

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA CO-ENCAPSULAÇÃO DE PACLITAXEL E CANABIGEROL UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

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

Autores(as):

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

1. Introdução

Dados recentes da American Cancer Society indicam que a mortalidade por câncer diminuiu devido a melhores hábitos da sociedade, como redução do tabagismo, detecção precoce e melhores opções de tratamento em cenários adjuvantes e metastáticos. Contudo, nos EUA entre 2015 e 2019, a taxa anual de novos casos de CM subiu de 0,6% para 1% (Siegel; Giaquinto; Jemal, 2024). No Brasil, à exceção da região norte do país - onde o câncer de colo de útero é mais incidente – o CM é a primeira causa de morte por câncer em mulheres, com estimativa de 74 mil novos casos/ano, até 2025 (INCA, 2022). O tratamento do CM é multifatorial e depende do estágio clínico, da localização do tumor, do subtipo molecular e de características individuais do paciente, como idade e comorbidades (Winslow et al., 2015; Feng et al., 2020; Garcia-Oliveira et al., 2021). Em casos iniciais, a abordagem padrão envolve cirurgia, geralmente associada a terapias adjuvantes, como quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia ou imunoterapia. Apesar de eficazes, essas estratégias estão frequentemente associadas a efeitos adversos significativos, que podem comprometer a adesão ao tratamento e impactar negativamente a qualidade de vida dos pacientes (García-Pinel et al., 2019). Adicionalmente, é importante destacar que uma parcela dos pacientes pode apresentar resposta limitada ou mesmo resistência às abordagens quimioterápicas convencionais, o que reforça a necessidade de alternativas terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas. Nesse contexto, a combinação de agentes bioativos com mecanismos de ação complementares tem despertado crescente interesse. A associação entre o Paclitaxel (PTX), quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de diversos subtipos de CM (Alqahtani et al., 2019), e o Canabigerol (CBG), composto não-psicoativo com propriedades anticâncer, anti-inflamatórias e neuroprotetoras (Ligresti et al., 2006; Barrie; Manolios, 2017; Basavarajappa et al., 2017; Lah et al., 2021), surge como uma estratégia potencial para superar limitações terapêuticas, ampliar a eficácia antitumoral e mitigar efeitos colaterais. O PTX atua como um agente antimitótico, promovendo a estabilização dos microtúbulos e induzindo a morte celular. Contudo, sua baixa solubilidade aquosa (0,6 μ M; Singla; Garg; Aggarwal, 2002) exige o uso de excipientes tóxicos na formulação comercial (Taxol®), o que limita sua aplicabilidade clínica (Surapaneni et al., 2012; Marzo; Naval, 2013). A encapsulação do PTX em sistemas de liberação sustentada de fármacos (Drug Delivery Systems, DDS) tem se mostrado uma alternativa promissora para melhorar sua absorção celular, potencializar a ação terapêutica e reduzir os efeitos adversos (Marupudi et al., 2007; Alqahtani et al., 2019; Rodrigues da Silva et al., 2021). Entre os DDS lipídicos, os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) destacam-se por suas vantagens em termos de biodisponibilidade, estabilidade e redução da toxicidade sistêmica (Keck; Specht; Brüssler, 2021; Rodrigues da Silva et al., 2021). De modo similar, o CBG apresenta importantes limitações farmacocinéticas, como baixa solubilidade aquosa (Bruni et al., 2018), instabilidade físico-química (Pacifci, 2018) e rápida metabolização hepática (Jastrzab; Jarocka-Karpowicz; Skrzydlewska, 2022), que podem ser contornadas por meio da encapsulação em NLC. Assim, o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas co-encapsulando PTX e CBG representa uma abordagem inovadora com potencial terapêutico relevante no tratamento do câncer de mama, sobretudo para pacientes que não respondem adequadamente aos tratamentos convencionais.

2. Metodologia

2.1 Otimização por planejamento experimental: formulação NLC-CBG-PTX

A escolha da quantidade dos excipientes que compõem a formulação foi investigada através da realização do planejamento experimental, utilizando-se o software Design Expert® (versão 13, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA). Foi realizado um planejamento fatorial 2^4 com um ponto central (em triplicata) e as propriedades de interesse medidas para otimização foram: tamanho (menores possíveis), índice de polidispersão (menores possíveis) e potencial Zeta (maiores em módulo) das partículas, conforme tabela 1.

Tabela 1. Condições experimentais do planejamento fatorial para otimização da formulação NLC-CBG-PTX. Variáveis experimentais (TL, LL, P68), níveis (baixo e alto) e propriedades de interesse (tamanho, PDI e PZ).

Variáveis	Nível baixo	Nível alto
Total de lipídio, TL (% m/m)	8	12
Pluronic F-68, P68 (% m/v)	8	12
Paclitaxel (mg/mL)	1	6
CBG (mg/mL)	1	5
Propriedades de interesse		Otimização
Tamanho (nm)		Menores
Índice de Polidispersão (PDI)		Menores
Potencial Zeta, PZ (mV)		Maiores

2.2 Preparo

A formulação NLC-CBG-PTX foi obtida por meio do método de emulsificação seguido de ultrassonicação, conforme descrito por Souto et al. (2020). O Canabigerol (CBG) de grau farmacêutico foi gentilmente fornecido pela empresa Linnea AS (Locarno, Suíça); o Paclitaxel (PTX) pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda (Itapira, SP, Brasil) e o acetato de tocoferol foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Esses compostos foram incorporados à fase oleosa da formulação, constituída por 80% de lipídio líquido e 20% de lipídio sólido. A fase aquosa foi composta por uma solução de Pluronic® F-68, um tensoativo não iônico fornecido pela Sigma-Aldrich. Considerando a susceptibilidade do CBG à oxidação (Fraguas-Sánchez et al., 2020), o acetato de tocoferol foi incorporado à formulação em concentração fixa de 0,1%, respeitando os limites máximos estabelecidos para administração intravenosa por agências regulatórias internacionais, incluindo FDA (EUA), EMA (Europa), ANVISA (Brasil), PMDA (Japão), Health Canada e Organização Mundial da Saúde (OMS).

2.3 Caracterização e Estabilidade físico-química das NLC

A técnica de espalhamento de dinâmico de luz (DLS) foi usada para determinar o tamanho e o 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 (PZ, em mV) foram determinados pelo método de eletroforese de laser Doppler, utilizando o mesmo equipamento (ZetaSizer Nano ZS90), a 25°C. A estabilidade da formulação foi avaliada ao longo de 1 mês, por acompanhamento dos parâmetros: tamanho de partícula, PDI e ZP, além da observação do aspecto físico da formulação, à temperatura ambiente (25°C).

3. Resultados e discussão

3.1 Otimização por planejamento experimental: formulação NLC-CBG-PTX

A otimização da formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) é essencial para o controle preciso dos parâmetros críticos do sistema, como a escolha adequada dos excipientes lipídicos e do surfactante, a fim de garantir estabilidade, eficiência de encapsulação e desempenho terapêutico (Fukuda et al., 2018; Salvi; Pawar, 2019). Um nanocarreador devidamente otimizado apresenta vantagens como maior solubilidade em meios biológicos, aumento da meia-vida circulante, biocompatibilidade, proteção física das moléculas encapsuladas, além da capacidade de atingir regiões-alvo com eficiente internalização celular (Salvi; Pawar, 2019). Para esse propósito, foi conduzido um delineamento experimental abrangente, envolvendo 19 formulações distintas preparadas de forma randômica. A análise de variância (ANOVA) foi empregada para avaliar o ajuste do modelo estatístico e identificar as variáveis independentes com influência significativa sobre as respostas dependentes da formulação ($p < 0,05$) (Carbone et al., 2012; Carvalho et al., 2022). Os resultados correspondentes a cada formulação estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados obtidos (tamanho, PDI e potencial Zeta) para as formulações NLC-CBG-PTX, no planejamento experimental realizado.

Formulação	TL (%)	P68 (%)	PTX (mg/mL)	CBG (mg/mL)	Tamanho (nm)	PDI	PZ (mV)
1	12	12	6	1	180,0	0,390	-17,5
2	12	8	1	5	168,0	0,163	-31,3
3	8	8	1	1	165,5	0,166	-31,0
4	12	8	6	5	216,9	0,287	-20,7
5	10	10	3,5	3	177,8	0,395	-21,4

6	12	12	1	5	141,2	0,140	-17,3
7	8	12	1	1	139,7	0,139	-19,5
8	10	10	3,5	3	220,4	0,446	-17,5
9	8	8	1	5	193,0	0,376	-5,73
10	12	8	1	1	186,6	0,264	-12,1
11	8	12	1	5	137,4	0,126	-17,1
12	8	12	6	5	233,6	0,548	-14,3
13	8	12	6	1	269,6	0,466	-15,5
14	10	10	3,5	3	254,0	0,365	-18,4
15	12	12	6	5	266,6	0,371	-15,3
16	8	8	6	5	215,6	0,382	-11,4
17	12	12	1	1	142,4	0,122	-12,7
18	8	8	6	1	217,5	0,384	-10,7
19	12	8	6	1	215,4	0,375	-6,48

Com base nos resultados obtidos, os modelos estatísticos ajustados para as variáveis de interesse apresentaram significância estatística e ausência de falta de ajuste, indicando boa adequação dos dados experimentais. Em relação ao tamanho (diâmetro médio das partículas), os valores variaram entre 141,2 nm e 269,6 nm, sendo observado que a concentração do surfactante exerceu um efeito negativo, ou seja, seu aumento no sistema promoveu a redução do tamanho das partículas (Figura 1A). Quanto ao índice de polidispersão (PDI), os valores oscilaram de 0,122 a 0,395, sendo que apenas seis das dezenove formulações apresentaram valores inferiores a 0,2, o que é considerado indicativo de uma distribuição de tamanho monodispersa. Para esta variável, verificou-se que o PTX exerceu um efeito positivo, aumentando a heterogeneidade do sistema quanto maior sua concentração (Figura 1B). No que se refere ao potencial Zeta (PZ), a análise indicou que a interação entre PTX e CBG teve um efeito positivo significativo sobre esta resposta, resultando em valores de maior magnitude, conforme ilustrado na **Figura 1C**. A amostra otimizada que melhor representa os critérios desejados e que foi escolhida para prosseguir os estudos foi a formulação 3 do fatorial, consoante **tabela 2**. Assim, a partir daqui esta formulação otimizada será descrita como NLC-CBG-PTX.

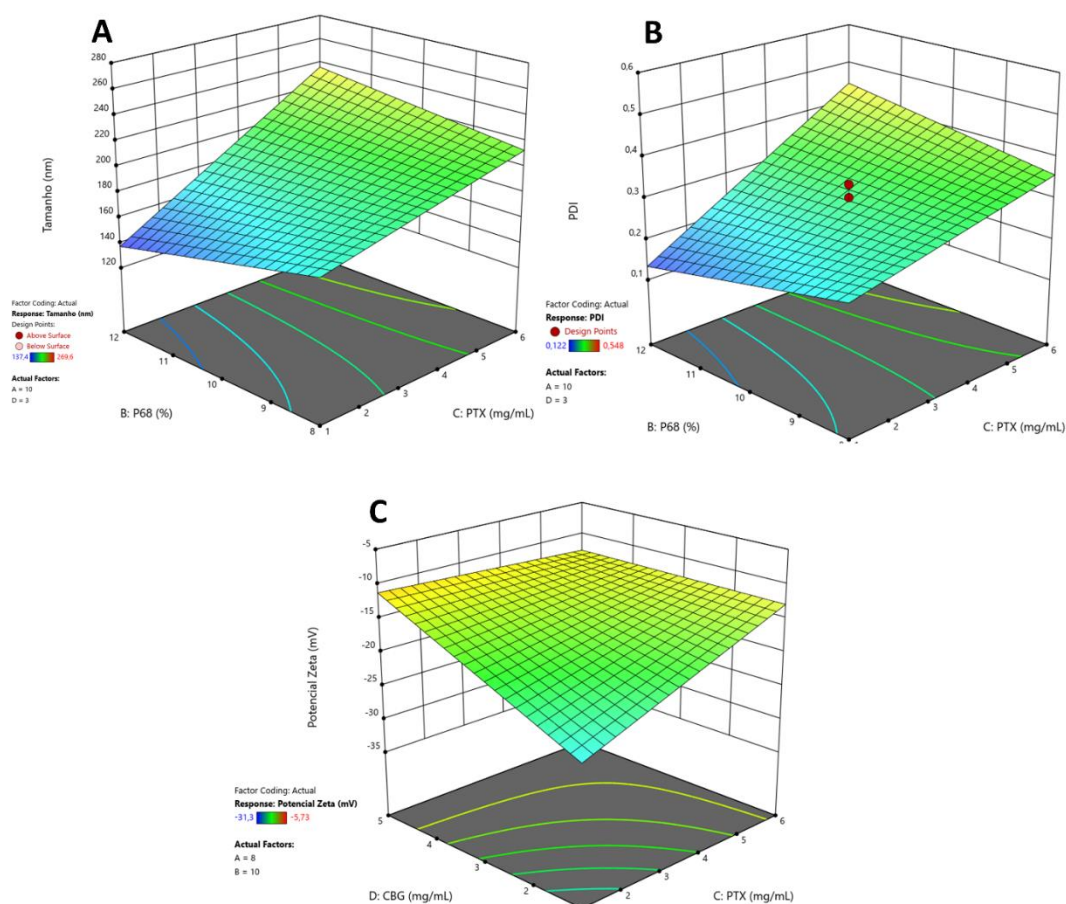


Figura 1. Resultados do planejamento fatorial para o sistema NLC-CBG-PTX: superfícies de resposta para: tamanho (A), PDI (B) e Potencial Zeta (C) das nanopartículas.

3.2 Estabilidade e caracterização das amostras otimizadas

Para caracterização das nanopartículas e estudo de estabilidade foi preparado uma amostra otimizada (NLC-CBG-PTX) e seus controles: NLC-CBG, NLC-PTX, NLC_{CTL}. Os resultados da média de caracterização destas formulações estão na **tabela 3**.

	Tamanho	PDI	Potencial Zeta
NLC-CBG-PTX	171,6	0,110	-20,9
NLC-CBG	169,7	0,120	-12,5
NLC-PTX	167,5	0,135	-13,2
NLC _{CTL}	165,7	0,114	-11,8

Tabela 3. Resultado médios das medidas de tamanho, PDI e da formulação otimizada e seus controles.

Os resultados de estabilidade da formulação otimizada, bem como os respectivos controles, armazenados a 25°C, em função do tempo (30 dias) são mostrados na Figura 2. 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-CBG-PTX), durante os 30 dias de análise de estabilidade, a formulação manteve sua aparência leitosa e homogênea. Além disso, o tamanho médio das partículas permaneceu próximo a 170 nm (fig. 2A) com valores de PDI menores que 0,2 (fig. 2B), caracterizando uma população monodispersa de tamanhos, desejável à aplicação clínica (Shimojo *et al.*, 2019; Suhaimi, 2015). O potencial Zeta, um parâmetro relacionado à carga superficial das partículas e correlacionado com a estabilidade de sistemas coloidais (Muller; Mader; Gohla, 2000) variou de -30,1 a -20,8 mV (Fig. 2C). 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).

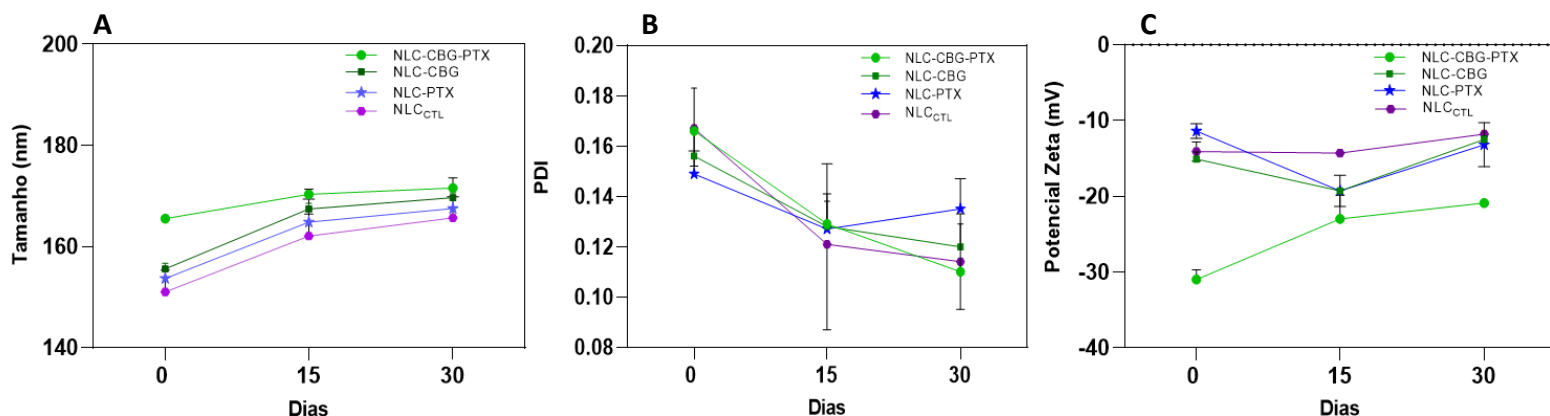


Figura 2: Dados de estabilidade da formulação otimizada (NLC-CBD-PTX) e seus controles (NLC-CBG, NLC-PTX, NLC_{CTL}) em relação ao tamanho (A), PDI (B) e Potencial Zeta (C), durante 30 dias de armazenamento a 25°C.

4. Conclusão

Neste trabalho, foi desenvolvida e otimizada, por meio de planejamento experimental, uma formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados co-encapsulando Paclitaxel e Canabigerol, com foco no tratamento do câncer de mama. A formulação otimizada, apresentou características físico-químicas adequadas à aplicação intravenosa, incluindo tamanho médio de aproximadamente 170 nm, baixa polidispersão ($PDI < 0,2$) e Potencial Zeta negativo, com estabilidade mantida por pelo menos 30 dias à temperatura ambiente (até o momento). Os resultados obtidos indicam que a estratégia de co-encapsulação em NLC é promissora para superar limitações farmacotécnicas e potencializar a ação terapêutica de PTX e CBG, permitindo a veiculação dos mesmos em concentrações adequadas à terapia do CM. Como próximas etapas: estão em andamento análises complementares de caracterização físico-química (por calorimetria diferencial de varredura, difração de Raios X e teor dos ativos nas NLC, por CLAE), bem como estudos de viabilidade e eficácia *in vitro* em linhagens celulares tumorais humanas e murinas (MCF-7 e 4T1) e em células não tumorais (NIH-3T3). Tais análises permitirão avaliar o desempenho biológico da nanoformulação e estabelecer sua aplicabilidade como alternativa terapêutica mais eficaz e menos tóxica para pacientes com câncer de mama.

5. Referências bibliográficas

- ALQAHTANI, F. Y. et al. Paclitaxel. **Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology**, v.44, p. 205-238, 2019.
- BARRIE, N.; MANOLIOS, N. The endocannabinoid system in pain and inflammation: its relevance to rheumatic disease. **European Journal of Rheumatology**, v. 4, n. 3, p. 210-218, 2017.
- BASAVARAJAPPA, B. S. et al. Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, n. 5, p. 624-648, 2017.
- BRUNI, N. et al. Cannabinoid delivery systems for pain and inflammation treatment. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2478-2503, 2018.
- CARBONE, C. et al. Clotrimazole-loaded mediterranean essential oils NLC: A synergic treatment of Candida skin infections. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, p. 231-251, 2019.
- 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.
- CHO, K. et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1310-1316, 2008.
- DANAEI, M. R. M. M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.
- 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 & Diseases**, v. 5, n. 2, p. 77-106, 2020.
- FRAGUAS-SÁNCHEZ, A. Let al. Stability characteristics of cannabidiol for the design of pharmacological, biochemical and pharmaceutical studies. **Journal of Chromatography B**, v. 1150, p. 122188, 2020.
- FUKUDA, I M. et al. Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, p. e01006, 2018.
- GARCIA-OLIVEIRA, P. et al. Status and challenges of plant-anticancer compounds in cancer treatment. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 2, p. 157-185, 2021.
- GARCIA-PINEL, Beatriz et al. Lipid-based nanoparticles: application and recent advances in cancer treatment. **Nanomaterials**, v. 9, n. 4, p. 638-666, 2019.
- INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2022: incidência do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>>. Acesso em 26 Julho de 2025.
- JASTRZĄB, A.; JAROCKA-KARPOWICZ, I.; SKRZYDLEWSKA, E. The origin and biomedical relevance of cannabigerol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 14, p. 7929, 2022.
- 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.
- LAH, T. T. et al. Cannabigerol is a potential therapeutic agent in a novel combined therapy for glioblastoma. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 340-361, 2021.
- LIGRESTI, A. et al. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 318, n. 3, p. 1375-1387, 2006.
- MARUPUDI, N. I. et al. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 6, n. 5, p. 609-621, 2007.
- MARZO, I.; NAVAL, J. Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: promises and pitfalls. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 6, p. 703-710, 2013.
- 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.
- PACIFICI, R. et al. Evaluation of long-term stability of cannabinoids in standardized preparations of cannabis flowering tops and cannabis oil by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 56, n. 4, p. 94-96, 2018.
- RODRIGUES DA SILVA, G. H. et al. Antineoplastics encapsulated in nanostructured lipid carriers. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 6929, 2021.
- SALVI, V. R.; PAWAR, P. Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug target ing carrier. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 255-267, 2019.
- 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.
- SIEGEL, R. L.; GIAQUINTO, A. N.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2024. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 1, 2024.
- 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. **International Scholarly Research Notices**, v. 2012, n. 1, p. 623139, 2012.
- WINSLOW, S. et al. Prognostic stromal gene signatures in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 17, p. 1-13, 2015.