

CITOTOXICIDADE IN VITRO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS FUNCIONALIZADAS PARA ENCAPSULAÇÃO DO QUIMIOTERÁPICO PACLITAXEL

Palavras-chave: Câncer de mama, carreadores lipídicos nanoestruturados, canabidiol, *drug delivery*.

Autores(as):

Rayza C. Pereira da Costa (IB - UNICAMP); Gabriela Geronimo (IB - UNICAMP); Gustavo H. Rodrigues da Silva (LNBio - CNPEM); Fabíola V. de Carvalho (IB - UNICAMP); Eneida de Paula (IB - UNICAMP).

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Global Cancer Statistics, o câncer de mama (CM) é a segunda principal causa de morte em mulheres, com cerca de 2,3 milhões de novos casos (11,7%) no mundo, no ano de 2020 (Ferlay *et al.*, 2020). No Brasil, em 2022, 30,1% dos cânceres diagnosticados eram de mama (INCA, 2023). O tratamento do CM varia de acordo com o estágio da doença, área em que se encontra o tumor (ducto, lóbulo ou o tecido entre eles) o subtipo molecular e fatores como estado de saúde e idade do paciente (Winslow *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2020; Garcia-Oliveira *et al.*, 2021). O padrão atual para o tratamento de CM primário (não metastático) é a cirurgia, frequentemente seguida de terapia adjuvante (quimioterapia convencional, radioterapia, hormônio ou imunoterapia). Contudo, a elevada toxicidade associada as terapias adotadas e seus efeitos adversos são obstáculos potenciais à adesão ao tratamento e qualidade de vida do paciente (García-Pinel *et al.*, 2019). No contexto da quimioterapia, estratégias como o uso de sistemas de liberação sustentada de fármacos (DDS, *drug delivery systems*) podem ajudar a minimizar esses efeitos indesejáveis, quer seja pela liberação sustentada – evitando picos plasmáticos, quer seja pelo direcionamento do fármaco para as células tumorais (Costa; Silva, 2017). O Paclitaxel (PTX) é um quimioterápico de amplo espectro, aplicado no tratamento de diferentes subtipos de CM. Pertencente à classe dos taxanos, o PTX possui mecanismo de ação antimitótico, estabilizando os microtúbulos e prevenindo sua despolimerização, resultando na inibição da dinâmica normal de reorganização da rede de microtúbulos essencial para as funções celulares, levando à morte celular (Alqahtani *et al.*, 2019). O PTX tem baixa solubilidade aquosa (0,6 µM, Singla; Garg; Aggarwal, 2000), limitando sua aplicabilidade clínica e/ou requerendo o uso de excipientes não inertes na formulação comercial (Taxol®), que aumentam sua toxicidade (Surapaneni *et al.*, 2012; Marzo; Naval, 2013). Com isso, a encapsulação em DDS constitui uma boa estratégia para aumentar a absorção celular e otimizar a ação terapêutica do PTX (Marupudi *et al.*, 2007; Alqahtani *et al.*, 2019; Rodrigues da Silva *et al.*, 2021), diminuindo seus efeitos colaterais. Dentre os DDS constituídos por lipídios, os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC, *nanostuctured lipid carriers*) são nanopartículas cujo interior é formado por uma mistura de lipídios - sólido e líquido - estabilizados por surfactante (Keck; Specht; Brüssler, 2021). Os NLC são excelentes DDS para melhorar a biodisponibilidade, direcionamento e eficácia de antineoplásicos, bem como para diminuir sua toxicidade sistêmica, no tratamento de diferentes tipos de câncer (Rodrigues da Silva *et al.*, 2021). NLC podem ser preparados com excipientes funcionais que conferem suas propriedades terapêuticas intrínsecas às nanopartículas (Geronimo *et al.*, 2021). Neste projeto, utilizou-se como excipiente funcional das NLC o canabidiol (CBD), que tem sido estudado para tratamento de diversas condições e doenças como a dor crônica, inflamação e câncer (Matarazzo *et al.*, 2021; Valenti *et al.*, 2022). No entanto, a aplicabilidade clínica do CBD é dificultada pela baixa solubilidade aquosa (0,1 µg/mL), limitada biodisponibilidade (6%) e suscetibilidade à oxidação (Koch *et al.*, 2020; Rebelatto; Rauber; Caon, 2023). Assim, no presente projeto, desenvolveu-se uma formulação de nanopartículas lipídicas funcionalizadas com CBD para encapsulação do quimioterápico PTX a 0,6% como possível abordagem terapêutica para tratamento de câncer de mama. Cabe ressaltar que as concentrações dos excipientes utilizadas neste projeto de iniciação científica, foram baseadas em uma formulação preliminar, desenvolvida no laboratório de Biomembranas-IB/Unicamp, modificada com incorporação de α -tocoferol (5%) devido a suas propriedades antioxidantes (Dong; Guo; Gu, 2009).

2. METODOLOGIA

2.1 Metodologia analítica de quantificação dos ativos PTX e CBD e determinação da eficiência da encapsulação

A quantificação do teor de PTX e CBD nas NLC foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção simultânea no UV (Barbosa *et al.*, 2015), no equipamento Waters, Sistema Breeze QS (Waters Technol., MA, EUA), de acordo com estudo prévio em literatura (Analakkattillam *et al.*, 2021; Marcial *et al.*, 2017). A fase móvel utilizada foi acetonitrila: ácido acético 0,1% 70:30 (v/v) em coluna cromatográfica C18 5µM, 450 x 4,6 mm com tamanho de partícula de 5 µm. A quantificação também permitiu avaliar a eficiência de encapsulação (%EE), determinada por ultrafiltração-centrifugação (Müller *et al.*, 2002), usando-se filtros de celulose (10 kDa, Millipore). Para tanto, uma alíquota da formulação foi adicionada à unidade de filtração acoplada a tubos tipo Eppendorf, e centrifugada por cerca de 20 min. a 4100g. A quantidade dos ativos livres no filtrado foi quantificada por CLAE e a %EE dos ativos encapsulados foi calculada pela equação: $\%EE = (ATIVO_{total} - ATIVO_{livre} / ATIVO_{total})$

$x 100$, onde: $ATIVO_{total}$ corresponde à quantidade total de PTX ou CBD na suspensão de NLC e $ATIVO_{livre}$ corresponde ao PTX ou CBD quantificado no filtrado (não encapsulado) da ultrafiltração-centrifugação.

2.2 Preparo e Caracterização e Estabilidade físico-química das NLC

A formulação NLC-CBD-PTX foi preparada pelo método da emulsificação-ultrasonicação (Souto *et al.*, 2020). CBD (10%), α -tocoferol (5%) e PTX (0,06%) provenientes respectivamente da Prati-Donaduzzi (Toledo, PR, Brasil), Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA) e Cristália Prod. Quim. Farm. Ltda (Itapira, SP, Brasil), foram adicionados à fase oleosa, constituída de 10% de lipídio sólido sintético. A fase aquosa foi composta por solução de surfactante não iônico, a 8%.

A técnica de espalhamento de dinâmico de luz (DLS) foi usada para determinar o tamanho e índice de polidispersão (PDI) de tamanhos das partículas, no equipamento ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), diluindo-se 1000x a dispersão de nanopartículas em água desionizada, a 25°C (n=3). Os valores do potencial Zeta (mV) foram determinados pelo método de eletroforese de laser Doppler, utilizando o mesmo equipamento (ZetaSizer Nano ZS90), a 25°C. O número de partículas foi determinado no equipamento de rastreamento de partículas (NTA) NanoSight NS300 (NanoSight, Reino Unido) com software NTA 2.0 Analytical (NanoSight, Reino Unido), equipado com laser verde a 532 nm, após diluição da amostra (1:50000). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão. A estabilidade da formulação foi avaliada ao longo do tempo, por acompanhamento dos parâmetros: tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta, além da observação do aspecto físico da formulação, à temperatura ambiente (25°C), durante 7 meses. Outras análises, como a de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e de difração de Raio X (XRD), estão em andamento para melhor caracterizar a organização estrutural das nanopartículas.

2.3 Medidas de Microscopia Eletrônica de Transmissão

As nanopartículas foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2 Spirit BioTWIN (Lab. de Microscopia Eletrônica, Instituto de Biologia/Unicamp). Para a análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) as formulações de NLC, contendo ou não PTX (alíquotas diluídas 33x em água desionizada), foram adicionadas a uma grade de microscopia eletrônica (Cu, 300 mesh; Koch Ltda, SP). Após 2 min, foram adicionados 10 μ L de uma solução aquosa de acetato de uranila a 2% (p/p), para contraste negativo. Após 1 min, o excesso de volume foi removido e 10 μ L de água desionizada foi adicionada. A grade preparada permaneceu em repouso por 24 h, a 25°C, para secagem.

2.4 Ensaios de citotoxicidade

A citotoxicidade da formulação foi avaliada em linhagens celulares de câncer de mama murino 4T1 (ATCC® CRL-2539) e de fibroblasto murino NIH-3T3 (ATCC® CRL1658). As células foram cultivadas em meio DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco), suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e incubadas em estufa incubadora de CO₂ SCO5W (Shel Lab –EUA), à temperatura de 37 °C sob umidade atmosférica, contendo 95% ar e 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e a partir da subconfluência de mais de 70% do frasco, foram realizados subcultivos celulares, com auxílio de tripsina. Para os ensaios de citotoxicidade, foram utilizadas microplacas de 96 poços para o plaqueamento, com densidade celular de 4×10^4 /poço e incubadas em estufa a 37 °C, por 24 horas para ocorrer a aderência celular. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio contendo as amostras a serem testadas: canabidiol puro (CBD), PTX comercial (Taxol®), nanopartículas com CBD (NLC-CBD) e nanopartículas com CBD e PTX (NLC-CBD-PTX), em diluições seriadas, com concentrações que variaram de 22,7 nM a 23,2 μ M de PTX, de acordo com estudo prévio em literatura (Dang *et al.*, 2023), por um período de 24 h. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi removido, os poços lavados com PBS 5 mM e a viabilidade avaliada pelo método de redução de brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio (MTT), isto é: o sobrenadante foi substituído com sol. MTT (0,5 %), sendo a placa mantida sob ausência de luz por 3 horas a 37°C. Após esse período, a solução de MTT foi retirada e foi adicionado DMSO para solubilizar o formazan, produto da ação de desidrogenases das células viáveis (Mosmann, 1983). Por fim as placas foram agitadas por 10 min, e a absorbância do formazan correspondente a cada poço foi lida no leitor de placas de Elisa, em $\lambda = 570$ nm. Os resultados foram analisados pelo software Prism 9.3.0 (GraphPad Software, Inc. USA), aplicando-se como teste estatístico o teste T para verificar se houve diferenças significativas entre o efeito das formulações, sendo a significância considerada para $p < 0,05$. Ensaios em andamento, também visam avaliar o efeito da formulação em linhagem celular tumoral humana (MCF-7).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Quantificação dos ativos e Determinação da eficiência da encapsulação

Os ativos PTX e CBD foram quantificados por CLAE, de acordo com as especificações já descritas na seção de métodos (item 2.1). Nas condições cromatográficas estabelecidas houve separação eficiente dos picos dos ativos (Figura 1). As eluições ocorreram nos tempos de retenção de 4,6 min e $\lambda = 228$ nm para PTX (Fig. 1B) e tempo de 17,6 min e $\lambda = 214$ nm para CBD (Fig. 1C). A eficiência de encapsulação pelas nanopartículas foi alta (99%) para o PTX e CBD, o que reflete no caráter lipofílico de ambos os ativos (Surapaneni *et al.*, 2012; Koch *et al.*, 2020).

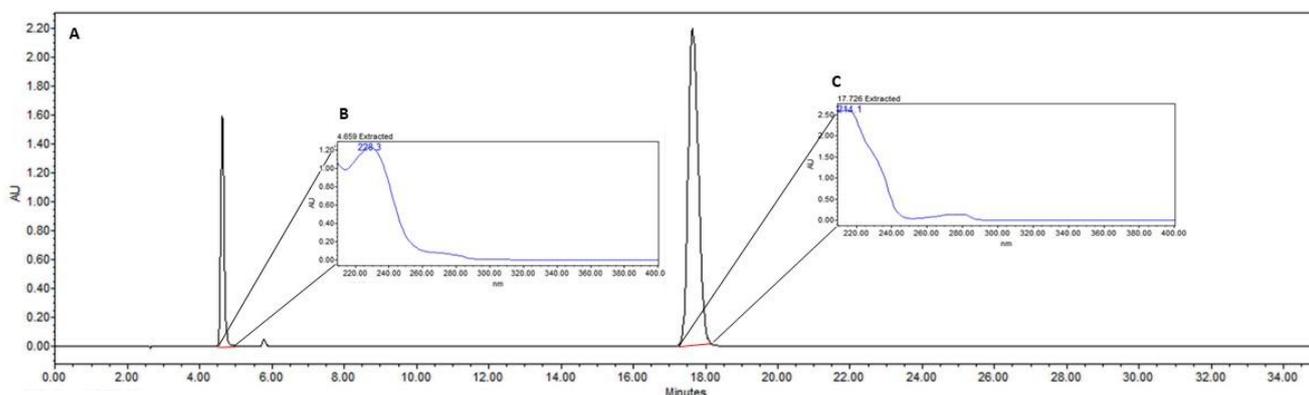


Figura 1. (A) Cromatograma de amostra de formulação NLC-CBD-PTX nos comprimidos mostrando eluição do PTX e CBD nos tempos de retenção de 4,6 min e 17,6 min, respectivamente; (B) Espectro de absorção UV-vis do PTX, com pico em 228 nm; (C) Espectro de absorção UV-vis do CBD, com pico em 214 nm.

3.2 Caracterização físico-química das formulações

As propriedades físico-químicas das nanopartículas (como tamanho, polidispersão, carga superficial) e as vias de administração são parâmetros que impactam na farmacocinética e biodisponibilidade no tumor (Cho *et al.*, 2008; Ernsting *et al.*, 2013; Danaei *et al.*, 2018). Na formulação desenvolvida (NLC-CBD-PTX), durante os 210 dias de análise da estabilidade, a formulação manteve sua aparência leitosa e homogênea. O tamanho médio das partículas permaneceu próximo a 220 nm, com valores de PDI menores que 0,2, caracterizando uma população monodispersa de tamanhos, desejável à aplicação clínica (Shimojo *et al.*, 2019; Suhaimi, 2015). O potencial Zeta (PZ), um parâmetro relacionado à carga superficial das partículas e correlacionado com a estabilidade de sistemas coloidais (Muller; Mader; Gohla, 2000) variou de -9,6 a -28,7 mV. Valores de PZ diferentes de zero são desejáveis para maior estabilidade de prateleira, já que a presença de cargas nas partículas favorece a repulsão eletrostática, evitando a agregação entre elas (Oliveira *et al.*, 2018). O número de partículas da formulação desenvolvida foi de $4,53 \times 10^{13}$ partículas/mL (NLC-CBD-PTX) e a do controle, sem PTX (NLC-CBD), foi de $6,5 \times 10^{13}$ partículas/mL. Os resultados de estabilidade da formulação armazenada a 25°C, em função do tempo (210 dias) são mostrados na Figura 2.

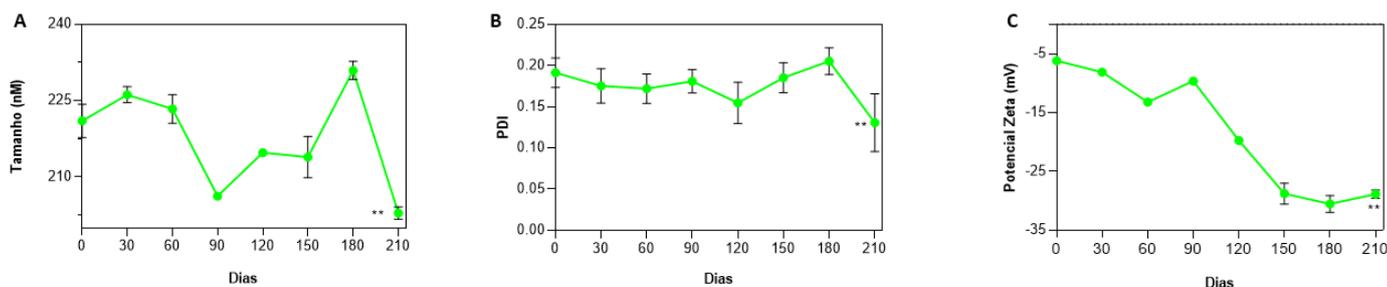


Figura 2. Dados de estabilidade da formulação NLC-CBD-PTX em relação ao tamanho (A), PDI (B) e Potencial Zeta (C), durante 210 dias de armazenamento a 25°C. A análise estatística foi realizada usando o teste T-Student pareado.

3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As análises de MET forneceram informações sobre o formato e o tamanho das nanopartículas lipídicas. Foram encontradas nas formulações sem e com PTX (Figura 3), partículas predominantemente esféricas e com superfícies suaves, características de carreadores lipídicos (Carvalho *et al.*, 2022). Cabe mencionar que a adição de PTX ao sistema não alterou a morfologia das nanopartículas (Figuras 3A). Os tamanhos das NLC foram medidos utilizando-se o software ImageJ®, e ambas as formulações apresentaram tamanhos próximos a 200 nm, confirmando as medidas de diâmetro feitas por DLS e NTA.

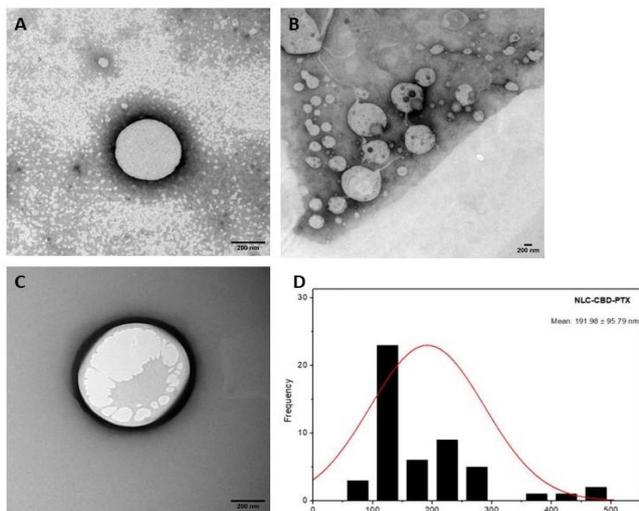


Figura 3. Micrografias eletrônicas de transmissão (TEM) das nanopartículas lipídicas da formulação com PTX (A, B) e sem PTX (C). Magnitudes: 6800x (B) e 30000x (A, C). Escala: 200 nm. Histograma da distribuição de frequência dos tamanhos da formulação NLC-CBD-PTX (D).

3.4 Ensaio de viabilidade celular

A nanotoxicidade tem despertado uma crescente preocupação, principalmente quando se visa uma aplicação clínica dos DDS nanométricos (Doktorovova; Souto; Silva, 2014). Em geral, para determinar a citotoxicidade, usa-se diversos métodos, sendo os ensaios baseados em tetrazólio (MTT) o mais comum, e que mede a atividade mitocondrial em células vivas (Doktorovova; Souto; Silva, 2014; Sarma *et al.*, 2021).

O efeito do NLC-CBD-PTX em células de carcinoma da mama murino (4T1-luciferase, ATCC CRL-2539TM) e fibroblastos normais (NIH-3T3, ATCC CRL-1658TM), é mostrado na Figura 4. Para todas as amostras testadas, a citotoxicidade foi dose-dependente. O CBD livre exibiu toxicidade em ambas as linhagens celulares (valores $IC_{50} = 0,009$ e $0,08\%$ para células tumorais e normais, respectivamente), enquanto que NLC-CBD (nanopartículas controle) apresentou toxicidade apenas em concentrações acima de 10^{10} partículas/mL ($IC_{50} = 6,1$ e $9,5 \times 10^{10}$ partículas/mL para células tumorais e normais respectivamente, correspondente a $0,009\%$ e $0,014\%$ de CBD para células tumorais e normais, respectivamente).

O antineoplásico PTX foi comparado com sua formulação comercial, o Taxol®. A formulação NLC-CBD-PTX demonstrou maior citotoxicidade que o medicamento de referência Taxol® para células tumorais ($IC_{50} = 0,34$ e $1,1 \mu\text{M}$ para NLC-CBD-PTX e Taxol®, respectivamente) do que para células normais ($IC_{50} = 6,3$ e $>25 \mu\text{M}$, respectivamente).

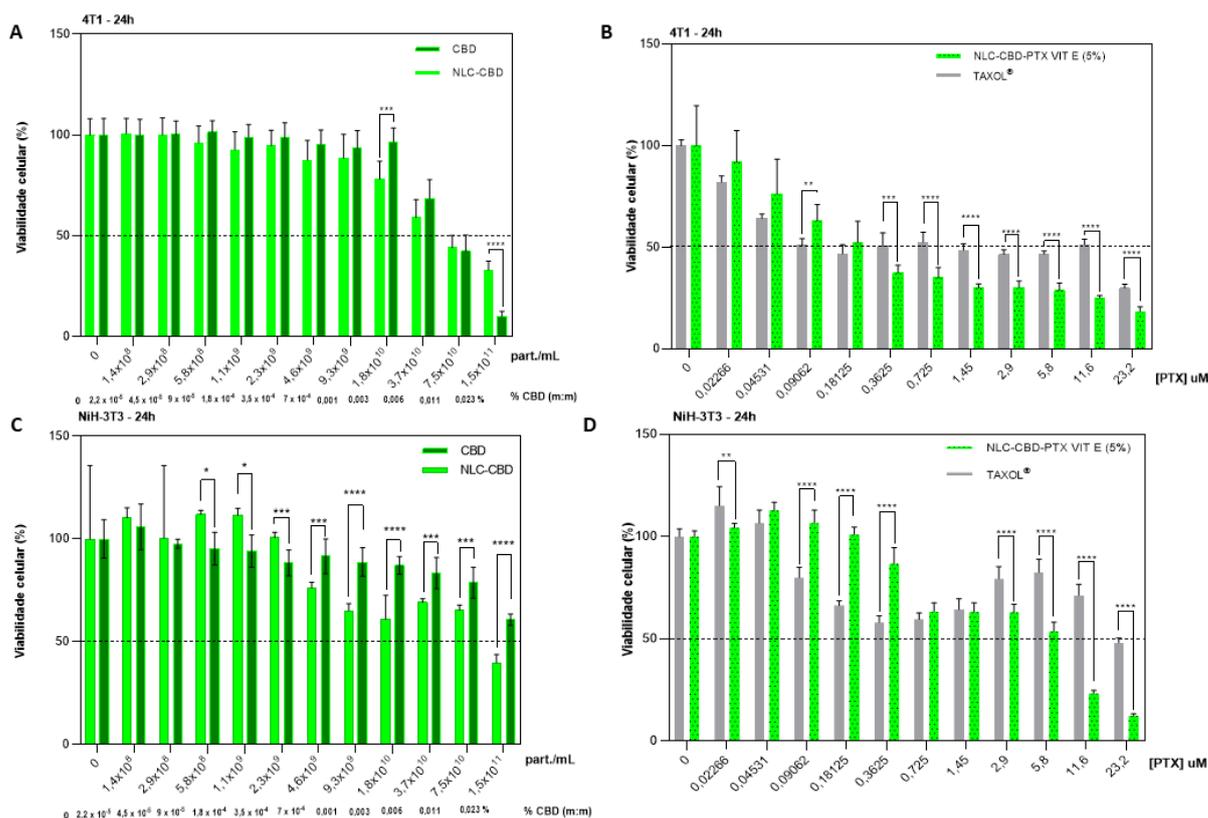


Figura 4. Viabilidade celular (pelo ensaio de MTT) em células de carcinoma mamário (4T1) tratadas com amostras controle: NLC-CBD e CBD (A) e amostras contendo paclitaxel: Taxol® e NLC-CBD-PTX (B); e em células normais (fibroblastos murino, NIH-3T3) tratadas com amostras controle: NLC-CBD e CBD (C) e amostras contendo paclitaxel: Taxol® e NLC-CBD-PTX (D), por 24 h. Resultados expressos como média \pm DP (n = 3). Análise estatística realizada por teste T-Student independente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4. Conclusão

Foi desenvolvida uma formulação farmacêutica de NLC contendo CBD e PTX (NLC-CBD-PTX) objetivando o tratamento do câncer de mama. As nanopartículas apresentaram tamanho médio na faixa de 220 nm, baixa polidispersão ($PDI < 0,2$), potencial elétrico de superfície negativo (-28,7 mV), concentração na ordem de 10^{13} partículas/mL, alta eficiência de encapsulação (99% para PTX e CBD), morfologia esférica (revelada por MET) e estabilidade de prateleira durante até 210 dias de armazenamento. O ensaio de viabilidade celular revelou que a formulação NLC-CBD-PTX causou maior citotoxicidade celular contra células tumorais 4T1 que o PTX comercial, enquanto o CBD não alterou a viabilidade celular, nas concentrações usadas. O possível efeito sinérgico entre o PTX e o CBD na diminuição da sobrevivência das células tumorais, em comparação com as células normais, ainda está sendo avaliado e também o será em células tumorais de mama de humanos. Esperamos encontrar resultados promissores para a nanoformulação desenvolvida, isto é, com potencial para melhorar a efetividade e a qualidade de vida dos doentes que necessitam de terapias agressivas para a remissão do tumor de mama.

5. Referências bibliográficas

- ANALAKKATTILLAM, S. et al. Comparative study of Dissolution for Cannabidiol in EU and US Hemp oil products by HPLC. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 110, n. 8, p. 3091-3098, 2021.
- ALQAHTANI, F. Y. et al. Paclitaxel. **Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology**, 44, 205-238, 2019.
- BARBOSA, M. V. et al. Comparative study of first-derivative spectrophotometry and high-performance liquid chromatography methods for quantification of paclitaxel in liposomal formulation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 1338-1343, 2015.
- CARVALHO, F. V. de et al. Docetaxel loaded in copaiba oil-nanostructured lipid carriers as a promising DDS for breast cancer treatment. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8838, 2022.
- COSTA, A. M.; SILVA, V. V. Estratégias nanotecnológicas para diagnóstico e tratamento do câncer. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 5, n. 2, p. 1-13, 2017.
- CHO, K. et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1310-1316, 2008.
- DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2018.
- DANG, W. et al. Subcellular Organelle-Targeted Nanostructured Lipid Carriers for the Treatment of Metastatic Breast Cancer. **International Journal of Nanomedicine**, p. 3047-3068, 2023.
- DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E. B.; SILVA, A. M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers- A systematic review of in vitro data. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.87, n. 1, p. 1-18, 2014.
- DONG, Y.; GUO, Y.; GU, X. Anticancer mechanisms of vitamin E succinate. **Chinese Journal of Cancer**, v. 28, n. 10, p. 1114-1118, 2009.
- ERNSTING, M. J. et al. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. **Journal of controlled release**, v. 172, n. 3, p. 782-794, 2013.
- FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes Dis.** 2018; 5 (2): 77-106, 2020.
- FERLAY, J. et al. Global cancer observatory: cancer today. **Lyon: International agency for research on cancer**, v. 20182020, 2020.
- GARCIA-OLIVEIRA, P. et al. Status and Challenges of Plant-Anticancer Compounds in Cancer Treatment. **Pharmaceutics**, 14:2 (2021): 157-84, 2021.
- GARCIA-PINEL, B. et al. Lipid-based nanoparticles: application and recent advances in cancer treatment. **Nanomaterials**, v. 9, n. 4, p. 638, 2019.
- GERONIMO, G. et al. Development of S 75: R 25 bupivacaine-loaded lipid nanoparticles functionalized with essential oils for treating melanoma. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 96, n. 8, p. 2197-2207, 2021.
- GUILHERME, A. et al. Improved efficacy of naproxen-loaded NLC for temporomandibular joint administration. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 11160-11170, 2019.
- HAIDER, M. et al. Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics: A Review. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 288-313, 2020.
- INCA. Instituto Nacional do Câncer. Tipos de Câncer: Câncer de Mama, Estatística. Disponível: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>. Acesso em: 07 Fev de 2024.
- KECK, C. M.; SPECHT, D.; BRÜBLER, J. Influence of lipid matrix composition on biopharmaceutical properties of lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 338, p. 149-163, 2021.
- KOCH, N. et al. Cannabidiol aqueous solubility enhancement: Comparison of three amorphous formulations strategies using different type of polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 589, p. 119812, 2020.
- MARCIAL, S. P.S.; CARNEIRO, G.; LEITE, E. A. Lipid-based nanoparticles as drug delivery system for paclitaxel in breast cancer treatment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 19, p. 1-11, 2017.
- MATARAZZO, Ananda Pulini et al. Mucoadhesive nanostructured lipid carriers as a cannabidiol nasal delivery system for the treatment of neuropathic pain. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 159, p. 105698, 2021.
- MILIAN, L. et al. Cannabinoid receptor expression in non-small cell lung cancer. Effectiveness of tetrahydrocannabinol and cannabidiol inhibiting cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in vitro. **PLoS one**, v. 15, n. 2, p. e0228909-e0228926, 2020.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MULLER, R. H; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.
- OLIVEIRA, J. D. et al. Sustained Release from Ionic-Gradient Liposomes Significantly Decreases ETIDOCAINE Cytotoxicity. **Pharmaceutical Research**, v. 29, p. 229-238, 2018.
- REBELATTO, E. R. L.; RAUBER, G. S.; CAON, T. An update of nano-based drug delivery systems for cannabinoids: Biopharmaceutical aspects & therapeutic applications. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 122727-122742, 2023.
- RODRIGUES DA SILVA, G. H. et al. Antineoplastics encapsulated in nanostructured lipid carriers. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 6929, 2021.
- SARMA, A. et al. Therapeutic nanostructures and nanotoxicity. **Journal of Applied Toxicology**, v. 41, n. 10, p. 1494-1517, 2021.
- SHIMOJO, A. A. M. et al. Evaluation of the Influence of Process Parameters on the Properties of Resveratrol-Loaded NLC Using 22 Full Factorial Design. **Antioxidants**, v. 8, n. 8, p. 272-284, 2019.
- SINGLA, A. K.; GARG, A.; AGGARWAL, D. Paclitaxel and its formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, n. 1-2, p. 179-192, 2002.
- SOUTO, E. B. et al. SLN and NLC for topical, dermal, and transdermal drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 17, n. 3, p. 357-377, 2020.
- SUHAIMI, S. H.; HASHAM, R.; ROSLI, N. A. Effects of Formulation Parameters on Particle Size and Polydispersity Index of Orthosiphon Stamineus Loaded Nanostructured Lipid Carrier. **Journal of Advanced Research in Applied Sciences and Engineering Technology**, v. 1, n. 1, p. 36-39, 2015.
- SURAPANENI, M. S.; DAS, S. K.; DAS, N. G. Designing Paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: current status and challenges. **Int Scholarly Res Notices**, v. 2012, n. 1, p. 623139, 2012.
- WINSLOW, S. et al. Prognostic stromal gene signatures in breast cancer. **Breast Cancer Res.**,17:23(2015).