



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GABRIELA GERONIMO

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DO TRATAMENTO
DE MELANOMA MURINO UTILIZANDO CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS PREPARADOS COM ÓLEO DE LAVANDA E
CONTENDO BUPIVACAÍNA S75:R25**

**PHARMACOKINETIC AND PHARMACODYNAMIC EVALUATION OF THE
TREATMENT OF MURINE MELANOMA WITH LAVAND-OIL
NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS CONTAINING S75:R25 BUPIVACAINE**

**CAMPINAS
2023**

GABRIELA GERONIMO

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DO TRATAMENTO
DE MELANOMA MURINO UTILIZANDO CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS PREPARADOS COM ÓLEO DE LAVANDA E
CONTENDO BUPIVACAÍNA S75:R25**

**PHARMACOKINETIC AND PHARMACODYNAMIC EVALUATION OF THE
TREATMENT OF MURINE MELANOMA WITH LAVAND-OIL
NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS CONTAINING S75:R25 BUPIVACAINE**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Molecular e Morfofuncional, na Área de Bioquímica.

Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Molecular and Morphofunctional Biology, in the area of Biochemistry.

Orientadora: Dra. Eneida de Paula

Coorientador: Dr. Gustavo Henrique Rodrigues da Silva

ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA GABRIELA
GERONIMO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
ENEIDA DE PAULA.

CAMPINAS
2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G319a Geronimo, Gabriela, 1995-
Avaliação farmacocinética e farmacodinâmica do tratamento de melanoma murino utilizando carreadores lipídicos nanoestruturados preparados com óleo de lavanda e contendo bupivacaína S75:R25 / Gabriela Geronimo. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Eneida de Paula.
Coorientador: Gustavo Henrique Rodrigues da Silva.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Melanoma. 2. Bupivacaína. 3. Carreadores lipídicos nanoestruturados. 4. Óleo de lavanda. I. Paula, Eneida de, 1963-. II. Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique, 1981-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the treatment of murine melanoma with lavender-oil nanostructured lipid carriers containing S75:R25 bupivacaine

Palavras-chave em inglês:

Melanoma
Bupivacaine
Nanostructured lipid carriers
Lavender oil

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Molecular e Morfofuncional

Banca examinadora:

Eneida de Paula [Orientador]
Debora Campanella Bastos
Patrícia Severino

Data de defesa: 23-05-2023

Programa de Pós-Graduação: Biologia Molecular e Morfofuncional

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-2077-2406>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/3739383603182974>

Campinas, 23 de maio de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Eneida de Paula – Orientadora

Dra. Debora Campanella Bastos – Universidade Estadual de Campinas

Dra. Patrícia Severino – Universidade Tiradentes

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Molecular e Morfofuncional do Instituto de Biologia da Unicamp.

A minha mãe, Dona Schirley.

A todos os pacientes oncológicos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por proporcionar-me esta oportunidade e capacidade para o desenvolvimento deste trabalho. Foi com a força e apoio Dele que em muitos momentos eu soube a melhor forma de enfrentar as dificuldades.

À minha orientadora professora Eneida, que desde a minha iniciação científica tem proporcionado algo maior que inspiração: a sua conduta e amor à ciência fez-me acreditar que a perseverança na luta por direitos e justiça faz de nós melhores cientistas, melhores humanos.

Ao meu coorientador Gustavo, pela paciência e ensinamentos pois, além de me auxiliar no início de minha carreira, nos tornamos bons amigos.

Aos colegas do grupo Biomembranas: Ludmilla, Fabi, Talita, Fernando, Hery, Priscila, Thiago, Vivi e Juliana. Vocês são a família que eu tive o privilégio de escolher. Cada um de vocês fez a diferença em minha vida. Eu agradeço por fazerem do meu coração um lugar mais quentinho. Agradeço ao nosso técnico Márcio Paschoal (*in memoriam*) pelos momentos de riso, auxílio e por sempre torcer por mim... De onde você estiver, Márcio, saiba que sentimos muito sua falta. Também agradeço aos funcionários do IB que me ajudaram de alguma forma neste trajeto: Elzira, Juliana, Kiko, Paulinho e Neto.

À minha família que sempre me apoiou, por mais que em alguns momentos eu chegasse a duvidar de mim mesma, foram eles que pegaram na minha mão e nunca me deixaram abaixar a cabeça pelas frustrações, cansaço ou desânimo: mãe, pai, Carol, Gra e Matheus vocês também são uma parte fundamental das engrenagens do meu trabalho.

Ao meu esposo que, diante de tantos acontecimentos neste período, me ensinou uma lição que levarei para a vida: confiança em mim mesma. Nos meus melhores e piores dias você estava comigo e foi no seu amor por mim que tudo se tornou mais leve. A melhor parte de mim está em nós.

Agradeço as colaborações de diferentes especialistas que proporcionaram o enriquecimento desde trabalho: a Dra Márcia Breitreitz (quimiometria), Dra. Tereza Della Costa (farmacocinética), Dra, Fernanda Viviane Mariano (histopatologia) e a Raissa Ludwig e Prof. Marcelo Mori pela paciência e acolhimento no uso da sala de cultura. Sou grata também as empresas Cristália Ltda e Blau Farm. S.A. pelas doações de insumos.

Agradeço à Unicamp, por me proporcionar um local de excelência em ensino e pesquisa com disponibilidade de meios para minha formação; ao CNPq (#130258/2021-0) e a FAPESP (#2021/02575-7) pela bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro.

*“Os grandes feitos são conseguidos
não pela força, mas pela perseverança”.*

Samuel Johnson.

RESUMO

Dos tumores malignos registrados no Brasil, o câncer de pele é o mais frequente e corresponde a cerca de 30% dos casos. O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele dado seu alto potencial metastático, alta mortalidade (80%) e resistência à terapêutica com agentes quimioterápicos. Diante disso, novas abordagens para o tratamento de melanoma têm sido alvo de pesquisas. A utilização de anestésicos locais (AL) após excisão cirúrgica do tumor para redução de focos metastáticos e risco de recorrência já é praticada na clínica. Estudos recentes demonstram efeitos citotóxicos da bupivacaína (BVC), AL potente e de efeito prolongado (4 h), em células tumorais como alterações na bioenergética celular, indução de vias de sinalização apoptóticas e necróticas dose dependente, além de auxílio na resposta imune antitumoral. Os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) são sistemas de entrega de fármacos (*Drug-Delivery Systems*) preparados a partir de uma mistura de lipídios sólidos e líquidos, mais surfactante. Esses lipídios podem agir como excipientes funcionais conferindo propriedades farmacêuticas adicionais aos NLC. Neste trabalho, utilizamos como lipídio funcional o óleo essencial de lavanda, cuja atividade antineoplásica poderia adjuvar a da BVC. O objetivo desta dissertação de mestrado foi o de avaliar o efeito antineoplásico em modelo xenográfico de melanoma induzido com células B16-F10 (melanoma murino) e a farmacocinética *in situ* (sondas de microdiálise inseridas no tumor) de uma formulação de BVC com excesso enantiomérico levógiro (BVC_{S75} / Novabupi[®]) encapsulada em NLC preparados com óleo essencial de lavanda (NLC-LO-BVC_{S75}). Os experimentos demonstraram que a formulação inibiu significativamente o crescimento tumoral (em 79%), bem mais que a solução de BVC_{S75} livre (21%) ou o fármaco de referência dacarbazina (41%). Análises bioquímica e morfológica não revelaram alterações do tecido hepático ou renal; tampouco a atividade da CK-MB sérica dos animais tratados com a nanoformulação se alterou. Os dados de farmacocinética revelaram uma liberação prolongada da BVC_{S75} no tecido tumoral, com diminuição (ca. 4 x) da constante de eliminação, aumento da concentração do BVC_{S75} no tumor e do tempo de meia-vida do fármaco, pela nanoformulação. Assim, verificou-se que a encapsulação de BVC_{S75} em NLC diminuiu a cardiotoxicidade *in vivo* e que o AL permanece mais tempo no local de ação, resultando no menor crescimento tumoral com taxa de sobrevida de 100% dos animais. Dessa forma, a formulação NLC-LO-BVC_{S75} é promissora, podendo ser administrada em cirurgias de excisão do tumor, por seu efeito direto sobre as células neoplásicas e também de anestésico local, como uma nova abordagem terapêutica para o tratamento do melanoma cutâneo.

Palavras-chave: Melanoma cutâneo, bupivacaína, carreadores lipídicos nanoestruturados, óleo essencial de lavanda.

ABSTRACT

Of the malignant tumors registered in Brazil, skin cancer is the most frequent and corresponds to about 30% of cases. Melanoma is the most aggressive form of skin cancer given its high metastatic potential, high mortality (80%) and resistance to treatment with chemotherapeutic agents. In view of this, new approaches for the treatment of melanoma have been the subject of research. The use of local anesthetics (LA) after surgical excision of the tumor to reduce metastatic focus and risk of recurrence is already practiced in the clinic. Studies demonstrate cytotoxic effects of bupivacaine (BVC), AL and prolonged effect (4 h), in tumor cells, such as alterations in cell bioenergetics, induction of dose-dependent apoptotic and necrotic signaling pathways, in addition to aid in the antitumor immune response. Nanostructured lipid carriers (NLC) are drug delivery systems prepared from a mixture of solid and liquid lipids plus surfactant. These lipids can act as functional excipients, conferring additional pharmaceutical properties to NLC. In this work, we used lavender essential oil as a functional lipid, whose antineoplastic activity could help BVC. The aim of this master's thesis was to evaluate the antineoplastic effect in a xenographic model of melanoma induced with B16-F10 cells (murine melanoma) and the *in situ* pharmacokinetics (microdialysis probes incorporated into the tumor) of a CVS formulation with enantiomeric excess (BVC_{S75} / Novabupi®) encapsulated in NLC prepared with lavender essential oil (NLC-LO-BVC_{S75}). The experiments showed that the formulation significantly inhibited tumor growth (by 79%), far more than the free BVC_{S75} solution (21%) or the reference drug dacarbazine (41%). Biochemical and histopathological analyzes revealed no changes in liver and kidney tissues and neither the serum CK-MB activity in animals treated with the nanoformulation was changed. The pharmacokinetic data revealed a prolonged release of BVC_{S75} in the tumor tissue, with a decrease (ca. 4x) in the elimination constant, an increase in the concentration of BVC_{S75} in the tumor and in the half-life of the drug, by the nanoformulation. Thus, it is tolerated that the encapsulation of BVC_{S75} in NLC suffered cardiotoxicity *in vivo* and that LA remains longer in the local growth of action, resulting in the smallest tumor with a survival rate of 100% of the animals. Thus, the NLC-LO-BVC_{S75} formulation is promising and can be manipulated in tumor excision surgeries, due to its direct effect on neoplastic cells besides its local anesthetic effect, as a new therapeutic tool for the treatment of cutaneous melanoma.

Keywords: skin melanoma, bupivacaine, nanostructured lipid carriers, lavender essential oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos clínicos de tipos de melanoma. Adaptado de < https://hospitalsiriolibanes.org.br/blog/oncologia/o-que-e-um-melanoma-cutaneo > e < https://incariopreto.com.br/cancer-de-pele-melanoma/ >.	18
Figura 2. Estruturas químicas dos estereoisômeros da bupivacaína: A) dextrogira, R (+); B) Levogira, S (+).....	19
Figura 3. Método de preparo dos NLC.....	28
Figura 4. Etapas do modelo ortotópico de indução de melanoma (B16-F10) em camundongos C57BL/6J.....	30
Figura 5. Linha do tempo – Análise geral dos procedimentos realizados nos animais.....	32
Figura 6. Análise farmacocinética intratumoral no melanoma murino de camundongos C57BL/6J utilizando a técnica de microdiálise local.	35
Figura 7. Fotomicrografias em microscopia eletrônica de transmissão (MET) das formulações de NLC-LO (A) e NLC-LO-BVC _{S75} (B). Magnificação 100.000 x. (C) Curvas de liberação <i>in vitro</i> de BVC _{S75} : em solução aquosa (BVC _{S75} livre) ou incorporada na formulação NLC-LO-BVC _{S75} , a 37 °C e pH 7,4. Adaptado de (GERONIMO et al., 2021).....	38
Figura 8. Avaliação do volume tumoral durante o período de tratamento. (A) Gráfico da evolução do volume tumoral durante o tratamento dos grupos: Controle positivo = solução NaCl 0,9%, Dacarbazina = fármaco de referência, BVC _{S75} livre = solução de 0,5% de BVC _{S75} livre, NLC-LO = carreadores lipídicos nanoestruturados com excipiente óleo de lavanda, NLC-LO-BVC _{S75} = carreadores lipídicos nanoestruturados com óleo de lavanda e bupivacaína a 0,5%, NLC-CAP = carreadores lipídicos nanoestruturados com excipiente sintético e NLC-CAP-BVC _{S75} = carreadores lipídicos nanoestruturados com lipídio sintético e bupivacaína a 0,5%. (B) Volume tumoral dos grupos experimentais no dia 16 (último tratamento realizado). As setas pretas indicam o início (dia 10) e o fim (dia 16) dos tratamentos. Os dados representam a média ± DP (n = 5). Análise estatística Two-way ANOVA com <i>post hoc</i> Tukey. a, em relação ao Controle positivo; b, em relação a BVCS75 livre; c, em relação a NLC-LO; d, em relação a NLC-CAP. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.....	40
Figura 9. Análise do volume tumoral do melanoma entre o período pós-tratamento (entre o dia do último tratamento (Dia 16) e sete dias após (Dia 22)). (A) Gráficos da evolução do crescimento do volume tumoral no dia 22. (B) Análise do volume tumoral durante o período de pós-tratamento; diferenças estatísticas entre os dias 16 e 22. (C) Exemplos de tumores representativos de cada grupo de tratamento, excisados após eutanásia (dia 22), em mesma escala de proporção. Os dados representam a média ± DP (n = 5). Análise estatística por Two-Way ANOVA com <i>post hoc</i> Tukey. a, em relação ao Controle positivo; b, em relação a BVC _{S75}	

livre; c, em relação a NLC-LO; d, em relação a NLC-CAP. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; n.s. = não significativo.43

Figura 10. Análise do peso dos animais durante o período de experimento. (A) Peso médio por animal monitorado por 22 dias (1 vez por semana) durante todo o período de tratamento dos animais. (B) Peso médio por animal no dia 22. (C) Peso corporal dos animais após retirada do tumor (dia 22). Análise estatística por One-Way ANOVA com *post-hoc* Tukey. a, em relação ao grupo Naive; b, em relação ao Controle positivo; c, em relação a dacarbazina; d, em relação a BVC_{S75} livre. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$47

Figura 11. Avaliação do consumo médio de ração dos animais durante todo o período de tratamento. Consumo médio de ração por animal monitorado por 22 dias (1 vez por semana) durante experimento. Análise estatística por ANOVA com *post hoc* Tukey (**** $p < 0,0001$).48

Figura 12. Variação nos parâmetros bioquímicos (níveis séricos de AST, ALT, CK-MB, ferro e ureia) dos animais, após tratamentos. (A) ALT; (B) AST; (C) CK-MB; (D) Ferro; (E) Ureia. Os dados representam a média $\pm$ DP (n = 5). Análise estatística One-way ANOVA com *post hoc* Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$49

Figura 13. Análise da sobrevida dos animais em relação ao tempo decorrido da indução do melanoma até 7 dias após o término dos tratamentos. (A) Nos grupos Naive; BVC_{S75} livre e NLC-LO-BVC_{S75} a taxa de sobrevida foi de 100%; no grupo NLC-CAP-BVC_{S75} foi de 80% (1 animal morreu); nos grupos Dacarbazina e NLC-LO 40% (3 animais morreram) e no grupo Controle positivo e NLC-CAP foi de 20% (4 animais morreram) (n = 5). (B) Porcentagem de sobrevida entre os grupos de tratamentos, revelando sobrevida maior para animais dos grupos que receberam BVC_{S75} (livre ou encapsulada).52

Figura 14. Baço de animais excisados após eutanásia. (A) Baço de animal saudável (20 mm de comprimento). (B) Baço após autópsia do animal pertencente ao grupo NLC-CAP, apresentando esplenomegalia (48 mm de comprimento).54

Figura 15. Análise do peso dos órgãos dos animais após tratamentos realizados. (A) Pulmão; (B) Fígado; (C) Baço; (D) Rim; (E) Coração; (F) Tumor. Análise estatística One-way ANOVA plus Tukey–Kramer *post hoc*. ** $p < 0,01$55

Figura 16. Seções histopatológicas de camundongos fêmeas adultas da linhagem C57BL/6J (*Mus musculus*). Indução do tumor melanoma nos camundongos por implante intradérmico de células B16-F10 (melanoma murino) (exceto grupo Naive). Análise da região do tumor, baço, fígado, pulmão e rins dos grupos de animais controles (sem e com tumor), Solução de Dacarbazina, Solução BVC_{S75} livre, NLC-LO, NLC-LO-BVC_{S75}, NLC-CAP e NLC-CAP-BVC_{S75}. (H&E, 10 $\times$ ou 20 $\times$).56

Figura 17. Estudo farmacocinético em tecido tumoral. (A) Linha do tempo experimental; (B) Procedimento de microdialise tumoral para quantificação de BVC_{S75} no fluido do espaço intersticial do tumor em camundongos C57BL/6J. (C) Concentração local de BVC_{S75} em escala logarítmica em função do tempo no tecido tumoral. Os dados representam a média $\pm$ DP (n = 5). Análise estatística por ANOVA com *post hoc* Tukey (****p < 0,001). 61

Figura 18. Influência dos NLC na concentração residual de BVC_{S75} após eutanásia no tecido tumoral. (A) Concentração de BVC_{S75} após eutanásia dos animais dos grupos analisados. Imagens de microscopia de fluorescência das nanoformulações, Controle (BVC_{S75} livre (B); NLC-LO-BVC_{S75} (C) e NLC-CAP-BVC_{S75} (D), marcados com rodamina. 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais tipos de NLC, classificados de acordo com características de sua matriz lipídica (Adaptado DE SALVI, PAWAR, 2019).	22
Tabela 2. Descrição dos grupos experimentais para os tratamentos <i>in vivo</i> (melanoma induzido). Foram realizadas quatro sessões de tratamento a cada dois dias (quatro dias de tratamento no total).	31
Tabela 3. Composição da matriz lipídica das formulações otimizadas e seus controles (sem fármaco).	37
Tabela 4. Caracterização das formulações NLC-LO-BVC _{S75} e NLC-CAP-BVC _{S75} e de seus respectivos controles (sem fármaco), quanto aos diâmetros médios (tamanho), índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta, concentração de nanopartículas (nanopartículas/mL) e eficiência de encapsulação (% EE).	37
Tabela 5. Percentual de crescimento do volume tumoral no período pós-tratamento (7 dias após último tratamento) dos grupos experimentais, em relação ao Controle Positivo.	44
Tabela 6. Avaliação geral terapêutica dos tratamentos realizados para melanoma cutâneo. ...	60
Tabela 7. Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da concentração de BVCS75 no tecido tumoral (n = 5).	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Anestésico local
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BVC	Bupivacaína
BVC_{S75}	Bupivacaína em excesso enantiomérico levogiro (75%)
B16-F10	Linhagem de melanoma murino
CAP	Capryol 90
CEMIB	Centro de Bioterismo da Unicamp
CK-MB	Creatina quinase, isoforma do músculo cardíaco
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DDS	Sistema de liberação de fármacos (do inglês <i>Drug Delivery Systems</i>)
DLS	Espalhamento de luz dinâmico (do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMEM	Meio de cultura (Dulbecos's modified Eagle's medium)
DoE	Planejamento experimental (do inglês <i>Design of Experiments</i>)
DRX	Difração de Raios X (X-ray diffraction)
DSC	Calorimetria diferencial de Varredura (do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
EE	Eficiência de Encapsulação
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IT	Intratumoral
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NLC	Carreador Lipídico Nanoestruturado (do inglês <i>Nanostructured Lipid Carriers</i>)
NLC-CAP	NLC preparada com o lipídio sintético Capryol
NLC-CAP-BVC_{S75}	NLC preparada com Capryol e contendo BVC _{S75}
NLC-LO	NLC preparada com óleo essencial de lavanda
NLC-LO-BVC_{S75}	NLC preparada com óleo essencial de lavanda e contendo BVC _{S75}
NTA	Análise de Rastreamento de Partículas (do inglês <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>)
LO	Óleo essencial de Lavanda (do inglês <i>Lavender essential oil</i>)
P-68	Pluronic® F68
PBS	Tampão Fosfato Salino (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDI	Índice de polidispersão (do inglês <i>Polydispersity index</i>)

pH	Potencial Hidrogeniônico
PZ	Potencial Zeta
SFB	Soro Fetal Bovino
SK-MEL-25	Linhagem de melanoma humano
SLN	Nanopartícula Lipídica Sólida (do inglês <i>Solid Lipid Nanoparticle</i>)
VT	Volume tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 MELANOMA	17
1.2 BUPIVACAÍNA	19
1.3 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS	21
1.4 ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA COMO EXCIPIENTE FUNCIONAL DAS NLC	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 MATERIAIS	26
3.1.1 Reagentes	26
3.1.2 Equipamentos	27
3.2 MÉTODOS	28
3.2.1 Preparo dos NLC	28
3.2.2 Medidas de Tamanho, índice de polidispersão, Potencial Zeta e Número de Partículas	29
3.2.3 Ensaios in vivo em modelo murino	29
3.2.4 Estudo farmacocinético (microdiálise local - tumoral)	34
3.2.5 Análise estatística.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 FORMULAÇÃO NLC-LO-BVC _{S75} : CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, TESTE DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> E VIABILIDADE CELULAR.....	36
4.2 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL EM MODELO <i>IN VIVO</i> DE MELANOMA.....	39
4.3 AVALIAÇÃO DE PESO CORPORAL E CONSUMO DE RAÇÃO DOS ANIMAIS, DURANTE TRATAMENTO.....	45
4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO	48
4.5 SOBREVIVÊNCIA	51
4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	55
4.6.1 Órgãos	57
4.6.2 Tumores.....	58
4.7 AVALIAÇÃO TERAPÊUTICA GLOBAL	59
4.8 ESTUDO FARMACOCINÉTICO (MICRODIÁLISE LOCAL – TUMORAL).....	60
5. CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS	66
ANEXO 1	75
ANEXO 2	76
DECLARAÇÕES DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA.....	76
DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS	80
PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO	81
APRESENTAÇÕES EM WORKSHOP / CONGRESSOS.....	82
PARTICIPAÇÃO EM CURSOS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 Melanoma

Dos tumores malignos registrados no Brasil, o câncer de pele é o mais frequente, correspondendo cerca de 30% dos casos (INCA, 2022). O melanoma cutâneo, malignidade dos melanócitos, representa cerca de 3% das neoplasias malignas e é a forma mais agressiva de câncer de pele, com mortalidade de 80% (AHMED et al., 2020; LI; HAN, 2020) e evolução para metástase cerebral em 75% dos pacientes. O melanoma cutâneo ocupa a 15ª posição entre os cânceres mais comuns no mundo e sua incidência depende do fenótipo da pele e do grau de exposição aos raios UV. Assim, é considerado um grande problema de saúde pública (LEONARDI et al., 2018; MISHRA et al., 2018; SCHADENDORF et al., 2018; BARONE et al., 2019; AHMED et al., 2020; INCA, 2022; BROWN et al., 2021). Além disso, o número de novos casos de melanoma tem aumentado ao redor do mundo, com maior ocorrência em indivíduos com 70–80 anos, devido à maior exposição à irradiação, associada a fatores desencadeantes como número de nevus, sensibilidade solar, imunossupressão e histórico familiar (COSTA, 2008; GARBE, LEITER, 2009; LEONARDI et al., 2018). Apesar de sua incidência ser menor entre indivíduos com menos de 40 anos de idade (20%) o melanoma é um dos cânceres mais prevalentes entre adultos jovens (12,4% em pacientes com 20–29 anos) no mundo (INDINI et al., 2018; LEONARDI et al., 2018). Segundo o Global Cancer Observatory em 2020 foram diagnosticados 324.625 casos de melanoma maligno (GLOBOCAN, 2020) e dados mais recentes da OMS preveem que o número de mortes causadas por melanoma aumentará em cerca de 74% até 2040 (VANELLA et al., 2021). A American Cancer Society estima que nos EUA em 2023 serão diagnosticados cerca de 97.610 novos casos de melanomas (cerca de 58.120 em homens e 39.490 em mulheres) e, dentre estes 7.990 irão a óbito (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023). Em países tropicais como o Brasil, acrescenta-se o problema da grande exposição aos raios UV, o que nos coloca como população de alto risco ao melanoma (BROWN et al., 2021).

O melanoma cutâneo é caracterizado por ser um câncer melanocítico, sendo classificado patologicamente como: nodular, lentiginoso acral, lentigo maligno e extensivo superficial, (Figura 1). O melanoma nodular corresponde a 5% dos melanomas existentes, é observado nas áreas do tronco e extremidades do corpo, sendo mais comum em pacientes do sexo masculino, com idade entre 50-60 anos (COSTA, 2008; AHMED et al., 2020). O tipo lentiginoso acral é mais raro, representa 5% entre indivíduos brancos e tem maior ocorrência em mulheres idosas, asiáticas, ocorrendo em pele glabra (sem folículos pilosos) e adjacente aos dedos. O melanoma

lentigo maligno está relacionado à maior exposição aos raios solares em áreas mais expostas de indivíduos com idade avançada, e corresponde a 4-15% dos melanomas cutâneos (COSTA, 2008). Já o melanoma extensivo superficial é o tipo mais comum (70% dos casos), caracterizado por lesões de fácil acesso e localizadas na parte externa do estrato córneo (área mais exposta à radiação solar) sendo, por isso, susceptível a maior variedade de terapias (COSTA, 2008; OGLESBY et al., 2019; REBECCA et al., 2020).



Figura 1. Exemplos clínicos de tipos de melanoma. Adaptado de <https://hospitalsiriolibanes.org.br/blog/oncologia/o-que-e-um-melanoma-cutaneo> e <https://incariopreto.com.br/cancer-de-pele-melanoma/>.

A detecção precoce do melanoma reduz muito a morbimortalidade a curto e longo prazo nos pacientes (AHMED et al., 2020). A forma de tratamento é dependente do estágio da doença, podendo envolver cirurgia, imunoterapia, quimioterapia e terapia fotodinâmica (DOMINGUES et al., 2018). Apesar da remoção cirúrgica do tumor primário ser um componente essencial para o tratamento, a imunossupressão do indivíduo no período perioperatório predispõe fatores que estimulam a recorrência do câncer como lesões pró-tumorigênicas, reação inflamatória, angiogênese e o desenvolvimento de metástases (SULLIVAN et al., 2015; CHAMARAUX-TRAN; PIEGELER, 2017; ZHANG; XIE; LU, 2021). Com isso, o tratamento do melanoma tem sido alvo de intensas pesquisas que visam aumentar a sobrevida dos pacientes, haja vista a alta possibilidade de recidiva, além da baixa resposta ao tratamento e resistência das células de melanoma à terapia medicamentosa (SOENGAS; LOWE, 2003; MISHRA et al., 2018; REBECCA et al., 2020).

O quimioterápico padrão para tratamento de melanoma é a dacarbazina, um agente alquilante capaz de reagir diretamente com o material genético das células de melanoma (transferência de grupamento alquila a cadeia do DNA), prejudicando seu processo de replicação celular, resultando em retardo ou inibição do crescimento do tumor (HAFEEZ; KAZMI, 2017). Apesar de sua baixa efetividade (15%) não há outro agente ou combinação de agentes antitumorais capaz de melhorar o prognóstico dos pacientes (DOMINGUES et al., 2018; BITEGHE et al., 2020). Outras possíveis alternativas para o tratamento de melanoma são

a administração de quimioterápico no local do tumor, ou terapia alvo (SNYDER; GREENBERG, 2010; OGLESBY et al., 2019) e a terapia fotodinâmica (BALDEA et al., 2018) ambas capazes de diminuir a atividade metastática. Contudo, existe um campo aberto para o desenvolvimento de pesquisas que buscam otimizar o tratamento e prognóstico desta neoplasia maligna.

1.2 Bupivacaína

A bupivacaína (BVC), introduzida no mercado em 1963, é o anestésico local (AL) mais utilizado para anestesia cirúrgica - como no trabalho de parto ou em procedimentos em que é necessário um maior tempo de anestesia (LAGAN et al., 2004; HEPPOLETTE et al., 2020). Devido ao carbono quiral presente no anel piperidina (Figura 2) a BVC é uma mistura racêmica, da qual a forma levogira, S (-), possui menor grau de toxicidade aos sistemas cardiovascular e nervoso central (SCV, SNC) do que a dextrogira, R (+) (BARDSLEY et al., 1998; FOSTER; MARKHAM, 2000). Este fato impulsionou a síntese química estereoseletiva de uma mistura enantiomérica contendo 75 % do isômero S (-) e 25 % do isômero R (+), a BVC_{S75} ou NovaBupi[®] (comercializada no Brasil pela Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda), com melhor perfil anestésico e margem de segurança que a mistura racêmica comercial (ARAÚJO et al., 2005; SOUZA et al., 2019).

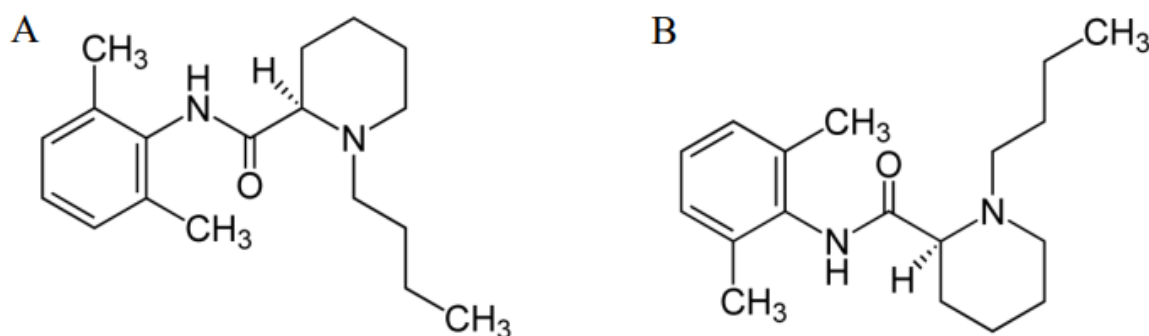


Figura 2. Estruturas químicas dos estereoisômeros da bupivacaína: A) dextrogira, R (+); B) Levogira, S (+).

Consolidados para analgesia em procedimentos clínicos e cirúrgicos, na diminuição da dor aguda e inflamação (BEZU; KEPP; KROEMER, 2022) os AL começaram a atrair atenção de pesquisadores pelo impacto da anestesia contra células tumorais, como na redução do risco de recorrência do tumor (SEKANDARZAD et al., 2016; CHAMARAUX-TRAN; PIEGELER, 2017; DAN et al., 2018; ZHANG; XIE; LU, 2021). Estudos revelam que, após excisão cirúrgica do tumor, ocorre a disseminação de células cancerígenas devido a depressão do sistema imune (essencialmente da função das células *Natural Killer*), contribuindo para o estabelecimento de

focos metastáticos (SEKANDARZAD et al., 2016; MULLER; ZIEGLER; PIEGELER, 2021). Assim, a atuação dos AL na resposta imune antitumoral melhora o prognóstico da neoplasia em razão da prevenção de estresse neuroendócrino (diminuição de citocinas pró-inflamatórias), capacidade de diminuir a inflamação resultante da cirurgia oncológica (promovendo efeitos citotóxicos causados diretamente nas células tumorais) e melhora na sobrevida global de indivíduos (BEZU et al., 2022; WU CHUANG et al., 2022).

Outros estudos pré-clínicos mostraram que os AL do tipo amino-amidas (como a BVC) possuem atividade antiproliferativa, antimetastática e pró-apoptótica em diversos tipos de células tumorais, por uma série de mecanismos diferentes (CATA; RAMIREZ; PEREZ-GONZALEZ, 2020; GRANDHI; PERONA, 2020; ZHENG; PENG; ZHANG, 2020). Como os AL bloqueiam canais de Na^+ e podem afetar alguns canais de cálcio, sua ação na bomba Ca^{2+} -ATPase impactaria o influxo de cálcio citossólico, estressando o retículo endoplasmático e promovendo supressão na tradução de proteínas. Esses AL também alterariam a polimerização de filamentos de actina em células tumorais, interrompendo o ciclo celular e remodelação do citoesqueleto, promovendo uma atividade indireta no bloqueio da migração de células cancerígenas (BEZU et al., 2022).

Liu e col. (LIU; DILGER; LIN, 2020) mostraram que a BVC causou a maior citotoxicidade entre AL amino-amida testados e que, em concentrações superiores a 8 mM (dose usada para infiltração anestésica local), causou a morte de quase todas as linhagens de células tumorais testadas, inclusive de melanoma. Outras recentes publicações com ensaios *in vitro* indicam atuação da BVC na inibição da progressão tumoral em câncer de células não pequenas de pulmão, gástrico e sarcoma (JU et al., 2020; ZUCKERMAN et al., 2020; GU et al., 2021), através da atuação do AL na via da fosforilação Akt/mTOR, resultando na indução autofágica das células cancerosas, diminuição da glicólise aeróbica e aumento da expressão de caspase-3, desencadeando alteração da morfologia celular e apoptose das células cancerosas. Em células de melanoma B16-F10 murinas, verificou-se que a BVC afetou sua sobrevivência, causando alterações no citoesqueleto e na via glicolítica, com depleção de ATP (KARNIEL; BEITNER, 2000; SCHWARTZ; BEITNER, 2000). Contudo, é importante ressaltar a necessidade de investigação em ensaios *in vivo*, pois as observações *in vitro* podem não ser reproduzíveis, no organismo como um todo.

Diante das vantagens do uso de AL no período pré-operatório para reduzir a metástase e a taxa de recorrência do câncer (VAHABI; EATEMADI, 2017; YANG et al., 2017; LIU et al., 2020), o uso da BVC como um tratamento adjuvante, incluindo mudanças em sua posologia e protocolo de aplicação, necessita ser mais bem estudado. Assim, uma abordagem capaz de

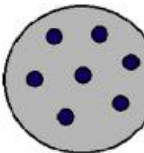
estender o tempo de ação e a atividade farmacológica da BVC sem aumentar sua toxicidade sistêmica poderia ser útil para seu reposicionamento, no tratamento do melanoma. Além disso, a literatura carece de estudos *in vivo*, com modelos animais com câncer e tratados com AL, que demonstrem o efeito desses fármacos em conter o desenvolvimento de metástases e a regressão tumoral (LIU; DILGER; LIN, 2020).

1.3 Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

Estratégias nanoterapêuticas, como os sistemas de liberação de fármacos (DDS, do inglês *Drug Delivery Systems*), tem sido cada vez mais utilizadas para resolver as limitações de agentes antineoplásicos, visto que podem ser usados para modular a biodistribuição e promover uma maior concentração do ativo no tecido-alvo, melhorando o equilíbrio entre eficácia e toxicidade (CHO et al., 2018).

Dentre os DDS, constituídos por lipídios, as emulsões e os lipossomas são os mais conhecidos. Porém, no começo dos anos 1990, foram descritas as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009). Diferentemente das emulsões, constituídas por um lipídio líquido na temperatura ambiente e estabilizadas por surfactante, as SLN contém um lipídio que é sólido na temperatura ambiente ou corporal (KECK; SPECHT; BRÜSSLER, 2021). Embora sejam de fácil preparo e baixo custo, algumas limitações das SLN ficaram evidentes, tais como a expulsão do fármaco durante o armazenamento e a limitada eficiência de encapsulação, dependente da solubilidade do ativo no lipídio sólido (FREITAS; MÜ, 1998). Neste contexto e já no final da década de 90, foi desenvolvida uma segunda geração de nanopartículas lipídicas, os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC), partículas cujo interior é formado por uma mistura de lipídios sólido e líquido, também estabilizadas por surfactante. O lipídio líquido aumenta a solubilidade dos ativos no interior lipídico dos NLC, favorecendo a encapsulação e impedindo a expulsão do fármaco durante armazenamento, devido a redução da cristalinidade da matriz (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002; SALVI; PAWAR, 2019; GARG et al., 2022; IZZA et al., 2022). Em recente revisão, nosso grupo de pesquisa demonstrou que os NLC são poderosos DDS para melhorar a biodisponibilidade, direcionamento e eficácia dos antineoplásicos, ao mesmo tempo em que diminuem seu efeito tóxico sistêmico, no tratamento de diferentes tipos de câncer (RODRIGUES DA SILVA et al., 2021). Dependendo da metodologia empregada no preparo e da composição da matriz lipídica, há diferentes tipos de NLC, como resumido na Tabela 1.

Tabela 1. Principais tipos de NLC, classificados de acordo com características de sua matriz lipídica (Adaptado DE SALVI, PAWAR, 2019).

<i>Tipos de NLC</i>	<i>Características</i>
NLC Tipo I ou Imperfeito 	A substituição de uma fração de lipídio sólido por lipídio líquido causa a formação de matriz cristalina imperfeita. Este fenômeno promove mais espaço para acomodação do medicamento no interior da partícula e permite maior carga de fármaco.
NLC Tipo II ou Amorfo 	A utilização de lipídios sólidos que permanecem polimorfos após a solidificação e armazenamento, juntamente com os lipídios líquidos favorecem a formação de um núcleo amorfo. Isto é vantajoso em relação aos NLC de tipo I, uma vez que não ocorre cristalização do lipídio sólido e o fármaco permanece incorporado na matriz amorfa.
NLC Tipo III ou Múltiplo 	Este tipo de NLC óleo-em-sólido ou gordura-em-água pode ser desenvolvido pela técnica de separação de fases espontânea. Quando o fármaco mostra maior solubilidade em óleo, esta abordagem pode ser utilizada na formulação de NLC a fim de melhorar a estabilidade e a capacidade de carga do fármaco. Minúsculas gotículas de óleo são dispersas uniformemente na matriz lipídica sólida e este sistema é disperso no meio aquoso.

Normalmente, as nanopartículas variam seu tamanho entre 150 – 300 nm, visto que em maiores ou menores proporções são propensas a serem menos estáveis devido flocculação das partículas ou apresentarem maior toxicidade em razão a elevada concentração de surfactante, respectivamente (BASSO et al., 2022). Com isso, observa-se que o tamanho das partículas, a metodologia de preparo empregada com baixo custo para seu desenvolvimento (economia de tempo e energia) assim como sua biocompatibilidade e estabilidade coloidal são vantagens neste tipo de sistema de entrega (RIBEIRO et al., 2017; DANAEI et al., 2018; RODRIGUES DA SILVA et al., 2020; GARG et al., 2022).

Uma característica interessante dos NLC é a possibilidade de utilizar excipientes funcionais em sua composição, como manteigas e óleos vegetais, que agregam ao DDS suas propriedades farmacêuticas intrínsecas (CARBONE et al., 2019; GERONIMO et al., 2021; RODRIGUES DA SILVA et al., 2020).

1.4 Óleo essencial de lavanda como excipiente funcional das NLC

Os excipientes funcionais caracterizam-se por, além de exercer sua função na organização das formulações farmacêuticas, agregarem propriedades farmacológicas desejáveis às mesmas. Os óleos vegetais, por exemplo, têm sido largamente utilizados como promotores de absorção, mas também como antimicrobianos, anti-inflamatórios, antineoplásicos e analgésicos (SHINDE et al., 2011). Carbone e col. demonstraram que a encapsulação de óleos essenciais em formulações de uso tópico potencializou o efeito terapêutico (antifúngico, cicatrizante) de fármacos, no tratamento de patologias dérmicas (CARBONE et al., 2019, 2020).

Derivados do metabolismo secundário de plantas aromáticas, os óleos essenciais são uma mistura de compostos lipofílicos e componentes altamente voláteis, de baixo peso molecular, extraídos através do processo de arraste a vapor e solventes (BAKKALI et al., 2008; SHANKAR; KARUPPAYIL, 2014; DHIFI et al., 2016). Eles são constituídos, majoritariamente, por terpenos e terpenoides que conferem aos óleos essenciais as características específicas de odor e atividades biológicas (antioxidante, antiinflamatórias antimicrobiana, anticancerígena, etc.) que são de grande interesse para a indústria farmacêutica (BAKKALI et al., 2008; TUREK; STINTZING, 2013; RAUT; KARUPPAYIL, 2014; DHIFI et al., 2016).

Estudos publicados sobre o uso de óleos essenciais no tratamento de câncer (ZUZARTE; SALGUEIRO, 2015; CHEUNG et al., 2020; DI MARTILE et al., 2020) mostraram sua aplicabilidade como terapia combinada ao antineoplásico, ou na redução dos efeitos adversos causados por este. O óleo essencial de lavanda (LO), escolhido aqui como excipiente funcional para compor a matriz lipídica dos NLC, contém como principais ativos monoterpenos como linalol, acetato de linalil, eucaliptol, geraniol, terpinen-4-ol e acetato de lavandulila, que lhe conferem propriedades sedativas, antidepressivas, antimicrobianas, antifúngicas e antiinflamatórias (BIAŁÓN et al., 2019). De acordo com o certificado de análise química (verificar ANEXO 1) expedido pelo fabricante existem mais de 15 constituintes no LO, com porcentagem majoritária para o linalol (27,7 %) e acetato de linalila (28,6 %).

Além disso, há na literatura vários relatos da atividade citotóxica/antiproliferativa do LO contra células tumorais (PRUSINOWSKA; ŚMIGIELSKI, 2014; ZHAO et al., 2017; JUSTUS et al., 2019; OVIDI et al., 2020). Zhao e col. atribuíram a atividade antineoplásica de LO aos compostos linalol e acetato de linalila, que foram capazes de inibir a proliferação celular *in vivo* e *in vitro* e induzir apoptose em células PC-3 e DU145, de câncer de próstata

humano (ZHAO et al., 2017). Ovidi e col. (2020) demonstraram a atividade do LO sobre diferentes linhagens tumorais humanas em cultura: de neuroblastoma (SHSY5Y), de adenocarcinoma de mama (MCF-7), coloretal (Caco2) e de leucemia linfoblástica (CCRF CEM). O efeito citotóxico do LO foi potencializado quando formulado como uma nanoemulsão (OVIDI et al., 2020). Peng e col. observaram que o acetato de linalila pode inibir a melanogênese das células de melanoma por meio do estresse oxidativo, diminuindo a atividade da tirosina quinase através da regulação das vias de sinalização JNK e ERK (PENG et al., 2014). Contudo, mais estudos *in vivo* são necessários para retratar a atividade/potencial antitumoral do LO em células de melanoma.

Assim, nesta dissertação, realizamos a encapsulação da BVC_{S75} em NLC contendo como excipiente funcional o óleo essencial de lavanda. Nosso objetivo foi a avaliação *in vivo* desse DDS, otimizado por planejamento experimental (DoE) e que combina as propriedades intrínsecas do LO (anti-inflamatórias, antissépticas, analgésicas e antineoplásicas) com as da BVC_{S75}, visando melhorar a eficiência terapêutica no tratamento do melanoma.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o potencial antineoplásico de uma formulação otimizada de bupivacaína em excesso enantiomérico (BVC_{S75}) a 0,5%, encapsulada em NLC preparados com óleo essencial de lavanda (NLC-LO-BVC_{S75}), comparativamente ao quimioterápico clássico para tratamento de melanoma cutâneo, a dacarbazina, e também a NLC preparados com excipientes sintéticos (sem LO).

2.2 Objetivos específicos

- Reproduzir a formulação desenvolvida durante a iniciação científica da mestranda (NLC-LO-BVC_{S75}) e verificar se parâmetros de estabilidade físico-química se mantinham.
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* da NLC-LO-BVC_{S75} (por via intratumoral) em modelo de melanoma induzido em camundongos da linhagem *Mus musculus* (C57BL/6J), e compará-la com a do tratamento com NLC preparada com lipídios sintéticos e contendo BVC_{S75} (NLC-CAP-BVC_{S75}).
- Comparar o efeito do tratamento *in vivo* utilizando a formulação NLC-LO-BVC_{S75} com o de uma formulação de NLC com lipídios sintéticos e contendo BVC_{S75}, a fim de avaliar possível efeito potencializador ou sinérgico do óleo de lavanda ao da BVC_{S75}.
- Comparar o efeito dos tratamentos *in vivo* com formulação NLC-LO-BVC_{S75} e com o fármaco comercial de escolha para tratamento do melanoma (dacarbazina), utilizando a mesma via de administração, a fim de verificar efeitos de tratamento *in loco-regional*.
- Avaliar no modelo *in vivo*, parâmetros clínicos, bioquímicos (dosagem de AST, ALT, CK-MB e ureia) e histopatológicos (alterações morfológicas), em decorrência à terapêutica aplicada, a fim de determinar o potencial antineoplásico e possíveis efeitos adversos do tratamento com NLC-LO-BVC_{S75}.
- Avaliar a farmacocinética da bupivacaína aplicada na formulação NLC-LO-BVC_{S75}, em comparação com o fármaco livre (BVC_{S75}) e (NLC-CAP-BVC_{S75}), através da técnica de microdiálise *in situ* (intratumoral), em camundongos da linhagem *Mus musculus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

- Acetato de uranila (Sigma Aldrich, EUA)
- Azul de tripano (Sigma Aldrich, EUA)
- Bupivacaína (Cristália Ind. Farm. Ltda, Brasil)
- Capryol 90 (Gattefossé SAS, França)
- Cera de Abelha Branca (Império das Essências, Brasil)
- Cloridrato de Cetamina (Syntec Tecnologia Ltda, Brasil)
- Dacarbazina (Blau Ind. Farm. S/A, Brasil)
- Eosina (Lafan Química Fina, Brasil)
- Estreptomicina (Sigma Aldrich, EUA)
- Etanol (Labsynth Ltda, Brasil)
- Formol (Sigma-Aldrich, EUA)
- Hematoxilina de Harris (Lafan Química Fina, Brasil)
- Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Nutricell, Brasil)
- Metanol grau HPLC (Merck Millipore, Alemanha)
- Óleo essencial de Lavanda (Terra Flor Aromoterapia, Alto Paraíso de Goiás, Brasil)
Composição no Anexo 1
- Palmitato de Cetila (Merck KGaA, Alemanha)
- Penicilina (Sigma Aldrich, EUA)
- Pluronic[®] F68 (Sigma Aldrich, EUA)
- Soro Fetal Bovino (SFB) (Vitrocell, Brasil)
- Tripsina EDTA (Vitrocell, Brasil)
- Xilazina (Syntec Tecnologia Ltda, Brasil)

3.1.2 Equipamentos

- Analgesímetro (Ugo Basile, Itália)
- Autoclave (Stermax, Brasil)
- AU5800 Series Clinical Chemistry Analyzers (Beckman Coulter)
- Balança analítica digital (AND HM-202, EUA)
- Balança analítica digital (OHAUS®220)
- Banho de ultrassom (Thornton T14, Brasil)
- Banho maria (Nova Ética, Brasil)
- Centrífuga de tubos Falcon (Quimis, Brasil)
- Chapa magnética (Fisatom, Brasil)
- Contador de células automático (Invitrogen, Termo Fisher Scientific, EUA)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Varian® ProStar, EUA).
- Estufa (Shel Lab – incubadora de CO₂, EUA)
- Fluxo Laminar (Trox® Technik, Brasil)
- Infusor PHD22/2000 (Harvard Apparatus, EUA)
- Medidor de pH (Modelo 300M, Analyser Instrumentação Analítica, Brasil)
- Microscópio óptico Leica (Leica Microsystems, Suíça)
- Microscópio invertido (Leica DMI6000)
- Nanosight NS300 (Malvern Panalytical, Reino Unido)
- Paquímetro digital milimetrado (200MM Pd 200 Vonder®)
- Ultra-sonicador de ponta (Vibracell, Sonics & Materials Inc, EUA)
- UltraTurrax S18N-19G (T-18, IKA® Merk, Darmstadt, Alemanha)
- ZetaSizer NanoZS 90 (Malvern Instruments, Reino Unido).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparo dos NLC

As formulações de NLC foram preparadas pelo método da emulsificação-ultrasonicação (GHASEMIYEH; MOHAMMADI-SAMANI, 2018) conforme demonstrado na Figura 3. A fase lipídica, composta de LO e cera de abelha foi aquecida em banho-maria até 10 °C acima da temperatura de fusão do lipídio sólido (cera de abelha = 60°C). Logo após, a BVC_{S75} foi incorporada à fase lipídica e mantida sob agitação magnética até completa solubilização na fase oleosa. Simultaneamente, a fase aquosa composta pela solução do surfactante Pluronic F-68 (P68) foi aquecida na mesma temperatura da fase lipídica. Para formação da pré-emulsão, a fase aquosa foi adicionada gota-a-gota à fase lipídica, sob agitação de 11000 rpm, por 3 min, em agitador Ultra-Turrax® (T18, IKA WerkeStaufen, Alemanha). A pré-emulsão formada foi imediatamente submetida à sonicação de ponta. Nesse processo, a pré-emulsão sofreu agitação ultrassônica com uma microponta de titânio no equipamento Vibracell (Sonicador Sonics – VibraCell), na potência de 50W e 20 KHz de frequência nominal, por 16 minutos com ciclos alternados de 30s (*on-off*). Ao término desta etapa, a nanoemulsão formada foi arrefecida em banho de gelo, até 25 °C, a fim de solidificar as nanopartículas formadas. Formulações controle, sem fármaco, também foram preparadas. É válido ressaltar que a formulação otimizada foi previamente otimizada por planejamento experimental e realizada a caracterização físico-química (GERONIMO et al., 2021). Para melhor avaliação do efeito do LO, NLC sem o composto natural também foram preparadas e caracterizadas utilizando excipientes sintéticos (palmitado de cetila e Capryol®), contendo ou não BVC_{S75} (NLC-CAP-BVC_{S75} e NLC-CAP) (RODRIGUES DA SILVA et al., 2017).

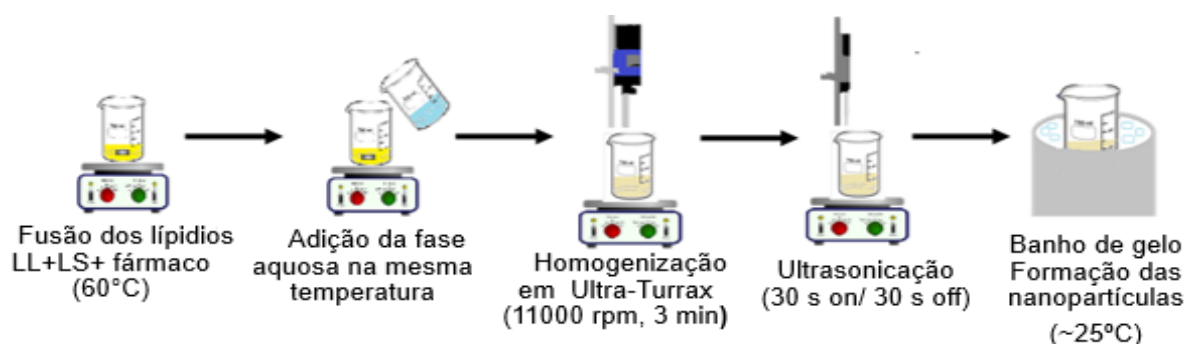


Figura 3. Método de preparo dos NLC.

3.2.2 Medidas de Tamanho, índice de polidispersão, Potencial Zeta e Número de Partículas

A técnica de espalhamento de dinâmico de luz (DLS) foi empregada para determinar o tamanho e índice de polidispersão (PDI) das partículas utilizando o ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcester-Shire, UK), diluindo-se 1000x a dispersão de nanopartículas em água desionizada, 25 °C (n=3). Os valores do potencial Zeta (mV) foram determinados de acordo com o método de eletroforese de laser Doppler, utilizando o ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK) a 25 °C. O número de partículas foi determinado pela diluição da amostra 1:50000 medidas no equipamento NanoSight NS300 (NanoSight, Reino Unido) com software NTA 2.0 Analytical (NanoSight, Reino Unido) equipado com laser verde a 532 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão.

3.2.3 Ensaios *in vivo* em modelo murino

3.2.3.1 Animais

Neste experimento foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6J (*Mus musculus*), fêmeas, adultas de aproximadamente 6 semanas de vida e 20 g de peso, obtidas do CEMIB-UNICAMP (Centro de Bioterismo /UNICAMP). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da UNICAMP (protocolo 5736-1/2021 e 5940-1/2022 – ANEXO 2), que segue as recomendações do Guia para o Cuidado e uso de animais de laboratório. Os animais foram alojados nas seguintes condições: 25 $\pm$ 2 °C, 30-70% de umidade e 12/12 h de ciclo claro/escuro, com comida e água disponíveis *ad libitum*. Antes do início do experimento os animais passaram por um processo de ambientação de 7 dias.

3.2.3.2 Indução do tumor primário nos camundongos

Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Após tricotomização da área, realizou-se a inoculação de células tumorais, ortotopicamente, na região dorsal do camundongo e por via subcutânea (OVERWIJK; RESTIFO, 2000) com uma agulha de 25x5 mm contendo 60 μ L de suspensão celular com 1×10^5 número de células de melanoma murino da linhagem B16-F10 (ATCC, CRL 6475). Ressalta-se que a escolha deste método de indução foi feita com base na literatura e conhecimento prévio do grupo (DE MOURA et al., 2021). O implante intradérmico de células B16-F10 em

camundongos C57BL/6J produz tumores de crescimento agressivo e com perfil invasivo, dada a evolução vertiginosa do tumor (NAKAMURA et al., 2002; CONCEA, 2019). Dessa forma, o crescimento tumoral foi avaliado a cada dois dias; após dez dias (quando o tumor atingiu volume na faixa de 50 - 100 mm³) foram iniciados os tratamentos, conforme esquematizado na Figura 4.

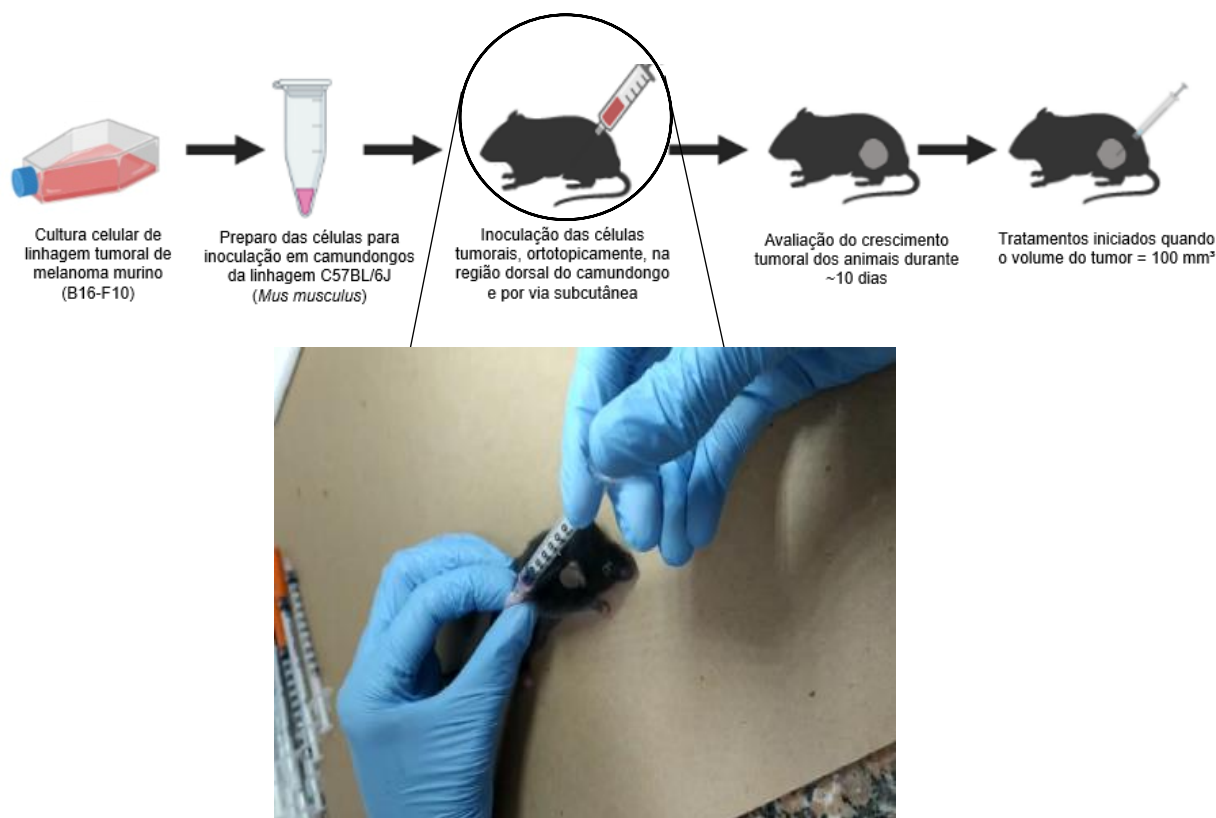


Figura 4. Etapas do modelo ortotópico de indução de melanoma (B16-F10) em camundongos C57BL/6J.

3.2.3.3 Tratamentos e via de administração

A penetração tumoral de nanopartículas e liberação do ativo no local de ação pode ser impactada por distintos fatores como extravasar através de vasos e lacunas endoteliais aumentadas em tumores, penetrar através do estroma denso do microambiente tumoral, permanecer no tecido tumoral por um período de tempo prolongado, além das interações complexas com macrófagos, fibroblastos e células tumorais (ERNSTING et al., 2013). Diante disso, dentre as diferentes vias de administração, estratégias terapêuticas para tratamento local do melanoma têm despertado grande interesse, pois além da neoplasia se desenvolver na pele superficial, a terapia local pode minimizar os efeitos colaterais nos tecidos normais (BENCHERIF et al., 2015; JIANG et al., 2018; YUAN et al., 2019). A administração via intratumoral (IT), i.e. com injeção direta no tumor, tem sido bastante avaliada (HONG et al.,

2020). Segundo estudos realizados, ensaios pré-clínicos com tratamentos via IT têm resultado em maior concentração de nanocarreadores na região tumoral e aumento da eficácia terapêutica quando comparado com aplicação intravenosa (LAMMERS et al., 2006; ZHAO et al., 2018; HONG et al., 2020), além de apresentarem elevada modulação imunológica local, limitada toxicidade sistêmica e simples procedimento de administração (BOMMAREDDY; SILK; KAUFMAN, 2017; HONG et al., 2020).

Ressalta-se que neste trabalho as formulações foram administradas por aplicação via IT e os animais ($n = 5$) divididos aleatoriamente em oito grupos de tratamento, conforme apresentado na Tabela 2. Os animais dos grupos 1 e 2 (sem e com tumor, respectivamente) receberam apenas solução salina estéril. A dosagem do quimioterápico (grupo 3) (80 mg/kg de dacarbazina) foi baseada em estudo prévio da literatura (ZHANG et al., 2013). A dose de BVC_{S75} (grupo 4) foi de 8 mg/kg (DURST et al., 2021). Os animais dos grupos 5 e 7 foram tratados com NLC controle, sem fármaco, (natural e sintética, respectivamente) em mesma concentração de partículas das formulações contendo BVC_{S75} ($3,1 \times 10^{13}$ partículas/mL). E, os grupos 6 e 8 foram tratados com NLC contendo BVC_{S75} (natural ou sintética, respectivamente) (8 mg/kg).

Estes procedimentos foram realizados a cada dois dias em todos os grupos (conforme demonstra na Tabela 2), totalizando quatro aplicações no término dos tratamentos. A cada aplicação, foi avaliado o peso dos animais e o crescimento tumoral, com auxílio de um paquímetro digital milimetrado (200MM Pd 200 Vonder®). Os animais também foram observados diariamente, quanto a possíveis sinais de reações adversas (letargia, incapacidade de perambular, perda de peso corporal). A massa corporal e a ração dos animais foram quantificadas semanalmente, utilizando-se balança digital analítica modelo OHAUS®220.

Tabela 2. Descrição dos grupos experimentais para os tratamentos *in vivo* (melanoma induzido). Foram realizadas quatro sessões de tratamento a cada dois dias (quatro dias de tratamento no total).

Grupos	n	Via de administração	Tratamento
1	5	IT	Controle sem tumor (animal saudável - <i>Naive</i>)
2	5	IT	Controle com tumor (animal com tumor, tratado com solução salina estéril 0,9%)
3	5	IT	Solução de Dacarbazina
4	5	IT	Solução BVC _{S75} livre (0,5%)
5	5	IT	NLC-LO
6	5	IT	NLC-LO-BVC _{S75}
7	5	IT	NLC-CAP
8	5	IT	NLC-CAP-BVC _{S75}

NOTA: NLC-sintéticas: NLC-CAP = carreadores lipídicos nanoestruturados contendo palmitato de cetila (lipídio sólido) e Capryol® (lipídio líquido); NLC-CAP-BVC_{S75} = carreadores lipídicos nanoestruturados contendo palmitato de cetila, Capryol® e BVC_{S75} a 0,5% encapsulada.

3.2.3.4 Avaliação do volume tumoral para a determinação da curva de crescimento

As dimensões dos tumores dos animais foram mensuradas, a cada 24 h após cada tratamento, em todos os grupos experimentais, inclusive no dia da eutanásia, com auxílio de um paquímetro digital milimetrado (200MM Pd 200 Vonder). O volume tumoral total (mm³) foi calculado considerando-se o comprimento e a largura do tumor (em mm), de acordo com a Equação 1 (DOS SANTOS et al. 2018),

$$\text{Volume tumoral (VT)} = \frac{\text{comprimento do tumor} \times \text{largura do tumor}^2}{2} \quad (1)$$

O peso do tumor (no dia da eutanásia) foi quantificado em balança analítica modelo OHAUS®220. Após 7 dias decorridos da última sessão de tratamento, todos os animais foram eutanasiados para realização de exames complementares: análise bioquímica e histopatológica. A Figura 5 mostra uma linha do tempo representativa, com análise geral dos procedimentos. É importante ressaltar que os tratamentos foram realizados somente quando VT (volume tumoral) atingiu faixa de 50 - 100 mm³.

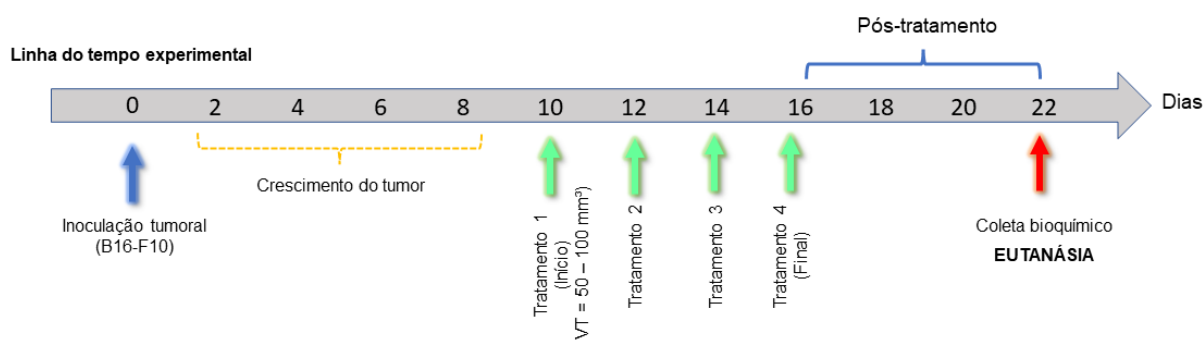


Figura 5. Linha do tempo – Análise geral dos procedimentos realizados nos animais.

3.2.3.5 Análise de sobrevida

A análise de probabilidade de sobrevida dos grupos a partir da aplicação dos tratamentos foi calculada pelo método de Kaplan-Meier (BLAND, ALTMAN 1998), o qual é utilizado para estimar e representar graficamente a probabilidade de sobrevivência, em um intervalo de tempo. O teste não paramétrico de *Log-rank* foi utilizado para comparação das curvas entre grupos, sendo considerada significativa variação de $p < 0,05$. Os dados estatísticos foram analisados com auxílio do software GraphPad Prism® 8.0.

3.2.3.6 Avaliação de marcadores bioquímicos

Após 7 dias do término dos tratamentos, amostras de sangue foram coletadas via punção cardíaca para a dosagem dos analitos bioquímicos: ureia (mg/dL), ferro (mg/dL), CK-MB (mg/dL), AST (U/L), ALT (U/L). O sangue coletado foi acondicionado em tubos de ensaio sem anticoagulante para a obtenção do soro. As análises de dosagem de ALT, AST, CK-MB e ureia foram realizadas por método cinético e dosagem de ferro por reação colorimétrica de ponto final. Todas as dosagens foram feitas no equipamento automatizado AU5800 Series Clinical Chemistry Analyzers (Beckman Coulter).

3.2.3.7 Avaliação histopatológica

O procedimento de eutanásia foi realizado através de superdosagem de anestésico (Cetamina - 300 mg/kg e xilazina - 30 mg/kg), administrado pela via intraperitoneal. Em seguida, os camundongos foram colocados sobre um campo operatório e, utilizando-se um bisturi, realizou-se incisão frontal, reta, e a retirada de: pulmão, fígado, baço, rins e tumor. Em seguida, os órgãos coletados foram colocados em recipientes com solução de formol a 10 % e tampão fosfato (pH 7,0). As análises foram realizadas após confecção das lâminas, conforme protocolo padrão já consolidado na literatura (HEWITSON et al. 2010) para análise histológica. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina/eosina (HE), analisados e fotografados em um microscópio óptico Leica (Leica Microsystems, Suíça) e processadas no aplicativo Leica® versão 4.2.0 (Leica Microsystems, Suíça) em ampliações de 10 × e 20 ×. Foram avaliadas possíveis alterações morfológicas dos órgãos dos animais, como áreas de inflamação, necrose e formação de metástases nos órgãos analisados (pulmão, fígado, baço, rins e tumores) entre os grupos experimentais em relação ao grupo saudável (*Naive*) e controle com tumor. Para avaliação do grau de invasão do tumor na epiderme do animal foi empregada a classificação de Clark, em que: I) o câncer está restrito à epiderme; II) há invasão da derme papilar; III) o tumor preenche toda a derme papilar sem invadir a derme reticular; IV) há invasão de derme reticular e V) há invasão da hipoderme (CLARK et al., 1969; SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011; DE MOURA et al., 2021). Também foram analisados critérios histológicos, considerados como resposta do tratamento das formulações desenvolvidas no melanoma: necrose (VERMA et al., 2013), redução do tamanho da região neoplásica (CARLSSON; GULLBERG; HAFSTRÖM, 1983), presença de infiltrado inflamatório (VAKKILA; LOTZE, 2004; LADSTEIN et al., 2012) e fibroplasia estromal (RUITER et al., 2002).

3.2.4 Estudo farmacocinético (microdiálise local - tumoral)

A análise de farmacocinética da BVC_{S75} (livre e encapsulada) em modelo xenográfico de melanoma foi realizada utilizando-se o método de microdiálise tecidual (UNGERSTEDT, 1991; MCDONALD et al., 2002; JOUKHADAR; MÜLLER, 2012). Para isso, foram utilizadas sondas CMA 20 (CMA Microdialysis, Kista, Suíça). Previamente, as sondas foram calibradas *in vitro*, assegurando-se que a % de recuperação da sonda (diálise) e a % de perda (retrodiálise) fossem iguais para BVC_{S75} (dados não mostrados). O fluxo utilizado foi de 1,5 µL/min, mantido com uso de um infusor PHD22/2000 (Harvard Apparatus, MA, USA) com seringas de 1 mL. O líquido de perfusão utilizado foi tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4. O método analítico de CLAE, foi utilizado para quantificação de BVC_{S75} (GERONIMO et al., 2021). A microdiálise foi realizada nos animais entre o 10º e o 14º dias após indução do melanoma, quando os tumores apresentavam tamanhos entre 200 - 400 mm³.

Para a coleta das amostras, os camundongos (n = 5) foram previamente anestesiados com uretano (1000 mg/kg). Após, as sondas foram inseridas nos tumores, tangencialmente, em seu terço superior (Figura 6). Em seguida, as sondas foram mantidas por uma hora para estabilização. As formulações contendo 0,5% de BVC_{S75}, em solução ou encapsulada, em NLC natural (NLC-LO-BVC_{S75}) ou sintética (NLC-CAP-BVC_{S75}), foram injetadas (dose de BVC_{S75}, 8 mg/Kg) no centro do tumor. Após 3 min, iniciou-se a coleta do dialisado, em intervalos de 30 minutos, com posterior quantificação por CLAE. No fim de cada experimento, em 2 animais de cada grupo, a solução tampão foi trocada por uma solução de BVC_{S75} a 5 µg/mL e a sonda foi estabilizada por uma hora para posterior coleta e cálculo da % de perda da sonda no tecido (retrodiálise). Os outros 3 animais de cada grupo, após a coleta, foram eutanasiados e o tumor dissecado. O tecido dissecado foi submetido a extração ácida (ISTENIC et al., 2021) para determinação da concentração residual de BVC_{S75} no tumor.

Os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram calculados a partir dos resultados de concentração de BVC_{S75} *in situ* (com tratamento de dados através do software PKanalix (documentation version 2021 ©Lixoft)): I) constante de eliminação, ou k_e , (fração de fármaco eliminada por tempo, calculada a partir da inclinação da reta do gráfico logaritmo da concentração de BVC_{S75} em função do tempo); II) meia vida tecidual ($t_{1/2}$), que é o tempo necessário para reduzir a concentração do fármaco pela metade, no tecido; III) área sob a curva do gráfico (ASC) do logaritmo da concentração de BVC_{S75} em função do tempo e IV) concentração inicial tecidual. Cada parâmetro foi estatisticamente avaliado, utilizando-se o teste t de Tukey no software GraphPad Prism (Califórnia, EUA), versão 8.



Figura 6. Análise farmacocinética intratumoral no melanoma murino de camundongos C57BL/6J utilizando a técnica de microdiálise local.

3.2.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados com o software GraphPad Prism[®] 8.0, utilizando-se o teste análise da variância (ANOVA) bifatorial para verificar se houve diferenças significativas entre os testes realizados (*in vivo*), sendo a significância considerada de $p < 0,05$. Para determinar em que pontos ocorreram diferenças, foi utilizado o teste *Post hoc* de Tukey, por meio do cálculo das diferenças mínimas significantes, para comparar a maior e a menor média nos intervalos, assim como o desvio padrão obtido.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Formulação NLC-LO-BVC_{S75}: características físico-químicas, teste de liberação *in vitro* e viabilidade celular

A formulação utilizada na dissertação (NLC-LO-BVC_{S75}), foi previamente otimizada por planejamento experimental (DoE), pelo método quimiométrico *Quality by Design* e caracterizada (quanto a estabilidade física, por medidas de DSC, DRX, MET, ensaio *in vitro* de cinética de liberação e viabilidade celular), durante a iniciação científica da mestrandia, com resultados publicado no artigo “*Development of S75:R25 bupivacaine-loaded lipid nanoparticles functionalized with essential oils for treating melanoma*”, pelo Journal of Chemical Technology & Biotechnology no ano de 2021 (GERONIMO et al., 2021). Os resultados da otimização e caracterização da nanoformulação podem ser visualizados no endereço: <https://doi.org/10.1002/jctb.6715>. A Tabela 3 mostra a composição dos NLC otimizados, utilizados nesta dissertação, para tratamento dos animais com melanoma induzido.

As propriedades físico-químicas das nanopartículas como tamanho, forma, polidispersividade, carga superficial e vias de administração são parâmetros que impactam na farmacocinética, biodistribuição, penetração intratumoral e biodisponibilidade no tumor (CHO et al., 2008; ERNSTING et al., 2013; ELOY, 2016; DANAIE et al., 2018). Outro importante fator que também afeta a entrega de ativos em sistemas de liberação nanométricos é a biologia do tumor (ERNSTING et al., 2013). A vasculatura tumoral é muito diferente da encontrada nos tecidos normais, pois apresentam imperfeições (capilares fenestrados) por onde as nanopartículas podem permear e acumular devido efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR), que permite que os nanocarreadores com tamanhos menores de 200 nm extravasem da circulação através da vasculatura tumoral e aumentem a concentração de ativos no interior do tumor (STEICHEN; CALDORERA-MOORE; PEPPAS, 2013; ELOY, 2016; DANAIE et al., 2018).

Os resultados de caracterização das nanoformulações, mostrados na Tabela 4, revelam formulações com características ideais de tamanho e polidispersão, para aplicação infiltrativa em tecido tumoral (o menor tamanho de partícula favorecem melhor direcionamento no tecido tumoral devido passagem das nanopartículas de forma passiva – graças ao “efeito EPR (DANAIE et al., 2018) e alta eficiência de encapsulação, entre 89% e 55,5% para NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75}, respectivamente.

A manutenção dos parâmetros (tamanho, PDI, potencial Zeta e concentração de partículas/mL) confirmaram a estabilidade físico-química das formulações por até um ano, quando armazenados na temperatura ambiente (RODRIGUES DA SILVA et al., 2017; GERONIMO et al., 2021). É importante destacar que os dados representados na Tabela 4 da formulação NLC-LO-BVC_{S75} são atuais (nova preparação) e condizem com os resultados anteriores publicados no artigo citado.

Tabela 3. Composição da matriz lipídica das formulações otimizadas e seus controles (sem fármaco).

Tipo de lipídio	Formulação	Lipídio sólido	%	Lipídio líquido	%	Surfactante	%	Fármaco %
Natural	NLC-LO	CA	10,5	LO	4,5	P68	5	-
	NLC-LO-BVC _{S75}							BVC _{S75} 0,5
Sintético	NLC-CAP	PC	9,0	CAP	4,0	P68	5	-
	NLC-CAP-BVC _{S75}							BVC _{S75} 0,5

Nota: CA = Cera de abelha, CAP = Capryol®, LO = Óleo essencial de lavanda, P68 = Pluronic F68, PC = Palmitato de cetila.

Tabela 4. Caracterização das formulações NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75} e de seus respectivos controles (sem fármaco), quanto aos diâmetros médios (tamanho), índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta, concentração de nanopartículas (nanopartículas/mL) e eficiência de encapsulação (% EE).

Formulação	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Concentração de nanopartículas (x10 ¹³ /mL)	%EE
NLC-LO	195,4 ± 1,8	0,138 ± 0,03	- 26,8 ± 0,8	3,1 ± 0,2	-
NLC-LO-BVC _{S75}	200,5 ± 2,4	0,140 ± 0,02	- 34,0 ± 0,6	3,8 ± 0,3	89,0 ± 2,3
NLC-CAP	156,0 ± 2,5	0,123 ± 0,01	- 15,7 ± 0,6	7,4 ± 0,4	-
NLC-CAP-BVC _{S75}	165,9 ± 1,5	0,123 ± 0,05	- 37,0 ± 1,1	8,8 ± 0,1	55,5 ± 3,6

A caracterização dos NLC preparados com o lipídio líquido sintético Capryol foi publicada anteriormente (RODRIGUES DA SILVA et al., 2017) e não será abordada nesta dissertação.

Os NLC preparados com LO (controle, sem fármaco, e com BVC_{S75}) foram caracterizados por MET e mostraram morfologia esférica com bordas bem definidas (Figura 7A e B), revelando que o excipiente funcional escolhido foi eficiente na formação de nanopartículas características (arredondadas) e que a adição do AL ao sistema não alterou sua morfologia. Além disso, a diminuição na intensidade dos picos de transição de fase observada em análises de DSC e a perda do padrão de difração, em análises de DRX, dos constituintes da nanoformulação vs. nanopartículas revelaram modificação estrutural no arranjo lipídico no interior da NLC, caracterizando perda da cristalinidade / arranjo amorfo da matriz lipídica, favorecendo a incorporação do fármaco na matriz lipídica (GERONIMO et al., 2021). O teste de liberação *in vitro*, a 37 °C (Figura 7C) mostrou que a BVC_{S75} em solução (BVC_{S75} livre)

atingiu liberação total (100%) após 4 h de ensaio, enquanto NLC-LO-BVC_{S75} prolongou o tempo de liberação do fármaco, sendo o equilíbrio alcançado após ~ 24h. Testes de citotoxicidade *in vitro*, em células de melanoma humano (SK-MEL-25) e murino (B16-F10) revelaram diminuição na IC₅₀ em ambas linhagens tumorais: de 0,28 mM BVC_{S75} em solução para 0,06 mM com NLC-LO-BVC_{S75} na linhagem SK-MEL-25 e de 0,82 mM (BVC_{S75}) para 0,16 mM na linhagem B16-F10 (NLC-LO-BVC_{S75}) (GERONIMO et al., 2021).

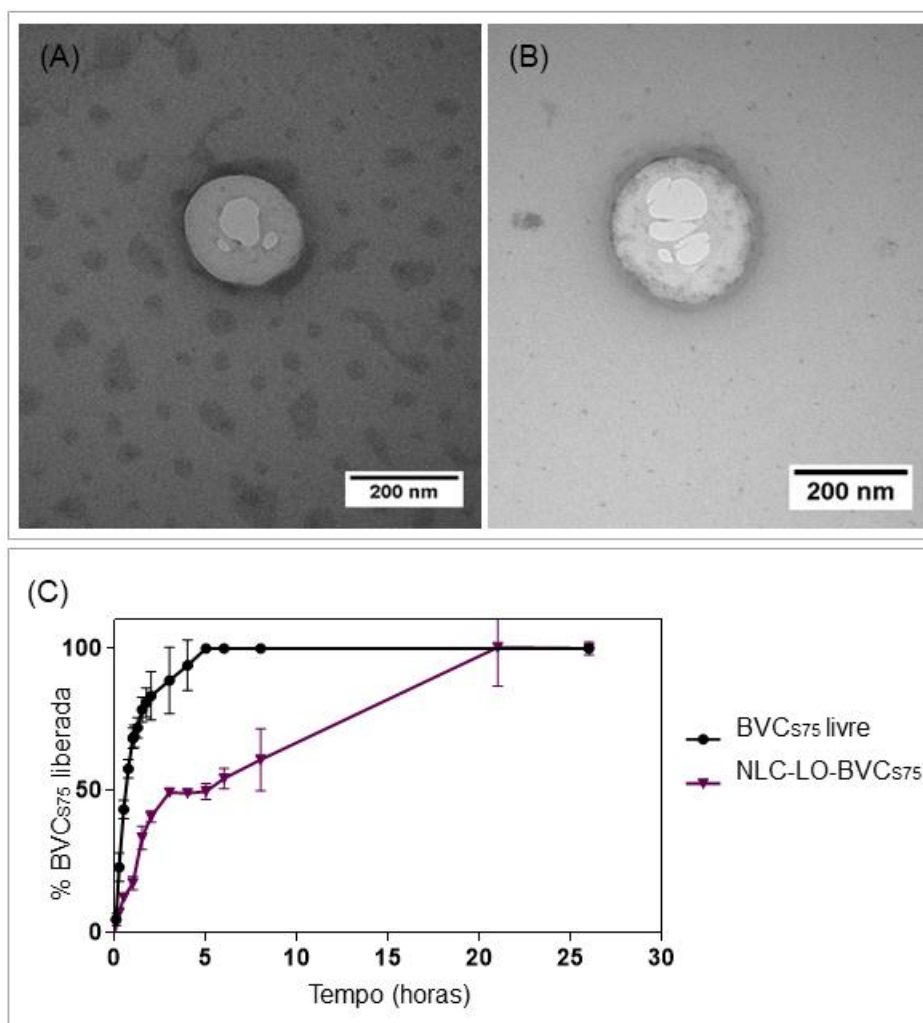


Figura 7. Fotomicrografias em microscopia eletrônica de transmissão (MET) das formulações de NLC-LO (A) e NLC-LO-BVC_{S75} (B). Magnificação 100.000 x. (C) Curvas de liberação *in vitro* de BVC_{S75}: em solução aquosa (BVC_{S75} livre) ou incorporada na formulação NLC-LO-BVC_{S75}, a 37 °C e pH 7,4. Adaptado de (GERONIMO et al., 2021).

Após caracterização físico-química da formulação NLC-LO-BVC_{S75} foram realizados ensaios de avaliação da atividade antitumoral, dos eventuais efeitos tóxicos e de parâmetros clínicos em animais tratados com a nanoformulação e seus controles, a fim de determinar o

potencial antineoplásico e possíveis efeitos adversos do tratamento proposto para o melanoma cutâneo.

4.2 Inibição do crescimento tumoral em modelo *in vivo* de melanoma

A avaliação da eficácia terapêutica das nanoformulações: funcionalizada com óleo essencial de lavanda contendo BVC_{S75} (NLC-LO-BVC_{S75}), seu controle sem fármaco (NLC-LO), preparada com lipídios sintéticos (NLC-CAP-BVC_{S75}) e seu controle (NLC-CAP) foi estudada em modelo xenográfico, em camundongos da espécie C57BL/6J portadores de melanoma induzido com linhagem de célula tumoral B16-F10. Em todos os grupos, os tratamentos foram iniciados quando o volume tumoral atingiu uma faixa de crescimento entre 50 – 100 mm³. A eficiência dos tratamentos levou em consideração a diminuição do volume tumoral (VT) nos animais, medido com o auxílio de um paquímetro durante todo o período de tratamento. A Figura 8 mostra os resultados obtidos, relativos à variação do crescimento do tumor durante o período de tratamento.

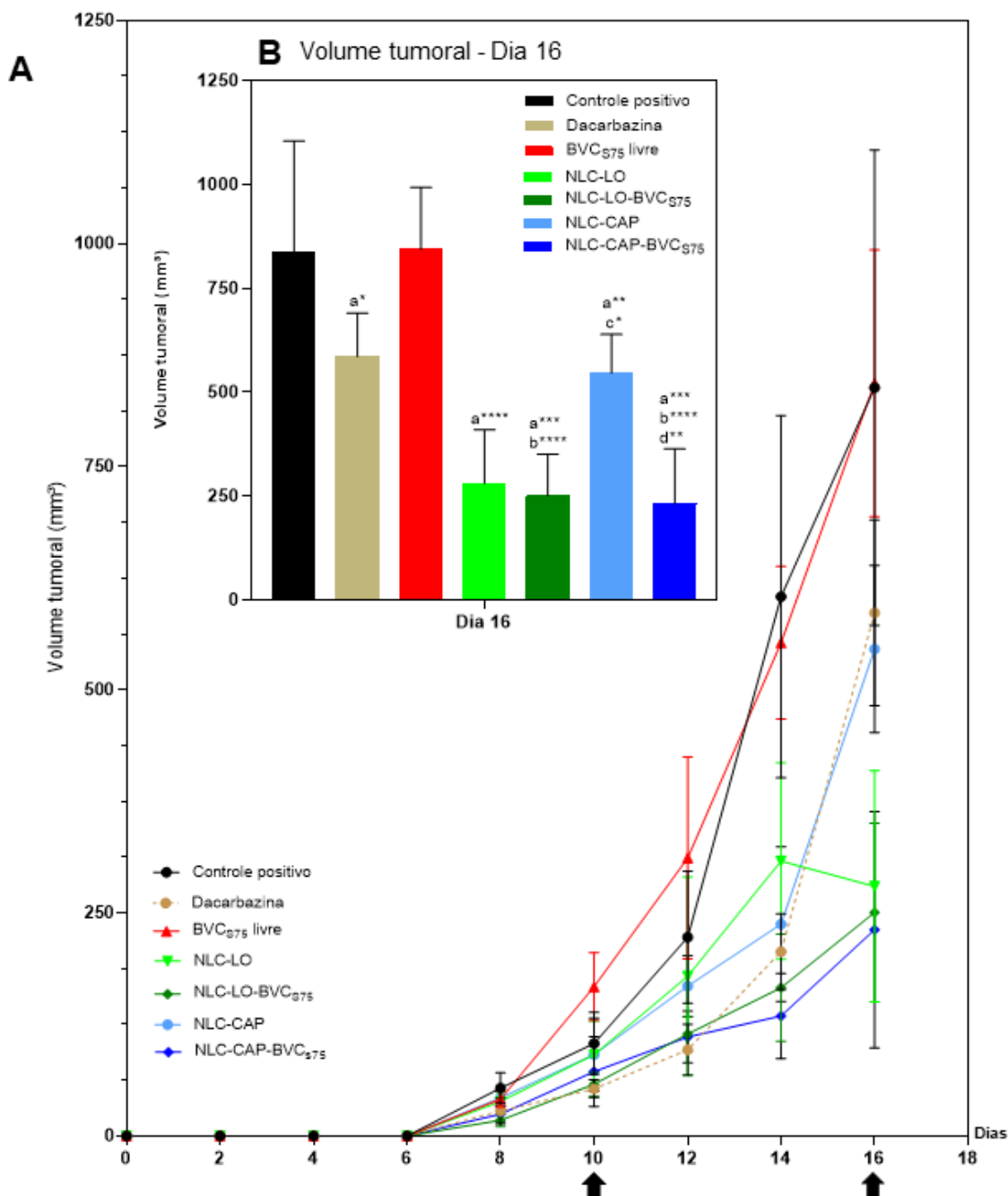


Figura 8. Avaliação do volume tumoral durante o período de tratamento. **(A)** Gráfico da evolução do volume tumoral durante o tratamento dos grupos: Controle positivo = solução NaCl 0,9%, Dacarbazina = fármaco de referência, BVC_{S75} livre = solução de 0,5% de BVC_{S75} livre, NLC-LO = carreadores lipídicos nanoestruturados com excipiente óleo de lavanda, NLC-LO-BVC_{S75} = carreadores lipídicos nanoestruturados com óleo de lavanda e bupivacaína a 0,5%, NLC-CAP = carreadores lipídicos nanoestruturados com excipiente sintético e NLC-CAP-BVC_{S75} = carreadores lipídicos nanoestruturados com lipídio sintético e bupivacaína a 0,5%. **(B)** Volume tumoral dos grupos experimentais no dia 16 (último tratamento realizado). As setas pretas indicam o início (dia 10) e o fim (dia 16) dos tratamentos. Os dados representam a média $\pm$ DP (n = 5). Análise estatística Two-way ANOVA com *post hoc* Tukey. **a**, em relação ao Controle positivo; **b**, em relação a BVC_{S75} livre; **c**, em relação a NLC-LO; **d**, em relação a NLC-CAP. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

Como mostra a Figura 8, o grupo Controle Positivo apresentou crescimento rápido e exponencial do tumor (de 103,56 a 838,53 mm³). O tratamento com BVC_{S75} livre causou baixa redução no crescimento tumoral, quando comparado ao grupo Controle Positivo (16,7% de

redução no VT). Contudo, nos grupos tratados com BVC_{S75} encapsulada nos NLC (**NLC-LO-BVC_{S75}** e **NLC-CAP-BVC_{S75}**) houve diminuição significativa do volume tumoral (70,1% e 72,4% de redução, respectivamente) em relação ao Controle Positivo. Este resultado evidencia o papel das nanoformulações, cuja liberação sustentada faz com que o fármaco permaneça por mais tempo no local de ação (WU CHUANG et al., 2022) causando maior efeitos nas células tumorais. Segundo a literatura a BVC_{S75} pode modificar a resposta imune antitumoral, através da diminuição de citocinas pró-inflamatórias, apoptóticas além do efeito anestésico local (CHAMARAUX-TRAN; PIEGELER, 2017; BEZU et al., 2022; WU CHUANG et al., 2022). Sobre a nanoencapsulação, relatos anteriores demonstram potencialização do efeito do fármaco quando em NLC (TAGNE; KAKUMANU; NICOLOSI, 2008; OVIDI et al., 2020; GERONIMO et al., 2021). Apesar de a NLC preparada com lipídio sintético (NLC-CAP-BVC_{S75}) ter causado maior regressão do volume tumoral que a NLC-LO-BVC_{S75}, não houve diferença estatística significativa entre as formulações, somente entre o tratamento realizado com a BVC_{S75} livre e encapsulada, com ambas as NLC ($p < 0,0001$). Os controles, **NLC-LO** e **NLC-CAP**, também causaram significativa redução do crescimento do tumor em relação ao controle positivo (66,6% e 34,9%, respectivamente, com $p < 0,05$), demonstrando ação citotóxica da formulação ou de seus excipientes (KARNIEL; BEITNER, 2000; SUZUKI et al., 2011; LIU; DILGER; LIN, 2020; SCHWARTZ; BEITNER, 2000; ZHAO et al., 2017; RAHIMINEJAD et al., 2018).

Outro dado interessante é a comparação entre o efeito da diminuição do VT entre os grupos tratados com as formulações controles (NLC-LO e NLC-CAP) em relação as contendo BVC_{S75} encapsulada (NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75}). Durante o período de tratamento (Figura 8B), não houve uma diminuição significativa do VT do grupo de animais tratados com NLC-LO-BVC_{S75} em relação ao tratamento com o controle NLC-LO (redução de 10,52%). Todavia, no tratamento realizado com NLC-CAP-BVC_{S75} em relação ao seu controle NLC-CAP, é possível verificar uma redução significativa de 57,62% do VT ($p < 0,01$). Este resultado pode indicar maior potencial citotóxico da formulação NLC-sintética quando comparada a NLC-natural durante o período de tratamento.

A dacarbazina, aprovada desde a década de 1970 como tratamento padrão para melanoma metastático, é um antineoplásico alquilante que tem como mecanismo de ação a formação de ligações cruzadas de seu grupamento alquila com os filamentos de DNA impedindo sua replicação (EGGERMONT et al., 2004; DOMINGUES et al., 2018; BOUCHEREAU et al., 2021). Aqui, o tratamento com dacarbazina em animais resultou em inibição de 30,1 % no volume tumoral em relação ao Controle positivo. Segundo Biteghe e col.,

apesar de apresentar respostas tumorais eficientes em aproximadamente 13-20% dos pacientes, as baixas taxas de resposta terapêutica à dacarbazina se devem à quimiorresistência na maior parte dos casos (BITEGHE et al., 2020). Desta forma, a busca por novas formas de tratamentos, envolvendo associações entre fármacos, terapias e utilização de DDS tem sido estudada, visando melhora do prognóstico do paciente (NAJAR; DUTZ, 2008; TAGNE; KAKUMANU; NICOLSI, 2008; ZHANG et al., 2013; HERSH et al., 2015; HAFEEZ; KAZMI, 2017; LIU et al., 2017; MISHRA et al., 2019; LI; HAN, 2020).

Na comparação entre os tratamentos realizados, observou-se maior diferença significativa na redução do volume tumoral para as formulações NLC-LO, NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75} em relação ao controle positivo (*inset* da Figura 8 – gráfico do volume tumoral no dia 16). Este resultado mostra provável ação das nanopartículas e do ativo diretamente nas células tumorais, em razão da maior proporção dos nanocarreadores no tecido-alvo, promovendo aumento da eficiência terapêutica (ELOY, 2016).

Outro dado importante foi a avaliação do efeito dos tratamentos após sua aplicação. Para isso, os tumores foram avaliados até 7 dias após o término da última dose aplicada, como mostrado na Figura 9. Pode-se perceber que todos os tratamentos com nanopartículas (NLC-LO-BVC_{S75}, NLC-CAP-BVC_{S75} e NLC-CAP) inibiram o rápido crescimento tumoral exibido no grupo controle positivo e foram mais eficazes que o tratamento com dacarbazina e BVC_{S75} livre no pós-tratamento (Figuras 9 A, C).

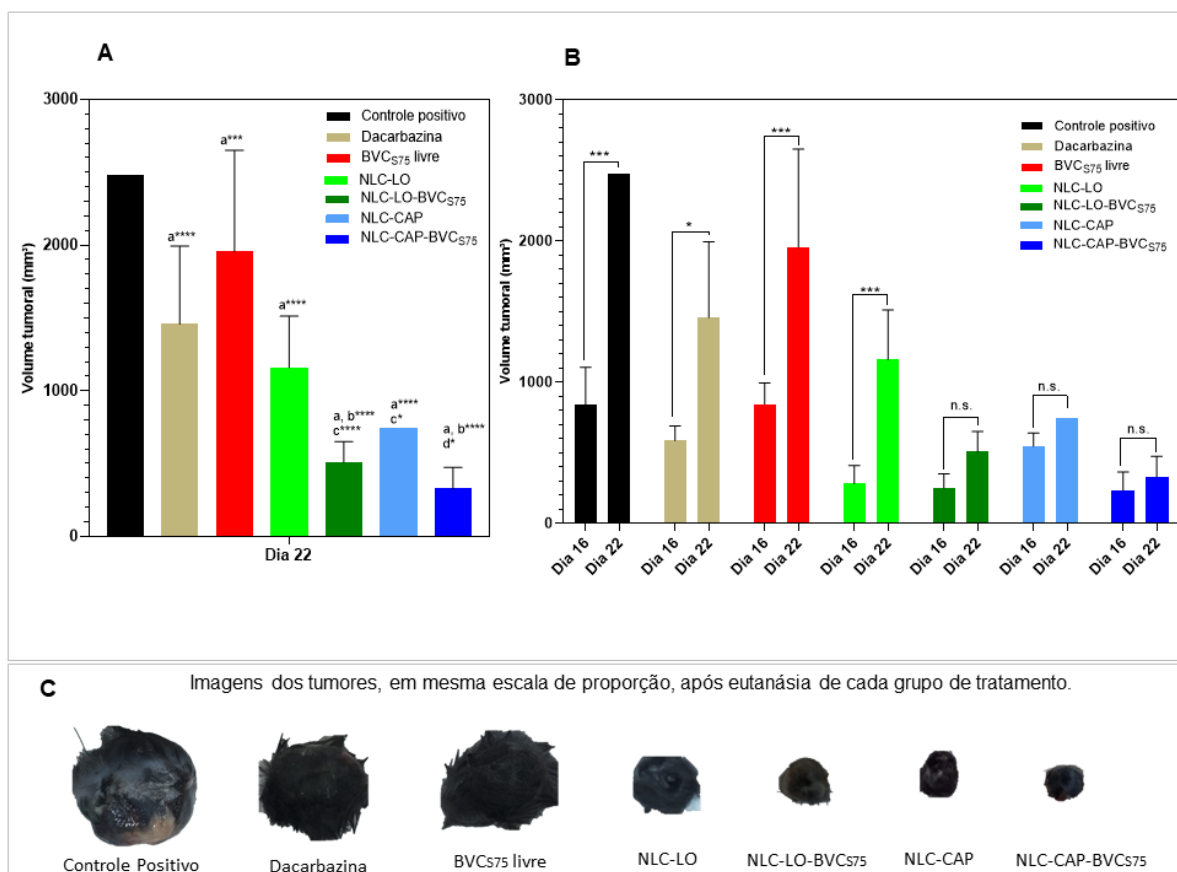


Figura 9. Análise do volume tumoral do melanoma entre o período pós-tratamento (entre o dia do último tratamento (Dia 16) e sete dias após (Dia 22)). **(A)** Gráficos da evolução do crescimento do volume tumoral no dia 22. **(B)** Análise do volume tumoral durante o período de pós-tratamento; diferenças estatísticas entre os dias 16 e 22. **(C)** Exemplos de tumores representativos de cada grupo de tratamento, excisados após eutanásia (dia 22), em mesma escala de proporção. Os dados representam a média $\pm$ DP ($n = 5$). Análise estatística por Two-Way ANOVA com *post hoc* Tukey. **a**, em relação ao Controle positivo; **b**, em relação a BVC_{S75} livre; **c**, em relação a NLC-LO; **d**, em relação a NLC-CAP. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; n.s. = não significativo.

Assim, se compararmos o VT de cada grupo de tratamento entre o dia 16 e 22 (Figura 9B), houve diferença estatística no VT dos grupos controle positivo (sem tratamento, $p < 0,001$), dacarbazina ($p < 0,05$), BVC_{S75} livre e NLC-LO ($p < 0,001$), indicando crescimento tumoral significativo após a última sessão de tratamento aplicada. Em relação ao volume tumoral no 16º dia, os tratamentos com NLC-LO-BVC_{S75}, NLC-CAP-BVC_{S75} e NLC-CAP mantiveram a inibição do crescimento tumoral em relação ao grupo controle positivo, dacarbazina e BVC_{S75} livre, indicando melhor efetividade na redução do VT pós-tratamento. Esses resultados no período pós-tratamento destacam o efeito citotóxico da BVC_{S75} uma vez que o efeito da formulação NLC-LO-BVC_{S75} foi potencializado em comparação à formulação controle com excipiente natural (NLC-LO), que apresentou crescimento tumoral ($p < 0,0001$) entre os dias 16-22 (Figura 9A). A maior diminuição do VT dos animais tratados com NLC-LO-BVC_{S75} nos permitem inferir que LO e BVC_{S75} conferem efeito aditivo ao tratamento tumoral, se

comparados as formulações com os ativos isolados (CARBONE et al., 2019, 2020; PUGLIA et al., 2019).

A Tabela 5 mostra, em porcentagem, o crescimento tumoral pós-tratamento. Dentre os tratamentos realizados as formulações NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75} levaram ao menor crescimento do tumor, medido no período pós-tratamento, com a maior diferença estatística em relação ao grupo tratado com o fármaco livre BVC_{S75} ($p < 0,0001$). Em relação à BVC_{S75}, estes resultados demonstram que a encapsulação nos NLC, por promover uma liberação sustentada (Figura 7C), protege o fármaco encapsulado da degradação e aumentam o tempo de permanência da BVC_{S75} no local de ação, como relatado por outros pesquisadores (SEVERINO et al., 2012; RODRIGUES DA SILVA et al., 2021). Assim, espera-se que maior quantidade de BVC_{S75} seja encontrada na área do tumor após o tratamento com as formulações NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75}, o que explicaria o menor crescimento do tumor no dia 22 (102,8% e 41,1%, respectivamente, em comparação ao grupo Controle Positivo) e frente aos controles dacarbazina e BVC_{S75} livre, como mostra a Figura 9C. Ressalta-se que as formulações de NLC contendo BVC_{S75} (natural e sintética) não apresentaram diferença estatística significativa entre si.

Tabela 5. Percentual de crescimento do volume tumoral no período pós-tratamento (7 dias após último tratamento) dos grupos experimentais, em relação ao Controle Positivo.

Grupos de tratamento	n	% de crescimento tumoral
Controle Positivo	5	195,2%
Solução de Dacarbazina	5	148,7%
Solução BVC _{S75} livre 0,5%	5	131,8%
NLC-LO	5	314,1%
NLC-LO-BVC _{S75}	5	102,8%
NLC-CAP	5	36,8%
NLC-CAP-BVC _{S75}	5	41,1%

Entre as formulações de NLC e seus respectivos controles, sem BVC_{S75}, foram observadas diferenças estatísticas no pós-tratamento, como mostra a Figura 9A, com $p < 0,0001$ para NLC-LO-BVC_{S75} em relação a NLC-LO (redução de 56,17% do VT) e $p < 0,05$ para NLC-CAP-BVC_{S75} em relação a NLC-CAP (redução de 56,29% do VT). Essas diferenças revelam a melhor atuação da formulação na diminuição do volume tumoral quando BVC_{S75} se encontra encapsulada nos NLC.

Nas formulações controle, NLC-LO e NLC-CAP, houve um crescimento tumoral de 314,11% e 36,79%, respectivamente, em relação ao Controle Positivo, 7 dias após a última sessão de tratamento ($p < 0,05$). Este resultado indica que as formulações sem BVC_{S75} também exercem um efeito direto no tumor. Na formulação controle composta por lipídio natural (NLC-

LO), houve diminuição do tumor somente durante as sessões de tratamento (com inibição de 66,6% do VT), ou seja, no pós-tratamento as células tumorais restantes cresceram de forma maior em relação ao grupo dos animais do controle positivo. No grupo de animais tratados com NLC composta por lipídio sintético (NLC-CAP) além da diminuição tumoral durante as sessões de tratamento, no pós-tratamento o crescimento do tumor foi baixo (36% em relação ao controle positivo), valor similar ao encontrado com a formulação NLC-CAP-BVC_{S75} (41,1%). Assim, a formulação NLC-CAP provavelmente é responsável por este resultado encontrado no pós-tratamento, uma vez que que BVC_{S75} livre não apresentou tal efeito. Provavelmente os lipídios sintéticos utilizados têm um efeito citotóxico nas células tumorais. Em relação ao palmitato de cetila (lipídio sólido utilizado na formulação), estudos na literatura descrevem um efeito tóxico deste excipiente da matriz lipídica das NLC em linhagem celular Balb/c 3T3 (RIDOLFI et al., 2011) e a influência do palmitato de cetila na indução de apoptose em células de Schwann, por via independente de caspase-3 mediada por ceramida (SUZUKI et al., 2011). Em relação ao lipídio líquido, não encontramos dados na literatura sobre seu papel citotóxico. A diferença entre as formulações e o efeito citotóxico da NLC-CAP é instigante e abre possibilidades de novos estudos sobre a influência dos diferentes lipídios que podem ser usados como excipientes em NLC e seu efeito citotóxico em células tumorais, em busca dos mais indicados para encapsulação de quimioterápicos.

4.3 Avaliação de peso corporal e consumo de ração dos animais, durante tratamento

A perda de peso e o estado de caquexia são características que podem ocorrer em vários tipos de câncer (AOYAGI et al. 2015). Esta condição ocorre devido ao desequilíbrio entre a ingestão e a necessidade dos nutrientes para manter o estado de sobrevivência do paciente, relacionado a morbimortalidade das neoplasias malignas (FEARON et al. 2006). Os tratamentos quimioterápicos convencionais podem causar náuseas, vômitos, diarreia, saciedade precoce, má-absorção e obstipação intestinal, afetando negativamente o estado nutricional (VIGANO; WATANABE; BRUERA, 1994; MARTIN et al., 2013; MUSCARITOLI et al., 2021). Nesse sentido a análise do peso corporal e ingestão alimentar são fundamentais ao se propor uma nova forma terapêutica, a fim de avaliar possíveis efeitos adversos ocasionados pela neoplasia e/ou tratamentos (FEARON et al. 2006; MUSCARITOLI et al., 2021).

No grupo saudável (*Naive*), os animais mantiveram o peso entre 19 – 20g, sem redução no consumo de ração durante o período de tratamento. Como esperado, os animais do grupo controle positivo tiveram perda de peso (Figura 10A) enquanto os animais dos grupos tratados com NLC e dacarbazina mantiveram suas massas corporais entre 18 – 20 g, sem diferenças

estatísticas significativas em relação ao grupo *Naive* (*inset* da Figura 10 – gráfico do peso dos animais no dia 22). Observou-se aumento significativo do peso corporal nos animais do grupo tratado com BVC_{S75} livre, em relação aos outros grupos ($p < 0,0001$). Contudo, este resultado se relaciona com a maior massa tumoral observada nestes animais (Figura 9C). Esta condição pode indicar que há uma menor concentração do fármaco no local de ação, devido ao microambiente tumoral apresentar uma densidade vascular irregular, que limita a penetração do ativo (PIGATTO et al., 2016) resultando em maior VT.

Para entender melhor a possível influência do peso do tumor na variação do peso total dos animais tratados, na Figura 10C comparamos o peso dos animais entre os grupos no dia 22, após a retirada do tumor. Os resultados mostram diminuição significativa da massa corporal dos grupos Controle positivo ($p < 0,0001$), dacarbazina e NLC-LO ($p < 0,01$) em relação ao grupo *Naive*, em que o crescimento tumoral foi $> 140\%$ (Tabela 5). Curiosamente, para o tratamento com BVC_{S75} livre (crescimento do VT > 100) não houve diminuição significativa da massa corporal dos animais do grupo após excisão do tumor. Esta condição também se verifica nos animais dos grupos de tratamento contendo BVC_{S75} em sua composição (NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75}), além de não se observar diminuição da apetência alimentar desses grupos, conforme mostrado na Figura 11. Este achado possivelmente reforça a atuação do AL no melhor prognóstico da neoplasia, devido efeitos causados diretamente nas células tumorais e/ou imunorregulação pela diminuição de citocinas pró-inflamatórias (MÜLLER; ZIEGLER; PIEGELER, 2021; BEZU et al., 2022; WU CHUANG et al., 2022).

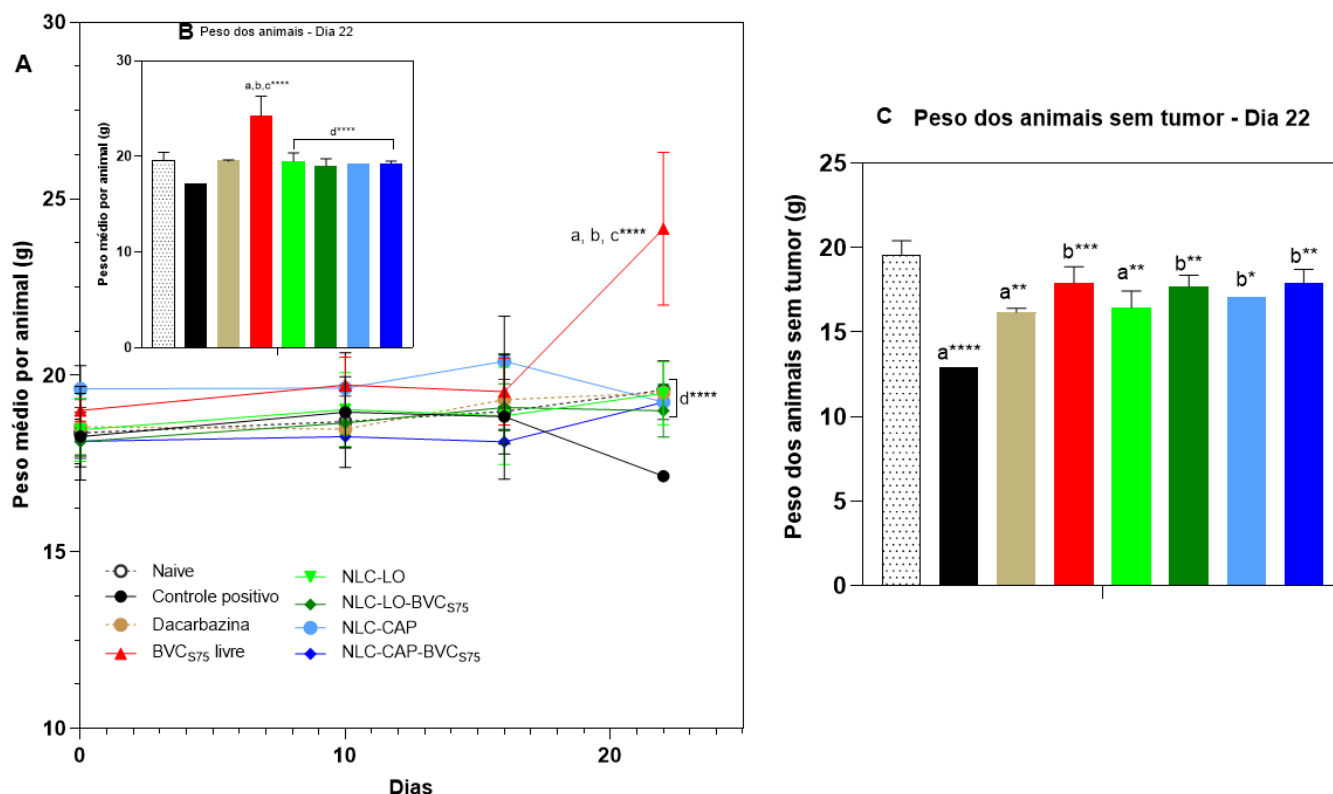


Figura 10. Análise do peso dos animais durante o período de experimento. **(A)** Peso médio por animal monitorado por 22 dias (1 vez por semana) durante todo o período de tratamento dos animais. **(B)** Peso médio por animal no dia 22. **(C)** Peso corporal dos animais após retirada do tumor (dia 22). Análise estatística por One-Way ANOVA com *post-hoc* Tukey. **a**, em relação ao grupo Naive; **b**, em relação ao Controle positivo; **c**, em relação a dacarbazina; **d**, em relação a BVC_{S75} livre. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

O consumo médio de ração também foi acompanhado durante o tratamento (Figura 11), a fim de analisar a inapetência alimentar. Durante o período de 22 dias de experimento observamos diferenças significativas em relação ao grupo Naive ($p < 0,0001$), com redução no consumo de ração pelos animais no período pós-tratamento (entre as semanas 3 e 4) nos grupos Controle positivo, dacarbazina e NLC-LO, que explica também a perda de massa corporal desses grupos (Figura 10C). Devido ao rápido crescimento tumoral no pós-tratamento nos grupos tratados com dacarbazina e NLC-LO, é possível que efeitos adversos relacionados à saciedade precoce ou à má absorção dos nutrientes da alimentação possam justificar a perda de peso. Nos demais grupos, não houve diminuição significativa no consumo de ração pelos animais.

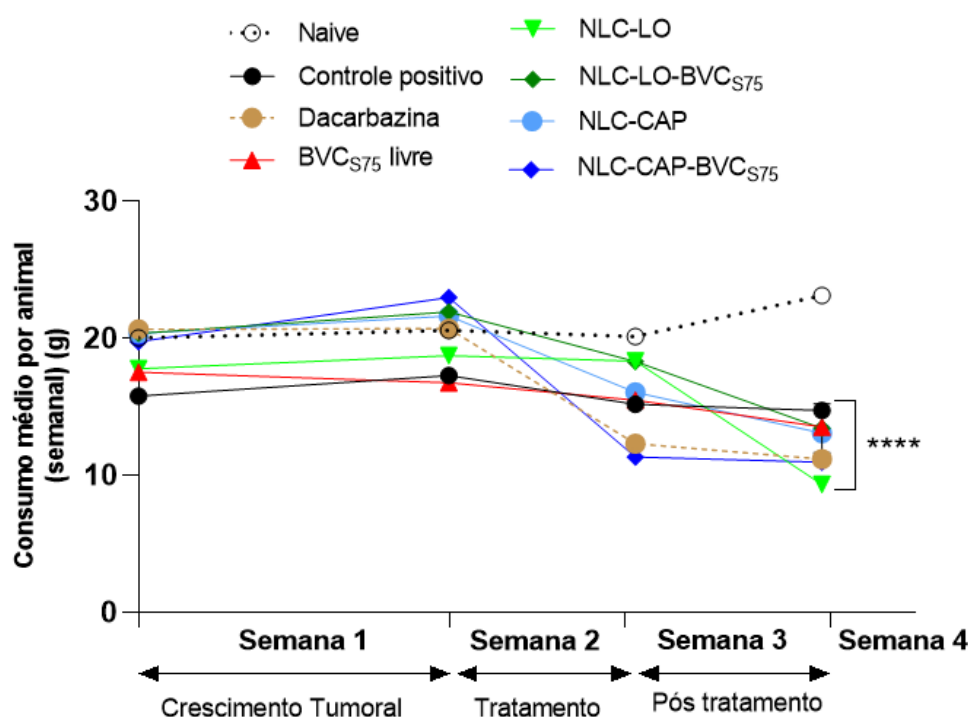


Figura 11. Avaliação do consumo médio de ração dos animais durante todo o período de tratamento. Consumo médio de ração por animal monitorado por 22 dias (1 vez por semana) durante experimento. Análise estatística por ANOVA com *post hoc* Tukey (**** $p < 0,0001$).

A Figura 11 mostra ainda que, na fase inicial dos tratamentos (até a semana 2) os animais mantinham seu consumo na faixa de 16 – 20 g, com alguns grupos consumindo maior quantidade de ração em relação ao grupo Naive (NLC-LO-BVC₇₅ (21,32 g), NLC-CAP (21,04 g) e NLC-CAP-BVC₇₅ (22,34 g)). Ao final do tratamento (semana 3) notou-se um decaimento no consumo médio da ração em todos os grupos tratados com exceção do grupo NLC-LO. Na semana 4, observa-se uma diminuição do consumo de ração em todos os grupos, inclusive o grupo NLC-LO que teve o menor consumo (9,32 g) em relação ao grupo Naive, provavelmente relacionado ao crescimento massivo do volume tumoral, como mostrado na Tabela 5.

4.4 Avaliação do perfil bioquímico

A análise do fenótipo bioquímico dos animais na clínica possibilita a compreensão do mecanismo de muitas doenças, como também a exploração e avaliação de novas possibilidades de tratamentos. As características dos animais como idade, gênero, linhagem e espécie, protocolos experimentais submetidos, entre outros fatores, podem influenciar nos valores finais dos resultados dos parâmetros bioquímicos (ZHOU, HANSSON, 2004). A Figura 12, mostra os resultados do perfil bioquímico (dosagens de ALT, AST, CK-MB, ferro e ureia) dos animais, avaliado após os tratamentos. É importante ressaltar que no grupo NLC-CAP não foram

realizadas as análises bioquímicas, pois não foi possível realizar a punção cardíaca do animal sobrevivente (verificar *item 4.5 Sobrevida*).

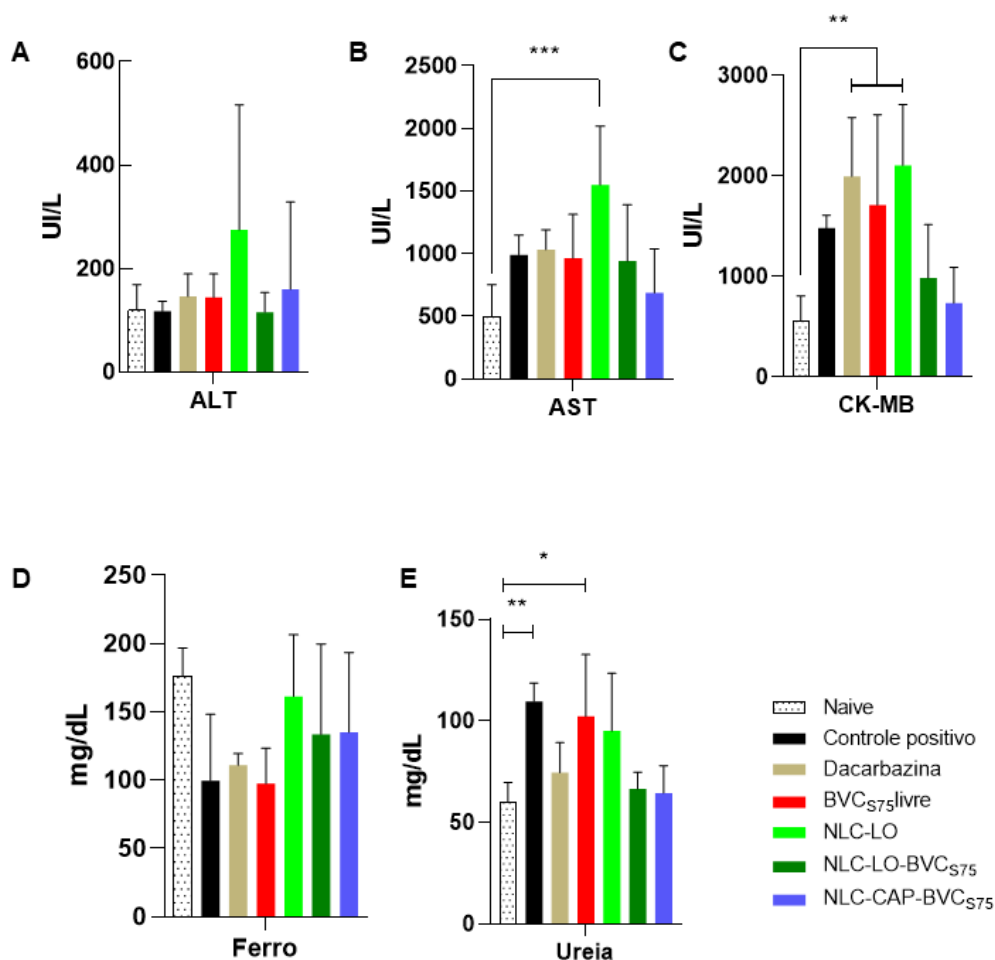


Figura 12. Variação nos parâmetros bioquímicos (níveis séricos de AST, ALT, CK-MB, ferro e ureia) dos animais, após tratamentos. **(A)** ALT; **(B)** AST; **(C)** CK-MB; **(D)** Ferro; **(E)** Ureia. Os dados representam a média $\pm$ DP ($n = 5$). Análise estatística One-way ANOVA com *post hoc* Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A enzima aspartato aminotransferase ou transaminase glutâmico-oxalacética (AST ou TGO), catalisa a transferência, reversível, do grupo amina entre glutamato e aspartato. A alanina aminotransferase ou Transaminase glutâmico-pirúvica (ALT ou TGP) que catalisa a conversão, reversível, de alanina e α -cetoglutarato em piruvato e glutamato (YADAV et al., 2022). Ambas possuem grande importância no metabolismo de aminoácidos, atividade no Ciclo de Krebs, gliconeogênese, sistema de lâncadeiras, entre outras. Maior atividade enzimática das mesmas é observada em tecidos como coração, fígado, musculo esquelético, rim e cérebro (NDREPEPA, 2021; YADAV et al., 2022). Entre os marcadores de lesão hepática, ALT e AST são os mais utilizados no diagnóstico clínico (MCGILL, 2016; YADAV et al., 2022). Na Figura 12A e B nota-se que somente o grupo NLC-LO apresentou níveis séricos de ALT e AST

maiores que os demais, apresentando diferença significativa em relação ao Naive somente no nível séricos de AST ($p < 0,001$). Contudo, a análise histopatológica revelou hepatócitos com características normais, sem presença de infiltrado inflamatório (como será discutido no *item 4.6 Análise Histopatológica*). Dessa forma, o aumento observado nas concentrações séricas de ALT e AST se demonstraram clinicamente irrelevantes.

A isoforma da creatina quinase MB (CK-MB) é um dos biomarcadores cardíacos que desempenham papel fundamental para diagnóstico de dano cardíaco e, como recentemente relatado, para malignidades como neoplasias (CHANG et al., 2015; KIM; HASHIM, 2016). Na Figura 12C observamos diferença estatística nos grupos dacarbazina, BVC_{S75} livre e NLC-LO ($p < 0,05$) em relação ao grupo Naive, indicando cardiotoxicidade nesses tratamentos. Já nos grupos contendo BVC_{S75} encapsulada (NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75}) os níveis de CK-MB foram menores e comparáveis aos do grupo Naive, indicando que a liberação sustentada diminui a cardiotoxicidade, em relação ao fármaco livre (GROBAN et al., 2001). A cardiotoxicidade dos anestésicos locais do tipo amino-amida de ação prolongada (principalmente BVC, AL mais utilizado em anestesia cirúrgica) é muito relatada na prática clínica (HEAVNER, 2002; MULROY, 2002; BOURNE; WRIGHT; ROYSE, 2010). E, apesar da síntese química estereoseletiva de moléculas com menor perfil de toxicidade como BVC_{S75}, estudos ainda revelam toxicidade cardíaca (GROBAN et al., 2001; CASATI; PUTZU, 2005; ZINK; GRAF, 2008).

Outra correlação importante é a associação entre o aumento dos níveis séricos de AST com o dano cardíaco (NDREPEPA, 2021). Na Figura 12B observa-se maior atividade de AST no soro nos animais tratados com dacarbazina e NLC-LO, em concordância com maior atividade de CK-MB no plasma (Fig. 12C). Em relação aos animais tratados com dacarbazina, os resultados corroboram relatos na literatura sobre a cardiotoxicidade provocada por quimioterápicos antineoplásicos (BINAGHI et al., 2017; LEWIS et al., 2020). Quanto a formulação controle NLC-LO, não encontramos dados na literatura em relação a cardiotoxicidade de LO. Contudo, não se encontrou alterações macroscópicas e diferença estatística em relação ao grupo Naive no peso do coração dos animais excisados após eutanásia deste grupo (Figura 15E).

Os níveis séricos de ferro no organismo estão relacionados com diversos processos biológicos, já que este metal participa de processos fisiológicos como o transporte de oxigênio, a respiração celular e a síntese de DNA, bem como da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que pode causar lesão tecidual por danos ao DNA, proteínas, peroxidação lipídica e morte celular (YAO et al., 2021; ROWINSKA et al., 2022). A Figura 12D mostra que não

houve variação significativa nos níveis séricos de ferro dos animais entre os grupos de tratamento em relação ao Naive.

A ureia, formada no fígado como principal produto nitrogenado do metabolismo de proteínas é filtrada no glomérulo renal, sendo assim amplamente utilizada para monitorar a função renal (MATSUE et al., 2017). Elevações em seus níveis séricos podem ser indicativos da redução da taxa de filtração glomerular devido sobrecarga renal, nefrotoxicidade ou fatores extrarrenais como dano cardíaco (BAUM et al., 1975; KAZORY, 2010; MATSUE et al., 2017). Na Figura 12E, apesar das diferenças estatísticas encontradas entre os grupos Controle positivo ($p < 0,01$) e BVC_{S75} livre ($p < 0,05$) em relação ao Naive, a análise histopatológica não revelou presença de alterações morfológicas nas células renais (verificar *item 4.6 Análise Histopatológica*).

De maneira geral, as análises bioquímicas não apontaram grandes alterações induzidas pelos tratamentos, a não ser pela BVC_{S75} livre (que aumentou os marcadores CK-MB e ureia) e a dacarbazina (que aumentou a atividade da CK-MB). O efeito da NLC-LO aumentando AST não foi significativo, uma vez que: i) não foi observado com NLC-LO-BVC_{S75}, ii) não foi acompanhado por aumento de ALT e iii) não foi corroborado pela análise histológica (que não detectou lesão hepática). Assim, estas análises não revelaram alterações metabólicas relevantes, mas evidenciaram que as nanoformulações otimizadas desenvolvidas (NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75}) apresentaram níveis semelhantes aos animais do grupo Naive em todos os parâmetros analisados: ALT, AST, CK-MB e ureia.

4.5 Sobrevida

O registro de ocorrências de óbito (análise de sobrevida) foi acompanhado durante todo o tratamento. A sobrevida dos animais foi determinada como o tempo (em dias) decorrido entre a inoculação da linhagem da célula tumoral (B16-F10) para indução de melanoma e o óbito do animal. Na Figura 13A pode-se comparar a sobrevida cumulativa dos animais dos grupos experimentais em função do tempo de experimento.

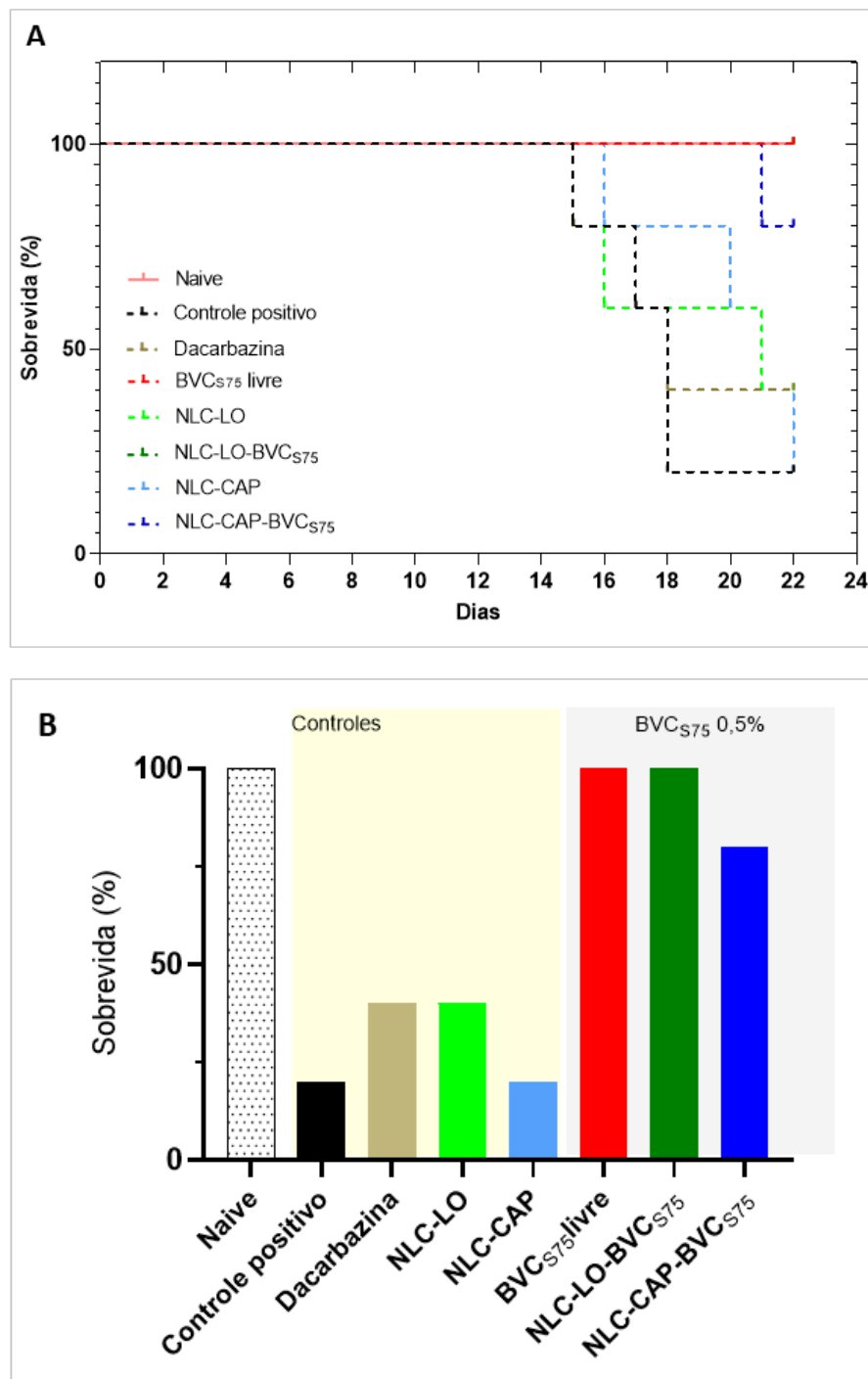


Figura 13. Análise da sobrevivência dos animais em relação ao tempo decorrido da indução do melanoma até 7 dias após o término dos tratamentos. **(A)** Nos grupos Naive; BVC_{S75} livre e NLC-LO-BVC_{S75} a taxa de sobrevivência foi de 100%; no grupo NLC-CAP-BVC_{S75} foi de 80% (1 animal morreu); nos grupos Dacarbazina e NLC-LO 40% (3 animais morreram) e no grupo Controle positivo e NLC-CAP foi de 20% (4 animais morreram) (n = 5). **(B)** Porcentagem de sobrevivência entre os grupos de tratamentos, revelando sobrevivência maior para animais dos grupos que receberam BVC_{S75} (livre ou encapsulada).

Como esperado, a taxa de sobrevida do grupo *Naive* foi de 100 % até o dia da eutanásia (7 dias após a finalização dos tratamentos). Os grupos BVC_{S75} livre, NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75} também mostraram taxas de sobrevida altas (100%, 100% e 80%, respectivamente) até a eutanásia dos animais. Apesar do grupo BVC_{S75} livre apresentar elevações nos níveis séricos de CK-MB e ureia (o que poderia indicar possível dano no tecido cardíaco dos animais – Figura 12C,E), sem diminuição significativa do VT, a maior taxa de sobrevida (Figura 13) pode indicar atuação benéfica do anestésico, não diretamente nas células tumorais, mas na resposta imune antitumoral, com diminuição de citocinas pró-inflamatórias que limitam a proliferação de células cancerígenas, promovendo a melhora na sobrevida global, como indicado na literatura (KANG; ZHAO; WANG, 2016; ZHOU et al., 2020; MÜLLER; ZIEGLER; PIEGELER, 2021; BEZU et al., 2022; WU CHUANG et al., 2022). Nos grupos de NLC contendo BVC_{S75}, não houve elevação nos níveis séricos dos marcadores bioquímicos hepáticos (AST, ALT), cardíaco e renal (CK-MB e ureia), e os mesmos induziram significativa diminuição do VT (79,48% para NLC-LO-BVC_{S75} e 86,82% para NLC-CAP-BVC_{S75}), demonstrando assim que a encapsulação da BVC_{S75} em NLC diminuiu sua toxicidade sistêmica *in vivo*, como relatado por outros autores (SEVERINO et al., 2012; RODRIGUES DA SILVA et al., 2021). A liberação sustentada da BVC_{S75} pelos NLC faz com que a mesma permaneça por mais tempo no tumor, resultando em menor crescimento tumoral no pós-tratamento (Figura 9B) e contribuindo para a maior taxa de sobrevida observada nos animais desses grupos. Em resumo, esses resultados demonstraram aumento da taxa de sobrevida dos animais em todos os grupos de tratamento que tinham BVC_{S75} em sua composição (NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75}), conforme demonstrado na Figura 13B.

Os grupos Dacarbazina e NLC-LO tiveram taxa de sobrevida de 40%. Nos animais tratados com dacarbazina os níveis sérios de CK-MB elevados já indicam possível cardiotoxicidade provocada pelo quimioterápico, de acordo com a literatura (BINAGHI et al., 2017; LEWIS et al., 2020). Já no grupo de animais tratados com NLC-LO notamos que, apesar da inibição significativa do volume tumoral durante o tratamento (66,63%), no pós-tratamento houve o maior crescimento do tumor (314,11%), com maior perda de massa corporal e diminuição do consumo de ração devido este acelerado crescimento do tumor.

Os grupos Controle positivo e NLC-CAP apresentaram os piores resultados, com apenas 20% da taxa de sobrevida. Em relação ao Controle positivo o crescimento tumoral pode ter sido a principal causa do óbito dos animais, bem como a diminuição da massa corporal e do consumo de ração. No grupo NLC-CAP, apesar da significativa diminuição do volume tumoral (65,85%), após autópsia, a análise macroscópica verificou que o animal apresentava esplenomegalia (baço

~ 48 mm de comprimento em contraste com ~20 mm de comprimento do baço de camundongo adulto jovem (Figura 14A) (PARKINSON et al. 2011), comprovando a toxicidade dos excipientes constituintes da formulação NLC-CAP.

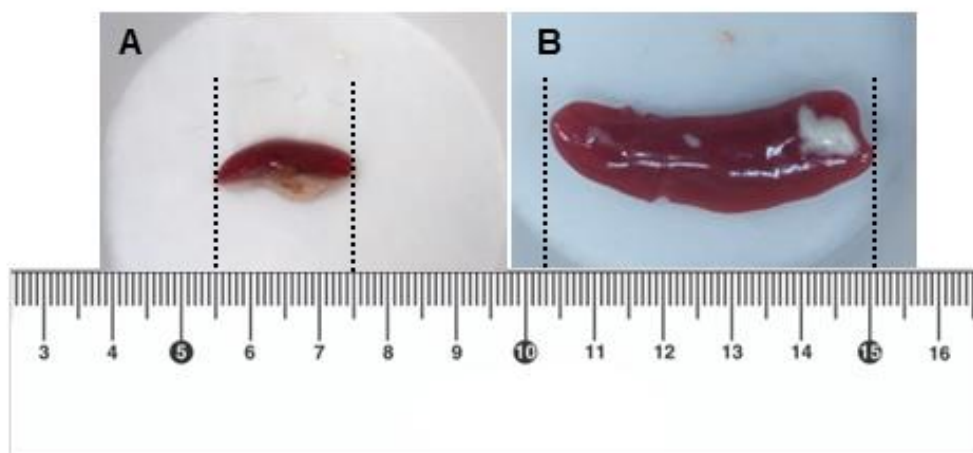


Figura 14. Baço de animais excisados após eutanásia. **(A)** Baço de animal saudável (20 mm de comprimento). **(B)** Baço após autópsia do animal pertencente ao grupo NLC-CAP, apresentando esplenomegalia (48 mm de comprimento).

A Figura 15 mostra o peso dos órgãos (pulmão, fígado, baço, rim, coração) e do tumor, excisados pós-eutanásia, para avaliar possíveis alterações anatomopatológicas. Não houve variação significativa no peso dos órgãos analisados, talvez pela grande variabilidade dos valores entre indivíduos (observar amplitude dos desvios-padrão). Somente o peso do tumor foi significativamente menor quando a BVC_{S75} livre foi encapsulada nos NLC (NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75} vs. BVC_{S75}) corroborando os resultados de VT (Tabela 5).

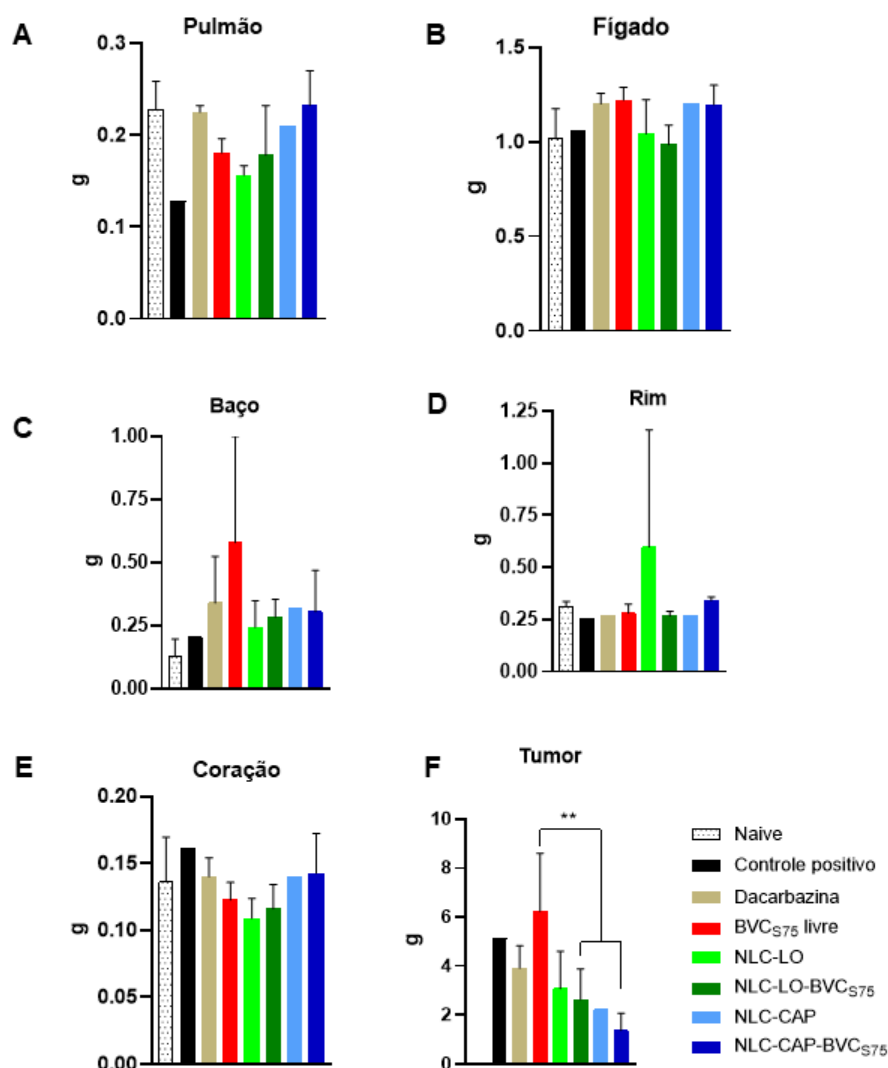


Figura 15. Análise do peso dos órgãos dos animais após tratamentos realizados. **(A)** Pulmão; **(B)** Fígado; **(C)** Baço; **(D)** Rim; **(E)** Coração; **(F)** Tumor. Análise estatística One-way ANOVA plus Tukey–Kramer *post hoc*. ** $p < 0,01$.

4.6 Análise Histopatológica

O implante intradérmico de células tumorais B16-F10 em camundongos C57BL/6J é um modelo utilizado para estudos pré-clínicos, pois produz tumores de crescimento agressivo, perfil invasivo e metastático, dada a evolução vertiginosa do tumor (NAKAMURA et al., 2002; CONCEA, 2019). Assim, a análise de lâminas histopatológicas é de extrema relevância para melhor perspectiva diagnóstica, detecção e classificação do câncer e de seus efeitos em tecidos (GURCAN et al., 2009; BELSARE; MUSHRIF, 2012). Os resultados histopatológicos são mostrados na Figura 16.

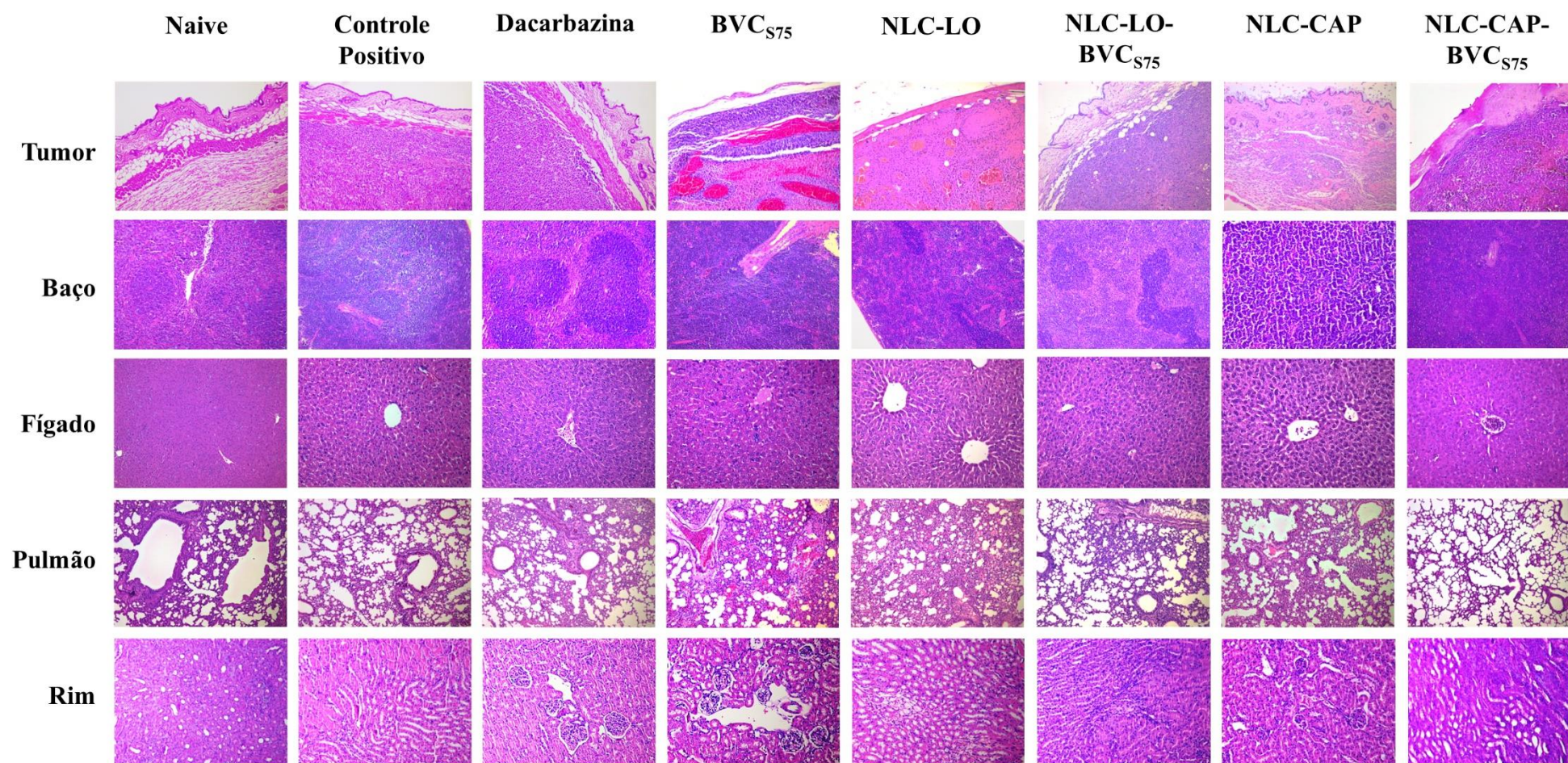


Figura 16. Seções histopatológicas de camundongos fêmeas adultas da linhagem C57BL/6J (*Mus musculus*). Indução do tumor melanoma nos camundongos por implante intradérmico de células B16-F10 (melanoma murino) (exceto grupo Naive). Análise da região do tumor, baço, fígado, pulmão e rins dos grupos de animais controles (sem e com tumor), Solução de Dacarbazina, Solução BVC_{S75} livre, NLC-LO, NLC-LO-BVC_{S75}, NLC-CAP e NLC-CAP-BVC_{S75}. (H&E, 10 × ou 20 ×).

Para avaliação do grau de invasão do tumor na epiderme do animal foi empregada a classificação de Clark, em que: I) o câncer está restrito à epiderme; II) há invasão da derme papilar; III) o tumor preenche toda a derme papilar sem invadir a derme reticular; IV) há invasão de derme reticular e V) há invasão da hipoderme (CLARK et al., 1969; SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011; DE MOURA et al., 2021).

O prognóstico à terapia do melanoma está relacionado com a profundidade/ espessura da invasão de células tumorais na epiderme (SCOLYER; LONG; THOMPSON, 2011; TAS; ERTURK, 2016). Com isso, os critérios histológicos considerados como resposta ao tratamento das formulações desenvolvidas foram principalmente: necrose (causada por apoptose das células tumorais, em consequência a terapia utilizada) (VERMA et al., 2013), redução do tamanho da região neoplásica (CARLSSON; GULLBERG; HAFSTRÖM, 1983), presença de infiltrado inflamatório (infiltração leucocitária devido a resposta imunológica ao tumor ou de origem tumoral em resposta à terapia) (VAKKILA; LOTZE, 2004; LADSTEIN et al., 2012) e fibroplasia estromal (surgimento de fibrose tecidual / tecido cicatricial na diferenciação de células epiteliais, limitando a invasão de células tumorais) (RUITER et al., 2002; CHANDLER et al., 2019).

4.6.1 Órgãos

As análises histológicas do **fígado** revelaram hepatócitos com características normais (células poliédricas com citoplasma eosinófilo bem distribuído), veias centro lobulares delimitadas e sem presença de infiltrado inflamatório em todos os grupos de tratamento avaliados (Naive, Controle positivo, Dacarbazina, BVC_{S75} livre, NLC-LO, NLC-LO-BVC_{S75}, NLC-CAP e NLC-CAP-BVC_{S75}).

Em todos os animais dos grupos de tratamento avaliados, os **rins** apresentaram aspectos histológicos dentro dos parâmetros de normalidade: estruturas glomerulares com tamanho, celularidade, espessura dos capilares e largura do espaço de Bowman usuais, sem evidências de anormalidades ou alterações patológicas.

Em todos os animais analisados, o **baço** apresentou características histológicas consideradas normais. Na polpa branca, foi observada a presença de centros germinativos formados por lençóis de linfócitos, enquanto na polpa vermelha, células imunes e capilares sanguíneos se intercalavam em extensos lençóis. Não foram encontradas evidências de anormalidades ou alterações patológicas neste tecido.

A avaliação **pulmonar** revelou que os grupos Naive, controle positivo, NLC-LO, NLC-CAP e NLC-CAP-BVC_{S75} apresentaram aspectos histológicos normais, com parênquima pulmonar e vias respiratórias bem definidos, ocasional presença de macrófagos pulmonares e presença de infiltrado inflamatório leve e fibrose. No grupo Naive ainda foi possível notar a presença de áreas de hialinização. O grupo BVC_{S75} apresentou áreas focais de hemorragia, associadas a um infiltrado inflamatório leve. Já o grupo NLC-LO-BVC_{S75} e Dacarbazina apresentaram focos de infiltrado inflamatório moderado a severo, que pode indicar uma resposta imunológica ao tumor em resposta ao tratamento utilizado (VAKKILA; LOTZE, 2004; LADSTEIN et al., 2012), porém as demais estruturas estavam dentro da normalidade.

4.6.2 Tumores

O grupo Naive não apresentava tumor representando, dessa forma, a pele normal. Nele, (Figura 16 topo, a esquerda) foi possível notar a presença de camadas (epiderme, derme e hipoderme) bem delimitadas, com presença de folículos pilosos, pelos com melanina, glândulas sebáceas e tecido adiposo com características usuais. Os melanócitos, localizados na camada basal, exibiam citoplasma claro e núcleo centralizado ou periférico, com baixa produção de melanina.

Nos grupos Controle Positivo e Dacarbazina, as células tumorais se organizaram em lençóis, áreas sólidas ou alveolares, com ocasionais grânulos de melanina em seu citoplasma. Observou-se também regiões com células fusiformes pouco diferenciadas. Contudo, no grupo Controle Positivo, apesar de não ter sido detectada presença de metástases nos órgãos analisados (apesar de a literatura descrever a observação de metástases devido ao crescimento agressivo e perfil invasivo do modelo de indução de melanoma utilizado - NAKAMURA et al., 2002; DE MOURA et al., 2021) o tumor exibiu grande agressividade, com extensas áreas de necrose e invasão do tecido muscular e adiposo subjacente, apresentando classificação de Clark V. No grupo tratado com dacarbazina, foi possível observar áreas com infarto, hemorragia, edema e presença de linfonodos não acometidos pelo melanoma, com células claras focais (aspecto normal), apresentando nível de Clark IV.

O grupo BVC_{S75} livre, observou-se proliferação de células cancerosas poliédricas ou epitelioides melanóticas, dispostas em um padrão de crescimento sólido, com áreas focais de células indiferenciadas amelanóticas. O tecido adjacente apresentou áreas de congestão vascular, hemorragia, presença de infiltrado inflamatório e fibrina. Neste grupo, o tumor dos

animais apresentou áreas de necrose maiores em comparação aos demais grupos, com nível de Clark IV.

Em relação aos grupos tratados com as formulações controle (sem BVC_{S75}), verificou-se que: no grupo NLC-LO, o tumor infiltrou-se no tecido profundo, atingindo a derme e a hipoderme (classificação de Clark nível V), apresentando células poligonais, fusiformes e epitelioides hipermelanóticas, dispostas em um padrão sólido ou alveolar. O tecido subjacente apresentou edema, enquanto áreas de necrose intratumorais também foram notadas nesse grupo. No grupo NLC-CAP, houve proliferação de células malignas poliédricas ou epitelioides, dispostas em um padrão de crescimento sólido, com áreas focais de necrose. O tumor apresentou distribuição de melanina no citoplasma de algumas células, porém não se notou invasão na hipoderme (nível de Clark IV).

Quanto aos animais tratados com as nanoformulações contendo BVC_{S75}: o grupo NLC-LO-BVC_{S75} apresentou nível de Clark IV, com células malignas que se dispuseram em um padrão sólido, com áreas de células fusiformes indiferenciadas, mas não se verificou rompimento da camada do epitélio. Notou-se também presença de áreas de necrose intratumoral, com focos de células melanocíticas e infiltrado inflamatório moderado. O grupo NLC-CAP-BVC_{S75} apresentou maior quantidade de áreas de indiferenciação com células fusiformes, tumor com crescimento sólido, necrose intratumoral, ulceração e invasão da hipoderme, com nível de Clark V.

4.7 Avaliação terapêutica global

Diante dos tratamentos realizados, considerando as análises realizadas - atividade antitumoral (inibição do VT), avaliação de alterações bioquímicas e histopatológicas e possíveis efeitos adversos - na avaliação terapêutica global foi possível concluir que os tratamentos realizados com NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75}, apesar de demonstrarem nível de Clark IV e V, respectivamente (não promovendo inibição das células de melanoma), apresentaram os melhores efeitos terapêuticos no prognóstico dos animais: sem perda de peso ou redução no consumo de ração, sem alterações bioquímicas e histopatológicas nos órgãos analisados e com sobrevida de 100 % (NLC-LO-BVC_{S75}) e 80 % (NLC-CAP-BVC_{S75}), conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Avaliação geral terapêutica dos tratamentos realizados para melanoma cutâneo.

Formulações	Perda de peso	Redução no consumo de ração	Alterações Bioquímicas	% Inibição VT	% Sobrevida	Nível de Clark
Naive	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	100	NC
Controle positivo	SIM	SIM	NÃO	-	20	V
Solução de Dacarbazina	SIM	SIM	SIM	41	40	IV
Solução de BVC _{S75} livre	NÃO	NÃO	SIM	21	100	IV
NLC-LO	SIM	SIM	NÃO	53	40	V
NLC-LO-BVC_{S75}	NÃO	NÃO	NÃO	79	100	IV
NLC-CAP	NÃO	NÃO	-	69	20	IV
NLC-CAP-BVC_{S75}	NÃO	NÃO	NÃO	87	80	V

Nota: NC = não consta.

4.8 Estudo farmacocinético (microdiálise local – tumoral)

Os tumores sólidos têm uma densidade vascular irregular e regiões de hipóxia e acidez. O microambiente tumoral possui características heterogênicas que limitam a penetração de ativos, em relação aos tecidos normais (PIGATTO et al., 2016). Diante disso, a microdiálise tem sido intensamente empregada para estudos farmacocinéticos em modelos de xenoinxertos tumorais e em pacientes com tumores acessíveis, no intuito de avaliar a disposição tecidual em diferentes tumores sólidos como melanoma, neuroblastoma e outros (PIGATTO et al., 2014). No modelo xenográfico de indução tumoral de melanoma, os dados obtidos mostraram maior regressão do VT nos animais tratados com NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75} em relação a BVC_{S75} livre (Figura 9, Tabela 5). Dessa forma, para avaliar a farmacocinética intratumoral da BVC_{S75} (livre e encapsulada nos NLC), utilizou-se a técnica da microdiálise, que permite a quantificação do fármaco ao longo do tempo (Figura 17) no fluido do espaço intersticial de praticamente qualquer tecido através de uma membrana semipermeável, perfundida em solução isosmótica no tecido em análise (PIGATTO et al., 2016; MONTERRUBIO et al., 2017).

O procedimento foi realizado conforme mostra a Figura 17 (A, B): após o volume tumoral atingir entre 200 – 400 mm³, a sonda foi inserida e esperou-se estabilização de uma hora para aplicação da formulação (BVC_{S75} livre, NLC-LO-BVC_{S75} ou NLC-CAP-BVC_{S75}) e em intervalos de 30 minutos realizou-se a coleta do dialisado para quantificação da BVC_{S75} nos grupos de tratamento. Os resultados da concentração de BVC_{S75} no tecido tumoral em função do tempo de coleta das amostras são mostrados na Figura 17 C.

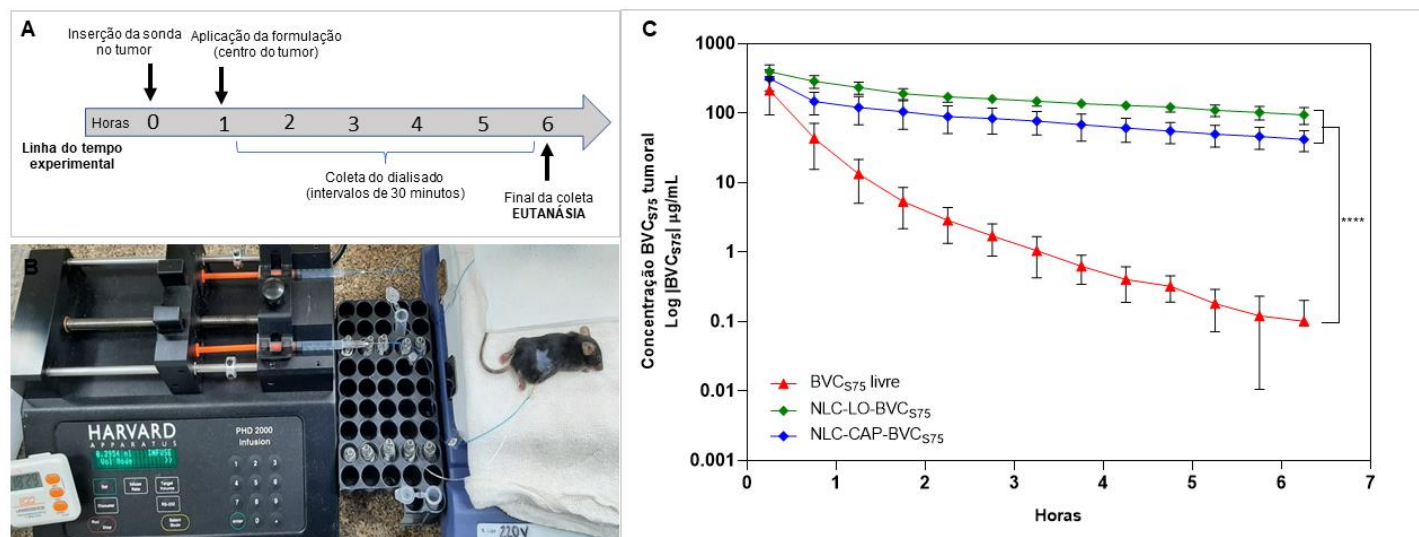


Figura 17. Estudo farmacocinético em tecido tumoral. **(A)** Linha do tempo experimental; **(B)** Procedimento de microdialise tumoral para quantificação de BVC_{S75} no fluido do espaço intersticial do tumor em camundongos C57BL/6J. **(C)** Concentração local de BVC_{S75} em escala logarítmica em função do tempo no tecido tumoral. Os dados representam a média $\pm$ DP ($n = 5$). Análise estatística por ANOVA com *post hoc* Tukey (**** $p < 0,001$).

É possível observar que a concentração de BVC_{S75} intratumoral no grupo tratado BVC_{S75} livre é menor desde o início da coleta, em comparação com os grupos tratados com as NLC contendo BVC_{S75} ($p < 0,0001$) e possui um decaimento de concentração mais acentuado em função do tempo. Desta forma, a BVC_{S75} encapsulada (NLC-LO-BVC_{S75} (%EE = 89%) e NLC-CAP-BVC_{S75} (%EE = 55%)) sofre liberação sustentada, com consequente aumento no tempo de permanência e melhor performance farmacodinâmica no local de ação (Figura 9). A Tabela 7 mostra os parâmetros farmacocinéticos calculados a partir dos resultados de concentração de BVC_{S75} no tumor, demonstrando a influência da encapsulação do fármaco nos NLC.

Tabela 7. Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da concentração de BVC_{S75} no tecido tumoral (n = 5).

Parâmetros	BVC _{S75} livre	NLC-LO-BVC _{S75}	NLC-CAP-BVC _{S75}
ke (min ⁻¹)	0,014 ± 0,004	0,003 ± 0,002 ****	0,003 ± 0,002 ****
t _{1/2} (min)	54,2 ± 16,5	461,2 ± 383,4	303,1 ± 165,7
ASC (µg.min/mL)	5254 ± 2758	135862 ± 67121 ***	21624 ± 9589
C ₀ (µg/mL)	213,0 ± 119,0	0,0 ± 0,0 **	0,0 ± 0,0 **

Nota: Análise estatística One-way ANOVA com *post-hoc* Tukey. ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001; em relação a BVC_{S75} livre. ke = constante de eliminação; t_{1/2} = tempo de meia vida; ASC = área sob a curva; C₀ = concentração inicial.

A constante de eliminação (ke) da BVC_{S75} no tecido (0,014 min⁻¹ quando não encapsulada) foi cerca de 4x maior que a medida nas formulações NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75} (0,003 min⁻¹), com diferença estatística significativa (p<0,0001) em relação a BVC_{S75} livre. Outros dados analisados demonstraram a liberação prolongada da BVC_{S75} no tecido tumoral: o tempo de meia vida da BVC_{S75} e a área sob a curva. O tempo de meia vida, apesar de não ter revelado diferença significativa entre os grupos devido ao grande desvio padrão nos dados, foi de ~ 1 h para BVC_{S75} livre, aumentando para 5-6 h quando nos NLC. Coerentemente, a ASC foi maior nos grupos tratados com NLC-LO-BVC_{S75} (135862, p < 0,001) e NLC-CAP-BVC_{S75} (21624), em relação a BVC_{S75} livre (5254) comprovando a maior concentração de BVC_{S75}, por maior tempo, nos grupos tratados com as nanoformulações de BVC_{S75}, como evidenciado pelos outros parâmetros analisados.

Ao final do experimento (após a eutanásia) a concentração do BVC_{S75} no tumor foi cerca de 4x maior nos animais tratados com NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75} do que nos tratados com fármaco livre (p < 0,05), como mostra a Figura 18 A. Além disso, para determinar a presença das nanopartículas no tecido tumoral, as formulações de NLC foram marcadas com rodamina, aplicadas no tumor e após eutanásia do animal foram analisadas as lâminas histológicas do tecido tumoral em microscópio invertido (Leica DMI6000) equipado com iluminação para epi-fluorescência e uma câmera digital para captura de imagens. Os resultados da Figura 18 (C, D) mostram rodamina no tecido tumoral, sendo um indicativo da presença de nanopartículas.

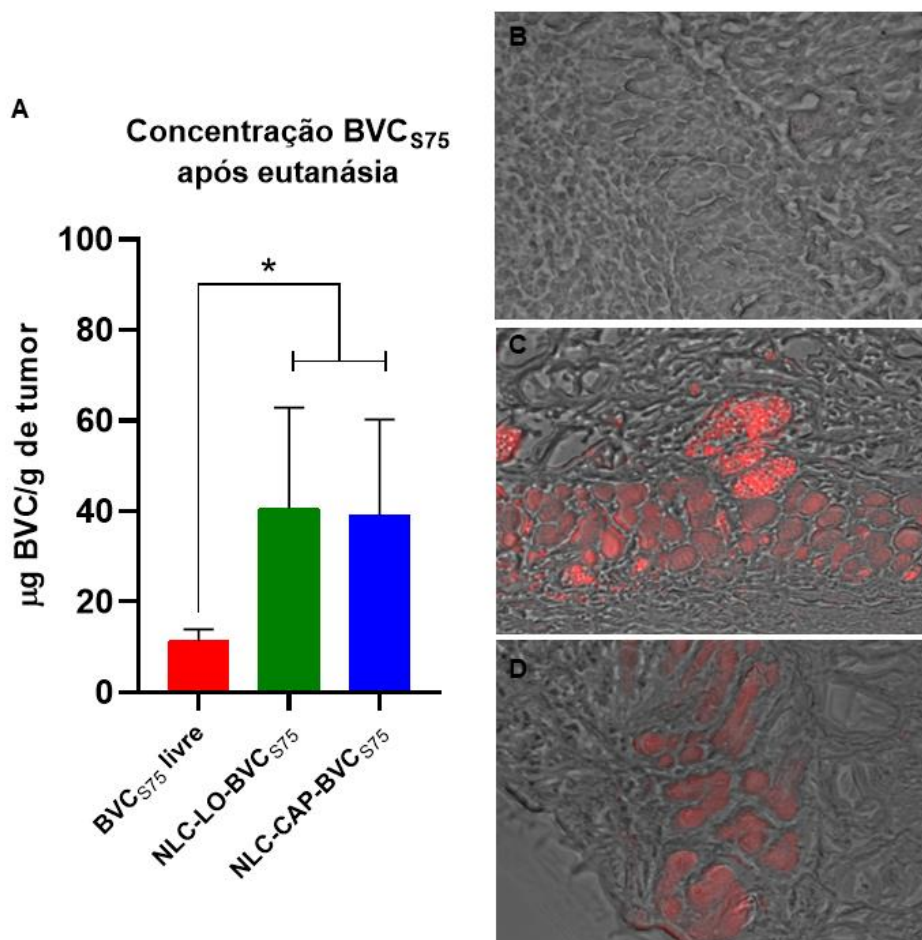


Figura 18. Influência dos NLC na concentração residual de BVC_{S75} após eutanásia no tecido tumoral. (A) Concentração de BVC_{S75} após eutanásia dos animais dos grupos analisados. Imagens de microscopia de fluorescência das nanoformulações, Controle (BVC_{S75} livre) (B); NLC-LO-BVC_{S75} (C) e NLC-CAP-BVC_{S75} (D), marcados com rodamina.

Esses dados corroboraram os resultados de inibição do crescimento tumoral em que o tratamento com BVC_{S75} encapsulada nos NLC resultou em diminuição significativa do volume tumoral (79,4% e 86,8% de redução com NLC-LO-BVC_{S75} e NLC-CAP-BVC_{S75}, respectivamente) (Figura 9) e menor crescimento tumoral no pós-tratamento, em relação aos demais grupos tratados (Tabela 5), indicando provável efeito direto, da BVC_{S75}, nas células de melanoma. Esses resultados sugerem a possível utilização destas nanoformulações anestésicas em procedimentos cirúrgicos de excisão tumoral, tendo em vista a ação do anestésico na resposta imune antitumoral, com capacidade de diminuir a inflamação resultante da cirurgia oncológica, com efeito positivo no prognóstico da neoplasia, promovendo efeitos citotóxicos diretamente nas células tumorais e melhora na sobrevida global dos indivíduos, como observado nos resultados aqui relatados.

5. CONCLUSÕES

As formas de tratamento para melhor prognóstico em pacientes com melanoma cutâneo têm sido alvo de intensa pesquisa, haja visto a baixa resposta à quimioterapia convencional, efeitos adversos que interferem na qualidade de vida dos indivíduos e alta possibilidade de recidiva deste tipo de câncer, após excisão cirúrgica do tumor. Neste cenário, a nanotecnologia juntamente com emprego de novas terapias medicamentosas para regressão tumoral e aumento na sobrevida dos pacientes aparecem como abordagens promissoras. Neste trabalho utilizamos DDS nanoparticulados, especificamente os carreadores lipídicos nanoestruturados preparados com excipiente funcional (LO), para encapsular o anestésico local BVC_{S75} a fim de aumentar sua janela terapêutica, diminuir seus efeitos adversos e potencializar seu efeito antitumoral, objetivando futura aplicação em cirurgia de remoção do tumor, em que o estímulo à resposta imune antitumoral através da diminuição de citocinas pró-inflamatórias, apoptóticas e efeito anestésico local pudessem criar uma alternativa terapêutica para o tratamento do melanoma.

Na avaliação da eficácia terapêutica das nanoformulações e fármacos controle (BVC_{S75} e dacarbazina), o tratamento com BVC_{S75} encapsulada nos NLC resultou em maior regressão do volume tumoral do que a forma livre durante o período de tratamento (79 % (NLC-LO-BVC_{S75}), 87 % (NLC-CAP-BVC_{S75}) e 21 % BVC_{S75} livre)) e menores taxas de crescimento tumoral no pós-tratamento (102,8% (NLC-LO-BVC_{S75}), 41,1% (NLC-CAP-BVC_{S75}) e 131,8% (BVC_{S75} livre). Assim, a liberação sustentada do ativo aumentou o tempo de permanência da BVC_{S75} no local de ação, promovendo maior regressão tumoral e menor toxicidade sistêmica – dados os elevados níveis de CK-MB e ureia no grupo de animais que sofreram tratamento com BVC_{S75} livre. Apesar da baixa inibição do VT no grupo tratado com BVC_{S75} livre, o aumento da sobrevida nos grupos de animais tratados com BVC_{S75} (livre ou encapsulada), a ausência de disfunções metabólicas (parâmetros bioquímicos) ou alterações histopatológicas nos órgãos analisados, demonstram que o efeito citotóxico da BVC_{S75} foi causado diretamente nas células tumorais. Em relação ao tratamento com dacarbazina, apesar de promover significativa diminuição do VT (41%) em relação ao grupo Controle positivo, notou-se presença de alterações bioquímicas (elevados níveis de CK-MB), além da diminuição do peso corporal e inapetência alimentar que podem ter sido fatores que contribuíram para diminuição da taxa de sobrevida dos animais deste grupo.

Por fim, a análise farmacocinética confirmou que os NLC proporcionaram, através de uma liberação prolongada, níveis efetivos de BVC_{S75} por mais tempo no tecido tumoral, melhorando a atividade farmacológica (inibição do volume do tumor) em relação ao fármaco

livre. Contudo, dentre estas formulações contendo BVC_{S75} , a composta por excipiente natural (NLC-LO- BVC_{S75}), por possuir taxa sobrevida de 100% dos animais e apresentar um efeito aditivo entre LO e BVC no pós-tratamento, destaca o efeito citotóxico desta formulação ao tratamento tumoral.

Estes resultados indicam uma ação adjuvante, de potencial uso clínico para a terapia do melanoma cutâneo, mediante a ação das formulações de NLC contendo BVC_{S75} , com efeitos terapêuticos significativos no prognóstico de sobrevida global dos indivíduos.

REFERÊNCIAS

- AHMED, B.; QADIR, M. I.; GHAFOR, S. Malignant Melanoma: Skin Cancer– Diagnosis, Prevention, and Treatment. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 30, n. 4, p. 291–297, 2020.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Key Statistics for Melanoma Skin Cancer. <
- AOYAGI, T. et al. Cancer cachexia, mechanism and treatment. **World journal of gastrointestinal oncology**, v. 7, n. 4, p. 17–29, 2015.
- ARAÚJO, D. R. et al. Drug-Delivery Systems for Racemic Bupivacaine (S50-R50) and Bupivacaine Enantiomeric Mixture (S75-R25): Cyclodextrins Complexation Effects on Sciatic Nerve Blockade in Mice. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 55, n. 3, p. 316–328, 2005.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BALDEA, I. et al. Photodynamic Therapy in Melanoma - Where do we Stand? **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 40, p. 5540–5563, 2018.
- BASSO, J. et al. A stepwise framework for the systematic development of lipid nanoparticles. **Biomolecules**, v. 12, n. 2, p. 223–228, 2022.
- BELSARE, A. D.; MUSHRIF, M. M. Histopathological image analysis using image processing techniques: An overview. **Signal & Image Processing**, v. 3, n. 4, p. 23–36, 2012.
- BIAŁOŃ, M. et al. Chemical composition of two different lavender essential oils and their effect on facial skin microbiota. **Molecules**, v. 24, n. 18, p. 3270–3286, 2019.
- BARDSLEY, H. et al. A comparison of the cardiovascular effects of levobupivacaine and rac-bupivacaine following intravenous administration to healthy volunteers. **British journal of clinical pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 245–249, 1998.
- BARONE, A. et al. Hybrid nanostructured films for topical administration of simvastatin as coadjuvant treatment of melanoma. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 10, p. 3396–3407, 2019.
- BAUM, N.; DICHOSO, C. C.; CARLTON JR, C. E. Blood urea nitrogen and serum creatinine: Physiology and interpretations. **Urology**, v. 5, n. 5, p. 583–588, 1975.
- BENCHERIF, S. A. et al. Injectable cryogel-based whole-cell cancer vaccines. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 7556–7568, 2015.
- BEZU, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Local anesthetics and immunotherapy: a novel combination to fight cancer. In: **Seminars in Immunopathology**. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2022. p. 1–8.
- BHAKUNI, G. S. et al. Animal models of hepatotoxicity. **Inflammation Research**, v. 65, n. 1, p. 13–24, 2016.
- BINAGHI, G. et al. Cardiogenic shock during first infusion of anthracycline chemotherapy in a patient with hodgkin lymphoma: an unusual event. **Cardiology**, v. 139, n. 1, p. 7–10, 2018.
- BITEGHE, F. A. N. et al. Desensitization of metastatic melanoma cells to therapeutic treatment through repeated exposure to dacarbazine. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 211, p. 111982–111993, 2020.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). **British medical journal**, v. 317, n. 7172, p. 1572–1580, 1998.
- BOMMAREDDY, P. K.; SILK, A. W.; KAUFMAN, H. L. Intratumoral approaches for the treatment of melanoma. **The Cancer Journal**, v. 23, n. 1, p. 40–47, 2017.

- BOUCHEREAU, S. et al. Impact of prior treatment with immune checkpoint inhibitors on dacarbazine efficacy in metastatic melanoma. **British Journal of Cancer**, v. 125, n. 7, p. 948-954, 2021.
- BOURNE, E.; WRIGHT, C.; ROYSE, C. A review of local anesthetic cardiotoxicity and treatment with lipid emulsion. **Local and Regional Anesthesia**, v. 3, p. 11-19, 2010.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Brasília, 2019, p. 111.
- BROWN, R. V. S. et al. Mortality from malignant skin melanoma in elderly Brazilians: 2001 to 2016. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, p. 34-39, 2021.
- 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.
- CARBONE, C. et al. Ferulic acid-NLC with Lavandula essential oil: a possible strategy for wound-healing? **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, p. 898–915, 2020.
- CARLSSON, G.; GULLBERG, B.; HAFSTRÖM, L. O. Estimation of liver tumor volume using different formulas—an experimental study in rats. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 105, n. 1, p. 20-23, 1983.
- CASATI, A.; PUTZU, M. Bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine: are they clinically different? **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 19, n. 2, p. 247-268, 2005.
- CATA, J. P.; RAMIREZ, M. F.; PEREZ-GONZALEZ, O. Local Anesthetics: Hunting for the Holy Grail of Oncoanesthesia. **Pain Medicine**, v. 21, n. 2, p. 219–220, 2020.
- CHAMARAUX-TRAN, T.; PIEGELER, T. The amide local anesthetic lidocaine in cancer surgery—potential antimetastatic effects and preservation of immune cell function? A narrative review. **Frontiers in Medicine**, v. 4, p. 235-241, 2017.
- CHANDLER, C. et al. The double edge sword of fibrosis in cancer. **Translational Research**, v. 209, p. 55-67, 2019.
- CHANG, C.C. et al. Creatine kinase (CK)-MB-to-Total-CK ratio: a laboratory indicator for Primary cancer screening. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 15, p. 6599-6603, 2015.
- CHANG, Y. C. et al. Local anesthetics induce apoptosis in human thyroid cancer cells through the mitogen-activated protein kinase pathway. **PLOS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89563–e89573, 2014.
- CHEUNG, M. K. et al. A review of the effects of natural compounds, medicinal plants, and mushrooms on the gut microbiota in colitis and cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 744–751, 2020.
- CHO, K. et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1310-1316, 2008.
- CLARK, W. H. et al. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. **Cancer Research**, v. 29, n. 3, p. 705-727, 1969.
- COSTA, Helena Olegario da. Melanomas extensivo-superficiais regressivos e não-regressivos finos: análise da densidade microvascular utilizando-se os marcadores D2-40 e CD31. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- CZAJKOWSKA-KOŚNIK, A.; SZEKALSKA, M.; WINNICKA, K. Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 71, n. 1, p. 156-166, 2019.
- DAN, J. et al. Inhibition of gastric cancer by local anesthetic bupivacaine through multiple mechanisms independent of sodium channel blockade. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 103, p. 823-828, 2018.
- 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. 57-73, 2018.

- DE ARAÚJO, D. R.; RIBEIRO, L. N. M.; DE PAULA, E. Lipid-based carriers for the delivery of local anesthetics. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 7, p. 701–714, 2019.
- DE MOURA, L. D. et al. Docetaxel and Lidocaine Co-Loaded (NLC-in-Hydrogel) Hybrid System Designed for the Treatment of Melanoma. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 10, p. 1552–1576, 2021.
- DHIFI, W. et al. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. 25–40, 2016.
- DI MARTILE, M. et al. Essential oils and their main chemical components: The past 20 years of preclinical studies in Melanoma. **Cancers**, v. 12, n. 9, p. 2650–2694, 2020.
- DOMINGUES, B. et al. Melanoma treatment in review. **Immuno Targets and Therapy**, v.7, p. 35–49, 2018.
- DOS SANTOS, M. S. C. et al. Nanographene oxide-methylene blue as phototherapies platform for breast tumor ablation and metastasis prevention in a syngeneic orthotopic murine model. **Journal of nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 9–25, 2018.
- DURST, M. S. et al. Lidocaine and bupivacaine as part of multimodal pain management in a C57BL/6J laparotomy mouse model. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 10918–10934, 2021.
- EGGERMONT, A. M. M.; KIRKWOOD, J. M. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: What have we learned in 30 years? **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 12, p. 1825–1836, 2004.
- ELOY, Josimar de Oliveira. Lipossomas e imunolipossomas contendo fármacos antitumorais: desenvolvimento, caracterização e avaliação da eficácia contra o câncer de mama. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- 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.
- EXADAKTYLOS, A. K. et al. Can anesthetic technique for primary breast cancer surgery affect recurrence or metastasis? **Anesthesiology**, v. 105, n. 4, p. 660–664, 2006.
- FEARON, K. C.; VOSS, A. C.; HUSTEAD, D. S. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1345–1350, 2006.
- FOSTER, R. H.; MARKHAM, A. Levobupivacaine. A Review of its Pharmacology and Use as a Local Anaesthetic. **Drugs**, v. 59, n. 3, p. 551–579, 2000.
- FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, n. 2, p. 221–229, 1998.
- GARBE, C.; LEITER, U. Melanoma epidemiology and trends. **Clinics in dermatology**, v. 27, n. 1, p. 3–9, 2009.
- GARG, J. et al. Nanostructured lipid carriers: a promising drug carrier for targeting brain tumours. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 25–55, 2022.
- GERONIMO, G. et al. Development of S75:R25 bupivacaine-loaded lipid nanoparticles functionalized with essential oils for treating melanoma. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 96, n. 8, p. 2197–2207, 2021.
- GHASEMIYEH, P.; MOHAMMADI-SAMANI, S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: Applications, advantages and disadvantages. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 13, n. 4, p. 288–303, 2018.
- GLOBAL CANCER OBSERVATORY. Estimated number of new cases in 2020, World, both sexes, all ages. < <https://gco.iarc.fr/>>. Acesso: 20/03/2023.
- GRANDHI, R. K.; PERONA, B. Mechanisms of Action by Which Local Anesthetics Reduce Cancer Recurrence: A Systematic Review. **Pain medicine**, v. 21, n. 2, p. 401–414, 2020.

- GROBAN, L.; DOLINSKI, S. Y. Differences in cardiac toxicity among ropivacaine, levobupivacaine, bupivacaine, and lidocaine. **Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management**, v. 5, n. 2, p. 48-55, 2001.
- GU, J. H. et al. The Local Anesthetic Bupivacaine Inhibits the Progression of Non-Small Cell Lung Cancer by Inducing Autophagy Through Akt/mTOR Signaling. **Frontiers in Oncology**, v. 11, n. 1, p. 616445–616453, 2021.
- GURCAN, M. N. et al. Histopathological image analysis: A review. **IEEE reviews in biomedical engineering**, v. 2, p. 147-171, 2009.
- HAFEEZ, A.; KAZMI, I. Dacarbazine nanoparticle topical delivery system for the treatment of melanoma. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16517–16526, 2017.
- HEAVNER, J. E. Cardiac toxicity of local anesthetics in the intact isolated heart model: a review. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 27, n. 6, p. 545-555, 2002.
- HEPPOLETTE, C.A.A. et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of levobupivacaine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 59, n. 6, p. 715-745, 2020.
- HERSH, E. M. et al. A randomized, controlled phase III trial of nab-Paclitaxel versus dacarbazine in chemotherapy-naïve patients with metastatic melanoma. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 11, p. 2267–2274, 2015.
- HEWITSON, T. D.; WIGG, B.; BECKER, G. J. Tissue preparation for histochemistry: fixation, embedding, and antigen retrieval for light microscopy. **Histology protocols**, p. 3-18, 2010.
- HONG, W. X. et al. Intratumoral immunotherapy for early-stage solid tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 13, p. 3091-3099, 2020.
- INCA. Instituto Nacional de Cancer. Cancer de pele Melanoma. <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pele-melanoma>>. Acesso em 12/05/2022.
- INDINI, A. et al. Cutaneous melanoma in adolescents and young adults. **Pediatric blood and cancer**, v. 65, n. 11, p. e27292–e27297, 2018.
- ISTENIC, S. et al. Determination of bupivacaine tissue concentration in human biopsy samples using high-performance liquid chromatography with mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 35, n. 11, p. e5198-e5208, 2021.
- IZZA, N. et al. Dependence of the Core-Shell Structure on the Lipid Composition of Nanostructured Lipid Carriers: Implications for Drug Carrier Design. **ACS Applied Nano Materials**, v. 5, n. 7, p. 9958–9969, 2022.
- JIANG, T. et al. Enhanced transdermal drug delivery by transfersome-embedded oligopeptide hydrogel for topical chemotherapy of melanoma. **ACS nano**, v. 12, n. 10, p. 9693-9701, 2018.
- JOUKHADAR, C.; MÜLLER, M. Microdialysis. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, n. 9, p. 895–913, 2012.
- JU, C. et al. Bupivacaine suppresses the progression of gastric cancer through regulating circ_0000376/miR-145-5p axis. **BMC Anesthesiology**, v. 20, n. 1, p. 275–284, 2020.
- JUSTUS, B. et al. New insights into the mechanisms of French lavender essential oil on non-small-cell lung cancer cell growth. **Industrial Crops and Products**, v. 136, p. 28-36, 2019.
- KANG, D.K.; ZHAO, L.Y.; WANG, H.L. Cytotoxic effects of local anesthesia through lidocaine/ropivacaine on human melanoma cell lines. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 66, n. 6, p. 594–602, 2016.
- KARNIEL, M.; BEITNER, R. Local anesthetics induce a decrease in the levels of glucose 1, 6-bisphosphate, fructose 1, 6-bisphosphate, and ATP, and in the viability of melanoma cells. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 69, n. 1, p. 40–45, 2000.
- KAZORY, A. Emergence of blood urea nitrogen as a biomarker of neurohormonal activation in heart failure. **The American journal of cardiology**, v. 106, n. 5, p. 694-700, 2010.

- KECK, C. M.; SPECHT, D.; BRÜSSLER, J. Influence of lipid matrix composition on biopharmaceutical properties of lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 388, p. 149-163, 2021.
- KIM, J.; HASHIM, I. A. The clinical utility of CK-MB measurement in patients suspected of acute coronary syndrome. **Clinica Chimica Acta**, v. 456, p. 89-92, 2016.
- KOBAYASHI, K. et al. Cytotoxicity and type of cell death induced by local anesthetics in human oral normal and tumor cells. **Anticancer Research**, v. 32, n. 7, p. 2925–2934, 2012.
- LADSTEIN, R. G. et al. Tumor Necrosis Is a Prognostic Factor in Thick Cutaneous Melanoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 36, n. 10, p. 1477–1482, 2012.
- LAGAN, G.; MCLURE, H. A. Review of local anaesthetic agents. **Current Anaesthesia and Critical Care**, v. 15, n. 4-5, p. 247-254, 2004.
- LAMMERS, T. et al. Effect of intratumoral injection on the biodistribution, the therapeutic potential of HPMACopolymer-based drug delivery systems. **Neoplasia**, v. 8, n. 10, p. 788-795, 2006.
- LASON, E. et al. NLC as a potential carrier system for transdermal delivery of forskolin*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 65, n. 3, p. 437–442, 2018.
- LEONARDI, G. C. et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International journal of oncology**, v. 52, n. 4, p. 1071-1080, 2018.
- LEWIS, W. D.; LILLY, S.; JONES, K. L. Lymphoma: diagnosis and treatment. **American family physician**, v. 101, n. 1, p. 34-41, 2020.
- 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**, v. 15, p. 113–122, 2020.
- LIU, H.; DILGER, J. P.; LIN, J. Effects of local anesthetics on cancer cells. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 212, p. 107558–107570, 2020.
- LIU, Q. et al. Dacarbazine-Loaded Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles Grafted with Folic Acid for Enhancing Antimetastatic Melanoma Response. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 26, p. 21673–21687, 2017.
- MARTIN, L. et al. Cancer cachexia in the age of obesity: skeletal muscle depletion is a powerful prognostic factor, independent of body mass index. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 12, p. 1539-1547, 2013.
- MATSUE, Y. et al. Blood urea nitrogen-to-creatinine ratio in the general population and in patients with acute heart failure. **Heart failure and cardiomyopathies**, v. 103, n. 6, p. 407-413, 2017.
- MCDONALD, S. et al. Determination of local tissue concentrations of bupivacaine released from biodegradable microspheres and the effect of vasoactive compounds on bupivacaine tissue clearance studied by microdialysis sampling. **Pharmaceutical research**, v. 19, n. 11, p. 1745-1752, 2002.
- MCGILL, M. R. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. **EXCLI journal**, v. 15, p. 817-828, 2016.
- MISHRA, H. et al. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 12, p. 2283-2302, 2018.
- MISHRA, H. et al. Co-delivery of eugenol and dacarbazine by hyaluronic acid-coated liposomes for targeted inhibition of survivin in treatment of resistant metastatic melanoma. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 4, p. 163–197, 2019.
- MONTERRUBIO, C. et al. Targeted drug distribution in tumor extracellular fluid of GD2-expressing neuroblastoma patient-derived xenografts using SN-38-loaded nanoparticles conjugated to the monoclonal antibody 3F8. **Journal of Controlled Release**, v. 255, p. 108-119, 2017.

- MULLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 131-155, 2002.
- MÜLLER, S. D.; ZIEGLER, J. S. H.; PIEGELER, T. Local anesthetics and recurrence after cancer surgery-what's new? A narrative review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 4, p. 719-732, 2021.
- MULROY, M. F. Systemic toxicity and cardiotoxicity from local anesthetics: incidence and preventive measures. **Regional Anesthesia & Pain Medicine**, v. 27, n. 6, p. 556-561, 2002.
- MUSCARITOLI, M. et al. ESPEN practical guideline: Clinical Nutrition in cancer. **Clinical Nutrition**, v. 40, n. 5, p. 2898-2913, 2021.
- NAJAR, H. M.; DUTZ, J. P. Topical CpG enhances the response of murine malignant melanoma to dacarbazine. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 9, p. 2204–2210, 2008.
- NAKAMURA, K. et al. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sciences**, v. 70, n. 7, p. 791–798, 2002.
- NDREPEPA, G. Aspartate aminotransferase and cardiovascular disease—a narrative review. **Journal of Laboratory and Precision Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1-17, 2021.
- OGLESBY, A.; ALGAZI, A. P.; DAUD, A. I. Intratumoral and combination therapy in melanoma and other skin cancers. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 20, n. 6, p. 781–796, 2019.
- OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. **Current Protocols in Immunology**, v. 39, n. 1, p. 20.1.1–20.1.29, 2000.
- OVIDI, E. et al. Chemical Investigation and Screening of Anti-Proliferative Activity on Human Cell Lines of Pure and Nano-Formulated Lavandin Essential Oil. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 11, p. 352–368, 2020.
- PAI, R. V.; VAVIA, P. R. Chitosan oligosaccharide enhances binding of nanostructured lipid carriers to ocular mucins: Effect on ocular disposition. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 577, p. 119095–119106, 2020.
- PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International journal of pharmaceutics**, v. 366, n. 1-2, p. 170-184, 2009.
- PARKINSON, C. M. et al. Diagnostic necropsy and selected tissue and sample collection in rats and mice. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 54, p. e2966-e2971, 2011.
- PENG, H. Y. et al. The melanogenesis alteration effects of achillea millefolium L. Essential oil and linalyl acetate: Involvement of oxidative stress and the JNK and ERK signaling pathways in melanoma cells. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95186–e95194, 2014.
- PIGATTO, M. C.; MOSSMANN, D. L.; DALLA COSTA, T. HPLC-UV method for quantifying etoposide in plasma and tumor interstitial fluid by microdialysis: application to pharmacokinetic studies. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 4, p. 529-536, 2014.
- PIGATTO, M. C. et al. Population pharmacokinetic modeling of etoposide free concentrations in solid tumor. **Pharmaceutical Research**, v. 33, p. 1657-1670, 2016.
- PRUSINOWSKA, R.; SMIGIELSKI, K. B. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.). A review. **Herba polonica**, v. 60, n. 2, p. 56-66, 2014.
- PUGLIA, C. et al. Lipid Nanoparticles and Active Natural Compounds: A Perfect Combination for Pharmaceutical Applications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 24, p. 4681–4696, 2019.
- RAHIMINEJAD, A. et al. Preparation and investigation of indirubin-loaded SLN nanoparticles and their anti-cancer effects on human glioblastoma U87MG cells. **Cell biology international**, v. 43, n. 1, p. 2-11, 2019.
- RAINER, H.M.; RANJITA, S.; CORNELIA, M.K. 20 years of lipid nanoparticles (SLN & NLC): present state of development & industrial applications. **Current drug discovery technologies**, v. 8, n. 3, p. 207–227, 2011.

- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial crops and products**, v. 62, p. 250-264, 2014.
- REBECCA, V. W.; SOMASUNDARAM, R.; HERLYN, M. Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 2858–2866, 2020.
- RIBEIRO, L. N. M. et al. Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, p. 102-112, 2017.
- RIDOLFI, D. M. et al. In vitro cytotoxicity assays of solid lipid nanoparticles in epithelial and dermal cells. **Journal of Physics: Conference Series. IOP Publishing**, v.304, p. 012032-012036, 2011.
- RODRIGUES DA SILVA, G. H. et al. Optimised NLC: a nanotechnological approach to improve the anaesthetic effect of bupivacaine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, n. 1–2, p. 253–263, 2017.
- RODRIGUES DA SILVA, G. H. et al. Injectable in situ forming nanogel: A hybrid Alginate-NLC formulation extends bupivacaine anesthetic effect. **Materials Science and Engineering**, v. 109, p. 110608–110617, 2020.
- RODRIGUES DA SILVA, G. H. et al. Antineoplastics encapsulated in nanostructured lipid carriers. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 6929–6953, 2021.
- ROWIŃSKA, K. et al. Serum Iron Level and 10-Year Survival after Melanoma. **Biomedicines**, v. 10, n. 12, p. 3018-3024, 2022.
- RUITER, Dirk et al. Melanoma–stroma interactions: structural and functional aspects. **The Lancet Oncology**, v. 3, n. 1, p. 35–43, 2002.
- SALVI, V. R.; PAWAR, P. Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 255-267, 2019.
- SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 971–984, 2018.
- SCHWARTZ, D.; BEITNER, R. Detachment of the glycolytic enzymes, phosphofructokinase and aldolase, from cytoskeleton of melanoma cells, induced by local anesthetics. **Molecular genetics and metabolism**, v. 69, n. 2, p. 159–164, 2000.
- SCOLYER, R. A.; LONG, G. V.; THOMPSON, J. F. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. **Molecular oncology**, v. 5, n. 2, p. 124-136, 2011.
- SEKANDARZAD, M. W. et al. Perioperative anesthesia care and tumor progression. **Anesthesia & Analgesia**, v. 124, n. 5, p. 1697-1708, 2017.
- SEVERINO, P. et al. Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. **Journal of Drug Delivery**, v. 2012, p. 750891-750901, 2012.
- SHINDE, R. L.; JINDAL, A. B.; DEVARAJAN, P. V. Microemulsions and nanoemulsions for targeted drug delivery to the brain. **Current Nanoscience**, v. 7, n. 1, p. 119-133, 2011.
- SNYDER, G. L.; GREENBERG, S. Effect of anaesthetic technique and other perioperative factors on cancer recurrence. **British Journal of Anaesthesia**, v. 105, n. 2, p. 106-115, 2010.
- SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3138-3151, 2003.
- SOUZA, M. C. O. et al. Analysis of bupivacaine enantiomers in plasma as total and unbound concentrations using LCMS/MS: Application in a pharmacokinetic study of a parturient with placental transfer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 164, p. 268-275, 2019.
- STEICHEN, S. D.; CALDORERA-MOORE, M.; PEPPAS, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 416–427, 2013.

- SULLIVAN, R. et al. Global cancer surgery: delivering safe, affordable, and timely cancer surgery. **The lancet oncology**, v. 16, n. 11, p. 1193-1224, 2015.
- SUZUKI, J. et al. Palmitate induces apoptosis in Schwann cells via both ceramide-dependent and independent pathways. **Neuroscience**, v. 176, n. 10, p. 188-198, 2011.
- TAGNE, J. B.; KAKUMANU, S.; NICOLOSI, R. J. Nanoemulsion preparations of the anticancer drug dacarbazine significantly increase its efficacy in a xenograft mouse melanoma model. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 6, p. 1055– 1063, 2008.
- TAS, F.; ERTURK, K. Presence of histological regression as a prognostic factor in cutaneous melanoma patients. **Melanoma Research**, v. 26, n. 5, p. 492-496, 2016.
- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: a review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 12, n. 1, p. 40-53, 2013.
- UNGERSTEDT, U. Microdialysis—principles and applications for studies in animals and man. **Journal of Internal Medicine**, v. 230, n. 4, p. 365–373, 1991.
- VAHABI, S.; EATEMADI, A. Effects of anesthetic and analgesic techniques on cancer metastasis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 87, p. 1–7, 2017.
- VAKKILA, J.; LOTZE, M. T. Inflammation and necrosis promote tumor growth. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 8, p. 641-648, 2004.
- VANELLA, V. et al. Emerging PD-1/PD-L1 antagonists for the treatment of malignant melanoma. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 26, n. 2, p. 79-92, 2021.
- VERMA, N. et al. Differentiating tumor recurrence from treatment necrosis: a review of neuro-oncologic imaging strategies. **Neuro-oncology**, v. 15, n. 5, p. 515-534, 2013.
- VIGANO, A.; WATANABE, S.; BRUERA, E. Anorexia and cachexia in advanced cancer patients. **Cancer surveys**, v. 21, p. 99-115, 1994.
- WU CHUANG, A. et al. Direct cytotoxic and indirect, immune-mediated effects of local anesthetics against cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 5845–5858, 2022.
- YADAV, S. et al. Current Advancement in Biosensing techniques for determination of Alanine aminotransferase and Aspartate aminotransferase-a Mini Review. **Process Biochemistry**, v. 114, p. 71-76, 2022.
- YANG, W. et al. The effects of anesthetics on recurrence and metastasis of cancer, and clinical implications. **World Journal of Oncology**, v. 8, n. 3, p. 63–70, 2017.
- YAO, F. et al. Iron regulatory protein 1 promotes ferroptosis by sustaining cellular iron homeostasis in melanoma. **Oncology Letters**, v. 22, n. 3, p. 657-668, 2021.
- YUAN, Z. et al. A controllable local drug delivery system based on porous fibers for synergistic treatment of melanoma and promoting wound healing. **Biomaterials science**, v. 7, n. 12, p. 5084-5096, 2019.
- ZHANG, C.; XIE, C.; LU, Y. Local Anesthetic lidocaine and cancer: insight into tumor progression and recurrence. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 669746-669758, 2021.
- ZHANG, X. H. et al. Efficacy of combined axitinib with dacarbazine in a B16F1 melanoma xenograft model. **Oncology Letters**, v. 6, n. 1, p. 69–74, 2013.
- ZHAO, Y. et al. In Vitro and in Vivo Efficacy Studies of Lavender angustifolia Essential Oil and Its Active Constituents on the Proliferation of Human Prostate Cancer. **Integrative Cancer Therapies**, v. 16, n. 2, p. 215–226, 2017.
- ZHAO, X. et al. Facile preparation of biocompatible nanostructured lipid carrier with ultra-small size as a tumor-penetration delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 170, p. 355-363, 2018.

ZHENG, Q.; PENG, X.; ZHANG, Y. Cytotoxicity of amide-linked local anesthetics on melanoma cells via inhibition of Ras and RhoA signaling independent of sodium channel blockade. **BMC Anesthesiology**, v. 20, n. 1, p. 43–51, 2020.

ZHOU, D. et al. Repositioning Lidocaine as an Anticancer Drug: The Role Beyond Anesthesia. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 565–576, 2020.

ZHOU, X.; HANSSON, G. K. Effect of sex and age on serum biochemical reference ranges in C57BL/6J mice. **Comparative medicine**, v. 54, n. 2, p. 176–178, 2004.

ZINK, W.; GRAF, B. M. The toxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine and levobupivacaine. **Current Opinion in Anesthesiology**, v. 21, n. 5, p. 645–650, 2008.

ZUCKERMAN, L. M. et al. Antiproliferative effect of bupivacaine on patient-derived sarcoma cells. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 13, n. 3, p. 7–22, 2020.

ZUZARTE, M.; SALGUEIRO, L. Essential oils chemistry. **Bioactive essential oils and cancer**, p. 19–61, 2015.

ANEXO 1

Rua 9, quadra 10 - Lote 01
Setor Planalto - Alto Paraíso de Goiás
(62) 3446-2162 - atendimento@terra-flor.com

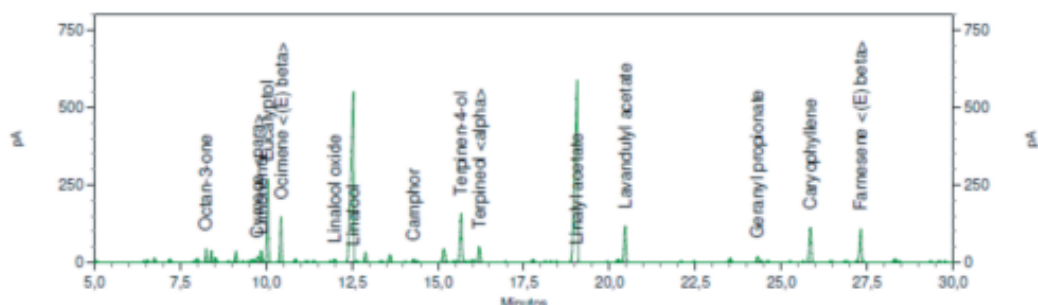
Este documento é uma cópia fiel do fornecedor.

Óleo essencial: Lavanda Francesa - *Lavandula angustifolia* P. Miller
Lote fornecedor: 1538-20
Lote Terra Flor: 20095
Data produção lote: 26/06/2020



Número do pico	Tempo retenção (min)	Concentração %	Nome do composto*	CAS#
1	8,26	0,9	Octan-3-one	106-68-3
2	9,76	0,6	Cymene <para>	99-87-6
3	9,86	1,0	Limoneno	5989-27-5
4	10,06	7,2	Eucalyptol	470-82-6
5	10,44	3,7	Ocimene <(E) beta>	13877-91-3
6	12,00	0,2	Linalool oxide	1365-19-1
7	12,54	27,7	Linalool	78-70-6
8	14,30	0,3	Camphor	76-22-2
9	15,68	5,0	Terpinen-4-ol	562-74-3
10	16,21	1,5	Terpineol <alpha>	98-55-5
11	19,06	28,6	Linalyl acetate	115-95-7
12	20,46	3,7	Lavandulyl acetate	25905-14-0
13	24,32	0,6	Geranyl propionate	105-90-8
14	25,85	3,9	Caryophyllene	87-44-5
15	27,32	3,6	Farnesene <(E) beta>	18794-84-8
% de picos controlados		88,6	-	-
% de picos não controlados		11,4	-	-
Total		100,0	-	-

* Identificação apenas dos componentes controlados.





DECLARAÇÕES DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Certificamos que a proposta intitulada Avaliação in vivo do efeito antitumoral em melanoma de bupivacaína encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados preparados com óleo essencial de lavanda, registrada com o nº 5736-1/2021, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Encida de Paula e Gabriela Geronimo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 18/03/2021.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	15/03/2021 a 15/03/2023
Vigência da autorização para manipulação animal:	18/03/2021 a 15/03/2023
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas

Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Origem:	CEMIB/Unicamp
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério 1 - Área de Fisiologia e Biofísica, DBEF/IB /UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 28 de abril de 2021.

Prof. Dr. Wagner José Fávoro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Por favor, atente-se ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área de pesquisadores regulares. A sua apresentação de relatório no prazo estabelecido impactará nos seus protocolos sejam submetidos.

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
bmar código 55CED6EB 84F04640 97A2CFF3 44DE3F0A

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, COORDENADOR CEUA/UNICAMP**, em 30/04/2021, às 10:23 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 28/04/2021, às 15:52 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Distribuição de bupivacaína encapsulada em CLN em tecidos alvos em modelo de melanoma murino utilizando microdiálise, registrada com o nº 5940-1/2022, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Eneida de Paula e Gabriela Geronimo, Gustavo H R da Silva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **17/02/2022**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/03/2022 a 01/12/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	17/02/2022 a 01/12/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotérios de Roedores da Bioquímica (bloco F), DBBT/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **15 de março de 2022**.

Prof. Dr. Wagner José Fávoro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

DISPOSITIVO: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo até 10 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP área de pesquisadores respondentes. A não apresentação do relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código 37A5EFC2 FA5645C5 A23E427E 7946F367

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 18/03/2022, às 15:15 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 17/03/2022, às 09:00 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
37A5EFC2 FA5645C5 A23E427E 7946F367



DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Avaliação farmacocinética e farmacodinâmica do tratamento de melanoma murino utilizando carreadores lipídicos nanoestruturados preparados com óleo de lavanda e contendo bupivacaína S75:R25**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 19 de julho de 2023.

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **Gabriela Geronimo**

RG n.º 47.033.470-8

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): **Eneida de Paula**

RG n.º 15.121.559-5

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO

1. **GERONIMO, Gabriela**; Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique; de Moura, Ludmilla David; Ribeiro, Lígia Nunes de Moraes; Guilherme, Viviane Aparecida; Mendonça, Talita Cesarim; Castro Simone Ramos; Breitzkreitz, Marcia Cristina; de Paula, Eneida. Development of S 75: R 25 bupivacaine-loaded lipid nanoparticles functionalized with essential oils for treating melanoma. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 96, p. 2197-2207, 2021. DOI: 10.1002/jctb.6715
2. Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique; Moura, Ludmilla David De; Carvalho, Fabíola Vieira De; **Geronimo, Gabriela**; Mendonça, Talita Cesarim; Lima, Fernando Freitas De; De Paula, Eneida. Antineoplastics Encapsulated in Nanostructured Lipid Carriers. **Molecules**, v. 26, p. 6929 - 6953, 2021. DOI: 10.3390/molecules26226929.
3. Carvalho, Fabiola Vieira de; Ribeiro, Ligia Nunes de Moraes; Moura, Ludmilla David de; Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique; Mitsutake, Hery; Mendonça, Talita Cesarim; **Geronimo, Gabriela**; Breitzkreitz, Marcia Cristina; de Paula, Eneida. Docetaxel Loaded in Copaiba Oil-Nanostructured Lipid Carriers as a Promising DDS for Breast Cancer Treatment. **MOLECULES**, v. 27, p. 8838 - 8855, 2022. DOI: 10.3390/molecules27248838.
4. RODRIGUES DA SILVA, Gustavo Henrique; Paes Lemes, Julia Borges; **Geronimo, Gabriela**; Carvalho, Fabiola Vieira de; Mendonça, Talita Cesarim; Malange, Kauê Franco; De Lima, Fernando Freitas; Breitzkreitz, Marcia Cristina; Parada, Carlos Amilcar; Dalla Costa, Teresa; de Paula, Eneida. Improved Local Anesthesia at Inflamed Tissue Using the Association of Articaine and Copaiba Oil in Avocado Butter Nanostructured Lipid Carriers. **Pharmaceuticals**, v. 16, p. 546, 2023. DOI: 10.3390/ph16040546

Apresentações em Workshop / Congressos



51st Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology
46th Congress of the Brazilian Biophysical Society / LAFESB

Águas de Lindóia, São Paulo
September 5th to 8th, 2022

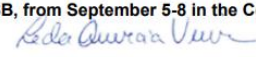
Certificate

We hereby certify that the abstract entitled

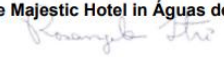
MULTIVARIATE ANALYSIS OF PROCESS VARIABLES IN THE PREPARATION OF NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS

by authors: GERONIMO, G., RODRIGUES DA SILVA, G.H., BREITKREITZ, M.C., CARVALHO, F.V., MENDONÇA, T.C., DE PAULA, E.

was presented during the 51th Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) co-organized with the 46th Congress of the Brazilian Society of Biophysics (SBBf) / LAFESB, from September 5-8 in the Convention Center of the Majestic Hotel in Águas de Lindóia, SP.



President of SBBq
Leda Quercia Vieira



President of SBBf
Rosângela Itri

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "Avaliação *in vivo* do efeito antitumoral de bupivacaína S75:R25 encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados em melanoma" foi apresentado na modalidade de comunicação oral durante o II Congresso Brasileiro de Nanomedicina, realizado nos dias 22 e 23 de setembro de 2022, no Instituto Presbiteriano Mackenzie, São Paulo - SP.

Apresentadora: Gabriela Geronimo
 Co-autores: Gustavo Henrique Rodrigues da Silva, Ludmilla David de Moura, Talita Cesarim Mendonça, Fabíola Vieira de Carvalho e Eneida de Paula.

Brasília, 03 de outubro de 2022

SOCIEDADE BRASILEIRA DE
NANOMEDICINA:0587752200019
0

Assinado de forma digital por SOCIEDADE
BRASILEIRA DE
NANOMEDICINA:05877522000190
Dados: 2022.10.05 14:46:14 -03'00'

Sociedade Brasileira de Nanomedicina

REALIZAÇÃO:



SOCIEDADE
BRASILEIRA DE
NANOMEDICINA

APOIO INSTITUCIONAL:





Mackenzie

IUPAB 20th IUPAB Congress 45th Annual SBBF Meeting 50th Annual SBBq Meeting 13th Annual SBBN Congress

2021

Certificate

NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS PREPARED WITH OLIVE OIL SHOWS ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY, AS SEEN IN ZEBRAFISH ACUTE INFLAMMATORY MODEL

by authors: **GABRIELA GERONIMO, GUSTAVO HENRIQUE RODRIGUES DA SILVA, LUDMILLA DAVID DE MOURA, FABIOLA VIEIRA DE CARVALHO, TALITA CESARIM MENDONÇA, JUAN PABLO GARCÍA-LÓPEZ, CARMEN GLÓRIA FEIJÓO, ENEIDA DE PAULA**

was presented during the 20th International Union for Pure and Applied Biophysics (IUPAB), 50th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 45th Congress of 50th Brazilian Society of Biophysics (SBBF) and 13th Brazilian Society on Nuclear Biosciences Congress (SBBN), virtually, Brazil, on October 4th to 8th, 2021.

Rosângela Itri
Rosângela Itri

Maurício da Silva Baptista
Maurício da Silva Baptista

Chairs of the IUPAB Congress

Sponsors and Support:

- Diamond Sponsor:** cytiva
- Gold Sponsor:** DAAD, SINAPE, SARTORIUS, PETROBRAS, PATRULHA AMARELA BRASIL
- Silver Sponsor:** ThermoFisher Scientific
- Organization:** SBBq, SBBF
- Support:** CNPq, FAPESP, SBBN, CAPES, FAPERJ

Participação em Cursos





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Comissão de Ética no Uso de Animais



CEUA/UNICAMP

Certificamos que **GABRIELA GERONIMO** concluiu o curso online **Legislação e procedimentos para utilização de animais de laboratório**, oferecido pelo **Instituto de Biologia da UNICAMP** e pela **Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório - CEUA/UNICAMP**.

Este certificado tem validade de 02 (dois) anos a partir da data de emissão.

Campinas, 21 dezembro 2020.

A handwritten signature in blue ink, reading "Wagner José Fávaro".

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Professor Assistente Doutor
Presidente da CEUA/UNICAMP