



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Rafaela Costa e Silva

**Desenvolvimento de nanocarreadores contendo ácido all-trans retinóico para administração oral e avaliação da atividade antitumoral em modelo de melanoma murino B16F10**

Florianópolis  
2022

Rafaela Costa e Silva

**Desenvolvimento de nanocarreadores contendo ácido all-trans retinóico para administração oral e avaliação da atividade antitumoral em modelo de melanoma murino B16F10**

Dissertação submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Farmácia da Universidade Federal  
de Santa Catarina para a obtenção do título de  
Mestre em farmácia  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Elenara M. T. Lemos Senna, Dr<sup>a</sup>.

Florianópolis  
2022

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

Silva, Rafaela Costa e

Desenvolvimento de nanocarreadores contendo ácido all trans retinóico para administração oral e avaliação da atividade antitumoral em modelo de melanoma murino B16F10 / Rafaela Costa e Silva ; orientadora, Elenara Maria Teixeira Lemos Senna, 2022.  
144 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. ácido all-trans retinoico. 3. melanoma . 4. nanocarreadores. I. Senna, Elenara Maria Teixeira Lemos . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Rafaela Costa e Silva

**Desenvolvimento de nanocarreadores contendo ácido all-trans retinóico para administração oral e avaliação da atividade antitumoral em modelo de melanoma murino B16F10**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Izabella Thaís da Silva  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Dr<sup>a</sup> Fabiana Noronha Dornelles  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)  
CEO/Co-Founder TechPain

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lílian Sibelle Campos Bernardes  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em farmácia.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elenara M. T. Lemos Senna  
Orientadora

Florianópolis, 2022.

Dedico este trabalho de pesquisa aos meus pais. Sua dedicação infinita foi o que me deu forças para alcançar meus objetivos. Mesmo durante os momentos mais difíceis, vocês me ensinaram que nada é impossível.

## **AGRADECIMENTOS**

Acima de tudo, agradeço a meus pais e minha irmã, que me deram total apoio para a realização desse trabalho. Sei que não foi fácil me compreender nesta fase, mas agradeço por todo o apoio. Mesmo sem entender o que estava fazendo, sempre me motivaram a nunca desistir dos meus sonhos.

Agradeço a professora Elenara, por sempre estar disponível para me ensinar, orientar e indicar o melhor caminho a seguir. Obrigada por todos os momentos em que você me manteve calma e disse que tudo seria tranquilo.

Agradeço a meu esposo Michael pela compreensão e encorajamento durante o trabalho. Sei que me ausentei muitas vezes para estudar e trabalhar. Sua presença foi a parte mais importante desta etapa. Obrigada por suportar meus momentos de estresse, cansaço e cuidar do nosso lar para que eu pudesse me dedicar a pesquisa.

Agradeço aos membros da banca por dedicarem o seu tempo e conhecimento para contribuir com o meu trabalho de pesquisa.

Agradeço a Ananda, aluna de iniciação científica, por ser meu braço direito, meus olhos e até meu cérebro em alguns momentos dessa jornada. Não sei o que faria sem seu apoio, amizade e incentivo. Poder fazer parte da formação de uma nova cientista foi uma experiência incrível.

Agradeço a todos os meus colegas do Hospital Universitário da UFSC, em especial Alaíde e Leide. O apoio de vocês foi essencial para me manter de pé durante toda essa caminhada. Ninguém sabe melhor do que vocês sobre o dia a dia da minha múltipla jornada de trabalho.

Agradeço aos amigos dos laboratórios de Farmacotécnica e Cosmetologia e LabCancer da UFSC por sempre estarem dispostos a me ajudar nos experimentos, a dar uma palavra de carinho e esperança. A convivência com vocês me ensinou a ser uma pessoa melhor, saber trabalhar nas adversidades e jamais desistir da pesquisa.

Agradeço as minhas amigas Stefane, Francielly e Marina, pois sempre me incentivaram a nunca desistir dos meus sonhos.

Agradeço a todos os professores da UFSC pela oportunidade de conhecê-los. Tenho certeza de que a melhor parte de cada um estará guardada comigo. Vocês são minha inspiração para seguir multiplicando o conhecimento que recebi.

Eu gostaria de agradecer a mim mesma por ter chegado até aqui. Vivenciar a realidade de trabalhar em plantão noturno e fazer um projeto de mestrado ao mesmo tempo, com pandemia e tudo mais, foi um processo bem difícil. É uma conquista muito grande trabalhar em um hospital universitário e realizar a pós graduação em uma universidade pública, mas o preço que se paga é a abdicação da família e amigos, um imenso cansaço e redução do tempo para me dedicar aos experimentos e escrita. Ao ver meu projeto concluído, todo o cansaço se torna uma imensa alegria, por ter concluído mais esta etapa da minha vida, e gera a força necessária para continuar em frente.

“Eu levanto a minha voz, não para que eu possa gritar, mas para que aqueles sem voz possam ser ouvidos... não é possível prosperar quando metade das pessoas ficam para trás.”

Malala Yousafzai – Nobel da Paz (2014)

## RESUMO

O ácido all-trans retinóico (ATRA) é um derivado da vitamina A com potente atividade antitumoral, que possui como efeito biológico a regulação da diferenciação e proliferação celular, sendo considerado o fármaco de primeira escolha no tratamento de leucemia pró-mielocítica aguda. Estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciaram que o ATRA apresenta atividade antitumoral frente ao melanoma metastático. Entretanto, o ATRA apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, limitando sua administração por via oral e necessitando de doses elevadas para a obtenção de efeitos farmacológicos. Para contornar esse problema, o desenvolvimento de nanocarreadores contendo o ATRA foi proposto neste trabalho. Previamente, a solubilidade do ATRA em diferentes óleos foi avaliada e o óleo de rícino foi selecionado devido a sua maior capacidade de solubilizar o fármaco. Nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas brancas e contendo ATRA foram desenvolvidas usando a técnica de emulsificação espontânea e deposição interfacial do polímero pré-formado, respectivamente. A lecitina de soja foi empregada como surfactante lipofílico e Poloxamer 188 e Tween® 80 como surfactantes hidrofílicos. Para a obtenção das nanocápsulas, dois polímeros gastroresistentes, o Eudragit® S100 e o acetato ftalato de celulose, foram testados. As formulações foram avaliadas quanto as suas características de tamanho e índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulação do ATRA. Um método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado para quantificação do ATRA nas formulações. O método analítico mostrou ser específico, linear, preciso, exato e robusto. Suspensões coloidais de nanoemulsões e nanocápsulas monodispersas e com tamanho de cerca de 200 nm e potencial zeta negativo foram obtidas. O teor de ATRA nas formulações foi de cerca de 900 µg/mL e a eficiência de encapsulação foi maior que 99%, indicando que o ATRA se encontra preferencialmente associado às gotículas/partículas. Os estudos de estabilidade indicaram que as formulações são estáveis durante 60 dias, e que a encapsulação foi capaz de proteger o fármaco da rápida degradação. O perfil de liberação do ATRA a partir dos diferentes nanocarreadores foi avaliado pelo método do saco de diálise e após incubação direta das formulações nos meios de liberação gástrico e intestinal simulados. Os perfis de liberação mostraram um baixo percentual do ATRA liberado após 24 h (< 10%), tanto para o ATRA livre como encapsulado, quando o método do saco de diálise foi empregado. Uma maior liberação do ATRA foi verificada para a nanoemulsão após 6 h de incubação direta da formulação em meio intestinal simulado, mostrando a maior capacidade deste sistema em liberar o fármaco. A atividade citotóxica *in vitro* foi avaliada pelo ensaio do MTT em células de melanoma murino B16F10. Os resultados mostraram uma redução significativa da viabilidade celular após tratamento com os nanocarreadores, quando comparado ao fármaco livre ( $p < 0,05$ ). Estudos preliminares de atividade antitumoral *in vivo* foram realizados em modelo de melanoma murino após inoculação das células B16F10 no dorso de camundongos C57BL/6, seguido do tratamento oral com ATRA livre e nanoencapsulado, na dose de 10 mg/kg. Entretanto, nas condições testadas não foi observado redução no volume do tumor entre os grupos tratados, indicando que estudos devem ainda ser realizados para otimização das condições do ensaio de atividade antitumoral.

**Palavras-chaves:** ácido all-trans retinoico, nanoemulsões, nanocápsulas, melanoma

## ABSTRACT

All-trans retinoic acid (ATRA) is a vitamin A derivative with potent antitumor activity, which has the biological effect of regulating cell differentiation and proliferation, being considered the drug of first choice in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *In vitro* and *in vivo* studies have evidenced the antitumor activity of ATRA against metastatic melanoma. However, ATRA exhibits low water solubility, limiting its oral administration and requiring high doses to obtain pharmacological effects. Thus, in this study, the development of nanocarriers containing ATRA was proposed to overcome this drawback. Previously, the solubility of ATRA in different oils was evaluated, and castor oil was selected due to its greater ability to solubilize the drug. Unloaded and ATRA-loaded nanoemulsions and polymeric nanocapsules were developed using the spontaneous emulsification and the interfacial deposition of the preformed polymer method, respectively. Soy lecithin was used as lipophilic surfactant, and Poloxamer 188 and Tween® 80 as hydrophilic surfactants. Two gastro-resistant polymers, Eudragit® S100 and cellulose acetate phthalate, were tested to obtain nanocapsules. The formulations were evaluated according to size and polydispersity index, zeta potential, pH, drug content, and encapsulation efficiency. A high-performance liquid chromatography analytical method was developed and validated to quantify ATRA in the formulations. The analytical method was specific, linear, precise, accurate, and robust. Monodisperse colloidal dispersions of nanoemulsions and nanocapsules with a mean size of about 200 nm and negative zeta potential values were obtained. The ATRA content in the formulations was about 900 µg/mL, and the encapsulation efficiency was higher than 99%, indicating the drug is preferentially associated with the nanodroplets/nanoparticles. Stability studies indicated that the formulations were stable for 60 days and that nanoencapsulation could protect the drug from rapid degradation. The ATRA release profile from the different nanocarriers was evaluated by the dialysis bag method and after direct incubation of the formulations in simulated gastric and intestinal release media. The release profiles showed a low percentage of ATRA released after 24 h (< 10%) for free and encapsulated ATRA when the dialysis bag method was employed. A greater release of ATRA was verified for the nanoemulsion after 6 h of direct incubation of the formulation in a simulated intestinal medium, showing the greater capacity of this system to release the drug. *In vitro* cytotoxic activity was evaluated using the MTT method on B16F10 murine melanoma cells. The results showed a significant reduction in cell viability after treatment of the cells with the ATRA-loaded nanocarriers compared to the free drug ( $p < 0.05$ ). Preliminary *in vivo* antitumor activity studies were performed in a murine melanoma model after inoculation of B16F10 cells on the back of C57BL/6 mice, followed by the oral treatment with the free drug and ATRA-loaded nanocarriers at a dose of 10 mg/kg. However, under the conditions tested, no reduction in tumor volume was observed between the treated groups, indicating that studies must still be carried out to optimize the conditions of the antitumor activity assay.

**Keywords:** all-trans retinoic acid, nanoemulsions, nanocapsules, melanoma

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do melanócito e melanina. ....	15
Figura 2 - Sistema ABCDE para o diagnóstico do melanoma. ....	17
Figura 3 - Progressão da linha do tempo dos tratamentos aprovados pelo FDA para melanoma, descritas cronologicamente desde o primeiro tratamento aprovado, dacarbazina, em 1974 até a combinação mais recentemente aprovada de binimetinibe com encorafenibe em 2018. ....	20
Figura 4 - Estrutura química do ATRA. ....	23
Figura 5 - Mecanismo de ação gênica do ATRA. ....	25
Figura 6 – Exemplos de reações de isomerização e metabolismo oxidativo catalisado pelo citocromo P450 dos retinóides. ....	29
Figura 7 - Representação esquemática dos principais nanocarreadores lipídicos de fármacos. ....	32
Figura 8 - Representação esquemática da estrutura de uma nanoemulsão O/A, contendo surfactante e co-surfactante. ....	34
Figura 9 - Representação da estrutura de nanocápsulas poliméricas mostrando: (a) núcleo interno lipídico revestido por uma membrana polimérica, (b) modo de associação das substâncias ativas às partículas. ....	35
Figura 10 - Características fisiológicas do TGI que influenciam a administração oral de fármacos. ....	41
Figura 11 - Mecanismos de absorção de fármacos encapsulados. em sistemas nanoestruturados lipídicos. ....	45
Figura 12 - Aspecto macroscópico dos nanocarreadores. (a) Formulações NEA <sub>P1</sub> e NEA <sub>P2</sub> . (b) Formulações NEB e NEA <sub>T2</sub> . ....	77
Figura 13 – Cromatograma obtido após análise de uma solução padrão de ATRA por CLAE com detecção em 353 nm. ....	80
Figura 14 – Cromatograma obtido após análise de uma dispersão de nanocápsulas poliméricas brancas (NCB <sub>CAP</sub> ) por CLAE com detecção de 353 nm. ....	80
Figura 15 – Curva de calibração de ATRA obtido por CLAE. ....	81

Figura 16 - Teor de ATRA (%) após armazenamento das formulações durante 60 dias em (a) temperatura ambiente (b) sob refrigeração. ....	89
Figura 17 - Tamanho (barras) e PDI (linhas) das formulações armazenada em (a) temperatura ambiente e (b) sob refrigeração. Potencial zeta das formulações armazenadas em (c) temperatura ambiente e (d) sob refrigeração (d).....	91
Figura 18 - Cromatograma obtido após 60 dias de armazenamento da formulação NEA <sub>T2</sub> . Todas as formulações apresentaram o mesmo aspecto.....	91
Figura 19 - Representação dos perfis de transmissão de luz dos nanocarreadores contendo ATRA sujeitas à centrifugação de 4000 RPM a 25 °C. (a) NEA <sub>T2</sub> , (b) NCA <sub>EUD</sub> e (c) NCA <sub>CAP</sub> ..	93
Figura 20 - Valores de índice de estabilidade para as diferentes formulações de nanocarreadores contendo ATRA, obtidos através do estudo de estabilidade acelerada (n = 3). ....	94
Figura 21 - Cromatograma obtido a partir da solução de ATRA no meio HCl 0,1 N contendo LSS 0,5% (m/V). Ambos os meios apresentam o mesmo perfil cromatográfico. ....	97
Figura 22 - Curvas de calibração obtidas para os meios (a) HCl 0,1 N e (b) Tampão fosfato pH 6,8, ambos contendo LSS 0,5% (m/V) .....	98
Figura 23 - Perfis de degradação do ATRA após incubação em (a) HCl 0,1 N e (b) Tampão fosfato pH 6,8, ambos contendo LSS 0,5% (m/V) .....	100
Figura 24 – Valores de porcentagem de fármaco liberada ao longo do tempo no meio (a) tampão fosfato pH 6,8 e (b) HCl 0,1 N, ambos contendo LSS 0,5% (m/V) (n = 3) .....	102
Figura 25 - Porcentagem de liberação do ATRA após 6 h de incubação dos nanocarreadores e do fármaco livre em tampão fosfato pH 6,8 contendo LSS 0,5% (m/V) (n = 3).....	104
Figura 26 - Valores de viabilidade celular obtidos após 72 h de incubação do ATRA livre e dos nanocarreadores (a) NEA <sub>T2</sub> , (b) NCA <sub>EUD</sub> , e (c) NCA <sub>CAP</sub> em cultura de células de melanoma B16F10.....	106
Figura 27 - Valores de viabilidade celular obtidos após 72 h de incubação do ATRA livre, CDDP e dos nanocarreadores contendo ATRA em diferentes concentrações em combinação com 10 µM de CDDP em cultura de células de melanoma B16F10. ....	109

Figura 28 – Valores de CI obtidos após avaliação da citotoxicidade do ATRA nanoencapsulado em diferentes concentrações em combinação com 10 µM de CDDP frente às células de melanoma murino B16F10. ....	109
Figura 29 - Resultados obtidos na avaliação da atividade antitumoral após administração do ATRA livre e nanoencapsulado na dose de 10 mg/kg em modelo de melanoma murino, após inoculação de 5 x 10 <sup>5</sup> células B16F10 pela via subcutânea no dorso de camundongos C57BL/6. (a) Volume do tumor, (b) peso corporal dos animais e (c) sobrevivência dos animais determinados ao longo do ensaio. ....	112
Figura 30 - Fotografia dos tumores coletados dos camundongos após a administração do ATRA livre e nanoencapsulado na dose de 10 mg/kg em modelo de melanoma murino, após inoculação de 5 x 10 <sup>5</sup> células B16F10 pela via subcutânea no dorso de camundongos C57BL/6. ....	113

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos subtipos de melanoma. ....	18
Tabela 2 - Composição das nanoemulsões brancas (NEB) preparadas pela técnica de emulsificação espontânea. ....	55
Tabela 3 – Composição das nanoemulsões (NEA) contendo ATRA.....	56
Tabela 4 - Composição das nanocápsulas brancas (NCB) e contendo ATRA (NCA) preparadas pela técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado.....	58
Tabela 5 - Parâmetros avaliados para determinação da robustez da metodologia analítica para a determinação do teor de ATRA por CLAE.....	63
Tabela 6 - Composição dos meios testados para realização do teste de liberação.....	65
Tabela 7 - Solubilidade do ATRA em diferentes óleos. ....	72
Tabela 8 - Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanoemulsões brancas (n=3).....	75
Tabela 9 - Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanoemulsões contendo ATRA (n=3). ....	76
Tabela 10 - Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanocápsulas brancas e contendo ATRA (n=3).....	79
Tabela 11 - Resultados experimentais obtidos para a avaliação da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia) do método de CLAE. ....	82
Tabela 12 - Resultados experimentais obtidos na avaliação da exatidão do método de CLAE para a determinação de ATRA nos nanocarreadores. ....	83
Tabela 13 - Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método desenvolvido por CLAE para quantificação de ATRA em nanocarreadores ....	84
Tabela 14 - Valores de teor, recuperação e eficiência de encapsulação de ATRA nos nanocarreadores (n=3).....	86
Tabela 15 - Solubilidade do ATRA ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes meios de liberação. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão de três determinações.....	96

Tabela 16 - Equação da reta e valores de $r^2$ , LD e LQ obtidos a partir das curvas de calibração do ATRA em ácido clorídrico 0,1 N e tampão fosfato pH 6,8, ambos contendo LSS 0,5% (m/V).....	98
Tabela 17 - Valores de $r^2$ e valores de tempo de meia-vida obtidos segundo cinética de primeira ordem para o ATRA, após incubação do fármaco na forma não encapsulada e encapsulada em HCl 0,1 N contendo LSS 0,5% (m/V).....	101
Tabela 18 - Valores de $IC_{50}$ em $\mu M$ calculados para o ATRA livre e nanoencapsulado em diferentes formulações. ....	107
Tabela 19 - Resultados obtidos na avaliação da atividade antitumoral após administração do ATRA livre e nanoencapsulado na dose de 10 mg/kg em modelo de melanoma murino, após inoculação de $5 \times 10^5$ células B16F10 pela via subcutânea no dorso de camundongos C57BL/6.....	113

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>&lt;</b>	Menor
<b>&gt;</b>	Maior
<b>5-FU</b>	5-fluorouracil
<b>A/O</b>	Água em óleo
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfato
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ATRA</b>	Ácido all-trans retinóico
<b>AUC</b>	Área sob a curva
<b>BHA</b>	Terc-butil hidroxianisol
<b>BHT</b>	Hidroxitolueno butilado
<b>BRAF</b>	Proto-oncogene B-Raf
<b>CAP</b>	Acetato ftalato de celulose
<b>CDDP</b>	Cisplatina
<b>CI</b>	Índice de combinação
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>cm</b>	Centímetro
<b>C<sub>max</sub></b>	Concentração plasmática máxima
<b>CTLA-4</b>	Proteína citotóxica associada a linfócito T
<b>D</b>	Dalton
<b>DBZ</b>	Dacarbazina
<b>DNA</b>	Ácido desoxidoribonucleido
<b>DPR</b>	Desvio padrão relativo
<b>DLVO</b>	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
<b>EE</b>	Eficiência de encapsulação
<b>EGFR</b>	Fator de crescimento epidérmico
<b>EO</b>	Óxido de etileno
<b>EROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>EUD</b>	Eudragit® S100
<b>FDA</b>	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos
<b>GLOBOCAN</b>	Estatísticas Globais do Câncer

<b>HPCD</b>	2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>i.e.</b>	isto é
<b>ICAM-1</b>	Gene I da molécula de adesão intercelular
<b>IFN-g</b>	Interferon gama
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Cancer
<b>IPD</b>	Índice de polidispersão
<b>IUB</b>	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
<b>IUPAC</b>	União Internacional da Química Pura e Aplicada
<b>IVIVC</b>	Correlação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
<b>LSS</b>	Lauril sulfato de sódio
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LPMA</b>	Leucemia promielocítica aguda
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>m</b>	Metro
<b>m/v</b>	Relação massa/volume
<b>MAP</b>	Proteína mitogeno-ativada
<b>MDSC</b>	Célula supressora mielóide
<b>MEK</b>	Quinase ativadora da MAP quinase
<b>mg</b>	Miligramas
<b>mm</b>	Milímetros
<b>MSH</b>	Hormônio estimulante de melanócitos
<b>mV</b>	Milivolt
<b>NCA</b>	Nanocápsulas poliméricas contendo ATRA
<b>NCB</b>	Nanocápsulas brancas
<b>NEA</b>	Nanoemulsões contendo ATRA
<b>NEB</b>	Nanoemulsões brancas
<b>NF1</b>	Neurofibromina 1
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>NRAS</b>	Oncogene viral RAS de neuroblastoma
<b>O/A</b>	Óleo em água
<b>°C</b>	Graus Celsius

<b>PD-1</b>	Proteína de morte celular programada 1
<b>PDL-1</b>	Ligante da proteína de morte celular programada 1
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PML</b>	Leucemia promielocítica
<b>PO</b>	Óxido de propileno
<b>RAR</b>	Receptor de ácido retinóico
<b>RARE</b>	Elementos responsivos ao ácido retinóico
<b>SS</b>	<i>Sample and Separate</i>
<b>TCL</b>	Triglicerídeos de cadeia longa
<b>TCM</b>	Triglicerídeos de cadeia média
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal
<b>TNF-a</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V/V</b>	Relação volume/volume
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento vascular endotelial
<b>VNR</b>	Vinorelbina
<b>TMZ</b>	Temozolomida
<b>α</b>	Alfa
<b>β</b>	Beta
<b>γ</b>	Gama

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....</b>	<b>15</b>
3.1	MELANOMA.....	15
3.1.1	<i>Diagnostico, classificação e estadiamento .....</i>	<i>16</i>
3.1.2	<i>Condutas terapêuticas.....</i>	<i>19</i>
3.2	ÁCIDO ALL-TRANS-RETINÓICO.....	22
3.2.1	<i>Mecanismo de ação e aplicações clínicas.....</i>	<i>24</i>
3.2.2	<i>Atividade do ATRA frente ao melanoma.....</i>	<i>26</i>
3.2.3	<i>Farmacocinética e efeitos adversos .....</i>	<i>27</i>
3.3	NANOCARREADORES DE FÁRMACOS .....	31
3.3.1	<i>Nanoemulsões.....</i>	<i>33</i>
3.3.2	<i>Nanocápsulas poliméricas.....</i>	<i>35</i>
3.3.3	<i>Caracterização dos nanocarreadores de fármacos .....</i>	<i>37</i>
3.4	VIA DE ADMINISTRAÇÃO ORAL .....	40
3.4.1	<i>Fisiologia do TGI e barreiras para a absorção de fármacos .....</i>	<i>40</i>
3.4.2	<i>Administração oral de nanocarreadores.....</i>	<i>43</i>
3.4.3	<i>Estratégias adicionais para aumentar a absorção e biodisponibilidade de fármacos em nanocarreadores.....</i>	<i>46</i>
3.5	SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO ATRA .....	48
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>52</b>
4.1	MATERIAIS .....	52
4.1.1	<i>Matérias-primas.....</i>	<i>52</i>
4.1.2	<i>Solventes e Reagentes.....</i>	<i>52</i>
4.1.3	<i>Equipamentos.....</i>	<i>52</i>
4.2	MÉTODOS.....	53
4.2.1	<i>Desenvolvimento dos nanocarreadores contendo ATRA .....</i>	<i>53</i>

4.2.2	<i>Caracterização físico-química dos nanocarreadores.....</i>	58
4.2.3	<i>Desenvolvimento e validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação do teor de ATRA livre e nos nanocarreadores.....</i>	60
4.2.4	<i>Estudos de estabilidade dos nanocarreadores contendo ATRA.....</i>	63
4.2.5	<i>Avaliação do perfil de liberação do ATRA a partir dos nanocarreadores.....</i>	64
4.2.6	<i>Avaliação da atividade citotóxica do ATRA livre e nanoencapsulado, utilizando cultura de células de melanoma B16F10.....</i>	68
4.2.7	<i>Avaliação preliminar da eficácia terapêutica dos nanocarreadores contendo ATRA em modelo de melanoma murino.....</i>	70
4.2.8	<i>Análise estatística.....</i>	71
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
5.1	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCARREADORES CONTENDO ATRA .....	72
5.1.1	<i>Determinação da solubilidade do ATRA em diferentes óleos.....</i>	72
5.1.2	<i>Preparação e caracterização físico-química das nanoemulsões brancas e contendo ATRA.....</i>	73
5.1.3	<i>Preparação e caracterização físico-química das nanocápsulas brancas e contendo ATRA.....</i>	77
5.1.4	<i>Determinação do teor de ATRA nos nanocarreadores por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</i>	79
5.1.5	<i>Estudos de estabilidade dos nanocarreadores contendo ATRA.....</i>	86
5.1.6	<i>Avaliação do perfil de liberação do ATRA a partir dos nanocarreadores.....</i>	94
5.1.7	<i>Avaliação da atividade citotóxica do ATRA livre e nanoencapsulado, utilizando cultura de células de melanoma B16F10.....</i>	104
5.1.8	<i>Avaliação preliminar da eficácia terapêutica dos nanocarreadores contendo ATRA em modelo de melanoma murino.....</i>	111

<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>116</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXO A – CERTIFICADO CEUA .....</b>	<b>132</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de pele é a doença maligna mais comum encontrada particularmente em Caucasianos, com mais de um milhão de casos ocorrendo a cada ano. Os vários tipos de câncer de pele são denominados de acordo com o tipo de célula de origem. Os mais comuns incluem o carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular, que juntos são referidos como câncer de pele não melanocíticos. Mais raro e letal que os carcinomas, o melanoma é o tipo mais agressivo de câncer de pele (ORTHABER *et al.*, 2017).

O melanoma cutâneo pode ser definido como um tumor maligno desencadeado pela transformação e proliferação atípica dos melanócitos, células epiteliais produtoras de melanina, geralmente localizados na junção dermoepidérmica da pele. Representa aproximadamente 4% de todos os tumores cutâneos e, apesar de sua baixa incidência, é o câncer de pele mais importante, devido a sua alta morbidade e mortalidade. A prevenção e o diagnóstico precoce são as principais ferramentas para o controle da doença, pois quando diagnosticado tardiamente, pode se infiltrar para a derme e torna-se um tumor de elevado índice metastático e resistente às terapias convencionais (BONALUMI; CAMPOS; LEAL, 2017).

Segundo a GLOBOCAN, em 2018 ocorreram 18 milhões de casos novos de câncer no mundo todo, dos quais 287.723 foram de melanoma (1,6%), com 60.712 óbitos (0,6% do total de óbitos) (BRAY *et al.*, 2018). No Brasil, as estimativas apontam que no triênio 2020-2022 ocorrerão 625 mil casos novos de câncer. Quanto ao câncer de pele melanoma, o número de casos novos estimados é de 4.200 em homens e de 4.250 em mulheres a cada ano. Esses valores correspondem a um risco estimado de 4,03 casos novos para cada 100 mil homens e 3,94 para cada 100 mil mulheres, sendo este tipo de câncer mais incidente na Região Sul, quando comparado com as demais Regiões do Brasil (INCA, 2019).

O melanoma é considerado uma doença multifatorial, influenciada por fatores genéticos combinados à exposição ambiental. O fator de risco ambiental mais relevante para o desenvolvimento da doença é a exposição aos raios ultravioleta (UV), tanto provenientes de fontes naturais, como artificiais, devido ao seu poder genotóxico. Exposição intensa aos raios solares, em horários de sua maior incidência, sem o uso de proteção solar, histórico de queimaduras solares, principalmente na

infância, com formação de bolhas, e utilização de camas de bronzeamento estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento do melanoma (RASTRELLI *et al.*, 2014).

O diagnóstico do melanoma baseia-se primeiramente no exame clínico do paciente, com observação cuidadosa da pele e lesão, e atenção a história prévia do indivíduo. O melanoma pode surgir em qualquer localização da pele e mucosas integras, com surgimento de lesões pigmentadas atípicas, com sintomas de prurido e/ou descamação, ou a partir de um nevo preexistente, que apresente assimetria, bordas irregulares, mudança de coloração e aumento do diâmetro (BONALUMI; CAMPOS; LEAL, 2017). As opções de tratamento baseiam-se principalmente no estágio da doença, e pode requerer a excisão cirúrgica, nos estágios iniciais, e a radioterapia e quimioterapia isoladas ou em combinação, nos estágios mais avançados (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

As terapias sistêmicas são indicadas em estágio II, III e IV da doença e incluem a quimioterapia, imunoterapia e terapia-alvo (COSTA *et al.*, 2019). O uso sistêmico da dacarbazina tem sido a primeira escolha para o tratamento do melanoma, no entanto, a monoterapia com este fármaco mostrou não modificar a sobrevida dos pacientes, quando comparada aos cuidados paliativos. A introdução da imunoterapia com agentes anti-CTLA-4 (proteína citotóxica associada a linfócito T) e anti-PD-1/PDL-1 (proteína de morte celular programada 1) e da terapia-alvo para tumores com mutações do gene BRAF tem propiciado um aumento da sobrevida dos pacientes, sendo incorporadas à prática clínica, mas acarretando um significativo aumento do custo do tratamento (CORRÊA *et al.*, 2019).

O ATRA é o derivado natural mais potente da vitamina A, o qual tem demonstrado muitos efeitos biológicos relacionados à diferenciação e inibição da proliferação celular, regulando o crescimento celular e apoptose em vários tipos de câncer. Sua ação é mediada pela ligação a receptores de ácido retinóico (RARs), ativando elementos responsivos ao ácido retinóico (RARE) e regulando transcricionalmente a expressão gênica (ALIZADEH *et al.*, 2014; BERLIN GRACE; REJI; SUNDARAM, 2017). No melanoma, estudos mostraram que o ATRA é capaz de inibir o crescimento do tumor, suprimir a formação de metástases, e induzir a expressão ou reduzir a perda do gene RAR em células tumorais (CHEN *et al.*, 2014; VISWANATHAN; BERLIN GRACE, 2018). Além disso, o ATRA inibe o fator de

crescimento endotelial vascular, que é crucial para o processo de angiogênese tumoral, reduz a síntese de DNA, induz alterações morfológicas, prolonga o tempo de duplicação de células e reduz a densidade de saturação celular (SIDDIKUZZAMAN; GURUVAYOORAPPAN; BERLIN GRACE, 2011).

A via oral é a forma de administração de medicamentos mais comum por apresentar vantagens como maior facilidade de administração e conveniência para o paciente e menor custo de produção, quando comparada, por exemplo, às vias injetáveis. Cerca de 60% dos medicamentos comercialmente disponíveis são administrados por via oral, representando em torno de 90% do mercado global de produtos farmacêuticos destinados ao uso humano. Entretanto, o desenvolvimento de formulações de uso oral apresenta muitos desafios, atribuídos às propriedades químicas dos fármacos, como baixa solubilidade aquosa e baixa permeabilidade através das membranas plasmáticas. Adicionalmente, a absorção de fármacos oralmente administrados pode ser limitada devido à baixa estabilidade química e biológica nos fluidos do trato gastrointestinal, à presença de transportadores de efluxo e ao metabolismo pré-sistêmico (ALQAHTANI *et al.*, 2021).

A administração do ATRA pela via oral foi aprovada pela Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration - FDA*) em 1995 e representa, atualmente, a terapia farmacológica de primeira escolha para o tratamento da leucemia pró-mielocítica aguda em adultos e neuroblastoma em crianças, sendo este fármaco disponível comercialmente na forma de cápsulas na dose de 10 mg (GIULI *et al.*, 2020; ROCHE, 2015). No entanto, a administração do ATRA pela via oral tem sido limitada devido as suas características de baixa solubilidade aquosa (0,19 µg/mL) e baixa permeabilidade, que conduzem a uma baixa absorção a partir do trato gastrointestinal (GIULI *et al.*, 2020) Além disso, estudos farmacocinéticos indicaram uma ampla variabilidade das concentrações plasmáticas do ATRA após administração oral na dose de 45 mg/m<sup>2</sup> durante 15 dias. Este resultado foi relacionado em parte às diferenças individuais no metabolismo pré-sistêmico intestinal e hepático e à incompleta absorção do ATRA no trato gastrointestinal (OZPOLAT *et al.*, 2003; SAADEDDIN *et al.*, 2004). Assim, embora seja muito ativo, o ATRA apresenta baixa biodisponibilidade oral, em torno de 50%, o que tem sido uma grande limitação para seu uso terapêutico, como uma forma de administração não invasiva (DAVID *et al.*, 2010; SIDDIKUZZAMAN; GRACE, 2014).

Várias estratégias têm sido adotadas visando o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. Entre elas, o emprego de nanocarreadores com tamanho entre algumas dezenas a algumas centenas de nanômetros tem mostrado melhorar as propriedades biofarmacêuticas dos mesmos e oferecem soluções para contornar as limitações associadas à segurança e eficácia terapêutica dos medicamentos (HAIDER *et al.*, 2020; TALEGAONKAR; BHATTACHARYYA, 2019). Entre as propriedades, a elevada relação entre área superficial e volume permite o maior contato do sistema de liberação com as superfícies absorptivas. Além disso, o aumento da solubilidade, proteção frente ao ambiente fisiológico hostil, controle da liberação e possibilidade de vetorização nas diferentes regiões do trato gastrointestinal (TGI) são outras vantagens do uso desses sistemas para administração oral de fármacos (HAIDER *et al.*, 2020; TALEGAONKAR; BHATTACHARYYA, 2019).

Considerando o exposto acima, este trabalho propõe o desenvolvimento de nanocarreadores contendo ATRA, como as nanoemulsões e as nanocápsulas poliméricas visando sua potencial aplicação para o tratamento oral do melanoma. Tais sistemas são constituídos por óleo, surfactante, co-surfactante e água, diferindo entre si pela presença da parede polimérica nas nanocápsulas, mas ambos apresentando tamanho nanométrico. Suas vantagens incluem a simplicidade de fabricação, alta capacidade de solubilização de compostos lipofílicos, e elevada área superficial, o que por sua vez lhes conferem capacidade de aumentar a absorção e biodisponibilidade oral dos compostos encapsulados (SUBONGKOT; NGAWHIRUNPAT, 2017). O efeito da encapsulação do ATRA nos diferentes tipos de nanocarreadores sobre o perfil biofarmacêutico e sobre a atividade antitumoral em modelos de melanoma murino *in vitro* e *in vivo* foram avaliados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanocarreadores contendo ácido all-trans retinóico para administração oral visando a sua potencial aplicação no tratamento do câncer de pele melanoma

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

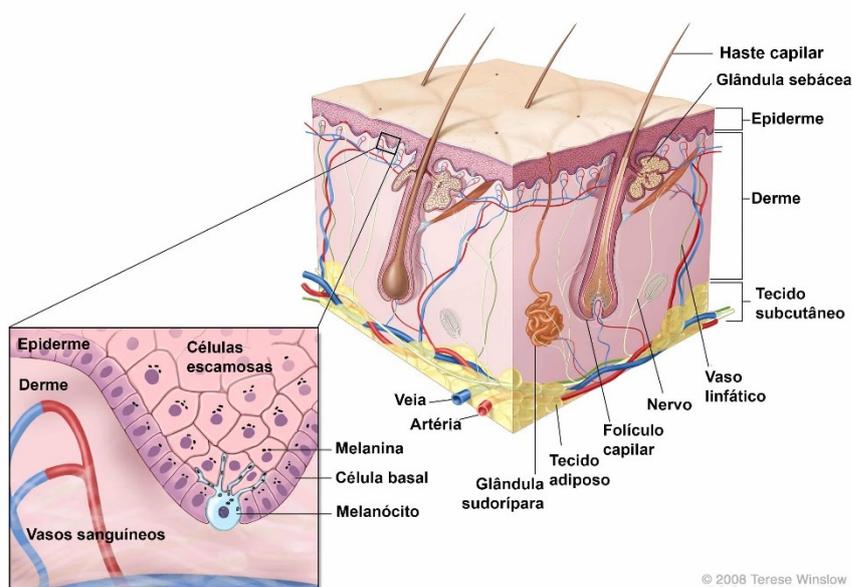
- Preparar nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo ATRA;
- Caracterizar as nanoemulsões e nanocápsulas contendo ATRA quanto ao tamanho, pH e potencial zeta;
- Desenvolver a metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do ATRA;
- Avaliar o teor e eficiência de encapsulação do ATRA nos nanocarreadores;
- Avaliar a estabilidade acelerada e de curto prazo dos nanocarreadores contendo ATRA;
- Avaliar a estabilidade do ATRA em meio gástrico e intestinal simulados;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do ATRA a partir dos nanocarreadores;
- Avaliar a atividade citotóxica do ATRA livre e nanoencapsulado, utilizando cultura de células de melanoma B16F10;
- Avaliar o efeito da incubação do ATRA nanoencapsulado com a cisplatina sobre a atividade citotóxica em modelo de cultura de células de melanoma B16F10;
- Avaliar a atividade antitumoral do ATRA livre e nanoencapsulado em modelo de melanoma murinho B16F10, após administração oral em camundongos.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

#### 3.1 MELANOMA

Melanócitos são células derivadas da crista neural que podem ser encontrados na camada basal da epiderme (Figura 1) e folículos pilosos, superfícies mucosas, meninges e coróide do olho. Em resposta ao dano no DNA induzido pela radiação UV, os queratinócitos produzem o hormônio estimulante de melanócitos (MSH) que se liga ao receptor 1 da melancortina, produzindo e liberando a melanina. A melanina, por fim, age como uma barreira à radiação UV, prevenindo a progressão do dano ao DNA (LEONARDI *et al.*, 2018).

Figura 1 - Representação do melanócito e melanina.



Fonte: Adaptado de PDQ ADULT TREATMENT EDITORIAL BOARD (2019).

O melanoma é um tipo de câncer de pele derivado de células melanocíticas, e é considerado uma doença multifatorial, influenciada por fatores genéticos combinados à exposição ambiental. O melanoma cutâneo pode ser classificado na população em função da exposição solar contínua ou intermitente, que tem influência os diversos locais de aparecimento, grau de exposição solar, idade, agentes oncogênicos e carga mutacional. Assim, em indivíduos mais velhos (> 55 anos)

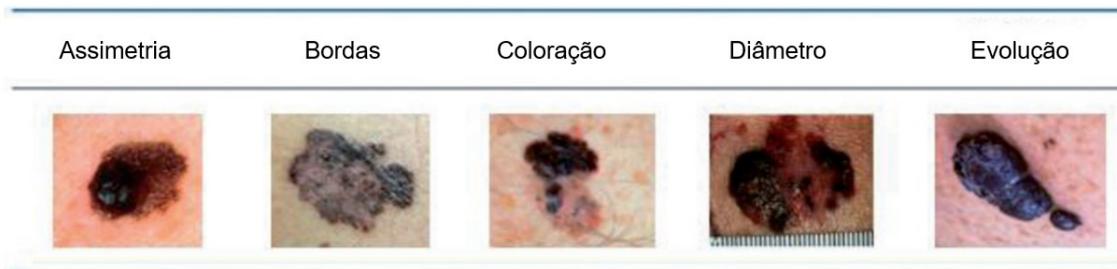
expostos ao sol de forma contínua, o melanoma geralmente aparece na cabeça, pescoço e membros superiores. Os principais aspectos genéticos são as mutações ocorridas no proto-oncogene B-Raf (BRAF), gene da neurofibromina 1 (NF1) e gene NRAS, e geralmente apresentam elevada carga mutacional. Por outro lado, melanomas causados pela exposição solar intermitente em indivíduos mais jovens (< 55 anos) ocorrem em áreas menos expostas, como o tórax, abdome e extremidades, e são geralmente associados a mutações no gene BRAFV600E e à menor carga mutacional (BONALUMI; CAMPOS; LEAL, 2017; LEONARDI *et al.*, 2018).

O fator genético e familiar é considerado o mais importante para o rastreamento de indivíduos susceptíveis ao aparecimento do melanoma maligno. Pessoas que apresentam o tipo de pele clara, com olhos e cabelos claros são consideradas como grupo de risco. O risco de desenvolver o melanoma aumenta com a presença de nevos melanocíticos (pintas), nevos atípicos (> 5 mm), e nevos congênitos gigantes (> 20 mm), além de lentigos solares e alterações importantes na pele. A monitorização de grupos de risco, principalmente entre a quarta e sexta décadas de vida, faixa de maior incidência, tem demonstrado grande impacto para o diagnóstico precoce do melanoma, melhorando o prognóstico dos pacientes (LOPES, 2006; RASTRELLI *et al.*, 2014).

### **3.1.1 Diagnóstico, classificação e estadiamento**

O diagnóstico do melanoma baseia-se primeiramente no exame clínico do paciente, realizado por um médico, com observação cuidadosa da pele e lesão, e atenção a história prévia do indivíduo. O melanoma pode surgir em qualquer localização da pele e mucosas íntegras, com surgimento de lesões pigmentadas atípicas e sintomas de prurido e/ou descamação. Estima-se que 30% dos melanomas sejam derivados de nevos preexistentes. O sistema ABCDE (Figura 2) foi criado para subsidiar o diagnóstico e inclui características da lesão que podem indicar malignidade, como Assimetria, Bordas irregulares, variação de Cores, Diâmetro maior que 6 mm e Evolução do crescimento da lesão (BONALUMI; CAMPOS; LEAL, 2017).

Figura 2 - Sistema ABCDE para o diagnóstico do melanoma.



Fonte: Adaptado de WARD; FARMA (2017).

Para auxiliar o diagnóstico clínico do melanoma, diversos dispositivos óticos estão se tornando essenciais. A técnica mais utilizada é a dermatoscopia (microscopia de epiluminescência), que realiza a observação das camadas da pele de forma não invasiva. Esse dispositivo conta com um sistema de ampliação ótico, combinado com óleo de imersão, que permite a visualização de estruturas morfológicas da pele e lesão até a junção dermoepidérmica, que não seriam vistas a olho nu. Essa abordagem possibilitou o aumento da precisão na detecção do melanoma, uma vez que reconhece sinais precoces da doença, como lesões atípicas, antes de alterações clínicas. Através da realização e interpretação da dermatoscopia é possível classificar a lesão como: lesão melanocítica benigna, lesão suspeita e lesão muito suspeita. A partir desse resultado, as lesões suspeitas devem ser encaminhadas para a biópsia, pois apesar da alta sensibilidade e especificidade apresentada pela dermatoscopia, esse exame não pode ser considerado como critério definitivo para o diagnóstico (NEILA; SOYER, 2011; RASTRELLI *et al.*, 2014).

Preferencialmente a biópsia é realizada com margens de 0,5 a 2 centímetros e profundidade até a camada superior do tecido adiposo. Deve-se avaliar espessura do tumor, nível de invasão, presença ou não de ulcerações, bordas e nível de crescimento vertical. Na avaliação histológica são observados os subtipos, índice mitótico, infiltrado inflamatório linfocítico e neutropenia. A partir do diagnóstico histológico é possível classificar o melanoma em seis subtipos. Suas denominações, frequência de ocorrência e características estão resumidos na Tabela 1 (LOPES, 2006; PAVRI *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Classificação dos subtipos de melanoma.

<b>Subtipo</b>	<b>Frequência</b>	<b>Características</b>
Disseminativo superficial	70%	Surge a partir de um nevo preexistente.
Nodular	5%	Ausência de fase de crescimento radial, apresentação variável e invasão vertical acentuada
Lentigo Maligna	4–15%	Tipicamente demonstra progressão lenta e frequentemente aparece em áreas expostas ao sol
Acral lentiginoso	5%	Tem maior incidência em pessoas de pele mais escura e ocorre frequentemente nas palmas das mãos, solas e espaços subungueais
Amelanótico	4%	Ausência característica de pigmentação e são considerados raros.
Desmoplásico	> 4%	Melanoma raro observado em adultos mais idosos, caracterizado por células fusiformes escassas e atipia celular mínima.

Fonte: Adaptado de LEONARDI *et al.* (2018).

O manejo dos pacientes com melanoma, desde o diagnóstico ao tratamento, é direcionado levando-se em consideração o estadiamento do paciente em grupos de estágios clinicamente relevantes. O estadiamento não apenas informa a avaliação do prognóstico e a tomada de decisão clínica, com base na experiência e resultados de grupos de pacientes anteriores com estágio semelhante, mas também facilita a notificação centralizada do registro do câncer e o desenho, a condução e a análise dos ensaios clínicos. Vários sistemas de estadiamento do câncer são usados em todo o mundo, sendo mais clinicamente utilizado o sistema de metástase de nódulo tumoral (TNM) mantido em colaboração pelo Comitê Conjunto Americano sobre Câncer (*American Joint Committee on Cancer - AJCC*) e a União Internacional para o Controle do Câncer (*International Union for Cancer Control - UICC*). O sistema TNM classifica os cânceres pelo tamanho e extensão do tumor primário (T), envolvimento do linfonodo regional (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M) (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2015; GERSHENWALD *et al.*, 2017).

O estadiamento do melanoma utiliza critérios dos exames clínico, patológico e de imagem, para fornecer maior precisão (qualitativa e quantitativamente) na definição de subgrupos prognósticos e combinar informações do melanoma primário

e dos linfonodos regionais. O melanoma em estágios I e II compreende aqueles em que não há evidência de metástases no paciente, quando a biópsia do linfonodo sentinela demonstra a ausência de metástases nodais após exame patológico, e o exame clínico, radiográfico e/ou laboratorial demonstra a ausência de metástases à distância. Pacientes com melanoma em Estágio III têm evidências patológicas de metástases regionais, seja nos linfonodos ou em locais intralinfáticos. A classificação quantitativa requer exame patológico da cadeia linfonodal ressecada cirurgicamente e documentação do número de linfonodos examinados e do número de linfonodos que contêm metástases. Pacientes com melanoma em Estágio IV apresentam evidências clínicas, histológicas ou radiológicas de metástases em um ou mais locais distantes (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2015).

### **3.1.2 Conduas terapêuticas**

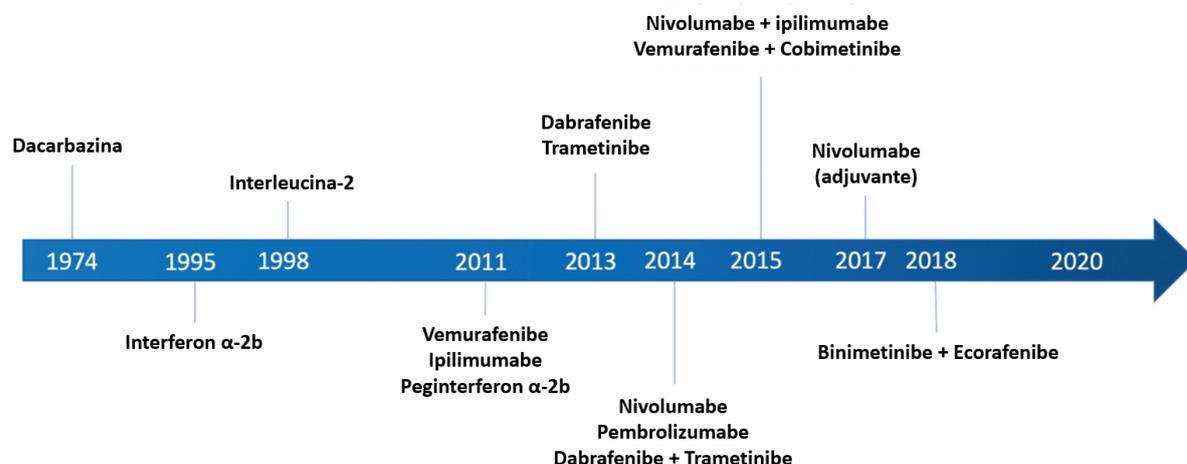
Após o diagnóstico, clínico e histológico, caso o tumor seja localizado e não metastático, a primeira linha de tratamento para o melanoma é a remoção cirúrgica. A excisão local é realizada para a ampliação de margens em torno da região onde se efetuou a biópsia, podendo se estender para 4-5 cm, dependendo do tamanho do tumor, com profundidade até o nível da fáscia muscular adjacente. A cirurgia é curativa para 70-90% dos pacientes com melanoma não invasivo, com uma sobrevida global de 92% dos pacientes em 5 anos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, 2014; WARD; FARMA, 2017).

Caso haja suspeita de metástase linfonodal, é recomendado a biópsia do primeiro linfonodo de drenagem (linfonodo sentinela), que permite a avaliação do acometimento linfático regional. Em caso negativo de metástase do linfonodo sentinela, há mais de 95% de possibilidade de que não ocorra acometimento da cadeia linfonodal. Caso o resultado seja positivo, torna-se necessária a dissecação total da cadeia linfonodal de drenagem. A presença de metástases linfáticas pode significar doença sistêmica, o que confere ao paciente um pior prognóstico e uma sobrevida em torno de 40% em 5 anos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, 2014).

As terapias sistêmicas são indicadas nos estágios II, III e IV da doença e incluem a quimioterapia, imunoterapia e terapia-alvo. (COSTA *et al.*, 2019). Uma linha

do tempo com os principais medicamentos aprovados pelo FDA se encontra na Figura 3. A dacarbazina, um fármaco antineoplásico pertencente a classe dos agentes alquilantes, foi o primeiro quimioterápico aprovado pelo FDA para o tratamento do melanoma metastático, em 1974. Age pela metilação da base guanina no DNA nas posições O-6 e N-7. As fitas de DNA metilado mantêm-se coesas de tal maneira que a divisão da célula se torna impossível, levando sobretudo à morte das células tumorais, por estas se dividirem mais rapidamente, mas igualmente das células saudáveis (KEWITZ *et al.*, 2014). Estudos têm relatado a completa remissão do tumor em menos de 5% dos pacientes e sobrevivência de 5 anos em 2 a 6% dos pacientes. Apesar da baixa eficácia, a dacarbazina tem sido indicada no tratamento do melanoma, principalmente em combinação com outras terapias (DOMINGUES *et al.*, 2018).

Figura 3 - Progressão da linha do tempo dos tratamentos aprovados pelo FDA para melanoma, descritas cronologicamente desde o primeiro tratamento aprovado, dacarbazina, em 1974 até a combinação mais recentemente aprovada de binimetinibe com encorafenibe em 2018.



Fonte: Adaptado de CHANDA; COHEN (2021)

Outros agentes quimioterápicos usados para tratar o melanoma incluem alcaloides da vinca, que inibem a polimerização da tubulina, e taxanos, que inibem a desmontagem dos microtúbulos. Alcaloides da vinca e taxanos, incluindo paclitaxel e docetaxel, mostraram atividade comparável com a dacarbazina. Os análogos de platina como cisplatina e carboplatina também demonstraram ter alguma atividade no melanoma metastático. O tratamento com cisplatina apresenta uma taxa de resposta

em torno de 15 a 20% nos ensaios. Os agentes de platina na maioria dos regimes de tratamento do melanoma metastático são usados em terapias combinadas, pois não tem atividade adequada quando usados como monoterapia (CHANDA; COHEN, 2021).

Múltiplos regimes de quimioterapia combinada para o tratamento do melanoma metastático foram criados, incluindo o regime Dartmouth (CBDT: cisplatina, carmustina, dacarbazina e tamoxifeno), que rendeu altas taxas de resposta, de até 55%, com respostas completas com duração de até 82 meses, o regime BOLD (bleomicina, vincristina, lomustina, dacarbazina) e o regime CVD (cisplatina, vinblastina, dacarbazina). No entanto, nenhum deles mostrou eficácia aumentada em comparação com a dacarbazina isolada, tendo seu uso descontinuado devido à falta de superioridade sobre a monoterapia com a dacarbazina e ao aumento da toxicidade observada com os outros agentes em combinação. Com o desenvolvimento de agentes direcionados mais seletivos, como imunoterapias, nos últimos anos a quimioterapia citotóxica passou a ser considerada de segunda linha para pacientes com melanoma metastático (CHANDA; COHEN, 2021).

A imunoterapia mais comumente realizada conta com agentes anti-CTLA-4 e anti-PD-1. O ipilimumabe é um anticorpo anti-CTLA-4, aprovado pelo FDA em 2011 para o tratamento do melanoma avançado. A proteína citotóxica associada a linfócito T (CTLA-4) é um receptor *checkpoint* inibitório que bloqueia a ativação das células T e induz a tolerância imune. Anticorpos anti-CTLA-4 agem como antagonistas, bloqueando o efeito inibitório, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentando a infiltração e expansão de células T clonais em tumores responsivos. Pembrolizumabe e nivolumabe são inibidores da proteína de morte celular programada 1 (PD-1), aprovados pelo FDA para o tratamento do melanoma em 2014. A PD-1 é uma proteína de superfície das células T envolvida na resposta imune, que promove a tolerância ao suprimir a atividade das células T inflamatórias. Como resultado, a ação da PD-1 previne as doenças autoimunes, mas também previne a morte de células cancerosas (DOMINGUES *et al.*, 2018).

Cerca de 70% dos pacientes com melanoma cutâneo apresentam mutações em genes que codificam proteínas envolvidas em rotas de sinalização chaves. Estas mutações oncogênicas podem estar associadas à proliferação celular e a um fenótipo de malignidade. O uso das terapias-alvo se baseia no uso de pequenas moléculas ou

anticorpos que afetam as proteínas mutadas, que são importantes para a progressão da doença. Fármacos como o vemurafenibe e dabrafenibe possuem como alvo a proteína B-Raf expressa pelo gene BRAF, enquanto o trametinibe e cobimetinibe inibem a MEK, uma quinase ativadora da MAP quinase. Ambas proteínas estão envolvidas no crescimento e proliferação celular (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; DOMINGUES *et al.*, 2018; PDQ ADULT TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2019).

Em casos de melanoma metastático, o tempo médio de sobrevida estimado é em torno de 8 meses, sendo que menos de 10% dos pacientes sobrevivem 5 anos desde o diagnóstico. Os principais sítios de metástase são os linfonodos, sistema nervoso central, pulmões e trato gastrointestinal. A excisão cirúrgica é a alternativa mais eficaz, tanto curativa quanto paliativa, mas em casos em que não é possível realizá-la, a politerapia tem demonstrado aumento na sobrevida global dos pacientes e palição dos sintomas (LOPES, 2006; YU *et al.*, 2019).

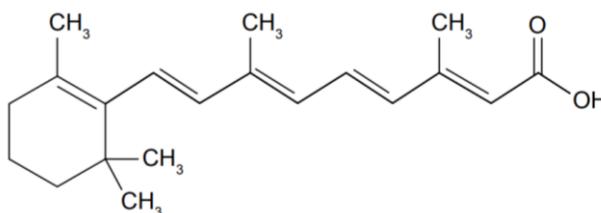
A imunoterapia e a terapia-alvo representam avanços importantes para o tratamento do melanoma, embora o uso de tais estratégias apresenta vários desafios. Além do elevado custo, pacientes só poderão ser beneficiados por estas terapias se biomarcadores da doença forem previamente estabelecidos (como mutações específicas). As doses clínicas toleradas também devem ser levadas em consideração, de modo que sejam eficazes para inibição do tumor com o mínimo de efeitos adversos. Além disso, a variabilidade entre pacientes e heterogeneidade do tumor estão associados a diferentes mecanismos de resistência. Assim, a busca por novos agentes terapêuticos e/ou uso de sistemas de liberação mais eficazes continua sendo um objetivo a ser alcançado para o tratamento do melanoma (LOPES, 2006; YU *et al.*, 2019).

### 3.2 ÁCIDO ALL-TRANS-RETINÓICO

De acordo com a definição da União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC*) e da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB*), retinóides corresponde ao termo empregado para designar uma classe de compostos cuja estrutura química consiste em quatro grupos

isoprenóides unidos de modo cabeça-cauda. No ácido *all-trans*-retinoico (ATRA), um anel não aromático de seis átomos de carbono encontra-se ligado à cadeia lateral poliprenóide, a qual é terminada com um grupo funcional ácido carboxílico (Figura 4) (DINIZ; LIMA; ANTONIOSI FILHO, 2002). No organismo, o ATRA é sintetizado a partir da vitamina A (retinol) e está relacionado ao crescimento e diferenciação celular, especialmente no estágio embrionário, através da ligação em receptores nucleares do ácido retinóico (RARs) e receptores retinóides X (RXRs). A forma sintética do ATRA, produzida em laboratório, é utilizada para tratamento de acne severa e como quimioterápico em alguns tipos de câncer, como a leucemia promielocítica aguda (DAVID *et al.*, 2010; SIDDIKUZZAMAN; GURUVAYOORAPPAN; BERLIN GRACE, 2011).

Figura 4 - Estrutura química do ATRA.



Fonte: SUBONGKOT; NGAWHIRUNPAT (2017).

O ATRA possui uma solubilidade muito baixa em água (0,21  $\mu\text{M}$ , pH 7,3) e, portanto, requer que proteínas de ligação específicas, como as proteínas de ligação ao ácido retinóico (CRABPs) sejam transportadas dentro das células para atuar nos receptores nucleares. Apresenta uma meia-vida curta no organismo (poucas horas), devido à sua degradação pelo sistema do citocromo P450. Além disso, induz efeitos adversos indesejáveis (malformações congênitas, ressecamento muco cutâneo, cefaleia e hipertrigliceridemia) quando administrado em altas concentrações. Por isso, por mais de 35 anos, vários grupos desenvolveram diferentes sistemas de entrega de ATRA para superar essas limitações, como hidrogéis, nanopartículas, micropartículas, entre outros (FERREIRA *et al.*, 2020).

Além da sua baixa solubilidade aquosa, o ATRA também é conhecido pela sua baixa estabilidade química, podendo sofrer fotodegradação e isomerização.

Estudos têm mostrado que quando expostos à luz, calor e agentes oxidantes, o ATRA é rapidamente transformado a ácido 13-cis retinóico e em produtos de oxidação como *all-trans-4-oxo*. Embora alguns destes produtos ainda possuam atividade antitumoral, a manutenção da integridade química do ATRA nas formulações é desejável para a qualidade dos produtos farmacêuticos (LIM; LEE; KIM, 2004). A exposição a ácidos de Lewis, incluindo ácido sulfúrico e clorídrico, também causa mudanças estruturais no ATRA, desidratando-o em hidrocarbonetos. O meio básico geralmente não é prejudicial aos retinóides, embora retinóides com grupamento ácido carboxílico formem sais em meio básico (CLEMENS *et al.*, 2013; GATTI; GIOIA; CAVRINI, 2000). No sangue e em outros tecidos, o ATRA está geralmente ligado a proteínas transportadoras e protegido por antioxidantes naturais. Portanto, quando armazenado de forma adequada, as amostras de plasma, soro e outros tecidos contendo ATRA são estáveis por meses e até anos (BARUA; FURR, 1998).

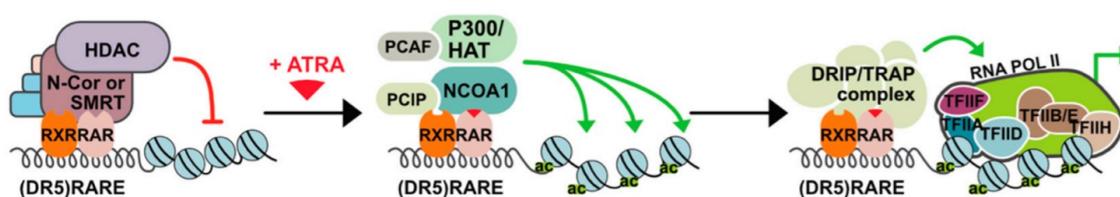
### 3.2.1 Mecanismo de ação e aplicações clínicas

O mecanismo de alteração da expressão gênica do ATRA é mediado principalmente pela ligação a seu receptor nuclear. Cada família de receptores nucleares apresenta os subtipos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . RAR e RXR atuam como fatores de transcrição ligante-dependentes, modulando a expressão dos genes responsivos ao ácido retinóico. Em condições fisiológicas, o RAR e RXR dimerizam-se, de acordo com os subtipos, formando um complexo que se liga firmemente ao ATRA. A ligação do ATRA desloca um repressor do complexo de transcrição e altera a expressão de genes que controlam a diferenciação de células de múltiplas linhagens. Além de sua atividade transcricional, o RAR- $\alpha$  possui outras funções e pode ativar diretamente várias vias de sinalização (BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2018; COELHO *et al.*, 2003; MOOSAVI; DJAVAHERI-MERGNY, 2019; SIDDIKUZZAMAN; GURUVAYOORAPPAN; BERLIN GRACE, 2011).

Na ausência de um ligante, os receptores RAR e RXR e os heterodímeros de receptores de ácido retinóico (RXR-RAR) se ligam a elementos de resposta ao ácido retinóico (RAREs) nas regiões regulatórias dos genes alvo e reprimem a transcrição por meio do recrutamento de histonas desacetilases (HDAC) e co-repressores, como o co-regulador negativo (N-CoR) ou mediador de silenciamento para retinóides e

receptores de hormônio da tireoide (SMRT). As HDACs removem grupos acetil de histonas nucleares, causando condensação da cromatina que impede a ligação de outros fatores e resulta no silenciamento da expressão gênica. Após a ligação do ATRA, o receptor RAR sofre mudança estrutural levando à dissociação do complexo co-repressor e associação de co-ativadores com atividades de histona acetiltransferase (HAT) (por exemplo, P300 e NCOA1) que causam descondensação da cromatina pela adição de grupos acetil às histonas, levando a ativação da transcrição gênica. Adicionalmente, complexos multiproteicos denominados proteínas que interagem com o receptor da vitamina D3 ou proteínas associadas ao receptor do hormônio tireoidiano (DRIP ou TRAP) também podem ser recrutados para a ativação da transcrição por meio da interação com a transcrição basal. Tais mecanismo estão ilustrados na Figura 5 (SZYMAŃSKI *et al.*, 2020).

Figura 5 - Mecanismo de ação gênica do ATRA.



Fonte: Adaptado de SZYMAŃSKI *et al.* (2020)

O ATRA é um potente fármaco antitumoral. Dentre suas atividades biológicas, sabe-se que esse fármaco é capaz de inibir os marcadores de proliferação celular e fatores de crescimento, como receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), sendo muito eficaz em inibir o crescimento tumoral, a angiogênese e a metástase. Além disso, o ATRA tem mostrado regular a permeabilidade mitocondrial, os receptores de morte celular e as espécies reativas de oxigênio (CHEN *et al.*, 2014).

Atualmente é utilizado como quimioterápico de escolha, aprovado pelo FDA e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para o tratamento de leucemia promielocítica aguda (LPMA). A LPMA é um subtipo da leucemia mielóide aguda, caracterizada pela translocação cromossômica específica t(15;17), que resulta na fusão entre o gene da leucemia promielocítica (PML) no cromossoma 15 e o gene do receptor-alfa ácido retinóico (RAR- $\alpha$ ) no cromossoma 17, originando a proteína de

fusão PML-RAR $\alpha$ . Essa fusão leva a um bloqueio na diferenciação, com acúmulo de células granulocíticas em fase promielocítica na medula óssea e no sangue periférico (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, 2014; BRASIL, 2014).

A LPMA é especialmente sensível ao ATRA, que age induzindo a maturação das células blásticas, levando à remissão completa da doença e à resolução de distúrbios da coagulação, podendo ser associado ou não às antraciclinas. O uso do ATRA, por administração oral, não invasiva, fez da LPMA o subtipo de leucemia mieloide aguda mais curável, mesmo após recidiva, com taxas de remissão completa acima de 70% e redução da necessidade de transplante de células-tronco (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, 2014; BRASIL, 2014).

### **3.2.2 Atividade do ATRA frente ao melanoma**

O ATRA também tem demonstrado exercer atividade antitumoral no melanoma. CHEN *et al.* (2014), em seu artigo de revisão, relatam que o ATRA inibe o crescimento do tumor e a formação de colônias. Os mecanismos de atividade antitumoral do ATRA verificados nos diferentes estudos *in vitro* e *in vivo* incluem a ativação da proteína quinase dependente de AMP cíclico e da sialitransferase, a modulação da adesão das células do melanoma aos componentes da membrana basal e a regulação transcricional do gene I da molécula de adesão intercelular (ICAM-1). Em um estudo *in vitro* usando células de melanoma B16F10, o ATRA mostrou ser capaz de inibir o potencial metastático, *down*-regulando os receptores de integrina expressos na superfície das células frente às proteínas de matriz extracelular, especialmente a laminina e vitronectina. Estudos *in vitro* também mostraram que o ATRA modifica a sensibilidade à radiação após exposição de células de melanoma C-143 aos raios-x, o que poderia ter implicações na modificação da resposta biológica provocada pelo tratamento radioterápico do câncer. Além disso, esse fármaco inibiu a invasão tecidual de células tumorais de melanoma, através da regulação da expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), fator essencial no crescimento e migração/invasão de célula neoplásicas.

Estudos *in vivo* realizados por YIN *et al.* (2017) verificaram que a aplicação tópica da pomada de ATRA inibiu o crescimento do tumor, após inoculação subcutânea das células de melanoma B16F10 no flanco direito de camundongos da linhagem C57BL/6. Este efeito foi acompanhado pelo marcado aumento das respostas de células T CD8+, com grande expressão de fatores de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), nos tumores tratados com ATRA, em comparação ao grupo controle. Igualmente, o tratamento tópico promoveu a diferenciação de células T CD8+ efetoras nos linfonodos de drenagem. Assim, os autores concluíram que o tratamento tópico com ATRA inibe o crescimento tumoral por promover a diferenciação e a função citotóxica de células T CD8+.

Semelhante aos efeitos sobre células mielocíticas imaturas, o ATRA mostrou ser capaz de induzir a diferenciação de células supressoras derivadas de células mieloides (MDSCs), através da ativação do ERK1/2, up regulação da glutathione sintase e geração de glutathione, resultando na redução da frequência e função de MDSCs na circulação sanguínea (NEFEDOVA *et al.*, 2007). Assim, com o objetivo avaliar a eficácia da terapia combinada de ipilimumabe com ATRA no tratamento de pacientes com melanoma avançado (estágios III e IV), TOBIN *et al.* (2018) conduziram um estudo clínico randomizado de fase II. Os autores demonstraram que o tratamento com ATRA *in vitro* diminuiu a função imunossupressora de MDSCs em reações linfocitárias mistas. Além disso, o ATRA reduziu a expressão de genes imunossupressores, incluindo PD-L1 e IL-10, e da indoleamina 2,3-dioxigenase pelas MDSCs. Finalmente, o ATRA diminuiu significativamente a frequência de MDSCs circulantes, comparado ao tratamento com ipilimumabe isoladamente. Desta forma, os autores concluíram que a associação do ATRA com outros agentes imunoterápicos é uma estratégia promissora para a melhoria dos resultados terapêuticos em pacientes com melanoma.

### **3.2.3 Farmacocinética e efeitos adversos**

O ATRA apresenta peso molecular de 300 g/mol, é um fármaco insolúvel em água (0,19  $\mu\text{g/mL}$ ; log P = 6,3) e tem baixa permeabilidade no trato gastrointestinal. Portanto, o ATRA tem sido classificado no Sistema de Classificação Biofarmacêutica como pertencente a classe 4, apresentando baixa solubilidade e baixa

permeabilidade e, conseqüentemente, baixa absorção oral (SUBONGKOT; NGAWHIRUNPAT, 2017).

A análise detalhada do perfil farmacocinético do ATRA em seres humanos é dificultada por sua baixa concentração plasmática atingida após administração oral e pela ausência de formulações intravenosas, o que reduziria a variabilidade decorrente de seu processo de absorção pelo trato gastrointestinal. Estudos clínicos demonstram um comportamento farmacocinético complexo desse fármaco, com baixa biodisponibilidade sistêmica, indução do metabolismo hepático e rápido desenvolvimento de resistência clínica em esquemas posológicos de uso crônico (SAADEDDIN *et al.*, 2004).

A biodisponibilidade do ATRA, após administração oral de dose única, comumente 45 mg/m<sup>2</sup>/dia, é estimada em cerca de 50%. Os dados farmacocinéticos evidenciam uma variação substancial no pico de concentração plasmática (C<sub>max</sub>) entre pacientes em alguns estudos (GILLIS; GOA, 1995). Como a absorção oral da maioria dos retinóides é aumentada com os alimentos, diferentes hábitos alimentares podem contribuir para a variação intra e inter-paciente nas concentrações plasmáticas máximas de ATRA, indicando que sua absorção oral depende do pH, composição de ácidos graxos e capacidade de solubilização pelos sais biliares do intestino (LIN *et al.*, 2000).

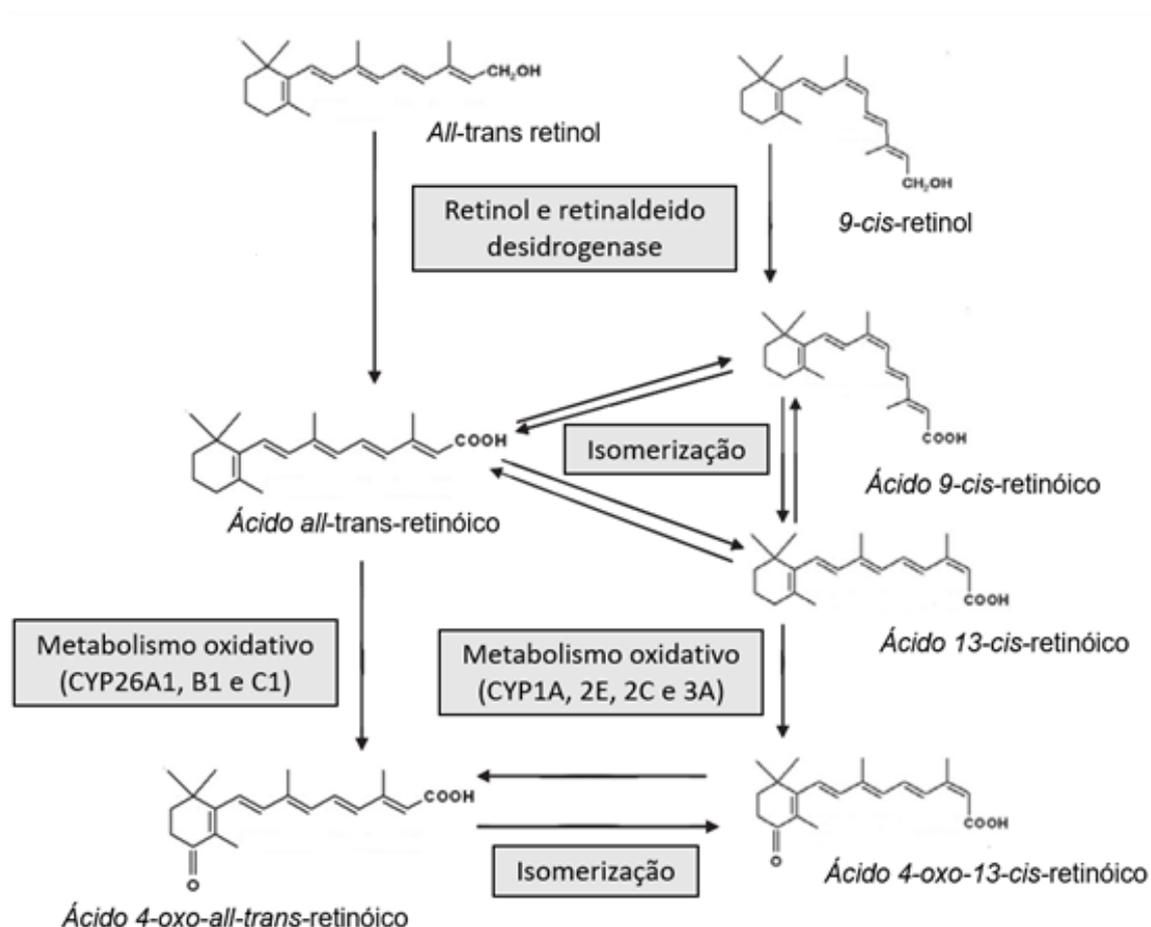
O ATRA é distribuído de forma rápida e extensiva para os tecidos, mas não se acumula em nenhum tecido específico. A administração de doses repetidas resulta em uma redução acentuada na concentração plasmática do fármaco e na área sob a curva de concentração plasmática-tempo que está associada à indução do catabolismo enzimático. A meia-vida de eliminação do fármaco, após atingir a concentração plasmática máxima, é em média de 0,7 horas, com retorno aos níveis basais após 7 a 12 horas. (GILLIS; GOA, 1995; REGAZZI *et al.*, 1997).

O ATRA é rapidamente metabolizado em humanos pelo citocromo P450 (CYP) no fígado e intestino, formando uma variedade de metabolitos por oxidação e glucuronização. Cerca de 30% dos metabolitos são excretados na urina e 60% nas fezes. Várias famílias de CYP são capazes de metabolizar os retinóides via 4-hidroxilação a 4-oxo-metabolitos, sendo a CYP26 mais relevante para o metabolismo do ATRA. Todas as isoformas do CYP26 (CYP26A1, CYP26B1 e CYP26C1) são induzidas pela exposição ao ATRA e resultam em aumento de sua atividade com o

uso contínuo do fármaco. Essa indução enzimática leva à redução gradativa da concentração plasmática pelo aumento da depuração e redução de sua biodisponibilidade ao longo do tratamento (MUINDI *et al.*, 2008; REGAZZI *et al.*, 1997).

Alguns dos metabólitos gerados incluem: derivados da oxidação (ácido 4-hidroxi-retinóico, ácido 4-oxo-retinóico), derivados da glucuronidação (4-oxo-retinoil-glucuronídeo), derivados da estereoisomerização espontânea ou por isomerases (ácido 9-cis-retinóico e 13-cis- ácido retinóico) (Figura 6), além de metabólitos não polares e ésteres. Esses metabólitos também podem sofrer metabolismo, gerando outros compostos (SCHULTZE *et al.*, 2018).

Figura 6 – Exemplos de reações de isomerização e metabolismo oxidativo catalisado pelo citocromo P450 dos retinóides.



Fonte: Adaptado de MUINDI *et al* (2008).

A complicação mais comum e potencialmente letal que pode ocorrer durante a utilização do ATRA é a síndrome de diferenciação (SD – anteriormente denominada síndrome do ácido retinóico, SAR). Essa síndrome apresenta um conjunto complexo de sinais e sintomas clínicos que incluem dispneia, infiltrado pulmonar, febre inexplicável, ganho de peso maior que 5 kg, derrame pleuro-pericárdico, hipotensão, insuficiência renal aguda e edema periférico. Sua incidência pode variar de 2% a 48% dos pacientes, dependendo do critério diagnóstico utilizado, esquema terapêutico e estratégias de profilaxia (CICCONI; LO-COCO, 2016; STAHL; TALLMAN, 2019).

Os mecanismos moleculares e celulares da SD não são totalmente compreendidos. Acredita-se que a administração de ATRA leva a uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e mudanças massivas de expressão gênica na diferenciação de células blásticas. Os mecanismos propostos incluem mudanças nas moléculas de adesão, secreção de citocinas e enzimas durante a diferenciação induzida por ATRA, como molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1/CCL2) e tipo- 2 transglutaminase (TGM2/TG2). A resposta final é a lesão endotelial, inflamação e sangramento no tecido acometido. A expressão aumentada do CD13 e a hiperleucocitose estão, aparentemente, associadas a maior incidência da síndrome (MOHAMMADZADEH *et al.*, 2021).

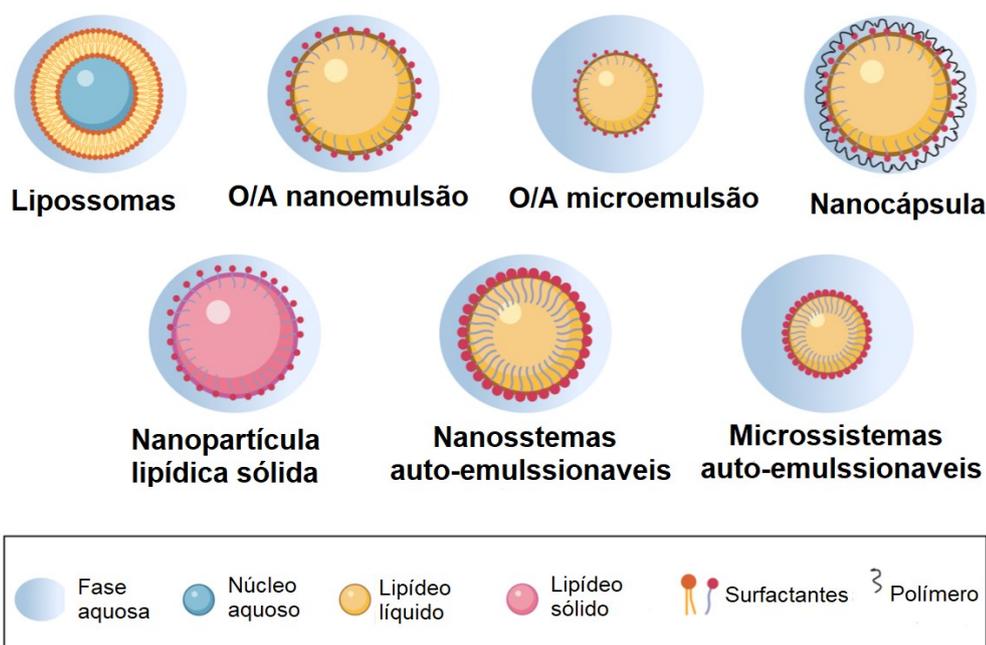
O diagnóstico da SD pode ser complicado, pois os sinais e sintomas são inespecíficos e podem ser confundidos com outras condições clínicas, por isso, recomenda-se que os pacientes sejam monitorados diariamente durante o tratamento com ATRA através de exames clínicos, laboratoriais e de imagem para se obter o diagnóstico precoce. O tratamento e profilaxia da SD é realizado com esteroides, comumente dexametasona, e a descontinuidade do tratamento é recomendada apenas em casos graves (CICCONI; LO-COCO, 2016; STAHL; TALLMAN, 2019).

### 3.3 NANOCARREADORES DE FÁRMACOS

A nanomedicina é o nome dado à junção da nanotecnologia com a medicina e tem como propósito o uso de materiais em escala nanométrica para curar, diagnosticar e prevenir doenças. Em geral, define-se como nanomaterial os materiais que apresentam, em pelo menos uma das dimensões, o tamanho entre 1 e 100 nm, no entanto, não existe consenso para este limite, podendo em alguns casos chegar a algumas centenas de nanômetros sem alteração das suas propriedades físico-químicas e biológicas (SOARES *et al.*, 2018). Em especial, na área farmacêutica, nanomateriais são empregados como carreadores de fármacos, oferecendo vários benefícios como o controle da liberação, proteção do fármaco frente ao ambiente biológico hostil, melhoria das propriedades biofarmacêuticas, alteração do perfil farmacocinético e liberação sítio-específica, que conduzem à melhoria da eficácia terapêutica e à redução dos efeitos adversos (MISHRA; SHANDILYA; MISHRA, 2018; PATRA *et al.*, 2018).

Nanocarreadores de fármacos podem ser classificados em materiais orgânicos, inorgânicos ou apresentar uma combinação de ambos. Nanocarreadores inorgânicos incluem as nanoestruturas metálicas, as nanopartículas de silício e os *quantum dots*, e orgânicos são usualmente classificados em poliméricos, não poliméricos e lipídicos. Os nanocarreadores poliméricos mais comuns são as nanoesferas, constituídas por uma matriz polimérica em que o fármaco pode se encontrar disperso, e as nanocápsulas, que são constituídas por um núcleo oleoso contendo o fármaco dissolvido, revestido por uma parede polimérica. Nanocarreadores lipídicos por sua vez são classificados de acordo com o tipo de lipídio empregado, sólido ou líquido, e estrutura da partícula, sendo as nanoemulsões, microemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas e lipossomas os mais estudados (Figura 7). (MISHRA; SHANDILYA; MISHRA, 2018; PATRA *et al.*, 2018).

Figura 7 - Representação esquemática dos principais nanocarreadores lipídicos de fármacos.



Fonte: Adaptado de PLAZA-OLIVER; SANTANDER-ORTEGA; LOZANO (2021).

Desde 1990, o FDA e a Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency* - EMA) aprovaram 21 nanocarreadores para uso em humanos e mais candidatos estão em fase de testes pré-clínicos e clínicos. A maioria dos nanocarreadores aprovados consiste em lipossomas (47%), seguidos por nanocarreadores virais (19%), micelares (14%), poliméricos (10%) e proteicos (10%). Alguns exemplos de medicamentos nanoestruturados em comercialização consistem em nanoemulsões para uso parenteral, como o Diazemus<sup>®</sup> (Diazepam) e o Diprivan<sup>®</sup> (Propofol) e formulações lipossomais intravenosas, como o AmBisome<sup>®</sup> (Anfotericina B) e Doxil<sup>®</sup> (Doxorrubicina) (CHARIOU; ORTEGA-RIVERA; STEINMETZ, 2020; SU; KANG, 2020).

Considerando que este trabalho envolve o uso de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas como carreadores para o ATRA, uma revisão mais detalhada sobre estes dois tipos de nanocarreadores será abordada abaixo.

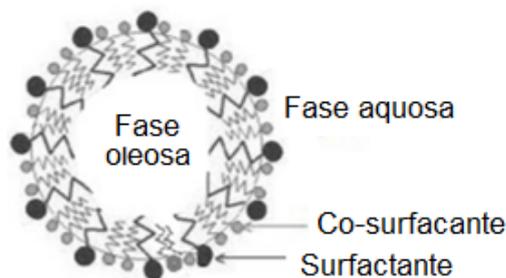
### 3.3.1 Nanoemulsões

Nanoemulsões são dispersões coloidais de dois líquidos imiscíveis estabilizadas por um surfactante apropriado, apresentando tamanho de gota de dezenas a centenas de nanômetros. Semelhante às emulsões convencionais, as nanoemulsões são sistemas metaestáveis à medida que a separação das fases ocorre com o tempo. Entretanto, o uso de um sistema surfactante adequado confere a estes sistemas estabilidade cinética, prevenindo a separação gravitacional e a agregação das gotas por meio da redução das forças atrativas entre elas (ASWATHANARAYAN; VITTAL, 2019; GUPTA *et al.*, 2016).

As nanoemulsões são constituídas de óleo, surfactante, co-surfactante e água, e podem ser classificadas em função da natureza das fases interna e externa em óleo em água (o/a) e água em óleo (a/o). A fase oleosa de uma nanoemulsão é geralmente constituída de triacil-, diacil- e monoacilgliceróis, além de ácidos graxos, contudo óleos essenciais, óleos minerais e outros compostos lipofílicos também podem ser usados. A fase aquosa é constituída predominantemente de água, podendo apresentar também álcoois e outros polióis como co-solventes. As características de viscosidade, índice de refração, e densidade de ambas as fases e tensão interfacial entre óleo e água afetam a sua formação, estabilidade e propriedades funcionais. Os surfactantes e co-surfactantes podem ser não iônicos, catiônicos e aniônicos e suas propriedades químicas e físico-químicas afetam principalmente as características de tamanho e de carga superficial das nanoemulsões (ASWATHANARAYAN; VITTAL, 2019).

Em especial as nanoemulsões o/a (Figura 8) têm sido empregadas para liberação de diversos compostos, incluindo fármacos, compostos ativos cosméticos e nutracêuticos. A incorporação de fármacos em sistemas nanoemulsionados apresenta diversas vantagens, como a melhoria da solubilidade aquosa, estabilidade, permeabilidade e biodisponibilidade. Quando administradas oralmente, permitem a redução da irritação gástrica e do metabolismo de primeira passagem e, devido ao tamanho reduzido das gotículas, exibem elevada área de contato com as superfícies absorptivas, proporcionando maior absorção que os medicamentos convencionais (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; HARWANSH; DESHMUKH; RAHMAN, 2019; KALE; DEORE, 2016).

Figura 8 - Representação esquemática da estrutura de uma nanoemulsão O/A, contendo surfactante e co-surfactante.



Fonte: Adaptado de KALE; DEORE (2016).

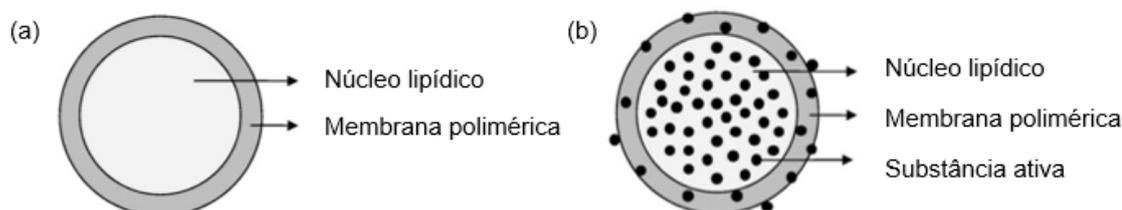
As nanoemulsões podem ser preparadas por diferentes métodos, que se dividem em dois grupos: de alta energia e de baixa energia. Os métodos de alta energia envolvem a utilização de dispositivos mecânicos, como os homogeneizadores de ultrassom, microfluidizadores e homogeneizadores de alta pressão, que exercem alta força de cisalhamento para reduzir o tamanho das gotículas, enquanto que os métodos de baixa energia exploram o potencial físico-químico do sistema para formar as nanoemulsões e dependem de fatores como temperatura, composição e solubilidade dos constituintes (ASWATHANARAYAN; VITTAL, 2019; NASTITI *et al.*, 2017).

A técnica de baixa energia mais empregada para a formulação de nanoemulsões é a emulsificação espontânea, que se baseia na difusão de uma fase orgânica contendo óleo, surfactante lipossolúvel e um solvente miscível em água, em uma fase aquosa contendo um surfactante hidrossolúvel. Neste processo, a fonte de energia para a emulsificação é decorrente da turbulência interfacial gerada pela rápida difusão do solvente orgânico na água, a qual está relacionada ao gradiente de tensão superficial induzido pela difusão dos solutos entre as duas fases. As gotículas são formadas como resultado de ondulações interfaciais promovidas pela introdução da fase dispersa (orgânica) no interior da fase dispersante (aquosa) sob agitação, de forma que essa dispersão aumenta espontaneamente a entropia e reduz a energia livre do sistema, gerando a formação espontânea das nanoemulsões. A dispersão coloidal formada é então submetida à evaporação sob pressão reduzida para eliminação do solvente orgânico e concentração até o volume desejado (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; SAFAYA; ROTLIWALA, 2020).

### 3.3.2 Nanocápsulas poliméricas

Nanocápsulas poliméricas são sistemas vesiculares nanométricos constituídos de um núcleo interno líquido ou sólido revestido por uma parede polimérica, formando uma estrutura do tipo núcleo-casca. Os sistemas constituídos por um núcleo oleoso encontram uma grande aplicação farmacêutica, pois apresentam uma elevada capacidade de carrear fármacos lipofílicos e proteger o mesmo da degradação pela ausência de contato com o ambiente externo, além de reduzir o efeito de liberação inicial (*burst*) induzido pelo pH, temperatura ou presença de enzimas. Fármacos geralmente se encontram dissolvidos no núcleo interno, associados à parede polimérica ou adsorvidos na superfície das partículas (Figura 9) (CRECENTE-CAMPO; ALONSO, 2019; DENG *et al.*, 2020; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010)

Figura 9 - Representação da estrutura de nanocápsulas poliméricas mostrando: (a) núcleo interno lipídico revestido por uma membrana polimérica, (b) modo de associação das substâncias ativas às partículas.



Fonte: Adaptado de MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI (2010).

Assim como as nanoemulsões, as nanocápsulas também são compostas por fase oleosa, fase aquosa e sistema de surfactantes. A diferença está na inserção de um polímero que forma uma parede polimérica na interface entre as duas fases. As propriedades dos polímeros exercem grande influência sobre a estabilidade, eficiência de encapsulação, perfil de liberação e biodistribuição. Os materiais mais desejáveis para a formação da parede polimérica são polímeros com alta estabilidade *in vivo* e de baixo custo (FERREIRA; NUNES, 2019). Na maioria dos casos estes polímeros devem ser biodegradáveis e/ou biocompatíveis, dependendo da via de administração. Vários polímeros podem ser empregados na formulação das nanocápsulas, podendo ser classificados em naturais e sintéticos. Polímeros naturais incluem os

polissacarídeos, como a quitosana e alginato de sódio, e as proteínas, como a albumina. Os polímeros sintéticos mais empregados são os poliésteres alifáticos como policaprolactona (PCL), poli-(ácido láctico) (PLA) e poli-(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e diferem entre si em relação ao seu grau de cristalinidade, massa molar e, conseqüentemente, velocidade de degradação (DENG *et al.*, 2020).

Uma estratégia interessante para a administração de fármacos pela via oral é a utilização de polímeros gastrorresistentes, para a produção de nanocápsulas de liberação entérica. A resistência gástrica é obtida com a introdução de polímeros que possuem solubilidade dependente de pH, isto é, em pH ácido, como o do fluido gástrico, eles mantêm sua estrutura química intacta, enquanto em pH neutro a alcalino, como no intestino, eles se dissolvem, liberando o fármaco encapsulado em seu interior. Os polímeros entéricos mais empregados são os derivados de celulose, como o acetato ftalato de celulose (CAP) e os copolímeros de ácido acrílico e metacrílico (Eudragit® L e S) (MACIEJEWSKI *et al.*, 2017; MACIEJEWSKI; SZNITOWSKA, 2019).

A liberação entérica previne a degradação dos compostos ativos no ambiente ácido do estômago e protege a mucosa gástrica da irritação induzida pelo acúmulo de fármaco em seu interior. Essas formulações propiciam a liberação em regiões específicas do intestino, de modo a permitir a absorção de fármacos insolúveis em locais mais favoráveis ou propiciar o tratamento localizado de doenças intestinais. Além disso, é possível obter uma liberação prolongada do fármaco, nos casos em que a dissolução do revestimento polimérico é iniciada durante o esvaziamento gástrico e prossiga por todo o trânsito intestinal (ZEMA *et al.*, 2013).

Diversos métodos podem ser utilizados para a produção de nanocápsulas, sendo mais conhecido o de deposição interfacial de polímero pré-formado (também denominado de nanoprecipitação), devido à facilidade de execução, baixo custo e alta reprodutibilidade (FRANK *et al.*, 2015). O método de deposição interfacial do polímero pré-formado se assemelha à técnica de emulsificação espontânea. Para a preparação das nanocápsulas, uma fase orgânica, constituída pelo óleo, surfactante lipofílico e polímero, dissolvidos em um solvente orgânico miscível em água, como acetona e etanol, é preparada. Esta fase orgânica é adicionada a uma fase aquosa contendo um surfactante hidrofílico e, com a rápida difusão do solvente orgânico, uma turbulência interfacial é gerada, levando à formação de gotículas de óleo e à precipitação do

polímero na interface óleo/água. O solvente orgânico é então removido por evaporação sob pressão reduzida, levando à formação de uma suspensão coloidal de nanocápsulas (DENG *et al.*, 2020; IYISAN; LANDFESTER, 2019; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

### 3.3.3 Caracterização dos nanocarreadores de fármacos

As nanoemulsões e nanocápsulas são sistemas apropriados para a encapsulação e liberação de fármacos poucos solúveis em água. Tais sistemas possuem composição química variada e as suas características finais são afetadas por diversos fatores, como tipo e concentração dos componentes empregados, técnica e condições de preparação. Assim, a caracterização físico-química é fundamental para o desenvolvimento das formulações, avaliação da qualidade, controle dos processos e compreensão de seu comportamento *in vitro* e *in vivo* (MODENA *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2018).

Dentre os parâmetros utilizados para caracterizar os nanocarreadores de fármacos, o tamanho e distribuição granulométrica são um dos mais importantes a serem avaliados. Geralmente o tamanho das partículas é representado pela distribuição de tamanhos em relação a uma medida de tendência central (diâmetro médio) e homogeneidade da distribuição (índice de polidispersão) (MCCLEMENTS; MCCLEMENTS, 2016). A técnica de espalhamento dinâmico da luz (*Dynamic Light Scattering* - DLS), também conhecida como espectroscopia de correlação fotônica, tem sido a mais empregada para este fim. Por esta técnica, o diâmetro hidrodinâmico é determinado por meio das flutuações temporais da luz espalhada de uma radiação incidente, causada pelo movimento Browniano das partículas em suspensão, as quais são analisadas por uma função de autocorrelação. Uma vez que as flutuações da luz espalhada estão diretamente relacionadas à velocidade com que as partículas se difundem no meio, o diâmetro hidrodinâmico ( $D_h$ ) pode ser obtido pela aplicação da Equação 1, de Stokes-Einstein,

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t} \quad (1)$$

em que  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura,  $\eta$  a viscosidade do meio e  $D_t$  o coeficiente de difusão translacional das partículas em suspensão. A partir dessa

relação, o equipamento calcula o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas e a homogeneidade de sua distribuição. Para que a medida seja precisa é importante que a temperatura da amostra seja conhecida e constante, pois afeta diretamente a viscosidade e agitação do sistema (SOARES *et al.*, 2018).

As técnicas de microscopia eletrônica também são utilizadas para se estudar o tamanho das nanopartículas em dispersão. A microscopia oferece a vantagem da medição direta do tamanho das partículas individuais, com visualização das estruturas nanométricas, ao contrário das técnicas de espalhamento da luz, que realizam medições indiretas. Portanto, os dados se complementam e fornecem um resultado mais confiável. Na microscopia eletrônica, a formação de uma imagem é resultante da interação de um feixe de elétrons incidente sobre o material, fornecendo detalhes de sua morfologia e superfície. Técnicas de microscopia eletrônica permitem a confirmação de modificações químicas realizadas na superfície das partículas ou em tensoativos, e a elucidação dos mecanismos de interação entre as nanopartículas e os componentes do meio biológico (BRODUSCH *et al.*, 2021; TAHERI *et al.*, 2016).

O potencial zeta é outra importante característica físico-química que afeta a estabilidade das nanopartículas e influencia em sua interação com componentes do meio biológico e desempenho *in vivo*. É definido como potencial elétrico no plano de cisalhamento de partículas dispersas em meio aquoso e reflete a carga superficial das partículas. Sua medição fornece informações como tendência à agregação ou floculação, e pode ser aplicado no desenvolvimento de nanocarreadores para a seleção dos componentes das formulações. De modo geral assume-se que valores de potencial zeta  $\geq 30$  mV em módulo fornecem estabilidade às dispersões coloidais, devido à repulsão elétrica existente entre as partículas (JAIN; THAREJA, 2019).

O potencial zeta é frequentemente determinado pela técnica de anemometria laser-doppler. Nesta técnica, as nanopartículas submetidas a um campo elétrico fraco migram em direção ao eletrodo de carga oposta. A mudança da frequência de um feixe de luz incidente sobre a dispersão coloidal é usada para determinação da mobilidade eletroforética que, é convertida em potencial zeta pela aplicação das teorias de Smoluchowski (JAIN; THAREJA, 2019).

Dentre os fatores que mais afetam os valores de potencial zeta, o pH é o mais importante. O potencial zeta varia com o pH, tornando-se mais positivos ou negativos em magnitude em meio ácido e básico, respectivamente. Por isso é essencial

conhecer os valores de pH das formulações e ajustá-los, caso necessário, com a finalidade de tornar as dispersões coloidais mais estáveis. Além disso, a força iônica da dispersão e a concentração de partículas também podem influenciar os valores de potencial zeta. Com o aumento da força iônica, a dupla camada elétrica ao redor das partículas torna-se mais comprimida, enquanto o potencial zeta diminui. O efeito da concentração das partículas é mais complexo, mas está associado a ambos adsorção de componentes do meio e espessura da dupla camada elétrica ao redor das mesmas (BHATTACHARJEE, 2016).

A eficiência de encapsulação é outro parâmetro que deve ser avaliado durante o desenvolvimento das formulações, pois demonstra a quantidade de fármaco incorporado aos nanocarreadores e sua capacidade em veicular o mesmo. A eficiência de encapsulação e o teor de fármaco encapsulado variam de acordo com a afinidade da substância ativa pelos componentes da formulação, que depende das suas propriedades físico-químicas e do método de preparação. A eficiência de encapsulação (EE, %) é estimada após a separação do fármaco livre da formulação, por técnicas como ultracentrifugação, ultrafiltração ou diálise. O fármaco não associado às partículas é quantificado por técnicas como espectroscopia de absorção no ultravioleta ou cromatografia líquida de alta eficiência e a EE% é geralmente expressa como o percentual de fármaco associado às partículas em relação à quantidade total presente na formulação (JAIN; THAREJA, 2019; JYOTHI *et al.*, 2010).

## 3.4 VIA DE ADMINISTRAÇÃO ORAL

### 3.4.1 Fisiologia do TGI e barreiras para a absorção de fármacos

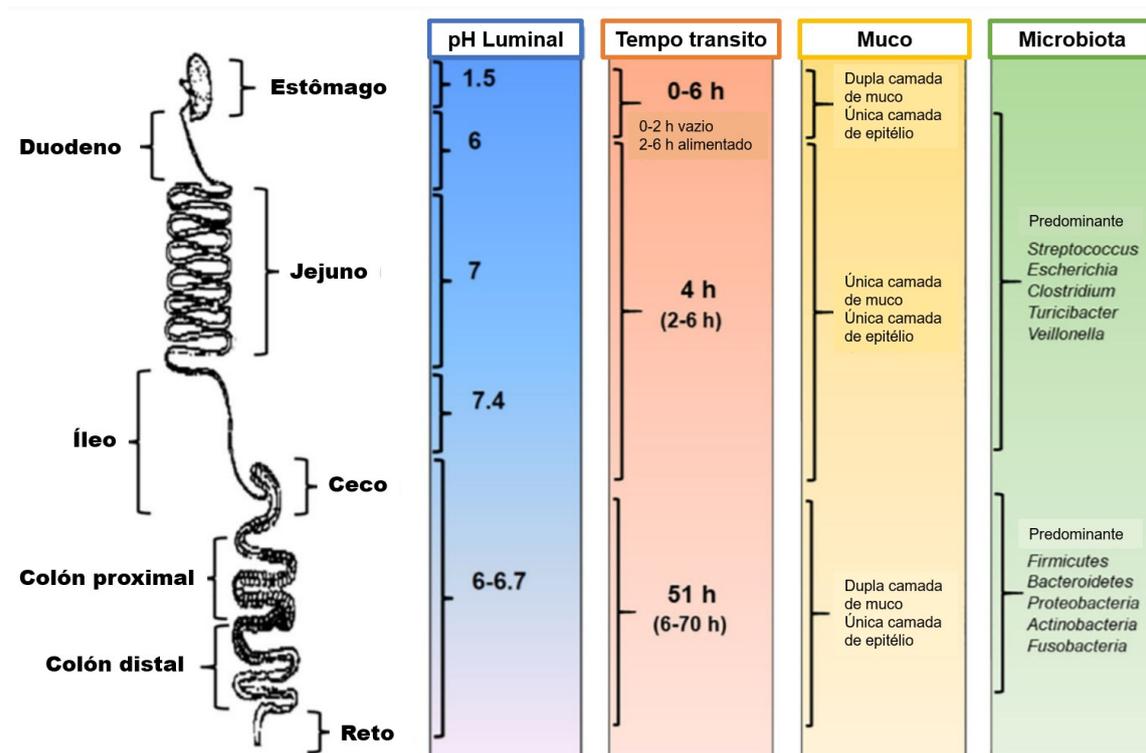
O TGI é composto por um conjunto de órgãos que formam um tubo muscular de aproximadamente 9 metros de comprimento e diâmetros variados. Dentre suas funções estão a digestão dos alimentos, a absorção de nutrientes e a excreção de resíduos. Após a ingestão, alimentos e medicamentos transitam do esôfago para o estômago com auxílio dos movimentos peristálticos. O estômago é onde o processo de digestão inicia pela ação do ácido gástrico e de enzimas, especialmente as peptidases. O estômago age como um reservatório temporário para os alimentos antes dele ser enviado ao duodeno a uma velocidade controlada. Muito pouco nutriente e fármacos são realmente absorvidos no estômago, devido a sua pequena área superficial (HUA, 2020; VRETTOS; ROBERTS; ZHU, 2021).

O intestino delgado começa distalmente ao estomago. É composto por três seções (duodeno, jejuno e íleo) com um comprimento médio de 4-6 metros. O intestino delgado é a parte mais complexa do TGI, onde a digestão é concluída devido à presença de enzimas hepáticas e pancreáticas, e a maior parte da absorção de nutrientes ocorre. O intestino delgado também é o principal local de absorção dos fármacos, devido à sua grande área superficial. A área de superfície do intestino delgado é aumentada enormemente para aproximadamente 200 m<sup>2</sup> em um adulto, devido à presença de vilosidades e microvilosidades supridas com vasos sanguíneos (CHENG *et al.*, 2010; HUA, 2020).

O intestino grosso é a parte final do trato gastrointestinal. Sua função principal é processar os produtos residuais e absorver quaisquer nutrientes e água remanescentes, o que é importante para a homeostase. Os resíduos restantes são então enviados para o reto e eliminados como fezes. Anatomicamente, ele pode ser dividido em quatro partes - cólon ascendente, transverso, descendente e sigmoide. A mucosa do cólon é lisa e não tem vilosidades especializadas, portanto, a área de superfície é muito menor do que o intestino delgado. O cólon é colonizado permanentemente por um grande número e variedade de bactérias, que formam o microbioma (HUA, 2020). A Figura 10 ilustra as diferentes características fisiológicas

do TGI. Estas características podem atuar como barreiras para a administração de fármacos por via oral, por isso serão detalhadas a seguir.

Figura 10 - Características fisiológicas do TGI que influenciam a administração oral de fármacos.



Fonte: Adaptado de HUA (2020).

Existem vários aspectos críticos que devem ser considerados na tentativa de explorar o TGI como via de administração de fármacos, incluindo: (i) a estabilidade do medicamento nos fluidos do TGI, (ii) a solubilidade em vários valores de pH e o conteúdo encontrado no intestino, (iii) a presença de muco e as membranas das células como barreira à absorção e, (iv) os processos de metabolismo de primeira passagem no intestino e fígado. O intestino delgado tem sido considerado o principal sítio para absorção de fármacos após administração oral. No entanto, ao alcançar os enterócitos, os fármacos podem se tornar substratos para as enzimas do citocromo P450 (CYP3A4) ou para as bombas de efluxo como a glicoproteína-P (P-gp), presentes em abundância nas vilosidades e que o jogam de volta para o lúmen. Ainda,

após absorção, fármacos são levados pelo sistema porta-hepático e alcançam o fígado, onde podem sofrer extenso metabolismo de primeira passagem (KHAN *et al.*, 2016; MOSS *et al.*, 2018).

A degradação enzimática e do pH atuam em conjunto como as principais barreiras bioquímicas à administração de medicamentos pela via oral. O fluido digestivo do estômago é composto de ácido clorídrico, pepsina (enzima digestora de proteínas) e muco secretado pelas glândulas gástricas, que proporcionam um ambiente ácido (pH 1,2 - 3). Além disso, as enzimas digestivas, como a pepsina, também representam obstáculos para a administração oral de medicamentos. As lipases no estômago contribuem para a hidrólise de fármacos com regiões hidrofóbicas. O intestino delgado também pode ser responsável pela digestão de fármacos, pois enzimas digestivas, como tripsinas, quimotripsinas, carboxipeptidases e elastases estão presentes em altas concentrações. Finalmente, o cólon fornece um tempo de residência mais longo de até 20 h, baixas concentrações de enzimas digestivas e valores de pH relativamente neutros de 6 - 6,7, bem como baixos volumes de fluido intestinal (AHADIAN *et al.*, 2020; GHOSH; GHOSH; SIL, 2019).

A camada de muco que reveste o estômago, intestino e cólon têm características e funções distintas e existem em ambientes luminiais radicalmente diferentes. O alto nível de acidez do estômago danificaria sua parede desprotegida e levaria à formação de úlceras gástricas. Para evitar isso, o muco no estômago atua como uma zona tampão e, associado com a excreção de moléculas de bicarbonato neutralizantes pelas células epiteliais, leva à obtenção de um pH próximo da neutralidade adjacente à superfície celular apical do estômago. O estômago é revestido por um sistema de muco formado por duas camadas: uma firmemente aderida, que consiste em mucinas transmembranas, e uma frouxamente aderida, que consiste em mucinas não covalentemente ligadas às células gastrointestinais (MOSS *et al.*, 2018).

A camada de muco do intestino delgado é consideravelmente mais fina do que o encontrado no estômago e no intestino grosso, e isso pode ser atribuído ao intestino delgado ser o local principal de absorção de fármacos e nutrientes. O muco também atua como um local de interação capaz de prender as bactérias antes que interagem com as células do epitélio intestinal, inativando-as por meio de moléculas antimicrobianas. Assim como no estômago, o muco que reveste o epitélio no intestino

grosso consiste em duas camadas, uma frouxamente e outra firmemente aderida. A espessura da camada firmemente aderida é de várias centenas de micrômetros, e é continuamente renovada. A densidade da camada firmemente aderida é muito alta, com o intuito de impedir que as bactérias intestinais alcancem às células epiteliais (AHADIAN *et al.*, 2020; MOSS *et al.*, 2018).

### 3.4.2 Administração oral de nanocarreadores

A administração pela via oral é considerada a mais segura e desejável devido a não ser invasiva, promover melhor adesão do paciente ao tratamento e propiciar um menor custo de produção dos medicamentos. Para que essa via seja efetiva é necessário que o fármaco se dissolva nos fluidos gastrointestinais para ser absorvido e distribuído para a corrente sanguínea e órgãos de interesse. As propriedades físico-químicas, como baixa solubilidade em meio aquoso, baixa permeabilidade através das membranas celulares e degradação em ambiente fisiológico são alguns fatores que resultam baixa absorção e, conseqüentemente, reduzida biodisponibilidade oral (VITHANI *et al.*, 2019).

O emprego de sistemas nanoestruturados permite contornar as limitações relacionadas com a administração oral, protegendo o fármaco contra a exposição do ambiente fisiológico hostil ao longo do TGI, como as grandes variações de pH e força iônica, presença de enzimas digestivas e exposição à microbiota intestinal. Tais condições adversas podem levar à instabilidade e degradação precoce do fármaco, com diminuição de sua biodisponibilidade (CIAPPELLANO *et al.*, 2016; LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016).

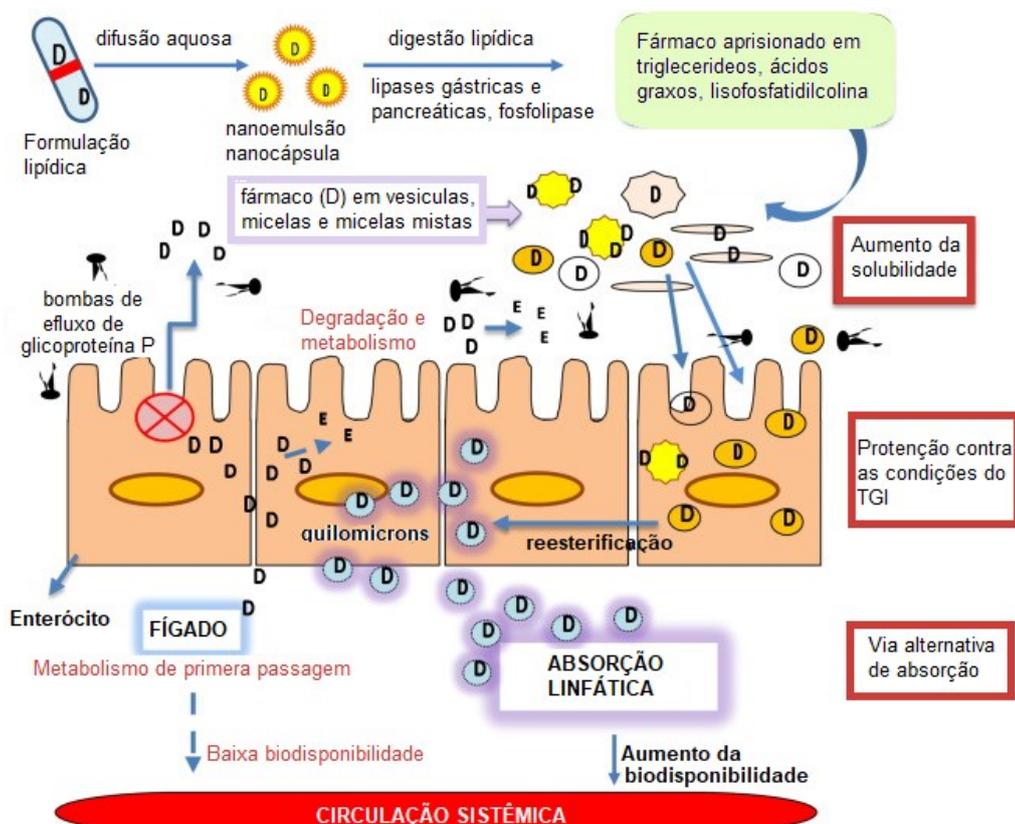
Em especial, fármacos presentes em formulações de nanocarreadores, como nanocápsulas e nanoemulsões, possuem a vantagem de carrear o fármaco em uma forma dissolvida com uma grande área superficial de contato, resultando em uma biodisponibilidade mais uniforme e reprodutível. Esta propriedade permite o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos pertencente às classes 2 e 4 da Classificação Biofarmacêutica. Além disso, particularmente nas nanoemulsões, as gotículas oferecem grande área de superfície para as enzimas pancreáticas, que promovem a hidrólise dos lipídios e, assim, aumenta a taxa de liberação e absorção do fármaco (CHAKRABORTY *et al.*, 2009; RANI *et al.*, 2019). Nas nanocápsulas, a parede

polimérica impede o contato do fármaco com os fluidos biológicos, evitando a sua degradação e o efeito *burst* de liberação induzido pelo pH, temperatura e outros fatores (DENG *et al.*, 2020).

#### 3.4.2.1 Absorção oral de fármacos a partir de nanocarreadores

O balanço entre solubilidade no ambiente aquoso do lúmen do TGI e sua permeação através das membranas lipídicas determinam a taxa e extensão da absorção oral de fármacos. Após a administração oral de formulações lipídicas, a lipase gástrica inicia a digestão dos lipídios presentes na formulação. Simultaneamente, a mistura mecânica (propulsão, trituração e retropulsão) do estômago facilita a formação de uma emulsão bruta (composta de fluido gástrico aquoso e produtos da digestão lipídica). Ao atingir o intestino delgado, os lipídios são transformados em diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos, pela ação da enzima lipase pancreática. A enzima fosfolipase A2 pancreática digere os fosfolipídios derivados da formulação ou lipídios biliares por hidrólise, para produzir lisofosfatidilcolina e ácidos graxos. A presença de lipídios no intestino delgado estimula a secreção de lipídios biliares endógenos da vesícula biliar, incluindo sais biliares, fosfolipídios e colesterol. Os monoglicerídeos previamente formados, ácidos graxos e lisofosfolipídeos são posteriormente incorporados em estruturas coloidais, como micelas e vesículas unilamelares e multilamelares na presença de sais biliares, que são capazes de solubilizar fármacos lipofílicos. As micelas formadas são absorvidas pelos enterócitos, onde são convertidas em quilomícrons após reesterificação via monoacilglicerol ou via do ácido fosfatídico, e subsequente estabilização por fosfolipídios. Os quilomícrons formados são direcionados para o sistema de transporte linfático via linfa mesentérica e finalmente entram na circulação sistêmica por drenagem linfática no ducto torácico (GHADI; DAND, 2017; NANJWADE *et al.*, 2011). Os mecanismos de promoção de absorção de fármacos incluídos em nanocarreadores lipídicos são ilustrados na Figura 11.

Figura 11 - Mecanismos de absorção de fármacos encapsulados em sistemas nanoestruturados lipídicos.



Fonte: Adaptado de Ghadi; Dand (2017).

O sistema linfático intestinal é responsável pelo transporte de lipídios absorvidos (na forma de lipoproteínas coloidais) e moléculas lipofílicas (por exemplo, vitaminas e fármacos lipossolúveis) a partir dos enterócitos para a circulação sistêmica. A linfa intestinal não passa pelo fígado antes de entrar na circulação sistêmica. Isso fornece uma rota alternativa para o transporte de fármacos, que evita o metabolismo de primeira passagem hepática. Os produtos de digestão lipídica são preferencialmente direcionados para a circulação linfática devido a impermeabilidade do endotélio vascular a grandes partículas coloidais e as grandes lacunas interendoteliais presentes no endotélio linfático. A captação linfática de fármacos lipofílicos também ocorre por via alternativa, como a absorção de micelas contendo moléculas de fármaco por via transcelular e o transporte paracelular entre os enterócitos. Assim, com o aumento da absorção intestinal e redução da metabolização de primeira passagem, é possível elevar a biodisponibilidade de fármacos

encapsulados em formulações lipídicas nanoestruturadas (PORTER; TREVASKIS; CHARMAN, 2007; VISHWAKARMA *et al.*, 2019)

A absorção de fármacos que apresentam biodisponibilidade dependente da ingestão de gorduras é favorecida pela incorporação em nanocarreadores lipídicos. Ácidos graxos de cadeia longa desempenham um papel importante na estimulação das secreções biliares e pancreáticas, prolongam o tempo de residência do fármaco no TGI, estimulam o transporte linfático, promovem alterações no fluxo sanguíneo mesentérico e hepático, induzem o aumento da permeabilidade da parede intestinal e redução do metabolismo e da atividade de efluxo que contribuem significativamente melhorando a biodisponibilidade. Por isso a escolha do óleo utilizado na preparação dos nanocarreadores lipídicos, por exemplo óleo de oliva, óleo de rícino ou triglicerídeos de cadeia média, aumentam a solubilidade e dissolução de fármacos lipofílicos e facilitam a formação de espécies solubilizadas, a partir das quais ocorre a absorção. Assim, formulações de nanocarreadores à base de lipídios podem ser utilizadas para aumentar a biodisponibilidade oral e, simultaneamente, reduzir a dose do fármaco administradas (KALEPU; MANTHINA; PADAVALA, 2013; KOZIOLEK; CARRIÈRE; PORTER, 2018; NABI *et al.*, 2019).

### **3.4.3 Estratégias adicionais para aumentar a absorção e biodisponibilidade de fármacos em nanocarreadores**

A biodisponibilidade insuficiente observada para os fármacos administrados por via oral pode ser causada pela degradação ocasionada pela abundância de enzimas presentes no ambiente gástrico e intestinal, particularmente peptidases, nucleases, lipases e esterases, que são secretadas em grandes quantidades no lúmen do intestino e possuem a capacidade de hidrolisar lipídios rapidamente. Além disso, o TGI apresenta um complexo meio no qual diferentes espécies, como os eletrólitos, podem reduzir a carga superficial dos nanocarreadores lipídicos, desestabilizando-os. A modificação de sua superfície com revestimento polimérico ou PEG promove uma estabilização estérica, proporcionada pelas cadeias poliméricas, que pode compensar a instabilidade eletrostática causada pela alta quantidade de sais, íons e variação de pH. Também ajuda a evitar a adsorção de enzimas e outras

moléculas ativas na superfície dos nanocarreadores (KARAMANIDOU *et al.*, 2016; PLAZA-OLIVER; SANTANDER-ORTEGA; LOZANO, 2021).

O emprego de revestimentos poliméricos carregados positivamente também pode fazer com que os nanocarreadores interajam com a camada de muco carregada negativamente para promover a adesão, prolongando o tempo de residência da nanoestrutura no intestino delgado e, portanto, aumentando a probabilidade de penetração na mucosa. Por outro lado, o muco hidrofóbico, carregado negativamente, pode capturar rapidamente substâncias por meio de interações físicas, eletrostáticas ou hidrofóbicas e, posteriormente, removê-las quando a camada de muco é eliminada. Assim, o revestimento com polímeros neutros e hidrofílicos, polietilenoglicol e poloxâmeros, fornece a característica mucopenetrante às nanopartículas, através de uma superfície eletricamente neutra e hidrofílica, que previne as interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre as nanopartículas e a camada de muco (WU; ZHAO; XU, 2020).

O aumento da absorção também pode ser alcançado pelo aumento da permeabilidade da membrana intestinal. Os lipídios podem aumentar a permeabilidade por meio de uma série de mecanismos diferentes, incluindo alteração na fluidez da membrana, abertura de junções intercelulares e inibição dos mecanismos de efluxo. Em geral, moléculas anfífilas baseadas em lipídios, como ácidos graxos, sais biliares e surfactantes, são conhecidos por aumentar o transporte transcelular, causando uma ruptura transitória na bicamada lipídica. Além disso, uma gama de produtos de digestão de lipídios, particularmente ácidos graxos de cadeia média (C8-12), bem como vários surfactantes, de origem natural ou sintéticos, mostraram aumentar o transporte paracelular de fármacos, alterando as junções intercelulares podendo estar associado à estimulação da contração dependente da calmodulina das fibras de actina, aumentando adicionalmente o fluxo transcelular dos fármacos (NIU *et al.*, 2016).

A glicoproteína-P (P-gp) é um transportador dependente de ATP encontrado na superfície apical de células epiteliais nos rins, intestino e células endoteliais do cérebro. Tem função protetora, identificando e expulsando toxinas e xenobióticos. Portanto, a P-gp pode desempenhar um papel relevante na farmacocinética dos fármacos. A P-gp intestinal é responsável pelo efluxo de substâncias dos enterócitos para o lúmen intestinal. Esse efluxo diminui a chance de fármacos atingirem a

circulação sistêmica e, portanto, tem um impacto negativo em sua biodisponibilidade oral. Para contornar essa limitação, a incorporação de inibidores de P-gp às formulações de nanocarreadores tem sido testada. Os excipientes farmacêuticos podem interagir com bicamadas lipídicas e modular a atividade da P-gp. Eles são geralmente compostos tensoativos, como o polisorbato 80 e poloxâmeros, e são considerados inibidores não específicos da P-gp, podendo se ligar ao sítio ativo não transportador da P-gp, mudar a conformação da proteína e alterar a integridade da membrana celular, que resulta em sua disfunção (NGUYEN; DUONG; MAENG, 2021).

### 3.5 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO ATRA

O desenvolvimento de sistemas de liberação nanoestruturados contendo ATRA tem como objetivos principais propor uma via alternativa para sua administração e melhorar as suas propriedades biofarmacêuticas e farmacocinéticas. Os sistemas nanoestruturados permitem o aumento da biodisponibilidade e diminuição da toxicidade do fármaco, além de possibilitar o direcionamento para tecidos alvos com introdução de ligantes na sua superfície. Os nanocarreadores melhoram a solubilidade aparente de fármacos lipofílicos em água, o que é de grande interesse, uma vez que a baixa solubilidade do ATRA tem limitado a sua absorção pelo trato gastrointestinal (GIULI *et al.*, 2020).

Muitos estudos têm sido realizados como intuito de melhorar as propriedades biofarmacêuticas do ATRA. CHEN *et al.* (2013) prepararam complexos de inclusão do ATRA em 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HPBCD), para a obtenção de péletes, visando a administração oral. A avaliação do perfil de dissolução em meio biorrelevantes mostrou que a dissolução do ATRA aumentou significativamente após a formação do complexo de inclusão. O ATRA livre apresentou dissolução menor que 4% após 60 minutos, enquanto o emprego do complexo de inclusão levou à mais de 90% de dissolução do ATRA a partir dos péletes em 10 minutos, não sendo observados precipitados em até 60 minutos, demonstrando ser uma boa alternativa para aumentar a absorção oral deste fármaco.

NARVEKAR *et al.* (2014) desenvolveram um nanocarreador híbrido constituído de polímero-óleo (PONC) na qual o ATRA pré-solubilizado em um óleo foi disperso em uma matriz de PLGA. Os nanocarreadores apresentaram tamanho de

cerca de 200 nm e potencial zeta negativo. A eficiência de encapsulação do ATRA foi aumentada em até 8,5 vezes, em comparação com nanopartículas poliméricas de PLGA. Após a liofilização e armazenamento, os pesquisadores demonstraram que o ATRA permaneceu encapsulado de forma estável por 6 meses, sem redução significativa da eficiência de encapsulação.

SILVA *et al.* (2016) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo ATRA para o tratamento de leucemia. A influência da formação *in situ* de um par iônico entre o ATRA e aminas lipofílicas sobre as características físico-químicas das partículas foi avaliada. Colesterol e butirato de colesterila, foram utilizados como matriz lipídica, polissorbato 80 como surfactante e as aminas benetamina (BNT), cloridrato de maprotilina (MPT-HCl) e maprotilina livre (MPT-FB) foram testadas. As nanopartículas apresentaram tamanho entre 70 e 200 nm e potencial zeta negativo. A EE do ATRA em SLN foi significativamente aumentada pela presença de aminas. Os valores de EE para ATRA em SLN aumentou de 33% (SLN sem amina) para 99% para SLN formuladas com aminas.

SUBONGKOT; NGAWHIRUNPAT (2017) desenvolveram microemulsões a partir do óleo de peixe e o tensoativo oleth-5 para administração oral do ATRA. As microemulsões obtidas apresentaram tamanho de partícula menor que 200 nm e carga superficial negativa. Os pesquisadores observaram que a velocidade de liberação *in vitro* do ATRA em meios biorrelevantes seguia a cinética de ordem zero e correlacionava-se com o tipo de microemulsão, de forma que formulações óleo em água liberaram o fármaco de forma mais eficiente que microemulsões água em óleo. A formulação microemulsionada foi capaz de aumentar significativamente a permeação intestinal *in vitro* do ATRA, em comparação com o controle, provavelmente devido ao transporte em vesículas e ao efeito promotor de absorção do surfactante. Além disso, não houve diferença significativa na citotoxicidade entre as formulações contendo ATRA, as formulações brancas e o ATRA livre, indicando que os carreadores são seguros para a administração oral.

GUI *et al.* (2019) desenvolveram nanopartículas de polímero-lipídio conjugadas a aptâmeros de CD133 para o direcionamento do ATRA em células alvo e avaliaram a sua potencial atividade sobre células iniciadoras de osteossarcoma. As nanopartículas conjugadas com aptâmeros CD133 (ATRA-PLNP-CD133) apresentaram tamanho de 129,9 nm, potencial zeta negativo e uma liberação

sustentada de ATRA durante 144 h. Em estudos *in vitro*, utilizando duas linhagens de células de osteossarcoma humano, Saos-2 e U-2OS, as nanopartículas promoveram de forma eficiente e específica a entrega de ATRA para células iniciadoras de osteossarcoma e levaram à obtenção de uma eficácia terapêutica superior em comparação com o ATRA livre e as nanopartículas convencionais (sem a conjugação com aptâmeros). Os estudos *in vivo* demonstraram redução significativa do volume tumoral após tratamento intravenoso com ATRA-PLNP-CD133, em comparação com os grupos controle, representando uma abordagem promissora para a terapia de células iniciadoras de osteossarcoma.

LI; HAN, (2020) desenvolveram nanoformulações lipídicas como uma estratégia de co-entrega de dacarbazina (DBZ) e ATRA para o tratamento combinado do melanoma. A DBZ deve ser veiculado no núcleo lipídico, enquanto o ATRA deve fazer parte da estrutura das nanopartículas. As propriedades físico-químicas, absorção celular e citotoxicidade *in vitro* de nanopartículas combinadas foram avaliadas. A citotoxicidade *in vitro* foi avaliada pelo método de MTT, utilizando células B16F10 tratadas por 24 h. A eficiência de encapsulação da DBZ e do ATRA nas formulações RD-LNF foi acima de 90%, o tamanho das partículas em torno de 140 nm e potencial zeta negativo. Os estudos de citotoxicidade demonstraram que a co-encapsulação dos fármacos gera um sinergismo e aumento da morte celular em comparação com os fármacos isoladamente. Em concentração igual a 50 µg/ml, os carreadores contendo os dois fármacos reduziram em 80% a viabilidade celular, enquanto a nanopartícula contendo apenas DBZ reduziu em 40%, indicando a potencialidade sinérgica do ATRA.

LIANG; LI; ZHU (2020) desenvolveram nanopartículas multicamadas para co-encapsular ATRA, cisplatina (CDDP) e vinorelbina (VNR) para avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* frente ao câncer de pulmão de células não pequenas. A estratégia contou com a síntese de um pró-fármaco de CDDP, formulação de nanocarreadores multicamada contendo núcleo polimérico, revestido por uma camada lipídica, seguida de uma camada de ácido hialurônico para encapsular os três fármacos. Os pesquisadores obtiveram nanopartículas com tamanho de 158 nm e potencial zeta de 12,3 mV. A citotoxicidade *in vitro* contra células de câncer de pulmão resistentes a CDDP (células A549/CIS) e células epiteliais de pulmão humano normal (células BEAS-2B) mostrou que os fármacos nanoencapsulados promoveram maior

redução da viabilidade em comparação com os fármacos livres. A avaliação do sinergismo mostrou valores de CI < 1, indicando que a administração conjunta dos três fármacos potencializa a ação antitumoral. Os ensaios in vivo em camundongos BALB/c inoculados com células A549/CIS demonstraram que o nanossistema pode inibir significativamente o crescimento antitumoral e reduzir o volume do tumor.

ZUCCARI *et al.* (2021) prepararam formulações de hidrogéis para uso tópico contendo micelas de D- $\alpha$ -tocoferil-polietilenoglicol-succinato (TPGS) contendo ATRA (ATRA-TPGSs) e avaliaram sua atividade frente a células de melanoma humano. As micelas foram preparadas pelo método de evaporação do solvente usando diferentes quantidades de TPGS e apresentaram tamanhos entre 11 e 20 nm, potencial zeta negativo e boa eficiência de encapsulação (35 – 70%). Usando Carbopol® 980 como agente gelificante, géis contendo ATRA-TPGS foram obtidos. Estudos de permeação cutânea do ATRA foram realizados em células de Franz, utilizando pele de orelha de porco como modelo de membrana. Os estudos demonstraram uma permeação do ATRA de 27  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  em 24 h, após aplicação das formulações contendo ATRA-TPGS na pele, superior ao já relatado para os niossomas e lipossomas. As nanopartículas ATRA-TPGSs mostraram efeitos citotóxicos aumentados em células de linhagem celular primária de melanoma BRAFV600 humano, reduzindo a viabilidade celular em até 70% em 72 horas, sugerindo que essas formulações podem representar uma alternativa válida para melhorar a adesão do paciente e alcançar resultados terapêuticos mais eficazes.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Matérias-primas

- Acetato fitalato de celulose (Sigma - Aldrich, EUA);
- Ácido all-trans retinóico (Purifarma, Brasil);
- Eudragit® S100 (Evonik, Alemanha);
- Lecitina de Soja (Lipoid S100®, Lipoid GmbH, Alemanha);
- Óleo de rícino (Sigma - Aldrich, EUA);
- Polissorbato 80 (Tweem® 80, Sigma - Aldrich, EUA);
- Poloxamer 188 (Kolliphor® P 188, Sigma - Aldrich, EUA);

#### 4.1.2 Solventes e Reagentes

- Acetona P.A (Neon comercial, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (JT Baker, EUA);
- Ácido acético glacial grau HPLC (Sigma - Aldrich, EUA);
- Ácido clorídrico 37% P.A. (Biotec, Brasil);
- Água ultrapura (Milli-Q®, Millipore, EUA);
- Álcool etílico 95% P.A. (Neon, Brasil);
- Fosfato de potássio dibásico (Alphatec, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico (Alphatec, Brasil);
- Hidróxido de sódio P.A. (Alphatec, Brasil);

#### 4.1.3 Equipamentos

- Agitador magnético multistirrer 15 (Velp Scientifica, Itália);
- Agitador Vortex KMC-1300V (Vision Scientific, EUA);
- Balança analítica AUW220D (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica BG200 (Gehaka, Brasil);
- Banho de ultrassônico USC 700 (Unique-Brasil);

- Centrífuga analítica LUMiSizer® (LUM GmbH, Alemanha - LINDEN/UFSC)
- Coluna HyperClone™ 00F-4361-E0, C18, 150 x 4.6 mm (Phenomenex, EUA)
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, acoplado a detector de arranjo de diodos – LC-20AD (Shimadzu, Japão);
- Evaporador rotatório R-300 (Büchi, Suíça);
- LUMiSizer® (LUM GmbH, Alemanha - LINDEN/UFSC)
- Medidor de pH mPA210 (MSTecnopon Instrumentação, Brasil);
- Minicentrífuga (Ministar, Itália);
- Rotaevaporado R-300 (Buchi, Suíça);
- Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments, Reino Unido).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Desenvolvimento dos nanocarreadores contendo ATRA

#### 4.2.1.1 Determinação da solubilidade do ATRA em diferentes óleos

A solubilidade do ATRA em diferentes óleos foi previamente avaliada para selecionar aquele a ser usado na preparação das nanoemulsões e nanocápsulas. A determinação da solubilidade foi realizada adicionando-se um excesso de ATRA individualmente em 5 mL de diferentes óleos. As misturas foram submetidas à agitação magnética por 24 horas, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Passado esse período, as misturas foram levadas à centrifugação a 6200 rpm durante 15 minutos, em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram coletados e diluídos adequadamente em acetonitrila. As soluções resultantes foram filtradas em membrana filtrante de PVDF (0,45 µm, Millipore, EUA) e analisadas por CLAE, conforme descrito em 4.2.3.1. Os óleos testados foram o óleo de rícino, triglicerídeos de cadeia média (TCM), óleo de algodão e amêndoas. As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.2.1.2 Preparação das nanoemulsões

##### 4.2.1.2.1 Preparação das nanoemulsões brancas

As nanoemulsões brancas (NEB) foram preparadas utilizando-se a técnica de emulsificação espontânea descrita por BOUCHEMAL *et al.* (2004). Brevemente, a fase orgânica foi preparada pesando-se 500 mg ou 700 mg de óleo de rícino diretamente em um cálice de 30,0 mL. Em seguida foram adicionados 1,4 mL, 2,0 mL ou 3,0 mL de uma solução etanólica de lecitina de soja (Lipoid® S100) a 5,0 mg/mL. O volume final foi completado para 20 mL com etanol e as soluções resultantes foram mantidas em banho ultrassônico por 6 minutos para completa solubilização dos componentes. Separadamente, soluções de Poloxamer 188 (Kolliphor® P 188) a 0,25%, 0,5% ou 1,0% (m/v) ou Tween® 80 0,5% ou 1,0% (m/v) foram preparadas e empregadas como fase aquosa das formulações.

A fase orgânica foi então vertida no interior de 40 mL da fase aquosa mantida sob agitação magnética, com o auxílio de uma seringa. A nanoemulsão formada foi mantida sob agitação magnética por mais 10 minutos e, em seguida, submetidas à evaporação sob pressão reduzida a temperatura de 40°C para eliminação do solvente orgânico e concentração até o volume final de 10 mL. Após a evaporação, as nanoemulsões brancas foram filtradas através de papel-filtro quantitativo com tamanho de poro de 8,0 µm e armazenadas a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Todas as formulações foram preparadas em triplicata. A composição das formulações testadas está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição das nanoemulsões brancas (NEB) preparadas pela técnica de emulsificação espontânea.

Formulação NEB	Fase orgânica			Fase aquosa		
	Óleo de rícino (mg)	Lecitina <sup>a</sup> (mg)	Etanol qsp (mL)	Poloxamer 188 (%)	Tween <sup>®</sup> 80 (%)	Água purificada qsp (mL)
NEB <sub>1</sub>	700	7	20	0,25	-	40
NEB <sub>2</sub>	700	7	20	0,5	-	40
NEB <sub>3</sub>	700	7	20	1	-	40
NEB <sub>4</sub>	500	7	20	0,25	-	40
NEB <sub>5</sub>	500	7	20	0,5	-	40
NEB <sub>6</sub>	500	7	20	1	-	40
NEB <sub>7</sub>	500	10	20	0,25	-	40
NEB <sub>8</sub>	500	15	20	0,25	-	40
NEB <sub>9</sub>	500	10	20	0,5	-	40
NEB <sub>10</sub>	500	15	20	0,5	-	40
NEB <sub>11</sub>	500	10	20	1	-	40
NEB <sub>12</sub>	500	15	20	1	-	40
NEB <sub>13</sub>	700	10	20	0,25	-	40
NEB <sub>14</sub>	700	15	20	0,25	-	40
NEB <sub>15</sub>	700	10	20	0,5	-	40
NEB <sub>16</sub>	700	15	20	0,5	-	40
NEB <sub>17</sub>	700	10	20	1	-	40
NEB <sub>18</sub>	700	15	20	1	-	40
NEB <sub>19</sub>	500	7	20	-	0,5	40
NEB <sub>20</sub>	500	7	20	-	1,0	40

<sup>a</sup> Quantidade obtida a partir da adição de uma solução de lecitina de soja 5 mg/mL em etanol.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 4.2.1.2.2 Preparação das nanoemulsões contendo ATRA

A preparação das nanoemulsões contendo ATRA (NEA) foi realizada conforme descrito em 4.2.1.2.1., com modificações. Para a preparação da fase orgânica, 500 mg de óleo de rícino foram adicionados a um cálice de 30,0 mL. A este cálice foram adicionados 1,4 mL da solução etanólica de lecitina de soja (Lipoid® 100) 5,0 mg/mL e 5,0 mL ou 10,0 mL de uma solução etanólica de ATRA 1,0 mg/mL. O volume foi então completado com etanol para 20 mL. A fase aquosa foi constituída de 40 mL de uma solução de Poloxamer 188 (Kolliphor® P 188) 0,25% (m/v) ou Tween® 80 0,5% ou 1,0% (m/v).

A fase orgânica foi vertida no interior da fase aquosa com o auxílio de uma seringa. A nanoemulsão formada foi mantida sob agitação magnética por 10 minutos e, em seguida, submetidas à evaporação sob pressão reduzida a temperatura de 40°C até o volume final de 10 mL. Após a evaporação, as nanoemulsões contendo ATRA foram filtradas através de papel-filtro quantitativo com tamanho de poro de 8,0 µm. Com o objetivo de evitar a degradação do fármaco, as formulações foram preparadas e armazenadas protegidas da luz e em temperatura ambiente. O pH das formulações foi ajustado para 3,5 de modo a manter o ATRA em sua forma não ionizada, na qual ele é menos solúvel em água. Todas as formulações foram preparadas em triplicata. A composição final das formulações de nanoemulsões contendo ATRA é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição das nanoemulsões (NEA) contendo ATRA.

		NEA <sub>P1</sub>	NEA <sub>P2</sub>	NEA <sub>T1</sub>	NEA <sub>T2</sub>
Fase orgânica	Óleo de rícino (mg)	500	500	500	500
	Lecitina <sup>a</sup> (mg)	7	7	7	7
	ATRA <sup>d</sup> (mg)	5	10	10	10
	Etanol qsp (mL)	20	20	20	20
Fase aquosa	Tween® 80 (%)	-	-	0,5	1,0
	Poloxamer 188 (%)	0,25	0,25	-	-
	Água purificada qsp (mL)	40	40	40	40

<sup>a</sup> Quantidade obtida a partir da adição de uma solução de lecitina de soja a 5 mg/mL em etanol;

<sup>b</sup> Quantidade obtida a partir da adição de uma solução de ATRA 1 mg/mL em etanol.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 4.2.1.3 Preparação das nanocápsulas poliméricas

##### 4.2.1.3.1 Preparação das nanocápsulas poliméricas brancas

As nanocápsulas poliméricas (NC) foram preparadas utilizando a técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado (nanoprecipitação) descrita por FESSI *et al.* (1989). Brevemente, a fase orgânica foi preparada pesando-se 500 mg de óleo de rícino diretamente em um cálice de 30,0 mL. Em seguida, 1,0 mL de uma solução etanólica de lecitina de soja (Lipoid® S100) a 7 mg/mL e 5,0 mL de uma solução etanólica de Eudragit® S100 (EUD) 20 mg/mL ou de acetofalato de celulose (CAP) 20 mg/mL em etanol:acetona (1:1, v/v), foram adicionados ao cálice. O volume final foi completado para 20 mL com etanol e as soluções foram deixadas em banho ultrassônico por 6 minutos para completa solubilização dos componentes. Separadamente, uma solução de Tween® 80 a 1,0% (m/v) foi preparada e utilizada como fase aquosa.

A fase orgânica foi então vertida no interior de 40 mL da fase aquosa mantida sob agitação magnética, com o auxílio de uma seringa e as nanocápsulas formadas foram mantidas sob agitação magnética por 10 minutos. Após, as suspensões de nanocápsulas foram submetidas à evaporação sob pressão reduzida a temperatura de 40°C para eliminação do solvente orgânico e concentração até o volume final de 10 mL. Após a evaporação, as nanocápsulas brancas (NCB) foram filtradas através de papel-filtro quantitativo com tamanho de poro de 8,0 µm e armazenadas a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Todas as formulações foram preparadas em triplicata. A composição das formulações encontra-se na Tabela 4.

##### 4.2.1.3.2 Preparação das nanocápsulas poliméricas contendo ATRA

A preparação das nanocápsulas poliméricas contendo ATRA (NCA) foi realizada conforme descrito em 4.2.1.3.1, com a diferença que foram acrescentadas à fase orgânica 10,0 mL de uma solução etanólica de ATRA 1 mg/mL. Com o objetivo de evitar a degradação do fármaco, todas as formulações foram preparadas e armazenadas protegidas da luz e em temperatura ambiente. O pH das formulações foi ajustado para 3,5 de modo a manter o ATRA em sua forma não ionizada, na qual

ele é menos solúvel em água. As formulações foram preparadas em triplicata. A composição das formulações de nanocápsulas contendo ATRA testadas está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição das nanocápsulas brancas (NCB) e contendo ATRA (NCA) preparadas pela técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado.

		NCB <sub>EUD</sub>	NCB <sub>CAP</sub>	NCA <sub>EUD</sub>	NCA <sub>CAP</sub>
Fase orgânica	Óleo de rícino (mg)	500	500	500	500
	Lecitina <sup>a</sup> (mg)	7	7	7	7
	Eudragit <sup>®</sup> S100 <sup>b</sup> (mg)	100	-	100	-
	Acetofalato de celulose <sup>c</sup> (mg)	-	100	-	100
	ATRA <sup>d</sup> (mg)	-	-	10	10
	Etanol qsp (mL)	20	20	20	20
Fase aquosa	Tween <sup>®</sup> 80 (%)	1,0	1,0	1,0	1,0
	Água purificada qsp (mL)	40	40	40	40

<sup>a</sup> Quantidade obtida a partir da adição de uma solução de lecitina de soja 5 mg/mL em etanol;

<sup>b</sup> Quantidade obtida a partir da adição de uma solução de Eudragit<sup>®</sup> S100 20 mg/ml em etanol

<sup>c</sup> Quantidade obtida a partir de uma solução de CAP a 20 mg/ml em etanol:acetona (1:1 v/v),

<sup>d</sup> Quantidade obtida a partir da adição de uma solução de ATRA 1 mg/mL em etanol

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

## 4.2.2 Caracterização físico-química dos nanocarreadores

### 4.2.2.1 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro médio e índice de polidispersão e o potencial zeta das nanoemulsões e das nanocápsulas poliméricas foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz e anemometria laser Doppler, respectivamente, utilizando um equipamento Zetasizer Nano ZS<sup>®</sup> (Malvern Instruments, Reino Unido). As análises foram realizadas a 25 °C, após diluição apropriada das amostras (1:100 V/V) em água ultrapura (Milli-Q<sup>®</sup>, Millipore, EUA). A análise do tamanho e distribuição granulométrica foi realizada em ângulo fixo de 173°. Para determinação do potencial zeta, as amostras foram colocadas em células eletroforéticas, onde um potencial de ±150 mV foi estabelecido. Os valores de potencial zeta foram calculados a partir dos

valores de mobilidade eletroforética, empregando a equação de Smoluchowski (SZE *et al.*, 2003).

#### 4.2.2.2 *Determinação do pH*

O pH das formulações de nanocarreadores foi determinado em um pHmetro mPA210 (MSTecnopon Instrumentação, Brasil), previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. Os resultados correspondem à média de três determinações.

#### 4.2.2.3 *Determinação do teor e eficiência de encapsulação do ATRA em nanocarreadores*

A concentração de ATRA presente nas nanoemulsões e nanocápsulas foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, nas condições descritas em 4.2.3.1. Para as análises, uma alíquota de 50,0 µL de cada uma das formulações contendo ATRA foi transferida para balões volumétricos de 5,0 mL e o volume final completado com acetonitrila. As soluções resultantes foram submetidas ao banho de ultrassom por 20 minutos e, posteriormente filtradas em membrana de PVDF (0,45 µm, Milipore) e analisadas por CLAE. O teor de ATRA (µg/mL) nas nanoemulsões e nanocápsulas foi calculado pela média de três determinações. Todas as amostras foram mantidas protegidas da luz até o momento da análise.

Para avaliação da eficiência de encapsulação (EE,%), as nanoemulsões e nanocápsulas foram submetidas à centrifugação a 6200 rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foi coletado e diluído em acetonitrila. As amostras foram filtradas em membrana de PVDF (0,45 µm, Millipore) e analisadas por CLAE nas condições descritas em 4.2.3.1. A eficiência de encapsulação (EE,%) do ATRA nas formulações foi estimada como sendo a diferença percentual entre a concentração total, obtida após completa dissolução das formulações, e a concentração encontrada no sobrenadante, conforme a Equação 2.

$$EE \% = \frac{C_t - C_s}{C_t} \times 100 \quad (2)$$

em que,  $C_t$  corresponde a concentração total de ATRA ( $\mu\text{g/mL}$ ) determinada nas nanoemulsões e nanocápsulas e  $C_s$  corresponde a concentração de ATRA ( $\mu\text{g/mL}$ ) determinada no sobrenadante. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

#### **4.2.3 Desenvolvimento e validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação do teor de ATRA livre e nos nanocarreadores**

##### *4.2.3.1 Condições cromatográficas*

O teor do ATRA livre e nos nanocarreadores foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme metodologia descrita por SUBONGKOT; NGAWHIRUNPAT (2017), com modificações. As análises foram realizadas em cromatógrafo LC-20AD (Shimadzu, Japão) equipado com uma bomba binária LC-20AD e acoplado com um detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A 206 (DAD). Os experimentos foram realizados em modo de fase reversa, utilizando uma coluna C18 (150 x 4,6 mm, 5,0  $\mu\text{m}$ ), (Phenomenex, EUA) com temperatura de forno a 30 °C. O sistema foi operado em modo isocrático com fase móvel constituída de 80% de acetonitrila grau HPLC, 20% de água ultrapura acrescida de ácido acético glacial grau HPLC, com pH ajustado para 2,5, em fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$  e os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda de 353 nm, com monitoramento dos espectros de UV/Vis na faixa de 200 a 400 nm. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software LCsolution.

##### *4.2.3.2 Validação do método analítico*

A validação do método analítico foi realizada levando-se em consideração os parâmetros de especificidade, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez, conforme recomendações presentes na RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA),

que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências (BRASIL, 2017).

#### 4.2.3.2.1 Especificidade

A especificidade do método analítico foi avaliada por meio da análise dos perfis cromatográficos das soluções obtidas após completa dissolução dos nanocarreadores sem fármaco, em comparação com as soluções obtidas a partir dos nanocarreadores contendo ATRA, após análise das amostras nas condições descritas em 4.2.3.1.

#### 4.2.3.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi determinada por meio da construção de três curvas de calibração em três dias consecutivos. Para o preparo da solução estoque, 1,0 mg de ATRA padrão de trabalho foi exatamente pesado e transferido para um balão volumétrico de 10,0 mL. O volume final foi completado com acetonitrila e a solução foi deixada em banho de ultrassom por 3 minutos para completa solubilização, levando à obtenção de uma solução de ATRA com concentração de 100 µg/mL. A partir desta solução estoque, soluções de ATRA nas concentrações de 0,5 a 20,0 µg/mL foram preparadas usando acetonitrila como solvente. Todas as soluções foram mantidas protegidas da luz até o momento da análise. As soluções foram analisadas por CLAE conforme condições cromatográficas descritas em 4.2.3.1. A partir dos dados obtidos, gráficos da área do pico do ATRA *versus* concentração foram construídos e utilizados como curvas de calibração. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram obtidos pelo cálculo da regressão linear utilizando *Software Excel*<sup>®</sup>.

#### 4.2.3.2.3 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados com base nas curvas de calibração obtidas, utilizando a Equação 3 e Equação 4, respectivamente:

$$LD = \frac{DPi \times 3,3}{IC} \quad (3)$$

$$LQ = \frac{DPi \times 10}{IC} \quad (4)$$

em que: DPi corresponde ao desvio padrão do intercepto com o eixo y obtido a partir das três curvas de calibração e IC corresponde à inclinação da reta

#### 4.2.3.2.4 Precisão

A precisão do método de CLAE foi avaliada por meio dos ensaios de repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia). A repetibilidade foi avaliada pela análise de seis amostras obtidas após dissolução de 10,0 µL nanocápsulas NCA<sub>CAP</sub> em 1,0 mL de acetonitrila, preparadas individualmente, nas condições descritas em 4.2.3.1. A precisão intermediária foi avaliada por meio da análise das seis amostras em três dias consecutivos. A precisão foi expressa como a porcentagem do desvio padrão relativo (DPR, %) entre as análises.

#### 4.2.3.2.5 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo método de adição de padrão de ATRA em 3 níveis de concentração (baixo, médio e alto) diferentes, na faixa de concentração da curva de calibração. Para isto, 50 µL de uma suspensão de nanocápsulas brancas (NCB<sub>CAP</sub>) foram transferidos para balões volumétricos de 5,0 mL, aos quais foram adicionadas soluções padrão de ATRA, de modo a obter concentrações finais de 1,0, 10,0 e 20,0 µg/mL. O volume final foi completado com acetonitrila e as soluções levadas ao banho de ultrassom por 3 minutos. As amostras foram filtradas em membrana PVDF (0,45 µm, Millipore, EUA) e analisadas por CLAE, conforme descrito em 4.2.3.1. As análises foram realizadas em triplicata e a exatidão do método foi estimada pela recuperação percentual (R%) de ATRA nas soluções, conforme Equação 5

$$R \% = \frac{C_{exp}}{C_{teor}} \times 100 \quad (5)$$

em que: C<sub>exp.</sub> corresponde à concentração média de ATRA (µg/mL) encontrada na solução após a adição do padrão e C<sub>teor.</sub> corresponde à concentração teórica.

#### 4.2.3.2.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio da análise da concentração de ATRA na suspensão de nanocápsulas NCA<sub>CAP</sub> após pequenas alterações das condições cromatográficas. A robustez do método foi expressa como porcentagem do desvio padrão relativo (DPR, %) entre as análises. Os parâmetros avaliados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros avaliados para determinação da robustez da metodologia analítica para a determinação do teor de ATRA por CLAE.

Parâmetro	Nível inferior	Nível superior
Fluxo da fase móvel (mL/min)	0,9	1,1
Composição da fase móvel (acetonitrila:água pH 2,5, v/v)	79:21	81:19
Comprimento de onda de detecção (nm)	352	354

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 4.2.4 Estudos de estabilidade dos nanocarreadores contendo ATRA

##### 4.2.4.1 Estudo de estabilidade de curto prazo

Para avaliação da estabilidade de curto prazo das formulações, a nanoemulsão e as nanocápsulas contendo ATRA foram armazenadas protegidas da luz, à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) e sob refrigeração ( $5 \pm 2$  °C). Nos tempos 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias, alíquotas de cada uma das amostras foram coletadas e analisadas quanto ao tamanho médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de ATRA. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como a média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados obtidos foram comparados e analisados estatisticamente pela análise da variância (ANOVA) seguida pelo posthoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  para um nível de confiança de 95%.

#### 4.2.4.2 Estudos de estabilidade acelerada

A estabilidade acelerada das formulações contendo ATRA foi investigada usando uma centrífuga analítica LUMiSizer® (LUM GmbH, Alemanha - LINDEN/UFSC), que consiste em uma centrífuga com 12 células ópticas e uma fonte de luz infravermelho próximo. Este equipamento permite a medição da intensidade da luz infravermelha transmitida em função do tempo e da posição ao longo de todo o comprimento da cubeta contendo a amostra, enquanto elas são simultaneamente submetidas à força centrífuga, fornecendo informações sobre fenômenos de instabilidade, como cremagem, coalescência e flocculação (SOBISCH; LERCHE, 2008). Para a análise, 2,5 mL de cada formulação foram colocados em células ópticas de policarbonato e submetidos à rotação a 4.000 rpm por 7200 segundos, na temperatura de 25 °C, e intervalo de 10 s entre as medições. As amostras foram analisadas em triplicata sem diluição prévia. A estabilidade das formulações foi representada por meio do perfil de transmissão no tempo *versus* espaço e pelo índice de instabilidade, em que, quanto mais próximo de zero, menor é a tendência de ocorrência de fenômenos de separação de fases.

#### 4.2.5 Avaliação do perfil de liberação do ATRA a partir dos nanocarreadores

##### 4.2.5.1 Determinação da solubilidade do ATRA nos meios de liberação

Para a realização dos estudos de liberação do ATRA a partir dos nanocarreadores, a solubilidade do fármaco em diferentes meios foi avaliada com intuito de estabelecer as condições *sink*. O ácido clorídrico 0,1 N e tampão fosfato pH 6,8 foram usados como meio gástrico e intestinal simulados, e etanol e laurilsulfato de sódio (LSS) foram adicionados para aumentar a solubilidade do ATRA. A composição dos meios é mostrada na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição dos meios testados para realização do teste de liberação.

<b>Meio</b>	<b>Composição</b>
1	HCl 0,1 N
2	HCl 0,1 N + etanol (80:20)
3	HCl 0,1 N + LSS (0,5%)
4	HCl 0,1 N + etanol (80:20) + LSS (0,5%)
5	Tampão fosfato pH 6,8
6	Tampão fosfato pH 6,8 + etanol (80:20)
7	Tampão fosfato pH 6,8 + LSS (0,5%)
8	Tampão fosfato pH 6,8 + etanol (80:20) + LSS (0,5%)

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Para determinação da solubilidade, um excesso de ATRA (cerca de 15 mg) foi adicionado a 30 mL de cada meio. As misturas foram submetidas à agitação magnética por 24 horas, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, as misturas foram submetidas à ultracentrifugação a 6200 rpm durante 20 minutos, em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram coletados, filtrados em membrana filtrante de PVDF (0,45 µm, Millipore, EUA), diluídos em acetonitrila na proporção de 1:10 (v/v), e analisados por CLAE, conforme descrito em 4.2.3.1. A concentração de ATRA nos diferentes meios foi determinada pela equação da reta obtida a partir da curva de calibração do fármaco nos diferentes meios. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

#### *4.2.5.2 Validação do método analítico de CLAE para determinação do ATRA nos meios de liberação*

##### *4.2.5.2.1 Condições cromatográficas*

A concentração de ATRA nos meios de liberação foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme condições descritas em 4.2.3.1. A validação do método analítico foi realizada pela avaliação dos parâmetros de especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, segundo orientações presentes na RDC N° 166, de 24 de julho de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências (BRASIL, 2017).

#### 4.2.5.2.2 Especificidade

A especificidade do método analítico foi avaliada pela análise dos perfis cromatográficos obtidos após incubação das formulações brancas e contendo ATRA nos meios de liberação na proporção de 1:100 v:v. As amostras foram analisadas por CLAE conforme metodologia descrita em 4.2.3.1. Para o método ser considerado específico nenhum dos componentes presentes nas formulações e nos meios de liberação devem eluir no tempo de retenção do fármaco.

#### 4.2.5.2.3 Linearidade e limites de detecção e quantificação

A linearidade do método foi avaliada através da construção de três curvas de calibração em dias consecutivos para cada meio selecionado. Para o preparo das soluções padrão, 20,0 mg de ATRA foram exatamente pesados e transferidos para um balão volumétrico de 100,0 mL. O volume final foi completado com acetonitrila, levando à obtenção de uma solução de ATRA com concentração de 200 µg/mL (S1). A partir da solução S1, soluções de ATRA nas concentrações de 2,0 µg/mL (S2) e 20,0 µg/mL (S3) foram preparadas em balão volumétrico de 10,0 mL usando os meios de liberação como solvente em ambas. A partir das soluções S2 e S3, soluções padrão de ATRA nas concentrações de 0,05 a 20,0 µg/mL foram obtidas nos meios de liberação. Todas as amostras foram mantidas protegidas da luz até o momento da análise. As soluções foram analisadas por CLAE conforme condições cromatográficas descritas em 4.2.3.1. A partir dos dados obtidos, gráficos da área do pico do ATRA *versus* concentração foram construídos. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram obtidos pela análise da regressão linear, utilizando *Software Excel*®. Os valores de LD e LQ foram calculados conforme descrito em 4.2.3.2.3.

#### 4.2.5.3 *Avaliação da estabilidade do ATRA livre e nanoencapsulado nos meios de liberação*

Para a avaliação da estabilidade do ATRA livre e nanoencapsulado nos ensaios de liberação, 400 µL de cada formulação e de uma solução de ATRA a 1,0 mg/mL foram adicionados a 40 mL de cada meio de liberação. As misturas foram

submetidas à agitação magnética por 24 horas, a temperatura de 37°C e mantidas ao abrigo da luz. Alíquotas de 2,0 mL dos meios foram coletadas nos tempos 0, 0,5, 2, 4, 6, 8 e 24 horas. As amostras foram filtradas em membrana filtrante de PVDF 0,45 µm (Millipore, EUA), e analisadas por CLAE, conforme descrito em 4.2.3.1. A concentração de ATRA nos diferentes meios foi determinada com auxílio da equação da reta obtida a partir da curva de calibração do fármaco em cada um dos meios de liberação. Os resultados foram expressos em porcentagem de ATRA em relação à concentração inicial, pela média de três determinações. Os resultados obtidos foram comparados e analisados estatisticamente pela análise da variância (ANOVA) seguida pelo posthoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  para um nível de confiança de 95%.

#### *4.2.5.4 Avaliação do perfil de liberação do ATRA pelo método do saco de diálise*

Os estudos de liberação foram realizados pelo método do saco de diálise (KIM *et al.*, 2021). Para o experimento, uma alíquota de cada um dos nanocarreadores contendo ATRA ou uma solução alcoólica de ATRA a 0,9 mg/mL foi colocada dentro de um saco de diálise (MWCO 14.000, Sigma Aldrich, EUA). Os sacos de diálise foram fechados e colocados em béqueres contendo 300 mL de ácido clorídrico 0,1 N ou tampão fosfato pH 6,8, ambos contendo LSS 0,5% (m/V). Os meios de liberação foram mantidos a  $37 \pm 0,5$  °C sob agitação magnética a 500 rpm e ao abrigo da luz. Alíquotas foram então coletadas nos tempos 0,5, 1 e 2 horas do meio ácido e nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 h do tampão fosfato pH 6,8. Em cada tempo, o meio de liberação foi imediatamente repostado por meio fresco. As amostras retiradas foram filtradas em membranas de PVDF de 0,45 µm e analisadas por CLAE, sem diluição prévia. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de fármaco liberado em função do tempo.

#### *4.2.5.5 Avaliação da liberação do ATRA após incubação direta no meio de liberação*

A liberação do ATRA a partir dos nanocarreadores foi realizada pelo método de separação de amostra (*Sample and Separate* - SS)(KIM *et al.*, 2021). O ensaio foi realizado adicionando-se 500 µL de cada formulação e de uma solução de ATRA a

900 µg/mL, diretamente em 40 mL de meio tampão fosfato pH 6,8 contendo LSS 0,5% (m/V). As misturas foram submetidas à agitação magnética de 500 rpm por 06 horas, a temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C e ao abrigo da luz. Após esse período, 400 µL das dispersões foram retiradas e submetidas à centrifugação/ultrafiltração a 6200 rpm durante 20 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida, 200 µL do sobrenadante foi coletado e analisadas por CLAE sem diluição prévia, conforme descrito em 4.2.3.1. A concentração de ATRA foi determinada com auxílio da curva de calibração obtida em tampão fosfato pH 6,8 contendo LSS 0,5% (m/V). Os resultados foram expressos em porcentagem de ATRA, pela média de três determinações. Os resultados obtidos foram analisados e comparados estatisticamente pela análise da variância (ANOVA) de uma via seguida pelo posthoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  para um nível de confiança de 95%.

#### **4.2.6 Avaliação da atividade citotóxica do ATRA livre e nanoencapsulado, utilizando cultura de células de melanoma B16F10**

##### *4.2.6.1 Cultivo celular*

Os experimentos foram conduzidos em parceria com o Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Câncer (LabCancer – UFSC), que cedeu a linhagem celular de melanoma epitelial de camundongo B16F10 altamente metastática. As células de melanoma murino B16F10 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium - High Glucose*, Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de solução antibiótica:antimicótica (penicilina e estreptomicina) e tampão pH 7,4 a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

##### *4.2.6.2 Avaliação da citotoxicidade*

Para os estudos de citotoxicidade, as células B16F10 foram cultivadas em placas de 96 poços, contendo  $5 \times 10^3$  células por poço e mantidas em atmosfera úmida a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas de plaqueamento, uma solução de ATRA livre, a nanoemulsão e nanocápsulas poliméricas brancas e contendo ATRA foram

adicionadas às células nas concentrações de 50 µM, 25 µM, 10 µM, 1 µM e 0,1 µM, e as células foram incubadas a 37°C por 72 horas. Em seguida, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS e 100 µL de uma solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a 5 mg/mL, diluída em meio de cultivo completo foram adicionados em cada um dos poços. As células foram incubadas por 30 minutos em estufa a 37°C e, em seguida, a solução de MTT foi descartada e 100 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para solubilização dos cristais de formazan formados. A leitura foi realizada no equipamento Multileitora Infinite M200 TECAN (LAMEB/UFSC) nos comprimentos de onda 560 nm e 630 nm. O grupo controle foi incubado somente com meio de cultura. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os dados foram expressos como porcentagem da viabilidade celular em comparação com o grupo controle, calculada da seguinte forma:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{B * 100}{A}$$

Onde,

A = densidade óptica média do grupo de controle

B = densidade óptica média dos grupos tratados (em cada concentração).

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida de post-hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  para um nível de confiança de 95%.

#### *4.2.6.3 Avaliação da citotoxicidade dos nanocarreadores contendo ATRA na presença de cisplatina*

Células B16F10 foram cultivadas em placas de 96 poços, contendo  $5 \times 10^3$  células por poço. Após 24 horas de plaqueamento soluções de nanoemulsão e nanocápsulas poliméricas contendo ATRA foram adicionadas as células em concentrações de 0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM e 50 µM, acrescidas de uma solução de cisplatina a 10 µM e incubadas a 37°C por 72 horas. Após esse tempo, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT, conforme descrito em 4.2.6.2. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os resultados foram utilizados para calcular o índice de combinação (*Combination index* - CI) pelo método de efeito mediano, através do *software*

*CompuSyn* (ComboSyn, Inc.). De acordo com o método de Chou-Talalay, IC < 1 indica sinergismo, IC = 1 efeito aditivo e IC > 1 antagonismo (CHOU; TALALAY, 1984).

#### **4.2.7 Avaliação preliminar da eficácia terapêutica dos nanocarreadores contendo ATRA em modelo de melanoma murino**

##### *4.2.7.1 Animais experimentais*

Este projeto seguiu todas as premissas éticas no uso de animais de experimentação presentes nas normativas do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). Os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o protocolo CEUA nº 2372251018 (ANEXO A). Nestes ensaios foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas, com 18 a 25 g e idade entre 8 e 10 semanas, cedidos pelo Prof. Juliano Ferreira (Laboratório de Farmacologia Experimental - LABEX, UFSC) e os experimentos foram conduzidos em parceria com o Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Câncer (LabCancer – CCB -UFSC). Os animais foram mantidos em gaiolas ventiladas, em instalação mantida a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , com  $50 \pm 10\%$  de umidade relativa, e 12 horas de luz e escuridão durante o período experimental. Os animais receberam acesso a ração normal e água filtrada. Ao final dos experimentos os animais foram eutanasiados por sobredosagem anestésica com uma solução de cetamina:xilazina, (90:10 mg/kg). O ponto final humanitário utilizado para exclusão de animais antes do fim do experimento foi o volume tumoral exceder  $1000 \text{ mm}^3$ , dimensões que prejudicam a qualidade de vida do camundongo.

##### *4.2.7.2 Avaliação do crescimento do tumor em animais inoculados com células B16F10*

O efeito da administração oral do ATRA livre e nanoencapsulado sobre o crescimento do tumor foi avaliado segundo descrito por DORA *et al.* (2016). Células de melanoma murino B16F10 ( $5 \times 10^5$  células previamente ressuspensas em 0,1 mL de DMEM isento de soro) foram inoculados por via subcutânea no dorso de camundongos C57BL/6. Os animais foram divididos em 5 grupos contendo 6 animais

em cada. Sete dias após a inoculação de células B16F10, uma solução de ATRA em óleo de soja, a nanoemulsão e as nanocápsulas contendo ATRA foram administrados por via oral em doses de 10 mg/kg, uma vez ao dia, durante 14 dias. O controle negativo recebeu apenas óleo de soja por via oral. Os volumes de tumor foram medidos duas vezes por semana, ao longo dos 21 dias de experimento e estimados de acordo com a seguinte equação:

$$\text{volume do tumor (mm}^3\text{)} = \text{largura}^2 \times \text{comprimento} \times 0,52$$

O peso corporal dos animais foi verificado no início e no final do experimento. Vinte e dois dias após a inoculação, os camundongos foram sacrificados e os tumores excisados e pesados. Os resultados obtidos com os camundongos tratados com fármaco livre, com o veículo e com os nanocarreadores foram analisados e comparados estatisticamente pela análise da variância (ANOVA) de uma via seguida pelo posthoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  para um nível de confiança de 95%.

#### **4.2.8 Análise estatística**

Os resultados foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA), de uma ou duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey para comparação entre as médias. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  para um nível de confiança de 95%. As avaliações foram realizadas com o auxílio do *software GraphPad Prism* versão 8.0.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCARREADORES CONTENDO ATRA

#### 5.1.1 Determinação da solubilidade do ATRA em diferentes óleos

Para a encapsulação de fármacos lipofílicos, como o ATRA, em nanoemulsões e nanocápsulas, é essencial a escolha de uma fase oleosa que tenha alta capacidade de solubilização dele, possibilitando uma alta taxa de encapsulação. Os óleos vegetais têm várias vantagens no desenvolvimento desses sistemas. São constituídos por misturas de ésteres de glicerídeos de ácidos graxos insaturados, que podem ser de cadeia média (TCM), com 6 a 12 cadeias de carbono, ou de cadeia longa (TCL), mais de 12 cadeias. Óleos de diferentes fontes vegetais possuem diferentes proporções destes lipídios, resultando em perfis de solubilidade distintos para o fármaco a ser encapsulado. Além disso, proporcionam absorção mais eficiente do fármaco no TGI através do sistema linfático intestinal e são totalmente digeridos pelo organismo, portanto, não apresentam problemas quanto à segurança de utilização (POUTON; PORTER, 2008; RANI *et al.*, 2019). Assim, para a escolha da fase oleosa mais adequada para a preparação dos nanocarreadores, a solubilidade do ATRA foi avaliada em diferentes óleos. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Solubilidade do ATRA em diferentes óleos.

Óleos	Concentração de ATRA (mg/mL $\pm$ dp)
Rícino	5,44 $\pm$ 0,31
Triglicerídeos de cadeia média (TCM)	2,54 $\pm$ 0,07
Algodão	1,80 $\pm$ 0,10
Amêndoas	1,01 $\pm$ 0,02

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O óleo de rícino apresentou maior capacidade de solubilização do ATRA, em comparação com os outros óleos testados. O óleo de rícino é obtido pela extração das sementes da planta *Ricinus communis* (popularmente conhecida no Brasil como Mamona) da família *Eurphorbiaceae*. Este óleo é composto principalmente por ésteres do glicerol e ácido graxos, sendo que o ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-9-octadecenóico) é o ácido graxo majoritário (89%), seguido de menores quantidades de ácido linoléico (4,2%), oleico (3,0%), esteárico (1%), palmítico (1%), ácido dihidroxiestárico (0,7%), ácido linolênico (0,3%) e ácido eicosanóico (0,3%). Apresenta alta viscosidade, devido a interação de hidrogênio de seus grupos hidroxila, e baixa polaridade, por apresentar grande quantidade de ácidos graxos de cadeia longa (OGUNNIYI, 2006). Na área da saúde, o óleo de rícino é usado como veículo para administração de medicamentos, como excipiente, aditivo ou para formar emulsões estáveis em sistemas aquosos. Também é frequentemente usado como veículo para fármacos insolúveis em água, como os antitumorais, devido à alta capacidade de solubilização de compostos apolares (PATEL *et al.*, 2016). Diante dessas características, o óleo de rícino foi selecionado para compor a fase oleosa dos nanocarreadores no desenvolvimento das formulações.

### **5.1.2 Preparação e caracterização físico-química das nanoemulsões brancas e contendo ATRA**

As nanoemulsões foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea, que consiste na adição lenta e controlada de uma fase orgânica, composta pelo óleo, surfactante lipofílico e um solvente orgânico miscível em água, no interior de uma fase aquosa, composta por surfactante hidrofílico e água purificada. A alta afinidade dos surfactantes pelas fases, somada a agitação magnética, leva à turbulência interfacial no sistema e à formação espontânea de gotículas de óleo de tamanho nanométrico (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; MEHRNIA *et al.*, 2016). Com o intuito de obter nanoemulsões com características físico-químicas adequadas, várias formulações foram preparadas, variando-se a quantidade inicial de óleo de rícino, e o tipo e concentração do surfactante das fases orgânica e aquosa. A lecitina de soja (Lipoid S100<sup>®</sup>) foi utilizada como surfactante lipofílico e dois surfactantes hidrofílicos foram testados, o poloxamer 188 (Kolliphor<sup>®</sup> P 188) e polisorbato 80 (Tween<sup>®</sup> 80). O

poloxamer 188 é um surfactante não iônico apresentando uma estrutura de triblocos em que dois blocos hidrofílicos de óxido de etileno (EO) são intercalados por um bloco hidrofóbico de óxido de propileno (PO), sendo que a porção oxido de etileno representa 80% da sua massa molecular. Os poloxâmeros demonstram uma variedade de efeitos biológicos, como mucoadesividade e capacidade de aumentar a fluidez da bicamada lipídica nas membranas celulares (HONG *et al.*, 2018). O Tween<sup>®</sup> 80 (polissorbato 80, mono-oleato de sorbitano polietoxilado) é um surfactante não-iônico hidrofílico, amplamente utilizado como agente emulsificante para reduzir o tamanho das gotículas em emulsões lipídicas. Apresenta capacidade em inibir a glicoproteína-P (P-gP), e por isso tem sido utilizado para aumentar a permeabilidade de fármacos na membrana intestinal (PRABHAKAR *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos na caracterização físico-química das formulações estão apresentados na Tabela 8. O tamanho das partículas é um dos fatores mais importantes que influenciam as propriedades dos nanocarreadores, como estabilidade, liberação do fármaco e perfil farmacocinético e farmacodinâmico (MCCLEMENTS; MCCLEMENTS, 2016). Nas condições testadas, o tamanho médio das gotículas das nanoemulsões variou entre 244 e 362 nm e o índice de polidispersão variou entre 0,21 e 0,33, sendo que o principal fator que afetou estas características foi a quantidade de óleo na formulação. As nanoemulsões preparadas com 700 mg de óleo de rícino (ex., NEB<sub>F1</sub> a NEB<sub>F3</sub>) apresentaram tamanhos mais elevados, em comparação àquelas obtidas com 500 mg de óleo (ex., NEB<sub>F4</sub> a NEB<sub>F6</sub>). O tipo de tensoativo utilizado nas formulações também afetou o tamanho das gotículas. Quando comparado às formulações preparadas com poloxamer 188 (NEB<sub>F5</sub> e NEB<sub>F6</sub>), a utilização do Tween<sup>®</sup> 80 (NEB<sub>F19</sub> e NEB<sub>F20</sub>), percebe-se que este último conduziu à obtenção de nanoemulsões de menor tamanho. Por outro lado, o aumento da quantidade de lecitina nas formulações pareceu aumentar o tamanho das gotículas da nanoemulsão (ex. NEB<sub>F9</sub> *versus* NEB<sub>F10</sub> e NEB<sub>F11</sub> *versus* NEB<sub>F12</sub>).

Tabela 8 - Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanoemulsões brancas (n=3).

<b>Formulação</b>	<b>Diâmetro médio</b>	<b>Índice de polidispersão</b>	<b>Potencial zeta</b>	<b>pH</b>
<b>o</b>	<b>± dp</b>	<b>o ± dp</b>	<b>± dp</b>	<b>± dp</b>
NEB <sub>F1</sub>	336,8 ± 37,4	0,32 ± 0,02	-30,3 ± 0,7	6,67 ± 0,04
NEB <sub>F2</sub>	317,3 ± 12,6	0,27 ± 0,02	-33,9 ± 1,6	6,51 ± 0,02
NEB <sub>F3</sub>	306,2 ± 11,6	0,26 ± 0,02	-31,6 ± 0,6	6,63 ± 0,02
NEB <sub>F4</sub>	258,7 ± 5,4	0,21 ± 0,01	-35,9 ± 1,6	5,90 ± 0,06
NEB <sub>F5</sub>	277,9 ± 2,2	0,26 ± 0,02	-31,9 ± 1,5	5,62 ± 0,01
NEB <sub>F6</sub>	279,2 ± 6,0	0,25 ± 0,01	-29,8 ± 0,9	5,78 ± 0,03
NEB <sub>F7</sub>	265,2 ± 5,2	0,24 ± 0,02	-32,4 ± 1,0	6,36 ± 0,07
NEB <sub>F8</sub>	271,3 ± 8,5	0,25 ± 0,01	-26,8 ± 1,1	6,32 ± 0,08
NEB <sub>F9</sub>	289,4 ± 17,7	0,25 ± 0,03	-32,8 ± 0,2	6,88 ± 0,04
NEB <sub>F10</sub>	345,4 ± 7,3	0,25 ± 0,02	-33,8 ± 1,4	6,71 ± 0,05
NEB <sub>F11</sub>	292,7 ± 1,8	0,28 ± 0,02	-30,8 ± 1,0	6,20 ± 0,14
NEB <sub>F12</sub>	335,5 ± 1,6	0,32 ± 0,02	-30,1 ± 2,0	5,83 ± 0,10
NEB <sub>F13</sub>	284,5 ± 3,9	0,27 ± 0,01	-32,3 ± 0,7	5,75 ± 0,08
NEB <sub>F14</sub>	276,7 ± 9,6	0,22 ± 0,01	-31,2 ± 1,7	5,62 ± 0,05
NEB <sub>F15</sub>	293,5 ± 1,7	0,28 ± 0,01	-39,4 ± 1,2	7,01 ± 0,06
NEB <sub>F16</sub>	295,2 ± 7,0	0,24 ± 0,02	-31,6 ± 1,2	7,00 ± 0,01
NEB <sub>F17</sub>	362,6 ± 6,9	0,33 ± 0,01	-32,8 ± 0,6	6,68 ± 0,10
NEB <sub>F18</sub>	296,2 ± 4,9	0,29 ± 0,01	-32,5 ± 0,6	6,55 ± 0,02
NEB <sub>F19</sub>	257,1 ± 10,7	0,22 ± 0,01	-23,9 ± 8,5	4,94 ± 0,09
NEB <sub>F20</sub>	244,8 ± 8,6	0,22 ± 0,02	-28,5 ± 4,5	4,65 ± 0,04

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O potencial zeta é um fator importante utilizado para avaliar a estabilidade dos nanocarreadores. Geralmente, as partículas são estáveis quando o valor em módulo do potencial zeta está em torno a 30 mV. Em formulações com surfactante não iônico, que não apresentam grupos com carga, como os iônicos, a estabilização pode ocorrer por polarização molecular e adsorção de moléculas de água a sua superfície. Assim, sobre a interface partícula/água forma-se uma camada elétrica semelhante à iônica, estabilizada estericamente (LASON; SIKORA; OGONOWSKI, 2013).

As nanoemulsões apresentaram carga superficial negativa, independente do surfactante hidrofílico usado. Esta característica tem sido associada à presença de lecitina nas formulações. Lecitinas são constituídas por misturas de fosfolipídeos, contendo principalmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, que não apresentam carga em pH fisiológico. Entretanto, lipídeos com grupamentos polares carregados

negativamente também estão presentes, como fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e ácido fosfatídico. Embora representem cerca de 1-2% dos fosfolipídeos das lecitinas, podem conferir carga negativa na interface óleo/água, estabilizando as formulações (BRUXEL *et al.*, 2012). Adicionalmente, observa-se que as formulações preparadas com poloxamer 188 apresentaram valores de potencial zeta mais elevados, em comparação com as formulações em que se utilizou Tween<sup>®</sup> 80. Teoricamente, esse parâmetro demonstraria maior estabilidade das formulações, mas o verificado na prática foi a instabilidade e separação de fases em grande parte das formulações contendo poloxamer 188. Diante dos resultados obtidos nessa fase do desenvolvimento, as formulações NEB<sub>F4</sub>, NEB<sub>F19</sub> e NEB<sub>F20</sub> foram escolhidas para dar continuidade aos estudos.

A partir das formulações selecionadas foram desenvolvidas nanoemulsões com a incorporação de ATRA. Para esse processo, quantidades estabelecidas do fármaco, previamente solubilizado em etanol, foram adicionadas à fase orgânica da formulação e as nanoemulsões foram preparadas usando os mesmos procedimentos descritos em 4.2.1.2.1 Os valores diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanoemulsões encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanoemulsões contendo ATRA (n=3).

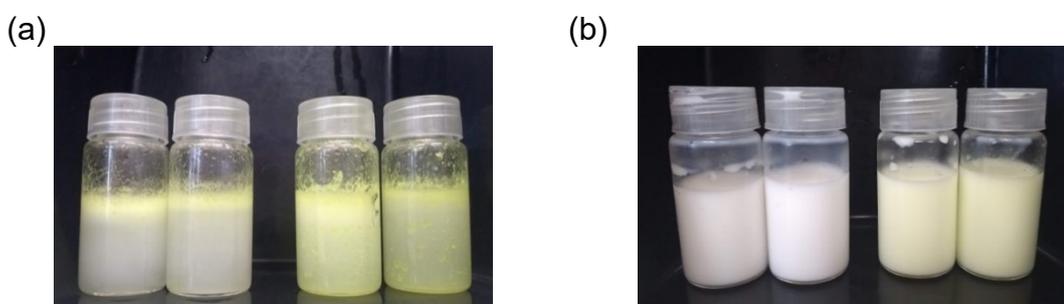
<b>Formulação</b>	<b>Diâmetro médio ± dp</b>	<b>Índice de polidispersão ± dp</b>	<b>Potencial zeta ± dp</b>	<b>pH ± dp</b>
NEA <sub>P1</sub>	257,5 ± 1,8	0,21 ± 0,01	-33,8 ± 1,7	6,28 ± 0,08
NEA <sub>P2</sub>	264,8 ± 15,1	0,21 ± 0,02	-31,8 ± 1,6	6,02 ± 0,02
NEA <sub>T1</sub>	242,3 ± 2,1	0,24 ± 0,01	-23,6 ± 3,3	3,54 ± 0,02
NEA <sub>T2</sub>	226,2 ± 10,5	0,20 ± 0,03	-21,9 ± 1,1	3,52 ± 0,02

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O tamanho das gotículas das nanoemulsões contendo ATRA variou entre 226 e 264 nm, e o índice de polidispersão entre 0,20 e 0,24. Uma pequena redução no tamanho da gota pode ser observada após a adição do ATRA, principalmente para as formulações preparadas com Tween<sup>®</sup> 80 (NEB<sub>19</sub> *versus* NEA<sub>T1</sub> e NEB<sub>20</sub> *versus* NEA<sub>T2</sub>) sugerindo que a adição do fármaco pode interferir na formação da gota, estabilizando-

a. Os valores de potencial zeta das nanoemulsões contendo ATRA mantiveram-se negativos, com pouca variação em relação às formulações de nanoemulsões brancas. Após algumas semanas as formulações NEA<sub>P1</sub> e NEA<sub>P2</sub> apresentaram-se instáveis, ocorrendo separação de fases, como mostrado na Figura 12. Assim, a formulação NEA<sub>T2</sub> foi escolhida para dar continuidade ao trabalho, pois apresentou melhores características de tamanho, IPD e potencial zeta. Sua composição foi utilizada como base para o desenvolvimento das nanocápsulas poliméricas.

Figura 12 - Aspecto macroscópico dos nanocarreadores. (a) Formulações NEA<sub>P1</sub> e NEA<sub>P2</sub>. (b) Formulações NEB e NEA<sub>T2</sub>.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

### 5.1.3 Preparação e caracterização físico-química das nanocápsulas brancas e contendo ATRA

As nanocápsulas poliméricas foram preparadas utilizando a técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado, descrita por Fessi *et al.* (1989). Esta técnica ocorre sob os mesmos princípios termodinâmicos da emulsificação espontânea, diferindo apenas pela formação de uma parede polimérica na interface entre as duas fases. Nesta técnica, uma fase orgânica constituída de um solvente orgânico miscível na água contendo o óleo, o surfactante hidrofóbico e o polímero, é adicionada à uma fase aquosa contendo um surfactante hidrofílico. A rápida difusão do solvente orgânico na água gera uma turbulência interfacial levando à formação de nanogotas. Com a alteração da polaridade do meio, o polímero precipita na interface entre o óleo e a água, gerando suspensões coloidais de nanocápsulas. As características das nanocápsulas, neste caso, também são afetadas pelo tipo e concentração do polímero empregado (DENG *et al.*, 2020; MAYER, 2005).

Neste trabalho, com o objetivo de proteger o ATRA de sua potencial degradação no ambiente ácido do estomago e permitir a sua liberação em pH onde ele apresenta maior solubilidade, as nanocápsulas poliméricas foram preparadas utilizando-se dois polímeros com propriedades gastrorresistentes, o Eudragit® S100 e o acetato ftalato de celulose (CAP). O Eudragit® S100 (EUD) é um copolímero do ácido metacrílico e metacrilato de metila, cuja proporção de grupamentos carboxílicos livres e de ésteres é de cerca de 1:2 e sua dissolução ocorre em pH > 7,0. O acetato ftalato de celulose (CAP), por sua vez, é um derivado de celulose em que metade dos grupamentos hidroxilas encontram-se esterificados com grupamentos acetila e cerca de um quarto com ácido ftálico, apresentando solubilidade aquosa em pH próximo a 6,0. Ambos são amplamente utilizados como material de revestimento de formas farmacêuticas sólidas entéricas, empregadas para proteger o fármaco frente à degradação em pH ácido ou melhorar a absorção daqueles que são melhores absorvidos no intestino (CHEN *et al.*, 2017; VIDAL-ROMERO *et al.*, 2019).

Os valores de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanocápsulas brancas e contendo ATRA testadas neste trabalho encontram-se na Tabela 10. Considerando que o ATRA apresenta pka de 4,75, o pH das formulações foi ajustado a 3,5. Neste pH, uma maior parte do ATRA encontra-se na forma não ionizada, menos solúvel em água e com maior afinidade pelo núcleo oleoso das partículas. Ademais, este pH garante a manutenção da estrutura da cápsula, evitando dissolução da parede polimérica. Suspensões de nanocápsulas monodispersas com tamanho médio variando entre 229 e 256 nm foram obtidas, independente do polímero empregado. Pode-se notar um leve aumento de tamanho em relação a nanoemulsão correspondente (NEA<sub>T2</sub>), que pode ser justificada pela presença da parede polimérica nas nanocápsulas. Os valores de potencial zeta em módulo também aumentaram, quando comparado às nanoemulsões, estando estes relacionados à presença de grupamentos carboxílicos livres em ambos polímeros empregados, que estão localizados na interface, em contato com meio aquoso (BARBOSA *et al.*, 2019). As nanocápsulas contendo ATRA apresentaram características semelhantes as nanocápsulas brancas, sem variações significativas de tamanho, IPD e potencial zeta.

Tabela 10 - Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanocápsulas brancas e contendo ATRA (n=3).

<b>Formulação</b>	<b>Diâmetro médio <math>\pm</math> dp</b>	<b>Índice de polidispersão <math>\pm</math> dp</b>	<b>Potencial zeta <math>\pm</math> dp</b>	<b>pH <math>\pm</math> dp</b>
NCB <sub>EUD</sub>	232,7 $\pm$ 5,2	0,22 $\pm$ 0,01	-25,9 $\pm$ 0,9	3,89 $\pm$ 0,10
NCB <sub>CAP</sub>	252,6 $\pm$ 4,5	0,25 $\pm$ 0,02	-37,8 $\pm$ 2,2	4,06 $\pm$ 0,03
NCA <sub>EUD</sub>	256,8 $\pm$ 8,1	0,22 $\pm$ 0,01	-29,5 $\pm$ 2,9	3,50 $\pm$ 0,04
NCA <sub>CAP</sub>	229,3 $\pm$ 9,3	0,22 $\pm$ 0,02	-37,8 $\pm$ 0,7	3,55 $\pm$ 0,02

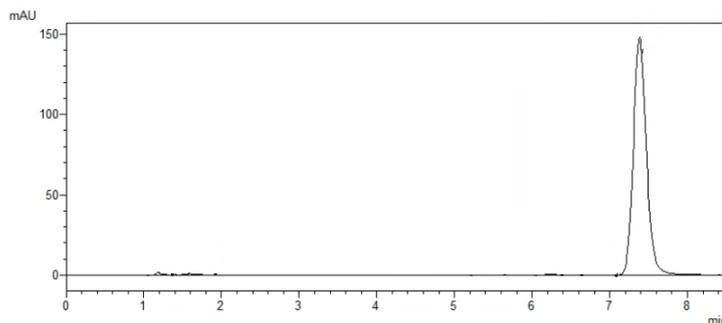
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 5.1.4 Determinação do teor de ATRA nos nanocarreadores por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

##### 5.1.4.1 Desenvolvimento e validação do método analítico de CLAE

A metodologia analítica de CLAE foi desenvolvida e validada para determinação do ATRA nas formulações, utilizando-se como base as condições cromatográficas previamente descritas por SUBONGKOT; NGAWHIRUNPAT (2017), com modificações. A análise cromatográfica foi realizada em modo de fase reversa e sistema de eluição isocrático. O melhor perfil cromatográfico foi obtido com a utilização de fase móvel constituída por 80% de acetonitrila e 20% de água, acrescida de ácido acético, com pH ajustado para 2,5. O pH ácido da fase móvel é fundamental para deslocar o equilíbrio químico do ATRA para sua forma protonada, não ionizada, o que gera o pico cromatográfico com parâmetros adequados para a quantificação, como maior resolução do pico cromatográfico e menor efeito de cauda, além de evitar a isomerização do ATRA em ácido cis-retinóico (ESPINOSA; BOSCH; ROSÉS, 2000). O cromatograma obtido após análise de uma solução padrão do ATRA encontra-se representado na Figura 13. Nas condições cromatográficas utilizadas, o ATRA apresentou um tempo de retenção em aproximadamente 7,5 minutos e o tempo de análise foi estabelecido em 8,5 minutos.

Figura 13 – Cromatograma obtido após análise de uma solução padrão de ATRA por CLAE com detecção em 353 nm.

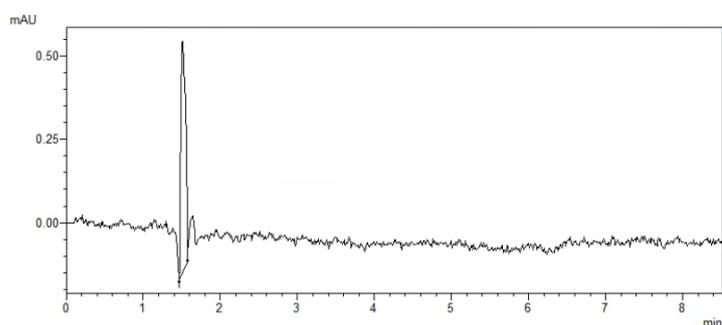


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 5.1.4.1.1 Especificidade

A especificidade é a capacidade do método analítico em identificar e quantificar exatamente o analito de interesse na presença de outros componentes da amostra, como impurezas e produtos de degradação (SHABIR, 2003). A verificação da especificidade do método foi avaliada após injeção de soluções diluídas a partir das nanoemulsões e nanocápsulas brancas no cromatógrafo, sob as mesmas condições de análise. Os cromatogramas evidenciaram a ausência de interferentes no mesmo tempo de retenção do ATRA, confirmando a especificidade do método de CLAE (Figura 14).

Figura 14 – Cromatograma obtido após análise de uma dispersão de nanocápsulas poliméricas brancas (NCB<sub>CAP</sub>) por CLAE com detecção de 353 nm.

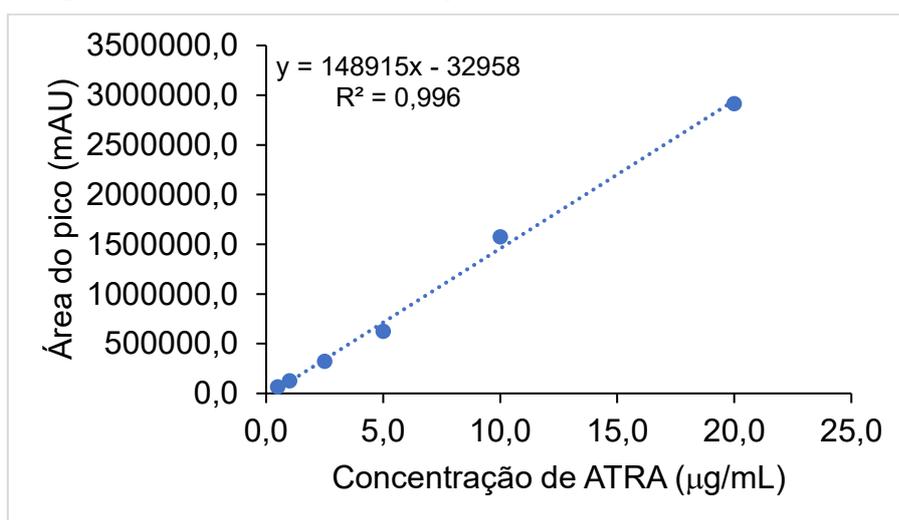


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 5.1.4.1.2 Linearidade

A linearidade do método demonstra sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em toda a faixa de trabalho estabelecida. O método desenvolvido para a determinação de ATRA livre e nanoencapsulado mostrou ser linear na faixa de concentração entre 0,5 e 20,0  $\mu\text{g/mL}$ , com equação de reta correspondendo a  $y = 148915x - 32958$ , onde  $x$  representa a concentração de ATRA em  $\mu\text{g/mL}$  e  $y$  a área absoluta do pico. O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) calculado foi igual a 0,996, estando de acordo com o preconizado pela RDC 166 (Figura 15) (BRASIL, 2017)

Figura 15 – Curva de calibração de ATRA obtido por CLAE.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 5.1.4.1.3 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada na amostra com o grau especificado de exatidão e precisão (BRASIL, 2017; INDRAYANTO, 2018). Os valores de LD e LQ foram determinados a partir da triplicata das curvas de calibração, e corresponderam a 0,09  $\mu\text{g/mL}$  e 0,27  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

#### 5.1.4.1.4 Precisão

A precisão do método analítico é a medida de quão próximos são os resultados obtidos para um número de medições nas mesmas condições analíticas. Por definição, a precisão contém três componentes: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Neste trabalho foram avaliadas a repetibilidade, que expressa a precisão obtida com o mesmo procedimento em amostras idênticas sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e equipamentos em um curto espaço de tempo, e a precisão intermediária, obtida com o mesmo procedimento em amostras idênticas, no mesmo laboratório, mas em dias diferentes (BRASIL, 2017; RENGER; VÉGH; FERENCZI-FODOR, 2011).

A precisão do método foi avaliada após análise por CLAE de uma solução obtida após a completa dissolução da formulação NCA<sub>CAP</sub>. A repetibilidade foi avaliada pela análise de seis amostras idênticas, obtidas após dissolução de nanocápsulas NCA<sub>CAP</sub> em acetonitrila, preparadas individualmente. A precisão intermediária foi avaliada por meio da análise das seis amostras em três dias consecutivos. Os resultados experimentais obtidos através da avaliação da repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia) do método de CLAE estão compilados na Tabela 11. Os valores de desvio padrão relativo (DPR, %) para todas as análises encontraram-se abaixo de 5%, demonstrando uma variabilidade aceitável entre as amostras para ambos os ensaios.

Tabela 11 - Resultados experimentais obtidos para a avaliação da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia) do método de CLAE.

	Repetibilidade			Precisão intermediária
	1° dia	2° dia	3° dia	
ATRA (µg/mL) ± dp	11,51 ± 0,52	11,58 ± 0,46	11,67 ± 0,42	11,58 ± 0,48
DPR (%)	4,52	3,95	3,56	4,14

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 5.1.4.1.5 Exatidão

A exatidão representa o grau de proximidade entre os resultados individuais obtidos nas amostras utilizando-se o método analítico desenvolvido e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão pode ser determinada de quatro formas distintas: (i) através da análise de uma amostra de concentração conhecida (substância de referência) e comparando-se o valor obtidos experimentalmente com o valor real; (ii) pela comparação dos resultados obtidos através do método desenvolvido com um outro método alternativo, já validado; (iii) pela adição do analito em uma matriz branca (sem o analito), em três níveis de concentração, ou (iv) pela adição de padrão em amostras contendo o analito de interesse, em uma concentração conhecida (RENGER; VÉGH; FERENCZI-FODOR, 2011).

A exatidão foi determinada pelo ensaio de recuperação com a adição de solução padrão de ATRA, em diferentes concentrações, sobre uma amostra de suspensão de nanocápsulas brancas (NCB<sub>CAP</sub>). Os resultados obtidos na avaliação da exatidão do método estão apresentados na Tabela 12. Os valores de recuperação encontram-se entre 96,25% e 108,86%, com DPR inferiores a 5%. Assim, o método de CLAE desenvolvido foi considerado exato, uma vez que está estabelecido pela RDC 166 /2017 que os critérios de aceitação estão baseados no objetivo do método, variabilidade intrínseca e concentração do analito na amostra (BRASIL, 2017).

Tabela 12 - Resultados experimentais obtidos na avaliação da exatidão do método de CLAE para a determinação de ATRA nos nanocarreadores.

<b>Concentração teórica (µg/mL)</b>	<b>Concentração experimental (µg/mL) (± dp)</b>	<b>Porcentagem de recuperação (%)</b>	<b>DPR (%)</b>
1,0	1,09 ± 0,02	108,86	1,71
10,0	9,52 ± 0,08	96,25	0,83
20,0	19,55 ± 0,32	97,74	1,63

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 5.1.4.1.6 Robustez

A robustez do método analítico é definida como a medida de sua capacidade de permanecer inalterado diante de pequenas variações, mas deliberadas, nos parâmetros do método. A robustez fornece um indicativo da confiabilidade do método durante o uso rotineiro. Alguns fatores críticos que podem ser selecionados para sua avaliação são: variações no pH, composição e fluxo da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura de análise, entre outros (BRASIL, 2017; INDRAYANTO, 2018).

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos na avaliação da robustez do método, após análise de uma solução obtida após dissolução completa da formulação NCA<sub>CAP</sub> sob condições normais e após pequenas variações nos parâmetros de fluxo, composição de fase móvel e comprimento de onda de detecção. Os teores de ATRA apresentaram valores entre 10,52 µg/mL e 12,75 µg/mL. Os tempos de retenção variaram em cerca de 1 minuto. Pode-se observar que a maior influência sobre o teor de fármaco ocorreu ao variar-se o fluxo de fase móvel em ± 0,1 mL/min, o que pode estar relacionado a modificação do tempo de interação entre o ATRA e a coluna. Assim, o método foi considerado robusto para os parâmetros de composição da fase móvel e comprimento de onda de detecção (DPR% < 5%). O parâmetro fluxo pode ser considerado crítico para as análises e deve ser controlado para evitar variações nos resultados relativos à concentração de ATRA nas formulações.

Tabela 13 - Parâmetros cromatográficos avaliados na robustez do método desenvolvido por CLAE para quantificação de ATRA em nanocarreadores

<b>Parâmetros</b>	<b>Variação</b>	<b>Concentração de ATRA (µg/mL)</b>	<b>Média ± dp (DPR, %)*</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
Fluxo (mL/min)	1,0	11,53	11,60 ± 1,12 (9,67%)	7,44
	0,9	12,75		8,27
	1,1	10,52		6,74
Composição de fase móvel (ACN:H <sub>2</sub> O)	80:20	11,53	11,55 ± 0,02 (0,17%)	7,44
	81:19	11,54		7,36
	79:21	11,57		7,45
Comprimento de onda (nm)	353	11,53	11,53 ± 0,03 (0,26%)	7,44
	352	11,50		7,44
	354	11,56		7,44

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 5.1.4.2 Determinação do teor e eficiência de encapsulação do ATRA em nanocarreadores

Os nanocarreadores lipídicos são formulações ideais para a encapsulação de fármacos lipofílicos, pois a baixa solubilidade aquosa desses compostos resulta em elevada incorporação aos componentes oleosos da formulação, resultando em sistemas altamente solubilizados no lúmen do TGI, melhorando a absorção e a biodisponibilidade oral do fármaco (VITHANI *et al.*, 2019).

Vários fatores podem influenciar a eficiência de encapsulação de fármacos em nanocarreadores. Os mais relevantes são a concentração e o peso molecular dos compostos, método de preparação, solubilidade do fármaco, polímeros e surfactantes e velocidade de agitação. Por isso a avaliação do teor de fármaco encapsulado e a eficiência de encapsulação devem ser realizadas durante todo o processo de desenvolvimento da formulação, a fim de se atingir as melhores características físico-químicas e os benefícios terapêuticos desejados (BALE *et al.*, 2016).

A determinação do teor, recuperação e eficiência de encapsulação do ATRA nas nanoemulsões e nanocápsulas foi realizada por CLAE, de acordo com o método descrito em 4.2.3.1., e encontram-se na Tabela 14. Em todos os nanocarreadores observa-se alto teor e valores de recuperação acima de 80%, o que reafirma a alta solubilização do ATRA em óleo de rícino. Os valores de eficiência de encapsulação foram superiores a 99%, indicando que quase a totalidade do ATRA encontra-se associado às partículas, podendo estar localizado em núcleo oleoso e/ou adsorvido à sua superfície. Os resultados de eficiência de encapsulação (EE) foram similares aos descritos na literatura para diferentes tipos de nanocarreadores (NARVEKAR *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016).

Tabela 14 - Valores de teor, recuperação e eficiência de encapsulação de ATRA nos nanocarreadores (n=3).

Formulação	Teor ( $\mu\text{g/mL}$ ) (média $\pm$ dp)	Recuperação (%) ( $\pm$ dp)	Eficiência de encapsulação (%)
NEA <sub>T1</sub>	801,9 $\pm$ 95,2	80,19 $\pm$ 0,10	>99
NEA <sub>T2</sub>	894,4 $\pm$ 35,2	89,44 $\pm$ 0,04	>99
NCA <sub>EUD</sub>	909,5 $\pm$ 49,1	90,95 $\pm$ 0,05	>99
NCA <sub>CAP</sub>	912,2 $\pm$ 13,4	91,22 $\pm$ 0,01	>99

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

### 5.1.5 Estudos de estabilidade dos nanocarreadores contendo ATRA

Na atualidade, a nanotecnologia tem sido considerada uma ferramenta poderosa na obtenção de medicamentos inovadores que apresentam propriedades inerentes a sua composição e suas características físico-químicas, que determinam o seu desempenho *in vivo*. Assim, dentre os principais objetivos do desenvolvimento de nanocarreadores estão o estabelecimento de propriedades físico-químicas, carga e velocidade de liberação do fármaco ótimas, de modo que a formulação atenda aos requisitos necessários para uma dada aplicação (MUSUMECI; PIGNATELLO, 2018; VEGA-VÁSQUEZ; MOSIER; IRUDAYARAJ, 2020). Ainda que os nanocarreadores possam ser obtidos a partir de uma grande variedade de materiais (ex., polímeros, lipídios, surfactantes, compostos metálicos e inorgânicos), o termo estabilidade coloidal é usado para descrever a manutenção da nanoestrutura frente à agregação/coagulação, que está diretamente relacionada à sua composição, tamanho, forma, cristalinidade e propriedades de superfície (PHAN; RAES, 2019). Tais características não devem ser afetadas durante o armazenamento e, portanto, estudos de estabilidade durante o desenvolvimento do produto são imprescindíveis para garantir a sua eficácia e segurança de utilização.

A estabilidade das dispersões coloidais depende em grande medida das propriedades da fase dispersa, e é definida pela manutenção das partículas em suspensão, que por sua vez depende das forças de interação entre as partículas. O principal modelo que tem sido usado para descrever a estabilidade dos coloides é a teoria do DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek), que recebeu este nome em homenagem aos cientistas que contribuíram para o seu desenvolvimento. De acordo com esta teoria, a estabilidade dos coloides é definida pela soma das forças de

atração de van der Waals e forças de repulsão eletrostáticas, devido à sobreposição das duplas camadas elétricas de partículas coloidais. A soma destas duas contribuições de energia potencial de interação resulta em uma energia potencial de interação total. Como resultado do balanço entre forças atrativas e repulsivas, a agregação ou estabilização da dispersão pode ocorrer (MIYAZAWA *et al.*, 2021; PLAZA-OLIVER; SANTANDER-ORTEGA; LOZANO, 2021).

Os nanocarreadores lipídicos como as nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, uma vez que a energia livre requerida para separação das fases é menor que a requerida para emulsificação. Nanoemulsões estão sujeitas à desestabilização durante armazenamento devido a vários mecanismos, como a separação gravitacional (cremagem ou sedimentação), floculação, coalescência e amadurecimento de Ostwald. Entretanto, o reduzido tamanho das gotas das nanoemulsões e o movimento browniano podem ser suficientes para contornar a ação da gravidade sobre as gotículas, impedindo a ocorrência de mecanismos gravitacionais de separação de fases (TADROS *et al.*, 2004). A floculação ocorre quando as gotas de óleo colidem, mas permanecem como gotas independentes. O amadurecimento de Ostwald é a forma mais comum de instabilidade nas nanoemulsões e é resultante da diferença de solubilidade de gotículas de diferentes tamanhos na dispersão coloidal. Neste caso, as gotículas menores mais solúveis na fase externa tendem a um estado de equilíbrio, pela difusão de suas moléculas solubilizadas na direção das gotículas de maior diâmetro. Como consequência, ocorre o aumento do tamanho das gotículas. Tais mecanismos de instabilidade podem levar à separação completa das fases. Na coalescência, a barreira interfacial proporcionada pela presença dos surfactantes é rompida, fazendo com que as gotículas da emulsão se unam, gerando gotas de óleo cada vez maiores até a completa separação (VEGA-VÁSQUEZ; MOSIER; IRUDAYARAJ, 2020).

As nanocápsulas poliméricas diferem das nanoemulsões pela presença de uma parede polimérica na interface óleo-água. No entanto, uma vez que são constituídas de partículas de tamanho nanométrico, a relação entre superfície e volume e a energia potencial de superfície é alta. Assim, do mesmo modo que as nanoemulsões, as suspensões de nanocápsulas são sistemas termodinamicamente instáveis e a instabilidade física pode resultar em agregação ou fusão das partículas, levando à

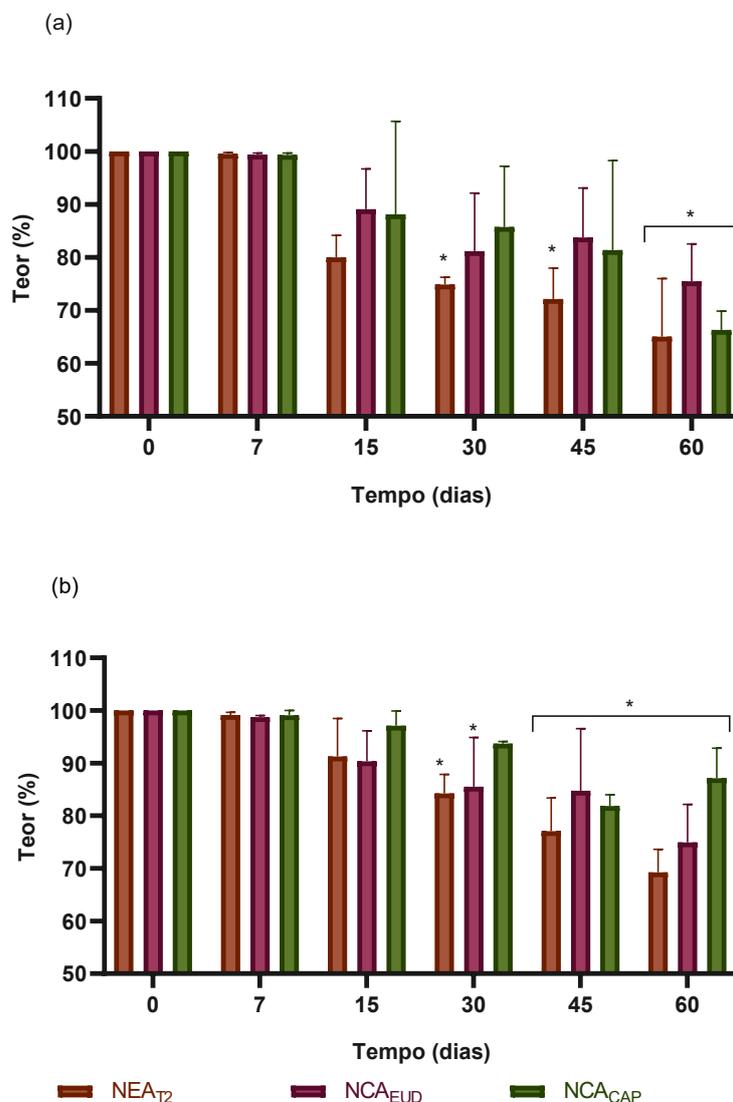
perda da sua integridade e à potencial perda do fármaco encapsulado (DEGOBERT; AYDIN, 2021).

Considerando os aspectos mencionados acima, no presente trabalho as formulações de nanoemulsões e nanocápsulas contendo ATRA foram avaliadas em estudos de estabilidade a curto prazo e em estudos de estabilidade acelerada. Os resultados serão apresentados a seguir.

#### *5.1.5.1 Estudo de estabilidade de curto prazo*

Para avaliar a estabilidade de curto prazo, as formulações de nanocarreadores contendo ATRA foram armazenadas por 60 dias nas temperaturas ambiente ( $25 \pm 2$  °C) e sob refrigeração ( $5 \pm 2$  °C), e protegidas da luz. As formulações foram avaliadas quanto ao teor de ATRA, tamanho e índice de polidispersão, e potencial zeta. Conforme a Figura 16, a redução do teor de ATRA nas formulações foi observada a partir do 15º dia de armazenamento a temperatura ambiente e a partir do 30º dia de armazenamento na geladeira. No entanto, a significância estatística na redução do teor de fármaco foi verificada a partir do 30º dia de armazenamento das nanoemulsões NEA<sub>T2</sub>, tanto a temperatura ambiente quanto sob refrigeração, com perda de cerca de 30% de fármaco em 60 dias. As nanocápsulas NCA<sub>EUD</sub> também apresentaram redução significativa do teor de ATRA a partir do 30º dia sob refrigeração, mas manteve seu conteúdo sem redução significativa até o 45º dia a temperatura ambiente, com perda de cerca de 25% do ATRA em 60 dias. Já as nanocápsulas NCA<sub>CAP</sub> apresentaram redução significativa do conteúdo de ATRA no 60º dia em armazenamento a temperatura ambiente e no 45º dia sob refrigeração. A redução foi de 15% de fármaco sob refrigeração e 35% de fármaco em temperatura ambiente.

Figura 16 - Teor de ATRA (%) após armazenamento das formulações durante 60 dias em (a) temperatura ambiente (b) sob refrigeração. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). \*representa significância estatística quando comparado ao tempo 0 (zero)( $p < 0,05$ ).



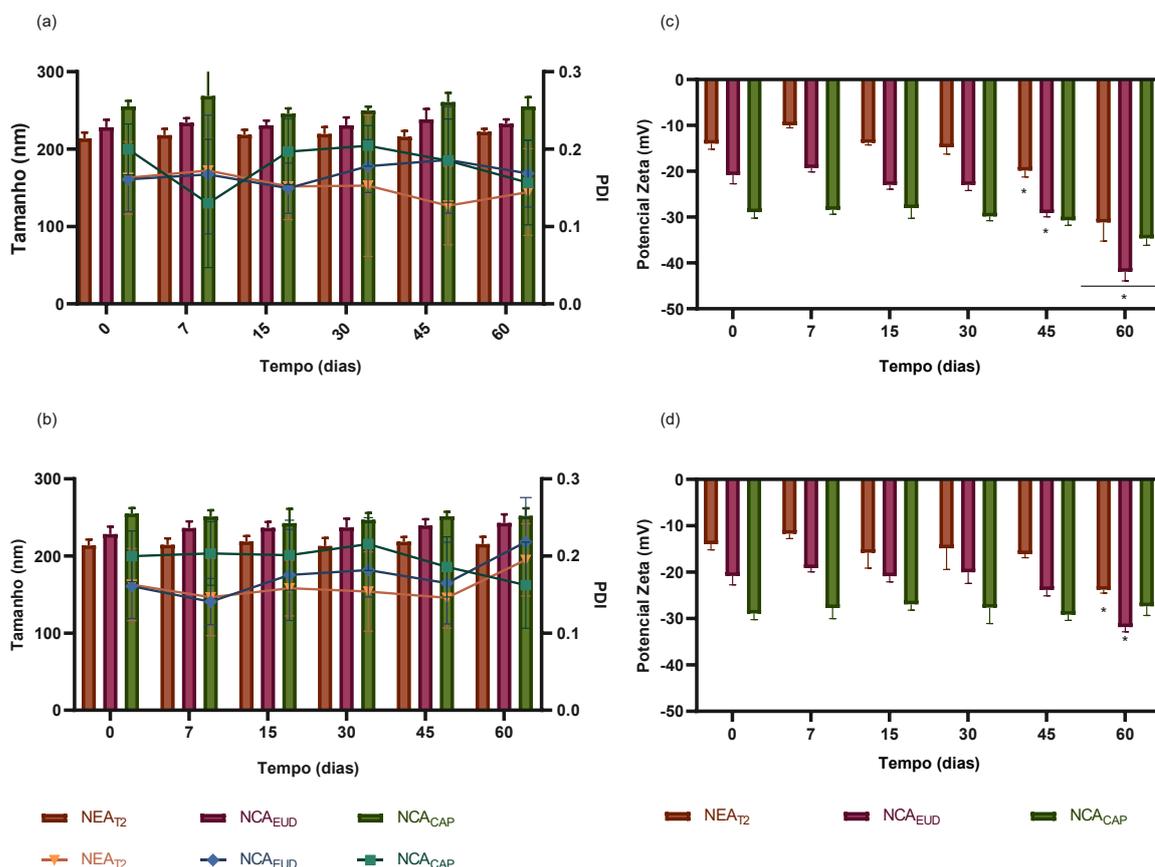
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

As características de tamanho, PDI e potencial zeta dos nanocarreadores lipídicos também foram monitorados durante 60 dias após armazenamento nas mesmas condições e os resultados são apresentados na Figura 17. A análise estatística indicou a inexistência de significância estatística entre os valores de tamanho e índice de polidispersão das formulações após armazenamento. Por outro lado, o potencial zeta dos nanocarreadores aumentou significativamente após 45 dias de armazenamento ( $p < 0,05$ ). O potencial zeta reflete o potencial de superfície das

partículas, que é afetado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Em módulo, um valor de potencial zeta elevado é importante para uma boa estabilidade coloidal, uma vez que forças repulsivas entre partículas carregadas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

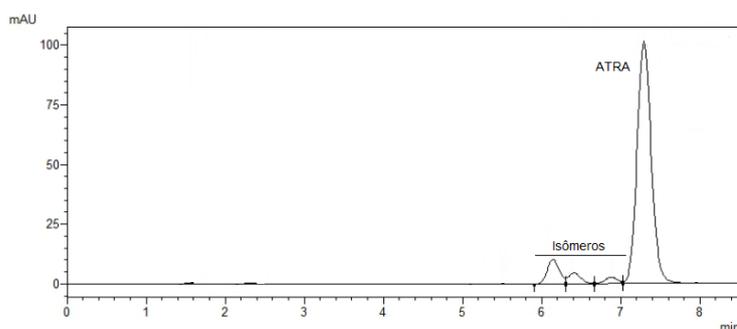
Os valores elevados de potencial zeta verificados após armazenamento podem explicar a manutenção do tamanho das partículas na faixa nanométrica, assim como a estreita faixa de distribuição granulométrica ao longo do tempo, expressa pelo índice de polidispersão ( $PDI < 0,2$ ). Por outro lado, a alteração do potencial zeta parece estar relacionada com a redução do teor de ATRA nas formulações durante o armazenamento, que provavelmente alterou o balanço de cargas na interface das partículas. Após 30 dias de armazenamento observou-se a formação de um precipitado amarelo no fundo dos recipientes em todas as formulações, armazenadas tanto em temperatura ambiente quanto em geladeira, sugestivo de ser o ATRA e seus isômeros. Isso reflete a instabilidade desse fármaco em meio aquoso, mesmo armazenada sob abrigo da luz. Estudos mostraram que a degradação do ATRA em soluções aquosas foi cerca de 5 a 30% após 30 minutos a 37 °C. Além disso, ATRA degradou rapidamente em vários produtos de isomerização após apenas 1 hora de exposição à luz em frascos transparentes e após 6 horas em frascos de âmbar (CZUBA *et al.*, 2020). A obtenção de produtos de degradação do ATRA pôde ser verificada através dos cromatogramas obtidos por CLAE para todas as formulações submetidas à avaliação da estabilidade, onde picos de menor área são observados em tempos de retenção mais baixos que o obtido para o fármaco Figura 18.

Figura 17 - Tamanho (barras) e PDI (linhas) das formulações armazenada em (a) temperatura ambiente e (b) sob refrigeração. Potencial zeta das formulações armazenadas em (c) temperatura ambiente e (d) sob refrigeração (d). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). \*representa significância estatística quando comparado ao tempo 0 (zero)( $p < 0,05$ ).



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Figura 18 - Cromatograma obtido após 60 dias de armazenamento da formulação NEAT<sub>2</sub>. Todas as formulações apresentaram o mesmo aspecto.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

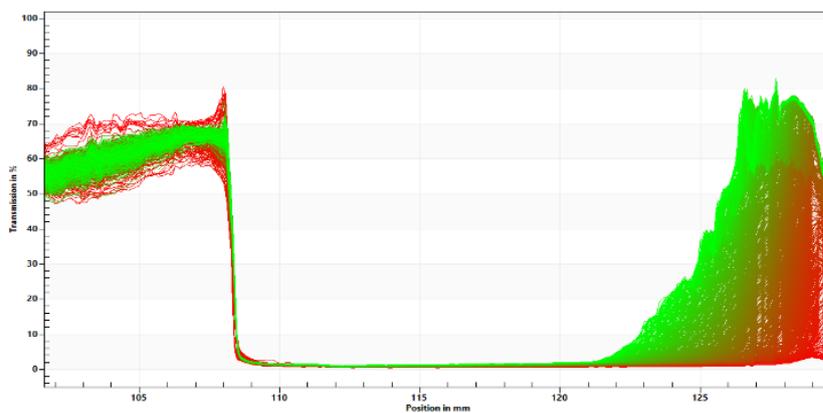
### 5.1.5.2 Estudos de estabilidade acelerada

A estabilidade acelerada das nanoemulsões e nanocápsulas contendo ATRA foi avaliada usando uma centrífuga analítica LUMiSizer® (LUM GmbH, Alemanha), o qual emprega a detecção fotométrica para avaliar fenômenos de instabilidade nas dispersões coloidais. Este método é baseado na medida da intensidade da luz transmitida no infravermelho próximo de uma amostra irradiada que está sendo submetida à centrifugação. A variação da luz transmitida ao longo do tempo e do espaço é registrada em perfis de transmissão e fornece informações sobre a cinética dos processos de separação, permitindo o cálculo da velocidade de migração das partículas. A extensão dos processos de separação de fases é expressa pelo índice de estabilidade fornecido pelo equipamento. Este parâmetro pode ser calculado com base na clarificação (aumento da intensidade de transmissão da luz) em um determinado tempo de centrifugação, dividido pela clarificação máxima. O índice de instabilidade é número adimensional e varia de 0 (mais estável) a 1 (menos estável) (ZIELIŃSKA *et al.*, 2018).

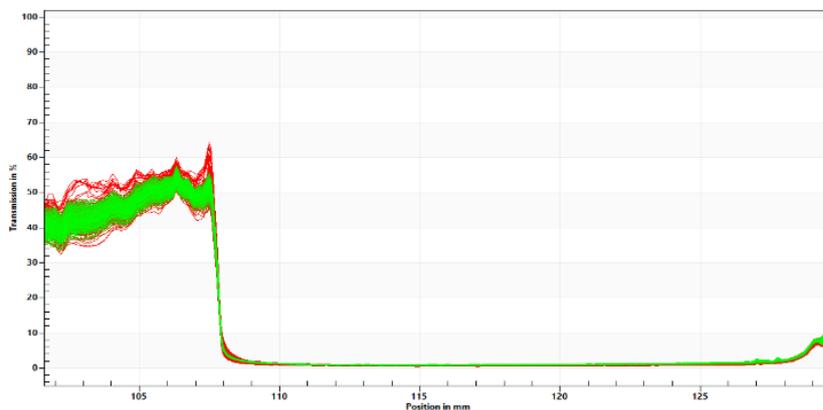
Os perfis de transmissão representativos das formulações de nanocarreadores lipídicos são apresentados na Figura 19. Os perfis de transmissão da nanoemulsão NEA<sub>T2</sub> e nanocápsulas NCA<sub>CAP</sub>, em menor intensidade, apresentaram uma área de clarificação (aumento da transmissão de luz) na parte inferior da cubeta, possivelmente devido a um fenômeno inicial de cremagem. Para as nanocápsulas NCA<sub>EUD</sub> o processo de clarificação é praticamente imperceptível, demonstrando um efeito adicional na estabilização da suspensão de nanocápsulas devido a presença do polímero EUD, em relação ao polímero CAP e a nanoemulsão.

Figura 19 - Representação dos perfis de transmissão de luz dos nanocarreadores contendo ATRA sujeitas à centrifugação de 4000 RPM a 25 °C. (a) NEA<sub>T2</sub>, (b) NCA<sub>EUD</sub> e (c) NCA<sub>CAP</sub>. Perfis de transmissão de luz registrados inicialmente são apresentados em vermelho. À medida que o tempo de centrifugação avança, os perfis passam a ser representados por linhas verdes.

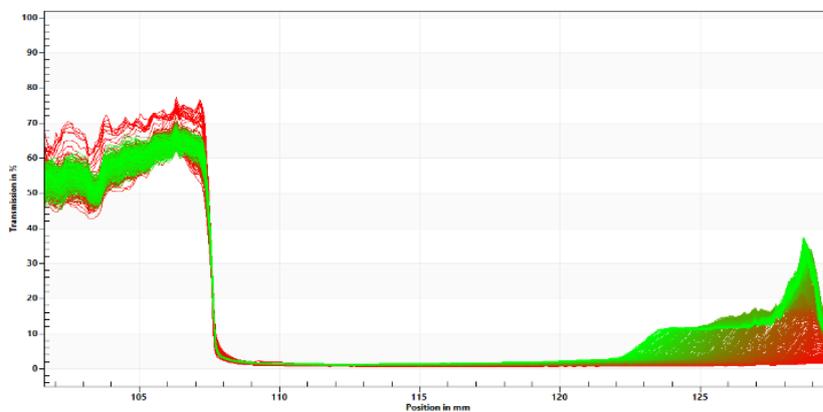
(a)



(b)



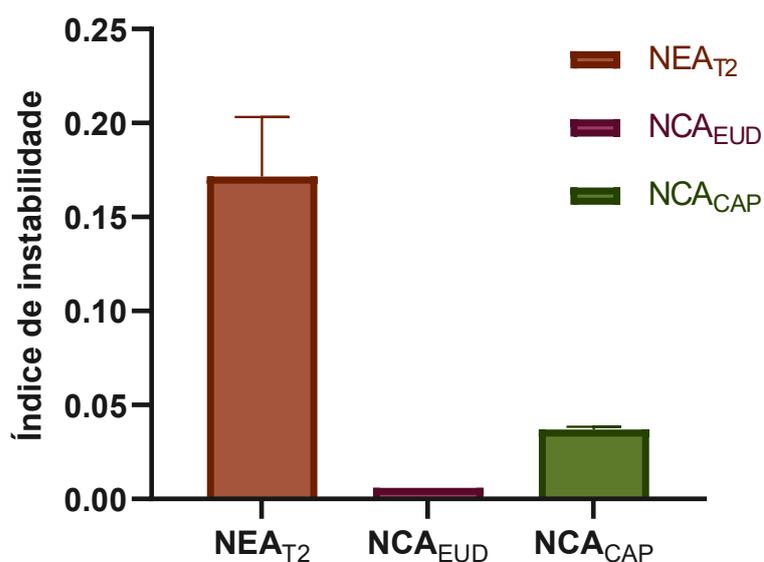
(c)



Fonte: LINDEN/UFSC (2022)

Todas as formulações desenvolvidas contendo ATRA apresentaram um índice de instabilidade inferior a 0,2, o que demonstra alta estabilidade dos nanocarreadores frente à separação de fases a 25 °C (Figura 20). Comparando os valores do índice de instabilidade da nanoemulsões  $NEA_{T2}$  ( $0,172 \pm 0,032$ ) com a nanocápsulas  $NCA_{CAP}$  ( $0,037 \pm 0,001$ ) e a nanocápsulas  $NCA_{EUD}$  ( $0,006 \pm 0,001$ ) é possível afirmar que a presença dos polímeros gastroresistentes na composição das nanoestruturas também contribuem para a estabilização das formulações, possivelmente devido à presença de grupamentos carregados negativamente em suas estruturas, que aumenta as forças de repulsão entre as partículas.

Figura 20 - Valores de índice de estabilidade para as diferentes formulações de nanocarreadores contendo ATRA, obtidos através do estudo de estabilidade acelerada (n = 3).



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

### 5.1.6 Avaliação do perfil de liberação do ATRA a partir dos nanocarreadores

A solubilização dos fármacos nos fluidos gastrointestinais é um dos processos que afetam diretamente sua farmacocinética quando administrados por via oral. Compostos fracamente solúveis em meio aquoso apresentam baixa absorção oral, bem como biodisponibilidade baixa e/ou com alta variabilidade individual. Com isso as

tecnologias de veiculação e liberação modificada de fármacos, como os nanocarreadores a base de lipídeos, são frequentemente utilizados para melhorar a solubilidade desses fármacos no TGI (CARRIER *et al.*, 2010; PERRIER *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2017).

É bem conhecido que os dois principais processos que afetam a absorção de fármacos administrados pela via oral são a dissolução nos fluidos biológicos e o transporte através das mucosas até a circulação sistêmica. Assim, estudos de dissolução são imprescindíveis para caracterização das formulações e predição do seu comportamento *in vivo*. Neste contexto, MARKOPOULOS *et al.* (2015) propuseram quatro níveis de simulação da composição luminal para os ensaios de dissolução. Os meios de Nível 0 são soluções aquosas simples, com pH ajustado (geralmente com um tampão) para representar o pH da região de interesse do TGI. Nos meios de Nível I, tanto o pH quanto a capacidade do tampão são ajustados para refletir os valores fisiológicos. Os componentes biliares, lipídios da dieta e produtos essenciais da digestão são incluídos adicionalmente nos meios de Nível II para refletir a capacidade de solubilização dos fluidos fisiológicos e as diferenças na composição entre o estado de jejum e alimentado. Em meios de Nível III, as composições são ainda mais complexas, e incluem a adição de proteínas, enzimas e a avaliação dos efeitos da viscosidade na liberação do fármaco. Os estudos de liberação do ATRA a partir dos nanocarreadores foram conduzidos utilizando dois meios que simulam o ambiente gástrico e o intestinal em nível 0, levando em consideração o pH fisiológico de cada região. Por outro lado, em ensaios de dissolução *in vitro*, é preferível que a condição *sink* seja estabelecida, de modo que a solubilidade do fármaco no meio não seja impeditiva para que ocorra o processo de dissolução. Assim, de modo a obter condições *sink* e permitir a quantificação do ATRA no meio de dissolução, estudos iniciais de solubilidade do ATRA em meio gástrico e intestinal simulados foram realizados e os resultados serão descritos a seguir.

### 5.1.6.1 Determinação da solubilidade do ATRA nos meios de liberação

A avaliação da solubilidade do ATRA foi realizada em ácido clorídrico 0,1 N e tampão fosfato pH 6,8, os quais são considerados meio gástrico e intestinal simulados. Etanol e laurilssulfato de sódio (LSS) foram adicionados a estes meios para aumentar a solubilidade do ATRA. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 15. A maior solubilidade no tampão fosfato pH 6,8 foi atingida ao acrescentar 0,5% de LSS ( $56,57 \pm 2,05 \mu\text{g/mL}$ ) e no ácido clorídrico 0,1 N quando este foi acrescido de 20% de etanol e 0,5% de LSS ( $26,28 \pm 0,60$ ). Para dar continuidade aos ensaios de liberação foram selecionados os dois meios contendo LSS a 0,5%.

Tabela 15 - Solubilidade do ATRA ( $\mu\text{g/mL}$ ) em diferentes meios de liberação. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três determinações

Meios	Solubilidade $\pm$ dp
HCl 0,1 N	$8,69 \pm 0,87$
HCl 0,1 N + etanol (80:20)	$15,73 \pm 4,48$
HCl 0,1 N + LSS (0,5%)	$18,31 \pm 1,68$
HCl 0,1 N + etanol (80:20) + LSS (0,5%)	$26,28 \pm 0,60$
Tampão fosfato pH 6,8	$19,12 \pm 7,70$
Tampão fosfato pH 6,8 + etanol (80:20)	$3,98 \pm 0,51$
Tampão fosfato pH 6,8 + LSS (0,5%)	$56,57 \pm 2,05$
Tampão fosfato pH 6,8 + etanol (80:20) + LSS (0,5%)	$52,47 \pm 1,72$

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

### 5.1.6.2 Revalidação do método analítico para determinação do ATRA nos meios de liberação por CLAE

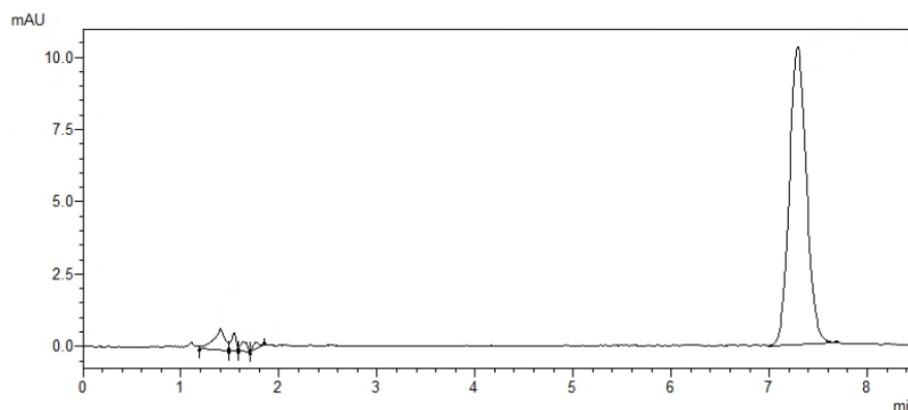
Para a determinação do ATRA em cada meio foi utilizado uma metodologia analítica de CLAE previamente desenvolvida e validada, conforme descrito em 4.2.3.1. A revalidação de um método analítico compreende a repetição parcial da validação da metodologia já validada, e tem como objetivo assegurar que o método continua cumprindo com os requisitos estabelecidos, ainda que a composição da

amostra e/ou o método analítico tenham sofrido alterações (BRASIL, 2017). A revalidação fez-se necessária para determinação do ATRA no meio de liberação.

#### 5.1.6.2.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada a partir da análise de soluções contendo formulações brancas e os meios de liberação, em comparação com os cromatogramas obtidos a partir de formulações contendo ATRA nos respectivos meios. O método demonstrou ser específico nas condições de análise, não havendo interferentes no mesmo tempo de retenção do fármaco, conforme representado na Figura 21.

Figura 21 - Cromatograma obtido a partir da solução de ATRA no meio HCl 0,1 N contendo LSS 0,5% (m/V). Ambos os meios apresentam o mesmo perfil cromatográfico.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 5.1.6.2.2 Linearidade e limites de detecção e quantificação

A linearidade do método foi avaliada através da construção de curvas de calibração para o ATRA nos diferentes meios de liberação na faixa de concentração de 0,05 a 20,0 µg/mL. Os valores do coeficiente de determinação ( $r^2$ ), assim como a equação da reta e os valores de LD e LQ encontram-se na Tabela 16. As curvas de calibração se encontram na Figura 22 e indicaram que o método foi linear para ambos os meios na faixa de concentração testada ( $r^2 > 0,99$ ) (BRASIL, 2017).

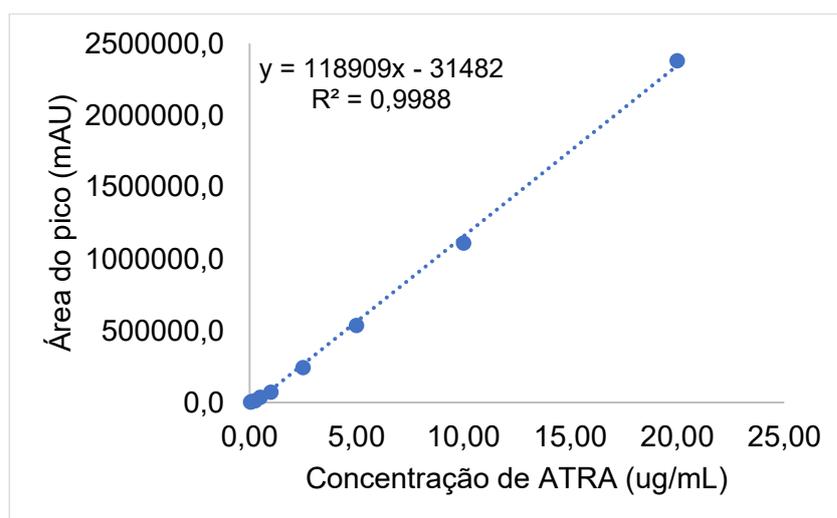
Tabela 16 - Equação da reta e valores de  $r^2$ , LD e LQ obtidos a partir das curvas de calibração do ATRA em ácido clorídrico 0,1 N e tampão fosfato pH 6,8, ambos contendo LSS 0,5% (m/V).

	<b>Ácido clorídrico 0,1 N + LSS (0,5%)</b>	<b>Tampão fosfato pH 6,8 + LSS (0,5%)</b>
Equação da reta	$y = 118909x - 31482$	$y = 144361x - 35031$
Coefficiente de determinação ( $r^2$ )	0,999	0,999
LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,34	0,29
LQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	1,03	0,87

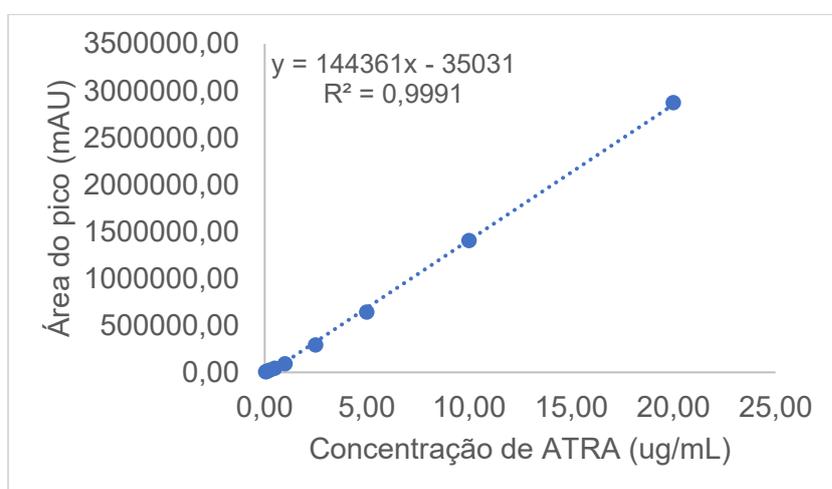
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Figura 22 - Curvas de calibração obtidas para os meios (a) HCl 0,1 N e (b) Tampão fosfato pH 6,8, ambos contendo LSS 0,5% (m/V).

(a)



(b)



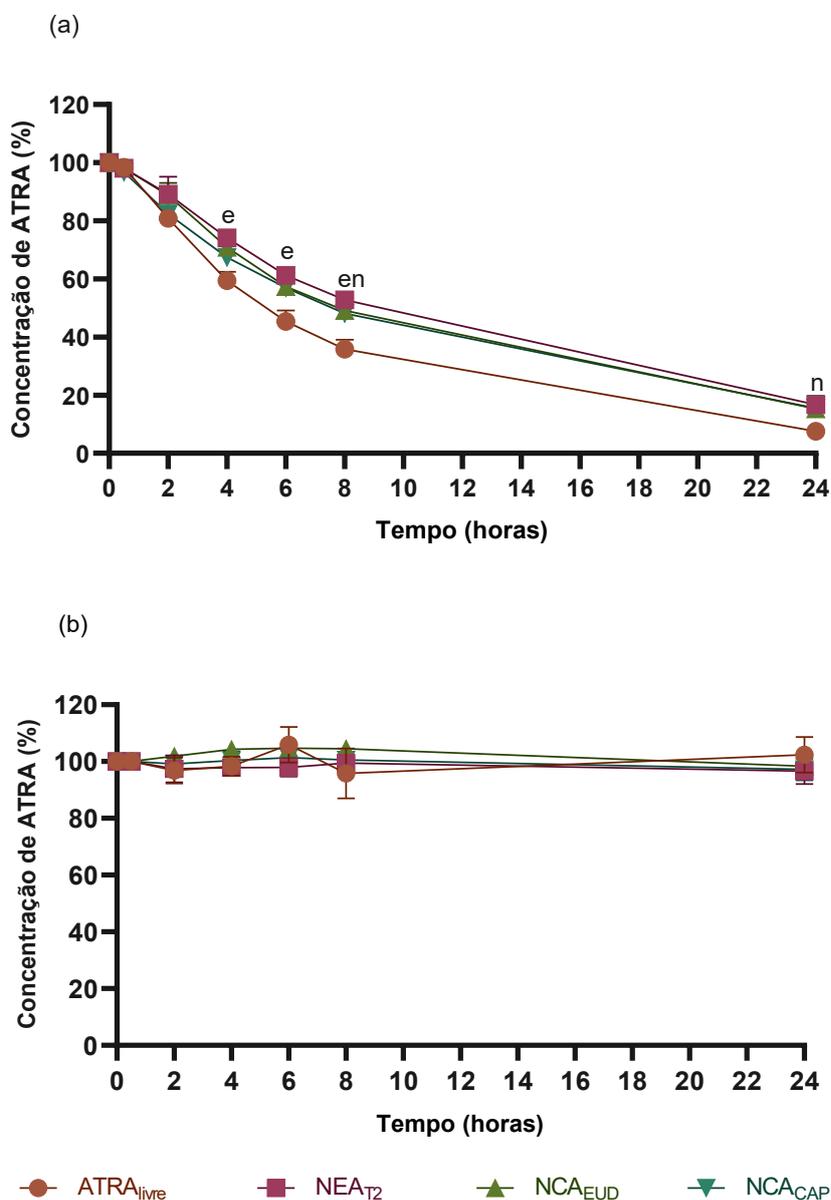
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

### 5.1.6.3 Avaliação da estabilidade do ATRA livre e nanoencapsulado nos meios de liberação

Estudos da literatura descrevem que o ATRA apresenta alta sensibilidade à degradação e isomerização ocasionados por altas temperaturas, exposição à luz visível e UV e em meios ácidos e oxidativos (MARTIN *et al.*, 1998). Assim, a estabilidade do ATRA livre e nanoencapsulado nos meios de liberação foi avaliada após diluição diretamente em ácido clorídrico 0,1 N e tampão fosfato pH 6,8, ambos contendo LSS 0,5% (m/V). As misturas foram mantidas sob agitação a 37° C e alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 0,5, 2, 4, 6, 8 h e analisadas quanto ao teor de ATRA por CLAE.

Os resultados obtidos demonstraram a rápida degradação do ATRA em meio ácido (pH ~ 1,2), enquanto em pH 6,8 o fármaco se manteve estável durante todo o período testado (Figura 23). A análise estatística mostrou a tendência que as formulações apresentam em proteger o fármaco frente à degradação em meio ácido. Diferenças significativas no teor de ATRA foram encontradas nos tempos correspondentes a 4, 6 e 8 h, quando a formulação NCA<sub>EUD</sub> foi testada, e nos tempos 8 e 24 horas, quando a formulação NEA<sub>T2</sub> foi testada, em comparação ao fármaco não encapsulado ( $p < 0,05$ ). Assim, levando-se em consideração que em ambiente fisiológico o tempo de residência gástrica é de 2 a 3 h, cerca de 10 a 20% do ATRA seria degradado antes de alcançar o intestino delgado.

Figura 23 - Perfis de degradação do ATRA após incubação em (a) HCl 0,1 N e (b) Tampão fosfato pH 6,8, ambos contendo LSS 0,5% (m/V). (e) representa significância estatística entre os valores de teor de ATRA da NCA<sub>EUD</sub> em relação ao fármaco livre. (n) representa significância estatística entre os valores de teor de ATRA da NEA<sub>T2</sub> em relação ao ATRA livre ( $p < 0,05$ ).



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O perfil de degradação do ATRA no meio ácido se ajusta ao modelo de cinética de primeira ordem, significando que a degradação depende principalmente da concentração de ATRA disponível no meio (SALMANI *et al.*, 2014). Na Tabela 17 encontram-se os valores de  $r^2$  e os tempos de meia-vida obtidos para o ATRA nas diferentes formulações, após incubação em ácido clorídrico 0,1 N, calculados a partir

da regressão não linear, utilizando o *software GraphPad Prism 8.0*. Como base nestes resultados é possível afirmar que os nanocarreadores são capazes de proteger o fármaco da degradação em ambiente gástrico.

Tabela 17 - Valores de  $r^2$  e valores de tempo de meia-vida obtidos segundo cinética de primeira ordem para o ATRA, após incubação do fármaco na forma não encapsulada e encapsulada em HCl 0,1 N contendo LSS 0,5% (m/V).

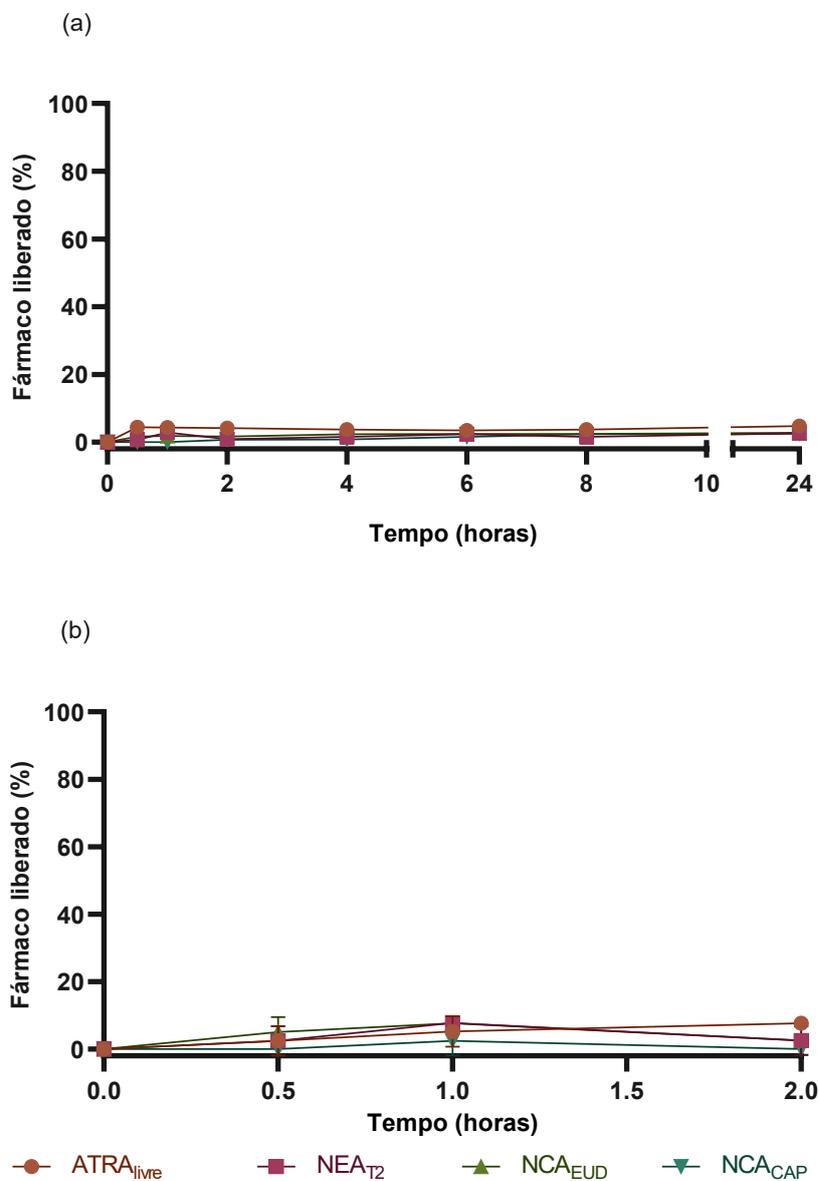
	Valor de $r^2$	Tempo de meia-vida (h)
ATRA <sub>livre</sub>	0,9934	4,919
NEA <sub>T2</sub>	0,9926	8,109
NCA <sub>EUD</sub>	0,9835	6,957
NCA <sub>CAP</sub>	0,9762	6,438

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 5.1.6.4 Avaliação do perfil de liberação do ATRA pelo método do saco de diálise

A avaliação do perfil de liberação do ATRA a partir dos nanocarreadores foi realizada pelo método do saco de diálise. Nesse método, as partículas contendo o fármaco são fisicamente separadas do meio de liberação por uma membrana de diálise semipermeável, e a liberação do fármaco é geralmente avaliada após análise no meio externo ao longo do tempo. O método do saco de diálise evita o emprego de técnicas para separação das partículas do meio e elimina a perda indesejada das mesmas durante o preparo e manuseio da amostra. Além disso, a amostragem e substituição do meio são facilitadas (AMATYA *et al.*, 2013; GUPTA; CHEN; XIE, 2021). Os perfis de liberação do ATRA em ácido clorídrico 0,1 N e tampão fosfato pH 6,8, usando o método do saco de diálise são apresentados na Figura 24. Os resultados mostraram que menos de 10% de fármaco foi liberado em ambos os meios de liberação. Da mesma forma o fármaco livre também não se difundiu adequadamente através da membrana para o meio de liberação, apresentando precipitação no interior do saco de diálise.

Figura 24 – Valores de porcentagem de fármaco liberada ao longo do tempo no meio (a) tampão fosfato pH 6,8 e (b) HCl 0,1 N, HCl 0,1 N, ambos contendo LSS 0,5% (m/V). (n = 3)



A baixa liberação do ATRA verificada durante o ensaio pode estar relacionada tanto as características das partículas e do fármaco, quanto a problemas relacionados ao método utilizado. Embora o método de diálise ofereça várias vantagens como facilidade de coleta da amostra e conveniência, esta técnica não pode ser usada se o fármaco se ligar aos componentes da formulação ou à membrana de diálise (AMATYA *et al.*, 2013; GUPTA; CHEN; XIE, 2021). Além disso, devido à barreira imposta pela

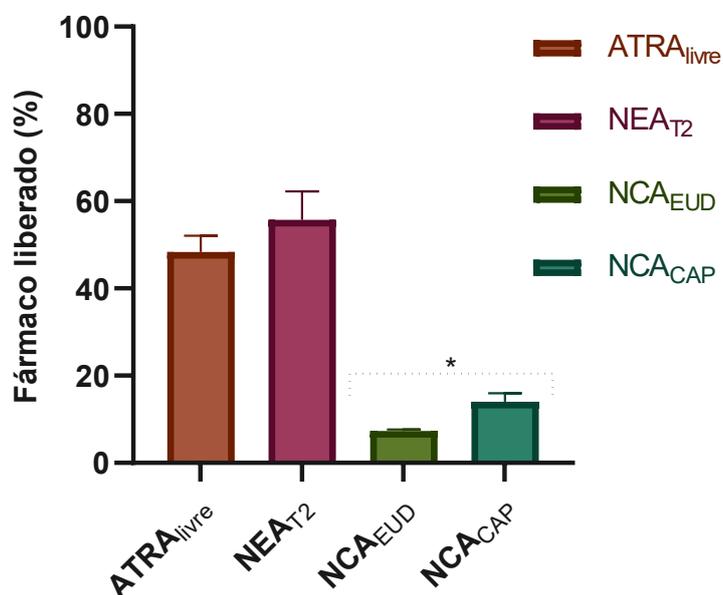
membrana e à falta de uma agitação adequada no interior do saco de diálise, a perda das condições *sink* pode ocorrer, comprometendo a liberação do fármaco a partir do nanocarreador (SHEN; BURGESS, 2013). Ainda, como relatado anteriormente, o ATRA demonstrou baixa estabilidade em meio ácido, o que pode ter levado a subestimar os percentuais de liberação em função do tempo. Todos estes aspectos podem ter contribuído para a obtenção dos resultados observados.

#### 5.1.6.5 Avaliação da liberação do ATRA após incubação direta no meio de liberação

Outra metodologia comumente utilizada para avaliação do perfil de liberação de fármacos de formulações micro e nanoparticuladas consiste na incubação direta das partículas no meio de liberação. Neste método, conhecido como *Sample and Separate* (SS), é caracterizado pela sua facilidade de execução. As partículas contendo fármaco são dispersas diretamente em um recipiente contendo o meio de liberação e em tempos pré-determinados, o meio de liberação é coletado. Uma técnica de separação das partículas como centrifugação ou ultrafiltração é empregada, e o fármaco liberado é determinado no meio de liberação por um método analítico validado (KIM *et al.*, 2021; SHEN; BURGESS, 2013).

Com intuito de verificar se a membrana de diálise atuou como barreira à liberação do ATRA, um ensaio de liberação foi realizado após incubação direta do ATRA livre e dos nanocarreadores em tampão fosfato pH 6,8 contendo LSS 0,5%. Após 6 horas de incubação, os nanocarreadores e o fármaco livre foram submetidos à ultrafiltração/centrifugação e os sobrenadantes foram analisados por CLAE. Os resultados mostraram que 55% do ATRA foi liberado a partir da nanoemulsão (NEA<sub>T2</sub>), enquanto cerca de 7% e 14% foram liberados a partir das nanocápsulas NCA<sub>EUD</sub> e NCA<sub>CAP</sub>, respectivamente (Figura 25). Quando o fármaco livre foi testado, a dissolução foi de aproximadamente 48% no mesmo período. Os resultados indicaram que de fato o método da diálise não se mostrou adequado para avaliar a cinética de liberação do ATRA a partir dos nanocarreadores. Por outro lado, a menor liberação do ATRA a partir das nanocápsulas sugere que a parede polimérica atua como uma barreira à liberação.

Figura 25 - Porcentagem de liberação do ATRA após 6 h de incubação dos nanocarreadores e do fármaco livre em tampão fosfato pH 6,8 contendo LSS 0,5% (m/V) (n = 3). \* Valores estatisticamente significativos quando comparados à formulação NEA<sub>T2</sub>-e ao fármaco livre (p < 0,05).



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

### 5.1.7 Avaliação da atividade citotóxica do ATRA livre e nanoencapsulado, utilizando cultura de células de melanoma B16F10

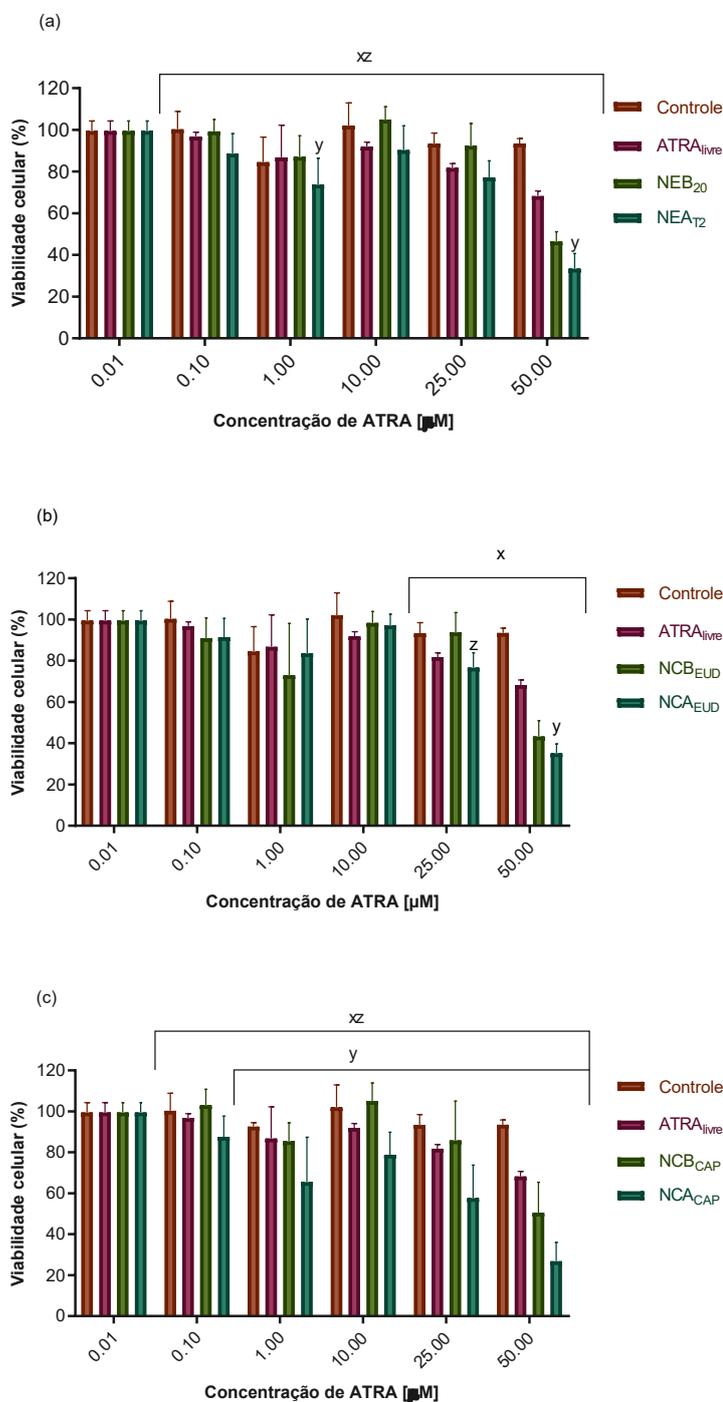
Os estudos *in vitro* são utilizados como indicadores de resultados potenciais sobre a atividade de nanocarreadores a nível celular para embasar posteriores estudos *in vivo*. Eles permitem explorar o efeito de diferentes compostos e concentrações a um custo relativamente baixo e tempo reduzido, além da possibilidade de investigação de mecanismos relacionados a citotoxicidade, alterações metabólicas e de expressão gênica. Os estudos *in vitro*, utilizando culturas de células, reduzem o número e custo dos animais necessários para avaliar estatisticamente os efeitos da veiculação de fármacos em nanopartículas (NATARAJAN; TOMICH, 2020).

### 5.1.7.1 Avaliação da citotoxicidade em modelo de cultura de células de melanoma B16F10

O efeito citotóxico do ATRA livre e encapsulado em diferentes nanocarreadores foi avaliado em células de melanoma murino B16F10 por meio do ensaio do MTT, após 72 horas de incubação. Os resultados são mostrados na Figura 26. A incubação de células B16F10 com ATRA livre e os nanocarreadores contendo ATRA causou redução significativa da viabilidade celular, de forma dependente da concentração de fármaco. Foi observada redução estatisticamente significativa no número de células viáveis para o ATRA livre em comparação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ), em concentrações acima de 25  $\mu\text{M}$ . Na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , a incubação das células B16F10 com ATRA livre causou uma redução de 30% no número de células viáveis. Quando os nanocarreadores contendo ATRA foram testados, uma redução na viabilidade celular de 80%, 75% e 70% foi verificada para a formulação  $\text{NCA}_{\text{CAP}}$ ,  $\text{NEA}_{\text{T2}}$  e  $\text{NCA}_{\text{EUD}}$ , respectivamente, após 72 h de incubação. Na comparação entre as formulações contendo ATRA, as nanocápsulas  $\text{NCA}_{\text{CAP}}$ , apresentaram redução significativa ( $P < 0,05$ ) da viabilidade celular nas concentrações de 10 e 25  $\mu\text{M}$ . Não houve diferença estatística entre as formulações nas demais concentrações avaliadas.

O maior efeito citotóxico dos nanocarreadores em relação ao fármaco livre pode ser explicado, em parte, pelo encapsulamento do ATRA no interior das partículas, que fornece uma proteção frente à degradação no meio de cultura, tornando-o mais disponível para atuar nas células. Além disso, a encapsulação do ATRA em nanocarreadores lipídicos permite a administração desse fármaco hidrofóbico como uma dispersão aquosa, o que pode melhorar sua biodisponibilidade. Os nanocarreadores brancos (sem ATRA) também exibiram efeito citotóxico. Esse efeito pode ser explicado pela possível toxicidade que os componentes da formulação, como surfactantes e polímeros, apresentam sobre a cultura de células. A formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), interações com proteínas intracelulares, desestabilização da membrana celular e do potencial de membrana mitocondrial são mecanismos bastante estudados para justificar a morte celular causada por nanopartículas (FRÖHLICH, 2012; NATARAJAN; TOMICH, 2020).

Figura 26 - Valores de viabilidade celular obtidos após 72 h de incubação do ATRA livre e dos nanocarreadores (a) NEA<sub>T2</sub>, (b) NCA<sub>EUD</sub>, e (c) NCA<sub>CAP</sub> em cultura de células de melanoma B16F10. x, y e z indicam a existência de significância estatística dos nanocarreadores contendo o ATRA, quando comparado ao controle, ao ATRA livre e à formulação branca, respectivamente (P < 0,05).



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Os valores de IC<sub>50</sub> em µM do ATRA livre e associado em nanopartículas foram estimados através de regressão não linear utilizando o *software GraphPad Prism 8.0* e os resultados estão listados na Tabela 18. Os valores de IC<sub>50</sub> dos nanocarreadores contendo ATRA foram menores do que os apresentados pelo ATRA livre, o que embasa o efeito de seu encapsulamento na citotoxicidade do ATRA frente às células de melanoma B16F10.

Tabela 18 - Valores de IC<sub>50</sub> em µM calculados para o ATRA livre e nanoencapsulado em diferentes formulações.

	<b>ATRA<sub>livre</sub></b>	<b>NEA<sub>T2</sub></b>	<b>NCA<sub>EUD</sub></b>	<b>NCA<sub>CAP</sub></b>
IC <sub>50</sub> (µM)(± dp)	107,8 ± 31,59	45,63 ± 16,26	50,57 ± 15,69	26,32 ± 10,70

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 5.1.7.2 Avaliação *in vitro* da atividade antitumoral combinada entre nanocarreadores contendo ATRA e cisplatina

Dada à complexidade fisiológica do tumor, um único medicamento ou mesmo uma estratégia terapêutica isolada pode não ser suficiente para um tratamento eficaz. A quimioterapia combinada, com a administração simultânea de dois ou mais agentes terapêuticos, está se tornando cada vez mais importante para alcançar o prognóstico a longo prazo e diminuir os efeitos adversos indesejados. Ao contrário da monoterapia, a quimioterapia combinada pode modular diferentes vias de sinalização nas células cancerígenas, causar respostas sinérgicas, maximizar o efeito terapêutico e superar a resistência aos medicamentos (HU *et al.*, 2016).

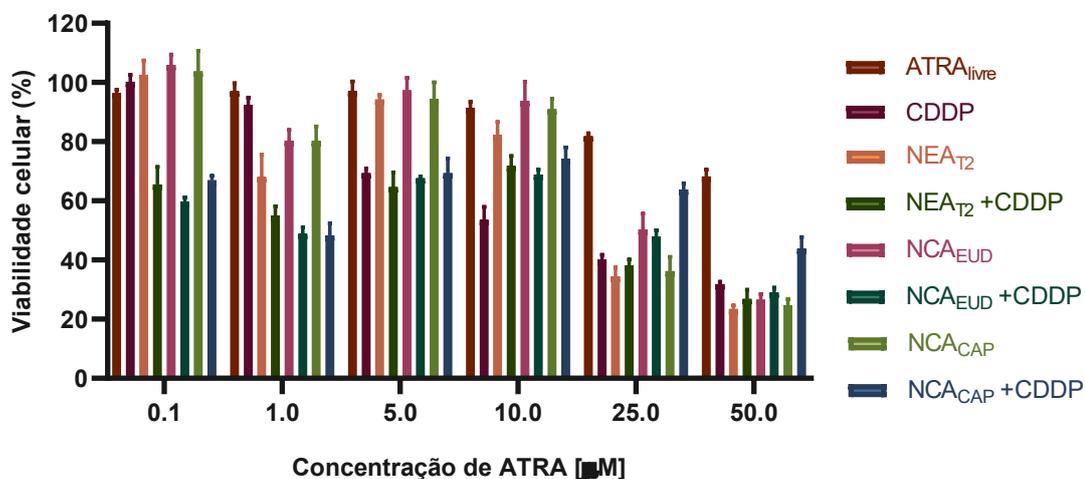
A administração simultânea de dois fármacos pode gerar efeitos terapêuticos maiores, iguais ou inferiores aos efeitos produzidos pelos dos fármacos isoladamente. A combinação é farmacodinamicamente sinérgica quando o efeito é maior que o efeito somado dos fármacos individuais e o alvo de cada fármaco está localizado em diferentes locais ou vias de sinalização diferentes. O efeito é aditivo quando o efeito é maior ou igual ao efeito somado dos fármacos individuais e eles exercem efeitos no mesmo alvo terapêutico ou via de sinalização. Efeitos de potenciação podem ser alcançados quando o efeito/atividade terapêutica de um fármaco é aumentado ou o efeito adverso é reduzido pelo outro fármaco através da regulação de sua

farmacocinética. Finalmente, o antagonismo é o oposto da sinergia e ocorre quando o efeito combinado dos fármacos é menor do que o esperado, seja por mecanismos químicos, fisiológicos ou farmacodinâmicos, como a competição pelo mesmo sítio de ação (HU *et al.*, 2016; ROELL; REIF; MOTSINGER-REIF, 2017).

O efeito citotóxico do ATRA nanoencapsulado em combinação com a cisplatina foi avaliado sobre as células de melanoma murino B16F10. A cisplatina foi selecionada devido a sua alta atividade antitumoral frente a diversos tipos de câncer, incluindo o melanoma e outros tumores sólidos. Além disso, terapias combinadas de cisplatina com outros fármacos têm sido altamente consideradas para superar a resistência e reduzir a toxicidade. O mecanismo de ação deste fármaco está relacionado à sua capacidade de se ligar ao DNA, com formação de adutos, originando ligações intra e intercadeias que induzem alterações estruturais, causando a inibição da transcrição e replicação, e a indução de apoptose. A cisplatina também leva à geração de EROS e interfere em diversas vias de sinalização que levam à morte celular (DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014).

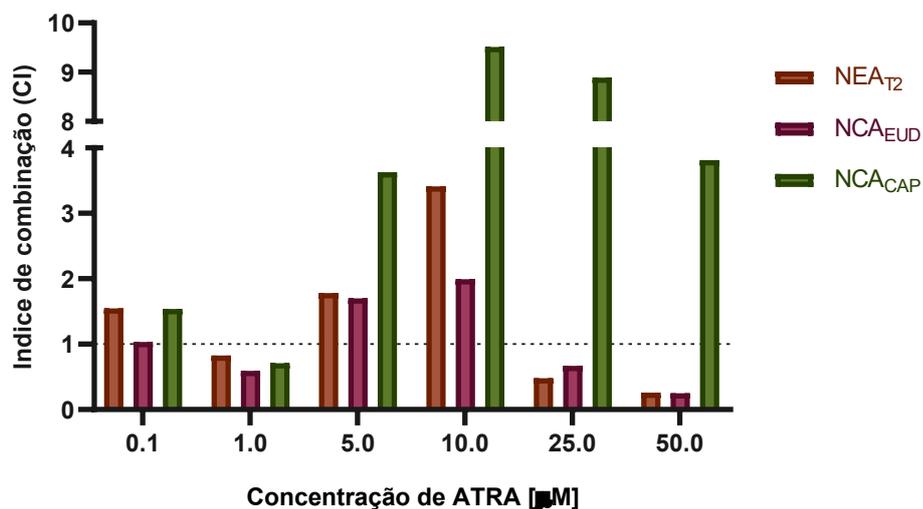
Para o ensaio, células B16F10 foram incubadas com as nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo ATRA em diferentes concentrações, acrescidas de uma solução de cisplatina em concentração fixa. Após 72 horas, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. A partir dos resultados de viabilidade celular foram calculados os valores de índice de combinação (CI), conforme descrito por CHOU; TALALAY (1984), usando o *software CompuSyn*, para a análise dose/efeito. Segundo estes autores valores de CI menores que 1,0 indicam interação sinérgica, igual a 1,0 indicam efeito aditivo e maiores que 1,0 indicam antagonismo (CHOU, 2010; CHOU; TALALAY, 1984). Os perfis de viabilidade celular obtidos pela combinação de diferentes concentrações de ATRA nanoencapsulado com a cisplatina são mostrados na Figura 27. Os valores de índice de combinação calculados são apresentados na Figura 28.

Figura 27 - Valores de viabilidade celular obtidos após 72 h de incubação do ATRA livre, CDDP e dos nanocarreadores contendo ATRA em diferentes concentrações em combinação com 10  $\mu\text{M}$  de CDDP em cultura de células de melanoma B16F10.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Figura 28 – Valores de CI obtidos após avaliação da citotoxicidade do ATRA nanoencapsulado em diferentes concentrações em combinação com 10  $\mu\text{M}$  de CDDP frente às células de melanoma murino B16F10.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Conforme verificado na Figura 28, para as condições testadas no ensaio, os valores de CI indicaram que o sinergismo ou antagonismo depende tanto concentração de fármaco quanto do nanocarreador avaliado. O efeito sinérgico foi observado principalmente quando a nanoemulsão NEA<sub>T2</sub> e as nanocápsulas NCA<sub>EUD</sub> em combinação com a cisplatina, enquanto as nanocápsulas NCA<sub>CAP</sub> co-incubada com a cisplatina levou preponderantemente a um efeito antagônico. Algumas hipóteses sobre o possível efeito antagônico entre a cisplatina e os nanocarreadores contendo ATRA são: (I) a competição por vias de internalização celular causada por componentes da formulação, que podem reduzir a concentração intracelular de cisplatina; (II) baixa disponibilidade do ATRA no meio para realizar sua ação antiproliferativa; (III) diferenças no tempo de ação entre os fármacos, que pode levar a supressão de um deles; (IV) inativação da cisplatina por componentes da formulação (HACKMAN *et al.*, 2020; RICHARDS *et al.*, 2020). Já os mecanismos de sinergismo podem estar relacionados a (I) modulação da permeabilidade celular, induzindo maior dos fármacos no interior das células, para exercerem seus efeitos; (II) ação em diferentes momentos do ciclo celular, potencializando o efeito antiproliferativo; (III) diferentes mecanismos de ação, que levam a morte celular por diferentes vias; (IV) a indução da diferenciação celular causada pelo ATRA pode aumentar a sensibilidade da célula a ação da cisplatina (ZHANG *et al.*, 2016).

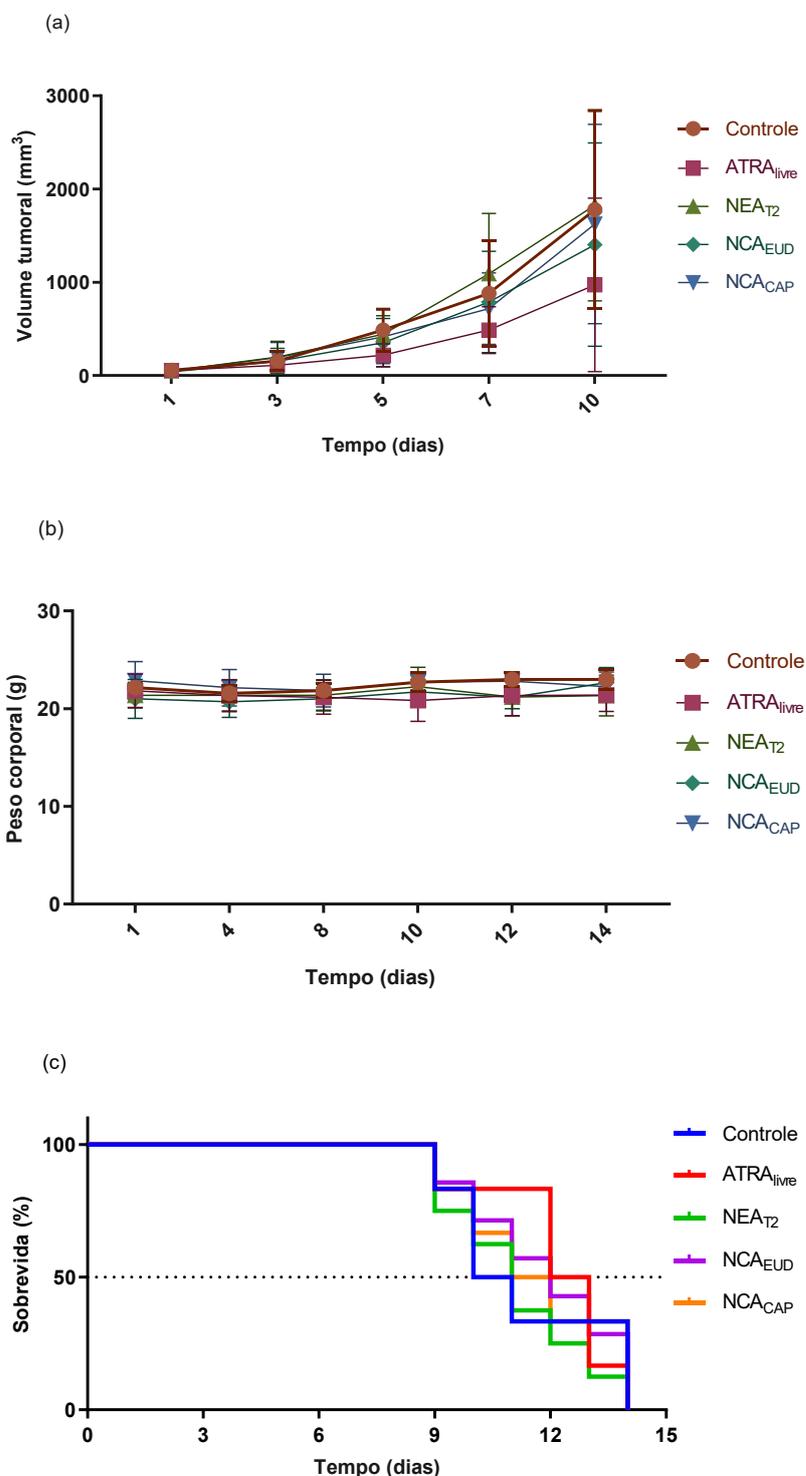
Outros estudos têm evidenciado o efeito da combinação do ATRA com fármacos quimioterápicos sobre a atividade antitumoral frente ao melanoma. HAN *et al.* (2019) avaliaram o efeito da co-liberação do ATRA e paclitaxel em micelas de ácido hialurônico sobre a citotoxicidade frente às células de melanoma B16F10. Neste estudo, a maior citotoxicidade foi verificada quando o paclitaxel foi combinado ao ATRA nas micelas. LI; HAN, (2020) também avaliaram o efeito citotóxico produzido pela combinação de nanoformulações lipídicas contendo ATRA e a dacarbarzina frente às células de melanoma B16F10. Neste estudo, os autores evidenciaram um efeito sinérgico da combinação, a qual provocou uma redução na viabilidade celular em cerca de 80%. Estes estudos corroboram com os achados neste trabalho, os quais mostraram que a combinação do ATRA encapsulado nas nanoemulsões NEA<sub>T2</sub> e nas nanocápsulas NCA<sub>EUD</sub> com a cisplatina pode constituir uma estratégia útil para o tratamento do melanoma.

### 5.1.8 Avaliação preliminar da eficácia terapêutica dos nanocarreadores contendo ATRA em modelo de melanoma murino

Para o estudo do melanoma, diversos modelos foram desenvolvidos e podem ser classificados como xenoenxertos (a partir de tumores humanos), modelos singênicos (tumores geneticamente idênticos), tumores induzidos com carcinógenos ou exposição à radiação UV, ou modelos geneticamente modificados em que há a expressão aumentada de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor. Os modelos de melanomas murinos transplantáveis são modelos bem estabelecidos para o estudo de terapias experimentais contra esse tipo de câncer, sendo mais utilizada a linhagem celular de melanoma B16 murino e suas sub-linhagens, que se originam do camundongo singênico C57BL/6. Várias linhagens derivadas da B16 foram obtidas para estudar diferentes estratégias terapêuticas. A sub-linhagem B16F10 foi selecionada por sua alta capacidade proliferativa e metastática *in vivo*. As células B16F10 podem ser injetadas através da veia da cauda de camundongos C57BL/6 para produzir metástases artificiais, principalmente no pulmão, ou podem ser injetadas na pele do flanco para estudar o crescimento local do tumor ou o desenvolvimento metastático espontâneo (DANCIU *et al.*, 2015; POTEZ *et al.*, 2018).

A eficácia terapêutica da administração oral do ATRA livre e nanoencapsulado foi avaliada em modelo de tumor sólido em que as células B16F10 são injetadas subcutaneamente do dorso dos camundongos C57BL/6 e a evolução do crescimento do tumor é avaliada ao longo dos tratamentos, conforme protocolo descrito em 4.2.7.2. A Figura 29 mostra os resultados obtidos na evolução do volume do tumor, peso corporal e sobrevivência dos animais ao longo dos ensaios. Os resultados de massa e volume tumoral, assim como o número de óbitos após 10 e 14 dias de tratamento estão compilados na Tabela 19. A Figura 30 mostra a fotografia dos tumores removidos após o sacrifício dos animais.

Figura 29 - Resultados obtidos na avaliação da atividade antitumoral após administração do ATRA livre e nanoencapsulado na dose de 10 mg/kg em modelo de melanoma murino, após inoculação de  $5 \times 10^5$  células B16F10 pela via subcutânea no dorso de camundongos C57BL/6. (a) Volume do tumor, (b) peso corporal dos animais e (c) sobrevida dos animais determinados ao longo do ensaio.



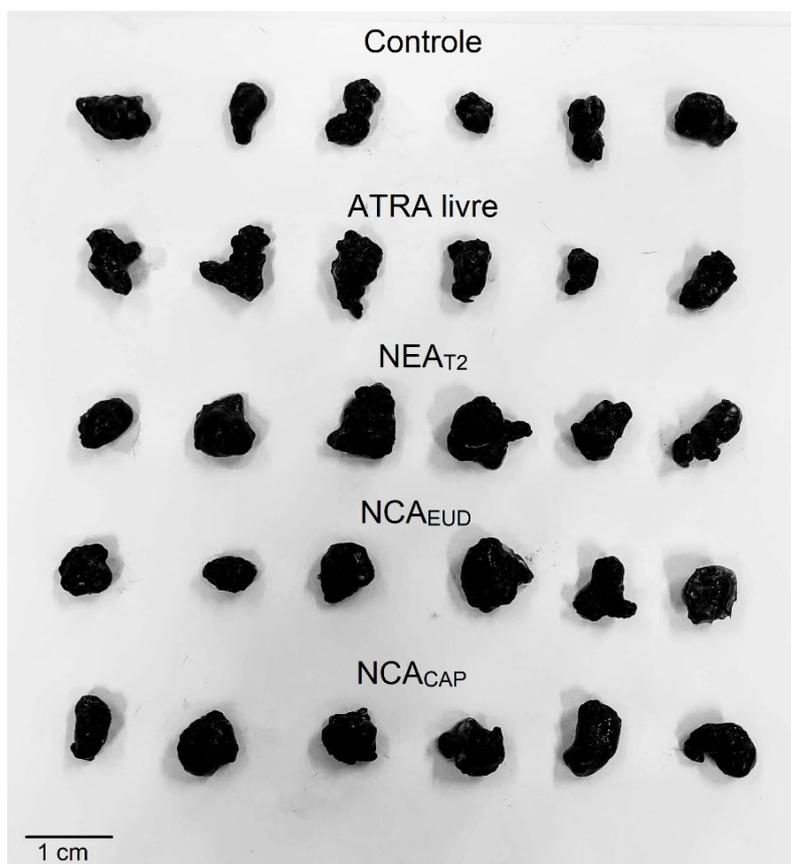
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 19 - Resultados obtidos na avaliação da atividade antitumoral após administração do ATRA livre e nanoencapsulado na dose de 10 mg/kg em modelo de melanoma murino, após inoculação de  $5 \times 10^5$  células B16F10 pela via subcutânea no dorso de camundongos C57BL/6. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Grupo	Peso do tumor (g) ( $\pm$ dp)	Volume tumoral (mm <sup>3</sup> ) ( $\pm$ dp)	Óbitos	
			Após 10 dias	Após 14 dias
Controle	0,70 $\pm$ 0,21	1964,02 $\pm$ 1061,10	0	4
ATRA livre	0,75 $\pm$ 0,20	699,81 $\pm$ 930,28	1	5
NEA <sub>T2</sub>	0,88 $\pm$ 0,29	1260,71 $\pm$ 1024,13	3	5
NCA <sub>EUD</sub>	0,69 $\pm$ 0,28	1480,71 $\pm$ 1090,42	2	5
NCA <sub>CAP</sub>	0,81 $\pm$ 0,13	1031,85 $\pm$ 1069,32	3	6

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Figura 30 - Fotografia dos tumores coletados dos camundongos após a administração do ATRA livre e nanoencapsulado na dose de 10 mg/kg em modelo de melanoma murino, após inoculação de  $5 \times 10^5$  células B16F10 pela via subcutânea no dorso de camundongos C57BL/6.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Como observado na Figura 29 e Tabela 19, não houve uma redução significativa no volume do tumor dos animais tratados com o ATRA livre e nanoencapsulado, na dose e número de células de melanoma B16F10 testados. Além disso, a alta taxa de mortalidade nos grupos experimentais prejudicou a análise estatística dos dados. É possível notar uma tendência do ATRA livre em ser mais eficaz na redução do volume do tumor, em comparação ao ATRA nanoencapsulado. No entanto, como há uma grande variação do volume tumoral entre animais do mesmo grupo, não é possível afirmar este resultado.

Quanto ao baixo efeito antiproliferativo relacionado ao ATRA, algumas hipóteses foram formuladas, com base na dose administrada, farmacocinética desfavorável e mecanismos de resistência ao fármaco. Na literatura há uma ampla variação da faixa de dosagem de ATRA administrada por via oral em modelos animais para avaliação em diversos tipos de câncer, mas não há dados suficientes para esse modelo em específico, quando a via oral é utilizada. Com isso, um compilado da literatura foi estudado e dosagens entre 0,1 e 30 mg/kg/dia foram encontradas para tratamento de carcinoma oral de células escamosas (XU *et al.*, 2008), carcinoma espinocelular de esôfago (LI *et al.*, 2017), adenocarcinoma do cólon (SHI *et al.*, 2017), carcinoma hepatocelular (YANG *et al.*, 2018), entre outros.

Por outro lado, a baixa sobrevida ao longo do experimento é uma característica desse modelo tumoral *in vivo*. Células B16F10 têm alto potencial metastático para órgãos viscerais distantes, principalmente os pulmões, e rápido crescimento, induzindo a morte dentro de duas a quatro semanas após a injeção subcutânea em camundongos. A linhagem de células B16 expressa baixos níveis de marcadores de classe I do complexo principal de histocompatibilidade e são pouco imunogênicas, devido à sua incapacidade de serem reconhecidas por células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas, o que as tornam ainda mais agressivas (KUZU *et al.*, 2015), explicando assim a alta mortalidade observada.

Além do aumento da dose e ajuste do número de células, outra perspectiva para avaliação do efeito benéfico do ATRA nanoencapsulado no modelo de melanoma murino *in vivo* consiste na avaliação da associação dos nanocarreadores com a cisplatina. O ATRA tem mostrado uma ação sinérgica em combinação com outros agentes quimioterápicos em vários estudos *in vitro* e em modelos animais. Os

mecanismos de sinergismo baseiam-se em perturbações que os quimioterápicos causam na síntese de DNA acopladas a um aumento da sensibilidade induzida pelo ATRA. Além disso, o ATRA exibe uma série de efeitos interessantes sobre o crescimento e diferenciação de células normais, pré-neoplásicas e neoplásicas *in vitro* e *in vivo*, que podem potencializar a atividade de outros fármacos por diferentes vias, produzindo melhores efeitos terapêuticos, com menores doses e efeitos adversos (LIU; CHAN; HO, 2008; ZHU *et al.*, 2019). Assim, mesmo que preliminares, os resultados obtidos neste trabalho servirão para embasar os delineamentos experimentais dos estudos *in vivo* que ainda serão realizados.

## 6. CONCLUSÕES

- Nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas brancas e contendo ATRA foram desenvolvidas usando as técnicas de emulsificação espontânea e deposição interfacial do polímero pré-formado, respectivamente. A caracterização das nanoemulsões e nanocápsulas brancas e contendo ATRA evidenciou a obtenção de suspensões coloidais monodispersas de tamanho nanométrico e potencial zeta negativo. Fatores como concentração de óleo e tipo e concentração de surfactante afetaram o tamanho das gotículas das nanoemulsões. Tanto o emprego do Eudragit® S100 quanto do acetato ftalato de celulose conduziram à obtenção de nanocápsulas.
- O método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvido para quantificação do ATRA nas formulações mostrou ser específico, linear, preciso, exato e robusto, permitindo a determinação do teor e da eficiência de encapsulação. A eficiência de encapsulação do ATRA foi próxima de 100%, indicando que o fármaco se encontra preferencialmente associado às partículas. O teor de ATRA nas formulações mostrou ser satisfatório, com vistas à obtenção de uma dose adequada para administração oral deste fármaco.
- Estudos de estabilidade acelerada foram realizados, utilizando o LUMiSizer®, e a estabilidade de curto prazo foi avaliada armazenando as formulações a temperatura ambiente e sob refrigeração durante 60 dias. As formulações demonstraram alta estabilidade em ambos os testes, com redução do potencial zeta após armazenamento prolongado. Houve redução do teor do ATRA após armazenamento, nas duas temperaturas avaliadas, relacionada a alta instabilidade do fármaco.
- Estudos de liberação em meios gástrico e intestinal simulados foram realizados usando o método do saco de diálise. Os perfis de liberação mostraram um baixo percentual do ATRA liberado após 24 h (< 10%), tanto para o ATRA livre como encapsulado. Ao usar o método SS (*sample and separate*), uma maior liberação

do ATRA foi verificada para a nanoemulsão após 6 h de incubação, mostrando a maior capacidade deste sistema em liberar o fármaco.

- A atividade citotóxica do ATRA livre e nanoencapsulado foi realizada utilizando cultura de células de melanoma B16F10, através do ensaio de redução do MTT. Os resultados demonstraram redução significativa da viabilidade celular do fármaco nanoencapsulado em comparação com o fármaco livre, indicando que os nanocarreadores são capazes de proteger o fármaco da degradação e torná-lo mais disponível para exercer sua ação antitumoral.
- A atividade citotóxica dos nanocarreadores contendo ATRA em combinação com a cisplatina foi realizada em cultura de células de melanoma B16F10 e demonstrou que o efeito sinérgico está diretamente relacionado a concentração de ATRA e ao tipo de nanocarreador.
- Estudos preliminares de atividade antitumoral *in vivo* do ATRA livre e nanoencapsulado foram realizados, em modelo de melanoma murinho B16F10, após administração oral, em camundongos C57BL/6. Não foram observados efeitos antiproliferativos nas condições avaliadas, necessitando de aprimoramento do ensaio para se obter os efeitos de redução do volume tumoral desejados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHADIAN, S. *et al.* Micro and nanoscale technologies in oral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 157, n. January, p. 37–62, 2020.
- ALIZADEH, F. *et al.* Retinoids and their biological effects against cancer. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 43–49, 2014.
- ALQAHTANI, M. S. *et al.* Advances in Oral Drug Delivery. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 12, n. February, 2021.
- AMATYA, S. *et al.* Drug release testing methods of polymeric particulate drug formulations. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 259–266, 2013.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. About Melanoma Skin Cancer. **American Cancer Society**, [S. l.], p. 1–13, 2016.
- AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. **AJCC Cancer Staging Manual**. 17. ed. Chicago, USA: Springer, 2015.
- ANTON, N.; BENOIT, J.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 128, n. 3, p. 185–199, 2008.
- ASWATHANARAYAN, J. B.; VITTAL, R. R. Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, [S. l.], v. 3, n. November, p. 1–21, 2019.
- BALE, S. *et al.* Overview on Therapeutic Applications of Microparticulate Drug Delivery Systems. **Therapeutic Drug Carrier Systems**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 309–361, 2016.
- BARBOSA, J. A. C. *et al.* Using zeta potential to study the ionisation behaviour of polymers employed in modified-release dosage forms and estimating their pKa. **International Journal of Pharmaceutics: X**, [S. l.], v. 1, p. 100024, 2019.
- BARUA, A. B.; FURR, H. C. Properties of retinoids: Structure, Handling, and Preparation. **Molecular Biotechnology**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 167–182, 1998.
- BERLIN GRACE, V. M. M.; REJI, R. M.; SUNDARAM, V. Enhanced expression of tumour suppressor RAR- $\beta$  by DSPC nano-formulated lipo-ATRA in the lung of B16F10 cell-implanted C57BL6 mice and in A549 cells. **Life Sciences**, [S. l.], v. 184, p. 10–17, 2017.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 235, p. 337–351, 2016.
- BONALUMI, A.; CAMPOS, E.; LEAL, F. **Oncologia Cutanea**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2017.

BOUCHEMAL, K. *et al.* Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 280, p. 241–251, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. **PORTARIA Nº 705, DE 12 DE AGOSTO DE 2014. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas da Leucemia Mieloide Aguda do Adulto**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. **RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Brasília: Ministério da Saúde - MS, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2017.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA CANCER J CLIN**, [S. l.], v. 68, p. 394–424, 2018.

BRODUSCH, N. *et al.* Scanning Electron Microscopy versus Transmission Electron Microscopy for Material Characterization: A Comparative Study on High-Strength Steels. **Scanning**, [S. l.], v. 2021, p. 1–19, 2021.

BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 13ª ed. [S. l.]: Artmed Editora, 2018.

BRUXEL, F. *et al.* Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, [S. l.], v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

CARRIER, R. L. *et al.* Predicting the effect of fed-state intestinal contents on drug dissolution. **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 27, n. 12, p. 2646–2656, 2010.

CHAKRABORTY, S. *et al.* Lipid – An emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 1–15, 2009.

CHANDA, M.; COHEN, M. S. Advances in the discovery and development of melanoma drug therapies. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 1319–1347, 2021.

CHARIOU, P. L.; ORTEGA-RIVERA, O. A.; STEINMETZ, N. F. Nanocarriers for the Delivery of Medical, Veterinary, and Agricultural Active Ingredients. **ACS Nano**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 2678–2701, 2020.

CHEN, M.-C. *et al.* Retinoic acid and cancer treatment. **BioMedicine**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 1–6, 2014.

CHEN, S. *et al.* Eudragit S100-Coated Chitosan Nanoparticles Co-loading Tat for Enhanced Oral Colon Absorption of Insulin. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 1277–1287, 2017.

CHEN, Z. *et al.* Enhanced dissolution, stability and physicochemical characterization of ATRA/2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex pellets prepared by fluid-bed coating technique. **Pharmaceutical Development and Technology**, [S. l.], v. 18, n. December 2011, p. 130–136, 2013.

CHENG, L. K. *et al.* Gastrointestinal system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 65–79, 2010.

CHOU, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. **Cancer Research**, [S. l.], v. 70, n. 2, p. 440–446, 2010.

CHOU, T. C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, [S. l.], v. 22, n. C, p. 27–55, 1984.

CIAPPELLANO, S. G. *et al.* In vitro toxicity assessment of oral nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 106, p. 381–401, 2016.

CICCONI, L.; LO-COCO, F. Current management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 27, n. 8, p. 1474–1481, 2016.

CLEMENS, G. *et al.* Design and biological evaluation of synthetic retinoids: probing length vs. stability vs. activity. **Molecular BioSystems**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 3124, 2013.

COELHO, S. M. *et al.* Ácido Retinóico: Uma Terapia Promissora Para Carcinoma Tireoideano Desdiferenciado? **Arq Bras Endocrinol Metab**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 190–197, 2003.

CORRÊA, F. de M. *et al.* Terapia-alvo versus dacarbazina no tratamento de primeira linha do melanoma avançado não cirúrgico e metastático: análise de impacto orçamentário na perspectiva do Sistema Único de Saúde, 2018-2020. **Epidemiol. Serv. Saude**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 1–12, 2019.

COSTA, L. M. M. *et al.* Characteristics of Brazilian melanomas: real-world results before and after the introduction of new therapies. **BMC Research Notes**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 296, 2019.

CRECENTE-CAMPO, J.; ALONSO, M. J. Engineering, on-demand manufacturing, and scaling-up of polymeric nanocapsules. **Bioengineering & Translational Medicine**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 38–50, 2019.

CZUBA, L. C. *et al.* Analysis of vitamin A and retinoids in biological matrices. *In: Methods in Enzymology*. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2020. v. 637p. 309–340.

DANCIU, C. *et al.* Behaviour of four different B16 murine melanoma cell sublines: C57BL/6J skin. **International Journal of Experimental Pathology**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 73–80, 2015.

DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 740, p. 364–378, 2014.

DAVID, K. A. *et al.* Phase I trial of ATRA-IV and depakote in patients with advanced solid tumor malignancies. **Cancer Biology and Therapy**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 678–684, 2010.

DEGOBERT, G.; AYDIN, D. Lyophilization of Nanocapsules: Instability Sources, Formulation and Process Parameters. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 13, n. 8, p. 1112, 2021.

DENG, S. *et al.* Polymeric Nanocapsules as Nanotechnological Alternative for Drug Delivery System: Current Status, Challenges and Opportunities. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 10, p. 847, 2020.

DINIZ, D. G. A.; LIMA, E. M.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Isotretinoína: perfis farmacológico, farmacocinético e analítico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S. l.], v. 38, n. 4, p. 415–430, 2002.

DOMINGUES, B. *et al.* Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy Open**, [S. l.], v. 7, p. 35–49, 2018.

DORA, C. L. *et al.* Oral Delivery of a High Quercetin Payload Nanosized Emulsion: *In Vitro* and *In Vivo* Activity Against B16-F10 Melanoma. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 1275–1281, 2016.

ESPINOSA, S.; BOSCH, E.; ROSÉS, M. Retention of Ionizable Compounds on HPLC. 5. pH Scales and the Retention of Acids and Bases with Acetonitrile - Water Mobile Phases. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 72, n. 21, p. 5193–5200, 2000.

FERREIRA, C. D.; NUNES, I. L. Oil nanoencapsulation: development, application, and incorporation into the food market. **Nanoscale Research Letters**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 9, 2019.

FERREIRA, R. *et al.* Advances and challenges in retinoid delivery systems in regenerative and therapeutic medicine. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 4265, 2020.

FESSI, H. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 55, p. 4, 1989.

FRANK, L. A. *et al.* Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 623–639, 2015.

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 7, p. 5577–5591, 2012.

GATTI, R.; GIOIA, M. G.; CAVRINI, V. Analysis and stability study of retinoids in pharmaceuticals by LC with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 147–159, 2000.

GERSHENWALD, J. E. *et al.* Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 67, n. 6, p. 472–492, 2017.

GHADI, R.; DAND, N. BCS class IV drugs: Highly notorious candidates for formulation development. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 248, p. 71–95, 2017.

GHOSH, S.; GHOSH, S.; SIL, P. C. Role of nanostructures in improvising oral medicine. **Toxicology Reports**, [S. l.], v. 6, n. February, p. 358–368, 2019.

GILLIS, J.; GOA, K. L. Tretinoin. A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Use in the Management of Acute Promyelocytic Leukaemia. **Drugs**, [S. l.], v. 50, n. 5, p. 897–923, 1995.

GIULI, M. V. *et al.* Current Trends in ATRA Delivery for Cancer Therapy. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 8, p. 707, 2020.

GUI, K. *et al.* Lipid-polymer nanoparticles with CD133 aptamers for targeted delivery of all-trans retinoic acid to osteosarcoma initiating cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 111, n. June 2018, p. 751–764, 2019.

GUPTA, A. *et al.* Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, [S. l.], v. 12, p. 2826–2841, 2016.

GUPTA, R.; CHEN, Y.; XIE, H. In vitro dissolution considerations associated with nano drug delivery systems. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 1–34, 2021.

HACKMAN, G. L. *et al.* Predicting and quantifying antagonistic effects of natural compounds given with chemotherapeutic agents: Applications for high-throughput screening. **Cancers**, [S. l.], v. 12, n. 12, p. 1–20, 2020.

HAIDER, M. *et al.* Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics : A Review. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 288, p. 1–26, 2020.

HAN, L. *et al.* Redox-sensitive micelles for targeted intracellular delivery and combination chemotherapy of paclitaxel and all-trans-retinoid acid. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 531–542, 2019.

HARWANSH, R. K.; DESHMUKH, R.; RAHMAN, A. Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S. l.], v. 51, n. March, p. 224–233, 2019.

HONG, W. *et al.* Pluronic-based nano-self-assemblies of bacitracin A with a new mechanism of action for an efficient in vivo therapeutic effect against bacterial peritonitis. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 66, 2018.

HU, Q. *et al.* Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 98, n. 3, p. 19–34, 2016.

HUA, S. Advances in Oral Drug Delivery for Regional Targeting in the Gastrointestinal Tract - Influence of Physiological, Pathophysiological and Pharmaceutical Factors. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 11, n. April, p. 1–22, 2020.

INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019.

INDRAYANTO, G. Validation of Chromatographic Methods of Analysis: Application for Drugs That Derived From Herbs. *In: Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2018. v. 43p. 359–392.

IYISAN, B.; LANDFESTER, K. Modular Approach for the Design of Smart Polymeric Nanocapsules. **Macromol. Rapid Commun**, [S. l.], v. 1800577, p. 1–25, 2019.

JAIN, A. K.; THAREJA, S. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, [S. l.], v. 47, n. 1, p. 524–539, 2019.

JYOTHI, N. V. N. *et al.* Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 187–197, 2010.

KALE, S. N.; DEORE, S. L. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 39–47, 2016.

KALEPU, S.; MANTHINA, M.; PADAVALA, V. Oral lipid-based drug delivery systems – an overview. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S. l.], v. 3, n. 6, p. 361–372, 2013.

KARAMANIDOU, T. *et al.* Lipid-based nanocarriers for the oral administration of biopharmaceutics. **Nanomedicine**, [S. l.], v. 11, n. 22, p. 3009–3032, 2016.

KEWITZ, S. *et al.* Impact of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation and MGMT expression on dacarbazine resistance of Hodgkin's lymphoma cells. **Leukemia Research**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 138–143, 2014.

KHAN, S. *et al.* Tacrolimus-loaded nanostructured lipid carriers for oral delivery-in vivo bioavailability enhancement. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 109, p. 149–157, 2016.

KIM, Y. *et al.* Recent Progress in Drug Release Testing Methods of Biopolymeric Particulate System. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 13, n. 8, p. 1313, 2021.

- KOZIOLEK, M.; CARRIÈRE, F.; PORTER, C. J. H. Lipids in the Stomach – Implications for the Evaluation of Food Effects on Oral Drug Absorption. **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 55, 2018.
- KUZU, O. F. *et al.* Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research. **Cancer Growth and Metastasis**, [S. l.], v. 8s1, p. CGM.S21214, 2015.
- LASOŃ, E.; SIKORA, E.; OGONOWSKI, J. Influence of process parameters on properties of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) formulation. **Acta Biochimica Polonica**, [S. l.], v. 60, n. 4, p. 773–777, 2013.
- LEONARDI, G. C. *et al.* Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 52, p. 1071–1080, 2018.
- LI, C.; HAN, X. Co-delivery of Dacarbazine and All-Trans Retinoic Acid (ATRA) Using Lipid Nanoformulations for Synergistic Antitumor Efficacy Against Malignant Melanoma. **Nanoscale Research Letters**, [S. l.], v. 15, n. 1, 2020.
- LI, N. *et al.* All-trans retinoic acid suppresses the angiopoietin-Tie2 pathway and inhibits angiogenesis and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. e0174555, 2017.
- LIANG, Z.; LI, J.; ZHU, B. Lung Cancer Combination Treatment: Evaluation of the Synergistic Effect of Cisplatin Prodrug, Vinorelbine and Retinoic Acid When Co-Encapsulated in a Multi-Layered Nano-Platform. **Drug Design, Development and Therapy**, [S. l.], v. Volume 14, p. 4519–4531, 2020.
- LIM, S.-J.; LEE, M.-K.; KIM, C.-K. Altered chemical and biological activities of all-trans retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticle powders. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 100, n. 1, p. 53–61, 2004.
- LIN, H.-S. *et al.* Kinetic Study of a 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Based Formulation of all-trans-Retinoic Acid in Sprague-Dawley. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 89, n. 2, p. 260–267, 2000.
- LIU, X.; CHAN, S. Y.; HO, P. C.-L. Comparison of the in vitro and in vivo effects of retinoids either alone or in combination with cisplatin and 5-fluorouracil on tumor development and metastasis of melanoma. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [S. l.], v. 63, n. 1, p. 167–174, 2008.
- LOPES, A. C. **Diagnostico e tratamento, Volume 2**. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2006.
- LUNDQUIST, P.; ARTURSSON, P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 106, p. 256–276, 2016.
- MACIEJEWSKI, B. *et al.* Gastroresistant gelatin films prepared by addition of cellulose acetate phthalate. **Pharmazie**, [S. l.], v. 72, p. 324–328, 2017.

MACIEJEWSKI, B.; SZNITOWSKA, M. Gelatin Films Modified with Acidic and Polyelectrolyte Polymers—Material Selection for Soft Gastroresistant Capsules. **Polymers**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 338, 2019.

MARKOPOULOS, C. *et al.* In-vitro simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: Choosing the appropriate test media. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 93, p. 173–182, 2015.

MARTIN, B. *et al.* Chemical stability of adapalene and tretinoin when combined with benzoyl peroxide in presence and in absence of visible light and ultraviolet radiation. **British Journal of Dermatology, Supplement**, [S. l.], v. 139, n. 52, p. 8–11, 1998.

MAYER, C. Nanocapsules as drug delivery systems. **The International Journal of Artificial Organs**, [S. l.], v. 28, n. 11, p. 1163–1171, 2005.

MCCLEMENTS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Standardization of Nanoparticle Characterization: Methods for Testing Properties, Stability, and Functionality of Edible Nanoparticles. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 56, n. 8, p. 1334–1362, 2016.

MEHRNIA, M.-A. *et al.* Crocin loaded nano-emulsions: Factors affecting emulsion properties in spontaneous emulsification. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 84, p. 261–267, 2016.

MISHRA, D. K.; SHANDILYA, R.; MISHRA, P. K. Lipid based nanocarriers: a translational perspective. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 7, p. 2023–2050, 2018.

MIYAZAWA, T. *et al.* A critical review of the use of surfactant-coated nanoparticles in nanomedicine and food nanotechnology. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 16, p. 3937–3999, 2021.

MODENA, M. M. *et al.* Nanoparticle Characterization: What to Measure? **Advanced Materials**, [S. l.], v. 31, p. 1901556, 2019.

MOHAMMADZADEH, Z. *et al.* The impact of ICAM-1, CCL2 and TGM2 gene polymorphisms on differentiation syndrome in acute promyelocytic leukemia. **BMC Cancer**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 1–7, 2021.

MOOSAVI, M. A.; DJAVAHARI-MERGNY, M. Autophagy: New Insights into Mechanisms of Action and Resistance of Treatment in Acute Promyelocytic leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 14, p. 3559, 2019.

MORA-HUERTAS, C. E. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 2010.

MOSS, D. M. *et al.* The biological challenges and pharmacological opportunities of orally administered nanomedicine delivery. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 223–236, 2018.

MUINDI, J. R. *et al.* Pharmacokinetics and Metabolism of All- trans -and 13- cis - Retinoic Acid in Pulmonary Emphysema Patients. **The Journal of Clinical Pharmacology**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 96–107, 2008.

MUSUMECI, T.; PIGNATELLO, R. **Biomaterials - Physics and Chemistry**. New editio ed. [S. l.]: IntechOpen, 2018.

NABI, B. *et al.* Insights on Oral Drug Delivery of Lipid Nanocarriers: a Win-Win Solution for Augmenting Bioavailability of Antiretroviral Drugs. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 60, 2019.

NANJWADE, B. K. *et al.* Functions of lipids for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Scientia Pharmaceutica**, [S. l.], v. 79, n. 4, p. 705–727, 2011.

NARVEKAR, M. *et al.* A new nanostructured carrier design including oil to enhance the pharmaceutical properties of retinoid therapy and its therapeutic effects on chemo-resistant ovarian cancer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 226–237, 2014.

NASTITI, C. *et al.* Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 37, 2017.

NATARAJAN, P.; TOMICH, J. M. **Understanding the influence of experimental factors on bio-interactions of nanoparticles: Towards improving correlation between in vitro and in vivo studies**. [S. l.: s. n.]

NEFEDOVA, Y. *et al.* Mechanism of All-Trans Retinoic Acid Effect on Tumor-Associated. **Cancer Research In**, [S. l.], v. 67, n. 22, p. 11021–11029, 2007.

NEILA, J.; SOYER, H. P. Key points in dermoscopy for diagnosis of melanomas, including difficult to diagnose melanomas, on the trunk and extremities. **The Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 3–9, 2011.

NGUYEN, T.-T.-L.; DUONG, V.-A.; MAENG, H.-J. Pharmaceutical Formulations with P-Glycoprotein Inhibitory Effect as Promising Approaches for Enhancing Oral Drug Absorption and Bioavailability. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 13, n. 7, p. 1103, 2021.

NIU, Z. *et al.* Lipid-based nanocarriers for oral peptide delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 106, p. 337–354, 2016.

OGUNNIYI, D. Castor oil: A vital industrial raw material. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 97, n. 9, p. 1086–1091, 2006.

ORTHABER, K. *et al.* Skin Cancer and Its Treatment: Novel Treatment Approaches with Emphasis on Nanotechnology. **Journal of Nanomaterials**, [S. l.], v. 2017, p. 20, 2017.

OZPOLAT, B. *et al.* Pharmacokinetics of intravenously administered liposomal all-trans -retinoic acid ( atra ) and orally administered atra in healthy volunteers . **J Pharm Pharmaceut Sci**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 292–301, 2003.

PATEL, V. R. *et al.* Castor Oil: Properties, Uses, and Optimization of Processing Parameters in Commercial Production. **Lipid Insights**, [S. l.], v. 9, p. 1–12, 2016.

PATRA, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 71, 2018.

PAVRI, S. N. *et al.* Malignant Melanoma: Beyond the Basics. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [S. l.], v. 138, n. 2, p. 330e-340e, 2016.

PDQ ADULT TREATMENT EDITORIAL BOARD. **PDQ Melanoma Treatment. Patient Version**. Bethesda, MD: National Cancer Institute (US), 2019.

PERRIER, J. *et al.* Statistical investigation of the full concentration range of fasted and fed simulated intestinal fluid on the equilibrium solubility of oral drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 111, n. October 2017, p. 247–256, 2018.

PLAZA-OLIVER, M.; SANTANDER-ORTEGA, M. J.; LOZANO, M. V. Current approaches in lipid-based nanocarriers for oral drug delivery. **Drug Delivery and Translational Research**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 471–497, 2021.

PORTER, C. J. H.; TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W. N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 231–248, 2007.

POTTEZ, M. *et al.* Characterization of a B16-F10 melanoma model locally implanted into the ear pinnae of C57BL/6 mice. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 1–19, 2018.

POUTON, C. W.; PORTER, C. J. H. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 60, n. 6, p. 625–637, 2008.

PRABHAKAR, K. *et al.* Tween 80 containing lipid nanoemulsions for delivery of indinavir to brain. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 345–353, 2013.

RANI, S. *et al.* Self-Emulsifying Oral Lipid Drug Delivery Systems: Advances and Challenges. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 129, 2019.

RASTRELLI, M. *et al.* Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. **in Vivo**, [S. l.], v. 28, p. 1005–1012, 2014.

REGAZZI, M. B. *et al.* Clinical Pharmacokinetics of Tretinoin. **Clin. Pharmacokinet.**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 382–402, 1997.

RENGER, B.; VÉGH, Z.; FERENCZI-FODOR, K. Validation of thin layer and high performance thin layer chromatographic methods. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1218, n. 19, p. 2712–2721, 2011.

RICHARDS, R. *et al.* Drug antagonism and single-agent dominance result from differences in death kinetics. **Nature Chemical Biology**, [S. l.], v. 16, n. 7, p. 791–800, 2020.

ROCHE. **Vesanoid® (tretinoína) Cápsulas 10 mg**. Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A: [s. n.], 2015.

ROELL, K. R.; REIF, D. M.; MOTSINGER-REIF, A. A. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy-perspectives from across disciplines. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 8, n. APR, p. 1–11, 2017.

SAADEDIN, A. *et al.* Pharmacokinetics of the Time-Dependent Elimination of All-Trans-Retinoic Acid in Rats. **AAPS PharmSci**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–9, 2004.

SAFAYA, M.; ROTLIWALA, Y. C. Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods , characterization, applications and optimization technique. **Materials Today: Proceedings**, [S. l.], v. 27, p. 454–459, 2020.

SALMANI, J. *et al.* Aqueous Solubility and Degradation Kinetics of the Phytochemical Anticancer Thymoquinone; Probing the Effects of Solvents, pH and Light. **Molecules**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 5925–5939, 2014.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCHULTZE, E. *et al.* Synergistic and additive effects of ATRA in combination with different anti-tumor compounds. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 285, n. January, p. 69–75, 2018.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 987, p. 57–66, 2003.

SHEN, J.; BURGESS, D. J. In vitro dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: Recent developments and challenges. **Drug Delivery and Translational Research**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 409–415, 2013.

SHI, W. N. *et al.* Overexpression of SphK2 contributes to ATRA resistance in colon cancer through rapid degradation of cytoplasmic RXR $\alpha$  by K48/K63-linked polyubiquitination. **Oncotarget**, [S. l.], v. 8, n. 24, p. 39605–39617, 2017.

SIDDIKUZZAMAN; GRACE, V. M. B. Anti-Metastatic Study of Liposome-Encapsulated All trans Retinoic Acid (ATRA) in B16F10 Melanoma Cells-Implanted C57BL/6 Mice. **Cancer Investigation**, [S. l.], v. 32, n. 10, p. 507–517, 2014.

SIDDIKUZZAMAN; GURUVAYOORAPPAN, C.; BERLIN GRACE, V. M. All Trans Retinoic Acid and Cancer. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 241–249, 2011.

SILVA, E. L. *et al.* Improved In Vitro Antileukemic Activity of All-Trans Retinoic Acid Loaded in Cholesteryl Butyrate Solid Lipid Nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 1291–1300, 2016.

SOARES, S. *et al.* Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. **Frontiers in Chemistry**, [S. l.], v. 6, n. August, p. 1–15, 2018.

SOBISCH, T.; LERCHE, D. Thickener performance traced by multisample analytical centrifugation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 331, n. 1–2, p. 114–118, 2008.

STAHL, M.; TALLMAN, M. S. Differentiation syndrome in acute promyelocytic leukaemia. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 187, n. 2, p. 157–162, 2019.

SU, S.; KANG, P. M. Recent advances in nanocarrier-assisted therapeutics delivery systems. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 1–27, 2020.

SUBONGKOT, T.; NGAWHIRUNPAT, T. Development of a novel microemulsion for oral absorption enhancement of all-trans retinoic acid. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 12, p. 5585–5599, 2017.

SZE, A. *et al.* Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 261, n. 2, p. 402–410, 2003.

SZYMAŃSKI, Ł. *et al.* Retinoic Acid and Its Derivatives in Skin. **Cells**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 2660, 2020.

TADROS, T. *et al.* Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 108–109, p. 303–318, 2004.

TAHERI, M. L. *et al.* Current status and future directions for in situ transmission electron microscopy. **Ultramicroscopy**, [S. l.], v. 170, n. Bâtiment MXC, p. 86–95, 2016.

TALEGAONKAR, S.; BHATTACHARYYA, A. Potential of Lipid Nanoparticles (SLNs and NLCs) in Enhancing Oral Bioavailability of Drugs with Poor Intestinal Permeability. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, [S. l.], v. 20, n. 121, p. 1–15, 2019.

TOBIN, R. P. *et al.* Targeting myeloid-derived suppressor cells using all-trans retinoic acid in melanoma patients treated with Ipilimumab. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 63, n. April, p. 282–291, 2018.

VEGA-VÁSQUEZ, P.; MOSIER, N. S.; IRUDAYARAJ, J. Nanoscale Drug Delivery Systems: From Medicine to Agriculture. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 8, n. February, p. 1–16, 2020.

VIDAL-ROMERO, G. *et al.* Design and Evaluation of pH-Dependent Nanosystems Based on Cellulose Acetate Phthalate, Nanoparticles Loaded with Chlorhexidine for Periodontal Treatment. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 604, 2019.

VISHWAKARMA, N. *et al.* Lipid-Based Nanocarriers for Lymphatic Transportation. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 83, 2019.

VISWANATHAN, S.; BERLIN GRACE, V. M. Reduced RAR- $\beta$  gene expression in Benzo(a)Pyrene induced lung cancer mice is upregulated by DOTAP lipo-ATRA treatment. **Gene**, [S. l.], v. 668, p. 18–26, 2018.

VITHANI, K. *et al.* Colloidal aspects of dispersion and digestion of self-dispersing lipid-based formulations for poorly water-soluble drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 142, p. 16–34, 2019.

VRETTOS, N.-N.; ROBERTS, C. J.; ZHU, Z. Gastroretentive Technologies in Tandem with Controlled-Release Strategies: A Potent Answer to Oral Drug Bioavailability and Patient Compliance Implications. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 1591, 2021.

WARD, W. H.; FARMA, J. M. **Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy**. 1. ed. Brisbane, Australia: Codon Publications, 2017.

WU, Z.-L.; ZHAO, J.; XU, R. Recent Advances in Oral Nano-Antibiotics for Bacterial Infection Therapy. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. Volume 15, p. 9587–9610, 2020.

XU, Q. *et al.* Antisense oligonucleotides and all-trans retinoic acid have a synergistic anti-tumor effect on oral squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–9, 2008.

YANG, D. *et al.* A novel controlled release formulation of the Pin1 inhibitor ATRA to improve liver cancer therapy by simultaneously blocking multiple cancer pathways. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 269, n. November 2017, p. 405–422, 2018.

YIN, W. *et al.* Topical treatment of all- trans retinoic acid inhibits murine melanoma partly by promoting CD8+ T-cell immunity. **Immunology**, [S. l.], v. 152, n. 2, p. 287–297, 2017.

YU, C. *et al.* Combination of Immunotherapy With Targeted Therapy: Theory and Practice in Metastatic Melanoma. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 10, p. 19, 2019.

ZEMA, L. *et al.* Gastroresistant capsular device prepared by injection molding. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 440, n. 2, p. 264–272, 2013.

ZHANG, R. X. *et al.* Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy – Strategies and perspectives. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 240, n. 3, p. 489–503, 2016.

ZHOU, Z. *et al.* Influence of Physiological Gastrointestinal Surfactant Ratio on the Equilibrium Solubility of BCS Class II Drugs Investigated Using a Four Component Mixture Design. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 4132–4144, 2017.

ZHU, Y.-H. *et al.* Synergistic Effect of Retinoic Acid Polymeric Micelles and Prodrug for the Pharmacodynamic Evaluation of Tumor Suppression. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 10, n. MAY, p. 1–11, 2019.

ZIELIŃSKA, A. *et al.* Anti-inflammatory and anti-cancer activity of citral: Optimization of citral-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) using experimental factorial design and LUMiSizer®. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 553, n. 1–2, p. 428–440, 2018.

ZUCCARI, G. *et al.* D- $\alpha$ -tocopherol-based micelles for successful encapsulation of retinoic acid. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 14, n. 3, 2021.

## ANEXO A – CERTIFICADO CEUA



Universidade Federal  
de Santa Catarina

Comissão de Ética no  
Uso de Animais



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Desenvolvimento de nanocarreadores lipídicos contendo ácido all-trans retinoico para administração oral e avaliação da atividade antitumoral em modelo de melanoma murino B16F10", protocolada sob o CEUA nº 2372251018 (ID 001607), sob a responsabilidade de **Elenara Maria Teixeira Lemos Senna e equipe; Rafaela Costa e Silva; Daniel Fernandes; Alfeu Zanotto Filho; Jonathan Agnes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 11/05/2020.

We certify that the proposal "Development of lipid nanocarriers containing all -trans retinoic acid for oral administration and evaluation of the antitumor activity in B16F10 murine melanoma model", utilizing 133 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 2372251018 (ID 001607), under the responsibility of **Elenara Maria Teixeira Lemos Senna and team; Rafaela Costa e Silva; Daniel Fernandes; Alfeu Zanotto Filho; Jonathan Agnes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 05/11/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2020 a 02/2021** Área: **Ciências da Saúde**

Origem: **Biotério de Experimentação e Produção do Laboratório de Farmacologia Experimental**

Espécie: **Camundongos heterogênicos** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **8 a 10 semanas** N: **133**

Linhagem: **C57 / B16 UFSC** Peso: **18 a 25 g**

Local do experimento: Biotério setorial do MIP: manutenção Sala de cirurgia estereotáxica do Depto de farmacologia - 2 andar implantes tumorais Laboratório 204 do Depto de Farmacologia - armazenamento e processamento dos tecidos

Florianópolis, 11 de maio de 2020

  
Prof. Dr. Maurício Laterça Martins

Maurício Laterça Martins

Presidente pro tempore da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina



Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina