



2023

XXXI Congresso de
Iniciação Científica
Unicamp

AValiação DA CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DESENVOLVIDAS PARA O TRATAMENTO DE MELANOMA CUTÂNEO

Palavras-chave: Melanoma cutâneo, drug-delivery, carreadores lipídicos nanoestruturados, óleo de lavanda, citotoxicidade

Autores:

Ester Shayane de Queiroz Carvalho
Ryan Cardoso Datovo
Vinicius Moreira Machado

Orientadora:

Dra. Eneida de Paula

Co-orientadora:

MSc. Gabriela Geronimo

1. INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é a forma mais agressiva de câncer de pele, com mortalidade de 80%¹ e evolução para metástase cerebral em 75% dos pacientes, sendo um grande problema de saúde pública^{2,3,4,5}. A forma de tratamento é dependente do estágio da patologia, podendo envolver cirurgia, imunoterapia, quimioterapia e terapia fotodinâmica⁶. A terapêutica do melanoma tem sido alvo de intensas pesquisas que visam aumentar a sobrevida dos pacientes, haja vista a alta taxa de recidiva, baixa resposta ao tratamento e o desenvolvimento de resistência medicamentosa^{7,3,8}. 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, prejudicando seu processo de replicação celular, resultando em retardo ou inibição do crescimento do tumor⁹. A dacarbazina porém, apesar de melhorar o prognóstico dos pacientes, possui baixa efetividade terapêutica^{6,10}. Estratégias nanotecnológicas como o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (DDS, do inglês *Drug Delivery Systems*), têm sido cada vez mais utilizadas para contornar as limitações de agentes antineoplásicos¹¹. Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são DDS preparados a partir de uma mistura de lipídios sólidos e líquidos, mais surfactante^{12,13,14}. Esses lipídios podem agir como excipientes funcionais conferindo propriedades farmacêuticas adicionais aos CLN^{15,16,17}. Estudos sobre o uso de óleos essenciais no tratamento de câncer^{18,19,20} mostraram sua aplicabilidade como terapia combinada aos antineoplásicos clássicos, ou na redução dos efeitos adversos causados por este. Por exemplo, Zhao e col. Observaram que o OL foi capaz de inibir a proliferação celular e induzir apoptose em células de câncer de próstata humano (PC-3 e DU145)²¹, e atribuíram a atividade antineoplásica aos seus principais constituintes: linalol e acetato de lilanil. Iwasaki e col. relataram o efeito apoptótico e indução de estresse oxidativo após tratamento de linhagem celular de câncer de cólon humano (HCT 116)²² com linalol. Peng e col. observaram que o acetato de linalila pode alterar 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 ERK²³. Este projeto objetivou utilizar o óleo

essencial de lavanda, ou seus excipientes purificados: linalol e acetato de linalila, como excipientes funcionais para compor a matriz lipídica de CLN inovadores, destinados ao tratamento do melanoma.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As formulações de CLN foram preparadas pelo método de emulsificação-ultrasonicação²⁴. A técnica de espalhamento de dinâmico de luz (DLS) foi empregada para determinar o tamanho e índice de polidispersão (PDI) das partículas, no equipamento ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As amostras foram diluídas 1000x em água desionizada, e medidas a 25 °C (n=3). Os valores do potencial Zeta (PZ, em mV) foram determinados no mesmo equipamento, pelo método de eletroforese de laser Doppler.

O número de partículas foi determinado no equipamento NanoSight NS300 (NanoSight, Reino Unido) com software NTA 2.0 Analytical (NanoSight, Reino Unido), equipado com laser verde a 532 nm, após diluição da amostra (1:50000). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

A avaliação da citotoxicidade (ensaio de MTT) foram feitos com a linhagem não tumoral de fibroblastos murinos (NIH-3T3) e linhagens de melanoma murino (B16-F10) e humano (SK-MEL-103) – dados ainda não concluídos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo de estabilidade físico-química das formulações é importante, uma vez que uma das maiores limitações deste tipo de sistema de liberação é a desestabilização das nanopartículas com o tempo, devido à instabilidade própria dos sistemas coloidais²⁵. Para acompanhar a estabilidade física dos CLN foram utilizados como parâmetros: o diâmetro médio das partículas, o PDI e o PZ, ao longo de 6 meses (180 dias) de armazenamento em temperatura ambiente (25°C), como mostra a Figura 1.

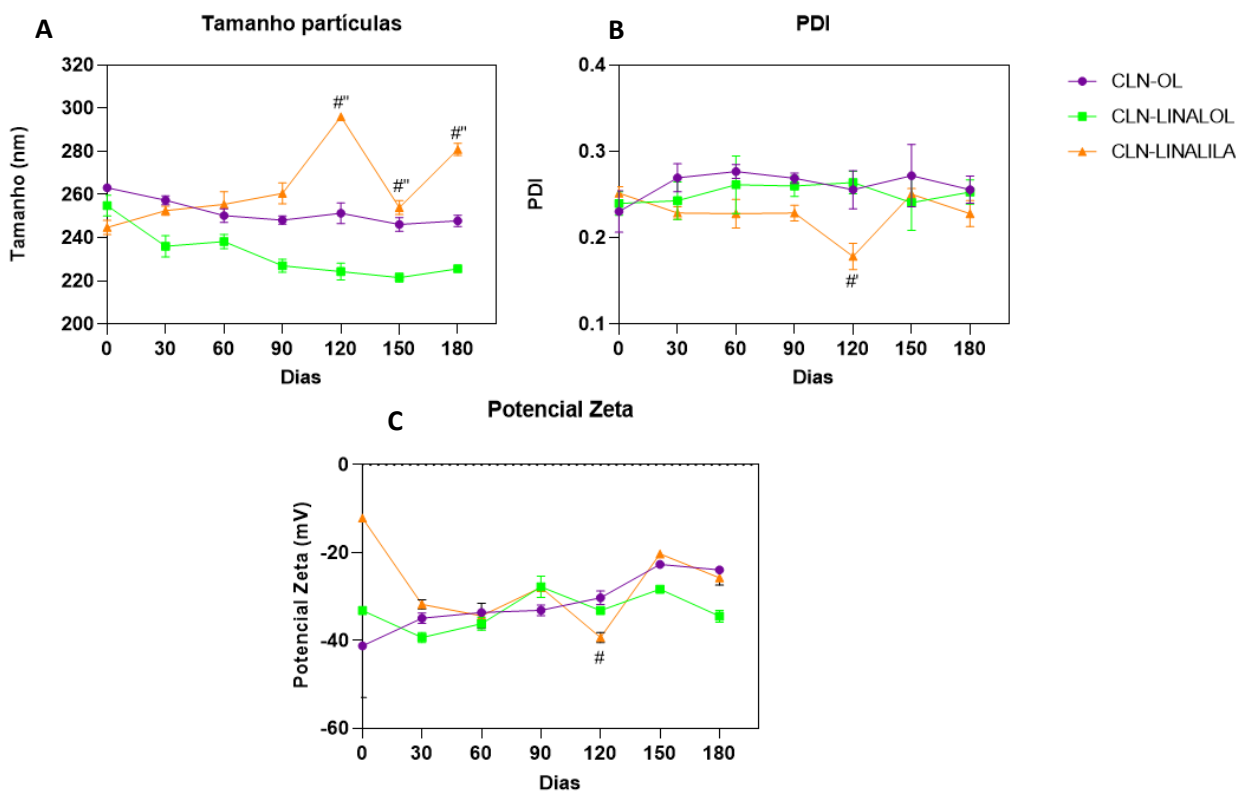


Figura 1. Estabilidade física das formulações de CLN desenvolvidas, acompanhada durante 180 dias de armazenamento a 25°C. **A)** Variação do tamanho médio das partículas; **B)** Variação do PDI; **C)** Variação do potencial Zeta. CLN-OL = carreadores lipídicos nanoestruturados contendo óleo essencial de lavanda, CLN-LINALOL = carreadores lipídicos nanoestruturados contendo linalol,

CLN-LINALILA = carreadores lipídicos nanoestruturados contendo acetato de linalila. Os dados representam a média \pm DP (n = 3). Análise estatística por Two-Way ANOVA com *post hoc* Tukey. # p < 0,05; #' p < 0,001; #' p < 0,0001.

O tamanho médio das partículas de CLN desenvolvidas durante os 6 meses de estabilidade foi de $252,04 \pm 2,82$ nm (CLN-OL), $232,55 \pm 3,39$ nm (CLN-LINALOL) e $263,44 \pm 3,33$ nm (CLN-LINALILA) e os valores de PDI foram $0,26 \pm 0,02$ (CLN-OL), $0,25 \pm 0,02$ (CLN-LINALOL) e $0,23 \pm 0,01$ (CLN-LINALILA). Como pode-se observar, as formulações CLN-OL e CLN-LINALOL apresentaram tamanho nanométrico e PDI < 0,25, indicando monodispersão de tamanhos, características desejáveis para estabilidade coloidal²⁶, sem diferença significativa ao longo do período de estabilidade. Contudo, a formulação CLN-LINALILA apresentou diferenças entre os tamanhos das partículas a partir de 120 dias de análise (p < 0,0001) e nos valores de polidispersão (PDI) no também nos últimos três meses analisados. Os valores de potencial Zeta nas formulações variaram entre: $-31,39 \pm 0,83$ mV (CLN-OL), $-33,20 \pm 1,10$ mV (CLN-LINALOL) e $-27,35 \pm 1,68$ (CLN-LINALILA). Os valores de PZ altos (em módulo) são desejáveis para a estabilidade de prateleira, já que as cargas iguais entre as partículas favorecem a repulsão eletrostática entre as partículas, evitando agregação^{27,28}. O número de partículas foi de $3,43 \times 10^{13}$ /mL (CLN-OL), $3,83 \times 10^{13}$ /mL (CLN-LINALOL) e $4,71 \times 10^{13}$ /mL (CLN-LINALILA) nas formulações desenvolvidas.

A Figura 2 mostra os testes preliminares de citotoxicidade, realizados em células de fibroblastos murino (NIH-3T3) tratadas com as formulações CLN-OL e CLN-LINALOL e com os óleos puros OL e LINALOL, por 24 h. Os resultados não demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos com as nanoformulações e os óleos puros, como também não atingiram a metade da concentração inibitória máxima (IC50). Diante disso, o teste será refeito para confirmação dos dados.

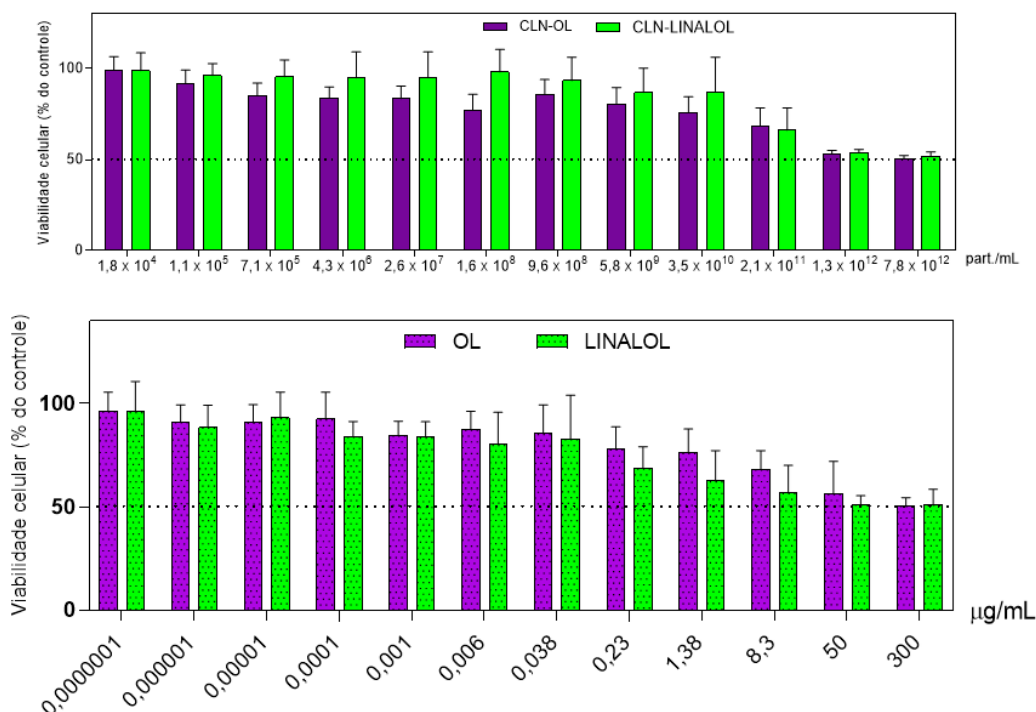


Figura 2. Ensaios de viabilidade celular, em linhagem não tumoral de fibroblastos murinos (NIH-3T3), pelo teste de MTT (24 horas). **A)** Avaliação da citotoxicidade em células tratadas com CLN-OL e CLN-LINALOL; **B)** Avaliação da citotoxicidade em células tratadas com OL (óleo essencial de lavanda) e LINALOL.

4. CONCLUSÃO

Foram desenvolvidos carreadores lipídicos nanoestruturados, contendo OL ou seus dois principais constituintes (Linalol e Linalila) como lipídio líquido constituinte, a fim de analisar o potencial citotóxico desses compostos de origem vegetal contra células tumorais de melanoma cutâneo. As nanopartículas apresentaram tamanho médio de na faixa de 200 nm, baixa polidispersão (PDI ~ 0,2) e potencial elétrico de superfície negativo (- 30 mV). O número de partículas em suspensão foi da ordem de 10^{13} /mL e as formulações mostraram-se estáveis por até 180 dias de armazenamento (CLN-OL e CLN-LINALOL). No entanto, a formulação CLN-LINALILA apresentou variações de tamanho e PDI compatíveis com instabilidade coloidal, tal que a mesma foi descontinuada.

Os testes preliminares de viabilidade celular foram realizados com a linhagem normal de fibroblastos 3T3. Os resultados obtidos não indicaram diferença significativa entre os tratamentos realizados entre as nanoformulações e os óleos puros e como não atingiram a metade da concentração inibitória máxima (IC50), o teste será refeito. Os resultados com as linhagens tumorais de melanoma murino (B16-F10) e humano (SK-MEL-103) ainda não concluídos e serão discutidos no relatório final.

5. REFERÊNCIAS

- (1) 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.
- (2) LEONARDI, G. C. et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International journal of oncology**, v. 52, n. 4, p. 1071-1080, 2018.
- (3) 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.
- (4) BARONE, A. et al. Hybrid nanostructured films for topical administration of simvastatin as adjuvant treatment of melanoma. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 10, p. 3396-3407, 2019.
- (5) INCA. Instituto Nacional de Cancer. Cancer de pele Melanoma. <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pele-melanoma>>.
- (6) DOMINGUES, B. et al. Melanoma treatment in review. **Immuno Targets and Therapy**, v.7, p. 35–49, 2018.
- (7) SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3138-3151, 2003.
- (8) REBECCA, V. W.; SOMASUNDARAM, R.; HERLYN, M. Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 2858–2866, 2020.
- (9) HAFEEZ, A.; KAZMI, I. Dacarbazine nanoparticle topical delivery system for the treatment of melanoma. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16517–16526, 2017.
- (10) 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.
- (11) CHO, K. et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1310-1316, 2008.
- (12) 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.
- (13) 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.

- (14) 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.
- (15) 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.
- (16) 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.
- (17) 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.
- (18) ZUZARTE, M.; SALGUEIRO, L. Essential oils chemistry. **Bioactive essential oils and cancer**, p. 19-61, 2015.
- (19) 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.
- (20) 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.
- (21) 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.
- (22) IWASAKI, K. et al. Anticancer effect of linalool via cancer-specific hydroxyl radical generation in human colon cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 44, p. 9765–9774, 2016.
- (23) 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.
- (24) 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.
- (25) 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.
- (26) OLIVEIRA, J. D. et al. Sustained Release from Ionic-Gradient Liposomes Significantly Decreases ETIDOCAINE Cytotoxicity. **Pharmaceutical Research**, v. 35, n. 12, 2018.
- (27) LIU, Y.; NAIDU, R.; MING, H. Surface electrochemical properties of red mud (bauxite residue): Zeta potential and surface charge density. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 394, n. 1, p. 451–457, 2013.
- (28) KANÁSOVÁ, M.; NESMĚRÁK, K. Systematic review of liposomes' characterization methods. **Monatshefte für Chemie**, v. 148, n. 9, p. 1581–1593, 2017.