....	55
FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DESCRITIVO DAS ETAPAS RELACIONADAS AO DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO CARDS. ....	67
FIGURA 10 – ILUSTRAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE REATIVAÇÃO DA BACTÉRIA <i>G. HANSENI</i> ARMAZENADA EM GLICEROL A -80 °C EM MEIO DE CULTIVO E PLAQUEAMENTO EM ÁGAR. ....	68
FIGURA 11 – ILUSTRAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE REATIVAÇÃO DAS COLÔNIAS DE <i>G. HANSENI</i> EM MEIO DE CULTIVO E PRODUÇÃO DA MATRIZ DE NANOCELULOSE BACTERIANA (BNC). ....	69
FIGURA 12 – ILUSTRAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE LIMPEZA E PURIFICAÇÃO DAS MATRIZES DE BNC PRODUZIDAS PELA BACTÉRIA <i>G. HANSENI</i> EM MEIO DE CULTURA MANITOL. .	70
FIGURA 13 – ILUSTRAÇÃO DO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO CARDS COM AMPLIAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE CARBONATO DE CÁLCIO SINTETIZADAS ENTRE AS FIBRAS DA BNC. ....	76
FIGURA 14 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. MICROGRAFIAS (A) DAS MICROPARTÍCULAS DE $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-CAR}$ ; (B) DA MATRIZ DE BNC E (C E D) DO CARDS EM AMBOS OS LADOS DA BNC, POROSO (C) E DENSO (D). ....	77

---

FIGURA 15 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. MICROGRAFIAS DO CORTE TRANSVERSAL DO CARDS. (A) AMPLIAÇÃO DE 250× E (B) AMPLIAÇÃO DE 4000×. .....	78
FIGURA 16 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. MICROGRAFIAS DO CARDS CONTENDO DOX (A) AMPLIAÇÃO DE 1000× E (B) AMPLIAÇÃO DE 5000×. ....	78
FIGURA 17 – MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER. AUTOFLUORESCÊNCIA DA DOX NAS AMOSTRAS DE (A) BNC, (B) BNC/ $\Lambda$ -CAR, (C) BNC/CACO <sub>3</sub> E (D) CARDS. .....	79
FIGURA 18 – VARREDURA DO COMPRIMENTO DE ONDA POR (MCVL) DA DOX PRESENTE NA BNC, CACO <sub>3</sub> / $\Lambda$ -CAR, BNC/CACO <sub>3</sub> E CARDS.....	80
FIGURA 19 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA BNC, CARDS.....	81
FIGURA 20 – CURVAS TGA (A) E DTG (B) PARA BNC E CARDS. ....	82
FIGURA 21 – CINÉTICA DE INCORPORAÇÃO DE DOX (600 $\mu$ M) NO CARDS A 25 °C E AGITAÇÃO DE 80 RPM. VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA DE DOIS EXPERIMENTOS EM DUPLICATA. * REPRESENTA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA (P < 0,05) DA INCORPORAÇÃO DE DOX ( $\mu$ M) EM RELAÇÃO AO TEMPO ANTERIOR....	83
FIGURA 22 – INCORPORAÇÃO DA DOX EM BNC, BNC/ $\Lambda$ -CAR, BNC/CACO <sub>3</sub> E CARDS. PORCENTAGEM DE INCORPORAÇÃO APÓS 20 HORAS SUBMERSAS EM UMA SOLUÇÃO DE DOX (775,9 $\mu$ M), 25 °C E AGITAÇÃO DE 80 RPM. VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA DE DOIS EXPERIMENTOS EM QUADRIPLICATA. ...	84
FIGURA 23 – INCORPORAÇÃO DE DOX NO CARDS APÓS 20 HORAS DE CONTATO COM DOX (258,6, 517,3, 775,9, 1293,1, 2586,3 $\mu$ M) A 25 °C E SOB AGITAÇÃO DE 80 RPM. VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA DE DOIS EXPERIMENTOS EM QUADRIPLICATA. ....	86
FIGURA 24 – CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DA DOX A PARTIR DOXDS CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM PBS (pH = 7,4), 37 °C DURANTE 7 DIAS. VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA DE DOIS EXPERIMENTOS EM DUPLICATA.....	87
FIGURA 25 – RELAÇÃO ENTRE A DOX INCORPORADA AO CARDS E LIBERAÇÃO DA DOX (%) A PARTIR DO DOXDS EM PBS (pH 7,4), 37 °C DURANTE 7 DIAS DE INCUBAÇÃO. VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA DE DOIS EXPERIMENTOS EM DUPLICATA.....	88

- FIGURA 26 – CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DO DOXDS EM PBS EM PHs (▲) PH 5,8, (●) PH 6,6 E (■) PH 7,4. DOXDS (620,72  $\mu$ M) FOI EXPOSTA DURANTE 28 DIAS A 37 °C. VALORES REPRESENTAM A MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA DE TRÊS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA. .... 89
- FIGURA 27 – FLUXOGRAMA DESCRITIVO DAS ETAPAS RELACIONADAS À PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDOS BIOLÓGICOS IN VITRO DO CARDS. 100
- FIGURA 28 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE IN VITRO ENVOLVENDO MEMBRANAS DE BNC E DO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CARDS EM FIBROBLASTOS (L929) PARA OS TEMPOS DE CULTURA DE 1, 3, 5 E 7 DIAS. .... 105
- FIGURA 29 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO CÉLULA-BIOMATERIAL (BNC E CARDS) IN VITRO PARA OS TEMPOS DE CULTURA DE 1, 3 E 7 DIAS. .... 107
- FIGURA 30 – EFEITO DO DIÂMETRO DA MATRIZ DE BNC NA MASSA SECA DA MATRIZ DE BNC E DO CARDS. VALORES REPRESENTAM A MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA, PARA TRÊS EXPERIMENTOS EM QUADRPLICATA. .... 112
- FIGURA 31 – MORFOLOGIA DE BNC (A) E DO CARDS (B) HIDRATADAS. .... 113
- FIGURA 32 – CINÉTICA DE ABSORÇÃO DE ÁGUA PARA BNC E PARA O CARDS. OS RESULTADOS FORAM EXPRESSOS COMO A MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA DE DOIS ENSAIOS INDEPENDENTES EM TRIPLICATA. \* INDICA A DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ( $P \leq 0,05$ ) DA ABSORÇÃO DE ÁGUA DO CARDS EM RELAÇÃO À BNC. .... 115
- FIGURA 33 – PROPRIEDADES MECÂNICAS. (A) CURVAS TÍPICAS DE TENSÃO-DEFORMAÇÃO; (B) DEFORMAÇÃO MÁXIMA À RUPTURA; (C) TENSÃO DE RUPTURA DAS AMOSTRAS HIDRATADAS DE BNC, BNC/ $\lambda$ -CAR, BNC/ $\text{CaCO}_3$  E CARDS. CURVAS E VALORES REPRESENTAM A MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA EM TRIPLICATA. .... 116
- FIGURA 34 – PROPRIEDADES MECÂNICAS. (A) CURVAS TÍPICAS DE TENSÃO-DEFORMAÇÃO; (B) ALONGAMENTO MÁXIMO À RUPTURA; (C) TENSÃO MÁXIMA À RUPTURA DAS AMOSTRAS LIOFILIZADAS DE BNC, BNC/CAR, BNC/ $\text{CaCO}_3$  E CARDS. CURVAS E VALORES REPRESENTAM A MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA EM TRIPLICATA. .... 118
- FIGURA 35 – PROPRIEDADES MECÂNICAS. CURVAS TÍPICAS DE TENSÃO-DEFORMAÇÃO HIDRATADAS E LIOFILIZADAS PARA (A) BNC, (B) BNC/CAR, (C) BNC/ $\text{CaCO}_3$  E (D) CARDS. CURVAS E VALORES REPRESENTAM A MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA EM TRIPLICATA. .... 119
- FIGURA 36 – ATIVIDADE METABÓLICA. INFLUÊNCIA DO CARDS NA ATIVIDADE METABÓLICA DE FIBROBLASTOS L929 POR CONTATO INDIRETO, ANALISADOS POR MTS APÓS 1, 3,

5 E 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 37 °C. OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA, PARA TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES EM QUADRIPLICATA.  
\* DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ( $P \leq 0,05$ ) EM RELAÇÃO AO CONTROLE. ....121

FIGURA 37 – PROLIFERAÇÃO CELULAR. INFLUÊNCIA DO CARDS NA PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS (L929). OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA PARA TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES, REALIZADOS EM QUADRIPLICATA. \* DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ( $P \leq 0,05$ ) EM RELAÇÃO AO CONTROLE. ....122

FIGURA 38 – ATIVIDADE MATEBÓLICA. INFLUÊNCIA DO CARDS NA ATIVIDADE METABÓLICA DE FIBROBLASTOS L929 POR CONTATO DIRETO, ANALISADOS POR MTS APÓS 1, 3, 5 E 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 37 °C. OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA DE DOIS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES EM QUADRIPLICATA. \* DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ( $P \leq 0,05$ ) EM RELAÇÃO AO CONTROLE. ....123

FIGURA 39 – MORFOLOGIA DE FIBROBLASTOS L929 CULTIVADOS SOBRE BNC E CARDS (A) BNC (1 DIA), (B) BNC (3 DIAS), (C) BNC (7 DIAS), (D) CARDS (1DIA), (E) CARDS (3 DIAS), (E) CARDS (7 DIAS). FORAM OBTIDAS IMAGENS EM TRÊS CAMPOS DISTINTOS DE CADA AMPLIAÇÃO EM DUPLICATA BIOLÓGICA. ....126

FIGURA 40 – MORFOLOGIA DE FIBROBLASTOS L929 CULTIVADOS SOBRE (A) BNC E (B) CARDS POR 7 DIAS DE CULTURA IN VITRO. IMAGENS OBTIDAS NA OBJETIVA DE 100 ×. ....127

FIGURA 41 – MORFOLOGIA DOS FIBROBLASTOS CULTIVADOS SOBRE O CARDS APÓS 7 DIAS DE CULTIVO. IMAGENS OBTIDAS NAS AMPLIAÇÕES DE 20X (A, B, C) E 100X (D, E, F). ....128

FIGURA 42 – EFEITO DA BNC E DO CARDS NA HEMÓLISE (%). FORAM UTILIZADOS COMO CONTROLE POSITIVO ÁGUA E NEGATIVO PBS. OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA DO ENSAIO EM TRIPLICATA.....130

FIGURA 43 – EFEITO DA BNC E CARDS NA PORCENTAGEM DE COAGULAÇÃO DINÂMICA DO SANGUE, CALCULADO EM RELAÇÃO AO CONTROLE POSITIVO (ÁGUA) E CONTROLE NEGATIVO, CARDS SEM ADIÇÃO DE COAGULANTE. OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA DO ENSAIO EM TRIPLICATA. ....131

FIGURA 44 – FLUXOGRAMA DESCRITIVO DAS ETAPAS RELACIONADAS AO DESENVOLVIMENTO E À TOXICIDADE DO SISTEMA DOXDS EM DIFERENTES LINHAGENS DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA. ....142

FIGURA 45 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO SISTEMA DOXDS. A) MICROGRAFIA DAS MICROPARTÍCULAS DE  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-CAR}$  (MEV) E IMAGENS (B, C E D) DE MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER (MCVL) DO DOXDS. ....148

- FIGURA 46 – ATIVIDADE METABÓLICA DAS LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA 4T1, MCF-7 E MDA-MB-231, APÓS TRATAMENTO COM O SISTEMA DOXDS E COM DOXSOL (5  $\mu$ M) POR 24, 48 E 72 HORAS DE CULTIVO. OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA DE TRÊS ENSAIOS INDEPENDENTES REALIZADOS EM TRIPLICATA. O SÍMBOLO \* REPRESENTA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ( $p \leq 0,05$ ) EM RELAÇÃO À DOXSOL PARA CADA TEMPO ANALISADO PELO TESTE DE TAKEY. .... 149
- FIGURA 47 – EFEITO DA DOX (1,25, 2,5 E 5  $\mu$ M) LIBERADA PELO SISTEMA DOXDS E DOXSOL NA ATIVIDADE METABÓLICA DAS CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA (4T1, MCF-7 E MDA-MB-231) PARA 8, 16 E 24 HORAS. OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA DO ENSAIO EM DUPLICATA. \* = DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ( $p \leq 0,05$ ) EM RELAÇÃO À DOXSOL PARA CADA CONCENTRAÇÃO. .... 152
- FIGURA 48 – EFEITO DA DOX NO CICLO CELULAR DA CÉLULA DE TUMOR DE MAMA DA LINHAGEM 4T1 EXPOSTA AO TRATAMENTO COM DOXDS E DOXSOL (5  $\mu$ M) PELO PERÍODO DE 24 H. OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA DO ENSAIO EM DUPLICATA. .... 155
- FIGURA 49 – EFEITO DA DOX NO CICLO CELULAR DA CÉLULA DE TUMOR DE MAMA DA LINHAGEM MCF-7 EXPOSTA AO TRATAMENTO COM DOXDS E DOXSOL (5  $\mu$ M) PELO PERÍODO DE 24 H. OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA DO ENSAIO EM DUPLICATA. .... 155
- FIGURA 50 – EFEITO DA DOX NO CICLO CELULAR DA CÉLULA DE TUMOR DE MAMA DA LINHAGEM MDA-MB-231 EXPOSTA AO TRATAMENTO COM DOXDS E DOXSOL (5  $\mu$ M) PELO PERÍODO DE 24 H. OS DADOS REPRESENTAM A MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO DA MÉDIA DO ENSAIO EM DUPLICATA. .... 156
- FIGURA 51 – IDENTIFICAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE DAS CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA DA LINHAGEM 4T1 TRATADAS COM DOXDS NAS CONCENTRAÇÕES DE 1,25, 2,5 E 5  $\mu$ M DURANTE 24 HORAS. .... 159
- FIGURA 52 – IDENTIFICAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE DAS CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA DA LINHAGEM MCF-7 TRATADAS COM DOXDS NAS CONCENTRAÇÕES DE 1,25, 2,5 E 5  $\mu$ M DURANTE 24 HORAS. .... 161
- FIGURA 53 – IDENTIFICAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE DAS CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA DA LINHAGEM MDA-MB-231 TRATADAS COM DOXDS NAS CONCENTRAÇÕES DE 1,25, 2,5 E 5  $\mu$ M DURANTE 24 HORAS. .... 163
- FIGURA 54 – MICROGRAFIAS OBTIDAS POR MEV DAS CÉLULAS DE TUMOR MAMÁRIO DA LINHAGEM 4T1. (A) CONTROLE CARDS, (B) CONTROLE PLACA, TRATADAS COM (C) DOXDS 1,25  $\mu$ M, (D) DOXSOL 1,25  $\mu$ M, (E) DOXDS 5  $\mu$ M, (F) DOXSOL 5  $\mu$ M. AS

IMAGENS SÃO REPRESENTATIVAS DO ENSAIO REALIZADO EM DUPLICATA COM IMAGENS  
OBTIDAS DA AMPLIAÇÃO DE 300× EM 3 PONTOS DISTINTOS. ....166

FIGURA 55 – MICROGRAFIAS OBTIDAS POR MEV DAS CÉLULAS DE TUMOR MAMÁRIO DA  
LINHAGEM MCF-7. (A) CONTROLE CARDS, (B) CONTROLE PLACA, TRATADAS COM  
(C) DOXDS 1,25 μM, (D) DOXSOL 1,25 μM, (E) DOXDS 5 μM, (F) DOXSOL 5 μM.  
AS IMAGENS SÃO REPRESENTATIVAS DO ENSAIO REALIZADO EM DUPLICATA COM  
IMAGENS OBTIDAS DA AMPLIAÇÃO DE 300× EM 3 PONTOS DISTINTOS. ....167

FIGURA 56 – MICROGRAFIAS OBTIDAS POR MEV DAS CÉLULAS DE TUMOR MAMÁRIO DA  
LINHAGEM MDA-MB-231. (A) CONTROLE CARDS, (B) CONTROLE PLACA,  
TRATADAS COM (C) DOXDS 1,25 μM, (D) DOXSOL 1,25 μM, (E) DOXDS 5 μM,  
(F) DOXSOL 5 μM. AS IMÁGEN SÃO REPRESENTATIVAS DO ENSAIO REALIZADO EM  
DUPLICATA COM IMAGENS OBTIDAS DA AMPLIAÇÃO DE 300× EM 3 PONTOS  
DISTINTOS. ....168

## LISTAS DE TABELAS

---

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO QUANTO AOS ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO DO CÂNCER DE MAMA E A DESCRIÇÃO DA SUA LOCALIZAÇÃO SEGUNDO A SOCIEDADE BRASILEIRA DE MASTOLOGIA.....	37
TABELA 2 – CLASSIFICAÇÕES DA QUIMIOTERAPIA UTILIZADAS PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER. ....	39
TABELA 3 – PORCENTAGEM DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO A PARTIR DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DESENVOLVIDOS COM CARBONATO DE CÁLCIO COMO UM DOS COMPONENTES.....	53
TABELA 4 – PORCENTAGEM DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS A PARTIR DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO CONTENDO NANOCELULOSE BACTERIANA COMO UM DE SEUS COMPONENTES E SEU MODO DE APLICAÇÃO. ....	56
TABELA 5 – POTENCIAL DE APLICAÇÃO DAS MATRIZES DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS COMPOSTOS DE PARTÍCULAS DE $\text{CaCO}_3$ E MATRIZ DE NANOCELULOSE BACTERIANA. ....	57
TABELA 6 – LIBERAÇÃO DE DOX A PARTIR DOS COMPONENTES DO SISTEMA (BNC, BNC/ $\lambda$ -CAR, BNC/ $\text{CaCO}_3$ E CARDS) EM PBS A 37 °C EM 24 HORAS. * = DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ( $p \leq 0,05$ ) DAS AMOSTRAS SEM SÍMBOLO.....	85
TABELA 7 – EFEITO DA VARIAÇÃO DO DIÂMETRO (6,4, 15,6, 35, 86 $\mu\text{m}$ ) DA MATRIZ DE BNC NA RAZÃO MÁSSICA DE MICROPARTÍCULAS DE $\text{CaCO}_3/\lambda$ -CAR:BNC. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA EM QUADRIPLICATA, PARA TRÊS ENSAIOS INDEPENDENTES.....	111
TABELA 8 – VALORES DE DOXORRUBICINA TEÓRICA (CALCULADA, EM SOLUÇÃO), INCORPORADA APÓS 20H, E MEDIDAS APÓS LIBERAÇÃO POR 24 H. ....	151
TABELA 9 – DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS NO MECANISMO DE MORTE DAS CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA DA LINHAGEM 4T1 TRATADAS COM DOXDS E DOXSOL NAS CONCENTRAÇÕES DE 1,25, 2,5 E 5 $\mu\text{M}$ DURANTE 24 HORAS. $\neq$ = DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ( $p \leq 0,05$ ) DO CONTROLE EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS COM DOXDS E DOXSOL. * = DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ( $p \leq 0,05$ ) DO TRATAMENTO COM DOXDS EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO COM DOXSOL.....	158
TABELA 10 – DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS MECANISMO DE MORTE DAS CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA DA LINHAGEM MCF-7 TRATADAS COM DOXDS E DOXSOL NAS	

CONCENTRAÇÕES DE 1,25, 2,5 E 5  $\mu$ M DURANTE 24 HORAS.  $\neq$  = DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ( $P \leq 0,05$ ) DO CONTROLE EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS COM DOXDS E DOXSOL. \* = DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ( $P \leq 0,05$ ) DO TRATAMENTO COM DOXDS EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO COM DOXSOL. ....160

TABELA 11 – DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS NO MECANISMO DE MORTE DAS CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA DA LINHAGEM MDA-MB-231 TRATADAS COM DOXDS E DOXSOL NAS CONCENTRAÇÕES DE 1,25, 2,5 E 5  $\mu$ M DURANTE 24 HORAS.  $\neq$  = DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ( $P \leq 0,05$ ) DO CONTROLE EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS COM DOXDS E DOXSOL. \* = DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ( $P \leq 0,05$ ) DO TRATAMENTO COM DOXDS EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO COM DOXSOL. ....162



---

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

4T1	Linhagem de carcinoma mamário murino (ER <sup>-</sup> )
BNC	Nanocelulose bacteriana ( <i>Do inglês bacterial nanocellulose</i> )
BNC/CaCO <sub>3</sub>	Nanocelulose bacteriana contendo carbonato de cálcio
BNC/λ-Car	Nanocelulose bacteriana contendo λ-carragenina
CaCO <sub>3</sub> /λ-Car	Micropartículas formadas por carbonato de cálcio e λ-carragenina
CarDS	Sistema de liberação de fármaco desenvolvido em matriz de BNC contendo micropartículas híbridas de CaCO <sub>3</sub> /λ-Car
DAPI	4'-6-Diamino-2-fenilindol
DDS	Sistemas de liberação de fármaco ( <i>Do inglês drug delivery system</i> )
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco ( <i>Do inglês, Dulbecco's modified Eagle's medium</i> )
DO	Densidade óptica
Dox	Doxorrubicina
DoxDS	Sistema de liberação de fármaco (CarDS) contendo Dox
DoxSol	Doxorrubicina em solução
DTG	Termogravimetria derivada
ER	Receptor de estrogênio ( <i>Do inglês, estrogen receptor</i> )
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier ( <i>Do inglês, Fourier transform infrared spectroscopy</i> )
HER2	Fator de Crescimento Epidérmico 2 ( <i>Do inglês, human epidermal growth factor receptor 2</i> )

## SIGLAS E ABREVIATURAS

---

IC <sub>50</sub>	Índice de citotoxicidade para eliminar 50% das células
ICS	Índice de coagulação do sangue
INCA	Instituto Nacional de Câncer (Brasil)
ISO	Organização Internacional para Normalização ( <i>Do inglês, International Organization for Standardization</i> )
L929	Linhagem de fibroblastos de tecido conectivo de camundongo
LAMATE	Laboratório de Materiais Elétricos (UFSC)
LAMEB	Laboratório Multiusuário em Estudos Biológicos (UFSC)
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (UFSC)
MCF-7	Linhagem de adenocarcinoma mamário (ER <sup>+</sup> )
MCVL	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
MDA-MB-231	Linhagem de adenocarcinoma mamário (triplo negativo)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTS	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino ( <i>Do inglês, phosphate buffered saline</i> )
PR	Receptor de progesterona ( <i>Do inglês, progesterone receptor</i> )
SBF	Soro fetal bovino
TGA	Análise termogravimétrica
λ-Car ou λ-Carr	λ-Carragenina (polissacarídeo sulfatado linear)

---

AGRADECIMENTOS .....	vii
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
LISTAS DE FIGURAS .....	xv
LISTAS DE TABELAS.....	xxi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xxiii
SUMÁRIO.....	xxv
1 INTRODUÇÃO.....	31
1.1 ESTRUTURA DO TRABALHO – Diagrama estrutural da tese.....	35
MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	36
1.2 HIPÓTESE .....	40
1.3 OBJETIVOS .....	40
1.3.1 Objetivo principal .....	40
1.3.2 Objetivos específicos .....	41
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	45
2.1 O CÂNCER .....	45
2.2 O CÂNCER DE MAMA.....	47
2.3 TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA.....	48
2.4 DOXORRUBICINA COMO MODELO DE FÁRMACO ANTITUMORAL UTILIZADO NA TERAPIA DO CÂNCER.....	50
2.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER .....	52
2.5.1 MICROPARTÍCULAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO .....	53
2.5.2 NANOCELULOSE BACTERIANA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS .....	54

## SUMÁRIO

---

3	DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE DOXORRUBICINA CONTENDO MICROPARTÍCULAS HÍBRIDAS DE CARBONATO DE CÁLCIO E CARRAGENINA EM MATRIZ DE NANOCELULOSE BACTERIANA – CarDS	61
	RESUMO .....	61
3.1	INTRODUÇÃO.....	62
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	67
3.2.1	Desenvolvimento do CarDS.....	68
3.2.1.1	Produção das matrizes de nanocelulose bacteriana – BNC	68
3.2.1.2	Purificação das matrizes de nanocelulose bacteriana.....	69
3.2.1.3	Síntese de $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ na BNC.....	70
3.2.2	Caracterização do CarDS .....	71
3.2.2.1	Morfologia do CarDS por MEV.....	71
3.2.2.2	Autofluorescência da Dox por MCVL.....	71
3.2.2.3	Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	71
3.2.2.4	Análise termogravimétrica (TGA) .....	72
3.2.2.5	Quantificação da incorporação/liberação do fármaco.....	72
3.2.2.6	Avaliação da incorporação e liberação de Dox.....	73
3.2.2.7	Capacidade de carga de Dox no CarDS.....	73
3.2.2.8	Efeito do pH na cinética de liberação .....	74
3.2.2.9	Análise estatística.....	74
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	75
3.3.1	Desenvolvimento do CarDS.....	75
3.3.2	Caracterização do CarDS .....	76
3.3.2.1	Morfologia do CarDS.....	76
3.3.2.2	Autofluorescência da Dox por (MCVL).....	79
3.3.2.3	Espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	81
3.3.2.4	Análise termogravimétrica (TGA) .....	82
3.3.2.5	Incorporação/liberação do fármaco .....	83
3.3.2.6	Capacidade de carga da Dox.....	86
3.3.2.7	Efeito do pH na liberação de Dox BNC-Car- $\text{CaCO}_3$ .....	88
3.4	CONCLUSÕES .....	91

---

---

4	AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS IN VITRO DO CarDS .....	95
	RESUMO .....	95
4.1	INTRODUÇÃO.....	96
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	100
4.2.1	Produção do CarDS.....	101
4.2.1.1	Produção das matrizes de nanocelulose bacteriana – BNC 101	
4.2.1.2	Síntese das micropartículas de CaCO <sub>3</sub> /λ-Car .....	101
4.2.2	Caracterização físico-química do CarDS.....	101
4.2.2.1	Razão mássica CaCO <sub>3</sub> /λ-Car:BNC.....	102
4.2.2.2	Área superficial .....	102
4.2.2.3	Morfologia do CarDS.....	102
4.2.2.4	Capacidade de absorção de água e taxa de reidratação... ..	103
4.2.2.5	Propriedades mecânicas .....	103
4.2.3	Estudos in vitro .....	103
4.2.3.1	Citotoxicidade .....	103
4.2.3.2	Interação célula-biomaterial.....	106
4.2.3.3	Hemocompatibilidade.....	109
4.2.4	Análise estatística .....	110
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	111
4.3.1	Avaliação da razão CaCO <sub>3</sub> /λ-Car:BNC.....	111
4.3.2	Avaliação da Área superficial.....	114
4.3.3	Avaliação da capacidade de absorção de água e taxa de reidratação .....	114
4.3.4	Avaliação das propriedades mecânicas.....	116
4.3.5	Avaliação da citotoxicidade .....	120
4.3.6	Avaliação da interação célula-biomaterial .....	123
4.3.6.1	Morfologia celular por MEV.....	125
4.3.6.2	Morfologia celular por MCVL.....	127
4.3.7	Avaliação da hemocompatibilidade .....	129
4.3.7.1	Potencial hemolítico .....	129
4.3.7.2	Coagulação dinâmica do sangue.....	131
4.4	CONCLUSÕES .....	133

## SUMÁRIO

---

5	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE DOXORRUBICINA – DoxDS, EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA.....	137
	RESUMO .....	137
5.1	INTRODUÇÃO.....	139
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	142
5.2.1	Produção do DoxDS.....	143
5.2.1.1	Produção do CarDS .....	143
5.2.1.2	Incorporação da Dox.....	143
5.2.1.3	Morfologia do DoxDS.....	143
5.2.2	Avaliação da citotoxicidade da Dox em linhagens celulares...	143
5.2.2.1	Linhagens celulares .....	144
5.2.2.2	Atividade metabólica .....	144
5.2.2.3	Morfologia celular .....	145
5.2.2.4	Ciclo celular .....	145
5.2.2.5	Apoptose/Necrose .....	146
5.2.3	Análise estatística .....	146
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	147
5.3.1	Avaliação da citotoxicidade da Dox e DoxDS nas linhagens de células tumorais .....	147
5.3.2	Avaliação do ciclo celular de células de câncer de mama após tratamento com DoxDS.....	154
5.3.3	Avaliação do mecanismo de morte celular pelo DoxDS .....	158
5.3.4	Avaliação da morfologia celular após tratamento com DoxDS	165
5.4	CONCLUSÕES.....	170
6	CONCLUSÕES GERAIS.....	173
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	177



## Introdução

*“Eu sou parte de uma equipe.  
Então, quando venço, não sou  
eu apenas quem vence. De certa  
forma, termino o trabalho de  
um grupo enorme de pessoas.”  
(Ayrton Senna)*





A quimioterapia é um dos tratamentos utilizados como terapia adjuvante após retirada do tumor, neste caso utilizando quimioterápicos, que por sua vez são normalmente danosos, não somente às células tumorais, mas sim ao organismo como um todo (LIM; WINER, 2011; HAJJAJI; BOUGNOUX, 2013). A busca por tecnologias inovadoras, no que diz respeito ao tratamento quimioterápico de células cancerígenas, faz com que pesquisadores de diversas áreas se unam e busquem tratamentos alternativos para o engenhamento de materiais para enfrentar os desafios de direcionamento do quimioterápico às células tumorais (FENG; CHIEN, 2003). Estes tratamentos alternativos buscam aumentar os índices de sobrevida e melhorar os efeitos colaterais em nível sistêmico, propondo o uso de sistemas de liberação de fármacos (DDS) que auxiliem na entrega in situ do fármaco às células tumorais (ABEER; MOHD AMIN; MARTIN, 2014; MASOOD, 2015; VOICU et al., 2015).

Neste contexto o Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab), vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), explora de forma inovadora o grande potencial da nanocelulose bacteriana (BNC) para o desenvolvimento de materiais biomédicos para diversas aplicações (BARREIRO et al., 2010; MÜLLER et al., 2011; RECOUVREUX et al., 2011; PÉRTILE et al., 2012; BERTI et al., 2013; COLLA; PORTO, 2014; GODINHO et al., 2016). A rede de nanofibras da BNC apresenta-se como um biomaterial promissor para o suporte macromolecular adequado à inclusão de moléculas ativas e, portanto, o desenvolvimento de DDS (CHARREAU; FORESTI; VAZQUEZ, 2013; SILVESTRE; FREIRE; NETO, 2014; CACICEDO et al., 2016). Pesquisadores relatam a potencial utilização de matrizes de BNC, tanto para a liberação de fármaco via oral (MOHD AMIN et al., 2012; PANDEY et al., 2013) quanto para a liberação de fármaco via transdérmica (STOICA-GUZUN et al., 2007; TROVATTI et al., 2011; SILVA et al., 2014).

O Laboratório de Nanobiomateriais e Instituto Biotecnologia Aplicada (CINDEFI) da Universidade Nacional de La Plata (La Plata, Argentina) relata pesquisas voltadas para à utilização de materiais híbridos como, por exemplo, micropartículas híbridas nanoestruturadas

de  $\text{CaCO}_3$ /polímeros/enzimas, aplicadas à biotecnologia biomédica e microbiológica (ISLAN; BOSIO; CASTRO, 2013; BOSIO et al., 2014b, 2014c; L. CACICEDO et al., 2016). As pesquisas realizadas no CINDEFI demonstram que estas construções híbridas são consideradas estruturas altamente estáveis e com alta capacidade de retenção de fármaco (BOSIO et al., 2014b; ISLAN et al., 2015). O compósito híbrido de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car apresenta uma estrutura esférica e até 95% de polimorfismo do cristal de  $\text{CaCO}_3$ , vaterita e uma alta eficiência de encapsulação de doxorubicina (Dox) (até 83%) (BOSIO et al., 2014a). O encapsulamento de fármacos oferece vantagens contra a rápida degradação do fármaco in vivo, assim como a redução de potenciais efeitos secundários tóxicos associados ao fármaco em circulação (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; TROVATTI et al., 2011; ALMEIDA et al., 2014; LI et al., 2014; SILVESTRE; FREIRE; NETO, 2014).

Em virtude das propriedades da matriz de BNC e das características promissoras das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car relatadas anteriormente, este trabalho, propõe a utilização destes biomateriais para o desenvolvimento de um sistema de liberação de fármacos, denominado CarDS, com foco no tratamento adjuvante de células tumorais remanescentes pós-cirurgia, visando um sistema terapêutico complementar para terapias oncológicas. A etapa de desenvolvimento do CarDS foi realizada em conjunto com a Universidade Nacional de La Plata e publicado em um artigo nomeado de *“Self-assembly of carrageenin –  $\text{CaCO}_3$  hybrid microparticles on bacterial cellulose films for doxorubicin sustained delivery”*. Nesta etapa foi avaliado a distribuição das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car entre as fibras da BNC, a interações entre os biomateriais e, por fim, a sua capacidade de incorporação e liberação de um fármaco modelo, a doxorubicina. É importante salientar que todos os ensaios realizados nesta tese tomaram como referência o fármaco doxorubicina (Dox), um quimioterápico utilizado para o tratamento de várias neoplasias, bem caracterizado na literatura (BOUCEK et al., 1987; LANKELMA et al., 1999; BABINCOVÁ et al., 2002; LEE; NA; BAE, 2005; KIEVIT et al., 2011), e acredita-se que é um bom representante para as propostas aqui relatadas.

A concepção de novos materiais é um dos muitos desafios na área de Engenharia Química/Biomédica (ISO/EN10993-6, 2007; OH et al.,

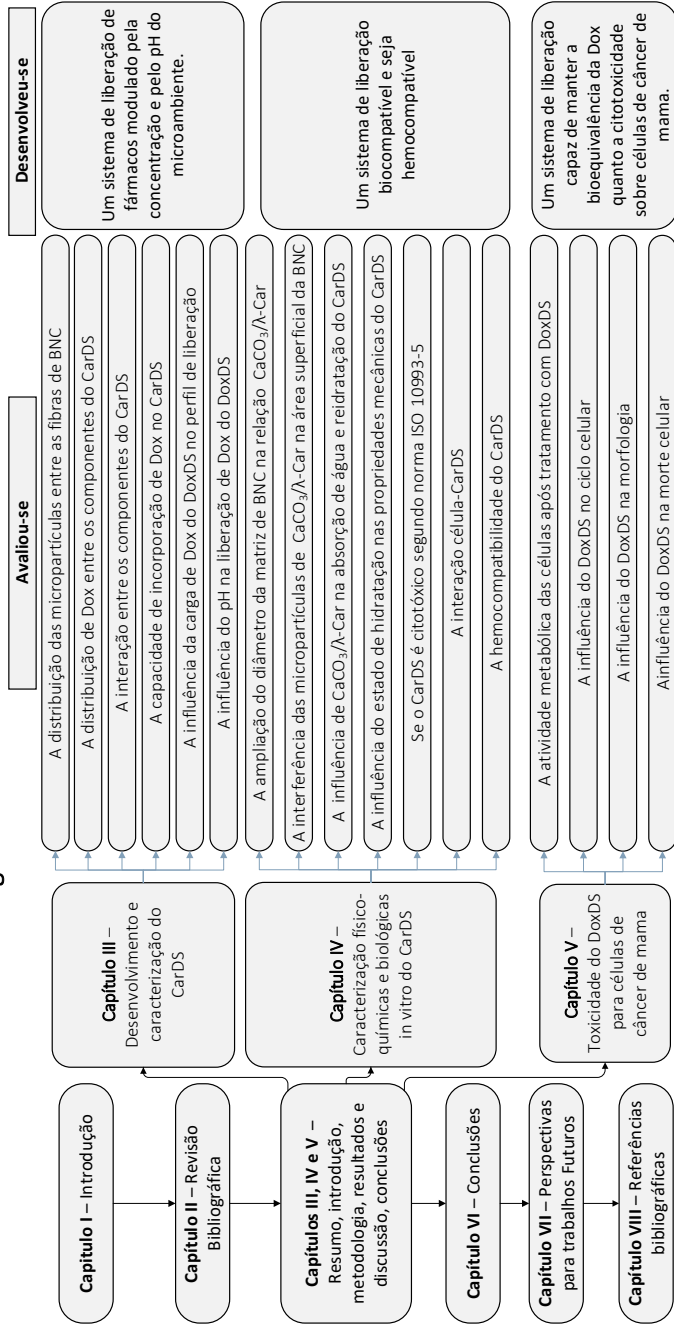
2008; HU; CATCHMARK, 2011; TORRES; COMMEAUX; TRONCOSO, 2012). Para garantir uma utilização eficaz e segura do CarDS visando a aplicação local, avaliou-se as suas características físico-químicas e biológicas in vitro, quanto as dimensões do CarDS, área superficial, absorção de água, taxa de reidratação, propriedades mecânicas, citotoxicidade, interação célula-biomaterial e hemocompatibilidade.

A liberação controlada implica na associação química ou física de fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados in vivo, tenham a capacidade de (i) controlar de forma pré-determinada a taxa de liberação do fármaco a partir desse mesmo sistema, e/ou (ii) conduzir o fármaco até o sítio específico em que este deve atuar (MASOOD, 2015; VOICU et al., 2015; ULLAH et al., 2016). O CarDS contendo doxorubicina (denominado DoxDS) foi testado ainda quanto a sua capacidade antitumoral em diferentes linhagens celulares de câncer de mama (4T1, MCF-7 e MDA-MB-231). A bioequivalência da Dox incorporada ao sistema quando comparada com a Dox em solução foi avaliada quanto à atividade metabólica, ciclo celular, mecanismo de morte e morfologia das respectivas células.

Em resumo, a síntese de micropartículas híbridas entre as fibras de BNC permite o desenvolvimento de um material promissor, com as características biológicas necessárias para aplicação local desejada, com potencial para reter grandes quantidades de fármacos, poderia assim permanecer no local de aplicação por longos períodos, desta forma auxiliando como terapia adjuvante relacionada à recidiva do câncer de mama e/ou diminuição dos efeitos colaterais ocasionados pelos quimioterápicos em nível sistêmico.



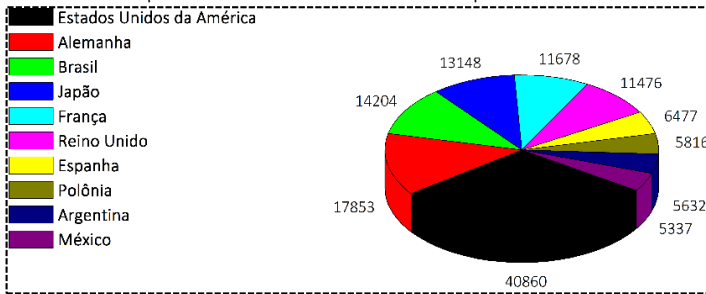
1.1 ESTRUTURA DO TRABALHO – Diagrama estrutural da tese.



MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial da Saúde (OMS) cita o Brasil como o terceiro país em números de mortes por câncer de mama para o ano de 2013, totalizando 14.204 casos de morte (IARC, 2013). A Figura 1 mostra o gráfico de distribuição para os 10 países com os maiores índices de mortes por câncer de mama no mundo.

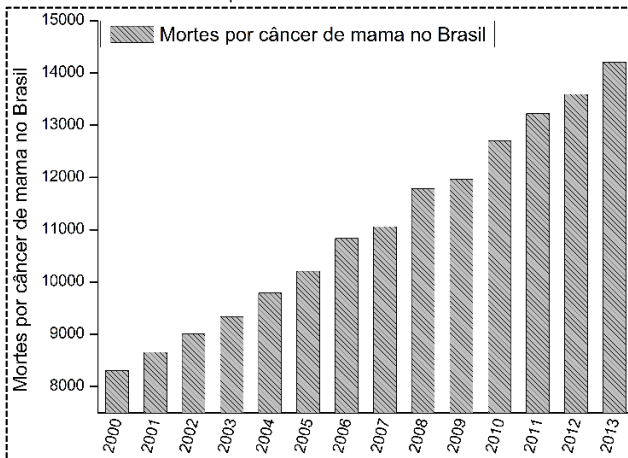
Figura 1 – Mortes por câncer de mama no mundo para o ano de 2013.



Fonte: Adaptado de IARC (2013).

O número de mortes por câncer de mama vem aumentando consideravelmente no Brasil. A Figura 2 mostra a evolução dos casos de câncer de mama do ano de 2000 até 2013.

Figura 2 – Número de mortes por câncer de mama no Brasil.



Fonte: Adaptado de IARC (2013).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, Rio de Janeiro) são esperados 57.960 novos casos de câncer de mama para o Brasil no ano de 2016 (INCA, 2014).

O Ministério da Saúde apresentou o Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento de Doenças Crônicas e não transmissíveis (DCNT) 2011-2022. O objetivo do plano para combater as DCNT é o de promover o desenvolvimento e a implementação de políticas públicas efetivas, integradas e sustentáveis, promovendo a redução destes índices. No entanto, apesar de ser considerado um câncer que relativamente apresenta um bom prognóstico quando diagnosticado e tratado em estágios iniciais, a taxa de mortalidade por câncer de mama continua elevada (DAVIES; HISCOX, 2011; INCA, 2014). Na maioria dos casos, a doença ainda é tardiamente diagnosticada, o que também ocasionou relevantes alterações na Lei nº 11.664. Esta lei garante que todas as mulheres a partir dos 40 anos de idade têm o direito de realizar o exame mamográfico (Lei aprovada em 01 de março de 2015), facilitando a detecção da doença precocemente, e possibilitando um tratamento adequado para cada estágio diagnosticado.

Os estágios de desenvolvimento do câncer de mama são classificações médicas que dependem do grau de extensão da doença e da localização da mesma (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação quanto aos estágios de progressão do câncer de mama e a descrição da sua localização segundo a Sociedade Brasileira de Mastologia.

Estágio	Localização
0	A doença está restrita ao local onde começou (carcinomas <i>in situ</i> ).
1	A doença invadiu a região local e possui no máximo 2 cm de tamanho (carcinomas invasivos).
2	A doença invadiu a região local, possui entre 2 e 5 cm de tamanho e linfonodos pouco comprometidos na axila (carcinomas invasivos).
3	A doença invadiu a região local, possui tamanho maior que 5 cm ou linfonodos pouco comprometidos na axila (carcinomas invasivos).
4	A doença invadiu outras partes do corpo como: ossos, pulmões, fígado, etc.

Fonte: INCA (2014)

A maior parte dos tumores da mama se desenvolvem nos dutos lactíferos e progridem até invadirem outras partes do corpo. Quando a doença é diagnosticada no início, o tratamento tem maior potencial curativo. Quando há evidência de metástase, o tratamento tem por objetivo principal prolongar a sobrevida do paciente e melhorar a sua qualidade de vida (EROLES et al., 2012; INCA, 2014).

O tipo de tratamento é selecionado de acordo com o risco de recidiva das células tumorais, idade da paciente, comprometimento linfonodal, tamanho tumoral, grau de diferenciação, assim como do estágio de progressão que irá ditar a terapia mais apropriada (INCA, 2014; SPRANKLIN; NAIR, 2016).

Nos casos em que a cirurgia é a modalidade terapêutica selecionada, ela pode ser classificada como conservadora, com a retirada apenas do tumor; ou de mastectomia, com a retirada da mama. Após a cirurgia, o tratamento complementar com radioterapia e quimioterapia pode ser indicado em algumas situações (NOH et al., 2015; OWADALLY; STAFFURTH, 2015). Já a reconstrução mamária, deve ser sempre considerada nos casos de mastectomia para fins estéticos e emocionais (EMILEE; USSHER; PERZ, 2010; INCA, 2014; CHANG; CHEN; LIU, 2015).

Nos casos onde a quimioterapia é a modalidade terapêutica complementar ela é utilizada para eliminação de possíveis células que, por ventura, migraram para outros órgãos e evoluíram como metástases antes do processo de retirada do tumor ou para evitar a recidiva das células tumorais no local do tumor (TELLI; CARLSON, 2009).

Dentre as opções quimioterápicas (Tabela 2), a quimioterapia adjuvante é utilizada no tratamento de câncer de mama, diminuindo a chance de recidiva e aumentando a sobrevida dos pacientes (LIM; WINER, 2011; FLATLEY; DODWELL, 2016). Uma vez retirado o tumor, cirurgicamente, a recidiva da doença pode ocorrer por meio de possíveis micrometástases ocultas. Portanto, a finalidade do tratamento pela quimioterapia adjuvante é, justamente, erradicar as micrometástases, diminuindo a chance de recidiva e aumentando a sobrevida (BREZDEN et al., 2000).



Tabela 2 – Classificações da quimioterapia utilizadas para o tratamento de câncer.

<b>Classificação</b>	<b>Descrição</b>
<b>Curativa</b>	Usada com o objetivo de se conseguir o controle completo do tumor, como nos casos de doença de Hodgkin, leucemias agudas, carcinomas de testículo, coriocarcinoma gestacional e outros tumores.
<b>Adjuvante</b>	Após a realização do procedimento cirúrgico, objetivando eliminar as células residuais locais ou circulantes. O intuito deste tratamento é reduzir o risco de câncer de mama recorrente ou metástase (espalhamento).
<b>Neoadjuvante ou prévia</b>	Indicada para redução parcial do tumor antes da cirurgia, facilitando a remoção cirúrgica do tumor.
<b>Paliativa</b>	Não tem finalidade curativa. Usada com a finalidade de melhorar a qualidade da sobrevivência do paciente. É o caso da quimioterapia indicada para carcinoma indiferenciado de células pequenas do pulmão.

Fonte: INCA (2014)

Apesar de a quimioterapia adjuvante ser uma ótima opção para eliminar as células remanescentes, esta causa grande desconforto aos pacientes e é extensivamente cara aos cofres públicos. Nesta etapa, o paciente necessita de aplicações diárias, semanais ou mensais, dependendo da gravidade da doença e os efeitos colaterais são diversos (INCA, 2014).

Importantes avanços no tratamento do câncer de mama aconteceram nos últimos anos, principalmente no que diz respeito às cirurgias menos agressivas, assim como a busca da individualização do tratamento (DHANKHAR et al., 2010; HURVITZ et al., 2013; INCA, 2014; BERNIER J, 2016). Esta individualização no tratamento está gerando novos estudos, entre eles o desenvolvimento de sistemas de liberação específicos de fármaco (DHANKHAR et al., 2010; QIU; PARK, 2012; LAM; GAMBARI, 2014), isto é, sistemas voltados para a liberação do fármaco ativo em situações específicas (locais), minimizando assim os efeitos colaterais relacionados aos altos níveis sistêmicos do fármaco e, conseqüentemente, melhorando a qualidade de vida dos pacientes que necessitam deste tipo de tratamento.

Os quimioterápicos são prescritos com intuito de eliminar as células tumorais remanescentes e/ou metastáticas, mas causam efeitos secundários não pretendidos conhecidos como efeitos colaterais a nível sistêmico. Dessa forma, evidencia-se a importância e a necessidade de investir-se no desenvolvimento de estratégias para reduzir os efeitos colaterais e a recidiva das células tumorais no local do tumor, tornando o tratamento do câncer de mama mais eficaz e menos danoso ao paciente. É com propósito de evitar ou minimizar os efeitos secundários e/ou colaterais causados por fármacos utilizados atualmente para o tratamento adjuvante de terapias oncológicas que este trabalho está inserido. Foi desenvolvido um sistema de liberação gradual de fármacos com intuito de focar em terapias personalizadas proporcionando um aumento da qualidade de vida do paciente com câncer. Este sistema tem foco no tratamento de células de câncer de mama após mastectomia e/ou pós retirada do tumor. A utilização de matrizes de BNC como suporte para o desenvolvimento de um sistema de liberação de fármaco contendo micropartículas híbridas de carbonato de cálcio e carragenina é uma alternativa para diminuir os problemas ocasionados pela quimioterapia convencional, minimizando seus efeitos colaterais e minimizando a recidiva do tumor. A utilização do sistema proposto teria um grande impacto na saúde e na qualidade de vida da população, tendo em vista o grande aumento da incidência de neoplasias nos últimos anos.

### 1.2 HIPÓTESE

A união de matriz de nanocelulose bacteriana (BNC) com micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  favorece a incorporação da doxorubicina, permitindo maior controle sobre a liberação do fármaco às células tumorais.

### 1.3 OBJETIVOS

#### 1.3.1 Objetivo principal

---

Este trabalho tem como objetivo principal desenvolver um novo sistema de liberação de agentes terapêuticos – CarDS, composto por uma matriz de nanocelulose bacteriana e contendo micropartículas híbridas de carbonato de cálcio e carragenina ( $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ ), caracterizar este

sistema quanto as propriedades físicas, químicas e biológicas in vitro, e por fim avaliar o efeito citotóxico in vitro do CarDS contendo doxorrubicina (DoxDS) quando comparado com Dox em solução (DoxSol) em células de câncer de mama.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

---

Dentre os objetivos específicos selecionados para cumprir o objetivo principal estão:

- I. Quanto ao desenvolvimento do sistema de liberação de agentes terapêuticos (CarDS), objetiva-se avaliar:**
  - i O tamanho e a distribuição das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  sintetizadas por cristalização coloidal entre as fibras da BNC;
  - ii A distribuição de doxorrubicina nos componentes do CarDS;
  - iii A interação entre os componentes do CarDS;
  - iv A capacidade de incorporação de Dox no CarDS;
  - v A influência da concentração de Dox em solução na capacidade de incorporação da Dox no CarDS;
  - vi A influência da concentração de Dox incorporada no DoxDS no perfil de liberação da Dox;
  - vii A influência da variação do pH do microambiente no perfil de liberação da Dox do DoxDS.
  
- II. Quanto à análise das propriedades físico-químicas e biológicas in vitro do CarDS, objetiva-se avaliar:**
  - i A ampliação do diâmetro da matriz de BNC na razão mássica de micropartículas/BNC;
  - ii A interferência das micropartículas  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  na área superficial da BNC;
  - iii A influência das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  na absorção de água e na taxa de reidratação do CarDS;

- iv A influência do estado de hidratação nas propriedades mecânicas do CarDS;
  - v A citotoxicidade do CarDS na atividade metabólica e proliferação de células de camundongo da linhagem L929, segundo norma ISO 10993-5;
  - vi As alterações na interação célula-biomaterial;
  - vii A hemocompatibilidade do biomaterial quando em contato com o sangue.
- III. **Quanto ao efeito citotóxico in vitro do CarDS contendo doxorrubicina (DoxDS), comparado com Dox em solução (DoxSol), em linhagens 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231, de câncer de mama, objetiva-se avaliar:**
- i A influência da Dox liberada pelo DoxDS em comparação com DoxSol na atividade metabólica;
  - ii A influência da Dox liberada pelo DoxDS em comparação com DoxSol nas alterações do ciclo celular;
  - iii A influência da Dox liberada pelo DoxDS em comparação com DoxSol no mecanismo de morte celular;
  - iv As possíveis alterações ocasionadas pela Dox liberada pelo DoxDS em comparação com DoxSol na morfologia das células de câncer de mama, acima citadas.

Capítulo  
2

Revisão Bibliográfica

*“Grandes realizações não são  
feitas por impulso, mas por uma  
soma de pequenas realizações.”  
(Vincent Van Gogh)*



## 2.1 O CÂNCER

Segundo a ATSDR (Agency for Toxic Substances and Diseases Registry), o câncer pode ser descrito como um crescimento descontrolado de células anormais no corpo (ATSDR, 2010). Caracteriza-se o desenvolvimento do tumor como um processo de múltiplos passos, cuja iniciação e promoção envolvem etapas no qual o DNA acumula uma série de lesões, levando a célula a perder seu controle da proliferação, diferenciação, apoptose e reparo do DNA (FARBER, 1984). Estas lesões podem ocorrer em genes especiais, denominados proto-oncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Os proto-oncogenes quando ativados transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (cancerização) das células normais. Essas células diferenciadas são denominadas células cancerosas (INCA, 2014).

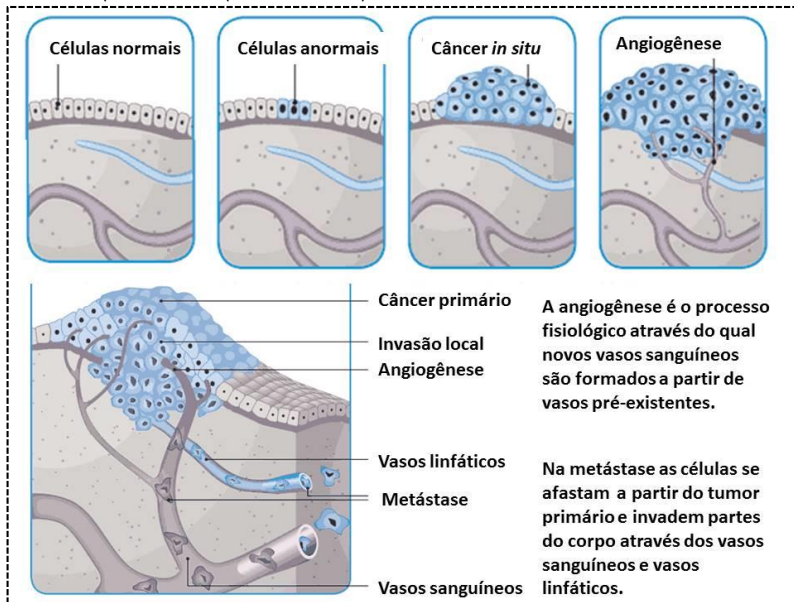
As células cancerígenas dividem-se rapidamente e tendem a ser muito agressivas (invasividade) e incontroláveis (crescimento descontrolado). O alto índice de proliferação celular promove a formação de tumores malignos que podem espalhar-se para outras regiões do corpo gerando metástases (EVAN et al., 2001).

As causas do câncer são variadas, podendo ser ocasionadas por agentes externos ou internos ao organismo e, ao mesmo tempo, estes agentes podem estar inter-relacionados (EVAN et al., 2001). As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou aos costumes próprios da sociedade como, por exemplo, a poluição atmosférica, os hábitos de higiene precários, os ferimentos não tratados adequadamente, o uso de drogas, entre outros. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Os tumores podem surgir nos mais distintos órgãos e tecidos e atingir diferentes tipos celulares. Quando estes começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados de sarcomas (ALISON, 2001).

Outra característica importante de diversos tipos de câncer é a velocidade de multiplicação das células que, ao formarem tumores maiores que 180 µm, recrutam novos vasos sanguíneos (angiogênese) em

função da alta necessidade de oxigenação tecidual para manter todas as células vivas (FOLKMAN, 1971). A presença de vasos sanguíneos facilita a disseminação das células tumorais a tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (metástase) (WEIGELT; PETERSE; VAN'T VEER, 2005), como apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Desenvolvimento do câncer a partir do crescimento descontrolado das células normais in situ até o recrutamento de novos vasos sanguíneos para a manutenção dos nutrientes (angiogênese) e posterior metástase das células tumorais para outras partes do corpo.



Fonte: Adaptado de Cancer Council, Victori e et al. (2015).

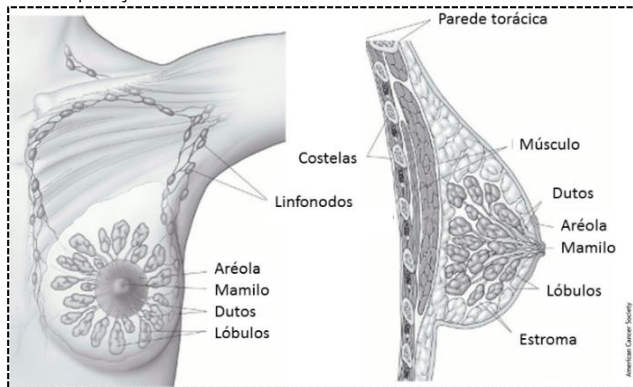
O câncer pode surgir em qualquer parte do corpo, mas alguns órgãos são mais afetados do que outros. Entre os mais afetados estão o pulmão, a mama, o colo do útero, a próstata, o cólon e reto (intestino grosso), a pele, o estômago, o esôfago, a medula óssea (leucemias) e a cavidade oral (boca). Cada órgão, por sua vez, pode ser afetado por tipos diferenciados de tumor, menos ou mais agressivos (SCHROEDER et al., 2011).



## 2.2 O CÂNCER DE MAMA

A mama feminina é composta principalmente de lóbulos (glândulas produtoras de leite), dutos (pequenos tubos que transportam o leite dos lóbulos ao mamilo) e estroma (tecido adiposo e tecido conjuntivo que envolve os dutos e lóbulos, vasos sanguíneos e linfático) (NELSON; BISSELL, 2005) (Figura 4).

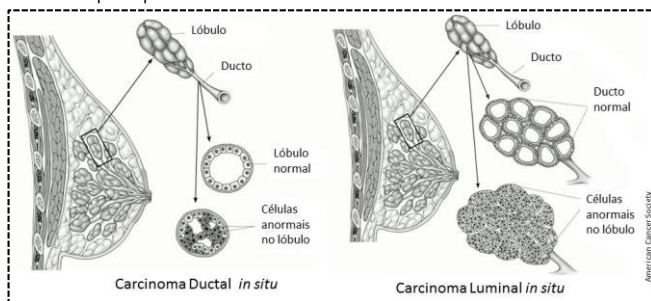
Figura 4 – Composição da mama feminina.



Fonte: Adaptado de American Cancer Society (2015).

O câncer de mama consiste em um crescimento descontrolado de células da mama que adquiriram características anormais (WEIGELT; PETERSE; VAN'T VEER, 2005). A localização mais comum destas células pré-cancerosas está nos lóbulos, produtores do leite ou nos dutos, por onde é drenado o leite, conforme demonstra a Figura 5.

Figura 5 – Principais pontos de desenvolvimento do câncer de mama.



Fonte: Adaptado de American Cancer Society (2015).

Os cânceres de mama podem ser agrupados em três grandes grupos: luminal, HER-2 positivo, e triplo negativo. O tumor luminal, apesar de ser menos agressivo, apresenta receptores de hormônios (estrogênio e progesterona); portanto, os bloqueadores destes receptores de hormônios são métodos de tratamento contra esse tipo de tumor (PAN et al., 2013). Quanto ao grupo HER-2 positivo, existem estudos explorando o bloqueio da via iniciada por esses receptores (DENT et al., 2013; HURVITZ et al., 2013). Porém, no caso do triplo negativo, em que as células não expressam nenhum desses receptores e nem a proteína HER-2, o tratamento mais indicado é a utilização de agentes quimioterápicos (CONTE; GUARNERI, 2009; PICHOT et al., 2009; MONTAGNA et al., 2013).

### 2.3 TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

O tratamento do câncer é realizado por meio de uma ou várias terapias combinadas. Entre as alternativas estão a cirurgia, a radioterapia, as terapias-alvo, a terapia hormonal e a quimioterapia (LIU, 2012).

Segundo o diretor científico do Instituto Oncoguia de São Paulo, avanços nestas quatro classes de tratamento estão sendo desenvolvidos com o objetivo de tornar o tratamento de câncer de mama mais eficiente (ONCOGUIA, 2015). Os principais avanços na cirurgia estão voltados para a retirada das partes da mama afetadas pelo tumor, preservando o mamilo e a pele. Esta técnica é denominada de adenomastectomia, que consiste na retirada da glândula mamária com colocação de prótese (INCA, 2014).

Em relação ao tratamento radioterápico, alguns institutos estão realizando a radioterapia logo após a cirurgia de retirada do tumor. Porém, por se tratar de um procedimento com um custo elevado, nem toda a população tem acesso a esta terapia, geralmente encontrada em poucos centros especializados (RUSSO; RUSSO, 2014).

A terapia hormonal e as terapias-alvo agem diretamente sobre alvos moleculares específicos que têm um papel crítico na proliferação do câncer (DAVIES; HISCOX, 2011). Alguns alvos terapêuticos importantes no tratamento do câncer da mama estão relacionados às terapias anti-HER-2 (fator de crescimento epidérmico-2), anti-VEGF (fator de

crescimento endotelial vascular), anti-ER (receptor de estrogênio) e anti-PR (receptor de progesterona). Estas terapias direcionadas devem permitir uma ação mais eficaz do fármaco e menor toxicidade (DHANKHAR et al., 2010).

Dentre os métodos terapêuticos disponíveis para o tratamento dos tumores antes e após procedimento cirúrgico, destaca-se o uso da quimioterapia, que consiste no emprego de substâncias químicas isoladas ou em combinação com outros fármacos ativos. A maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto benignas. Os antineoplásicos agem diretamente na célula de câncer, atuando em diversas fases do ciclo celular, interferindo nas funções bioquímicas vitais para as células (SUTRADHAR; AMIN, 2014).

A quimioterapia não tem alcançado os resultados desejados e esperados pelos médicos para o tratamento do câncer de mama. Muitos fármacos estão sendo estudados com o intuito de diminuir a citotoxicidade; no entanto, na maioria dos tratamentos, as classes mais utilizadas continuam sendo as antraciclinas e os taxanos (SBOC, 2011). Um dos mecanismos de ação destas classes é a interação com o DNA das células proliferativas, mas como as células de tumor não são as únicas células em proliferação no corpo, todas as células proliferativas acabam sendo afetadas (POLJAKOVÁ et al., 2008). Exemplos de células altamente proliferativas no corpo humano são: as que revestem o trato digestivo; as da medula óssea, responsáveis por produzir as células vermelhas do sangue; as que combatem infecções; e as epidérmicas, responsáveis pelo crescimento capilar. Assim, os pacientes com câncer que recebem tratamento por quimioterapia geralmente sofrem com a indesejável perda de cabelo, com anemia, e estão mais propensos a infecções (CHRISTIANSEN; AUTSCHBACH, 2006; PECTASIDES; PECTASIDES; ECONOMOPOULOS, 2007; MORRIS; KING; KENNEDY, 2009).

Para o desenvolvimento do organismo e manutenção da homeostase tecidual, a taxa de proliferação celular deve ser compensada com a taxa de morte celular. Nesse aspecto, a morte celular possui grande importância quando o tecido sofre injúrias, como nos processos inflamatórios e no câncer (ELMORE, 2007). A morte celular pode ser classificada em apoptose, necrose, autofagia ou catástrofe mitótica,

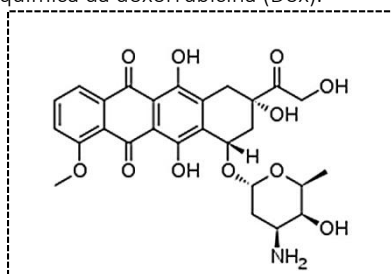
dentre outras. Estas vias podem estar interagindo ou não para a eliminação das células cancerosas do organismo (KAUFMANN; EARNSHAW, 2000).

Os fármacos antitumorais visam restabelecer o processo de morte celular. Apesar dos avanços nas bases deste tipo de tratamento, ainda não existe um método ideal que possa ser adotado com o intuito de suprimir os efeitos adversos sistêmicos, como a depressão da medula óssea e das funções renais, hepáticas, pulmonar e gastrointestinal (INCA, 2014). Neste cenário, torna-se imprescindível a realização de pesquisas que proporcionem um perfil toxicológico mínimo ou nulo do ponto de vista clínico.

### 2.4 DOXORRUBICINA COMO MODELO DE FÁRMACO ANTITUMORAL UTILIZADO NA TERAPIA DO CÂNCER

A doxorubicina (Dox) é um dos fármacos do grupo das antraciclina que está entre os mais eficazes agentes quimioterapêuticos utilizados para o tratamento de diferentes neoplasias malignas, (HAZARDS, 2001; CHRISTIANSEN; AUTSCHBACH, 2006). Essas neoplasias podem incluir câncer da mama, do ovário, sarcomas, doença de Hodgkin, e linfomas não-Hodgkin (CHRISTIANSEN; AUTSCHBACH, 2006; AYDINLIK et al., 2016). No seu estado puro, a Dox se apresenta como um pó vermelho alaranjado que é solúvel em água, alcoóis aquosos e vários solventes (HAZARDS, 2001). A Figura 6 mostra a estrutura química da Dox.

Figura 6 – Estrutura química da doxorubicina (Dox).



Apesar da ampla utilização da Dox para o tratamento de câncer, os mecanismos de ação associados ao efeito antitumoral são os mais variados (MIZUTANI et al., 2005; AYDINLIK et al., 2016). Dentre os

principais mecanismos de ação da Dox citados na literatura estão: a perda da integridade da membrana mitocondrial, a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (MIZUTANI et al., 2005) e ligações com DNA. A Dox impede a replicação celular por intercalantes de DNA, inibindo assim a progressão da enzima topoisomerase II, e, portanto, a síntese de DNA e a transcrição de RNA (FORNARI et al., 1994).

A Dox apresenta um anel de antraciclina em sua estrutura que se intercala entre os pares de nucleotídeos da dupla fita de DNA nas fases de transcrição e replicação, ela induz a lesões no miocárdio, o que limita a dose a ser administrada (KEIZER et al., 1990; DE BEER; BOTTONE; VOEST, 2001). Os contribuintes sugeridos para a cardiomiopatia induzida por DOX incluem a formação de espécies reativas de oxigênio, apoptose, expressão inibida de genes específicos de cardiomiócitos e sinalização molecular alterada (MIZUTANI et al., 2005). Tendo em conta esses vários contribuintes, uma grande variedade de abordagens destinadas a prevenir ou minimizar a cardiotoxicidade de Dox foi testada, mas até agora a capacidade destes tratamentos para proteger o coração de danos é limitada (TAKEMURA; FUJIWARA, 2007). Contudo, pesquisadores observam que o encapsulamento da Dox pode diminuir o efeito citotóxico ocasionado em células saudáveis e direcionar o tratamento para o local do tumor (FANG; NAKAMURA; IYER, 2007; KOJIMA et al., 2013a; PATRA et al., 2015).

Mizutani e colaboradores (2005) estudaram os mecanismos de indução de apoptose pela doxorubicina pela geração de peróxido de hidrogênio em células derivadas de leucemia humana. Estes pesquisadores observaram que a apoptose induzida pela Dox foi iniciada principalmente por meio de lesões oxidativas do DNA, ou seja, causando a clivagem de DNA e, subsequentemente, a apoptose celular (MIZUTANI et al., 2005).

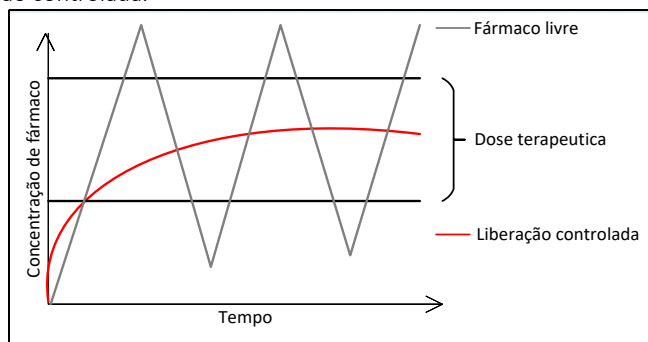
Patra e colaboradores (2015) estudaram a retenção de Dox em nanodiscos hexagonais porosos de óxido de zinco e avaliaram o mecanismo de ação pelos ensaios de ciclo celular e expressão de determinadas moléculas de sinalização e ambos os níveis de mRNA e proteína. Verificaram que o tratamento de células de câncer de mama pelos nanodiscos contendo Dox induziu a ativação da proteína supressora do tumor, a p53, causando a sua regulação pela diminuição da proteína

antiapoptótica Bcl-2. Enquanto isso, a expressão de proteínas pró-apoptóticas Bax aumentou, juntamente com a ativação sinérgica da caspase 9 nas células tratadas. Estes resultados mostraram que os nanodiscos contendo Dox desencadeiam a proteína p53 e aumentam a sua atividade de morte por apoptose de células cancerosas (PATRA et al., 2015).

### 2.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER

Entre os métodos alternativos para o tratamento de câncer estão os sistemas de liberação de fármaco que apresentam uma interessante abordagem terapêutica, principalmente no que se refere aos benefícios que estes sistemas podem proporcionar, já que são destinados a manter a dose terapêutica entre dos níveis de ineficiência e teórico (QIU; PARK, 2012). Já os métodos convencionais de administração a concentração da droga na corrente sanguínea aumenta até atingir o nível máximo de dissolução (pico) e então declina, sendo requerida a administração de nova dose para manter os níveis de concentração. A Figura 7 mostra uma comparação das variações de concentração de fármacos administrados pela terapia convencional e por liberação controlada.

Figura 7 – Representação esquemática das doses terapêuticas, fármaco livre e liberação controlada.



Fonte: Elaborado pela autora (2016).

O encapsulamento de fármacos em nano/micropartículas tem possibilitado o desenvolvimento de terapias mais eficientes e com uma

redução dos efeitos colaterais, ocasionados pela quimioterapia em nível sistêmico e o direcionamento do fármaco às células tumorais (WONG et al., 2006; KANG et al., 2010; GAUTIER et al., 2012; PRASAD et al., 2013).

### 2.5.1 MICROPARTÍCULAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO

As micropartículas de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) são consideradas uma alternativa para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. A Tabela 3 mostra uma série de biomateriais utilizados como sistemas de liberação de fármacos formados por micropartículas de  $\text{CaCO}_3$ , a relação dos respectivos fármacos utilizados e a influência na porcentagem de liberação.

Tabela 3 – Porcentagem de liberação de fármaco a partir de sistemas de liberação desenvolvidos com carbonato de cálcio como um dos componentes.

Componente	Fármacos	Liberação	Referência
Multicamadas de poliestireno sulfonato de sódio	Sulfato de protamina	90% em ca. 16 h	WANG et al., 2006
Nanoesfera de $\text{CaCO}_3$	Doxorrubicina	80% em 160 h	PENG et al., 2013
Nanoesfera de $\text{CaCO}_3$ /alginato	Doxorrubicina	20% em 160 h	
Poli(hidrocloreto de alilamina) e poliestireno sulfonato de sódio	Daunorrubicina e doxorrubicina	40 a 90% em 14 h	ZHAO et al., 2006
Poliuretano amina/poliestireno sulfonato	Doxorrubicina	20 a 60% em 36 h	DU et al., 2013
Nanocristais de carbonato de cálcio	Doxorrubicina	80 % em 30 minutos	KAMBA et al., 2013
Fosfato de Cálcio	Heparina	50% em 175 h	LIANG et al., 2013
Pectina e $\alpha$ -quitina	Alendronato	90% em 30 min	KUMAR et al., 2013
Carboximetilcelulose/ quitosana/alginato	Doxorrubicina	10 a 80% variação do pH	PENG; ZHAO; GAO, 2010
Poliuretano amina alifático/ poliestireno sulfonato de sódio	Doxorrubicina	20 a 60% em 35 dias	SHI et al., 2014
Ácido hialurônico/ $\lambda$ , $\kappa$ , e $\iota$ carragenina	Doxorrubicina	20 a 70% em 25 dias	BOSIO et al., 2014b

Os estudos citados na Tabela 3 demonstram a ampla utilização de carbonato de cálcio para o desenvolvimento de compósitos de DDS. Porém, se tomarmos os valores de Dox liberada, observamos que estes

são liberados em um curto período (horas). Porém, Bosio e colaboradores (2014a,b) e Shi e colaboradores (2014) demonstraram que algumas formulações de micropartículas de  $\text{CaCO}_3$  mostram-se mais estáveis, apresentando uma taxa de liberação mais lenta e gradual (dias) em presença das micropartículas (BOSIO et al., 2014a).

Ishikawa e colaboradores (2002) realizaram um estudo em ratos comparando o uso de  $\text{CaCO}_3$  em pó para entrega nasal de fármaco com formulação líquida. Os resultados demonstraram que a formulação em pó insolúvel de  $\text{CaCO}_3$  melhora a biodisponibilidade nasal, predominantemente por retardamento da eliminação do medicamento a partir do sítio de absorção (ISHIKAWA et al., 2002).

Haruta e colaboradores (2003) realizaram um estudo em macacos e humanos voluntários, com micropartículas de carbonato de cálcio porosas para a liberação de insulina intranasal. Estas micropartículas permitiram um efeito farmacológico de ação rápida e de curta duração contra a hiperglicemia, sendo mais benéfica do que os sistemas de administração de insulina pulmonar para o tratamento de diabetes (HARUTA et al., 2003).

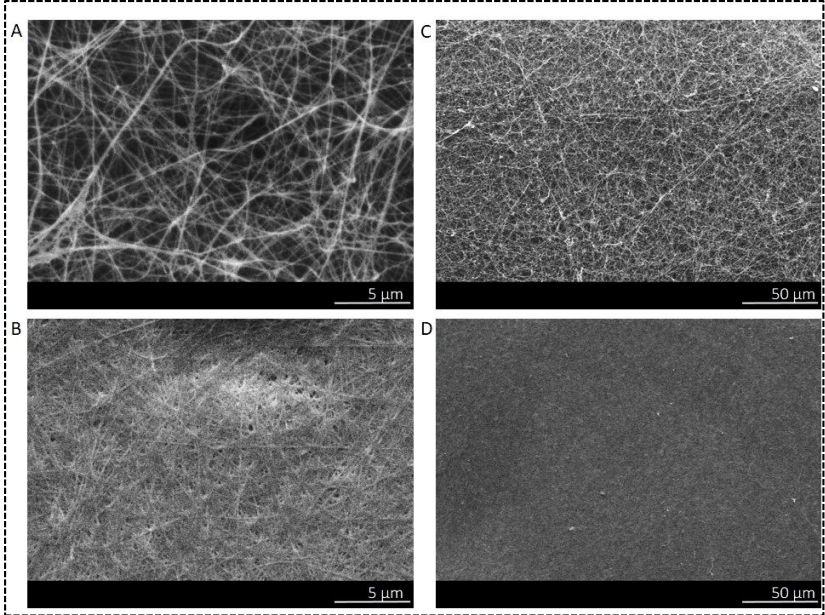
### 2.5.2 NANOCELULOSE BACTERIANA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

---

A nanocelulose bacteriana (BNC), uma rede tridimensional de nanofibras também conhecida como biocelulose (TROVATTI et al., 2011; TORRES; COMMEAUX; TRONCOSO, 2012; SILVESTRE; FREIRE; NETO, 2014; GODINHO et al., 2016; LCACICEDO et al., 2016), é um polissacarídeo extracelular produzido por diversas bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Agrobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, entre outros, sob forma de um hidrogel (99 % água) na interface ar/meio de cultura. Composta por unidades de glicose unidas por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (PÉRTILE et al., 2012; LEITÃO et al., 2013). A Figura 8 mostra a morfologia de ambos os lados da matrix de BNC. O lado poroso (Figura 8A e 8C) é caracterizado por uma menor densidade de fibras e o lado denso (Figura 8B e 8D) é caracterizado pela ampla densidade de fibras.



Figura 8 – Microscopia eletrônica de varredura. Micrografias de ambos os lados da BNC (A) Lado poroso com ampliação de 10000 ×, (B) Lado denso com ampliação de 10000 ×, (C) Lado pooso com ampliação de 1000 × e (D) Lado denso com ampliação de 1000 ×.



Em virtude da sua estrutura, a BNC representa um suporte macromolecular adequado à inclusão de fármacos e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de sistemas de liberação específica (CACICEDO et al., 2015).

A Tabela 4 descreve os principais sistemas de liberação de fármaco desenvolvidos a partir de nanocelulose, sua forma de ministração e respectiva porcentagem de liberação.

Tabela 4 – Porcentagem de liberação de fármacos a partir de sistemas de liberação de fármaco contendo nanocelulose bacteriana como um de seus componentes e seu modo de aplicação.

Componentes	Fármaco	Liberação	Aplicação	Referência
<b>Poli(ácido acrílico)</b>	Albumina sérica bovina	70 a 90% em 14 h	Oral	MOHAMAD et al., 2014
<b>Glicerina</b>	Glicose	-	Transdermal	ALMEIDA et al., 2014
<b>Poli(ácido acrílico-co-acrilamida)</b>	Teofilina	70 a 90% em 24 h	Oral	MOHD AMIN et al., 2013
<b>Poli(óxido de etileno)-β-poli-caprolactona)</b>	Retinol	90% em 90 h	Transdermal	NUMATA; MAZZARINO; BORSALI, 2015
<b>Acrilamida</b>	Teofilina	80% em 125 h	Oral	PANDEY; MOHD AMIN, 2014
<b>Glicerol 5%</b>	Diclofenaco	90% em 30 min	Transdermal	SILVA et al., 2014
<b>Glicerol 1%</b>	Lidocaína e ibuprofeno	90% em 4 h	Tópica e transdermal	TROVATTI et al., 2012
<b>Poli(vinil álcool)/ quitosana</b>	Ibuprofeno	70 a 90% em 6 h	-	PAVALOIU et al., 2014

Os estudos apresentados na Tabela 4 mostram que o foco principal dos pesquisadores está relacionado aos modos de administração oral e transdermal, apresentando as mais diferenciadas taxas de liberação.

A BNC pode ser usada como um biomaterial comercial pela sua moldabilidade in situ, bem como a sua produção relativamente eficiente em termos de custo. Devido às suas singulares propriedades, a BNC tem despertado grande interesse tanto comercial quanto cientificamente em várias áreas, principalmente na área biomédica (HONG et al., 2006; ALMEIDA et al., 2014). A arquitetura nanofibrilar da BNC apresenta certas semelhanças com os componentes da matriz extracelular, principalmente o colágeno. Tanto a BNC quanto o colágeno representam estruturas de suporte mecânico primárias para seus respectivos tecidos de origem. As fibras de colágeno e nanocelulose são semelhantes em tamanho (cerca de 100 nm de diâmetro) e são montadas a partir de

moléculas precursoras extracelularmente em cadeias poliméricas. Em aplicações biomédicas a BNC está sendo investigada para uso similar à matriz de colágeno; no entanto, esta pode ter vantagem sobre o colágeno, no que diz respeito à baixa ou nula reatividade imunológica. Proteínas são particularmente reconhecidas pelo sistema imune e propensas a provocar respostas imunológicas, enquanto que a BNC tem a distinta vantagem de se tratar de um polissacarídeo com reduzido efeito imuno-estimulador (WANG; ZHU; DU, 2011).

A síntese de micropartículas de  $\text{CaCO}_3$  entre as fibras da matriz de BNC é uma estratégia promissora ao desenvolvimento de novos biomateriais para a engenharia de tecidos e de sistemas de liberação de fármacos. Porém, existem poucos estudos voltados a esta linha de pesquisa; como mostrado na Tabela 5, os principais estudos relatam sua aplicação para regeneração óssea.

Tabela 5 – Potencial de aplicação das matrizes de sistemas de liberação de fármacos compostos de partículas de  $\text{CaCO}_3$  e matriz de nanocelulose bacteriana.

<b>Estratégia</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
Nucleação biomimética e crescimento de $\text{CaCO}_3$ em matrizes de BNC	Regeneração óssea	VYROUBAL et al., 2013
Irradiação ultrassônica para deposição de $\text{CaCO}_3$ em matrizes de BNC	Não relata uma possível aplicação	STOICA-GUZUN et al. 2012
Irradiação de microondas na deposição de $\text{CaCO}_3$ em matrizes de BNC	Regeneração óssea	STOICA-GUZUN et al., 2013
Montagem biomimética de micropartículas de $\text{CaCO}_3$ em BNC	Engenharia de tecidos	LIU et al., 2013

O desenvolvimento de técnicas alternativas para o tratamento do câncer de mama, especialmente as que possibilitem uma menor recidiva das células tumorais e reduzam o efeito colateral ocasionado pelo fármaco em nível sistêmico é desejável.



Capítulo

# 3

## Desenvolvimento de um Sistema de Liberação de Doxorrubicina contendo Micropartículas Híbridas de Carbonato de Cálcio e Carragenina em Matriz de Nanocelulose Bacteriana - CarDS

O Capítulo 3 apresenta os tópicos: resumo, introdução, materiais e métodos, resultados e discussão e conclusões da etapa de desenvolvimento do CarDS, produzido pela síntese de micropartículas híbridas de carbonato de cálcio e carragenina em matriz de nanocelulose bacteriana. Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a Universidade Nacional de La Plata e publicada em um artigo intitulado “*Self-assembly of carrageenin-CaCO<sub>3</sub> hybrid microparticles on bacterial cellulose films for doxorubicin sustained delivery*”, em 2015, no Journal of Applied Biomedicine, pelos autores: Maximiliano L. Cacicedo, Karina Cesca, Valeria E. Bosio, Luismar M. Porto e Guillermo R. Castro.



### 3 DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE DOXORRUBICINA CONTENDO MICROPARTÍCULAS HÍBRIDAS DE CARBONATO DE CÁLCIO E CARRAGENINA EM MATRIZ DE NANOCELULOSE BACTERIANA – CarDS

---

#### RESUMO

Levando em consideração a necessidade de se investir em novas tecnologias para auxiliar no tratamento adjuvante da recidiva do câncer de mama, propõe-se o desenvolvimento de um novo sistema terapêutico complementar para terapias oncológicas e de aplicação local (CarDS). O CarDS foi desenvolvido pela síntese de micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3$  e carragenina ( $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ ) em matriz de nanocelulose bacteriana (BNC). O CarDS foi caracterizado quanto, ao tamanho e distribuição das micropartículas entre as fibras de BNC, distribuição da Dox entre os componentes do sistema, interação físicas e termogravimétricas, incorporação de Dox entre os componentes do sistema, modulação da incorporação e liberação em função da Dox em solução, influência do pH do microambiente na liberação da Dox. Foi demonstrado uma distribuição uniforme micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  entre as fibras de BNC, a Dox se concentrou mais intensamente junto às micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  sintetizadas na matriz de BNC, a interação entre os componentes e a análise termogravimétrica demonstraram alterações na BNC pela presença das micropartículas e da Dox, as modificações ocasionadas pela presença das micropartículas na BNC possibilitou uma incorporação de ~80% da Dox em solução (DoxDS), a concentração de Dox no DoxDS pode ser modulado pela variação da concentração da Dox em solução, o DoxDS em diferentes concentrações mostrou um liberação inversamente proporcional a sua concentração incorporada, a cinética de liberação do fármaco a partir do DoxDS pode ser alterada pela variação do pH do microambiente local, observando uma maior liberação em pHs mais baixos. Por fim, o CarDS apresenta-se vantajoso pela alta retenção do fármaco e sua liberação gradual ocasionado pelas variações da concentração incorporada e pH do microambiente local, possibilitando sua aplicação para terapia local.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A nanocelulose bacteriana (BNC) é um polissacárideo hidrofílico extracelular constituído por cadeias de glicose  $\beta$ -(1→4) e biosintetizadas na interface meio de cultura/ar pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, entre outros microrganismos (PETERSEN; GATENHOLM, 2011; CACICEDO et al., 2016; ULLAH et al., 2016). A estrutura nanofibrillar original tem capacidade de reter água (ca. 99%) e exibe propriedades específicas tais como pureza, elevado grau de polimerização (até 8000), cristalinidade (70-80%), e estabilidade mecânica (BARUD et al., 2011). Particularmente, a BNC tem sido amplamente estudada para a cicatrização de feridas e engenharia de tecidos (SVENSSON et al., 2005; HELENIUS et al., 2006; RECOUVREUX et al., 2011; MULLER et al., 2013; COLLA; PORTO, 2014).

O desenvolvimento de filmes nanocompósitos baseados em BNC em associação com outros polímeros foi realizado com base em duas estratégias principais: fibrilas de BNC foram dissolvidas em uma solução aquosa à base de polímero, seguida por remoção do solvente (FERNANDES et al., 2009); alternativamente, filmes nanocompósitos foram produzidos por meio da adição da solução de polímero durante o crescimento in situ das fibrilas de BNC em cultura de células microbianas. Estudos realizados em nanocompósitos de BNC com gelatina, colágeno, ácido hialurônico e alginato, além de apresentarem melhoria das propriedades mecânicas, não foram citotóxicos quando testados com diversas culturas de células animais, assim como apresentarem adesão celular, crescimento e proliferação (CAI; HOU; YANG, 2011; CHIAOPRAKOBKIJ et al., 2011; LOPES DURAN et al., 2014). Além disso, a BNC foi proposta como candidata em potencial para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos buscando-se a aplicação tópica (ALMEIDA et al., 2014).

O carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) é um dos materiais mais abundantes na terra e pode ser encontrado em três diferentes polimorfismos (vaterita, aragonita e calcita). Entre eles, a vaterita é o mais estável e útil para sintetizar materiais híbridos devido ao seu tamanho de cristal, distribuição e geometria (BEUVIER et al., 2011). Várias abordagens foram utilizadas para determinar o polimorfismo e morfologia dos cristais de  $\text{CaCO}_3$ , incluindo controle do tamanho, da forma, e da agregação. Liu e colaboradores (2013) avaliaram a síntese de partículas lamelares



híbridas de  $\text{CaCO}_3$  induzidas por clara de ovo em nanocelulose bacteriana. Os dados experimentais sugerem que o híbrido tem uma superfície rugosa e uma estrutura tridimensional elaborada, com porosidade controlável, com potencial para aplicação em engenharia de tecidos (LIU et al., 2013). STOICA-GUZUN e colaboradores (2013) avaliaram o efeito da irradiação de microondas na deposição de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) em membranas de nanocelulose bacteriana (BNC) obtendo dois tipos de polimorfismos de carbonato de cálcio, a calcita e vaterita. STOICA-GUZUN e colaboradores (2012) avaliaram o efeito da irradiação ultrassônica na deposição de carbonato de cálcio em membranas de celulose bacteriana, obtendo os polimorfismos calcita e vaterita na presença ou na ausência de irradiação ultra-sônica. Ma e colaboradores (2013) avaliaram a produção de nanocompósitos híbridos de BNC/ $\text{CaCO}_3$  e carboximetilcelulose/ $\text{CaCO}_3$  pelo método assistido por microondas. Estes autores observaram que a concentração de celulose favoreceu o crescimento de  $\text{CaCO}_3$  e a escolha do tipo de celulose apropriada é muito importante para a cristalinidade dos compósitos de celulose/ $\text{CaCO}_3$  produzidos, assim como o polimorfismo de  $\text{CaCO}_3$ . A morfologia do  $\text{CaCO}_3$  mudou de calcita para vaterita com o aumento da concentração de celulose. No entanto, estas técnicas fornecem morfologias heterogêneas e estruturas cristalinas mistas (vaterita-calcita) dos compósitos  $\text{CaCO}_3$ /BNC que não são apropriadas para fins tecnológicos, tais como a liberação de fármacos.

Carrageninas (Cars) são hidrocolóides lineares compostos quimicamente de ésteres de sulfato de galactose e 3,6-anidrogactose ligados por ligações  $\alpha$ -1,3 e  $\beta$ -1,4. As Cars são normalmente utilizadas como agentes de gelificação, espessantes, emulsificantes e estabilizantes em aplicações alimentícias e farmacêuticas. Além disso, foram relatadas atividades biológicas das Cars tais como anticoagulantes, imunomoduladores, antivirais, anti-trombóticos e anti-tumorais (CAMPO et al., 2009).

A doxorubicina (Dox) é um dos fármacos extensivamente utilizados para terapias oncológicas, sendo comumente administrada pela via intravenosa. Infelizmente, a Dox é altamente tóxica, e a biodistribuição em células não-alvo pode causar efeitos secundários indesejáveis em vários tecidos e órgãos (por exemplo, coração, fígado, rins, estômago,

cérebro e linhagens de células sanguíneas) e desta forma causando sintomas indesejáveis durante a quimioterapia, tais como vômitos, náuseas, problemas gastrointestinais, além de frequentemente induzir alucinações e tonturas. O encapsulamento de fármacos tem demonstrado muitas vantagens, como: (i) a redução de potenciais efeitos secundários tóxicos associados com a circulação sistêmica do fármaco "livre", (ii) a proteção do fármaco contra a degradação in vivo, (iii) o aumento do conforto do paciente, evitando doses de infusão repetitivas e (iv) uma farmacocinética favorável do fármaco ao paciente. Alguns exemplos de micro e nanopartículas contendo Dox, tais como transportadores poliméricos, lipossomas, nanopartículas magnéticas e inorgânicos foram recentemente revistos (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012).

O FDA (Food and Drug Administration, EUA) relatou a aprovação de quatro medicamentos contra o câncer para pacientes com características genéticas específicas que é reflexo de uma nova tendência para tratamentos terapêuticos: a medicina personalizada. Medicina personalizada pode ser definida como a personalização dos cuidados de saúde mediante a adaptação das terapias com base nas características individuais do paciente, da patologia e necessidades (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2013). Além disso, a distribuição variável e a eficácia terapêutica das nanopartículas contendo Dox, particularmente relacionados ao microambiente tumoral em linhagens celulares de câncer de mama, foi recentemente relatada. A heterogeneidade biológica dos tumores, constituídos por uma diversidade de células tumorais e o microambiente circundante, apresentaram sensibilidade diferente para as quimioterapias com nanopartículas contendo Dox mas não para doxorubicina "livre" (SONG et al., 2014).

Entre as limitações dos filmes terapêuticos implantáveis pode-se mencionar os requisitos de equipamentos sofisticados, tais como scanners e ferramentas de biologia molecular para estabelecer as características do tumor, a fim de determinar a quantidade de fármaco adequada a ser administrada, e a necessidade de cirurgia para implante e retirada do filme do paciente em determinado intervalo de tempo. No entanto, do ponto de vista terapêutico, a utilização de um dispositivo implantável carregado com fármaco altamente tóxico, como a

doxorubicina, é vantajosa, uma vez que a administração do fármaco é somente local e reduz a distribuição sistêmica da Dox, aumentando não só a qualidade de vida do paciente oncológico, mas também sua sobrevida. Particularmente, durante a detecção dos primeiros estágios de tumores sólidos e/ou após uma cirurgia que potencialmente permite a aplicação de quimioterapia local, o sistema DDS é mais eficaz na redução da recidiva do câncer e evita efeitos colaterais indesejáveis ocasionados pelas elevadas concentrações sistêmicas dos fármacos. Além disso, há uma liberação tópica de fármaco controlada e prolongada para assegurar uma concentração adequada, e difusão e absorção para células cancerosas ao longo de muitos ciclos de divisão das células tumorais (WOLINSKY; COLSON; GRINSTAFF, 2012).

Em trabalhos anteriores, a Dox foi encapsulada em micropartículas híbridas nanoestruturadas (N-hMPs) de  $\text{CaCO}_3$  e  $\lambda$ -Car. Esta nanoestrutura possui formato esférico com até 95% de polimorfismo do cristal de vaterita, o que resultou em uma alta eficiência de encapsulação de Dox (até 83) e falta de toxicidade em culturas de células depois de 24 h (BOSIO et al., 2014a). Além disso, do ponto de vista terapêutico, o principal desafio da administração de Dox ainda está relacionado com a redução da atividade citotóxica multidireccional em vários tecidos e órgãos associados aos efeitos secundários indesejáveis (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012).

Até onde se tem conhecimento, este é o primeiro estudo de desenvolvimento de matrizes de nanocelulose bacteriana contendo micropartículas híbridas de carbonato de cálcio e carragenina para a liberação modulada local de fármacos, com foco na aplicação em terapias oncológicas específicas, em particular para o tratamento de câncer de mama. Alguns pontos relativos à interação destes componentes precisam ser explorados em maiores detalhes, e suscitam questões tais como:

- i. Qual o tamanho e distribuição das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car sintetizadas entre as fibras de BNC?
- ii. Como a Doxorubicina está distribuída entre os componentes do sistema CarDS?
- iii. Como ocorre a interação entre os componentes do CarDS e a Doxorubicina?

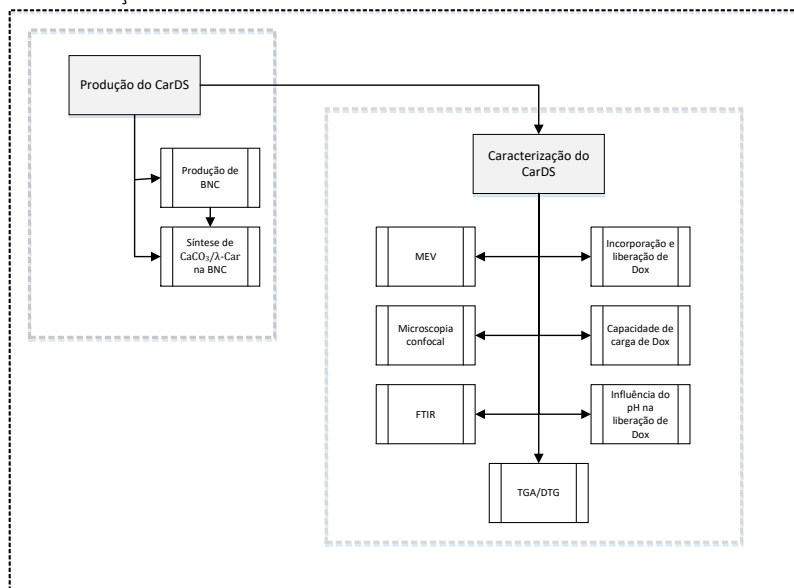
- iv. Qual a influência de cada componente do CarDS na incorporação da Doxorrubicina?
- v. Qual o comportamento do sistema CarDS quando exposto a diferentes cargas de Dox?
- vi. Como a carga de Dox incorporada ao DoxDS pode modular o perfil de liberação?
- vii. Qual o perfil de liberação quando submetemos o sistema DoxDS a diferentes condições ambientais pela variação local do pH?

Para responder os questionamentos acima, os procedimentos experimentais foram conduzidos de forma a estabelecer a caracterização das micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  sintetizadas por cristalização coloidal na matriz de BNC (CarDS), com técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia confocal, FTIR, TGA, cinéticas de incorporação e liberação da Dox.

### 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 9 apresenta o fluxograma descritivo contendo as etapas relacionadas ao desenvolvimento e caracterização do sistema de liberação de fármacos desenvolvido em matriz de BNC contendo micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  (CarDS) e contendo Doxorubicina (DoxDS).

Figura 9 – Fluxograma descritivo das etapas relacionadas ao desenvolvimento e caracterização do CarDS.



A etapa de desenvolvimento do CarDS é composta pela produção das matrizes de BNC e síntese das micropartículas híbridas entre as fibras de BNC, como descrito a seguir. A etapa de produção da BNC foi realizada no Laboratório de Tecnologias Integradas, Intelab/UFSC (Florianópolis, Brasil) e a parte de desenvolvimento e caracterização do sistema CarDS foi desenvolvido no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Fermentações – CINDEFI/UNPL (La Plata, Argentina).

### 3.2.1 Desenvolvimento do CarDS

#### 3.2.1.1 Produção das matrizes de nanocelulose bacteriana – BNC

##### 3.2.1.1.1 Linhagem bacteriana

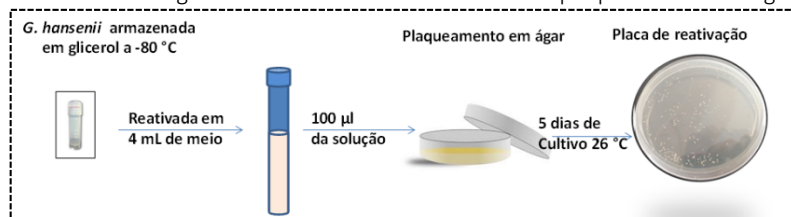
A linhagem bacteriana *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 (recentemente renomeada para *Komagataeibacter hansenii*) foi estocada em ultra freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Nuaire, EUA), em meio contendo 20% de glicerol, reativada em meio manitol ( $25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de manitol,  $5,0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $3,0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de peptona) e mantida em placa ágar manitol contendo ágar  $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , a pH 6,5.

##### 3.2.1.1.2 Meio manitol e meio ágar-manitol

##### 3.2.1.1.3 Reativação da cultura estoque e produção da placa de trabalho

A Figura 10 mostra a ilustração do procedimento de reativação da *G. hansenii* armazenada em glicerol (20%) em ultrafreezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Figura 10 – Ilustração do procedimento de reativação da bactéria *G. hansenii* armazenada em glicerol a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  em meio de cultivo e plaqueamento em ágar.



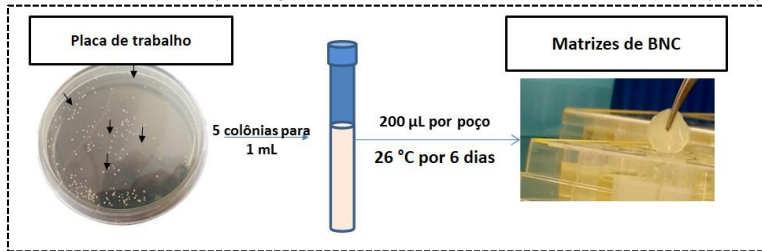
Uma alíquota da bactéria armazenada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  em glicerol (20%) foi reativada em 4 mL de meio manitol. Cem microlitros desta solução foram plaqueados em placa ágar-manitol e acondicionado em incubadora BOD (Nova Ética, Brasil) a  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 dias, até o crescimento de colônias isoladas (placa de reativação). Para a produção da placa de trabalho foram utilizadas cinco colônias isoladas da bactéria (placa de reativação), previamente ressuspensas em 1 mL de meio manitol. A solução foi homogeneizada por 60 segundos no vórtex (Vision, Coreia), e deixada decantar por 10 segundos. A densidade óptica (DO) foi lida em espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA), a  $660\text{ nm}$  (valor de

referência  $DO_{660}=0,15$ ). Após leitura, foi realizada uma diluição seriada até  $10^{-5}$ , sendo então plaquedados  $100 \mu\text{L}$  da solução diluída  $10^{-5}$  em placa ágar-manitol, que foi mantida na BOD (Nova Ética, Brasil) por 7 dias a  $26^\circ\text{C}$ . Após o crescimento das colônias isoladas, o procedimento de produção das matrizes foi realizado.

#### 3.2.1.1.4 *Produção das matrizes de nanocelulose bacteriana*

A Figura 11 ilustra o procedimento de reativação das colônias e produção das matrizes de nanocelulose bacteriana.

Figura 11 – Ilustração do procedimento de reativação das colônias de *G. hansenii* em meio de cultivo e produção da matriz de nanocelulose bacteriana (BNC).



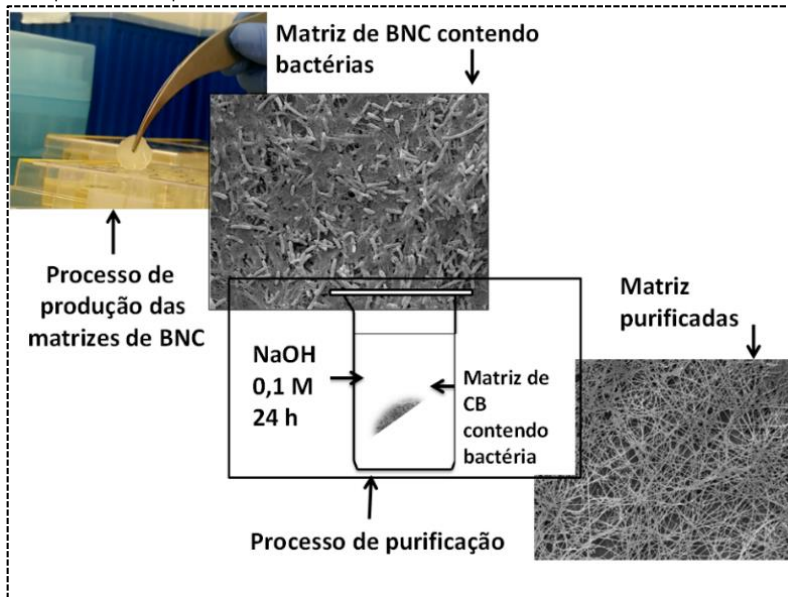
Para produzir as matrizes de BNC, as colônias da placa de reativação foram reativadas em meio de cultivo manitol, seguindo a relação de 5:1 (número de colônias/volume de meio). Em seguida, foram homogeneizadas em vórtex (Vision, Coreia) por 60 segundos, deixada decantar por 10 segundos e feita a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA), a  $660 \text{ nm}$  (valor de referência  $DO_{660} = 0,15 \text{ nm}$ ). Foi realizada uma diluição de 10 vezes em meio de cultivo manitol (inóculo). O inóculo foi distribuído em placas de plástico estéril no volume e dimensões característicos de cada matriz, sendo cultivado na incubadora BOD (Nova Ética, Brasil), a  $26^\circ\text{C}$ , por 6 dias.

#### 3.2.1.2 *Purificação das matrizes de nanocelulose bacteriana*

A Figura 12 a ilustra o procedimento de purificação das matrizes de nanocelulose bacteriana. Após 6 dias de cultivo, as matrizes formadas na interface líquido/ar foram removidas, lavadas e purificadas para a remoção de bactérias e/ou resíduos do meio de cultura e do metabolismo

bacteriano que pudessem estar retidos nas redes de nanofibras da BNC. Para isso, as matrizes foram purificadas pela adição de NaOH 0,1 M por 24 h a 50 °C e, em seguida, submetidas a sucessivas lavagens com água destilada, até que o pH da solução de enxague fosse equivalente ao da água destilada. Em seguida, as matrizes foram esterilizadas em autoclave (Cristófoli, Brasil) por 20 min a 121 °C.

Figura 12 – Ilustração do procedimento de limpeza e purificação das matrizes de BNC produzidas pela bactéria *G. hansenii* em meio de cultura manitol.



### 3.2.1.3 Síntese de $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ na BNC

A síntese das micropartículas de carbonato de cálcio e  $\lambda$ -Carragenina ( $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ ) foi realizada por cristalização coloidal em presença de  $\text{CaCl}_2$ , glicina (Gly),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\lambda\text{-Car}$ , seguindo o protocolo desenvolvido por Bosio e colaboradores (2014). As matrizes de BNC foram imersas em um frasco contendo 3,2% (m/v) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e 0,1% (m/v) de  $\lambda\text{-Car}$  a 25 °C durante 20 min. Posteriormente, uma solução contendo 3,2% (m/v) de  $\text{CaCl}_2$  1,25 M em tampão de Glicina-NaCl (pH 10) foi vertida no frasco e agitada a 300 RPM durante outros 20 min. Cada



membrana foi lavada duas vezes com 2 mL de água destilada, seguidos de uma solução fisiológica (BOSIO et al., 2014a).

### 3.2.2 Caracterização do CarDS

---

O sistema foi caracterizado quanto à morfologia (MEV/confocal), interação química (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), capacidade de incorporação e de liberação da Dox, capacidade de carga e influência do pH do microambiente biológico na liberação da Dox.

#### 3.2.2.1 *Morfologia do CarDS por MEV*

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a morfologia do sistema CarDS. As amostras de BNC, micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ , CarDS e DoxDS liofilizadas foram recobertas por pulverização catódica usando um Metalizer (Balzers SCD 030, EUA) com obtenção de espessura de camada entre 15 e 20 nm, e analisadas em microscópio eletrônico de varredura Philips, modelo 505 (Rochester, EUA). As imagens foram processadas por um programa de imagem (Soft Imaging System ADDA II).

#### 3.2.2.2 *Autofluorescência da Dox por MCVL*

Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) foi utilizada para avaliar a distribuição da Dox nos componentes da matriz. As amostras de BNC, BNC/ $\lambda\text{-Car}$ , BNC/ $\text{CaCO}_3$  e CarDS contendo Dox foram examinadas por MCVL (Leica TCS SP5, Alemanha). Imagens de 8 bits usando quatro detectores de sinais fluorescentes e um detector de transmissão de imagens de campo claro foram coletadas em objetiva de 63x (HCX PLAPO CS 1,40 OIL UV) e uma banda de emissão de início/fim de 415/485 nm, respectivamente. Software *Leica Application Suite* (LAS AF) foi utilizado para controlar a fluorescência do microscópio e posterior análise das imagens.

#### 3.2.2.3 *Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*

As amostras de BNC, CarDS e DoxDS foram examinadas por FTIR (Nicolet Magna 560, EUA) usando detector BCTA e depois analisadas na gama espectral de  $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ , com uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , e de

digitalização igual a 64. As imagens foram processadas utilizando-se o *software Origin*, versão 8.5.

### 3.2.2.4 *Análise termogravimétrica (TGA)*

Medições termogravimétricas dinâmicas da matriz de BNC e do CarDS foram realizadas utilizando um instrumento de modelo TGA-50 (Shimadzu, Japão), e realizadas para avaliar a variação da massa em função da temperatura. Os testes foram executados a partir de 20°C, indo até 900 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C·min<sup>-1</sup> e sob uma atmosfera de N<sub>2</sub>. As imagens foram processadas utilizando-se o *software Origin*, versão 8.5.

### 3.2.2.5 *Quantificação da incorporação/liberação do fármaco*

#### 3.2.2.5.1 *Incorporação*

A incorporação da Dox às amostras foi realizada pela imersão destas em 500 µL de solução MES-NaOH pH 6,5 e 500 µL de Dox-HCl pH 3, em tubos plásticos de 2 mL, agitados a 80 RPM por 20 h a 25 °C. Logo após, as amostras contendo Dox foram transferidas para um tubo plástico de 2 mL contendo 1 mL de NaCl 0,145 M (solução de lavagem). A Dox foi quantificada por espectrofluorimetria (Perkin Elmer LS 50B, Japão) usando  $\lambda_{exc}$  e  $\lambda_{em}$  de 454 e 588 nm, respectivamente, com curva de calibração. A eficiência de carga foi avaliada como descrita na Equação 1.

$$\text{Incorporação de Dox} = \frac{\text{Dox}_0 - \text{Dox}_t}{W_{\text{BNC}}}, \quad 1$$

onde Dox<sub>0</sub> e Dox<sub>t</sub> são, respectivamente, a concentração de Dox (µM) na solução no tempo zero e no tempo *t*, e W<sub>BNC</sub> representa a massa da matriz de BNC (em gramas).

#### 3.2.2.5.2 *Liberação do fármaco*

Para avaliar a liberação da Dox incorporada, as amostras foram colocadas em 1,5 mL de tampão PBS 10 mM em frascos de plástico de 2 mL a 37 °C, sob agitação de 80 RPM. Alíquotas de 500 µL foram retiradas e repostas com igual volume de solução tampão fresca a intervalos definidos. A concentração de Dox foi determinada por

fluorescência, como mencionado no item 3.2.2.5.1. A concentração acumulada foi determinada como apresentado na equação abaixo.

$$\text{Liberação acumulada, } C_N = \sum_{i=1}^N \left( C_i - \frac{2}{3} \times C_{i-1} \right). \quad 2$$

A porcentagem de Dox liberado a cada tempo é expressa pela Equação abaixo, onde  $C_i$  é a concentração inicial.

$$\% \text{ Dox liberada } C_i = \frac{\left( C_i - \frac{2}{3} C_{i-1} \right) \times 100}{C_i} \quad 3$$

### 3.2.2.6 Avaliação da incorporação e liberação de Dox

Para determinar previamente o tempo de incorporação foi realizada uma cinética de incorporação de Dox no CarDS. O CarDS foi imerso em uma solução de Dox na concentração de 600  $\mu\text{M}$ , mantidos em agitação a 80 RPM, por até 20 h e 25 °C. Os sistemas DoxDS foram retirados e lavados em NaCl 0,9 % para retirar o excesso de fármaco. A Dox residual e Dox proveniente da solução de lavagem foram quantificadas e a concentração de Dox incorporada a cada tempo foi determinada.

Para avaliar a incorporação da Dox nos componentes do sistema (BNC, BNC/ $\lambda$ -Car, BNC/ $\text{CaCO}_3$  e CarDS) estes foram imersos em uma solução de Dox de 775,9  $\mu\text{M}$ , agitados a 80 RPM, por 20 h, a 25 °C. A quantificação da Dox incorporada foi determinada como descrito no item 3.2.2.2.5.1. Foi avaliada a liberação da Dox incorporada em cada componente do sistema pela imersão destes em 1,5 mL de PBS e avaliada a porcentagem de liberação em 24 horas.

### 3.2.2.7 Capacidade de carga de Dox no CarDS

A capacidade de carga de Dox no CarDS foi avaliada pela inserção do CarDS em diferentes concentrações de Dox, variando de 512 a 2586  $\mu\text{M}$ . Os sistemas foram mantidos em agitação a 80 RPM, por 20 h a 25 °C. Após a incorporação, os sistemas foram lavados em NaCl 0,9 % para retirar o excesso de fármaco, e imersos em PBS, pH 7,4, para avaliar a influência da carga na cinética de liberação. A porcentagem de Dox incorporada e liberada foi determinada como descrito no item 4.2.3.5.

### 3.2.2.8 *Efeito do pH na cinética de liberação*

Com o intuito de avaliar a influência do pH do microambiente biológico quanto as doses de liberação da Dox a partir do CarDS, este foi imerso em uma solução de Dox de 775,9  $\mu\text{M}$ , agitados a 80 RPM, por 20 h a 25 °C. Após incorporação os sistemas foram lavados em NaCl 0,9 % para retirar o excesso de fármaco e imersos em PBS variando pH de 5,8 a 7,4. A exposição do sistema DoxDS (775,9  $\mu\text{M}$ ) as soluções de PBS 10 mM considerando variações de pH de 5,8 a 7,4 foi realizada. A porcentagem de Dox incorporada e liberada foi determinada como descrito no item 3.2.2.5.

### 3.2.2.9 *Análise estatística*

A análise estatística dos dados gerados foi realizada utilizando-se o software OriginPro 8.0. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e comparados entre si por meio da análise de variância one-way (ANOVA) e teste de Fisher. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relacionados ao desenvolvimento do sistema de liberação de fármacos (CarDS), pela união de uma matriz polimérica (BNC) e micropartículas de carbonato de cálcio para liberação de um composto ativo (Dox), são relatados e discutidos nesta sessão.

#### 3.3.1 Desenvolvimento do CarDS

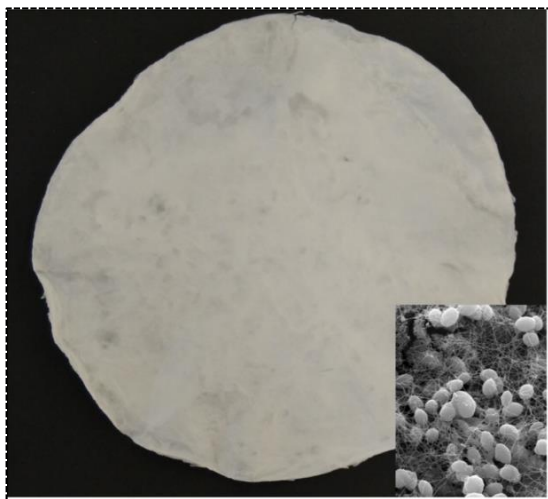
---

Em um primeiro momento testou-se a capacidade da matriz de BNC em incorporar a Dox em solução. As matrizes de BNC foram incubadas na presença de diferentes concentrações de Dox. A Dox foi incorporada à matriz, mas não se observou qualquer liberação prolongada. Resultados semelhantes foram relatados por Trovatti e colaboradores (2011 e 2012) que avaliaram a liberação tópica de lidocaína e ibuprofeno em matrizes de BNC, em tampão de fosfato (pH 7,4), demonstrando um perfil de liberação de mais de 90% do fármaco, nos primeiros 20 min (TROVATTI et al., 2011, 2012a).

Com o propósito de desenvolver um DDS capaz de modular a incorporação e a liberação do fármaco ao longo do tempo optou-se por sintetizar micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car por cristalização coloidal na matriz de BNC em presença de  $\text{CaCl}_2$ . Outros métodos de preparação de materiais híbridos poliméricos contendo  $\text{CaCO}_3$  são relatados na literatura (FIMBEL; SIFFERT, 1986; STOICA-GUZUN et al., 2007, 2013; MATAHWA; RAMIAH; SANDERSON, 2008; SHEN et al., 2010; VILELA et al., 2010; ZHANG; CHAN; LEONG, 2013); no entanto, estes métodos necessitam de períodos maiores de preparação (horas). Bosio e colaboradores (2014) avaliaram a síntese de micropartículas porosas por cristalização coloidal em presença de cálcio, o que permite a obtenção de diferentes polimorfismos dos cristais de  $\text{CaCO}_3$  (calcita, aragonita e vaterita), dependendo das proporções e do tipo de polímero utilizado, com tempo de síntese relativamente curto (min). Dentre os polímeros avaliados, a  $\lambda$ -carragenina foi selecionada por influenciar no processo de síntese, proporcionando uma maior porcentagem de vaterita (micropartículas esféricas com diâmetro médio de 2  $\mu\text{m}$ ). O método descrito por Bosio e colaboradores (2014) foi utilizado para a síntese das micropartículas híbridas de carbonato de cálcio e  $\lambda$ -carragenina ( $\text{CaCO}_3/\lambda$ -

Car) na matriz de BNC, e este sistema foi denominado CarDS, como ilustrado na Figura 13.

Figura 13 – Ilustração do sistema de liberação de fármaco CarDS com ampliação das micropartículas de carbonato de cálcio sintetizadas entre as fibras da BNC.



A morfologia do sistema CarDS é de aparência esbranquiçada, com predominância da distribuição das micropartículas no lado poroso da matriz de BNC. Matrizes de BNC de 6,5 mm de diâmetro, hidratadas, foram utilizadas nesta etapa do trabalho; estas matrizes possuem uma massa seca média de 0,19 mg. Após síntese das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  entre as fibras da BNC, esta massa se elevou para 1,75 mg, e a relação de micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  por massa seca de BNC foi de 9 mg/mg.

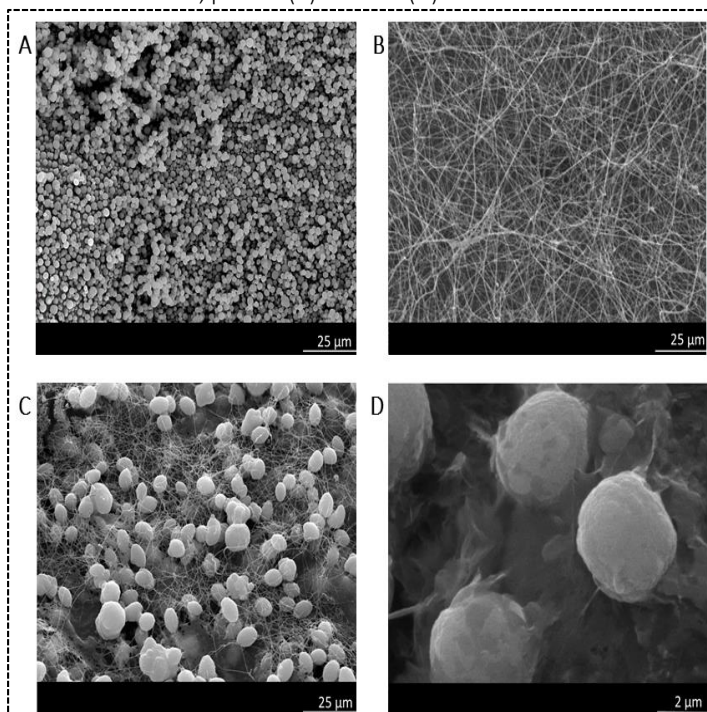
### 3.3.2 Caracterização do CarDS

---

#### 3.3.2.1 Morfologia do CarDS

A Figura 14 mostra os detalhes da morfologia do CarDS, a distribuição das micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  na matriz de BNC.

Figura 14 – Microscopia eletrônica de varredura. Micrografias (A) das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ ; (B) da matriz de BNC e (C e D) do CarDS em ambos os lados da BNC, poroso (C) e denso (D).

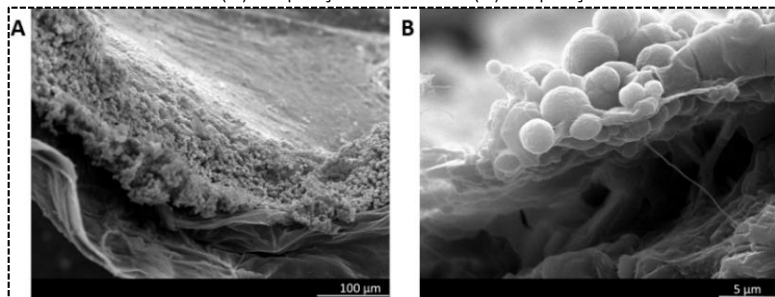


A Figura 14A mostra a morfologia das micropartículas esféricas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  no polimorfismo de vaterita, com diâmetro médio de  $4\ \mu\text{M}$ . A Figura 14B mostra a morfologia da matriz de BNC, onde é possível visualizar a alta densidade de poros, característicos da BNC. Este parâmetro é considerado importante pois regula a difusão dos compostos para dentro e para fora da matriz. A porosidade da BNC pode ser alterada por modificações nas condições de cultivo *in situ* (LIU et al., 2013; STUMPF et al., 2013) ou por modificações físicas (RAMBO et al., 2008). Devido a facilidade de modular a porosidade, a BNC tornando-se um biomaterial adequado para a precipitação de micropartículas de carbonato de cálcio. As Figuras 14C e 14D mostram a distribuição das

micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  na interface matriz BNC-solução, sintetizadas pelo método de cristalização coloidal.

A Figura 15 mostra a morfologia do corte transversal do CarDS obtida por MEV, nas ampliações de 250 e 4000 $\times$ .

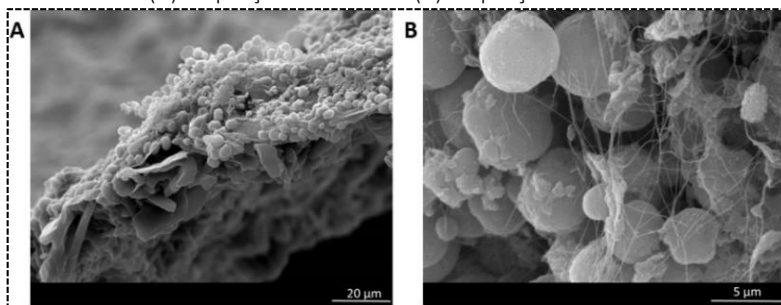
Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura. Micrografias do corte transversal do CarDS. (A) ampliação de 250 $\times$  e (B) ampliação de 4000 $\times$ .



As imagens dos cortes transversais do CarDS obtidas por MEV, com diferentes ampliações, mostram a presença das micropartículas, particularmente no lado poroso da matriz de BNC (Figuras 15A e 15B). Este resultado indica a contribuição positiva da menor densidade de fibras oferecida pela matriz produzida por *G. hansenii*, sendo possível modificar a matriz de BNC pela síntese de micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ , obtendo exclusivamente o polimorfismo vaterita.

A Figura 16 mostra a morfologia do CarDS após incorporação da Dox nas ampliações de 1000 $\times$  e 5000 $\times$ .

Figura 16 – Microscopia eletrônica de varredura. Micrografias do CarDS contendo Dox (A) ampliação de 1000 $\times$  e (B) ampliação de 5000 $\times$ .



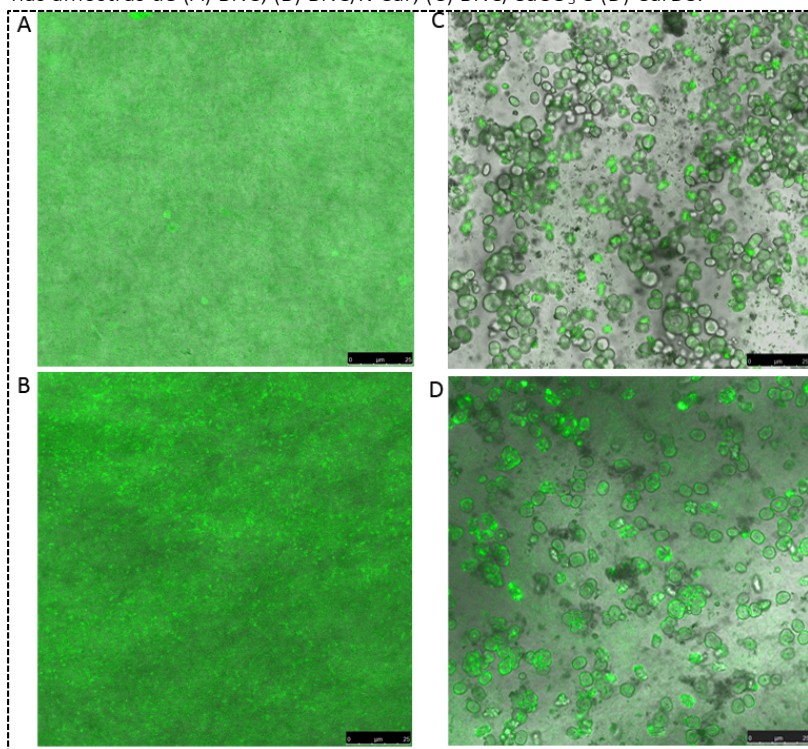


O processo de incorporação da Dox não modificou a distribuição das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  e/ou a sua morfologia, como pode ser observado nas Figuras 16A e 16B. Com base na hidrofiliicidade da Dox, e considerado o ambiente altamente polar da solução feita pelos sais e as características da  $\lambda\text{-Car}$ , a Dox ficou incorporada no interior das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ .

### 3.3.2.2 Autofluorescência da Dox por (MCVL)

A Figura 17 mostra as micrografias, obtidas por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL), evidenciando a autofluorescência da Dox distribuída na BNC, BNC/ $\lambda\text{-Car}$ , BNC/ $\text{CaCO}_3$  e no CarDS.

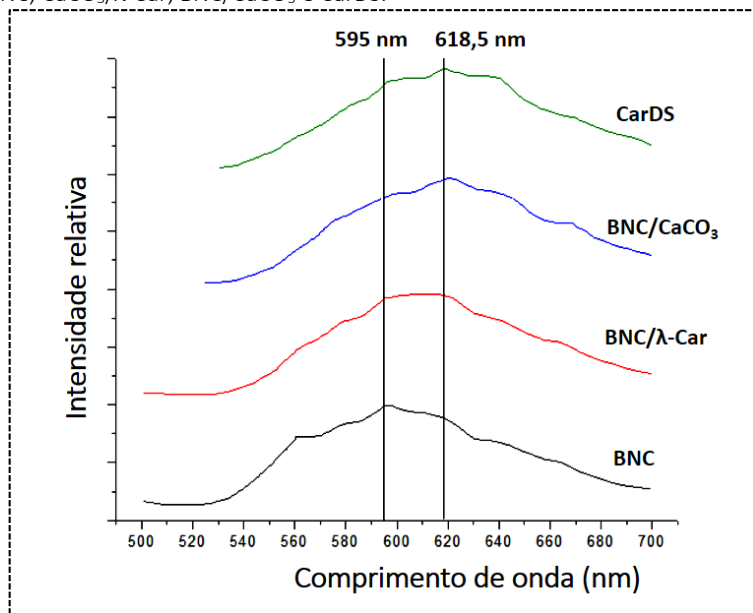
Figura 17 – Microscopia confocal de varredura a laser. Autofluorescência da Dox nas amostras de (A) BNC, (B) BNC/ $\lambda\text{-Car}$ , (C) BNC/ $\text{CaCO}_3$  e (D) CarDS.



A Figura 17A mostra a distribuição homogênea da Dox na matriz de BNC. Quando foi adicionada a  $\lambda$ -Car à BNC e incorporado Dox, alguns pontos com maior fluorescência podem ser observados, associados à presença de  $\lambda$ -Car ligada à matriz de BNC (Figura 17B). Quando em presença das micropartículas BNC/CaCO<sub>3</sub> sem a presença da Car foram observados pontos fluorescentes da Dox nas micropartículas (Figura 17C), mas neste caso a quantidade de Dox distribuída na matriz de BNC é inferior, o que provavelmente se deve à nucleação de cristais de sal, tal como foi relatado previamente (BOSIO et al., 2014a). Por outro lado, a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia confocal revelaram uma distribuição homogênea da Dox situada principalmente nas micropartículas híbridas CaCO<sub>3</sub>/ $\lambda$ -Car, indicando a vantagem da síntese destas micropartículas híbridas na superfície da matriz de BNC (Figura 17D).

A Figura 18 mostra a interação da Dox com os componentes do sistema.

Figura 18 – Varredura do comprimento de onda por (MCVL) da Dox presente na BNC, CaCO<sub>3</sub>/ $\lambda$ -Car, BNC/CaCO<sub>3</sub> e CarDS.

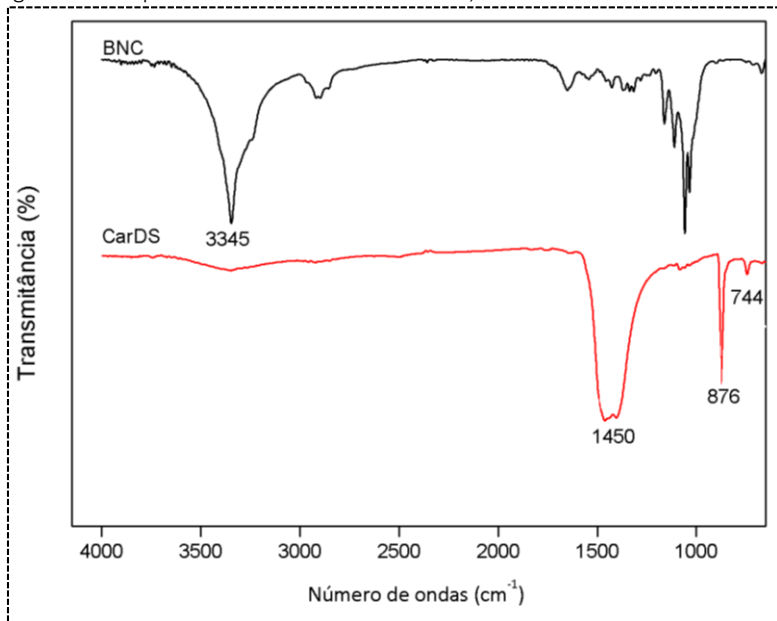


Foi avaliada a fluorescência da Dox presente na BNC, BNC/ $\lambda$ -Car, BNC/ $\text{CaCO}_3$  e CarDS. O comprimento de onda da radiação emitida pela Dox presente na BNC e BNC/ $\lambda$ -Car foi de 595 nm, e alterada para 610-620 nm, quando em presença de  $\text{CaCO}_3$ , sugerindo uma interação entre cristais de sal e a Dox. Estes resultados podem ser correlacionados com as imagens de microscopia confocal (Figura 16), que mostra a distribuição da Dox para cada componente do sistema.

### 3.3.2.3 Espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 19 mostra os espectros do infravermelho para BNC, CarDS (BNC/ $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car).

Figura 19 – Espectro de infravermelho da BNC, CarDS.

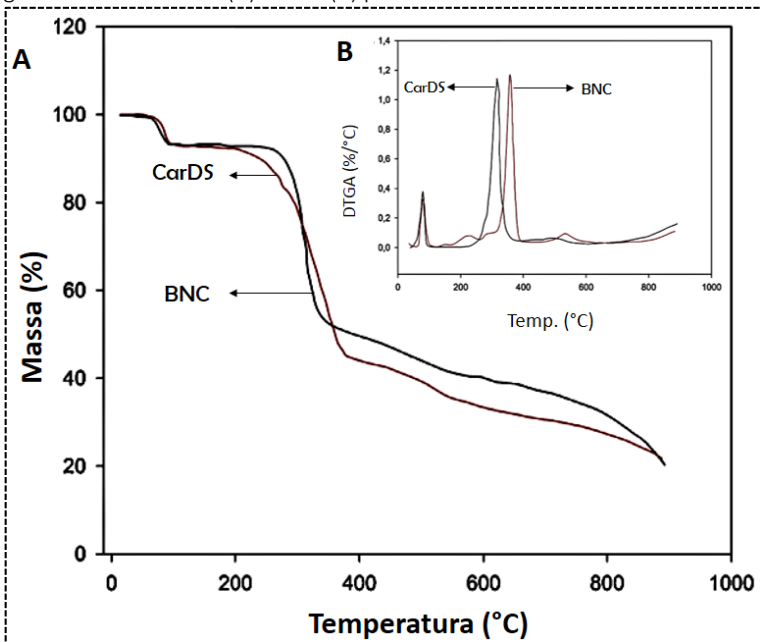


A presença de  $\text{CaCO}_3$  no CarDS pode ser confirmada pelas bandas de absorção em  $744$ ,  $876$ , e  $1450 \text{ cm}^{-1}$  (WANG et al., 2010). Particularmente, o alongamento de O-H de BNC em  $3345 \text{ cm}^{-1}$  foi atenuado por outras moléculas de  $\lambda$ -Car e  $\text{CaCO}_3$ .

## 3.3.2.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A Figura 20 mostra as curvas de estabilidade térmica (TGA) e termogravimetria derivada (DTG) de BNC e CarDS.

Figura 20 – Curvas TGA (A) e DTG (B) para BNC e CarDS.



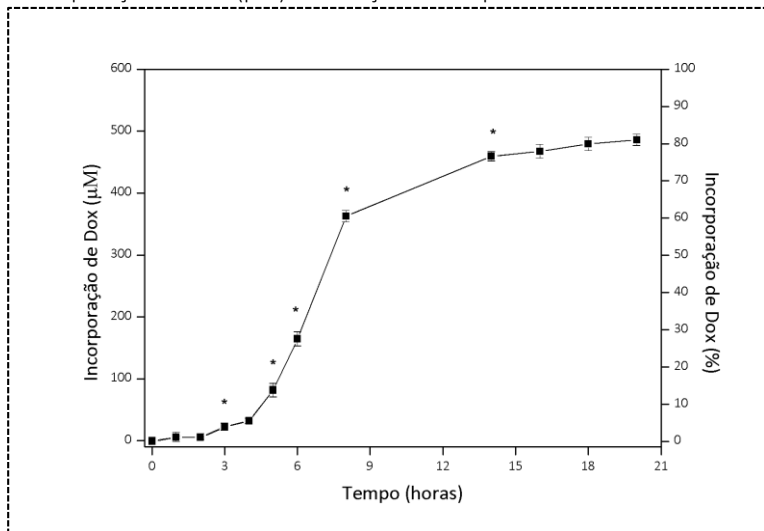
Após a produção do biocompósito, a estabilidade térmica foi investigada por TGA. Foram observados dois estágios independentes de perda de massa que podem ser claramente identificados, para BNC e CarDS. O primeiro estágio foi atribuído ao teor de água livre, observado no intervalo de temperatura de 65 a 100 °C, apresentando uma perda de massa igual a 7% para ambas as amostras, BNC e CarDS. O segundo estágio, de 200 a 400 °C, foi atribuído à decomposição térmica do biomaterial para ambas as amostras (Figura 20A). Além disso, a segunda derivada da curva de perda de massa (Figura 20B) mostrou uma mudança na temperatura de decomposição de 315,8 °C para 357,9 °C, para BNC e para o CarDS, respectivamente. A mudança de comportamento térmico da BNC provavelmente está associada à presença de alto teor de

polimorfismo vaterite no cristal de  $\text{CaCO}_3$  (BRITO et al., 2008). O comportamento térmico para a BNC está em concordância com os resultados obtidos por Wong e colaboradores (2009), que observaram uma máxima degradação térmica (DTG) da BNC no intervalo de 300 a 350 °C (WONG; KASAPIS; TAN, 2009). O comportamento de degradação térmica é reconhecidamente afetado por alguns parâmetros estruturais, tais como peso molecular, cristalinidade e orientação das fibras (BARUD et al., 2007).

### 3.3.2.5 Incorporação/liberação do fármaco

A Figura 21 mostra a cinética de incorporação da Dox no CarDS.

Figura 21 – Cinética de incorporação de Dox (600  $\mu\text{M}$ ) no CarDS a 25 °C e agitação de 80 RPM. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média de dois experimentos em duplicata. \* Representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) da incorporação de Dox ( $\mu\text{M}$ ) em relação ao tempo anterior.



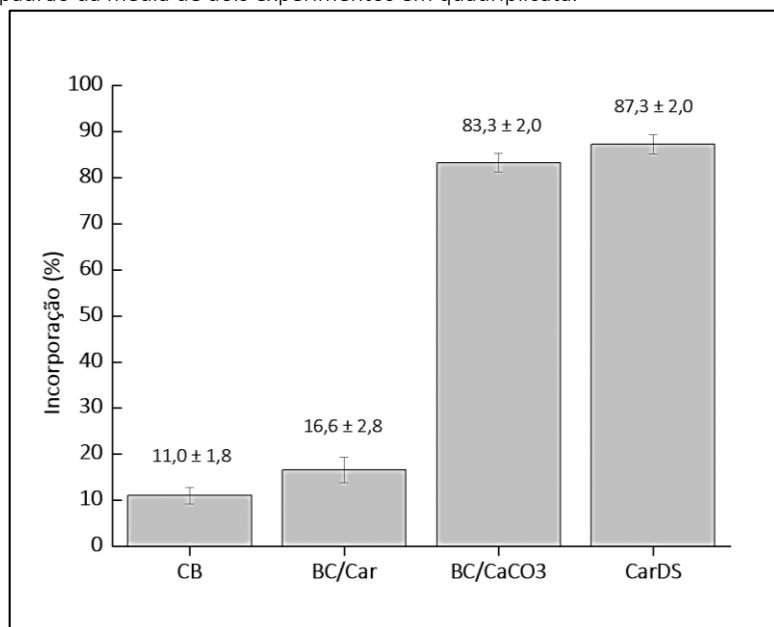
Podemos observar uma fase de indução de até 4 horas com incorporação final de 32  $\mu\text{M}$  (5,4%), uma fase exponencial de 4 até 8 horas com uma incorporação final de 363  $\mu\text{M}$  (60,5%), seguida por um fase de saturação do sistema pelo fármaco, obtendo uma incorporação de 460  $\mu\text{M}$  (76,6%) em 14 horas; Um aumento adicional de 4% é

observado ao final de 20 horas, totalizando uma incorporação de 490  $\mu\text{M}$  (81%) da Dox em solução.

A capacidade de incorporação da Dox em micropartículas de carbonato de cálcio em outros biopolímeros já foi relatada (PENG; ZHAO; GAO, 2010; LIANG et al., 2013; BOSIO et al., 2014b) apresentando uma variação de 66 a 95 % para tempos distintos.

A Figura 22 mostra a porcentagem de incorporação de Dox em cada componente do sistema, ou seja, BNC, BNC/ $\lambda$ -Car, BNC/ $\text{CaCO}_3$  e CarDS.

Figura 22 – Incorporação da Dox em BNC, BNC/ $\lambda$ -Car, BNC/ $\text{CaCO}_3$  e CarDS. Porcentagem de incorporação após 20 horas submersas em uma solução de Dox (775,9  $\mu\text{M}$ ), 25 °C e agitação de 80 RPM. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média de dois experimentos em quadruplicata.



A incorporação de Dox na BNC foi de 11  $\pm$  1,8%. Este valor é considerado baixo e ocorreu provavelmente devido à elevada hidrofobicidade da Dox. A BNC é um biopolímero constituído de ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) ligando unidades de D-glicose, exibindo seis grupos hidroxila

livres por unidade de celobiose. Com intuito de aumentar a hidrofiliabilidade da BNC foi adicionada uma molécula polar, tal como o  $\lambda$ -Car, que contém três grupos sulfonados por dímero, resultando em uma incorporação aumentada da Dox para  $16,6 \pm 2,8\%$ . No entanto, a incorporação da Dox ainda é muito baixa para ambos os casos. A fim de aumentar a incorporação da Dox, a síntese das micropartículas de  $\text{CaCO}_3$  foi considerada como alternativa levando-se em consideração o efeito positivo de grupos iônicos. A presença do  $\text{CaCO}_3$  e das micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car nas matrizes de BNC aumentou para  $83,3 \pm 2\%$  e  $87,3 \pm 2\%$ , respectivamente (Figura 21). A alta incorporação da Dox no sistema CarDS foi atribuída à presença das micropartículas de  $\text{CaCO}_3$ , o que confirma a hipótese do papel das interações polares entre a Dox e o  $\text{CaCO}_3$ . Apesar do aumento de 4,3% de Dox em presença de  $\lambda$ -Car, os sistemas BNC/ $\text{CaCO}_3$  e CarDS não apresentarem diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ). A incorporação de  $\lambda$ -Car na matriz de BNC aumenta ligeiramente a quantidade de Dox adsorvida, mas sem o controle da cinética de liberação do fármaco. No entanto, a presença de  $\lambda$ -Car na síntese das micropartículas aumenta a estabilidade por mais de um ano de forma semelhante como descrito anteriormente (BOSIO et al., 2014a).

A Tabela 6 mostra a porcentagem de liberação da Dox a partir dos componentes do sistema.

Tabela 6 – Liberação de Dox a partir dos componentes do sistema (BNC, BNC/ $\lambda$ -Car, BNC/ $\text{CaCO}_3$  e CarDS) em PBS a 37 °C em 24 horas. \* = Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) das amostras sem símbolo.

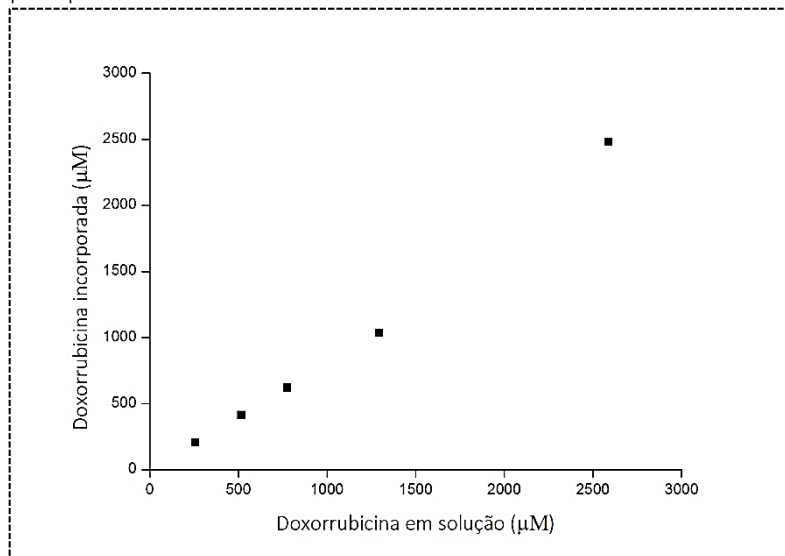
Amostras	Liberação de Dox (%)
BNC	$15,95 \pm 1,86^*$
BNC/ $\lambda$ -Car	$12,63 \pm 2,41^*$
BNC/ $\text{CaCO}_3$	$1,32 \pm 0,10$
CarDS	$1,72 \pm 0,55$

A Dox liberada pode ser classificada em dois grupos principais: de alta e de baixa liberação, e pode ser correlacionada com a ausência ou a presença de  $\text{CaCO}_3$  na matriz. A presença de  $\text{CaCO}_3$  na matriz, com e sem  $\lambda$ -Car diminuiu a liberação da Dox em 7,3 e 12,8 vezes, em 24 horas, em relação a BNC, com e sem  $\lambda$ -Car, respectivamente.

#### 3.3.2.6 Capacidade de carga da Dox

A Figura 23 mostra a capacidade de incorporação da Dox quando submetida a diferentes concentrações. Esta capacidade de carga no CarDS foi avaliada no intervalo de 258,6 a 2586,3  $\mu\text{M}$ .

Figura 23 – Incorporação de Dox no CarDS após 20 horas de contato com Dox (258,6, 517,3, 775,9, 1293,1, 2586,3  $\mu\text{M}$ ) a 25 °C e sob agitação de 80 RPM. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média de dois experimentos em quadruplicata.

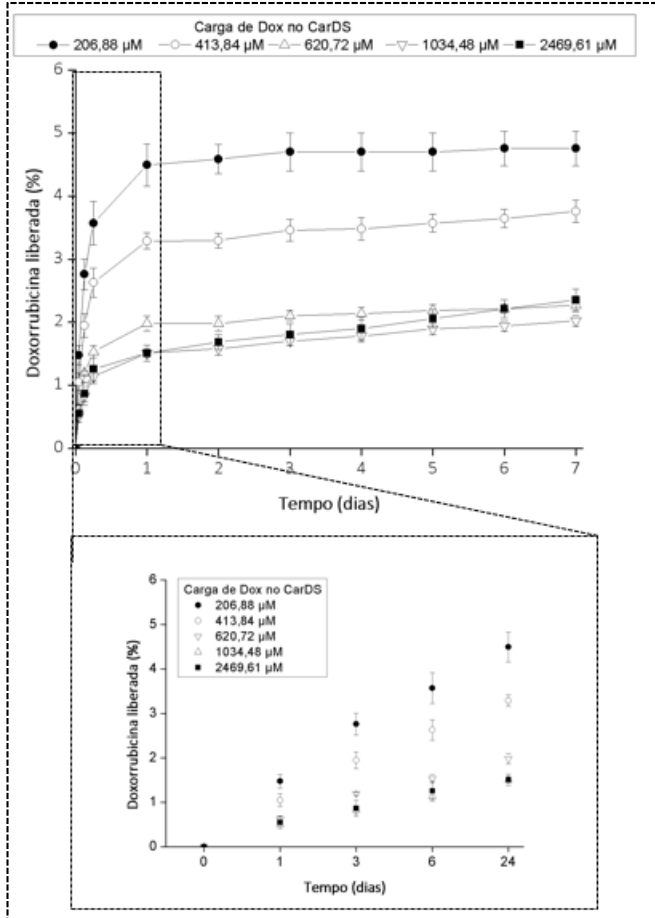


A quantidade de Dox incorporada ao CarDS aumentou linearmente para o intervalo de 258,6 a 1293,1  $\mu\text{M}$ , apresentando uma incorporação de 81% da Dox em solução. Já para a concentração de Dox de 2586,3  $\mu\text{M}$  a porcentagem de incorporação foi de 95% da Dox em solução.

A Figura 24 mostra a cinética de liberação do DoxDS cotendo diferentes cargas de Dox.



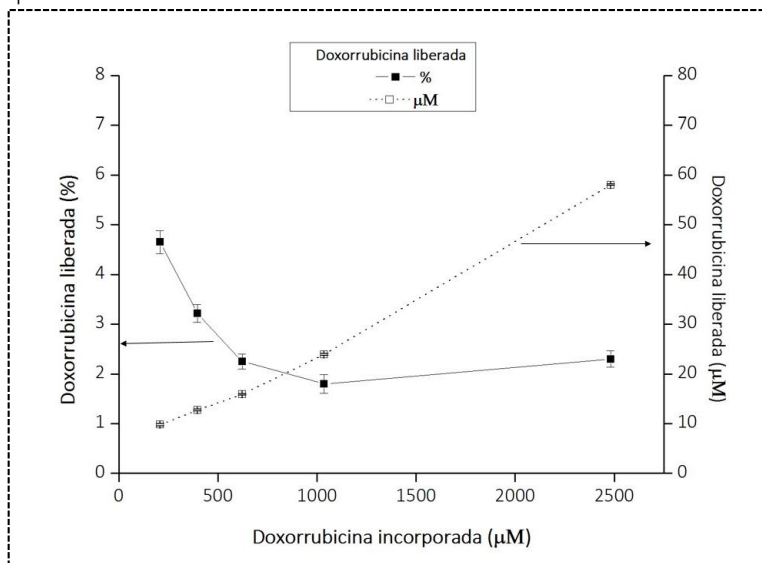
Figura 24 – Cinética de liberação da Dox a partir DoxDS contendo diferentes concentrações em PBS (pH = 7,4), 37 ° C durante 7 dias. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média de dois experimentos em duplicata.



Curvas hiperbólicas foram observadas em todos os casos, com liberação linear nas primeiras 24 horas. O aumento da carga de Dox aprisionada dentro do CarDS pode estar inversamente correlacionado com a liberação da Dox do sistema.

A Figura 25 mostra o efeito do DoxDS contendo diferentes cargas na liberação ( $\mu\text{M}$  e %) após 7 dias de incubação.

Figura 25 – Relação entre a Dox incorporada ao CarDS e liberação da Dox (%) a partir do DoxDS em PBS (pH 7,4), 37 °C durante 7 dias de incubação. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média de dois experimentos em duplicata.

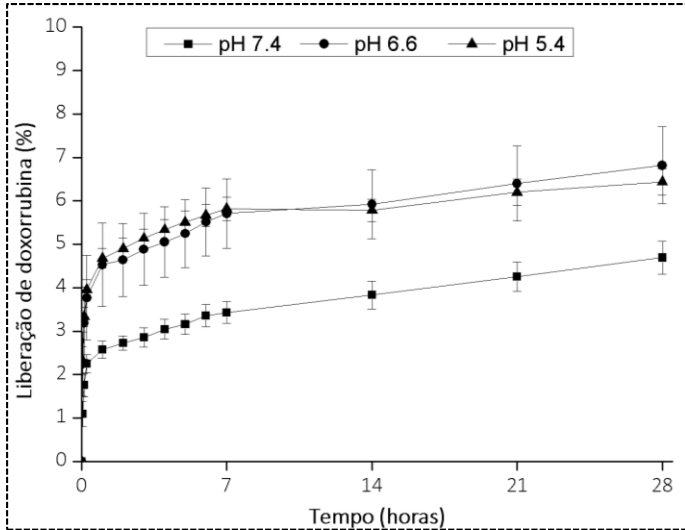


As porcentagens de liberação de 4,75%, 3,75%, 2,26%, 2,02% e 2,35% foram obtidas para as concentrações de 206,88, 413,84, 620,72, 1034,48, e 2469,61  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Na maior concentração testada de Dox (2586,3  $\mu\text{M}$ ), os resultados sugerem outro tipo de interação com o microambiente que pode ser atribuído ao fenômeno de empilhamento pela interação aromática de anéis de Dox (BOSIO et al., 2014a).

### 3.3.2.7 Efeito do pH na liberação de Dox BNC-Car- $\text{CaCO}_3$

A Figura 26 mostra as cinéticas de liberação da Dox a partir do DoxDS pela variação do pH do microambiente (5,4, 6,6, 7,4) ao longo de 28 dias.

Figura 26 – Cinética de liberação do DoxDS em PBS em pHs (▲) pH 5,8, (●) pH 6,6 e (■) pH 7,4. DoxDS (620,72  $\mu$ M) foi exposta durante 28 dias a 37 °C. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos em triplicata.



A porcentagem de liberação da Dox a partir do sistema DoxDS foi avaliada quando o DoxDS foi exposto a variações do pH do microambiente. Em 24 horas já foi possível observar a influência do pH na liberação. Quando DoxDS está em contato com pH mais ácidos (5,8 e 6,6), observa-se, com diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) um maior percentual de liberação, quando comparado com pH de 7,4. As porcentagens de Dox para os pHs de 5,8 (▲) e 6,6 (●) foram de  $4,67 \pm 0,22\%$  e  $4,52 \pm 0,96\%$ , respectivamente, enquanto que para pH 7,4 (■) foi de  $2,57\% (\pm 0,19)$ . Após 28 dias de liberação observa-se o mesmo perfil, onde as porcentagens de Dox para os pHs de 5,8 (▲) e 6,6 (●) foram de  $6,82 \pm 0,88\%$  e  $6,43 \pm 0,30\%$ , respectivamente, enquanto que para pH 7,4 (■) foi de  $4,7 \pm 0,4\%$ .

Ogomi e colaboradores (2005) prepararam um hidrogel compósito de  $\text{CaCO}_3$  e poli(álcool vinílico) (PVA) para liberação de fármacos, onde a velocidade de liberação do fármaco e da dissolução do  $\text{CaCO}_3$  aumentou com uma diminuição do pH do tampão. Além disso, as taxas de liberação

de fármaco aumentaram com uma diminuição no peso molecular do fármaco modelo. Estes resultados mostram que as camadas de  $\text{CaCO}_3$  em hidrogéis comportam-se como camadas de cobertura para a liberação de fármaco modelo; neste caso, a taxa de liberação de fármacos modelo pode ser controlada pela taxa de dissolução de  $\text{CaCO}_3$  (OGOMI; SERIZAWA; AKASHI, 2005). As micropartículas de  $\text{CaCO}_3$  tornam-se menos estáveis em pH mais baixos; conseqüentemente, ocorre um aumento da solubilidade e liberação da Dox. Esta situação é benéfica, uma vez que as células tumorais acidificam o pH do ambiente local (GERWECK; VIJAYAPPA; KOZIN, 2006). O efeito do pH sobre a cinética de liberação da Dox é um fator muito relevante, e talvez possa ser modulado em futuros sistemas de liberação de fármacos implantáveis, em terapias de câncer. Além disso, células cancerígenas têm um alto metabolismo anaeróbico por causa da baixa oxigenação. Em consequência, há um grande acúmulo de ácido láctico e o pH extracelular diminui para níveis abaixo de 5,8 (GERWECK; VIJAYAPPA; KOZIN, 2006).

### 3.4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados de caracterização do CarDS, desenvolvido em matriz de nanocelulose bacteriana e micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  entre as fibras da BNC, pode-se concluir que:

- i. A síntese das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  por cristalização coloidal possibilitou modificar a superfície da matriz de BNC; as micropartículas foram caracterizadas por uma distribuição relativamente uniforme;
- ii. A Doxorubicina se concentrou mais intensamente junto às micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  sintetizadas na matriz de BNC;
- iii. As medidas de interação entre os componentes por FTIR, e a análise termogravométrica confirmaram alterações na BNC pela presença das micropartículas;
- iv. A modificação ocasionada pela presença das micropartículas na BNC possibilitou uma incorporação de ~80% da Dox em solução (DoxDS);
- v. A concentração de Dox no CarDS pode ser modulada pela variação da concentração da Dox em solução;
- vi. O DoxDS contendo diferentes concentrações de Dox demonstrou uma liberação inversamente proporcional à sua concentração incorporada, liberando uma porcentagem de fármaco menor quanto maior a sua carga;
- vii. A cinética de liberação do fármaco a partir do DoxDS pode ser alterada pela variação do pH do microambiente local, observando uma maior liberação em pH mais baixos.

Em resumo, o CarDS apresentou uma distribuição uniforme das micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  entre as fibras de BNC, proporcionando uma alta incorporação de Dox (Ca. 80%) e perfis de liberação modulados pela concentração de Dox incorporada, assim como pela variação do pH local, demonstrando possuir as características estruturais necessárias para a aplicação local desejada.



Capítulo

# 4

## Avaliação das Propriedades Físico-Químicas e Biológicas in vitro do CarDS

O Capítulo 4 apresenta os tópicos: resumo, introdução, materiais e métodos, resultados e discussão e conclusões, referentes à etapa de avaliação das propriedades físico-químicas e biológicas in vitro do CarDS quanto às propriedades área superficial, absorção de água, propriedades mecânicas e razão de micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  em diferentes formatos de BNC. Avaliou-se ainda o efeito citotóxico do CarDS segundo norma ISO 10993-5 e a interação célula-CarDS. Por fim, avaliou-se a hemocompatibilidade do CarDS em contato direto com sangue humano por ensaios de coagulação dinâmica e potencial hemolítico.





---

**4 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS  
IN VITRO DO CarDS**

---

**RESUMO**

O CarDS desenvolvido pela síntese de micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car em matriz de BNC pode contribuir como alternativa ao tratamento adjuvante da recidiva do câncer de mama; todavia, um dos pontos críticos para a utilização do CarDS para a aplicação desejada diz respeito à sua natureza, à forma, e às suas características físico-químicas e biológicas in vitro. Desta forma, foram avaliadas a razão de micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car nos diferentes formatos de BNC, a influência da presença das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car entre as fibras da BNC sobre a área superficial, sua capacidade de absorção de água, taxa de reidratação e suas propriedades mecânicas. Foram avaliados ainda o efeito citotóxico do CarDS em linhagem padrão de fibroblastos murinos (L929), seguindo as recomendações da norma ISO 10993-5, e a interação célula-CarDS. Por fim, foi avaliada a hemocompatibilidade do CarDS em contato direto com sangue humano pela realização de ensaios de coagulação dinâmica do sangue e potencial hemolítico. Pode-se observar que a razão de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car por BNC não foi alterada quando se aumenta o diâmetro da matriz de BNC, que a presença das micropartículas reduz a área superficial da BNC e a capacidade de absorção de água e taxa de reidratação. A presença das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car influencia nas propriedades mecânicas tornando o biomaterial mais maleável e de mais fácil manuseio no momento da aplicação. O CarDS não apresentou atividade citotóxica, segundo norma (ISO 10993-5), mantendo os níveis de atividade metabólica e proliferação celular, quando comparado com o controle. A partir da análise da interação célula-CarDS foi possível observar que fibroblastos, quando cultivados sobre o CarDS, são capazes de aderir e proliferar adequadamente. O ensaio de hemocompatibilidade demonstrou que o material não alterou o perfil de formação de coágulos e que os índices hemolíticos permaneceram dentro dos valores da normalidade. Pode-se concluir que, os ensaios selecionados para avaliar a atividade biológica in vitro evidenciam que o sistema tem potencial para ser implantado pois não causa efeitos destrutivos quando em contato direto com o sangue ou culturas celulares.

## **4.1 INTRODUÇÃO**

Devido aos índices crescentes de mortalidade por câncer de mama, cada vez mais se investe em pesquisas que visam o tratamento e/ou a cura do câncer (FENG; CHIEN, 2003; GROBMYER et al., 2012; YANG et al., 2012; ZHANG; CHAN; LEONG, 2013). O desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e menos danosos, ou seja, mais específicos e de ação local, levou a estudos de incorporação de agentes quimioterápicos em sistemas de liberação de fármacos (DDS) (LI et al., 2011; SZOT et al., 2011). Os DDS utilizam biomateriais como matrizes para fármacos que terão sua liberação no organismo de forma controlada, ou melhor, de forma previsível, e local (MINKO et al., 2005; LAMMERS et al., 2010).

No capítulo anterior foi relatado o desenvolvimento do CarDS, um DDS composto de matriz de nanocelulose bacteriana (BNC) contendo micropartículas híbridas de carbonato de cálcio e  $\lambda$ -carregenina ( $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car) para aplicação local, como alternativa à terapia oncológica adjuvante, para prevenção da recidiva de câncer de mama (CESCA et al., 2014; CACICEDO et al., 2015). O CarDS apresentou um alto potencial de retenção de Dox em solução (ca. 80%) e um baixo perfil de liberação (< 10%) no tempo estudado. A viabilidade terapêutica do CarDS está relacionada à sua capacidade em reter grandes quantidades de quimioterápico e manter um perfil de liberação adequado, i.e., sustentado, ao longo do tempo, por alteração local do pH.

Um dos pontos críticos para o desenvolvimento de biomateriais inovadores diz respeito à natureza, forma e características dos biomateriais (CHEN; LIU, 2015). A estrutura das nanofibras de BNC serve como um suporte macromolecular adequado para inclusão de compostos ativos e, portanto, para o desenvolvimento de DDS. Uma das maiores vantagens da BNC é a sua capacidade de ser moldada em diversos tamanhos e formas durante a sua síntese sem causar qualquer alteração significativa em suas propriedades físicas (RECOUVREUX et al., 2011); neste sentido, relata-se aqui a avaliação da matriz de BNC como um modulador adicional em um sistema com dimensões similares à base de uma prótese mamária; além disso, avalia-se se essa ampliação influencia na densidade de micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -car. Além das características relatadas acima, a BNC apresenta elevada capacidade de

absorção de água, assim como propriedades mecânicas únicas, boa permeabilidade e resistência à degradação (RAMBO et al., 2008; MULLER et al., 2011; BERTI et al., 2013; MULLER et al., 2013; STUMPF et al., 2013). A maior parte dessas propriedades surge a partir da sua rede de nanofibras tridimensional. É importante salientar que quando se adiciona outro componente à matriz de BNC, essas propriedades podem ser alteradas; sendo assim, foi avaliada a influência da presença das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  entre as fibras de BNC sobre a área superficial, a capacidade de absorção de água, e sobre a taxa de reidratação, assim como possíveis alterações nas propriedades mecânicas.

O fator mais importante que diferencia um biomaterial de qualquer outro material é a sua capacidade de co-existir em contato com tecidos do corpo humano sem causar um grau inaceitável de dano ao organismo (WILLIAMS, 2008, 2009). O conhecimento e compreensão dessas interações torna-se necessário quando se visa uma determinada aplicação. Para a avaliação de biomateriais, a International Organization for Standardization – ISO, juntamente com outras agências reguladoras, desenvolveu um conjunto de normas. Essas normas apresentam técnicas de avaliação biológica para dispositivos médicos, desde sua fabricação, esterilização, resposta biológica local ou sistêmica, onde o que se analisa é a aceitação do material dentro de um meio biológico, assegurando que a sua capacidade de funcionamento não gere distúrbios imunológicos ou toxicidade, e também que o mesmo não atue negativamente sobre o DDS de modo a que este venha perder sua função ou apresentar risco ao paciente. As informações disponíveis sobre citotoxicidade de biomateriais baseados em BNC e micropartículas de carbonato de cálcio são escassas na literatura. Estudos de citotoxicidade de biomateriais baseados em BNC/ $\text{CaCO}_3$  foram conduzidos com osteoblastos (FU et al., 2013) e celulose microcristalina/ $\text{CaCO}_3$  em fibroblastos (JIA; CHEN; YANG, 2012). O conhecimento do nível ou ausência de citotoxicidade induzida pelo sistema proposto nesta tese, o CarDS, é muito importante quando se projeta a sua aplicação local.

Além do estudo da citotoxicidade, outra propriedade que deve ser estudada em materiais implantáveis é a hemocompatibilidade (ULLAH et al., 2016). Os biomateriais devem atender aos requisitos de

funcionalidade biológica para o qual foram projetados, e provocar o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias (ŘÍHOVÁ, 1996). É sabido que as superfícies que por ventura entrarem em contato com o sangue podem ativar a cascata de coagulação e a consequente formação de trombos, devido à interação de tais superfícies com proteínas do sangue e plaquetas (ŘÍHOVÁ, 1996; ANDRADE et al., 2011; LEITÃO et al., 2013). Fink e colaboradores (2010), avaliaram a hemocompatibilidade de tubos de enxertos vasculares baseados em BNC, e compararam esses com enxertos comerciais de poli(tereftalato de etileno) (PET) e poli(tetrafluoroetileno) expandido (PTFE) (FINK et al., 2010). Eles relataram que os enxertos baseados em BNC não provocam uma rápida coagulação do sangue, mas induzem a cascata de coagulação de uma forma mais lenta. Foi relatado ainda que tanto nanocompósitos de BNC com álcool polivinílico (usado em aplicações cardiovasculares), quanto BNC in natura foram hemocompatíveis (LEITÃO et al., 2013; porém, não foram encontrados na literatura relatos da avaliação da hemocompatibilidade de matrizes de BNC contendo micropartículas de carbonato de cálcio e carragenina, daí a necessidade de avaliação da hemocompatibilidade do sistema CarDS aqui desenvolvido.

Devido às propriedades funcionais da BNC e o grande potencial das micropartículas híbridas de carbonato de cálcio e  $\lambda$ -Car na incorporação e liberação de Dox, relatados no capítulo anterior, alguns questionamentos serão abordados neste capítulo:

- i. A ampliação de escala, ou seja, do diâmetro da matriz de BNC, ocasiona alterações na razão mássica entre as micropartículas (sintetizadas nas fibras de BNC) e a BNC liofilizada?
- ii. A presença das micropartículas  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car influencia na área superficial da matriz de BNC?
- iii. As propriedades de absorção de água e a taxa de reidratação são alteradas pela presença das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car na matriz de BNC?

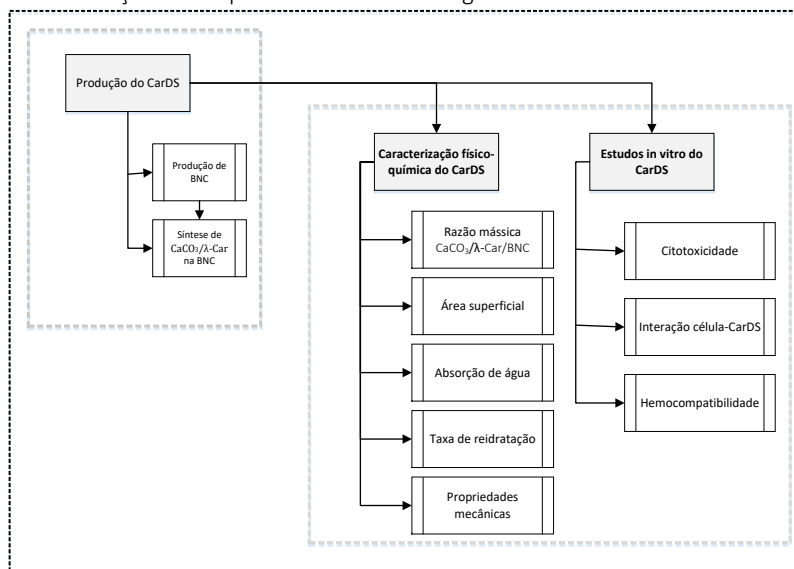
- iv. A presença das micropartículas e o estado hidratação ou liofilizado do CarDS influenciam suas propriedades mecânicas?
- v. A união da BNC com as micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car causa efeito citotóxico a células saudáveis quando avaliada segundo a norma ISO-10993-5?
- vi. A presença das micropartículas entre as fibras de BNC influencia a interação célula-CarDS?
- vii. O CarDS é hemocompatível quando em contato com sangue humano?

Buscando responder os questionamentos acima, foram avaliados a densidade de micropartículas entre as fibras de BNC, a área superficial, absorção de água, taxa de reidratação, propriedades mecânicas, citotoxicidade, interação células-CarDS e hemocompatibilidade do DDS desenvolvido (CarDS).

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 27 apresenta o fluxograma descritivo contendo as etapas relacionadas à avaliação das propriedades físico-químicas e biológicas in vitro do sistema de liberação de fármacos desenvolvido em matriz de BNC contendo micropartículas  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  (CarDS).

Figura 27 – Fluxograma descritivo das etapas relacionadas à produção, caracterização físico-química e estudos biológicos in vitro do CarDS.



As etapas de produção do CarDS, avaliação da citotoxicidade e ensaios de hemocompatibilidade foram realizados no Laboratório de Tecnologias Integradas, Intelab/UFSC. A análise de área superficial foi realizada no Laboratório de Materiais Elétricos (LAMATE). Os procedimentos de secagem em ponto crítico, metalização e as análises de MEV, e em microscópio confocal foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. A quantificação da doxorubicina (Dox) foi realizada no Laboratório Multiusuário em Estudos Biológicos (LAMEB), da UFSC.

### 4.2.1 Produção do CarDS

---

A produção do CarDS é realizada em duas etapas: a produção das matrizes de BNC e a síntese das micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  entre as fibras de BNC, como descrito no item 3.2.1, com algumas modificações, conforme relatadas abaixo.

#### 4.2.1.1 Produção das matrizes de nanocelulose bacteriana – BNC

As matrizes de BNC com diferentes formatos foram produzidas pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 23769) cultivada em meio manitol. A cultura foi distribuída em frascos plásticos estéreis no volume e dimensões características de cada matriz, sendo cultivada em incubadora BOD (Nova Ética, Brasil), a 26 °C e durante 6 dias. As matrizes de BNC foram recolhidas das placas, lavadas com água destilada e depois purificadas pela adição de NaOH 0,1 M por 24 h a 50 °C. Em seguida, as membranas de BNC foram submetidas a sucessivas lavagens com água destilada, até que o pH da água de enxague fosse equivalente ao da água destilada. As matrizes foram então esterilizadas em autoclave (Cristófoli, Brasil) por 20 min a 121 °C.

#### 4.2.1.2 Síntese das micropartículas de $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$

A síntese das micropartículas de carbonato de cálcio e  $\lambda$ -Carragenina ( $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ ) na matriz de BNC seguiu o método descrito no item 3.2.2.2; todavia, para os ensaios aqui realizados, as soluções necessárias para a síntese foram esterilizadas e/ou filtradas. Este procedimento foi realizado, em camera de fluxo laminar em condições estéreis, com intuito de manter a esterilidade do CarDS para os experimentos realizados in vitro.

### 4.2.2 Caracterização físico-química do CarDS

---

A caracterização físico-química do CarDS teve como intuito avaliar a influência da síntese de micropartículas  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  na matriz de BNC, quanto à razão mássica  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ :BNC, área superficial, capacidade de absorção de água e taxa de reidratação e propriedades mecânicas.

#### 4.2.2.1 Razão mássica $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car:BNC}$

A razão mássica de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car:BNC}$  foi avaliada para os diferentes diâmetros das matrizes BNC produzidos por *G. hansenii*. Matrizes de BNC de diferentes diâmetros foram produzidas pela variação do volume de inóculo (0,2; 2; 7; 20 mL) em placas de cultura de diferentes dimensões (6,4; 15,6; 35 e 86 milímetros), como descrito no item 3.2.1.1.3. A síntese das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  foi realizada como descrito no item 3.2.1.3. Os CarDS, nos diferentes diâmetros, as amostras foram congelados em ultra freezer, a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  (Nuair, EUA) por 24 h; em seguida, foram liofilizados (em liofilizador Liotop, Brasil) em temperatura de  $-50\text{ }^\circ\text{C}$  e pressão menor que 0,3 mmHg, durante 48 horas e, posteriormente, pesados. A razão mássica micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car:BNC}$  foi determinada pela Equação 4.

$$\text{Razão mássica } \text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car:BNC} = \frac{\text{massa seca de CarDS} - \text{massa seca de BNC}}{\text{massa seca de BNC}} \quad 4$$

#### 4.2.2.2 Área superficial

A influência das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  na área superficial da BNC foi determinada pela aplicação da equação de Brunauer-Emmett-Teller (B.E.T.) nas isotermas de adsorção de  $\text{N}_2$  (NOVA 2200E, Quantachrome, EUA). Antes da análise as amostras foram colocadas em tubos, aquecidas a  $90\text{ }^\circ\text{C}$  sob vácuo durante 1,5 horas para remoção da umidade da superfície e outros contaminantes. As análises foram realizadas a pressão relativa entre 0,05 e 0,25.

#### 4.2.2.3 Morfologia do CarDS

A distribuição das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  na matriz de BNC foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram congeladas em ultra freezer, a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  (Nuair, EUA) por 24 h; em seguida, foram liofilizadas (em liofilizador Liotop, Brasil) em temperatura de  $-50\text{ }^\circ\text{C}$  e pressão menor que 0,3 mmHg, durante 48 horas, montadas em stubs, e recobertas com ouro usando um Metalizer (Leica EM SCD500, Suíça). O MEV (JEOL JSM-6390LV, EUA) foi operado a 10 kV e 80 A (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, LCME/UFSC). As micrografias das micropartículas foram analisadas pelo software ImageJ V 1.51 (NIH, EUA) para a obtenção de sua distribuição de tamanho.



#### 4.2.2.4 *Capacidade de absorção de água e taxa de reidratação*

A capacidade de absorção de água e à taxa de reidratação foram avaliadas para BNC e para o CarDS. Amostras circulares de 15,6 mm de diâmetro foram primeiramente pesadas, determinando-se assim a sua massa úmida ( $M_{úmida}$ ); depois, foram liofilizadas, determinando-se a sua massa seca ( $M_{seca}$ ); posteriormente, foram imersas em 2 mL de água destilada, a 37 °C, por 0,5 h, 1 h, 6 h e 24 h. A cada tempo, o excesso de água sobre a superfície de cada membrana foi removido com papel absorvente, e as amostras foram pesadas determinando-se a massa de reidratação ( $M_{reidratação}$ ). A absorção de água para cada amostra foi então determinada por  $((M_{reidratação} - M_{seca})/M_{seca})$  e a taxa de reidratação por  $((M_{reidratação} - M_{seca})/(M_{úmida} - M_{seca})) \times 100$ .

#### 4.2.2.5 *Propriedades mecânicas*

As propriedades mecânicas da BNC, BNC/CaCO<sub>3</sub>, BNC/ $\lambda$ -Car e CarDS foram determinadas em texturômetro *Stable Micro Systems* (TA-HDplus) usando uma célula de carga de 500 N em condições de temperatura e umidade ambiente. Corpos de prova foram elaborados com 10 mm de largura e 35 mm de comprimento. Os corpos de prova foram fixados às garras superior e inferior do instrumento, deixando-se uma distância de 10 mm entre as duas garras. A velocidade de separação do instrumento foi de 1 mm·s<sup>-1</sup>, e a espessura para cada amostra foi determinada utilizando um paquímetro pela média de 3 medidas repetidas aleatoriamente ao longo da extensão dos materiais. Foram testadas pelo menos 3 amostras para cada amostra hidratada e liofilizada.

---

### 4.2.3 **Estudos in vitro**

---

Os estudos in vitro tiveram como intuito avaliar a influência das micropartículas de CaCO<sub>3</sub>/ $\lambda$ -Car presentes na matriz de BNC quanto à citotoxicidade em células da linhagem L929, interação célula-CarDS e, por fim, quanto à hemocompatibilidade.

#### 4.2.3.1 *Citotoxicidade*

A avaliação da citotoxicidade do sistema de liberação CarDS foi realizada pela técnica de contato direto, conforme a norma ISO 10993-5

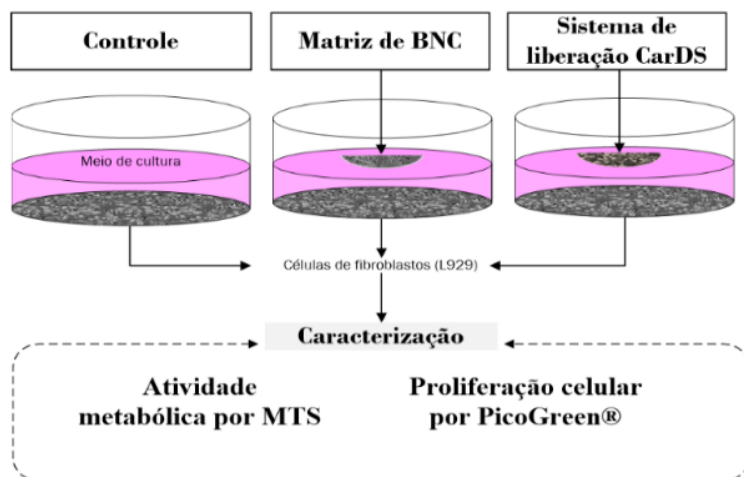
(2009), utilizando-se fibroblastos de tecido conectivo de camundongo, linhagem L929.

#### 4.2.3.1.1 Manutenção celular

Os fibroblastos de tecido conectivo de camundongo L929 foram mantidos em nitrogênio líquido, posteriormente descongelados e cultivados em meio de cultura celular Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco®, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) (Gibco®, EUA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco®, EUA) em atmosfera úmida, à temperatura de 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, em placa de cultura de tecidos (TPP, Suíça) para a propagação celular. Após atingir a confluência de 80% de preenchimento das placas de cultura, as células foram lavadas com PBS para a remoção das proteínas do SFB da superfície das células; em seguida, foi adicionada uma solução de tripsina (Gibco®, EUA) em volume suficiente para cobrir as células. As placas de cultura de tecidos foram transferidas para a estufa de CO<sub>2</sub> (Ultrasafe HF 212UV, Brasil) durante 5 min para a ativação da tripsina e descolamento das células aderidas na placa de cultura. A tripsina e as células foram transferidas para tubos de plástico de 2 mL e centrifugadas por dois minutos a 24 °C e 5000 RPM. A solução sobrenadante (tripsina) foi removida e o pellet (as células) foi ressuspensionado em meio de cultura, e as células viáveis foram quantificadas em câmara de Neubauer (SP Labor, Brasil).

A avaliação da citotoxicidade do CarDS e da BNC em células foi realizada pela quantificação da atividade metabólica a capacidade proliferativa, como ilustrada na Figura 28.

Figura 28 – Ilustração esquemática da avaliação da citotoxicidade *in vitro* envolvendo membranas de BNC e do sistema de liberação CarDS em fibroblastos (L929) para os tempos de cultura de 1, 3, 5 e 7 dias.



As células de fibroblastos L929 foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 24 poços na densidade inicial de  $1,8 \times 10^4$  células/poço. Após 24 h, o meio foi substituído, e amostras (BNC e CarDS) foram adicionadas e cultivadas em estufa (Ultrasafe HF 212UV, Brasil) por 1, 3, 5 e 7 dias. Foram utilizadas células cultivadas em placa e células cultivadas sobre a BNC como controle. A citotoxicidade do CarDS e da BNC em células foi avaliada quanto à atividade metabólica e capacidade proliferativa.

#### 4.2.3.1.2 Atividade metabólica

As alterações na viabilidade celular após 1, 3, 5 e 7 dias de cultura foram determinadas pela inferência da atividade mitocondrial medida utilizando CellTiter 96® Aqueous One Solution (MTS) (Promega Corporation, EUA) por ensaio colorimétrico realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas suavemente com PBS, e foram adicionados 300  $\mu$ L de meio DMEM e 60  $\mu$ L do reagente MTS. As placas foram mantidas em atmosfera humidificada (5% CO<sub>2</sub>), incubadas a 37 °C

durante 2 h, e ao abrigo da luz. Após a incubação cada amostra foi homogeneizada e 100 µL da solução foram transferidos para uma nova placa de 96 poços. A absorbância do sobrenadante foi medida a 490 nm utilizando espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA). O grupo controle foi constituído de células cultivadas em placa de cultura.

A atividade metabólica das células foi calculada em relação às células controle, como descrito na Equação 7.

$$\text{Atividade metabólica (\%)} = \frac{\text{ABS tratamento} \times 100}{\text{ABS controle}} \quad 5$$

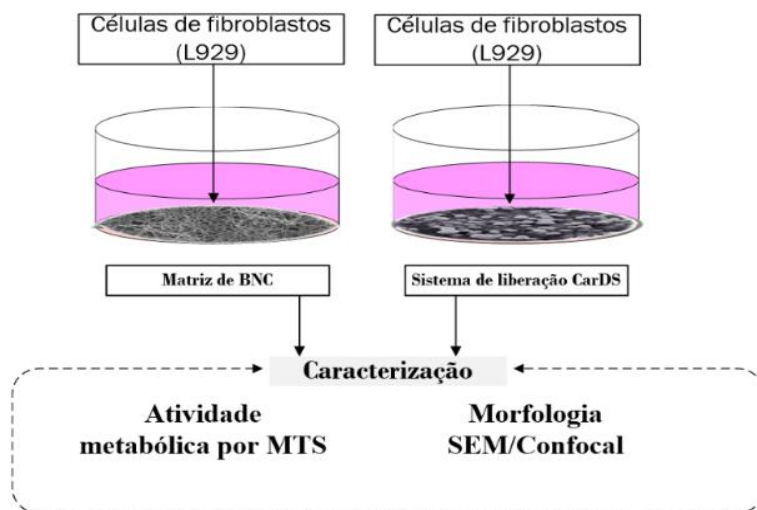
#### 4.2.3.1.3 *Proliferação celular*

A proliferação celular após 1, 3, 5 e 7 dias de cultura foi avaliada por quantificação de DNA (Quant-iT PicoGreen dsDNA, Invitrogen, EUA) em ensaio fluorimétrico seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas suavemente com PBS e foi adicionado 1 mL de água ultrapura. As amostras permaneceram durante uma hora em atmosfera úmida a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e, em seguida, as amostras foram armazenadas em congelador a -80 °C até a análise. Para quantificar a proliferação celular foi utilizado Quant-iT PicoGreen dsDNA® Reagent™, que consiste em detectar a presença de cadeia dupla de DNA no sobrenadante celular por uma sonda fluorescente. Medidos 28,7 µL para cada amostra, estes foram misturados com 71,3 µL da solução PicoGreen® (0,5 mL reagente PicoGreen® em 100 mL de 1X tampão TE), 100 µL de tampão TE 1X e incubados no escuro durante 10 minutos. A fluorescência foi medida a um comprimento de onda de excitação de 485 nm e a um comprimento de onda de emissão de 528 nm em espectrofotômetro de fluorescência (Molecular Devices, EUA). Uma curva padrão foi preparada, e os valores de dsDNA da amostra foram lidos a partir da curva padrão utilizando as concentrações de 0, 0,02, 0,05, 1 e 2 µg·mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3.2 *Interação célula-biomaterial*

A avaliação da interação célula L929-CarDS foi avaliada quanto a atividade metabólica e morfologia como ilustrado na Figura 29.

Figura 29 – Ilustração esquemática da avaliação da interação célula-biomaterial (BNC e CarDS) in vitro para os tempos de cultura de 1, 3 e 7 dias.



Para tanto, as amostras, matrizes de BNC e CarDS, foram adicionadas nos poços de uma placas de 96 poços de cultura de tecidos, e imersas em meio de cultura sem soro durante 24 horas. Fibroblastos de tecido conectivo de camundongo, da linhagem L929, foram semeados na densidade de  $1,8 \times 10^4$  células por poço e o meio de cultura foi renovado a cada dois dias. Após a incubação durante 1, 3 e 7 dias, os biomateriais foram lavados com PBS, e mudanças na viabilidade e morfologia das células aderentes na BNC e no CarDS foram avaliadas. A viabilidade foi determinada pela atividade metabólica (MTS) e a morfologia das células e dos biomateriais foi visualizada pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de microscopia eletrônica confocal a laser (MCVL).

#### 4.2.3.2.1 Atividade metabólica

O número de células metabolicamente ativas aderidas aos biomateriais (BNC e CarDS) foi quantificado por MTS. Após tempo de cultivo as amostras foram lavadas com PBS, e a estas foram adicionados 200  $\mu$ L de meio de cultura e 40  $\mu$ L de solução de MTS, sendo então armazenadas em estufa por 2 h. Após a incubação cada amostra foi

homogeneizada e 100 µL da solução foram transferidos para uma nova placa de 96 poços e realizada leitura a 490 nm.

#### 4.2.3.2.2 Morfologia por MEV

A fim de verificar a influência das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  na morfologia das células aderidas à BNC (BNC e CarDS), estas foram submetidas a análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Primeiramente as amostras foram fixadas com fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M) durante 4 horas à temperatura ambiente, e submetidas a três lavagens de 15 minutos com tampão cacodilato de sódio 0,1M. Posteriormente, foi realizado o processo de desidratação em sequência de álcool em concentrações crescentes (10%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%); as amostras foram incubadas em cada série durante 20 minutos; a última etapa (álcool 100%) foi repetida três vezes. Após a desidratação, as amostras foram submetidas à secagem no equipamento de ponto crítico de  $\text{CO}_2$  (Leica EM CPD 030); neste processo as partículas de álcool são substituídas por  $\text{CO}_2$ . Ao final, as amostras foram montadas em stubs, metalizadas com uma cobertura de ouro (metalizador Sputter Leica EM SCD 500) e então analisadas sob microscópio eletrônico de varredura por captura de elétrons secundários em 10 kV (Jeol JSM-6390LV).

#### 4.2.3.2.3 Morfologia por MCVL

Para análise morfológica das células aderidas ao biomaterial por Microscopia Confocal de Varredura a Laser, as células foram lavadas três vezes com uma solução de PBS (pH 7,4), e em seguida fixadas com formaldeído a 3,7% em PBS e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS. Para visualizar os filamentos de F-actina, as células foram coradas com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (Molecular Probes, EUA). Os núcleos das células foram coradas com DAPI [(4', 6-diamidino-2-fenilindole, sal dicloridrato, Molecular Probes, EUA)]. As amostras foram então montadas em lâminas e analisadas utilizando-se um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ci-G, Japão).

#### 4.2.3.3 *Hemocompatibilidade*

##### 4.2.3.3.1 Preparação de amostras de sangue

Sangue foi coletado de doadores voluntários saudáveis, de acordo com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (Processo nº 48296915.8.0000.0121), intitulado “Biofuncionalidade e hemocompatibilidade de membranas poliméricas de nanocelulose bacteriana (BNC)”. O sangue foi recolhido em tubos de coleta de sangue em vácuo citrado (3,2%) e utilizado na sequência.

##### 4.2.3.3.2 Potencial hemolítico

O potencial hemolítico da BNC e do CarDS foi analisado como descrito pela Sociedade Americana para Testes e Materiais (ASTM F756-00, 2000). Para realização do ensaio, sete amostras (0,28 cm<sup>2</sup>) foram adicionadas em tubos de ensaio de polipropileno e posteriormente preenchidos com 7 mL de PBS. Após 72 h de incubação a 37 °C, o PBS foi removido, e 7 mL de PBS e 1 mL de sangue venoso diluído (8 mL de sangue/10 mL de PBS) em citrato foi adicionado a cada amostra. Cada tubo foi suavemente agitado duas vezes a cada 30 minutos, a fim de favorecer o contato do sangue com o material. Após incubação por 3 h, cada fluido foi transferido para um tubo apropriado e centrifugado a 2000 RPM durante 15 min. A hemoglobina liberada por hemólise foi medida por densidade óptica (DO) dos sobrenadantes a 540 nm utilizando um espectrofotômetro UV-VIS (Molecular Devices, EUA). A porcentagem de hemólise foi calculada conforme descrito na Equação 8.

$$\text{Hemólise (\%)} = \left( \frac{\text{DO}_{\text{teste}} - \text{DO}_{\text{controle negativo}}}{\text{DO}_{\text{controle positivo}} - \text{DO}_{\text{controle negativo}}} \right) \times 100 \quad 6$$

PBS e água ultra-pura foram utilizados como controle negativo e positivo respectivamente como materiais de referência.

##### 4.2.3.3.3 Coagulação dinâmica do sangue

A cinética de coagulação do sangue foi realizada para BNC e CarDS. As amostras foram previamente preparadas, onde cada Eppendorf contendo 4 amostras de BNC e de CarDS com 6,4 mm de diâmetro foram colocadas em banho termostatizado a 37 °C durante 5 min. A coagulação foi induzida pela adição de 250 µL da mistura de sangue/ACD

(*anticoagulant citrate dextrose solution*), seguida da adição de 20 µL de solução de CaCl<sub>2</sub> (0,2 mol/L). Os Eppendorfs contendo as amostras foram mantidos em um banho termostático a 37 °C. Foram retiradas amostras nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min e diluídas em 50 mL de água destilada. A concentração de hemoglobina liberada foi medida por transferência de 200 µL do sobrenadante para uma placa de 96 poços, e realizada leitura espectrofotométrica da absorbância a 540 nm. A formação do coágulo é seguida por uma redução no valor da absorvância. Sangue foi utilizado como controle positivo para normalização das amostras, e CarDS sem adição de coagulante foi utilizado como controle negativo. O índice de coagulação dinâmica do sangue (ICS) do biomaterial foi determinado pela Equação 9. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

$$ICS = \left( \frac{\text{ABS do sangue em contato com a amostra}}{\text{ABS da solução de água destilada em contato com sangue/ACD}} \right) \times 100 \quad 7$$

#### **4.2.4 Análise estatística**

---

Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando-se o software estatístico Origin, versão 8.5. Os resultados experimentais foram expressos como a média ± erro padrão e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando  $p \leq 0,05$ .



### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No capítulo anterior foi apresentado o desenvolvimento de um sistema de liberação de fármacos para aplicação local, denominado CarDS. O CarDS foi concebido com intuito de auxiliar no tratamento adjuvante da recidiva do câncer de mama, pela aplicação do sistema, contendo uma carga específica de agente quimioterápico, após a retirada do tumor (mastectomia), inibindo assim a recidiva local das células tumorais. Um dos desafios para o desenvolvimento de biomateriais inovadores diz respeito à natureza, forma e as características físico-químicas e biológicas dos materiais. Por tanto torna-se necessário o estudo da interação entre os materiais e o sistema biológico.

Neste capítulo foi explorado as características físico-químicas e biológicas in vitro do CarDS visando melhorar o entendimento da interação do CarDS com o sistema biológico.

#### 4.3.1 Avaliação da razão $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ :BNC

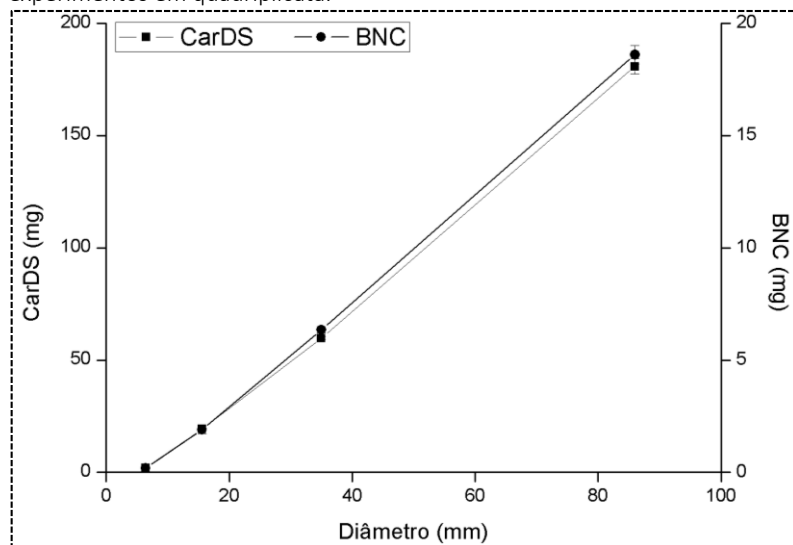
Para que um biomaterial atinja a especificidade adequada para implante, deve-se conhecer as suas propriedades estruturais. Afim de obter um formato adequado de uma membrana de diâmetro similar à da base de uma prótese mamária, cerca de 86 mm de diâmetro, avaliou-se a síntese de micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  em matrizes de BNC com diâmetros variando de 5,4 a 86 mm.

A Tabela 7 e a Figura 30 mostram o efeito da variação do diâmetro da matriz de BNC na massa seca de BNC, na massa seca do CarDS e na razão de micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ :BNC.

Tabela 7 – Efeito da variação do diâmetro (6,4, 15,6, 35, 86 mm) da matriz de BNC na razão mássica de micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ :BNC. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média em quadruplicata, para três ensaios independentes.

Amostra	Diâmetro (mm)			
	6,4	15,6	35	86
BNC seca (mg)	0,19 $\pm$ 0,04	1,90 $\pm$ 0,17	6,35 $\pm$ 0,26	18,61 $\pm$ 0,42
CarDS seco (mg)	1,98 $\pm$ 0,04	19,41 $\pm$ 0,52	59,83 $\pm$ 0,99	180,75 $\pm$ 3,39
Razão mg $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ : mg BNC)*	9,20 $\pm$ 0,30*	9,48 $\pm$ 0,73*	8,56 $\pm$ 0,36*	8,71 $\pm$ 0,17*

Figura 30 – Efeito do diâmetro da matriz de BNC na massa seca da matriz de BNC e do CarDS. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média, para três experimentos em quadruplicata.



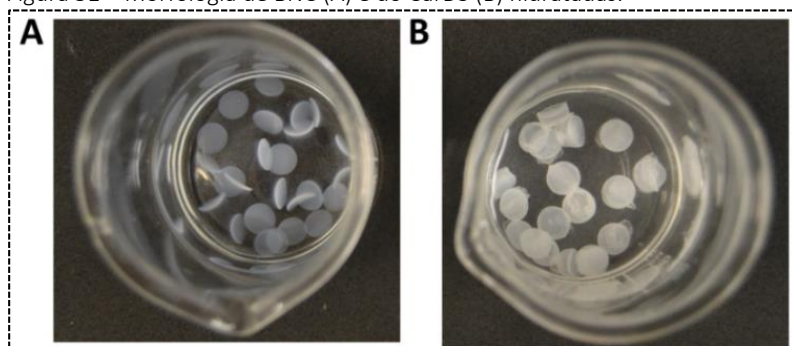
A vantagem da utilização da matriz de BNC para o desenvolvimento de um sistema DDS, está relacionada à sua estrutura tridimensional (ABEER; MOHD AMIN; MARTIN, 2014). O entrelaçamento das fibras, porosidade, área superficial, e massa seca, é influenciado pelas condições de cultivo, assim como a linhagem bacteriana e seu respectivo meio de cultura (CACICEDO et al., 2016). Quando mantemos a maioria destes parâmetros constantes e variamos somente o diâmetro da placa de cultura, obtemos uma relação linear entre a massa de BNC e o diâmetro da matriz formada (Tabela 7 e Figura 29), assim como, quando realizamos a síntese das micropartículas nas matrizes de BNC nos diferentes formatos, mantemos uma relação linear da massa do CarDS em função do aumento do diâmetro da matriz de BNC (Tabela 7).

Neste trabalho foi realizada a pré-incubação das matrizes de BNC, produzidas por *G. hansenii*, em solução contendo íons  $\text{CO}_3^{2-}$ , possibilitando que os mesmos se difundam para o interior da matriz polimérica. Quando se adiciona solução contendo  $\text{Ca}^{2+}$ , sob forte agitação, ocorre precipitação de micropartículas de  $\text{CaCO}_3$ , dentro e fora

da matriz de BNC. Neste caso, independentemente do diâmetro da matriz de BNC avaliada (6,4, 15,6, 35 e 86 mm), não se observou alteração significativa ( $p < 0,05$ ) na razão mássica entre as micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  e a BNC (Tabela 7). Este fato ocorreu muito provavelmente devido à saturação dos íons  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  presentes em solução e na matriz de BNC, e pelos parâmetros de produção mantidos constantes. Ao aumentarmos o diâmetro da matriz de BNC produzida, aumentamos linearmente a massa seca de BNC (Tabela 7 e Figura 29) e permanecemos com uma relação de micropartículas sintetizadas na matriz de BNC de 9 mg/mg.

A Figura 31 mostra a morfologia das matrizes de BNC e do CarDS hidratadas com diâmetro de 5,4 mm.

Figura 31 – Morfologia de BNC (A) e do CarDS (B) hidratadas.



A Figura 31A mostra a aparência da matriz de BNC e a Figura 31B mostra a aparência do sistema CarDS, ou seja, BNC após a síntese das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ . Esta se apresenta mais esbranquiçada e menos transparente e com razão mássica de micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  por BNC de  $9,20 \pm 0,30$  (mg/mg). BNC e CarDS, apresentando este formato e hidratadas, foram utilizadas para os ensaios experimentais de incorporação e liberação da Dox e suas respectivas caracterizações, apresentadas no Capítulo 3.

Neste caso, ao aumentar a escala de produção da matriz de BNC, de 6,4 mm para 86 mm, conseguimos manter a razão mássica de micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ :BNC constante, independente do diâmetro da matriz de BNC produzida.

### **4.3.2 Avaliação da Área superficial**

---

A área superficial é uma característica importante quando se procura desenvolver um biomaterial, pois está relacionada à porosidade, a qual influencia diretamente na difusão de compostos e/ou moléculas para dentro/fora do biomaterial. A BNC tem elevada área superficial pois é um biomaterial com uma grande quantidade de poros (espaços vazios). Neste sentido, avaliou-se a influência da presença de micropartículas na morfologia e na área superficial da matriz de BNC. A matriz de BNC produzida pela cepa *G. hansenii*, após cultivada durante 6 dias, apresentou uma área superficial média determinada pela equação de Brunauer-Emmett-Teller (B.E.T.) de  $56,82 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . O entrelaçamento das fibras e a porosidade, podem ser influenciado pelo tempo de cultivo. Islam e colaboradores (2015) avaliaram a área superficial de BNC, também produzida por *G. hansenii* após 14 dias de cultivo, e observaram uma área superficial de  $19,97 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . A síntese das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  entre as fibras de BNC, em ambiente estéril, pelo método de cristalização coloidal, observou-se que a presença das micropartículas ocasiona uma alteração da área superficial de  $56,82 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  para  $7,62 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ .

A síntese in loco das micropartículas entre as fibras da BNC torna a superfície da BNC com menor porosidade, como observada nas imagens de MEV, no capítulo anterior e promove redução de 87% na área superficial, conforme determinada pelo método de B.E.T.

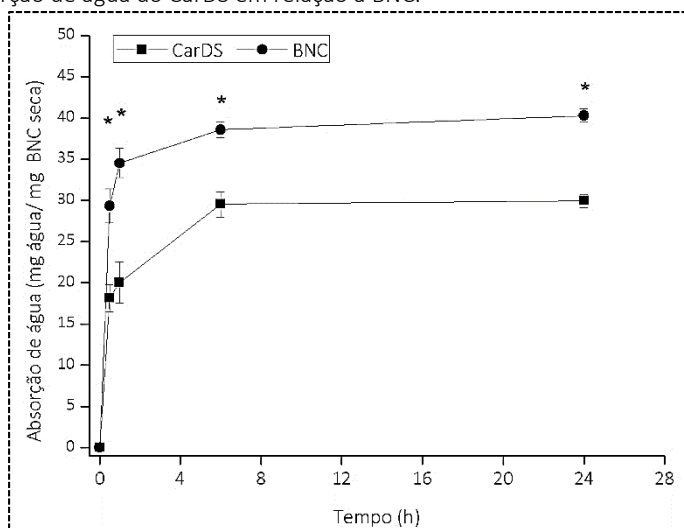
### **4.3.3 Avaliação da capacidade de absorção de água e taxa de reidratação**

---

A capacidade de absorção de água e a taxa de reidratação são características importantes dos biomateriais para aplicações biomédicas, uma vez que a propriedade de difundir água permite o transporte do fármaco para fora da matriz (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010; KOLAKOVIC et al., 2012). Avaliou-se a influência da síntese das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  entre as fibras de BNC nas propriedades de absorção de água e taxa de reidratação da BNC.

A Figura 32 mostra a cinética de absorção de água da BNC e do sistema CarDS.

Figura 32 – Cinética de absorção de água para BNC e para o CarDS. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de dois ensaios independentes em triplicata. \* Indica a diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) da absorção de água do CarDS em relação à BNC.



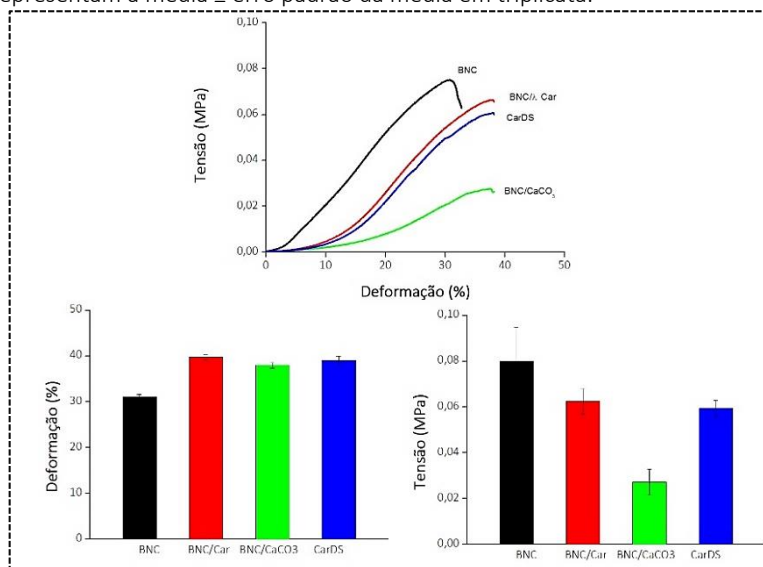
A absorção de água pela BNC pode variar em milhares de vezes o seu próprio peso (HOFFMAN, 2013). A presença das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  na matriz de BNC ocasionou uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) de 27% na capacidade de absorção de água (Figura 32). A propriedade de absorção de água relata a capacidade do material em absorver água disponível; no entanto, a redução da capacidade de absorção de água, aqui relatada, pode estar relacionada à diminuição da área superficial e da porosidade da BNC, devido à presença das micropartículas entre as fibras de BNC que ocupam o espaço destinado à água. A redução da taxa de reidratação do CarDS de 19% quando comparada com a da BNC, pode ser explicada pela presença das micropartículas e também pelo agrupamento das fibras de BNC durante o processo de liofilização, não sendo capaz de retornar à sua forma original.

A presença das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  entre as fibras de BNC ocasionou uma redução na capacidade de absorção de água de 27% e uma redução de 19% na taxa de reidratação.

#### 4.3.4 Avaliação das propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas são normalmente utilizadas para caracterização de novos materiais, fornecendo informações importantes sobre a maleabilidade do biomaterial no momento da aplicação (HU; CATCHMARK, 2011; DE OLIVEIRA BARUD et al., 2016). Para uma aplicação adequada, CarDS deve manter a integridade durante o uso; portanto, avaliou-se as propriedades mecânicas para BNC, BNC/ $\lambda$ -Car, BNC/ $\text{CaCO}_3$  e CarDS quanto à tensão aplicada para deformação máxima à ruptura quando em estado hidratado e liofilizado. A Figura 33 mostra as propriedades mecânicas relacionadas às curvas típicas de tensão-deformação e os valores de tensão de ruptura e deformação de amostras hidratadas.

Figura 33 – Propriedades mecânicas. (A) Curvas típicas de tensão-deformação; (B) deformação máxima à ruptura; (C) tensão de ruptura das amostras hidratadas de BNC, BNC/ $\lambda$ -Car, BNC/ $\text{CaCO}_3$  e CarDS. Curvas e valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média em triplicata.



A Figura 33A mostra as curvas características de tensão-deformação para a BNC, BNC/Car, BNC/ $\text{CaCO}_3$  e CarDS. A matriz de BNC sofreu alteração de seu comportamento mecânico à medida que teve

alterada sua composição. Um dos parâmetros avaliados nos biomateriais implantáveis é a capacidade de alongamento à ruptura, considerando-se que, quanto maior a maleabilidade do material, mais fácil é de se trabalhar e mais moldável ele fica no lugar a ser implantado. Esses valores podem variar em função de diferentes situações, como linhagem bacteriana, tempo de cultivo, ou mesmo suplemento pré ou pós-tratamento da BNC (CAI; HOU; YANG, 2011). A Figura 33B mostra os valores em porcentagem de deformação para BNC, BNC/Car, BNC/CaCO<sub>3</sub> e CarDS. A presença das micropartículas híbridos de CaCO<sub>3</sub>/λ-Car entre as fibras de BNC aumentou de forma significativa ( $p \leq 0,05$ ) a porcentagem de deformação, de 30% para 39%.

Lin e colaboradores (2013) avaliaram as propriedades mecânicas de uma membrana de BNC contendo quitosana (BNC-Ch) para aplicação na cicatrização de feridas; os resultados mostram valores de deformação à ruptura de 29 e 32% para as membranas BC e BC-Ch, respectivamente. A Figura 33C mostra os valores em tensão aplicada à ruptura para BNC, BNC/Car, BNC/CaCO<sub>3</sub> e CarDS. Neste caso foi possível observar que a presença da λ-Car tornou o material mais elástico, sendo necessária uma maior tensão à ruptura quando comparada somente com a presença das micropartículas de CaCO<sub>3</sub>, porém não apresentando diferença significativa em relação a BNC.

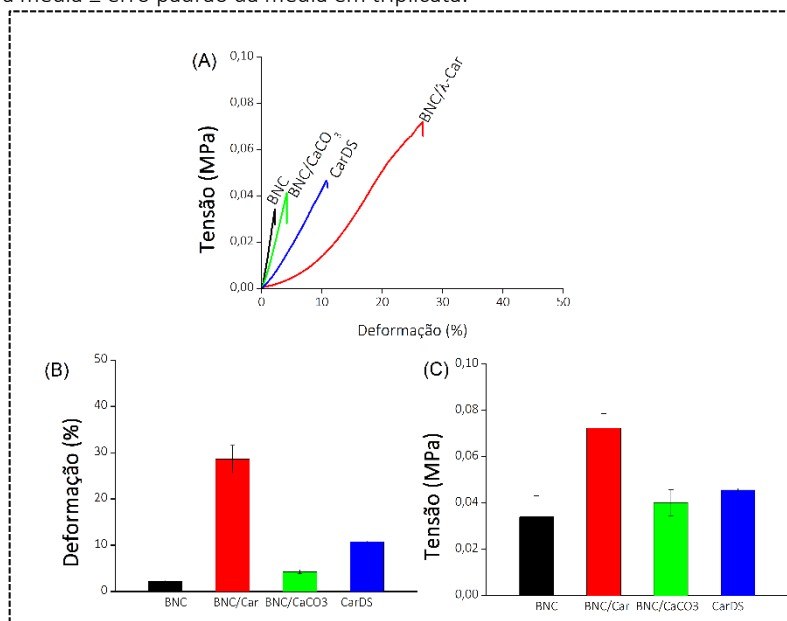
Almeida e colaboradores (2014) adicionaram glicerina à matriz de BNC para administração tópica de fármaco, e observaram que, além de modificar as propriedades mecânicas, a inclusão de glicerina resultou em um efeito hidratante da pele que poderia ser clinicamente relevante para o tratamento de doenças da pele caracterizadas pela *secura*, tais como psoríase e dermatite atópica. Wang e colaboradores (2008) desenvolveram um hidrogel híbrido de alginato contendo micropartículas de CaCO<sub>3</sub> e observaram que a conjugação do alginato com as micropartículas de CaCO<sub>3</sub> proporcionou um aumento na resistência mecânica do hidrogel de alginato, provavelmente devido à formação de uma rede reticulada com as micropartículas.

Ao avaliarmos as propriedades mecânicas do sistema CarDS observamos uma maior maleabilidade, como observado pelo aumento na correspondente deformação à ruptura. Este aumento na maleabilidade, muito provavelmente é devido à presença da λ-Car que, além de

influenciar na maleabilidade, influencia no polimorfismo do  $\text{CaCO}_3$  produzido. Para a aplicação tópica desejada neste trabalho, projeta-se o uso do CarDS como um sistema liberação de fármacos local em estado hidratado, porém foram avaliadas também as características do CarDS liofilizado.

A Figura 34 apresenta as curvas típicas de tensão-deformação e as médias de tensão e deformação à ruptura das amostras liofilizadas.

Figura 34 – Propriedades mecânicas. (A) Curvas típicas de tensão-deformação; (B) alongamento máximo à ruptura; (C) tensão máxima à ruptura das amostras liofilizadas de BNC, BNC/Car, BNC/ $\text{CaCO}_3$  e CarDS. Curvas e valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média em triplicata.



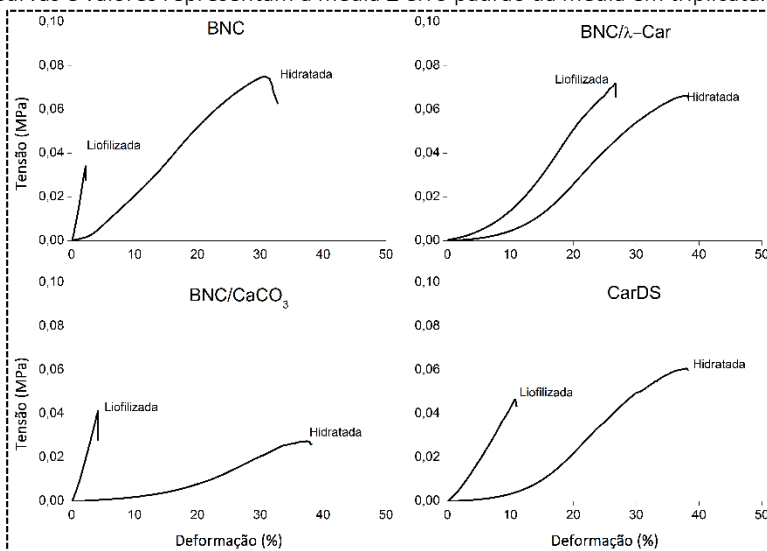
A Figura 34A destaca as curvas de tensão-deformação para BNC, BNC/ $\lambda$ -Car, BNC/ $\text{CaCO}_3$  e CarDS (BNC/ $\text{CaCO}_3$ / $\lambda$ -Car) liofilizadas. Neste caso também podemos observar a alteração do comportamento mecânico em razão das alterações da matriz de BNC. Entre as curvas observa-se claramente dois grupos distintos, de acordo com a presença ou ausência de carragenina. A Figura 34B mostra que as amostras que não possuem



$\lambda$ -Car em sua estrutura, ou seja, BNC e BNC/CaCO<sub>3</sub>, apresentam uma menor capacidade de deformação quando comparadas com as amostras que possuem  $\lambda$ -Car em sua estrutura. A Figura 34C mostra que a tensão aplicada para romper a matriz de BNC contendo  $\lambda$ -Car é maior. Porém, quando se adicionam as micropartículas este resultado não apresenta diferença significativa quando comparadas com BNC pura e BNC/CaCO<sub>3</sub>.

A Figura 35 mostra os perfis das curvas tensão-deformação das amostras hidratadas e liofilizadas, onde observa-se uma redução da capacidade de deformação para todas as amostras liofilizadas.

Figura 35 – Propriedades mecânicas. Curvas típicas de tensão-deformação hidratadas e liofilizadas para (A) BNC, (B) BNC/Car, (C) BNC/CaCO<sub>3</sub> e (D) CarDS. Curvas e valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média em triplicata.



Em termos de propriedades mecânicas, observou-se que o CarDS é mais maleável quando úmido e que ocorre uma diminuição nas propriedades mecânicas quando liofilizado. O estado de hidratação é uma característica importante em termos da aplicação clínica do CarDS uma vez que materiais mais flexíveis são mais fáceis de ser aplicados sobre o sítio cirúrgico.

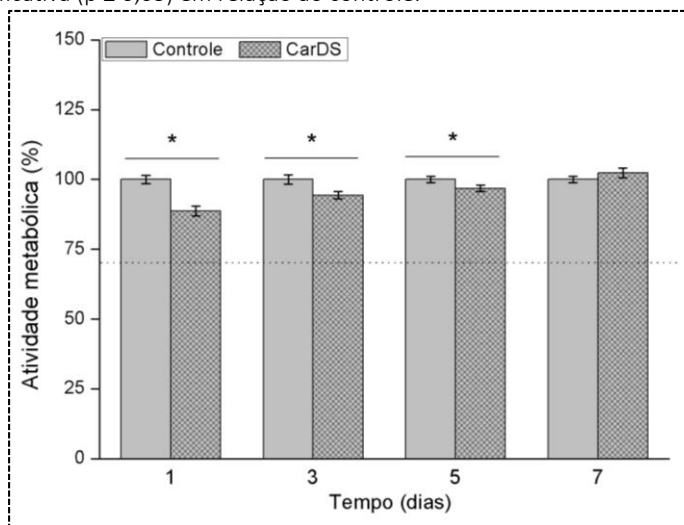
#### 4.3.5 Avaliação da citotoxicidade

---

A realização de ensaios in vitro permite uma maior compreensão das propriedades biológicas dos biomateriais, sendo de fundamental importância para entender o seu comportamento junto ao tecido in vivo. O que se analisa é a aceitação do material dentro de um meio biológico, assegurando que a sua capacidade de funcionamento não gere distúrbios imunológicos ao ser implantado e também que os tecidos não atuem negativamente sobre o dispositivo, de modo que este venha a perder sua função. O CarDS, composto por micropartículas de carbonato de cálcio e  $\lambda$ -carragenina, é composto de materiais considerados não citotóxicos, quando avaliados separadamente. Porém, alguns biomateriais podem interagir, e reações ocasionadas pelas suas interações podem liberar produtos secundários (CHEN; LIANG; THOUAS, 2013). Esses produtos secundários podem estar relacionados a danos celulares indesejáveis, inviabilizando a aplicação destes biomateriais in vivo. Este trabalho busca explorar ao máximo as características do CarDS, não deixando dúvidas sobre a sua citotoxicidade. Seguiu-se as orientações sugeridas pela *International Organization for Standardization*, norma ISO 10993-5, que descreve testes de citotoxicidade in vitro para avaliação biológica de dispositivos médicos (ISO/EN10993-5, 2009). Estas orientações sugerem a análise das alterações na atividade metabólica da linhagem L929, cultivada em placa, após tratamento com o biomaterial objeto de estudo. Esta análise pode ser realizada por contato direto do biomaterial sobre as células e ou/ células sobre biomaterial. Em função destas orientações, avaliou-se as possíveis alterações que o biomaterial desenvolvido, o CarDS, poderia ocasionar na atividade metabólica e índice proliferativo das células L929.

A Figura 36 mostra a capacidade das células em metabolizar os sais de tetrazólion presente no reagente MTS quando em contato com o CarDS, após 1, 3, 5 e 7 dias de cultivo.

Figura 36 – Atividade metabólica. Influência do CarDS na Atividade metabólica de Fibroblastos L929 por contato indireto, analisados por MTS após 1, 3, 5 e 7 dias de incubação a 37 °C. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média, para três experimentos independentes em quadruplicata. \* Diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao controle.

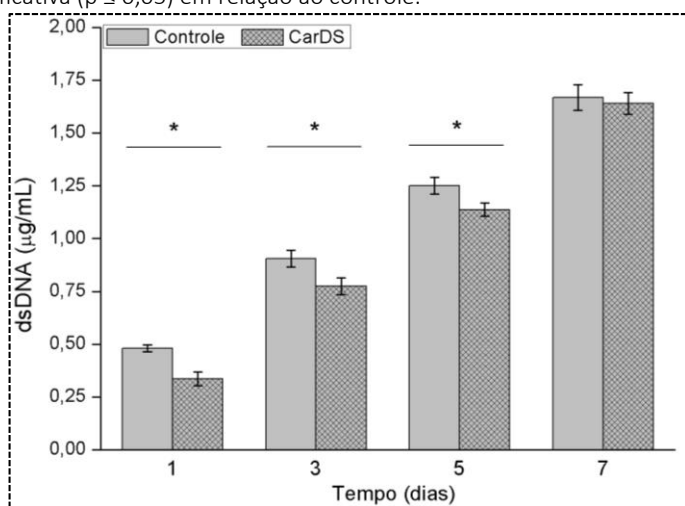


A atividade metabólica foi normalizada em função das células tratadas com controle (BNC). A BNC já foi relatada como um biomaterial considerado não citotóxico, sendo utilizado para várias terapias, dentre elas tratamento de feridas e irritabilidade in vivo (ALMEIDA et al., 2014; SULAEVA et al., 2015). A norma ISO 10993-5 relata que a atividade metabólica das células em contato com o biomaterial deve apresentar um índice superior a 70% para ser considerado não-citotóxico. Este índice está representado na Figura 36 por uma linha tracejada. Neste trabalho as taxas de atividade metabólica foram superiores ao índice de 70% para todos os tempos avaliados; relatado pelo aumento na atividade metabólica das células de  $88,7 \pm 1,68\%$ ,  $94,3 \pm 1,32\%$ ,  $96,82 \pm 1,13\%$  e  $102,42 \pm 1,73\%$ , com o tempo de cultivo de 1, 3, 5 e 7 dias, respectivamente, quando em contato com CarDS. A porcentagem de células metabolicamente ativas, em contato com CarDS, aumenta com o passar dos dias de cultivo (1, 3, 5 e 7 dias). Após sete dias de cultivo, a atividade metabólica das células em contato com CarDS foi de 102%, não

apresentando diferença significativa quando comparada com o controle, evidenciando a não citotoxicidade do CarDS, estando de acordo com o índice relatado pela ISO 10993-5.

A Figura 37 mostra a concentração de dsDNA de fibroblastos da linhagem L929, quando em contato com o CarDS ao longo do tempo de cultivo de 1, 3, 5 e 7 dias.

Figura 37 – Proliferação celular. Influência do CarDS na proliferação de fibroblastos (L929). Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média para três experimentos independentes, realizados em quadruplicata. \* Diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao controle.



A Quantificação do dsDNA das células L929 (Figura 37) mostra uma tendência proliferativa ao longo do tempo de cultivo. Foi relatado que a concentração de DNA aumentou 6,4 vezes em 7 dias de cultivo. Ao sétimo dia de cultivo a concentração de DNA se equivale a do controle, não havendo diferença significativa entre eles ( $p \leq 0,05$ ).

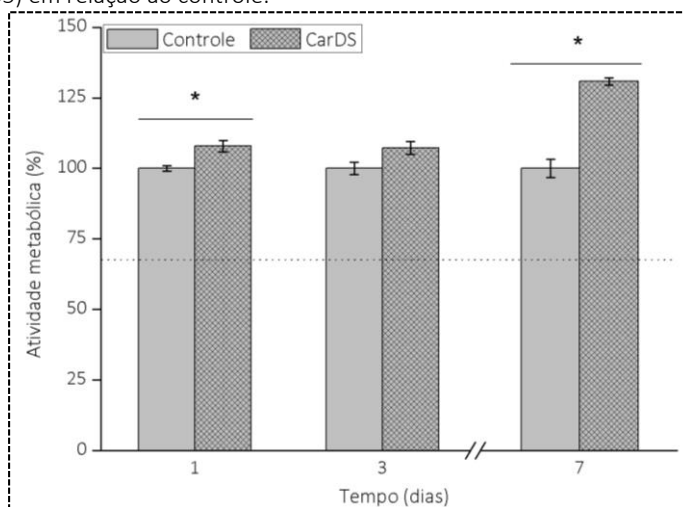
Além da atividade metabólica e índice proliferativo, a interação célula-biomaterial é uma resposta do comportamento das células frente ao biomaterial estudado. Como já mencionado, a BNC é considerada um biomaterial não tóxico; todavia, micropartículas de carbonato de cálcio em altas concentrações foram relacionadas a alterações morfológicas em placa de cultura.

#### 4.3.6 Avaliação da interação célula-biomaterial

A avaliação da interação célula-biomaterial tem por finalidade confirmar a utilização segura e eficaz do CarDS junto ao tecido in vivo. Para tanto, fibroblastos da linhagem L929 foram plaqueados na densidade de  $1,8 \times 10^4$  células sobre a matriz de BNC e CarDS, sendo posteriormente avaliadas as alterações na atividade metabólica e morfologia da células em questão.

A Figura 38 mostra porcentagem de células de foboblástos metabolicamente ativas, quando em contato com CarDS, após 1, 3 e 7 dias de cultivo.

Figura 38 – Atividade metabólica. Influência do CarDS na Atividade metabólica de Fibroblastos L929 por contato direto, analisados por MTS após 1, 3, 5 e 7 dias de incubação a 37 °C. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de dois experimentos independentes em quadruplicata. \* Diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao controle.



O ensaio de MTS tem como princípio avaliar a capacidade de células vivas em reduzir o composto MTS em um produto formazan solúvel em meio de cultura, graças às enzimas desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas. A presença de 1,54 mg de micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  entre as fibras da BNC, proporcionou um

microambiente mais favorável para a interação célula-biomaterial, como pode ser observado pelos resultados mostrados na Figura 38, apresentando uma atividade metabólica 7% superior ao controle, no primeiro dia e 31% superior ao controle no sétimo dia de cultivo.

Não existem relatos na literatura da interação de fibroblastos L929 com estes biomateriais BNC/CaCO<sub>3</sub>/λ-Car em conjunto. No entanto, matrizes de BNC já são consideradas material biocompatível e não citotóxico (HELENIUS et al., 2006; CHIAOPRAKOBKIJ et al., 2011; PÉRTILE et al., 2012; AHMAD et al., 2014).

Células endoteliais da veia humana exibiram grande proliferação em matriz BNC que, por sua vez, exibiu crescimento horizontal e ocorrência de migração vertical à membrana. Devido à presença de diferentes gradientes de disponibilidade de oxigênio em função da profundidade da matriz BNC, verificou-se que a penetração celular no interior do hidrogel de BNC estava limitada até um determinado nível de oxigênio (JEONG et al., 2010; RECOUVREUX et al., 2011).

Mendes e colaboradores (2009) avaliaram a resposta biológica da matriz BNC após implantação subcutânea em camundongos. As análises das seções histológicas da matriz de BNC e do tecido circundante aos 7, 15, 30, 60 e 90 dias após a cirurgia, não mostraram nenhuma evidência de reação estranha ao longo do período estudado. As células polimorfonucleares e os linfócitos foram observados aos 7, 15 e 30 dias após a cirurgia, sugerindo uma leve resposta inflamatória. Em contraste, aos 60 e 90 dias após a cirurgia, não foi observada infiltração de células inflamatórias (MENDES et al., 2009).

Kim e colaboradores (2010) prepararam compósitos de gelatina e BNC e avaliaram sua biocompatibilidade. As células de fibroblastos NH3T3 foram semeadas sobre compósitos de BNC e BNC-gelatina e incubados durante 48 h. Eles descobriram que as células apresentaram boa aderência e proliferação, embora a biocompatibilidade fosse muito melhor nos compósitos de BNC-gelatina do que em BNC pura. Consequentemente, os scaffolds de BNC-gelatina foram bioativos, indicando que podem ser utilizados para curativos de feridas e como arcabouços de engenharia tecidual (KIM; CAI; CHEN, 2010). De modo semelhante, Wang e colaboradores (2012) relataram a síntese de um composto BNC-gelatina via reticulação por procianidina. Os resultados

mostraram que a proliferação, infiltração e adesão de fibroblastos são melhoradas em relação à BNC pura. De fato, a gelatina, um polipeptídeo derivado de uma matriz extracelular e uma forma desnaturada de colágeno, apresenta muitas propriedades desejáveis tais como boa biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, adesividade, promoção da adesão celular e crescimento e baixo custo (WANG et al., 2012).

Micropartículas de carbonato de cálcio por sua vez foram avaliadas em osteoblastos (FU et al., 2013). Os autores relataram valores de viabilidade celular reduzidos com o aumento da concentração de cristais de  $\text{CaCO}_3$  sintetizadas pelo método assistido por microondas, o que implica que altas concentrações de cristais de  $\text{CaCO}_3$  induziram o aumento da citotoxicidade nas células (FU et al., 2013). Neste caso o método de síntese influenciou na citotoxicidade das micropartículas. Os mesmos autores avaliaram a citotoxicidade de cristais de  $\text{CaCO}_3$  pelo método de agitação ultrassônica e observaram que as mesmas concentrações testadas apresentaram valores de atividade metabólica superiores a 90%.

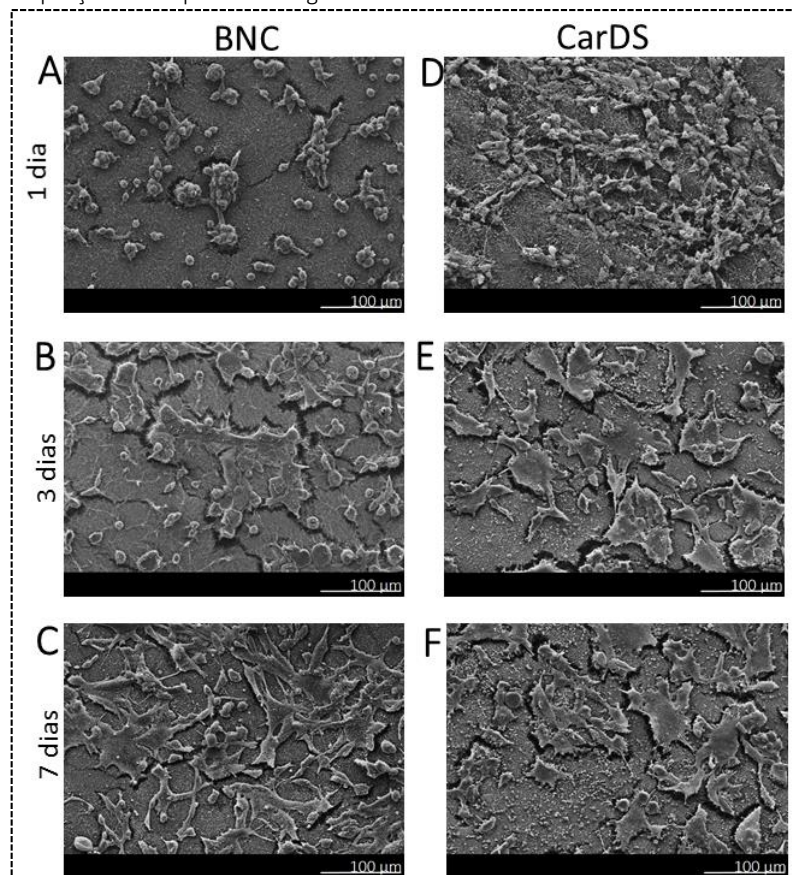
Ma e colaboradores (2013) relacionaram a influência da concentração de micropartículas de carbonato de cálcio quanto a alteração morfológica celular, eles observaram que as concentrações elevadas deste nanocompósito tinha um pequeno efeito sobre a forma da célula (MA et al., 2013).

O próximo item descreve a morfologia das células aderidas ao CarDS, composto de micropartículas híbridas de carbonato de cálcio e  $\lambda$ -carragina (CarDS) em comparação com as células aderidas somente ao controle (BNC).

### 4.3.6.1 *Morfologia celular por MEV*

Os resultados relatados anteriormente para atividade metabólica (Figura 39) das células cultivadas sobre BNC e CarDS podem ser evidenciados pela análise morfológica das células mostradas na Figura 39.

Figura 39 – Morfologia de fibroblastos L929 cultivados sobre BNC e CarDS (A) BNC (1 dia), (B) BNC (3 dias), (C) BNC (7 dias), (D) CarDS (1dia), (E) CarDS (3 dias), (F) CarDS (7 dias). Foram obtidas imagens em três campos distintos de cada ampliação em duplicata biológica.



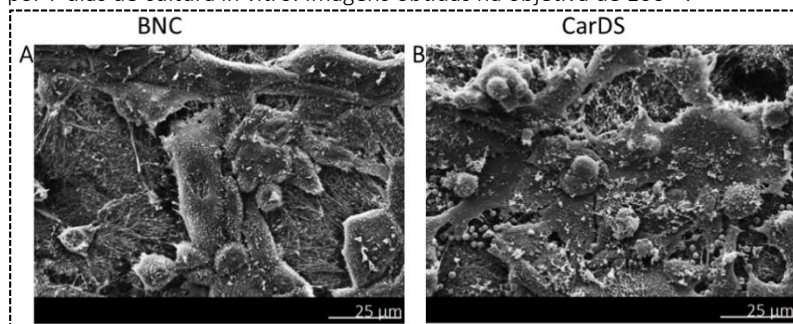
Para ambos os biomateriais (BNC e CarDS) observa-se (Figura 39) um aumento do número de células após 1, 3, e 7 dias de cultivo. No primeiro dia de cultivo é observada a presença de células aderidas em ambos os biomateriais; porém, a maioria das células ainda estava no formato arredondado. No terceiro dia de cultivo, observa-se a morfologia das células espreadas e alguma interação das células com as fibras de BNC; no sétimo dia de cultivo, percebe-se a interação célula-célula e



células completamente espalhadas. Observa-se ainda que as células são capazes de interpretar a informação proveniente da matriz, responder e reorganizar-se em função da topografia do material.

A Figura 40 mostra a morfologia das células cultivadas sobre os biomateriais para o sétimo de cultivo, em uma ampliação de 100x.

Figura 40 – Morfologia de fibroblastos L929 cultivados sobre (A) BNC e (B) CarDS por 7 dias de cultura in vitro. Imagens obtidas na objetiva de 100 x.



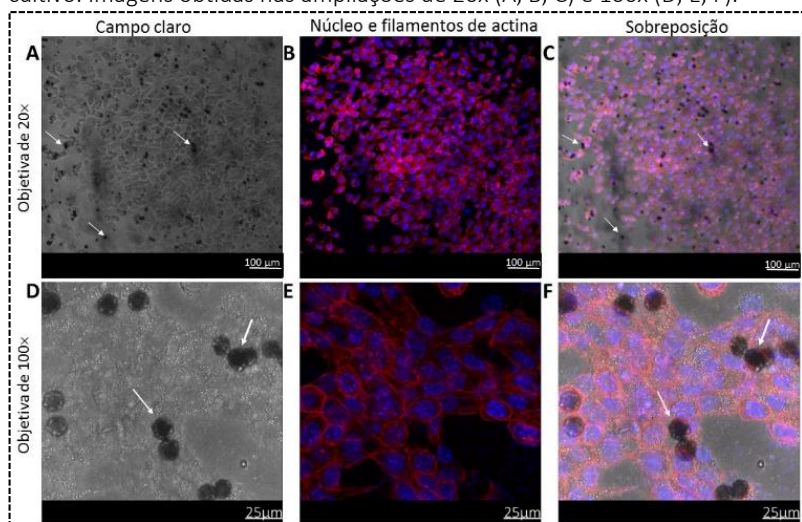
A presença das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  não influenciou na interação célula-célula e célula-biomaterial, evidenciando a distribuição das células entre as micropartículas de carbonato de cálcio como mostrado na Figura 40. Observa-se a presença de células com prolongamentos citoplasmáticos, filopódios e lamelipódios e interação células-biomaterial. Também são observadas interações intercelulares e interação das células com fibras de BNC e micropartículas.

#### 4.3.6.2 *Morfologia celular por MCVL*

A morfologia das células quanto à disposição do núcleo e os filamentos de actina foi avaliada por microscopia confocal de varredura a laser. É possível visualizar as células em contato com o CarDS, caracterizadas por microscopia confocal, nas quais o núcleo celular foi marcado com DAPI e o citoesqueleto (F-actina) com faloidina (Figura 41).

A Figura 41 mostra a morfologia das células cultivadas sobre o CarDS, em duas ampliações. As imagens das Figuras 41A e 41D mostram a morfologia das células cultivadas sobre o CarDS, nas objetivas de 20 e 100x, respectivamente. As setas vermelhas indicam as micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  entre as células.

Figura 41 – Morfologia dos fibroblastos cultivados sobre o CarDS após 7 dias de cultivo. Imagens obtidas nas ampliações de 20x (A, B, C) e 100x (D, E, F).



As imagens das Figuras 41A e 41D mostram a morfologia das células cultivadas sobre o CarDS, nas objetivas de 20 e 100x, respectivamente. As setas indicam as micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  entre as células. As imagens das Figuras 41B e 41E mostram a morfologia do núcleo e filamentos de actina das células cultivadas sobre o CarDS, nas objetivas de 20 e 100x, respectivamente, por microscopia de fluorescência. É possível observar que as células cultivadas sobre o CarDS apresentam o citoesqueleto alongado e organizado, característico da fisiologia dos fibroblastos, e que a presença das micropartículas não influenciou nestas características. As imagens das Figuras 41C e 41F mostram a sobreposição do campo claro com as marcações do núcleo e actina. As setas vermelhas apontam para as micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  entre as células, em ambiente de cultura 3D. As interações célula-célula e célula-biomaterial, no que se refere à organização do citoesqueleto, evidenciam que o CarDS apresenta um microambiente propício para a proliferação e migração celular.

BNC é uma boa matriz para a obtenção de diferentes polimorfismos de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Stoica-Guzun e colaboradores (2012) utilizaram cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e carbonato de

sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) como reagentes de partida para promover a deposição de carbonato de cálcio em membranas de BNC, porém não há relatos da avaliação de ensaios celulares nessas membranas.

A seleção e avaliação de materiais não citotóxicos destinados ao uso em seres humanos requer um programa estruturado de avaliação para estabelecer sua segurança. A Food and Drug Administration (FDA) e a Organização Internacional de Normalização (ISO) exigem testes de segurança adequados para os dispositivos médicos através de fases pré-clínicas e clínicas como parte do processo de autorização regulamentar. Regulamentam ainda uma série de ensaios que devem ser realizados antes mesmo dos ensaios clínicos (KAYE; CROWLEY, 2000; ISO/EN10993-4, 2002). O teste de hemocompatibilidade é um destes ensaios citados pela ISO e tem como objetivo demonstrar o comportamento das células sanguíneas frente ao contato direto com os biomateriais (ISO/EN10993-4, 2002; SEYFERT; BIEHL; SCHENK, 2002).

### 4.3.7 Avaliação da hemocompatibilidade

---

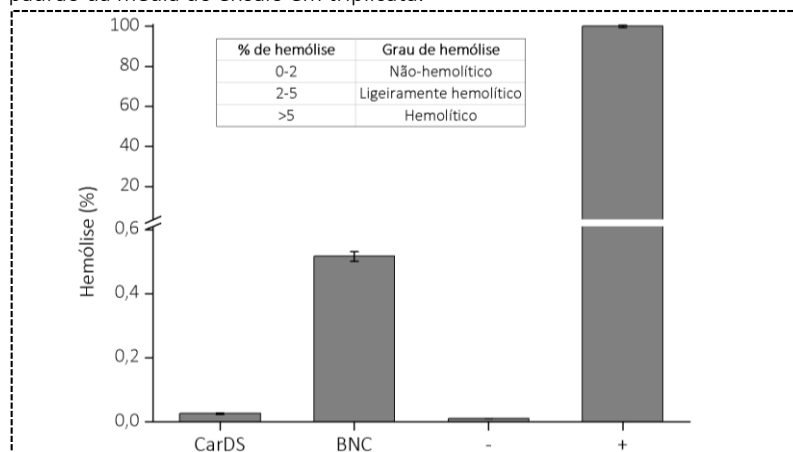
Os ensaios de potencial hemolítico e coagulação dinâmica do sangue foram realizados de acordo com a prática padrão de avaliação da hemocompatibilidade, seguindo os padrões das Propriedades de Materiais da Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM F756-00, 2000). Segundo esta norma, o material é classificado como não-hemolítico (0-2% de hemólise), ligeiramente hemolítico (2-5% de hemólise) e hemolítico (> 5% de hemólise).

#### 4.3.7.1 Potencial hemolítico

O percentual de hemólise é uma medida direta da hemoglobina livre presente no plasma, depois da exposição a um determinado material. Para a determinação da hemólise da BNC e do CarDS, uma solução isotônica (PBS) serviu como controle negativo e água destilada como controle positivo, sendo este um indutor de stress osmótico que rompe as células vermelhas do sangue

A Figura 42 mostra a porcentagem de hemólise induzida pela CarDS, BNC, PBS (-) e água (+) quando em contato direto com sangue.

Figura 42 – Efeito da BNC e do CarDS na hemólise (%). Foram utilizados como controle positivo água e negativo PBS. Os dados representam a média ± erro padrão da média do ensaio em triplicata.



A porcentagem de hemólise para BNC e CarDS foram de  $0,52 \pm 0,014$  e  $0,026 \pm 0,002$ , respectivamente. De acordo com a norma técnica considerada, a BNC e o CarDS foram considerados como não-hemolíticos, permanecendo no intervalo de 0-2 % de hemólise.

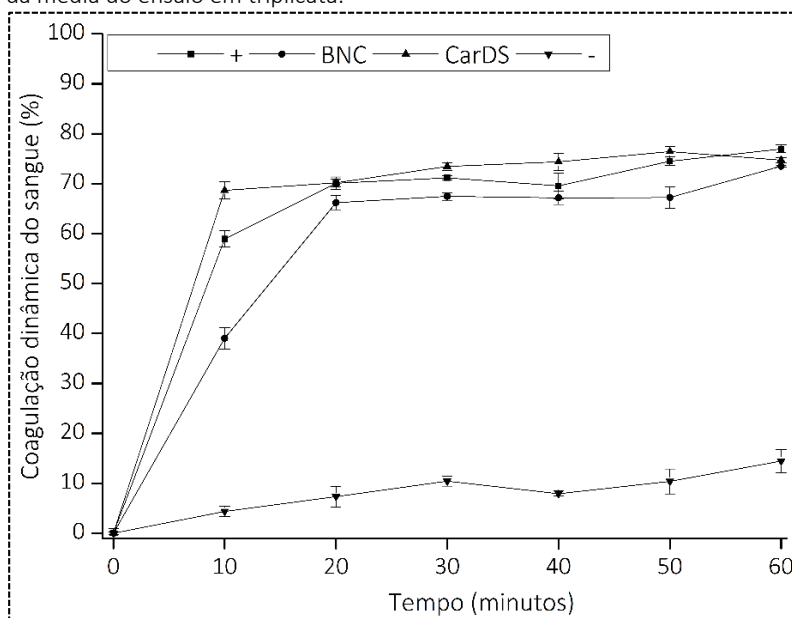
Para ser adequado para a aplicação desejada, o material deve ser hemocompatível, isto é, ele deve ser capaz de se manter em contato com sangue sem induzir toxicidade ou ativar as cascatas de coagulação. Embora por definição um material compatível com o sangue deva ser não-hemolítico, a verdade é que, na prática, vários dispositivos médicos podem causar hemólise. Isto significa que é importante ter a certeza que os benefícios clínicos ultrapassam os riscos e que os valores de hemólise estão dentro dos limites aceitáveis. Para as amostras de BNC e CarDS não foram encontrados valores favoráveis à indução de hemólise.

Outro teste citado pela norma, que relata a influência do biomaterial em contato com o sangue, é o ensaio de coagulação dinâmica do sangue.

4.3.7.2 *Coagulação dinâmica do sangue*

A Figura 43 apresenta o resultado do percentual de coagulação dinâmica do sangue quando em contato com BNC e CarDS, utilizando sangue como controle (100%).

Figura 43 – Efeito da BNC e CarDS na porcentagem de coagulação dinâmica do sangue, calculado em relação ao controle positivo (água) e controle negativo, CarDS sem adição de coagulante. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média do ensaio em triplicata.



Sangue humano foi usado para determinar os tempos de coagulação e fornecer informação sobre a atividade pró-coagulante de cada biomaterial. À medida que ocorre a coagulação, mais glóbulos vermelhos são retidos no coágulo e, por conseguinte, menos hemoglobina é liberada por lise por adição de água destilada. O índice de coagulação dinâmica do sangue não havia sido estudado para este biomaterial. A evolução no tempo da porcentagem de coagulação dinâmica do sangue, apresentada pela Figura 43, demonstra um perfil

clássico, seguindo o mesmo perfil do controle positivo; na presença de BNC e CarDS o sangue coagulou em um tempo dentro da normalidade.

Um achado interessante é que, quando mergulhado o CarDS —o qual possui micropartículas de carbonato de cálcio— no sangue, praticamente não há ativação da cascata de coagulação. O CarDS funciona, aparentemente, como um hemoprotetor de coagulação. Isto sugere que não há liberação dos íons cálcio associados ao carbonato em meio hemostático.

Percebe-se então a importância dos estudos de biomaterias na área biomédica, já que estes proporcionam cada vez mais biocompatibilidade e integração ao meio biológico, conforme se desenvolvem novas tecnologias capazes de mesclar interfaces orgânicas e inorgânicas.

#### **4.4 CONCLUSÕES**

Com base na sequência de experimentos realizados para análise das propriedades físico-químicas e biológicas in vitro do CarDS, pode-se concluir que:

- i. A ampliação da escala da matriz de BNC, mais especificamente do diâmetro, de 5,6 para 86 mm, não influencia na proporção de micropartículas sintetizadas no hidrogel, entre as fibras da BNC, mantendo uma razão de ~9 (mg/mg);
- ii. A presença das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  entre as fibras de BNC tornou a superfície da BNC mais compacta e com menor porosidade, proporcionando uma redução de 87% na área superficial da BNC;
- iii. A presença das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  na BNC ocasionou uma redução na capacidade de absorção de água de 27% e uma redução de 19% na taxa de reidratação;
- iv. A presença das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  aumentou a resistência à deformação em 9% e diminuiu a resistência à tensão aplicada para romper a membrana em 56 %;
- v. O CarDS foi considerado não citotóxicos segundo a norma ISO 10993-5. Noa influenciando na atividade metabólica das células e índice proliferativo.
- vi. A interação célula-CarDS foi confirmada pela adesão e proliferação de fibroblastos, quando cultivados no CarDS ;
- vii. Quando o CarDS entrou em contato direto com o sangue in vitro, observou-se que os índices hemolíticos permaneceram dentro dos valores da normalidade.

Por fim os ensaios selecionados para avaliar as propriedades físico-químicas e biológicos in vitro do CarDS evidenciam as características promissoras do material, em particular a ausência de citotoxicidade e sua hemocompatibilidade, propícias para aplicações biomédicas.







## Avaliação da Citotoxicidade do Sistema de Liberação de Doxorubicina – DoxDS, em Células de Câncer de Mama

O Capítulo 5 apresenta os tópicos: resumo, introdução, materiais e métodos, resultados e discussão e conclusões da etapa de avaliação da toxicidade do sistema de liberação de fármacos, testado com o fármaco modelo doxorubicina, desenvolvido pela síntese de micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  em BNC, contendo doxorubicina, denominado DoxDS, quando em contato com células de câncer de mama.



## 5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE DOXORRUBICINA – DoxDS, EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA

---

### RESUMO

A quimioterapia é um dos tratamentos utilizados como terapia adjuvante, visando a redução do tumor ou a eliminação das células remanescentes e/ou metastáticas. A doxorubicina (Dox) é um dos agentes quimioterápicos mais utilizados nos casos em que a quimioterapia adjuvante é prescrita, porém a Dox causa sérios efeitos colaterais em nível sistêmico quando administrada via intravenosa. A proposta foi determinar a toxicidade da Dox liberada pelo sistema DoxDS em comparação com a Dox em solução (DoxSol), em linhagens celulares de câncer de mama, com o propósito de confirmar a bioequivalência do fármaco quando incorporada ao sistema. O DoxDS serviria como dispositivo in situ, possibilitando o combate das células tumorais remanescentes, após retirada do tumor por procedimento cirúrgico. Neste sentido foram realizados ensaios experimentais para confirmar a eficiência da Dox liberada pelo DoxDS quando comparada à Dox em solução (DoxSol), com base nos parâmetros relacionados à viabilidade, ao ciclo celular, à morte celular e à morfologia celular, de três linhagens de câncer de mama: 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231. Os resultados demonstraram equivalência da citotoxicidade da Dox liberada pelo sistema DoxDS em comparação com DoxSol na diminuição da viabilidade celular, sendo que as linhagens de adenocarcinoma humano (MCF-7 e MDA-MB-231) foram menos sensíveis à Dox do que a linhagem de camundongo (4T1). O tratamento com DoxDS e DoxSol se equivalem quanto a alterações do ciclo celular, sendo que uma maior porcentagens de células de adenocarcinoma humano (MCF-7 e MDA-MB-231) estavam na fase G0-G1, enquanto que para a linhagem de camundongo 4T1 a maior porcentagem de células estava na fase S. Quanto ao mecanismo de morte, alguns tratamentos com DoxDS e DoxSol apresentaram diferença significativa, porém o mecanismo de morte celular ocasionado pela Dox para as linhagens 4T1 e MDA-MB-231 foi relacionado ao processo de apoptose tardia, e para a linhagem MCF-7 foi relacionado ao processo de necrose. Após contato do DoxDS com as células de câncer de mama observa-se as mesmas alterações morfológicas características das células daquelas tratadas com DoxSol. A partir dos resultados provenientes dos ensaios experimentais foi possível concluir que o fármaco incorporado ao sistema não perdeu e/ou diminuiu sua bioequivalência, sendo capaz de realizar a sua função de inibição da progressão do crescimento de células de câncer de mama quando incorporado ao sistema de liberação de fármacos proposto.



## **5.1 INTRODUÇÃO**

Esforços têm sido relatados para o encapsulamento de fármacos visando minimizar os efeitos colaterais e o direcionamento destes para células tumorais (DHANKHAR et al., 2010; ICHIKAWA et al., 2014). Estes esforços estão voltados para o uso de tecnologias inovadoras como os sistemas de liberação de fármacos (DDS), que têm como intuito potencializar a entrega do fármaco às células tumorais (PATRA et al., 2015; SATSANGI et al., 2015) e diminuir os efeitos colaterais em nível sistêmico.

Nos capítulos anteriores foi relatado o desenvolvimento de um DDS denominado CarDS, composto de matriz de nanocelulose bacteriana contendo micropartículas híbridas de carbonato de cálcio e  $\lambda$ -carragenina com potencial para tratamentos adjuvantes específicos, auxiliando como quimioterapia adjuvante local, para minimizar a recidiva do câncer de mama. Foi relatado ainda que a viabilidade terapêutica do CarDS está relacionada à sua capacidade para reter grandes quantidades de Dox e assim manter um perfil de liberação adequado ao longo do tempo. Outro fator importante está relacionado às características de citocompatibilidade e hemocompatibilidade, que se enquadram dentro dos padrões exigidos pelas respectivas normas (Capítulos 3 e 4).

O CarDS para aplicação local deve ser capaz de liberar quantidades significativas de fármaco, apresentando uma atividade anti-neoplásica equivalente ao fármaco administrado via intravenosa (LINCE et al., 2011; GAUTIER et al., 2012), com a vantagem de que, quando o fármaco está encapsulado, pode potencializar sua ação local, minimizando os efeitos colaterais do fármaco em nível sistêmico (SON et al., 2003; WONG et al., 2007).

Neste sentido, Gillies e colaboradores (2005) avaliaram a toxicidade in vitro de micelas contendo Dox em comparação com Dox em solução. A Dox encapsulada em micelas mostrou toxicidade bastante semelhante à do fármaco livre (GILLIES; FRÉCHET, 2005). Zhao e colaboradores (2007) relatam a incorporação de Dox em microcápsulas multicamadas formadas por quitosana/alginato/CMC/CaCO<sub>3</sub> e a sua aplicação no tratamento do tumor através de cultura de células tumorais in vitro e in vivo. Os ensaios in vitro mostraram uma melhor eficácia da

Dox encapsulada em comparação com o fármaco livre em termos de inibição do tumor nas quatro semanas deste *in vivo*. Bosio e colaboradores (2014) avaliaram a citotoxicidade de Dox liberada por micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3$ /carragenina/ácido fólico em células de osteosarcoma humano MG-63, obtendo uma redução na viabilidade celular de 86% após 24 horas de cultura. O'Brien e colaboradores (2004) avaliaram a Dox e a Dox-lipossomal em 509 pacientes com câncer de mama metastático e observaram cardiotoxicidade reduzida de Dox lipossomal (O'BRIEN et al., 2004).

Neste estudo, procurou-se avaliar a bioequivalência da Dox liberada pelo DoxDS (composto de BNC/ $\text{CaCO}_3$ / $\lambda$ -Car/Dox) em comparação com Dox em Solução (DoxSol) em três linhagens de câncer de mama.

A maioria dos agentes quimioterápicos contra o câncer, incluindo a doxorubicina, pode interagir com o DNA e, por conseguinte, pode ocasionar alterações no ciclo celular, conduzir à apoptose ou mitose (CHRISTIANSEN; AUTSCHBACH, 2006; SVENSON, 2009), as quais são diferenciadas pela morfologia e vias bioquímicas celulares específicas (OKADA; MAK, 2004). A exposição da fosfatidilserina (PS) é um dos primeiros eventos que ocorrem na superfície de uma célula em processo de apoptose. A apoptose é caracterizada por mudanças morfológicas incluindo contração celular, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e formação de corpos apoptóticos (FUCHS; STELLER, 2011). Zhao e colaboradores (2007) relatam que a Dox incorporada em microcápsulas de quitosana/alginato/CMC/ $\text{CaCO}_3$  pode efetivamente induzir à apoptose de células tumorais de HepG2 (ZHAO et al., 2007). Kamba e colaboradores (2014) avaliaram o efeito da Dox em solução em comparação com Dox incorporada em nanocristais de  $\text{CaCO}_3$ , em células de câncer de mama MCF-7, e observaram alta toxicidade da Dox incorporada nos nanocristais de  $\text{CaCO}_3$ , e efetiva morte das células em comparação com a Dox em solução. Estes mesmos autores relataram ainda alterações morfológicas, tais como formação de corpos apoptóticos, formação de bolhas na membrana, ausência de microvilosidades, condensação da cromatina, fragmentação do DNA cromossômico, encolhimento celular, e fragmentação nuclear,

concluindo que as células sofrem apoptose por fragmentação internucleossomal do DNA genômico (KAMBA et al., 2014).

A partir dos relatos mencionados anteriormente surgem alguns questionamentos sobre os efeitos ocasionados pela Dox liberada pelo DoxDS:

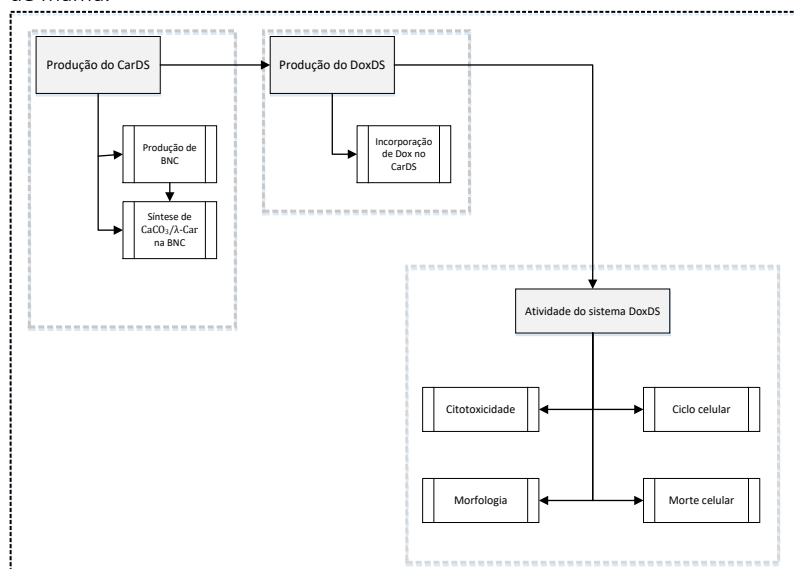
- i. Como a Dox liberada pelo sistema influencia na redução da atividade metabólica das células de câncer de mama quando comparada com DoxSol?
- ii. As alterações ocasionadas pela Dox em solução no ciclo celular são equivalentes quando comparadas com as alterações da Dox liberada pelo DoxDS?
- iii. As características morfológicas das células tratadas com DoxSol são diferentes das tratadas com DoxDS?
- iv. Há algum outro fenômeno envolvido na morte das células de câncer de mama após tratamento com DoxDS em comparação com DoxSol?

Embasado nesses questionamentos, este trabalho objetiva avaliar a bioequivalência da Dox liberada pelo sistema DoxDS, desenvolvido pela síntese de micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  em matriz de nanocelulose bacteriana incorporado com Dox, quando comparado com Dox em solução (DoxSol) na atividade metabólica, morfologia, ciclo celular e morte celular de diferentes linhagens celulares de câncer de mama.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 44 apresenta um fluxograma descritivo contendo as etapas relacionadas ao desenvolvimento do DoxDS e a avaliação da toxicidade da Dox liberada pelo CarDS (DoxDS) e a Dox em solução (DoxSol) em linhagens celulares de câncer de mama.

Figura 44 – Fluxograma descritivo das etapas relacionadas ao desenvolvimento e à toxicidade do sistema DoxDS em diferentes linhagens de células de câncer de mama.



As etapas de produção do CarDS, incorporação e liberação do fármaco, assim como os ensaios *in vitro* com células cancerígenas foram realizados no Laboratório de Tecnologias Integradas. IntelLab/UFSC (Florianópolis). A quantificação da Dox e a análise dos resultados relacionadas aos ensaios de ciclo celular e de apoptose foram realizadas no Laboratório Multiusuário em Estudos Biológicos (LAMEB); as análises de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), ambos também da UFSC.



### 5.2.1 Produção do DoxDS

---

#### 5.2.1.1 Produção do CarDS

O sistema de liberação de fármacos (CarDS) foi produzido como descrito no item 4.2.1. Onde resumidamente as matrizes de BNC no diâmetro de 6,4 mm foram submetidas em condições estéreis ao processo de síntese das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$ .

#### 5.2.1.2 Incorporação da Dox

A incorporação da Dox ao CarDS foi realizada pela imersão destas em solução de Dox MES-NaOH/HCl concentrações de 31,25; 62,5; 125  $\mu\text{M}$ , em tubos plásticos de 2 mL, agitados a 80 RPM, por 20 h, a 25 °C. Após 20 h, o sistema contendo Dox (DoxDS) foi retirado da solução e lavado em uma solução de NaCl 0,9 % para retirar o excesso de fármaco. A Dox residual e da solução de lavagem foram quantificadas por espectrofluorimetria (Molecular Devices, EUA) como descrito no item 4.2.1.

#### 5.2.1.3 Morfologia do DoxDS

A distribuição da Dox nas micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  presentes no CarDS foi analisada por microscopia eletrônica de varredura a (MEV) e microscopia confocal (MCVL). Para a análise de MEV as amostras de CarDS liofilizadas foram recobertas com ouro (Leica EM SCD 500, EUS) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Rochester Philips 505, EUA). Para a análise de MCVL as amostras ainda hidratadas foram examinadas por (MCVL) (Leica TCS SP5, Alemanha) utilizando ampliação de 63x (HCX PL APO CS 1,40 OIL UV). Software *Leica Application Suite* (LAS AF) foi utilizado para controlar a fluorescência do microscópio e posterior análise das imagens.

### 5.2.2 Avaliação da citotoxicidade da Dox em linhagens celulares

---

A influência da Dox liberada pelo sistema DoxDS em comparação com a Dox em solução (DoxSol), nas linhagens celulares de câncer de mama (4T1, MCF-7 e MDA-MB-231) foi avaliada quanto a atividade metabólica, morfologia, ciclo celular e morte celular.

### 5.2.2.1 *Linhagens celulares*

As linhagens celulares foram mantidas em nitrogênio líquido, posteriormente descongeladas e cultivadas em seu respectivo meio de cultura em atmosfera úmida, a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, em placa de cultura (TPP, Suíça) para a propagação celular. As linhagens 4T1 e MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco®, EUA) e a linhagem MDA-MB-231 foi cultivada em meio DMEM (Gibco®, EUA). Os meios foram preparados conforme descrição do fabricante e suplementados com 10% de soro fetal bovino (SBF) (Gibco®, EUA) e 1% de penicilina/ estreptomicina (Gibco®, EUA). Após atingir a confluência de 80%, as células foram lavadas três vezes com uma solução de PBS (Gibco®, EUA). Logo após, foi adicionado uma solução de tripsina EDTA (Gibco®, EUA). A placa de cultura contendo as células foi transferida para a estufa (Ultrasafe HF 212UV, Brasil) durante cinco minutos para a ativação da tripsina e descolamento das células aderidas na placa de cultura de células. Em cabine de segurança biológica, a tripsina e as células foram transferidas para tubos de plástico de polipropileno de 2 mL e centrifugadas por dois minutos a 24 °C e 5000 RPM. A solução sobrenadante (tripsina) foi removida e o pellet (as células) foi homogeneizado em meio de cultura. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer (SP Labor, Brasil) e redistribuídas conforme ensaio experimental.

### 5.2.2.2 *Atividade metabólica*

As linhagens celulares de câncer de mama foram plaqueadas na densidade de  $3,0 \times 10^4$  células/poço em placa de 24 poços. Após 24 horas, as células foram incubadas na presença de DoxDS e DoxSol. Para avaliar a concentração citotóxica da Dox incorporada ao DoxDS e DoxSol, um estudo prévio foi realizado na concentração de 5 µM pelos tempos de 24, 48 e 72 horas. Após determinar a concentração para eliminar 50% das células cultivadas em placa, avaliou-se a quimiosensibilidade das células à DoxDS e DoxSol nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5 µM pelos tempos de 8, 16 e 24 horas. Após cada tempo experimental, as amostras e o meio de cultura foram removidos, as células foram lavadas com PBS e, na sequência, as células foram tratadas com 300 µL de meio e 60 µL de solução de MTS. Depois de um tempo de reação de 2 horas, em atmosfera úmida, a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, a absorbância da solução foi

medida a 490 nm utilizando espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA). Foram utilizados como controle para DoxDS células tratadas com CarDS sem fármaco, e para DoxSol, células tratadas somente com meio de cultura contendo o veículo de dissolução da Dox (MES + HCl).

### 5.2.2.3 Morfologia celular

A influência da DoxDS e DoxSol na morfologia das células 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231, cultivadas em placa, foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As células foram plaqueadas na densidade de  $3 \times 10^4$  células/poço em *cover slip* (lâminas tratadas para cultura de células) armazenadas em placa de 24 poços. Após 24 horas, as células foram incubadas com DoxDS e DoxSol nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  pelos tempos de 8, 16 e 24 horas. Logo após, DoxDS e o meio de cultura foram retirados e as células foram lavadas com PBS e, na sequência, as lâminas contendo as células foram lavadas com PBS, fixadas com glutaraldeído 2,5%, durante a noite, e lavadas 3x com cacodilato de sódio 0,1 M por 20 min. Posteriormente, as amostras foram desidratadas com álcool em doses crescentes (10 a 100%) e, em seguida, com HMDS (hexametildissilazano), e repousadas sobre papel absorvente para evaporação do solvente. As amostras foram distribuídas sobre fitas de carbono aderidas aos *stubs* e então recobertas com uma dupla camada de ouro. Após o recobrimento, as amostras foram escaneadas por microscópio eletrônico (JEOL JSM-6390LV, EUA), com fonte de elétrons de tungstênio, detector de elétrons secundários e na tensão de 10 kV, localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC). As amostras foram analisadas em duplicata, com aquisição de imagens em três regiões distintas nas ampliações de 50, 300, 1000 e 3000x.

### 5.2.2.4 Ciclo celular

A influência da DoxDS e da DoxSol nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  na distribuição do ciclo celular das linhagens 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231 foi avaliada por citometria de fluxo. Após tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (7 min e 1800 RPM), lavadas com PBS, centrifugadas novamente (7 min e 1800 RPM), ressuspensas em 150  $\mu\text{L}$  de PBS e fixadas com EtOH 70%, por 1 hora. As células foram

armazenadas a 4 °C até o momento da análise. Antes da análise as células foram centrifugadas (5 min e 1800 RPM), ressuspensas em 200 µL de PSSI (1,4 µL de Triton X-100 1%, 20 µL de RNase, 60 µL de iodeto de propideo (IP) em 10 mL de PBS). Após 30 min de incubação a 37 °C sob proteção da luz, as células foram analisadas por citometria de fluxo (FACSVanta-GETM, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, EUA). Para cada amostra, 10.000 eventos foram adquiridos. A distribuição do ciclo celular foi calculada, utilizando Flowing software versão 2.5.1, e comparada com a da amostra controle sem tratamento.

#### 5.2.2.5 *Apoptose/Necrose*

A influência da DoxDS e da DoxSol (1,25, 2,5 e 5 µM) na morte celular por apoptose/necrose das células 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231, cultivadas em placa, foi avaliada por citometria de fluxo. Para o ensaio foi utilizado o kit de detecção de dupla marcação com Anexina V-FITC e iodeto de propídio (Sigma-Aldrich, EUA). As células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas com 500 µL de tampão de ligação, 5 µL de anexina V conjugada com FITC, e 5 µL de iodeto de propídio (10 µg/mL). A reação foi incubada por 5 minutos, à temperatura ambiente, sob abrigo da luz. A intensidade de fluorescência (FITC e iodeto de propídio) foi avaliada utilizando o equipamento FACSCanto (Becton Dickinson, EUA), em comprimento de onda de excitação de 488 nm (para o PI) e 530 nm (para FITC). Para cada ensaio foram incluídos CPA+: controle positivo apoptose (15 µg/mL de Camptothecin), CNA-: controle negativo apoptose (células sem tratamento), CPN+: controle positivo necrose (congelamento a -20 °C por 15 min), CPN-: controle negativo necrose (células não tratadas). Um total de 10.000 eventos foi coletado para cada amostra e analisado com auxílio do programa Flowing software versão 2.5.1 1.

#### 5.2.3 **Análise estatística**

---

Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando-se o *software* estatístico *Origin* versão 8.5. Os resultados experimentais foram expressos como a média ± erro padrão e comparados por análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste Tukey considerando-os estatisticamente diferentes para  $p \leq 0,05$ .

### **5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nos capítulos anteriores foi relatado o desenvolvimento do sistema de liberação de fármacos CarDS, sendo este capaz de reter diferentes concentrações de Dox, e de estabelecer um perfil de liberação conhecido. Foi relatado ainda, em um segundo momento, ensaios que comprovam as características promissoras deste sistema quanto à capacidade de hidratação, propriedades mecânicas, citotoxicidade, interação célula-DDS e hemocompatibilidade. Neste capítulo, avaliou-se a bioequivalência da Dox liberada pelo sistema (DoxDS) em comparação com o fármaco em solução (DoxSol) quanto à sua capacidade de eliminar células de câncer de mama. Para tanto, foram avaliados a atividade metabólica, o ciclo celular, a morfologia e mecanismos de morte celular das células tumorais sob ação do DoxDS.

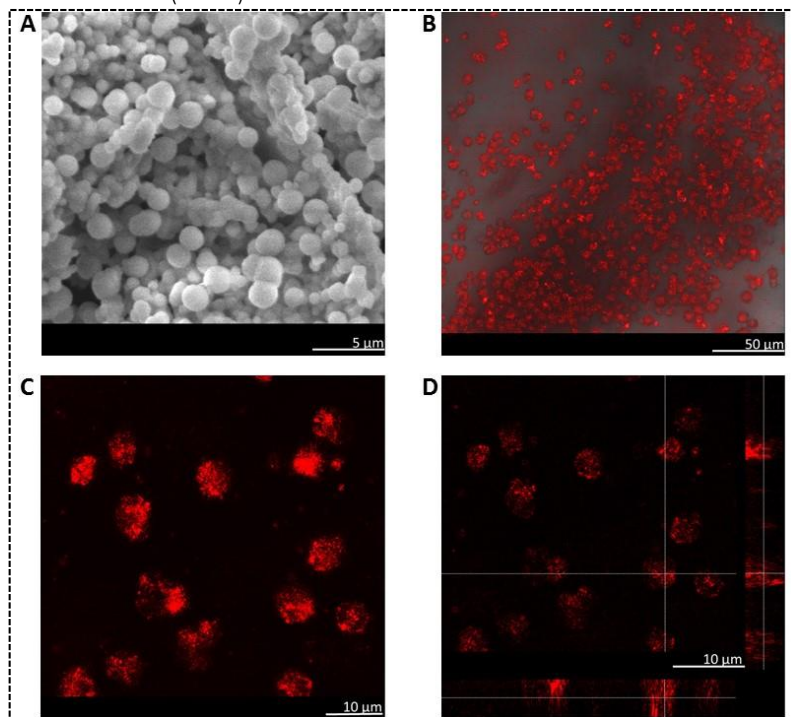
#### **5.3.1 Avaliação da citotoxicidade da Dox e DoxDS nas linhagens de células tumorais**

---

Em virtude da Dox ser um agente quimioterápico com citotoxicidade conhecida, foi realizada uma busca na literatura da concentração da Dox necessária para eliminar 50% das células cultivadas em placa ( $IC_{50}$ ). Diferentes valores foram encontrados para as diferentes linhagens celulares relatadas neste trabalho (De 0,1 a 28  $\mu M$ ) (LIU; TONG; YANG, 2005; SMITH, 2006; LIU et al., 2007; PICHOT et al., 2009; YOU et al., 2012; ABUHAMMAD; ZIHLIF, 2013; DUNNE et al., 2014; SARISOZEN; ABOUZEID; TORCHILIN, 2014; ZHONG et al., 2016). Esses valores variam muito, principalmente devido às condições de cultura, meios de cultura, passagem celular e número inicial de células. Neste sentido, levando em consideração os valores de  $IC_{50}$  relatados pelos autores, optou-se por realizar uma avaliação prévia, com concentração de 5  $\mu M$  de Dox incorporada ao sistema DoxDS, e comparar com o efeito da DoxSol em células tumorais.

A Figura 45 mostra a distribuição da autofluorescência da Dox incorporada no DoxDS.

Figura 45 – Caracterização morfológica do sistema DoxDS. A) Micrografia das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  (MEV) e imagens (B, C e D) de microscopia confocal a laser (MCVL) do DoxDS.



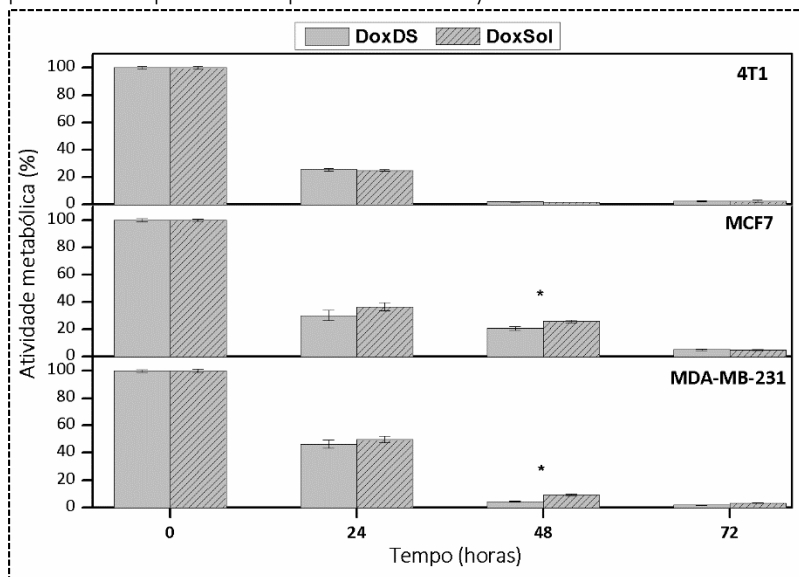
A Figura 45A mostra a morfologia das micropartículas  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  sem Dox. As imagens obtidas por microscopia confocal mostram uma distribuição uniforme destas micropartículas entre as fibras de BNC (Figura 45B). As ampliações apresentadas nas Figuras 45C e 45D mostram os detalhes da distribuição da autofluorescência da Dox ( $5\ \mu\text{M}$ ) nas micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda\text{-Car}$  na matriz de BNC. Na Figura 45D pode-se observar a distribuição da Dox tridimensional nas micropartículas.

Zhao e colaboradores (2007) relataram uma distribuição homogênea da Dox dentro das microcápsulas de quitosana/alginate/CMC/ $\text{CaCO}_3$  observada pela forte emissão fluorescente ao longo das microcápsulas, por MCVL. Neste trabalho também foi registrado uma distribuição uniforme, tanto das micropartículas na matriz de BNC (Figura

45B), quanto observando a autofluorescência da Dox nas micropartículas (Figura 45D).

A Figura 46 mostra o efeito citotóxico da Dox (5  $\mu$ M) liberada pelo sistema DoxDS em comparação à Dox em solução (DoxSol) nas linhagens celulares de câncer de mama. Foi avaliado o efeito da Dox na redução da atividade metabólica das células 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231, após os tempos de cultura 24, 48 e 72 horas.

Figura 46 – Atividade metabólica das linhagens celulares de câncer de mama 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231, após tratamento com o sistema DoxDS e com DoxSol (5  $\mu$ M) por 24, 48 e 72 horas de cultivo. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de três ensaios independentes realizados em triplicata. O símbolo \* representa diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação à DoxSol para cada tempo analisado pelo teste de Takey.



Após 24 horas de contato das células com DoxDS e DoxSol (Figura 46), foi observada uma redução estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ), de mais de 50% na atividade metabólica, para as 3 linhagens celulares (4T1, MCF-7 e MDA-MB-231) quando comparada com controle. Porém, não foram observadas diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) na redução da atividade metabólica em nenhuma das três linhagens de câncer de mama

(4T1, MCF-7 e MDA-MB-231) cultivadas em placa, em relação ao tratamento com DoxDS ou DoxSol. A linhagem 4T1 apresentou uma redução da atividade metabólica de 75,51% ( $\pm 1,01$ ) e 75,07% ( $\pm 0,62$ ) quando em contato com a Dox liberada pelo sistema DoxDS e DoxSol, respectivamente. A linhagem MCF-7 apresentou uma redução na atividade metabólica de 69,75% ( $\pm 3,77$ ) e 63,36% ( $\pm 3,08$ ) para as células tratadas com DoxDS e DoxSol, respectivamente. E a linhagem MDA-MB-231 apresentou valores de redução na atividade metabólica de 53,62% ( $\pm 2,93$ ) e 50,22% ( $\pm 2,27$ ), respectivamente.

Após 48h de contato das células com a Dox liberada por DoxDS e DoxSol (Figura 46), observa-se uma diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos (DoxDS e DoxSol) para as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, sendo que DoxDS foi mais citotóxico às células do que DoxSol. Isso pode ser explicado pela liberação contínua de Dox pelo sistema DoxDS, pois o sistema DoxDS segue liberando Dox ao longo do tempo, enquanto que as células tratadas com DoxSol receberam somente uma dose de Dox (5  $\mu\text{M}$ ). Este efeito não foi observado para a linhagem 4T1, muito provavelmente devido à redução de 98% das células já em 24 horas. Observa-se ainda que a linhagem MCF-7 foi menos sensível à Dox ao longo do tempo de cultivo. Zhong e colaboradores (2016) observaram que doxorubicina a 2  $\mu\text{M}$  foi mais efetiva na redução da atividade metabólica das linhagens ER- (4T1 e MDA-MB-231) do que para a linhagem ER+ (MCF-7).

A partir deste ensaio foi possível demonstrar que a concentração de 5  $\mu\text{M}$  ocasionou uma redução de 50% da atividade metabólica em 24 horas para as três linhagens estudadas. Tendo em vista esses resultados, os próximos procedimentos experimentais foram realizados para tempos e concentrações inferiores a 24 horas e 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

A Tabela 8 mostra a concentração e porcentagem de Dox incorporada ao CarDS e a concentração e porcentagem da Dox liberada após 24 h, em meio de cultura, em pH 7,4, para os ensaios de citotoxicidade nas células tumorais.



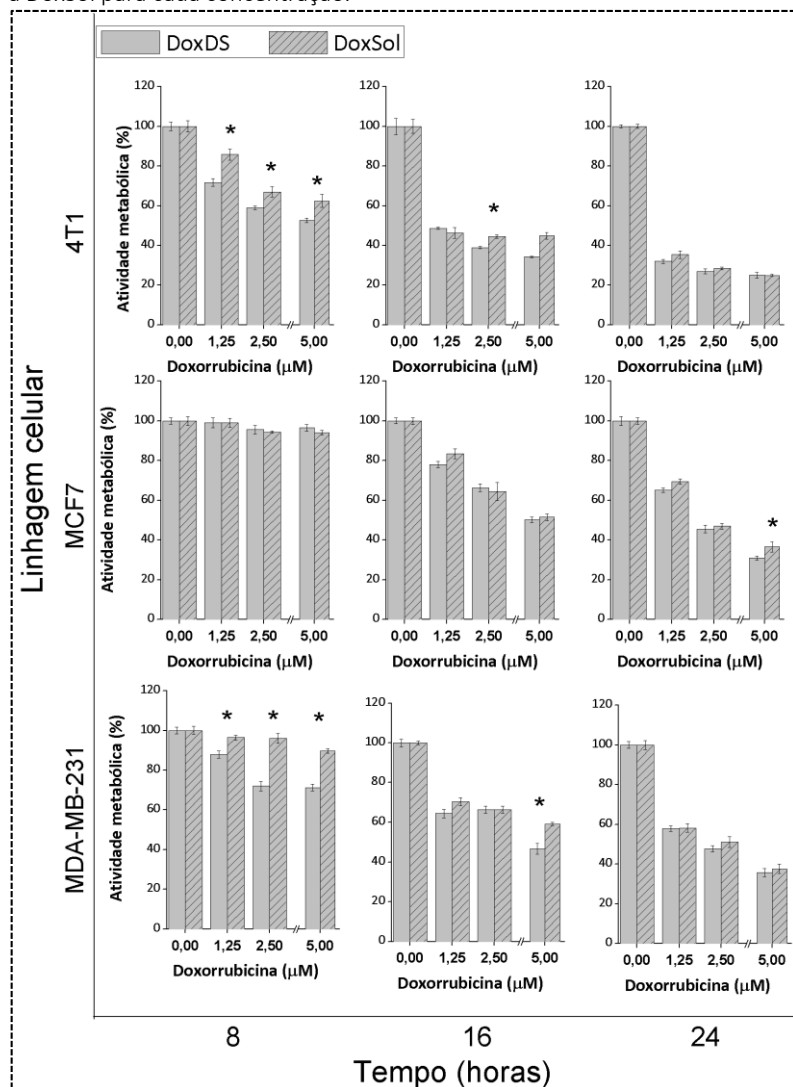
Tabela 8 – Valores de doxorubicina teórica (calculada, em solução), incorporada após 20h, e medidas após liberação por 24 h.

<b>Teórica</b>	<b>Dox em Solução, <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Dox incorporada, <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Dox incorporada (%)</b>	<b>Dox liberada, <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Dox Liberada %</b>
125,0	126,3 $\pm$ 5,1	101,4 $\pm$ 6,0	80,3 $\pm$ 4,7	5,5 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,2
62,5	63,4 $\pm$ 2,6	50,7 $\pm$ 3,2	80,0 $\pm$ 5,2	2,7 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,2
31,25	30,9 $\pm$ 2,7	24,7 $\pm$ 1,3	80,1 $\pm$ 4,4	1,4 $\pm$ 0,1	5,7 $\pm$ 0,4

O CarDS foi exposto a concentrações de 31,3, 62,5, 125,0  $\mu\text{M}$ , e após tempo de incorporação de 20 horas observam-se valores de incorporação de 80,0  $\pm$  4,7%, 80,0  $\pm$  5,2%, 80,1  $\pm$  4,4%, não apresentando diferença significativa no percentual de incorporação da Dox para as três concentrações avaliadas, resultando em uma concentração média de 80%. Apesar de observarmos (Figura 25, Capítulo 3) que a porcentagem de liberação aumenta inversamente com a concentração da Dox incorporada, relatamos aqui que essa relação não se mantém. Valores entre 5,4% e 5,7% de liberação foram encontrados para as três concentrações testadas (Tabela 8).

Posteriormente a essa análise realizou-se ensaios de bioequivalência da Dox liberada pelo sistema DoxDs e Dox em solução (DoxSol) na atividade metabólica das células tumorais por 8, 16 e 24 horas. A Figura 47 mostra o efeito da Dox (1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ) liberada pelo sistema DoxDS e Dox em solução (DoxSol) na atividade metabólica das células de câncer de mama 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231 para 8, 16, 24 horas.

Figura 47 – Efeito da Dox (1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ) liberada pelo sistema DoxDS e DoxSol na atividade metabólica das células de câncer de mama (4T1, MCF-7 e MDA-MB-231) para 8, 16 e 24 horas. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média do ensaio em duplicata. \* = Diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação à DoxSol para cada concentração.



Após 8 horas de contato das células com a Dox liberada pelo sistema DoxDS, houve uma redução da atividade metabólica nas células quando comparada com DoxSol, com diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) para as linhagens 4T1 e MDA-MB-231 tratadas com as 3 concentrações de Dox (Figura 47). O efeito das concentrações de Dox (1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ) na atividade metabólica da linhagem de câncer de mama 4T1 foi apresentado na Figura 47, apresentando os valores de  $71,73 \pm 1,85\%$ ;  $58,96 \pm 0,90\%$ ,  $52,64 \pm 1,15\%$  e  $85,81 \pm 2,93\%$ ,  $67,01 \pm 2,61\%$ ; e  $62,46 \pm 3,22\%$  após tratamento com Dox liberada pelo sistema DoxDS e DoxSol, respectivamente. O efeito das concentrações de Dox (1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ) na atividade metabólica da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 foi reportado na Figura 47, apresentando os valores de  $87,84 \pm 1,83\%$ ,  $71,95 \pm 2,36\%$ ,  $71,19 \pm 1,71\%$  e  $96,34 \pm 1,32\%$ ,  $96,03 \pm 2,45\%$ , e  $89,71 \pm 1,17\%$ ) após tratamento com Dox liberada pelo sistema DoxDS e DoxSol, respectivamente. Já para a linhagem de câncer de mama MCF-7 o efeito da Dox liberada pelo sistema DoxDS e DoxSol, além de apresentar um efeito citotóxico menor, não apresentou diferença significativa no tipo de tratamento realizado.

Ao final de 24 horas as linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 isoladas de um adenocarcinoma humano se apresentaram mais resistentes ao fármaco em estudo do que a linhagem de camundongo 4T1. As células de câncer da mama ER<sup>-</sup> (Receptor de estrogênio negativo) e altamente metastáticas também são sensíveis à doxorubicina (Bar-On et al., 2007), por isso a maioria dos ensaios que avaliam a diminuição do tumor por agentes quimioterápicos é realizada em modelos tumorais in vivo com a linhagem 4T1 (ER<sup>-</sup>).

Neste trabalho percebemos que a toxicidade da Dox foi mais efetiva para a linhagem 4T1 (camundongo), apresentando uma redução mais efetiva na atividade metabólica de 63, 73 e 75 % para as concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente, após 24 h de exposição da Dox, quando comparada com as linhagens tumorais de adenocarcinomas humanos (MCF-7 e MDA-MB-231). Após 24 horas de contato com Dox, a linhagem MCF-7 apresentou valores de redução da atividade metabólica de 33, 44 e 66% para as concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A linhagem MDA-MB-231 apresentou uma redução da atividade metabólica de 43, 51 e 63%.

Entre as linhagens avaliadas, as linhagens de adenocarcinomas humanos (MCF-7 e MDA-MB-231) foram menos sensíveis à Dox do que a linhagem de camundongo (4T1). Em relação à citotoxicidade da Dox pelos diferentes tratamentos, observamos diferença significativa do tratamento com DoxDS em relação à DoxSol em um tempo inicial de 8 horas, porém esta diferença diminuiu ao longo do tempo de cultivo.

### **5.3.2 Avaliação do ciclo celular de células de câncer de mama após tratamento com DoxDS**

---

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram em diferentes fases de divisão celular (ABUHAMMAD; ZIHLIF, 2013). Durante o processo de divisão celular, perturbações na organização do citoesqueleto geralmente provocam alterações na progressão do ciclo celular (RIEDER; MAIATO, 2004). Neste sentido o efeito do tratamento com Dox sobre os parâmetros do ciclo celular em linhagens celulares de câncer de mama (4T1, MCF-7 e MDA-MB-231) foi investigado, comparando-se a influência da Dox liberada pelo DoxDS com a Dox em solução (DoxSol) em três diferentes concentrações (1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ) nos tempos de 8, 16 e 24 horas.

Não foram observadas diferenças significativas para os tratamentos DoxDS e DoxSol para os tempos de 8 e 16 horas, assim como para as concentrações de 1,25 e 2,5  $\mu\text{M}$ , para as diferentes linhagens estudadas, ou não foram encontradas diferenças entre o tratamento e o controle.

Os resultados apresentados nas Figuras 48, 49 e 50 são para os tratamentos das células após 24 h na concentração de 5  $\mu\text{M}$ . Essas figuras mostram o efeito da Dox na ciclo celular das linhagens celulares de câncer de mama 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231 quando expostas ao tratamento com DoxDS e DoxSol na concentração de 5  $\mu\text{M}$  por 24 horas.

Figura 48 – Efeito da Dox no ciclo celular da célula de tumor de mama da linhagem 4T1 exposta ao tratamento com DoxDS e DoxSol (5  $\mu$ M) pelo período de 24 h. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média do ensaio em duplicata.

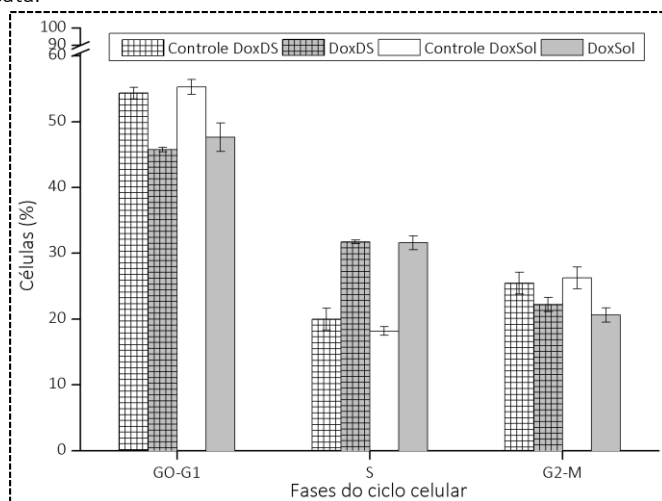


Figura 49 – Efeito da Dox no ciclo celular da célula de tumor de mama da linhagem MCF-7 exposta ao tratamento com DoxDS e DoxSol (5  $\mu$ M) pelo período de 24 h. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média do ensaio em duplicata.

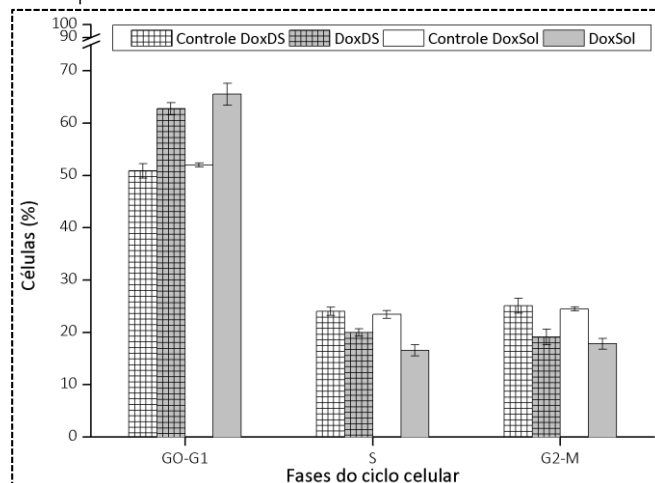
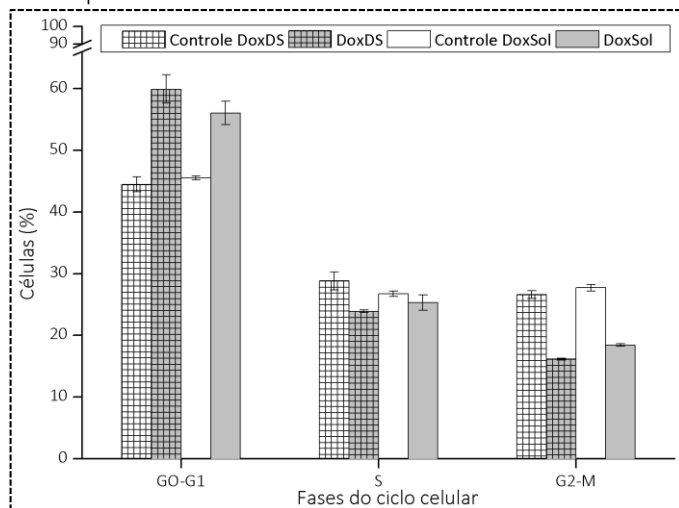


Figura 50 – Efeito da Dox no ciclo celular da célula de tumor de mama da linhagem MDA-MB-231 exposta ao tratamento com DoxDS e DoxSol (5  $\mu$ M) pelo período de 24 h. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média do ensaio em duplicata.



Não foram observadas diferenças entre os tratamentos com DoxDS e DoxSol para as três linhagens estudadas. Em ambos os tratamentos a Dox causou uma alteração no ciclo celular, sendo esta diferente para cada linhagem.

Para a linhagem 4T1 (Figura 48), o tratamento das células com Dox foi relacionado a um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) das células na fase S, onde foram obtidos os valores de  $19,98 \pm 1,65\%$ ,  $18,18 \pm 0,65\%$  para as células sem tratamento e de  $31,74 \pm 0,26\%$ ,  $31,61 \pm 1,06\%$  para as células tratadas com 5  $\mu$ M de DoxDS e DoxSol, respectivamente, e a consequente diminuição nas outras fases do ciclo.

Para a linhagem MCF-7 (Figura 49), o tratamento com Dox ocasionou um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) das células na fase G0-G1, apresentando os valores de  $50,89 \pm 1,37\%$ ,  $51,99 \pm 0,37\%$  para as células sem tratamento, e de  $61,74 \pm 1,17\%$ ,  $68,52 \pm 1,08\%$  para as células tratadas com 5  $\mu$ M de DoxDS e DoxSol, respectivamente.

Para a linhagem MDA-MB-231 (Figura 50), o tratamento com Dox ocasionou um aumento das células na fase G0-G1, onde foram obtidos os

valores de  $44,48 \pm 1,21$ ,  $45,52 \pm 0,31\%$  para as células sem tratamento e de  $59,92 \pm 2,30\%$ ,  $56,05 \pm 1,90\%$  para as células tratadas com  $5 \mu\text{M}$  de DoxDS e DoxSol, respectivamente.

A resposta das células tumorais ao tratamento com fármacos pode ser definida por um vasto número de mecanismos moleculares operando em diferentes estágios, desde a penetração das substâncias dentro das células até a morte celular ou o encerramento de algum estágio do ciclo celular (ELMORE, 2007). Zhong e colaboradores (2016) observaram que o tratamento com Dox nas diferentes concentrações (0,5, 1 e 2  $\mu\text{M}$ ) provocou um aumento na fase G0 ou S para as células MDA-MB-231 (ZHONG et al., 2016). BAR-ON e colaboradores (2007) examinaram os efeitos da doxorubicina na expressão de Skp2 nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231, e verificaram que a doxorubicina tinha efeitos completamente opostos na regulação de Skp2 nas diferentes linhagens celulares. Eles sugerem que a doxorubicina induz a paragem do ciclo celular em diferentes pontos de controle do ciclo celular, dependendo da sua capacidade para induzir a atividade de p53. Como ambas, Skp2 e p53, desempenham papéis importantes na progressão tumoral do câncer de mama e nos quadros clínicos, essas observações sugerem que as funções de ambas as proteínas reguladoras devem ser levadas em conta no tratamento do câncer da mama por Dox (BAR-ON; SHAPIRA; HERSHKO, 2007).

A doxorubicina tem mostrado um grande potencial terapêutico, sendo considerada um dos mais potentes agentes quimioterápicos já aprovados pela Food and Drug Administration (HE et al., 2015). A sua capacidade para combater células que se dividem rapidamente e a progressão lenta da doença tem sido amplamente reconhecidas há várias décadas, limitadas apenas pela sua toxicidade em células não cancerosas no corpo humano (TAKEMURA; FUJIWARA, 2007). De fato, o dano aos tecidos não direcionados complica o tratamento do câncer, restringindo as dosagens terapêuticas de Dox e diminuindo a qualidade da vida dos pacientes durante e após o tratamento.

Neste trabalho, utilizamos a Dox como um fármaco modelo para demonstrar a sua bioequivalência quando liberada pelo sistema DoxDS em comparação à Dox em solução. O sistema DoxDS é apresentado como uma alternativa para o tratamento quimioterápico adjuvante

que poderia auxiliar na redução dos índices relacionados à recidiva do câncer de mama e minimizar os danos em nível sistêmico. Observamos, pelos resultados apresentados nas Figuras 48, 49 e 50, que a Dox incorporada ao sistema DoxDS mantém sua bioequivalência no que diz respeito ao ciclo celular das células de câncer de mama aqui estudadas.

### 5.3.3 Avaliação do mecanismo de morte celular pelo DoxDS

A avaliação dos níveis de apoptose por citometria de fluxo é geralmente realizada por métodos que utilizam anexina V-FITC como marcador vital, que se associa aos resíduos de fosfatidilserina, externalizados no início do processo apoptótico. A utilização conjunta do marcador nuclear fluorescente iodeto de propídio (PI), por sua vez, torna possível verificar as alterações nucleares características dos estágios tardios da apoptose, como resultado do aumento da permeabilidade da membrana. Com o intuito de avaliar a bioequivalência da Dox liberada pelo sistema DoxDS em comparação com a Dox em solução (DoxSol), foram avaliadas três concentrações de Dox em três linhagens celulares de câncer de mama.

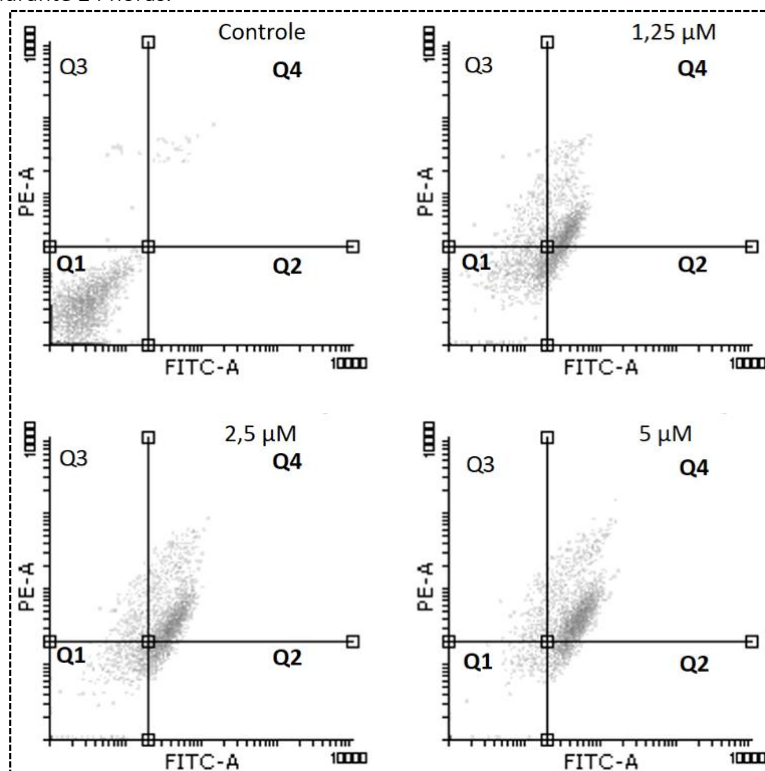
A Tabela 9 mostra a ocorrência de mortalidade nas células 4T1 tratadas com DoxDS e DoxSol nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  durante 24 h, e a Figura 51 mostra a distribuição das células somente para o DoxDS nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ .

Tabela 9 – Distribuição das células no mecanismo de morte das células de tumor de mama da linhagem 4T1 tratadas com DoxDS e DoxSol nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  durante 24 horas. # = Diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) do controle em relação aos tratamentos com DoxDs e DoxSol. \* = Diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) do tratamento com DoxDS em relação ao tratamento com DoxSol.

Linhagem celular	Tratamento	Avaliação da morte celular (%)			
		Viáveis (Q1)	Apoptose (Q2)	Necrose (Q3)	Apoptose tardia (Q4)
	Controle	93,99 $\pm$ 0,12#	0,55 $\pm$ 0,08#	2,13 $\pm$ 0,12#	3,35 $\pm$ 0,08#
	DoxDS1.25	12,79 $\pm$ 0,60*	27,76 $\pm$ 5,20*	5,58 $\pm$ 0,60*	53,88 $\pm$ 5,20*
	DoxSol1.25	30,83 $\pm$ 1,24	19,79 $\pm$ 3,83	10,92 $\pm$ 1,24	38,47 $\pm$ 3,83
	DoxDS2.5	12,89 $\pm$ 0,74*	26,33 $\pm$ 4,22	7,71 $\pm$ 0,74	53,08 $\pm$ 4,22
	DoxSol2.5	20,50 $\pm$ 1,24	18,88 $\pm$ 3,78	9,35 $\pm$ 1,24	51,28 $\pm$ 3,78
	DoxDS5	6,29 $\pm$ 0,97*	3,51 $\pm$ 0,56*	12,31 $\pm$ 0,97*	77,90 $\pm$ 1,56*
	DoxSol5	10,13 $\pm$ 1,02	16,47 $\pm$ 3,47	8,19 $\pm$ 1,02	65,22 $\pm$ 3,47



Figura 51 – Identificação do mecanismo de morte das células de tumor de mama da linhagem 4T1 tratadas com DoxDS nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  durante 24 horas.



Após o período de tratamento com Dox 1,25  $\mu\text{M}$  ocorreu um aumento significativo da marcação de células em apoptose inicial, de  $27,47 \pm 5,20\%$  e  $19,79 \pm 3,83\%$  para DoxDS e DoxSol, respectivamente, quando comparado ao grupo controle,  $0,55 \pm 0,08\%$ . As células em necrose correspondem a  $5,58 \pm 0,60\%$  e  $10,92 \pm 1,24\%$  para DoxDS e DoxSol, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle,  $2,13 \pm 0,12\%$ . A ocorrência de apoptose tardia foi observada para concentração de 1,25  $\mu\text{M}$ , sendo de  $53,88 \pm 5,20\%$  e  $38,47 \pm 3,83\%$  para DoxDS e DoxSol, respectivamente, comparada ao grupo controle,  $3,35 \pm 0,08\%$ . O restante da população de células 4T1 incubadas com 1,25  $\mu\text{M}$  de Dox,

não exibiu marcação fluorescente, caracterizando-se, portanto, como células viáveis.

Após o período de tratamento com 2,5  $\mu\text{M}$  de Dox, os índices de apoptose inicial, necrose e apoptose tardia, apresentaram-se similares aos índices relatados para a concentração de 1,25  $\mu\text{M}$ .

Para os tratamentos com 5  $\mu\text{M}$ , os índices de apoptose inicial foram de  $3,51 \pm 0,56\%$   $16,47 \pm 3,47\%$ , para DoxDS e DoxSol, respectivamente, apresentando diferença significativa quando comparado ao grupo controle,  $0,55 \pm 0,08\%$ . As células necróticas correspondem a  $12,31 \pm 0,97\%$ ,  $8,19 \pm 1,02\%$ , para DoxDs e DoxSol respectivamente, apresentando ainda diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle  $2,13 \pm 0,12\%$ . Para a apoptose tardia, evidenciada pela fluorescência de ambos os marcadores os índices foram de  $77,90 \pm 1,56\%$ ;  $65,22 \pm 3,47\%$ .

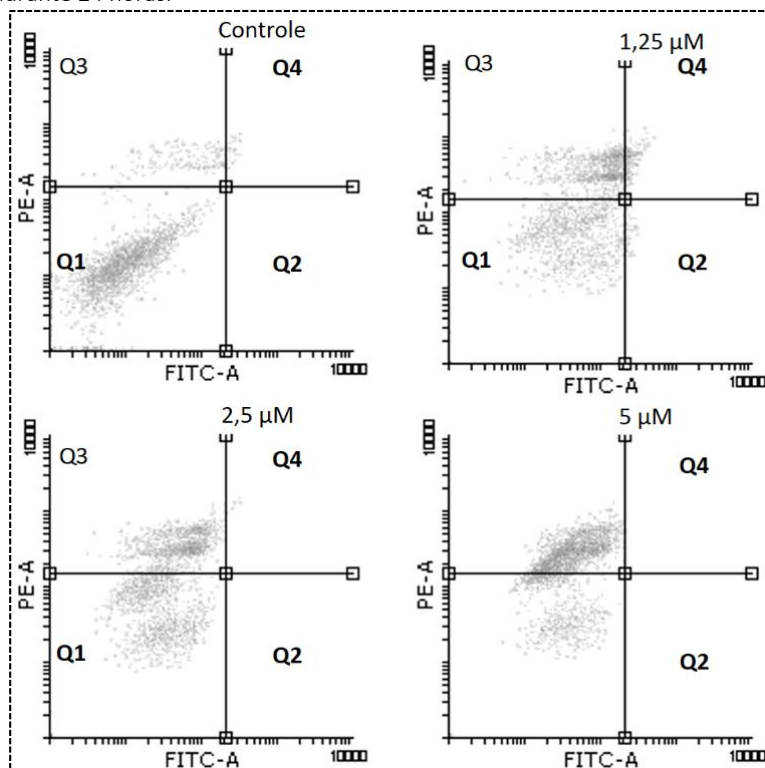
Como apresentado na Figura 51 e na Tabela 9, para a linhagem 4T1, independente da concentração de DoxDS e DoxSol, o maior número de células se apresentam em apoptose tardia/necrose.

A Tabela 10 mostra a ocorrência de mortalidade nas células da linhagem MCF-7 tratadas com DoxDS e DoxSol nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  durante 24 h. A Figura 52 mostra a distribuição das células somente para o DoxDS nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ .

Tabela 10 – Distribuição das células mecanismo de morte das células de tumor de mama da linhagem MCF-7 tratadas com DoxDS e DoxSol nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  durante 24 horas.  $\#$  = Diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) do controle em relação aos tratamentos com DoxDs e DoxSol.  $*$  = Diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) do tratamento com DoxDS em relação ao tratamento com DoxSol.

Linhagem celular	Tratamento	Avaliação da morte celular (%)			
		Viáveis (Q1)	Apoptose (Q2)	Necrose (Q3)	Apoptose tardia (Q4)
	Controle	$85,00 \pm 2,9\#$	$0,10 \pm 0,06$	$12,39 \pm 0,29\#$	$2,52 \pm 0,06\#$
	DoxDS1.25	$48,72 \pm 2,09$	$0,29 \pm 0,03*$	$39,17 \pm 2,09$	$10,82 \pm 0,03$
	DoxSol1.25	$46,58 \pm 1,87$	$2,21 \pm 0,11$	$40,44 \pm 1,87$	$10,78 \pm 0,11$
	DoxDS2.5	$44,58 \pm 4,38$	$0,04 \pm 0,01$	$54,66 \pm 4,38*$	$0,74 \pm 0,01$
	DoxSol2.5	$52,47 \pm 2,63$	$0,07 \pm 0,02$	$46,66 \pm 2,63$	$0,81 \pm 0,02$
	DoxDS5	$26,12 \pm 2,13$	$0,05 \pm 0,01$	$72,91 \pm 2,13$	$0,98 \pm 0,01$
	DoxSol5	$30,28 \pm 1,07$	$0,08 \pm 0,01$	$68,69 \pm 4,07$	$0,95 \pm 0,01$

Figura 52 – Identificação do mecanismo de morte das células de tumor de mama da linhagem MCF-7 tratadas com DoxDS nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  durante 24 horas.



Após o período de tratamento com 1,25  $\mu\text{M}$  de Dox ocorreu um aumento significativo da marcação de células em apoptose inicial para DoxDS e DoxSol, quando comparado ao grupo controle. A maioria das células eram células necróticas.

A ocorrência de apoptose tardia foi observada para a concentração de 1,25  $\mu\text{M}$ . O restante da população de células MCF-7, incubadas com 1,25  $\mu\text{M}$  de Dox liberado a partir do DoxDS e DoxSol, não exibiu marcação fluorescente, caracterizando-se, portanto, como células viáveis.

Após o período de tratamento com 2,5  $\mu$ M de Dox, a porcentagem de células em apoptose inicial e apoptose tardia é pequena; porém, os índices de células necróticas foram superiores ao tratamento com 1,25  $\mu$ M, mostrando valores de 54,66  $\pm$  4,38% e 56,66  $\pm$  2,63%. O restante da população de células MCF-7 incubadas 2,5  $\mu$ M de Dox liberado a partir do DoxDS e DoxSol, 48,72% ( $\pm$  2,09) e 46,58% ( $\pm$  1,87) respectivamente, não exibiu marcação fluorescente, caracterizando-se, portanto, como células viáveis.

Após tratamento com a concentração de 5  $\mu$ M de Dox as células em apoptose inicial e apoptose tardia permaneceram similares às apresentadas para a concentração de 2,5  $\mu$ M. Porém as células em necrose, 72,91  $\pm$  2,13% e 68,69  $\pm$  4,07%, para DoxDS e DoxSol, aumentaram significativamente quando comparadas ao grupo controle 12,39  $\pm$  0,29%. Para amostras tratadas por 24 horas na concentração de 5  $\mu$ M de Dox, o restante da população de células MCF-7 foi de 26,12  $\pm$  2,13% e 30,28  $\pm$  1,07%, respectivamente, não exibindo marcação fluorescente, caracterizando-se, portanto, como células viáveis.

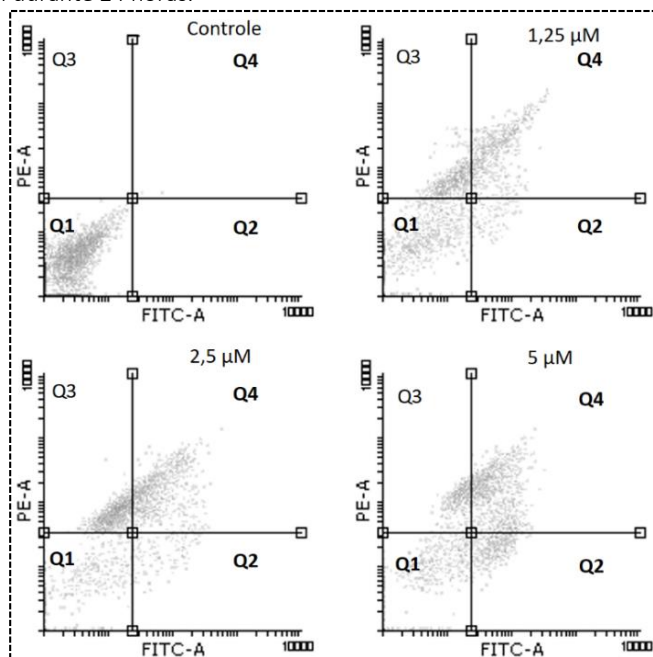
A Tabela 11 mostra a ocorrência de mortalidade nas células da linhagem MDA-MB-231 tratadas com DoxDS e DoxSol nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu$ M durante 24 h.

A Figura 53 mostra a distribuição das células para o DoxDS nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu$ M.

Tabela 11 – Distribuição das células no mecanismo de morte das células de tumor de mama da linhagem MDA-MB-231 tratadas com DoxDS e DoxSol nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu$ M durante 24 horas. # = Diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) do controle em relação aos tratamentos com DoxDs e DoxSol. \* = Diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) do tratamento com DoxDS em relação ao tratamento com DoxSol.

Linhagem celular	Tratamento	Avaliação da morte celular (%)			
		Viáveis (Q1)	Apoptose (Q2)	Necrose (Q3)	Apoptose tardia (Q4)
	Controle	97,66 $\pm$ 8,48#	0,64 $\pm$ 0,08#	0,91 $\pm$ ,01#	0,79 $\pm$ 0,01#
	DoxDS1.25	34,46 $\pm$ 0,27*	2,11 $\pm$ 0,27*	38,13 $\pm$ 1,94*	25,29 $\pm$ 1,91
	DoxSol1.25	37,98 $\pm$ 0,37	6,82 $\pm$ 0,37	25,87 $\pm$ 1,44	29,33 $\pm$ 1,44
	DoxDS2.5	20,35 $\pm$ 0,27	7,95 $\pm$ 0,27*	29,01 $\pm$ 2,03	42,69 $\pm$ 2,03
	DoxSol2.5	20,47 $\pm$ ,37	9,52 $\pm$ 0,37	30,40 $\pm$ 1,26	39,61 $\pm$ 1,56
	DoxDS5	29,01 $\pm$ 0,53*	5,74 $\pm$ 0,53*	21,78 $\pm$ 0,28*	43,48 $\pm$ 2,88
	DoxSol5	23,79 $\pm$ 0,72	17,69 $\pm$ 0,72	17,39 $\pm$ 0,16	41,13 $\pm$ 1,66

Figura 53 – Identificação do mecanismo de morte das células de tumor de mama da linhagem MDA-MB-231 tratadas com DoxDS nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5  $\mu$ M durante 24 horas.



Após o período de tratamento com 1,25  $\mu$ M de Dox ocorreu um aumento significativo da marcação com anexina V (AV), evidenciando morte celular apoptótica inicial quando comparado ao grupo controle. As células mostrando marcação apenas com iodeto de propídeo (IP), relacionadas como células necróticas, correspondem a  $38,13 \pm 1,94\%$  e  $25,87 \pm 1,44\%$ , para DoxDS e DoxSol, respectivamente. A ocorrência de apoptose tardia, evidenciada pela fluorescência de ambos os marcadores (AV, IP) foi observada para concentração de 1,25  $\mu$ M,  $25,29 \pm 1,91\%$  e  $29,33 \pm 1,44\%$ , para DoxDS e DoxSol, respectivamente. O restante da população de células MDA-MB-231 incubadas com 1,25  $\mu$ M de Dox não exibiu marcação fluorescente, caracterizando-se, portanto, como células viáveis.

Após o período de tratamento com 2,5  $\mu$ M de Dox, os índices da marcação para apoptose inicial e apoptose tardia aumentaram para

7,95%  $\pm$  0,27%, 9,52  $\pm$  0,37% e 42,69  $\pm$  2,03%, 39,61  $\pm$  1,56%, respectivamente. Os índices de células necróticas após o tratamento com 1,25  $\mu$ M foram de 29,0  $\pm$  2,03%, 30,40  $\pm$  1,26%. O restante da população de células MDA-MB-231 incubadas 2,5  $\mu$ M de Dox não exibiu marcação fluorescente, caracterizando-se, portanto, como células viáveis.

Após tratamento com a concentração de 5  $\mu$ M de Dox, os índices de apoptose inicial e apoptose tardia permaneceram similares aos apresentados para a concentração de 2,5  $\mu$ M. Os índices de células marcadas somente com IP, representando as células em necrose, diminuíram para 21,78  $\pm$  0,28% e 17,39  $\pm$  0,16%, para DoxDS e DoxSol, respectivamente. Ao final de 24 horas de tratamento com Dox na concentração de 5  $\mu$ M de Dox, o restante da população de células MDA-MB-231 teve um ligeiro aumento em relação à concentração de 2,5  $\mu$ M, não exibindo marcação fluorescente, caracterizando-se, portanto, como células viáveis.

A distribuição celular relacionada às células viáveis, apoptose, necrose e apoptose tardia foram apresentadas nas Figuras 51, 52 e 53, para o tratamento com DoxDS nas três concentrações de Dox. Os valores comparativos de células viáveis (Q1), apoptose (Q2), necrose (Q3) e apoptose tardia (Q4) para DoxSol estão apresentados nas Tabelas 9, 10 e 11. Os resultados de distribuição celular relacionados ao período de tratamento de 24 h com Dox liberada pelo DoxDS e pelo DoxSol, nas concentrações estudadas de 1,25, 2,5 e 5  $\mu$ M (Figuras 51, 52 e 53) exibiram uma clara evidência de apoptose tardia para a linhagem 4T1, (Tabela 9) e para a linhagem MDA-MB-231 (Tabela 11). Para a linhagem MCF-7 (Tabela 10) os valores de distribuição celular demonstraram claramente uma maior ocorrência das células em necrose.

A apoptose é um processo de morte celular que ocorre como resposta das células sob ação de uma variedade de fármacos anticancerígenos. Os grupos tratados com DoxDS quando comparados com DoxSol apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, porém ambos obtiveram o mesmo perfil quando relacionamos a distribuição celular nos quadrantes. As linhagens 4T1 e MDA-MB-231 foram relacionadas ao processo de apoptose tardia (Caracterizado pelas marcações de PI+ e AV+) como indicado pelas Figuras 51 e 53; a linhagem

MCF-7, por sua vez, foi relacionada ao processo de necrose, como indicado na Figura 52.

O DNA é o principal alvo terapêutico para o tratamento do câncer. Por meio da indução de danos ao DNA, se inicia uma cascata de eventos que, em última análise, determina o destino das células cancerosas (HURLEY, 2002). Danos ao DNA e sua reparação, regulação do ciclo celular e indução de apoptose são três processos que estão envolvidos não só na carcinogênese mas na resposta das células de câncer a agentes quimioterapêuticos. Apesar da aceitação de que o complexo-II-DNA de topoisomerase é um alvo molecular importante para a doxorubicina (HURLEY, 2002), é provável que outros mecanismos, tais como o dano oxidativo direto ao DNA (ZHONG et al., 2016), podem contribuir para a eficácia geral da doxorubicina.

### **5.3.4 Avaliação da morfologia celular após tratamento com DoxDS**

---

A bioequivalência da Dox liberada pelo sistema em comparação com Dox em solução foi avaliada em função das alterações morfológicas de três linhagens celulares de câncer de mama cultivadas *in vitro*, quando submetidas às concentrações crescentes de Dox liberada por DoxDS e DoxSol de 1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ .

As três linhagens de câncer de mama selecionadas para análise comparativa da bioequivalência do DoxDS e DoxSol têm características distintas. As linhagens 4T1 e MDA-MB-231 apresentam morfologia semelhante e são consideradas linhagens celulares triplo-negativa, ou seja, não expressam receptores de estrogênio, progesterona e HER2 (receptor do fator de crescimento epidérmico) (REF). Essas células são frequentemente associadas a um tipo de câncer de mama basal, que contém células cancerosas semelhantes às células que revestem os dutos da mama. A linhagem MCF7 é amplamente utilizada em estudos de câncer de mama *in vitro*, pois mantém conservadas as características do epitélio mamário. Estas características incluem a habilidade das células em formar junções aderentes e junções oclusivas quando do contato célula-célula com as células vizinhas, e através destas conexões, contribuindo para vários processos fisiológicos.

As Figuras 54, 55 e 56 mostram a morfologia das linhagens de câncer de mama estudadas, 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231,

respectivamente, após 24 horas de tratamento com DoxDS e DoxSol para as concentrações de 5 e 1,25  $\mu\text{M}$ .

Figura 54 – Micrografias obtidas por MEV das células de tumor mamário da linhagem 4T1. (A) Controle CarDS, (B) controle placa, tratadas com (C) DoxDS 1,25  $\mu\text{M}$ , (D) DoxSol 1,25  $\mu\text{M}$ , (E) DoxDS 5  $\mu\text{M}$ , (F) DoxSol 5  $\mu\text{M}$ . As imagens são representativas do ensaio realizado em duplicata com imagens obtidas da ampliação de 300x em 3 pontos distintos.

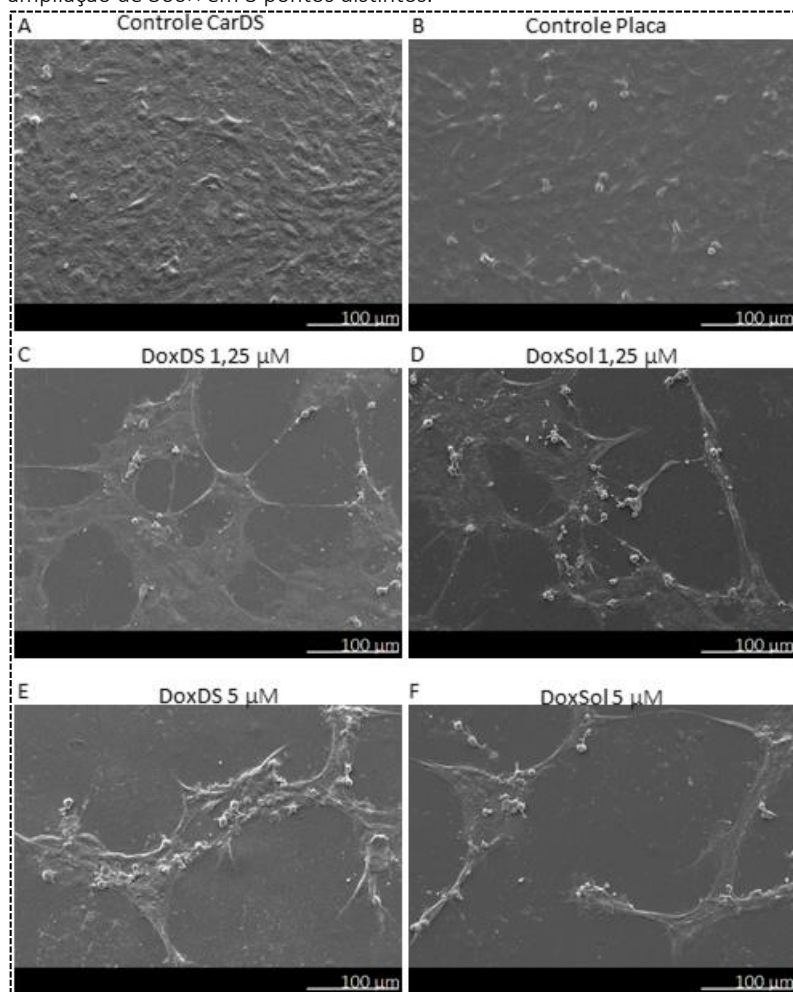




Figura 55 – Micrografias obtidas por MEV das células de tumor mamário da linhagem MCF-7. (A) Controle CardS, (B) controle placa, tratadas com (C) DoxDS 1,25  $\mu$ M, (D) DoxSol 1,25  $\mu$ M, (E) DoxDS 5  $\mu$ M, (F) DoxSol 5  $\mu$ M. As imagens são representativas do ensaio realizado em duplicata com imagens obtidas da ampliação de 300 $\times$  em 3 pontos distintos.

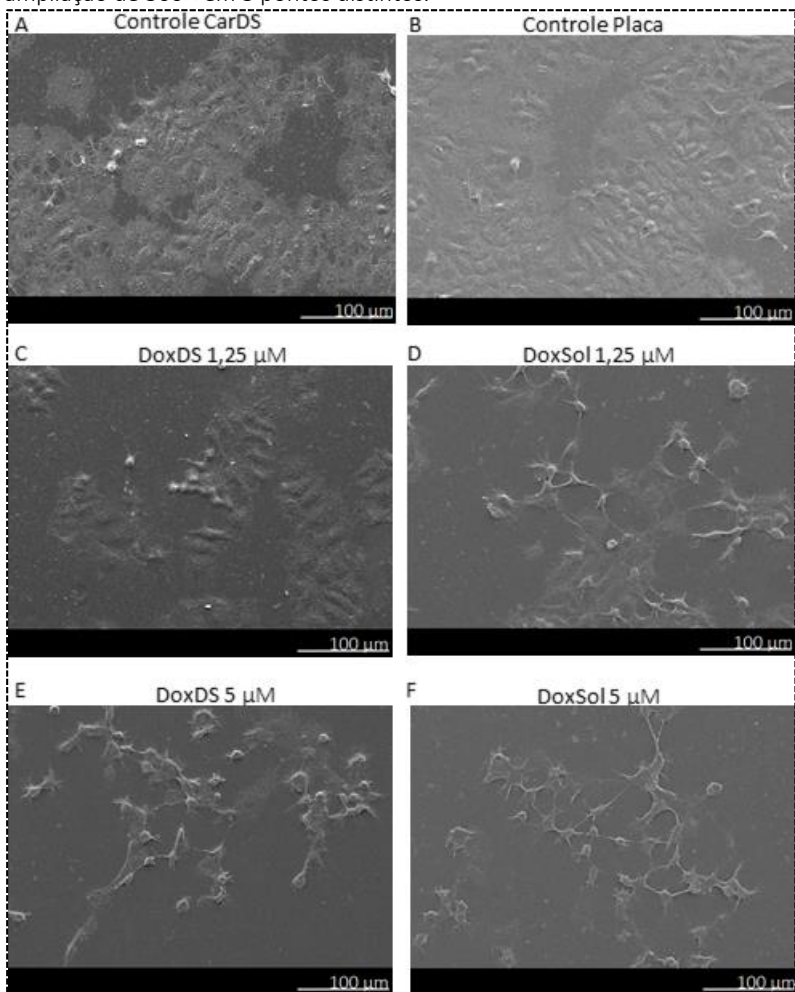
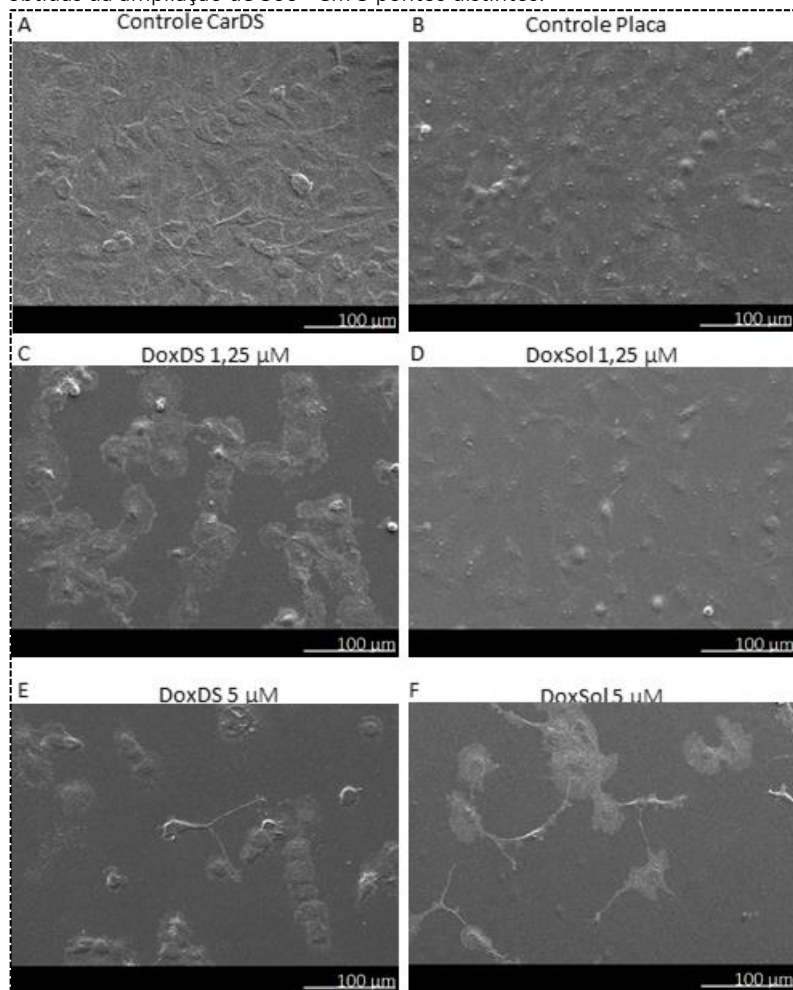


Figura 56 – Micrografias obtidas por MEV das células de tumor mamário da linhagem MDA-MB-231. (A) Controle CarDS, (B) controle placa, tratadas com (C) DoxDS 1,25  $\mu$ M, (D) DoxSol 1,25  $\mu$ M, (E) DoxDS 5  $\mu$ M, (F) DoxSol 5  $\mu$ M. As imagens são representativas do ensaio realizado em duplicata com imagens obtidas da ampliação de 300 $\times$  em 3 pontos distintos.



A partir de uma análise das imagens (Figuras 54, 55 e 56), características morfológicas das células podem ser identificadas, tais como o arredondamento celular devido ao encolhimento e a condensação do citoplasma, indicadores de apoptose, características estas mais acentuadas no tratamento com maior concentração de Dox de 5  $\mu\text{M}$ . Ambos os tratamentos, DoxDS e DoxSol, causam efeitos de retração das junções aderentes da célula cultivada em placa. Este achado corrobora os dados de diminuição da atividade metabólica apresentados na Figura 47.

A morfologia da célula MCF-7 sem tratamento (controle) é apresentada na Figura 55A que mostra a morfologia característica de células do epitélio mamário. A morfologia das células após 24 horas de tratamento com Dox liberado por DoxDS e DoxSol é apresentada nas Figuras 55B e 55E para a concentração de 1,25  $\mu\text{M}$ , nas Figuras 55C e 55F para a concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ , e nas Figuras 55D e 55G para a concentração de 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

As células MDA-MB-231 apresentam normalmente morfologia achatada, em forma de fuso, caracterizada por diversos filopódios, como pode ser observado pelo controle, Figura 56A. Sob tratamento com Dox em baixa concentração (1,25  $\mu\text{M}$ ), no entanto, as células apresentam morfologia achatada, como pode ser observado nas Figuras 56B e 56E; a estrutura do citoesqueleto foi modificada quando a concentração de Dox foi aumentada para 5  $\mu\text{M}$ , cf. Figuras 56D e 56G, e as células formam prolongamentos de comunicação célula-célula.

## 5.4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados relacionados à toxicidade da Dox liberada pelo DoxDS em comparação com a Dox em solução (DoxSol), em células de câncer de mama, é possível concluir que:

- i. A Dox liberada pelo DoxDS é equivalente ou por vezes mais eficaz na diminuição da atividade metabólica das células de câncer de mama, sendo que as linhagens de adenocarcinomas humanos (MCF-7 e MDA-MB-231) foram menos sensíveis à Dox do que a linhagem de camundongo (4T1).
- ii. O tratamento das células com DoxDS e DoxSol se equivalem nas alterações do ciclo celular, porém a Dox causou alterações diferenciadas para cada linhagem. Para as linhagens de adenocarcinoma humano (MCF-7 e MDA-MB-231), observou-se que a maior porcentagem de células estava na fase G0-G1, e para a linhagem de camundongo 4T1 observou-se que a maior porcentagem de células estava na fase S.
- iii. A Dox liberada pelo DoxDS promoveu diferença em relação ao mecanismo de morte celular em comparação com DoxSol, porém o mecanismo de morte celular ocasionado pela Dox para as linhagens 4T1 e MDA-MB-231 foi relacionado ao processo de apoptose tardia, e para a linhagem MCF-7 foi relacionado ao processo de necrose, independente da concentração de Dox avaliada.
- iv. Após contato do DoxDS com as células de câncer de mama observam-se as mesmas alterações morfológicas características das células quando em contato com DoxSol.

Em resumo, a Dox liberada pelo sistema DoxDS manteve sua eficiência, quando comparada com Dox em solução na diminuição da atividade metabólica de células de câncer de mama cultivadas em placa; assim como, manteve as mesmas alterações no ciclo celular, mecanismo de morte e alterações morfológicas.

Capítulo  
6

## Conclusões Gerais

*“O cientista não é o homem que  
fornece as verdadeiras respostas; é  
quem faz as verdadeiras perguntas”.*  
*(Claude Lévi-Strauss)*



Levando em consideração a necessidade de se investir em novas tecnologias para o tratamento adjuvante da recidiva do câncer de mama, este trabalho relata a adequação de matrizes de nanocelulose bacteriana para o desenvolvimento de um sistema de liberação de fármacos, a doxorrubicina, para terapia adjuvante personalizada *in situ*, onde podemos concluir que:

- i. A caracterização do CarDS, desenvolvido pela síntese das micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car por cristalização coloidal na matriz de BNC, resultou na comprovação das características estruturais necessárias para aplicação *in situ* do sistema, características estas relacionadas a uma distribuição uniforme das micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car entre as fibras de BNC, alta incorporação de Dox e perfis de liberação modulados pela concentração de Dox incorporada, assim como pela variação do pH local.
- ii. Os ensaios selecionados para avaliar as propriedades físico-químicas e biológicas *in vitro*, evidenciaram as características promissoras da união da matriz de BNC com as micropartículas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car relacionadas a não citotoxicidade e hemocompatibilidade para aplicações biomédicas. A ampliação da geometria da matriz de BNC não ocasionou alterações na razão mássica das micropartículas sintetizadas entre as fibras de BNC. A diminuição da área superficial pela presença das micropartículas na BNC, reduz a capacidade de absorção de água e reidratação, tornando-o mais maleável e de fácil manuseio na hora da aplicação de acordo com as análises de propriedades mecânicas. A união dos componentes BNC e  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car foram considerados não citotóxicos quando avaliadas segundo normas da ISO 10993-5. A interação célula-biomaterial possibilitou observar que fibroblastos quando cultivadas sobre o CarDS, são capazes de aderir e proliferar em contato com o sistema. O CarDS é

hemocompatível se por ventura entrar em contato com sangue total.

- iii. E por fim a Dox liberada pelo DoxDS foi bioequivalente ou por vezes mais eficaz nos parâmetros relacionados a citotoxicidade, ciclo celular, mecanismo de morte e morfologia da linhagens de câncer de mama avaliadas. O DoxDS se apresenta inicialmente mais citotóxico às linhagens (4T1 e MDA-MB-231) estudadas, porém esta citotoxicidade se equivale a DoxSol ao longo do tempo de cultivo. O DoxDS mantém sua bioequivalência no que diz respeito ao ciclo celular das células de câncer de mama estudadas, porém a Dox causa alteração no ciclo celular, sendo esta, diferenciada para cada linhagem de câncer de mama estudada. Os mecanismos de morte foram associados a necrose e apoptose, sendo que as linhagens 4T1 e MDA-MB-231 foram relacionadas ao processo de apoptose tardia e a linhagem MCF-7 foi relacionada ao processo de necrose. E por fim as alterações morfológicas ocasionadas por DoxDS foram equivalentes quando comparadas com DoxSol.

Por fim podemos concluir que a hipótese sugerida pode ser confirmada, portanto a união de matrizes de nanocelulose bacteriana com micropartículas híbridas de  $\text{CaCO}_3/\lambda$ -Car favorece a incorporação da doxorubicina, permitindo maior controle sobre a liberação do fármaco para células tumorais.



Capítulo

# 8

## Referências Bibliográficas

*“No fundo, todos temos  
necessidade de dizer quem somos e  
o que é que estamos a fazer e a  
necessidade de deixar algo feito,  
porque esta vida não é eterna e  
deixar coisas feitas pode ser uma  
forma de eternidade.”  
(José Saramago)*



ABEER, M. M.; MOHD AMIN, M. C. I.; MARTIN, C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: Their biochemistry, current approaches and future prospects. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1047–1061, 2014.

ABUHAMMAD, S.; ZIHLIF, M. Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. **Genomics**, v. 101, n. 4, p. 213–220, 2013.

AHMAD, N.; CAIRUL, M.; MOHD, I.; MAHALI, S. M.; ISMAIL, I.; TUAN, V.; CHUANG, G. Biocompatible and Mucoadhesive Bacterial Cellulose -g- Poly ( acrylic acid ) Hydrogels for Oral Protein Delivery. 2014.

ALMEIDA, I. F.; PEREIRA, T.; SILVA, N. H. C. S.; GOMES, F. P.; SILVESTRE, A. J. D.; FREIRE, C. S. R.; SOUSA LOBO, J. M.; COSTA, P. C. Bacterial Cellulose Membranes as Drug Delivery Systems: An in Vivo Skin Compatibility Study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 3, p. 332–336, abr. 2014.

AMIN, M. C. I. M.; ABADI, A. G.; AHMAD, N.; KATAS, H.; JAMAL, J. A. Bacterial cellulose film coating as drug delivery system: Physicochemical, thermal and drug release properties. **Sains Malaysiana**, v. 41, n. 5, p. 561–568, 2012.

ANDRADE, F. K.; SILVA, J. P.; CARVALHO, M.; CASTANHEIRA, E. M. S.; SOARES, R.; GAMA, M. Studies on the hemocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 98 A, n. 4, p. 554–566, 2011.

ATSDR. What Is Cancer ? p. 1–12, 2010.

AYDINLIK, S.; ERKISA, M.; CEVATEMRE, B.; SARIMAHMUT, M.; DERE, E.; ARI, F.; ULUKAYA, E. Enhanced cytotoxic activity of doxorubicin through the inhibition of autophagy in triple negative breast cancer cell line. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 2016.

BABINCOVÁ, M.; ALTANEROVÁ, V.; ALTANER, E.; BAÈOVÁ, Z.; BABINEC, P. Doxorubicin mediated free iron release from ferritin magnetoparticles is enhanced at higher temperatures: Implications for cancer therapy. **European Cells and Materials**, v. 3, n. SUPPL. 2, p. 140–141, 2002.

BAR-ON, O.; SHAPIRA, M.; HERSHKO, D. D. Differential effects of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and Skp2 expression in breast cancer cells. **Anticancer Drugs**, v. 18, n. 10, p. 1113–1121, 2007.

BARREIRO, A. M.; RECOUVREUX, D. O. S.; HOTZA, D.; PORTO, L. M.; RAMBO, C. R. Sand dollar skeleton as templates for bacterial cellulose coating and apatite precipitation. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 19, p. 5252–5256, 2010.

BARUD, H. S.; REGIANI, T.; MARQUES, R. F. C.; LUSTRI, W. R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Antimicrobial Bacterial Cellulose-Silver Nanoparticles Composite Membranes. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

BARUD, H. S.; RIBEIRO, C. A.; CRESPI, M. S.; MARTINES, M. A. U.; DEXPERT-GHYS, J.; MARQUES, R. F. C.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite membranes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, p. 815–818, 2007.

BERNIER J, P. P. Surgery and radiation therapy of triple-negative breast cancers: From biology to clinics. **Breast.**, v. 28, p. 148–155, 2016.

BERTI, F. V.; RAMBO, C. R.; DIAS, P. F.; PORTO, L. M. Nanofiber Density Determines Endothelial Cell Behavior on Hydrogel Matrix. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 33, n. 8, p. 4684–4691, 2013.

BEUVIER, T.; CALVIGNAC, B.; DELCROIX, G. J.-R.; TRAN, M. K.; KODJIKIAN, S.; DELORME, N.; BARDEAU, J.-F.; GIBAUD, A.; BOURY, F. Synthesis of hollow vaterite CaCO<sub>3</sub> microspheres in supercritical carbon dioxide medium. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 26, p. 9757, 2011.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 83–99, 2010.

BOSIO, V. E.; CACICEDO, M.; CALVIGNAC, B.; LEON, I.; BEUVIER, T.; BOURY, F.; CASTRO, G. R. Synthesis and characterization of CaCO<sub>3</sub>-biopolymers hybrid nanoporous microparticles for cancer damaged bone therapy. **Journal of Nanoparticles Research**, v. 132, p. 4833794, 2014a.

BOSIO, V. E.; CACICEDO, M. L.; CALVIGNAC, B.; LEON, I.; BEUVIER, T.; BOURY, F.; CASTRO, G. R. Synthesis and characterization of CaCO<sub>3</sub>-biopolymer hybrid nanoporous microparticles for controlled release of

doxorubicin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 158–169, 2014b.

BOSIO, V. E.; LÓPEZ, A. G.; MUKHERJEE, A.; MECHETTI, M.; CASTRO, G. R. Tailoring doxorubicin sustainable release from biopolymeric smart matrix using congo red as molecular helper. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 32, p. 5178, 2014c.

BOUCEK, R. J.; JR, S.; OLSONLL, R. D.; BRENNERLL, D. E.; OGUNBUNMI, E. M.; INUI, M.; FLEISCHER, S. The Major Metabolite of Doxorubicin Is. v. 262, n. 33, p. 15851–15856, 1987.

BREZDEN, C. B.; PHILLIPS, K. A.; ABDOLELL, M.; BUNSTON, T.; TANNOCK, I. F. Cognitive function in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 14, p. 2695–2701, 2000.

BRITO, M.; CASE, E.; KRIVEN, W. M.; ZHU, J. S. and Dongming. Use of Vaterite and Calcite in Forming Calcium Phosphate Cement Scaffolds. Developments in Porous, Biological and Geopolymer Ceramics. **Engineering and Science Proceedings**, v. 28, n. 9, p. 135–150, 2008.

BUSUIOC, C.; STROESCU, M.; STOICA-GUZUN, A.; VOICU, G.; JINGA, S.-I. Fabrication of 3D calcium phosphates based scaffolds using bacterial cellulose as template. **Ceramics International**, p. 0–1, 2016.

CACICEDO, M. L.; CESCO, K.; BOSIO, V. E.; PORTO, L. M.; CASTRO, G. R. Self-assembly of carrageenin–CaCO<sub>3</sub> hybrid microparticles on bacterial cellulose films for doxorubicin sustained delivery. *Journal of Applied Biomedicine*, v. 13, n. 3, p. 239–248, 2015.

CACICEDO, M. L.; CASTRO, M. C.; SERVETAS, I.; BOSNEA, L.; BOURA, K.; TSAFRAKIDOU, P.; DIMA, A.; TERPOU, A.; KOUTINAS, A.; CASTRO, G. R. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, 2016.

CACICEDO, M. L.; E. LEÓN, I.; S. GONZALEZ, J.; M. PORTO, L.; A. ALVAREZ, V.; CASTRO, G. R. Modified bacterial cellulose scaffolds for localized doxorubicin release in human colorectal HT-29 cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p. 421–429, 2016.

CAI, Z. J.; HOU, C. W.; YANG, G. Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, n. 3, p. 1488–1494,

2011.

CAMPO, V. L.; KAWANO, D. F.; SILVA, D. B. da; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 167–180, jun. 2009.

CESCA, K.; CACICEDO, M. L.; BOSSIO, V. E.; CASTRO, G. R.; PORTO, L. M. BaCarbTM: anovel bioinorganic matrix for local drug delivery. **BMC Proceedings**, v. 8, n. Suppl 4, p. P77, 2014

CHANG, C. H.; CHEN, S. J.; LIU, C. Y. Adjuvant treatments of breast cancer increase the risk of depressive disorders: A population-based study. **Journal of Affective Disorders**, v. 182, p. 44–49, 2015.

CHARREAU, H.; FORESTI, M. L.; VAZQUEZ, A. Nanocellulose patents trends: a comprehensive review on patents on cellulose nanocrystals, microfibrillated and bacterial cellulose. **Recent patents on nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 56–80, 2013.

CHEN, F.-M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, 2015.

CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G. a. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 3–4, p. 584–671, 2013.

CHIAOPRAKOBKIJ, N.; SANCHAVANAKIT, N.; SUBBALEKHA, K.; PAVASANT, P.; PHISALAPHONG, M. Characterization and biocompatibility of bacterial cellulose/alginate composite sponges with human keratinocytes and gingival fibroblasts. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 548–553, 2011.

CHRISTIANSEN, S.; AUTSCHBACH, R. Doxorubicin in experimental and clinical heart failure. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v. 30, n. 4, p. 611–616, 2006.

COLLA, G.; PORTO, L. Development of artificial blood vessels through tissue engineering. **BMC Proceedings**, v. 8, n. Suppl 4, p. P45, 2014.

CONTE, P.; GUARNERI, V. Triple-negative breast cancer: current management and future options. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 7, n. 1, p. 14–18, 2009.

DAVIES, E.; HISCOX, S. New therapeutic approaches in breast cancer.

**Maturitas**, v. 68, n. 2, p. 121–128, 2011.

DE BEER, E. L.; BOTTONE, a E.; VOEST, E. E. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. **European journal of pharmacology**, v. 415, n. 1, p. 1–11, 2001.

DE OLIVEIRA BARUD, H. G.; DA SILVA, R. R.; DA SILVA BARUD, H.; TERCIJAK, A.; GUTIERREZ, J.; LUSTRI, W. R.; DE OLIVEIRA, O. B.; RIBEIRO, S. J. L. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 406–420, 2016.

DENT, S.; OYAN, B.; HONIG, A.; MANO, M.; HOWELL, S. HER2-targeted therapy in breast cancer: A systematic review of neoadjuvant trials. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 6, p. 622–631, 2013.

DHANKHAR, R.; VYAS, S. P.; JAIN, A. K.; ARORA, S.; RATH, G.; GOYAL, A. K. Advances in Novel Drug Delivery Strategies for Breast Cancer Therapy. **Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 230–249, out. 2010.

DU, C.; SHI, J.; SHI, J.; ZHANG, L.; CAO, S. PUA/PSS multilayer coated CaCO<sub>3</sub> microparticles as smart drug delivery vehicles. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 7, p. 3745–3752, 2013.

DUNNE, L. W.; HUANG, Z.; MENG, W.; FAN, X.; ZHANG, N.; ZHANG, Q.; AN, Z. Human decellularized adipose tissue scaffold as a model for breast cancer cell growth and drug treatments. **Biomaterials**, v. 35, n. 18, p. 4940–4949, jun. 2014.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

EMILEE, G.; USSHER, J. M.; PERZ, J. Sexuality after breast cancer: A review. **Maturitas**, v. 66, n. 4, p. 397–407, 2010.

EROLE, P.; BOSCH, A.; ALEJANDRO PÉREZ-FIDALGO, J.; LLUCH, A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 6, p. 698–707, 2012.

EVAN, G. I.; EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, n. May, p. 342–348, 2001.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; IYER, a K. Tumor-targeted induction of

oxystress for cancer therapy. **Journal of drug targeting**, v. 15, n. 7–8, p. 475–486, 2007.

FARBER, E. Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: G. H. A. Clowes memorial lecture. **Cancer Research**, v. 44, n. 12 Pt 1, p. 5463–5474, 1984.

FENG, S.-S.; CHIEN, S. Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. **Chemical Engineering Science**, v. 58, n. 18, p. 4087–4114, 2003.

FERNANDES, S. C. M.; OLIVEIRA, L.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P.; GANDINI, A.; DESBRIERES, J. Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. **Green Chemistry**, v. 11, n. 12, p. 2023–2029, 2009.

FIMBEL, P.; SIFFERT, B. Interaction of Calcium-Carbonate (Calcite) with Cellulose Fibers in Aqueous-Medium. **Colloids and Surfaces**, v. 20, n. 1–2, p. 1–16, 1986.

FLATLEY, M. J.; DODWELL, D. J. Adjuvant treatment for breast cancer. **Surgery (Oxford)**, v. 34, n. 1, p. 43–46, 2016.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England journal of medicine**, v. 285, n. 21, p. 1182–1186, 1971.

FORNARI, F. a.; RANDOLPH, J. K.; YALOWICH, J. C.; RITKE, M. K.; GEWIRTZ, D. a. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. **Molecular pharmacology**, v. 45, n. 4, p. 649–56, 1994.

FU, L. H.; DONG, Y. Y.; MA, M. G.; LI, S. M.; SUN, R. C. Compare study CaCO<sub>3</sub> crystals on the cellulose substrate by microwave-assisted method and ultrasound agitation method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 3, p. 839–845, 2013.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Programmed cell death in animal development and disease. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 742–758, 2011.

GAUTIER, J.; MUNNIER, E.; PAILLARD, a.; HERVÉ, K.; DOUZIECH-EYROLLES, L.; SOUCÉ, M.; DUBOIS, P.; CHOURPA, I. A pharmaceutical study of doxorubicin-loaded PEGylated nanoparticles for magnetic drug targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 1, p. 16–25, 2012.

GERWECK, L. E.; VIJAYAPPA, S.; KOZIN, S. Tumor pH controls the in



vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. **Molecular cancer therapeutics**, v. 5, n. 5, p. 1275–9, 2006.

GILLIES, E. R.; FRÉCHET, J. M. J. pH-responsive copolymer assemblies for controlled release of doxorubicin. **Bioconjugate Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 361–368, 2005.

GODINHO, J. F.; BERTI, F. V.; MÜLLER, D.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Incorporation of Aloe vera extracts into nanocellulose during biosynthesis. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 545–555, 22 fev. 2016.

GROBMYER, S. R.; ZHOU, G.; GUTWEIN, L. G.; IWAKUMA, N.; SHARMA, P.; HOCHWALD, S. N. Nanoparticle delivery for metastatic breast cancer. **Maturitas**, v. 73, n. 1, p. 19–26, 2012. D.

HAJAJI, N.; BOUGNOUX, P. Selective sensitization of tumors to chemotherapy by marine-derived lipids: A review. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 5, p. 473–488, 2013.

HARUTA, S.; HANAFUSA, T.; FUKASE, H.; MIYAJIMA, H.; OKI, T. An Effective Absorption Behavior of Insulin for Diabetic. v. 5, n. 1, p. 1–9, 2003.

HAZARDS, O. E. Working with Doxorubicin ( Adriamycin ). n. Dx, p. 1–8, 2001.

HE, Q.; JOHNSTON, J.; ZEITLINGER, J.; CITY, K.; CITY, K. HHS Public Access. v. 33, n. 4, p. 395–401, 2015.

HELENIUS, G.; BÄCKDAHL, H.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; GATENHOLM, P.; RISBERG, B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 76A, n. 2, p. 431–438, fev. 2006.

HOFFMAN, A. S. Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 10–16, 2013.

HONG, L.; WANG, Y. L.; JIA, S. R.; HUANG, Y.; GAO, C.; WAN, Y. Z. Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. **Materials Letters**, v. 60, n. 13–14, p. 1710–1713, 2006.

HU, Y.; CATCHMARK, J. M. In vitro biodegradability and mechanical properties of bioabsorbable bacterial cellulose incorporating cellulases. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2835–2845, 2011.

HURLEY, L. H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 3, p. 188–200, 2002.

HURVITZ, S. a.; HU, Y.; O'BRIEN, N.; FINN, R. S. Current approaches and future directions in the treatment of HER2-positive breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 3, p. 219–229, 2013.

IARC. **International Agency for Research on cancer**. Acessado em 23 de outubro de 2016.

ICHIKAWA, Y.; GHANEFAR, M.; BAYEVA, M.; WU, R.; KHECHADURI, A.; NAGA PRASAD, S. V.; MUTHARASAN, R. K.; JAIRAJ NAIK, T.; ARDEHALI, H. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 2, p. 617–630, 3 fev. 2014.

INCA. **Estimativa Incidência de câncer no Brasil - 2014**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>.

ISHIKAWA, F.; MURANO, M.; HIRAISHI, M.; YAMAGUCHI, T.; TAMAI, I.; TSUJI, A. Insoluble powder formulation as an effective nasal drug delivery system. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 8, p. 1097–1104, 2002.

ISLAN, G. a.; BOSIO, V. E.; CASTRO, G. R. Alginate lyase and ciprofloxacin co-immobilization on biopolymeric microspheres for cystic fibrosis treatment. **Macromolecular Bioscience**, v. 13, n. 9, p. 1238–1248, 2013.

ISLAN, G. A.; CACICEDO, M. L.; BOSIO, V. E.; CASTRO, G. R. Development and characterization of new enzymatic modified hybrid calcium carbonate microparticles to obtain nano-architected surfaces for enhanced drug loading. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 439, p. 76–87, 2015.

ISO/EN10993-4. Biological evaluation of medical devices - Part 4: Selection of tests for interaction with blood. **International Organization for Standardization**, p. 34, 2002.

ISO/EN10993-5. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. **International Organization for Standardization**, 2009.

ISO/EN10993-6. Biological evaluation of medical devices — Part 6: Tests for local effects after implantation. **International Organization for**

**Standardization**, v. 2 ED, p. 21, 2007.

JEONG, S. II; LEE, S. E.; YANG, H.; JIN, Y. H.; PARK, C. S.; PARK, Y. S. Toxicologic evaluation of bacterial synthesized cellulose in endothelial cells and animals. **Molecular and Cellular Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 373–380, 2010.

JIA, L. T.; CHEN, S. Y.; YANG, A. G. Cancer gene therapy targeting cellular apoptosis machinery. *Cancer Treatment Reviews*, v. 38, n. 7, p. 868–876, 2012.

KAMBA, S. A.; ISMAIL, M.; HUSSEIN-AL-ALI, S. H.; IBRAHIM, T. A. T.; ZAKARIA, Z. A. B. In vitro delivery and controlled release of doxorubicin for targeting osteosarcoma bone cancer. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10580–10598, 2013.

KAMBA, S. A.; ISMAIL, M.; TENGKU IBRAHIM, T. A.; ZAKARIA, Z. A. B.; HASSAN GUSAU, L. In vitro ultrastructural changes of MCF-7 for metastasise bone cancer and induction of apoptosis via mitochondrial cytochrome c released by CaCO<sub>3</sub>/Dox nanocrystals. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

KANG, K. W.; CHUN, M.-K.; KIM, O.; SUBEDI, R. K.; AHN, S.-G.; YOON, J.-H.; CHOI, H.-K. Doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles to overcome multidrug resistance in cancer therapy. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 6, n. 2, p. 210–213, 2010.

KAUFMANN, S. H.; EARNSHAW, W. C. MINIREVIEW Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. v. 49, p. 42–49, 2000.

KAYE, R.; CROWLEY, J. Guidance for Industry and FDA Premarket and Design Control Reviewers Medical Device Use-Safety : Incorporating Human Factors Engineering into Risk Management Additional Copies. **World Wide Web Internet And Web Information Systems**, p. 33, 2000.

KEIZER, H. G.; PINEDO, H. M.; SCHUURHUIS, G. J.; JOENJE, H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. **Pharmacology & therapeutics**, v. 47, n. 2, p. 219–231, 1990.

KIEVIT, F. M.; WANG, F. Y.; FANG, C.; MOK, H.; WANG, K.; SILBER, J. R.; ELLENBOGEN, R. G.; ZHANG, M. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro. **Journal of Controlled Release**, v. 152, n. 1, p. 76–83, 2011.

KIM, J.; CAI, Z.; CHEN, Y. Biocompatible Bacterial Cellulose Composites for Biomedical Application. **Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 11006, 2010.

KOJIMA, C.; SUEHIRO, T.; WATANABE, K.; OGAWA, M.; FUKUHARA, A.; NISHISAKA, E.; HARADA, A.; KONO, K.; INUI, T.; MAGATA, Y. Doxorubicin-Conjugated Dendrimer/collagen Hybrid Gels for Metastasis-Associated Drug Delivery Systems. **Acta Biomater**, v. 9, n. 3, p. 5673–5680, 2013.

KOLAKOVIC, R.; PELTONEN, L.; LAUKKANEN, A.; HIRVONEN, J.; LAAKSONEN, T. Nanofibrillar cellulose films for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 2, p. 308–315, 2012.

KUMAR, P. T. S.; RAMYA, C.; JAYAKUMAR, R.; NAIR, S. K. V; LAKSHMANAN, V. K. Drug delivery and tissue engineering applications of biocompatible pectin-chitin/nano CaCO<sub>3</sub> composite scaffolds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 106, p. 109–116, 2013.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

LAM, P. L.; GAMBARI, R. Advanced progress of microencapsulation technologies: in vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 178, p. 25–45, 28 mar. 2014.

LAMMERS, T.; KIESSLING, F.; HENNINK, W. E.; STORM, G. Nanotheranostics and image-guided drug delivery: Current concepts and future directions. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 6, p. 1899–1912, 2010.

LANKELMA, J.; DEKKER, H.; LUQUE, R. F.; LUYKX, S.; HOEKMAN, K.; VALK, P. Van Der. Doxorubicin Gradients in Human Breast Cancer. v. 5, n. July, p. 1703–1707, 1999.

LEE, E. S.; NA, K.; BAE, Y. H. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 2, p. 405–418, 2005.

LEITÃO, A. F.; GUPTA, S.; PEDRO, J.; REVIKINE, I.; GAMA, M. Hemocompatibility study of a bacterial cellulose / polyvinyl alcohol nanocomposite. **Colloids and Surfaces B:Biointerfaces**, v. 111, n. 111, p. 493–502, 2013.

LI, W.; GUO, R.; LAN, Y.; ZHANG, Y.; XUE, W.; ZHANG, Y. Preparation and properties of cellulose nanocrystals reinforced collagen composite films. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 102, n. 4, p. 1131–1139, 2014.

LIANG, P.; ZHAO, D.; WANG, C. Q.; ZONG, J. Y.; ZHUO, R. X.; CHENG, S. X. Facile preparation of heparin/CaCO<sub>3</sub>/CaP hybrid nano-carriers with controllable size for anticancer drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 783–788, 2013.

LIM, E.; WINER, E. P. Adjuvant chemotherapy in luminal breast cancers. **Breast**, v. 20, n. SUPPL. 3, p. S128–S131, 2011.

LINCE, F.; BOLOGNESI, S.; STELLA, B.; MARCHISIO, D. L.; DOSIO, F. Preparation of polymer nanoparticles loaded with doxorubicin for controlled drug delivery. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 11, p. 2410–2419, 2011.

LIU, S. Epigenetics Advancing Personalized Nanomedicine in Cancer Therapy. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 64, n. 13, p. 1532–1543, 2012.

LIU, S. Q.; TONG, Y. W.; YANG, Y. Y. Incorporation and in vitro release of doxorubicin in thermally sensitive micelles made from poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide)-b- poly(D,L-lactide-co-glycolide) with varying compositions. **Biomaterials**, v. 26, n. 24, p. 5064–5074, 2005.

LIU, S. Q.; WIRADHARMA, N.; GAO, S. J.; TONG, Y. W.; YANG, Y. Y. Bio-functional micelles self-assembled from a folate-conjugated block copolymer for targeted intracellular delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v. 28, n. 7, p. 1423–1433, 2007.

LIU, X.; MA, Y.; ZHOU, Y.; PEI, C.; YIN, G. A promising hybrid scaffold material: Bacterial cellulose in-situ assembling biomimetic lamellar CaCO<sub>3</sub>. **Materials Letters**, v. 102–103, p. 91–93, 2013.

LOPES DURAN, T.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C.; GREIN, A.; TISCHER, C. A.; FARIA-TISCHER, P. C. de S. Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: Production and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 401–408, 2014.

MA, M. G.; DONG, Y. Y.; FU, L. H.; LI, S. M.; SUN, R. C. Cellulose/CaCO<sub>3</sub> nanocomposites: Microwave ionic liquid synthesis, characterization, and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2,

p. 1669–1676, 2013.

MASOOD, F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. **Materials Science and Engineering: C**, v. 60, p. 569–578, 2015.

MATAHWA, H.; RAMIAH, V.; SANDERSON, R. D. Calcium carbonate crystallization in the presence of modified polysaccharides and linear polymeric additives. **Journal of Crystal Growth**, v. 310, n. 21, p. 4561–4569, 2008.

MENDES, P. N.; RAHAL, S. C.; PEREIRA-JUNIOR, O. C. M.; FABRIS, V. E.; LENHARO, S. L. R.; DE LIMA-NETO, J. F.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. In vivo and in vitro evaluation of an *Acetobacter xylinum* synthesized microbial cellulose membrane intended for guided tissue repair. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 51, p. 12, 2009.

MINKO, T.; BATRAKOVA, E. V.; LI, S.; LI, Y.; PAKUNLU, R. I.; ALAKHOV, V. Y.; KABANOV, A. V. Pluronic block copolymers alter apoptotic signal transduction of doxorubicin in drug-resistant cancer cells. **Journal of Controlled Release**, v. 105, n. 3, p. 269–278, 2005.

MIZUTANI, H.; TADA-OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; KOJIMA, M.; KAWANISHI, S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life Sciences**, v. 76, n. 13, p. 1439–1453, 2005.

MOHAMAD, N.; MOHD AMIN, M. C. I.; PANDEY, M.; AHMAD, N.; RAJAB, N. F. Bacterial cellulose/acrylic acid hydrogel synthesized via electron beam irradiation: Accelerated burn wound healing in an animal model. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 312–320, 2014.

MOHD AMIN, M. C. I.; AHMAD, N.; HALIB, N.; AHMAD, I. Synthesis and characterization of thermo- and pH-responsive bacterial cellulose/acrylic acid hydrogels for drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 465–473, 2012.

MOHD AMIN, M. C. I.; AHMAD, N.; PANDEY, M.; JUE XIN, C. Stimuli-responsive bacterial cellulose-g-poly(acrylic acid-co-acrylamide) hydrogels for oral controlled release drug delivery. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 9045, n. 2003, p. 1–10, 2013.

MONTAGNA, E.; MAISONNEUVE, P.; ROTMENSZ, N.; CANCELLO, G.; IORFIDA, M.; BALDUZZI, A.; GALIMBERTI, V.; VERONESI, P.; LUINI, A.

PRUNERI, G.; BOTTIGLIERI, L.; MASTROPASQUA, M. G.; GOLDBIRSCHE, A.; VIALE, G.; COLLEONI, M. Heterogeneity of triple-negative breast cancer: Histologic subtyping to inform the outcome. **Clinical Breast Cancer**, v. 13, n. 1, p. 31–39, 2013.

MORRIS, P. G.; KING, F.; KENNEDY, M. J. Cytotoxic chemotherapy for pregnancy-associated breast cancer: single institution case series. **Journal of oncology pharmacy practice : official publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners**, v. 15, n. 4, p. 241–247, 2009.

MÜLLER, D.; RAMBO, C. R.; D.O.S.RECOUVREUX; PORTO, L. M.; BARRA, G. M. O. Chemical in situ polymerization of polypyrrole on bacterial cellulose nanofibers. **Synthetic Metals**, v. 161, n. 1–2, p. 106–111, 2011.

MULLER, D.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M.; SCHREINER, W. H.; BARRA, G. M. Structure and Properties of Polypyrrole/bacterial Cellulose Nanocomposites. **Carbohydr Polym**, v. 94, n. 1, p. 655–662, 2013

NELSON, C. M.; BISSELL, M. J. Modeling dynamic reciprocity: Engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 5, p. 342–352, 2005.

NOH, J. M.; KIM, K. H.; PARK, W.; SUH, C. O.; HUH, S. J.; CHOI, D. H.; KEUM, K. C.; KIM, Y. B. Prognostic significance of nodal involvement region in clinical stage IIIc breast cancer patients who received primary systemic treatment, surgery, and radiotherapy. **Breast**, v. 24, n. 5, p. 637–641, 2015.

NUMATA, Y.; MAZZARINO, L.; BORSALI, R. A slow-release system of bacterial cellulose gel and nanoparticles for hydrophobic active ingredients. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 486, n. 1–2, p. 217–225, 2015.

O'BRIEN, M. E. R.; WIGLER, N.; INBAR, M.; ROSSO, R.; GRISCHKE, E.; SANTORO, A.; CATANE, R.; KIEBACK, D. G.; TOMCZAK, P.; ACKLAND, S. P.; ORLANDI, F.; MELLARS, L.; ALLAND, L.; TENDLER, C. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX???) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 15, n. 3, p. 440–449, 2004.

OGOMI, D.; SERIZAWA, T.; AKASHI, M. Controlled release based on the dissolution of a calcium carbonate layer deposited on hydrogels. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 2, p. 315–323, 2005.

OH, J. K.; DRUMRIGHT, R.; SIEGWART, D. J.; MATYJASZEWSKI, K. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 33, n. 4, p. 448–477, 2008.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592–603, 2004.

ONCOGUIA. **No Title.** Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/instituto-oncoguia/10/13/>>.

OWADALLY, W.; STAFFURTH, J. Principles of cancer treatment by radiotherapy. **Surgery (United Kingdom)**, v. 33, n. 3, p. 127–130, 2015.

PAN, W. L.; WONG, J. H.; FANG, E. F.; CHAN, Y. S.; YE, X. J.; NG, T. B. Differential inhibitory potencies and mechanisms of the type I ribosome inactivating protein marmorin on estrogen receptor (ER)-positive and ER-negative breast cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 5, p. 987–996, 2013.

PANDEY, M.; MOHD AMIN, M. C. CNS Neurotoxicity of Bacterial Cellulose-Poly(acrylamide-Sodium Acrylate) Hydrogel: A Future Therapeutic Carrier. **CNS Neurosci Ther**, 2014.

PANDEY, M.; MOHD AMIN, M. C. I.; AHMAD, N.; ABEER, M. M. Rapid synthesis of superabsorbent smart-swelling bacterial cellulose/acrylamide-based hydrogels for drug delivery. **International Journal of Polymer Science**, v. 2013.

PATRA, P.; MITRA, S.; DAS GUPTA, A.; PRADHAN, S.; BHATTACHARYA, S.; AHIR, M.; MUKHERJEE, S.; SARKAR, S.; ROY, S.; CHATTOPADHYAY, S.; ADHIKARY, A.; GOSWAMI, A.; CHATTOPADHYAY, D. Simple synthesis of biocompatible biotinylated porous hexagonal ZnO nanodisc for targeted doxorubicin delivery against breast cancer cell: In vitro and in vivo cytotoxic potential. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 133, p. 88–98, 2015.

PAVALOIU, R.-D.; STOICA-GUZUN, A.; STROESCU, M.; JINGA, S. I.; DOBRE, T. Composite films of poly(vinyl alcohol)–chitosan–bacterial cellulose for drug controlled release. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 117–124, 2014.

PECTASIDES, D.; PECTASIDES, E.; ECONOMOPOULOS, T. Systemic therapy in metastatic or recurrent endometrial cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, n. 2, p. 177–190, 2007.



PENG, C.; ZHAO, Q.; GAO, C. Sustained delivery of doxorubicin by porous CaCO<sub>3</sub> and chitosan/alginate multilayers-coated CaCO<sub>3</sub> microparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 353, n. 2–3, p. 132–139, 2010.

PENG, H.; LI, K.; WANG, T.; WANG, J.; WANG, J.; ZHU, R.; SUN, D.; WANG, S. Preparation of hierarchical mesoporous CaCO<sub>3</sub> by a facile binary solvent approach as anticancer drug carrier for etoposide. **Nanoscale research letters**, v. 8, n. 1, p. 321, 2013.

PÉRTILE, R. A. N.; MOREIRA, S.; GIL, R. M.; CORREIA, A.; GUÁRDIAO, L. Bacterial Cellulose: Long-Term Biocompatibility Studies. **Journal of Biomaterials Science**, n. April 2013, p. 1339–1354, 2012.

PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial Cellulose-Based Materials and Medical Devices: Current State and Perspectives. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 91, n. 5, p. 1277–1286, 2011.

PICHOT, C. S.; HARTIG, S. M.; XIA, L.; ARVANITIS, C.; MONISVAIS, D.; LEE, F. Y.; FROST, J. a; COREY, S. J. Dasatinib synergizes with doxorubicin to block growth, migration, and invasion of breast cancer cells. **British journal of cancer**, v. 101, n. 1, p. 38–47, 2009.

POLIAKOVÁ, J.; ECKSCHLAGER, T.; HŘEBAČKOVÁ, J.; HRABĚTA, J.; STIBOROVÁ, M. The comparison of cytotoxicity of the anticancer drugs doxorubicin and ellipticine to human neuroblastoma cells. **Interdisciplinary toxicology**, v. 1, n. 2, p. 186–189, 2008.

PRASAD, P.; SHUHENDLER, A.; CAI, P.; RAUTH, A. M.; WU, X. Y. Doxorubicin and mitomycin C co-loaded polymer-lipid hybrid nanoparticles inhibit growth of sensitive and multidrug resistant human mammary tumor xenografts. **Cancer Letters**, v. 334, n. 2, p. 263–273, 2013.

QIU, Y.; PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 49–60, 2012.

RAMBO, C. R.; RECOUVREUX, D. O. S.; CARMINATTI, C. A.; PITLOVANCIV, A. K.; ANTÔNIO, R. V.; PORTO, L. M. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 4, p. 549–554, 2008.

RECOUVREUX, D. O. S.; RAMBO, C. R.; BERTI, F. V.; CARMINATTI, C. a.; ANTÔNIO, R. V.; PORTO, L. M. Novel three-dimensional cocoon-like

hydrogels for soft tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 2, p. 151–157, 2011.

RIEDER, C. L.; MAIATO, H. Stuck in division or passing through: What happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. **Developmental Cell**, v. 7, n. 5, p. 637–651, 2004.

ŘÍHOVÁ, B. Biocompatibility of biomaterials: Hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 21, n. 2, p. 157–176, 1996.

RUSSO, J.; RUSSO, I. H. **Techniques and methodological approaches in breast cancer research**. New York, NY: Springer New York, 2014.

SARISOZEN, C.; ABOUZEID, A. H.; TORCHILIN, V. P. The effect of co-delivery of paclitaxel and curcumin by transferrin-targeted PEG-PE-based mixed micelles on resistant ovarian cancer in 3-D spheroids and in vivo tumors. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 2, p. 539–550, 2014.

SATSANGI, A.; ROY, S. S.; SATSANGI, R. K.; TOLCHER, A. W.; VADLAMUDI, R. K.; GOINS, B.; ONG, J. L. Biomaterials Synthesis of a novel, sequentially active-targeted drug delivery nanoplatfrom for breast cancer therapy. **Biomaterials**, v. 59, p. 88–101, 2015.

SBOC. Manual de Condutas 2011. **Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica**, n. 1806–6054, p. 1–40, 2011.

SCHROEDER, A.; HELLER, D. A.; WINSLOW, M. M.; DAHLMAN, J. E.; PRATT, G. W.; LANGER, R.; JACKS, T.; ANDERSON, D. G. **Treating metastatic cancer with nanotechnology** *Nature Reviews Cancer*, 2011.

SEYFERT, U. T.; BIEHL, V.; SCHENK, J. In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. **Biomolecular Engineering**, v. 19, n. 2–6, p. 91–96, 2002.

SHEN, J.; SONG, Z.; QIAN, X.; YANG, F. Carboxymethyl cellulose/alum modified precipitated calcium carbonate fillers: Preparation and their use in papermaking. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 3, p. 545–553, 2010.

SHI, J.; SHI, J.; FENG, D.; YUE, P.; CAO, S. Stimuli-responsive hybrid composites based on CaCO<sub>3</sub> for controllable drug delivery. **Polym. Bull.**, v. 71, n. 7, p. 1857–1873, 2014.

SILVA, N. H. C. S.; RODRIGUES, A. F.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P. C.; ROSADO, C.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. D.; FREIRE, C. S. R. Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: In vitro dissolution and permeation studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n. 1, p. 264–269, 2014.

SILVESTRE, A. J.; FREIRE, C. S.; NETO, C. P. Do bacterial cellulose membranes have potential in drug-delivery systems? **Expert opinion on drug delivery**, v. 11, n. 7, p. 1113–1124, 2014.

SMITH, L. The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 8, p. 2115–2120, 1 ago. 2006.

SON, Y. J.; JANG, J. S.; CHO, Y. W.; CHUNG, H.; PARK, R. W.; KWON, I. C.; KIM, I. S.; PARK, J. Y.; SEO, S. B.; PARK, C. R.; JEONG, S. Y. Biodistribution and anti-tumor efficacy of doxorubicin loaded glycol-chitosan nanoaggregates by EPR effect. **Journal of Controlled Release**, v. 91, n. 1–2, p. 135–145, 2003.

SONG, G.; DARR, D. B.; SANTOS, C. M.; ROSS, M.; VALDIVIA, A.; JORDAN, J. L.; MIDKIFF, B. R.; COHEN, S.; NIKOLAISHVILI-FEINBERG, N.; MILLER, C. R.; TARRANT, T. K.; ROGERS, A. B.; DUDLEY, A. C.; PEROU, C. M.; ZAMBONI, W. C. Effects of tumor microenvironment heterogeneity on nanoparticle disposition and efficacy in breast cancer tumor models. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 23, p. 6083–6095, 2014.

SPRANKLIN, L.; NAIR, S. Discordance of receptor status in breast cancer throughout tumor progression and the associated prognostic implications: A case report and review of the literature. **Cancer Treatment Communications**, v. 5, n. October 2008, p. 36–38, 2016.

STOICA-GUZUN, A.; STROESCU, M.; JINGA, S. I.; JIPA, I. M.; DOBRE, T. Microwave assisted synthesis of bacterial cellulose-calcium carbonate composites. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 414–422, 2013.

STOICA-GUZUN, A.; STROESCU, M.; JINGA, S.; JIPA, I.; DOBRE, T.; DOBRE, L. Ultrasound Influence upon Calcium Carbonate Precipitation on Bacterial Cellulose Membranes. **Ultrason Sonochem**, v. 19, n. 4, p. 909–915, 2012.

STOICA-GUZUN, A.; STROESCU, M.; TACHE, F.; ZAHARESCU, T.; GROSU, E. Effect of electron beam irradiation on bacterial cellulose

membranes used as transdermal drug delivery systems. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 265, n. 1, p. 434–438, 2007.

STUMPF, T. R.; PERTILE, R. A.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Enriched Glucose and Dextrin Mannitol-Based Media Modulates Fibroblast Behavior on Bacterial Cellulose Membranes. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 33, n. 8, p. 4739–4745, 2013.

SZOT, C. S.; BUCHANAN, C. F.; GATENHOLM, P.; RYLANDER, M. N.; FREEMAN, J. W. Investigation of cancer cell behavior on nanofibrous scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, v. 31, n. 1, p. 37–42, 2011.

SULAEVA, I.; HENNIGES, U.; ROSENAU, T.; POTTHAST, A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1547–1571, 2015.

SUTRADHAR, K. B.; AMIN, L. Review Article Nanotechnology in Cancer Drug Delivery and Selective Targeting. v. 2014, 2014.

SVENSON, S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 445–462, 2009.

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTBERG, M.; GATENHOLM, P. Bacterial Cellulose as a Potential Scaffold for Tissue Engineering of Cartilage. **Biomaterials**, v. 26, n. 4, p. 419–431, 2005.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 157–170, fev. 2012.

TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 49, n. 5, p. 330–352, mar. 2007.

TELLI, M. L.; CARLSON, R. W. First-line chemotherapy for metastatic breast cancer. **Clinical breast cancer**, v. 9 Suppl 2, n. June, p. S66–S72, 2009.

TORRES, F. G.; COMMEAUX, S.; TRONCOSO, O. P. Biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials. **Journal of functional biomaterials**, v. 3, n. 4, p. 864–78, 2012.

TROVATTI, E.; FREIRE, C. S.; PINTO, P. C.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P.;

SILVESTRE, A. J.; NETO, C. P.; ROSADO, C. Bacterial Cellulose Membranes Applied in Topical and Transdermal Delivery of Lidocaine Hydrochloride and Ibuprofen: In Vitro Diffusion Studies. *Int J Pharm*, v. 435, n. 1, p. 83–87, 2012.

TROVATTI, E.; SILVA, N. H. C. S.; DUARTE, I. F.; ROSADO, C. F.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Biocellulose membranes as supports for dermal release of lidocaine. *Biomacromolecules*, v. 12, n. 11, p. 4162–4168, 2011.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Paving the Way for Personalized Medicine. **Department of health and human services**, p. 61, 2013.

ULLAH, H.; WAHID, F.; SANTOS, H. A.; KHAN, T. Advances in Biomedical and Pharmaceutical Applications of Functional Bacterial Cellulose-Based Nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, v. 150, p. 330–352, 2016.

VILELA, C.; FREIRE, C. S. R.; MARQUES, P. A. A. P.; TRINDADE, T.; PASCOAL NETO, C.; FARDIM, P. Synthesis and characterization of new CaCO<sub>3</sub>/cellulose nanocomposites prepared by controlled hydrolysis of dimethylcarbonate. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, n. 4, p. 1150–1156, 2010.

VOICU, G.; GEANALIU-NICOLAE, R. E.; PÎRVAN, A. A.; ANDRONESCU, E.; IORDACHE, F. Synthesis, characterization and bioevaluation of drug-collagen hybrid materials for biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 510, p. 474–484, 2015.

VYROUBAL, R.; SAHA, N.; VESELA, D.; SHAH, R.; SAHA, P. Biomimetic nucleation and growth of CaCO<sub>3</sub> in bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* (*Acetobacter xylinus*). *Current Opinion in Biotechnology*, v. 24, p. S109, 2013.

WANG, C.; HE, C.; TONG, Z.; LIU, X.; REN, B.; ZENG, F. Combination of adsorption by porous CaCO<sub>3</sub> microparticles and encapsulation by polyelectrolyte multilayer films for sustained drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 308, n. 1–2, p. 160–167, 2006.

WANG, J.; CHEN, J. S.; ZONG, J. Y.; ZHAO, D.; LI, F.; ZHUO, R. X.; CHENG, S. X. Calcium carbonate/carboxymethyl chitosan hybrid microspheres and nanospheres for drug delivery. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 114, n. 44, p. 18940–18945, 2010.

WANG, J.; WAN, Y. Z.; LUO, H. L.; GAO, C.; HUANG, Y. Immobilization

of gelatin on bacterial cellulose nanofibers surface via crosslinking technique. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 3, p. 536–541, 2012.

WANG, J.; ZHU, Y.; DU, J. BACTERIAL CELLULOSE: A NATURAL NANOMATERIAL FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS. **Journal of Mechanics in Medicine and Biology**, v. 11, n. 2, p. 285–306, 2011.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591–602, ago. 2005.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941–2953, 2008.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897–5909, 2009.

WOLINSKY, J. B.; COLSON, Y. L.; GRINSTAFF, M. W. Local drug delivery strategies for cancer treatment: Gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. **Journal of Controlled Release**, v. 159, n. 1, p. 14–26, 2012.

WONG, H. L.; RAUTH, A. M.; BENDAYAN, R.; MANIAS, J. L.; RAMASWAMY, M.; LIU, Z.; ERHAN, S. Z.; WU, X. Y. A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 7, p. 1574–1585, 2006.

WONG, H. L.; RAUTH, A. M.; BENDAYAN, R.; WU, X. Y. In vivo evaluation of a new polymer-lipid hybrid nanoparticle (PLN) formulation of doxorubicin in a murine solid tumor model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 3, p. 300–308, 2007.

WONG, S. S.; KASAPIS, S.; TAN, Y. M. Bacterial and plant cellulose modification using ultrasound irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 280–287, 2009.

YANG, F.; JIN, C.; SUBEDI, S.; LEE, C. L.; WANG, Q.; JIANG, Y.; LI, J.; DI, Y.; FU, D. Emerging Inorganic Nanomaterials for Pancreatic Cancer Diagnosis and Treatment. **Cancer Treat Rev**, v. 38, n. 6, p. 566–579, 2012.

YOU, J.; ZHANG, R.; ZHANG, G.; ZHONG, M.; LIU, Y.; VAN PELT, C. S.; LIANG, D.; WEI, W.; SOOD, A. K.; LI, C. Photothermal-chemotherapy with doxorubicin-loaded hollow gold nanospheres: A platform for near-infrared

light-triggered drug release. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 2, p. 319–328, 2012.

ZHANG, Y.; CHAN, H. F.; LEONG, K. W. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 104–120, 2013.

ZHAO, Q.; HAN, B.; WANG, Z.; GAO, C.; PENG, C.; SHEN, J. Hollow chitosan-alginate multilayer microcapsules as drug delivery vehicle: doxorubicin loading and in vitro and in vivo studies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 63–74, 2007.

ZHAO, Q.; ZHANG, S.; TONG, W.; GAO, C.; SHEN, J. Polyelectrolyte microcapsules templated on poly(styrene sulfonate)-doped CaCO<sub>3</sub> particles for loading and sustained release of daunorubicin and doxorubicin. **European Polymer Journal**, v. 42, n. 12, p. 3341–3351, 2006.

ZHONG, Z. F.; QIANG, W. A.; WANG, C. M.; TAN, W.; WANG, Y. T. Furanodiene enhances the anti-cancer effects of doxorubicin on ER $\alpha$ -negative breast cancer cells in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v. 774, p. 10–19, 2016.