

Formulações de sinvastatina na proliferação e viabilidade de células tumoriais

Versão final após defesa

Maria Carolina Martins Gaspar

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Biotecnologia

2º ciclo de estudos

Orientador: Prof.^a Doutora Adriana Oliveira dos Santos

Dezembro de 2023

Declaração de Integridade

Eu, Maria Carolina Martins Gaspar, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M11838 de Biotecnologia da Faculdade (indicar), declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 14/12 /2023

(assinatura conforme Cartão de Cidadão ou preferencialmente assinatura digital no documento original se naquele mesmo formato)

Maria Carolina Martins Gaspar

“Na Natureza, nada se cria, nada se perde, tudo se transforma”

Antoine Lavoisier

Agradecimentos

É com profunda gratidão e alegria que dedico este momento para expressar os meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a conclusão desta tese.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer com destaque a Professora Adriana pela orientação valiosa, paciência incansável e apoio incondicional ao longo de todo o processo. Ao Francisco e a Catarina pela disponibilidade e auxílio que me forneceram nos meus primeiros passos.

À minha família, em especial, aos meus pais e a minha irmã, não tenho palavras suficientes para expressar o quanto estou grata pelo vosso amor, apoio e incentivo constantes. Sem vocês não estaria aqui nem teria completado esta etapa.

A todos os meus amigos, tanto aos antigos como os que fui fazendo pelo caminho um sincero obrigado, sem vocês este percurso não teria sido o mesmo. Agradeço especialmente aos membros oficiais do turno da noite, a Adriana, Matilde e Ricardo e ainda a Inês e Mafalda, e aos nossos membros honorário, por todo apoio e amizade que me forneceram neste último ano, decerto que pensarei com carinho nas noitadas que passamos juntos.

Este marco não é apenas meu, mas de todos vós que estiveram ao meu lado ao longo desta jornada. A minha tese não é apenas o resultado de esforço individual, mas o produto de um esforço coletivo e do generoso apoio de muitos.

Por fim, quero expressar a minha gratidão à instituição pela oportunidade de realizar este estudo e pelo ambiente propício à aprendizagem que proporcionaram.

Este trabalho de investigação foi realizado no Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS-UBI), na Universidade da Beira Interior e foi apoiado por fundos nacionais provenientes da base de financiamento (referência UIDB/00709/2020) e financiamento programático através do CICS-UBI (referência UIDP/00709/2020).

Resumo

O cancro da próstata manifesta-se a nível global como uma das principais causas de óbito, resultando em milhões de fatalidades anualmente. Apesar da existência de uma ampla gama de tratamentos considerados padrão, estes estão associados a baixas taxas de sucesso e a variados efeitos colaterais debilitantes. desta forma, continua a ser de elevada importância desenvolver abordagens que possam melhorar a eficácia terapêutica e superar as limitações dos tratamentos atuais.

A sinvastatina, um fármaco originalmente desenvolvido para reduzir os níveis de colesterol no sangue, tem demonstrado potencial para exercer efeitos além do seu uso tradicional. Vários estudos têm sugerido que a sinvastatina tem propriedades que poderiam ser exploradas no tratamento do cancro. Esses efeitos estão intrinsecamente relacionados com a habilidade da sinvastatina de inibir a via de síntese do colesterol, através da sua notável inibição da enzima hidroximetilglutaril-coenzima A redutase. Além da modulação dos níveis de colesterol, a sinvastatina parece exibir outras propriedades notáveis (efeitos pleiotrópicos) que demonstram potencial a nível anticancerígeno. Por exemplo, a nível da inibição da via sintética que desempenha um papel crucial na proliferação e na sinalização celular de células tumorais e não tumorais.

O foco central deste trabalho residiu no desenvolvimento, aprimoramento, e análise da eficácia de micro e nanoemulsões na entrega da sinvastatina, com o intuito de aperfeiçoar a sua eficácia terapêutica. De maneira mais precisa, esta pesquisa aborda o impacto da sinvastatina no crescimento celular das células tumorais da próstata PC-3 e DU145. Para tal, foi realizado um ensaio inicial do impacto da sinvastatina na ausência de transportadores nas duas linhas celulares referenciadas anteriormente. Esse ensaio foi crucial para estabelecer um padrão de comparação com o fármaco quando formulado.

Foi realizado posteriormente otimização e desenvolvimento de micro e nanoemulsões. Um *screening* inicial da concentração de polietilenoglicol 4000 (0,75%, 1% ,2%) e das condições de armazenamento (25 °C e 4 °C) foi realizado de forma a assegurar propriedades como o tamanho hidrodinâmico e homogeneidade (PDI, do inglês *polydispersity index*) de gotículas de forma desejável. Posteriormente foi feita uma comparação das formulações desenvolvidas, tanto neutras como catiónicas.

Os perfis *in vitro* de libertação do fármaco foram caracterizados com recurso a câmaras de Ussing horizontais, sendo posteriormente avaliados os respetivos perfis cinéticos. Realizou-se um estudo sobre o impacto da adição de α -tocoferol na estabilidade química

a uma temperatura de 40 °C durante 15 dias. As quantificações do fármaco nos ensaios de liberação de degradação foram realizadas por cromatografia líquida acoplada à detecção UV, tendo ocorrido a sua validação previa. As micro e nanoemulsões com maior potencial para administração intravenosa foram posteriormente testadas nas linhas celulares PC-3 e DU145.

Tanto as nano como microemulsões neutras com fármaco demonstraram elevada homogeneidade ($PDI \leq 0,1$). Nanoemulsões neutras com 5,55% de sinvastina exibiram valores de PDI de 0,134 e 0,050, com tamanhos de gotícula em torno dos 160 nm e 130 nm, antes e após, respectivamente, da refrigeração das mesmas a 4 °C. Já as microemulsões com 8,93% de sinvastina exibiram um PDI de 0,034, e um tamanho de 31,2 nm.

As formulações catiónicas, exibiram tamanhos similares de 29 nm e 27 nm nas microemulsões com 2,9% e 5,95% de fármaco, e 111 nm e 104 nm nas nanoemulsões com 1,85% e 3,7 % de fármaco. O PDI foi de 0,16 e 0,04 em nanoemulsões e 0,07 e 0,06 em microemulsões. Inesperadamente não foi possível realizar a caracterização das maiores concentração de cada formulação de 8,93% em microemulsão e 5,55% de nanoemulsão devido a sua precipitação após diluição.

Durante os ensaios de liberação *in vitro*, verificou-se uma liberação incompleta, tendo sido obtidas percentagens totais de liberação ao fim de 6 horas de apenas 9,2%, 16%, 9,2% e 11,60% para a nanoemulsão catiónica, microemulsão catiónica, nanoemulsão neutra e microemulsão neutra, respectivamente. Estas baixas taxas de liberação resultaram, em parte, da alta adsorção da sinvastatina por parte da membrana/Câmaras de Ussing. A qual demonstrou taxas muito superiores ao esperado, sendo exibido valores de 37,48%, 76,24%, 46,26% e 45,03% para a nanoemulsão catiónica, microemulsão catiónica, nanoemulsão neutra e microemulsão neutra, respectivamente. Demonstrando que, o fármaco na sua maioria permanece retido ou adsorvido relativamente a pequena percentagem que é libertada.

Usando como matéria-prima sinvastatina já adicionada de antioxidante, formulações, com sem adição de DL- α -Tocoferol apresentaram estabilidade química pelo menos durante 15 dias a 40 °C.

Foi demonstrada a promoção do efeito inibitório do crescimento celular da sinvastatina com as novas formulações comparativamente ao fármaco livre, o que demonstra a sua eficácia como veículos para administração de fármacos. No entanto, este efeito promissor foi observado exclusivamente na linha PC-3 à concentração de 1-3 μ M,

alcançando-se valores de viabilidade de 31,7% nas microemulsões e 35,2% nas nanoemulsões, o que não foi observado na linha DU145 mantendo valores de viabilidade >85% nos dois tipos de emulsões. O uso de transportadores permitiu a inibição do crescimento celular com concentrações inferiores de fármaco, tendo sido demonstrando inibições de 30,1 % com as micro e 26,8% com as nanoemulsões a apenas 3 µM. Este nível de inibição só foi observado com o fármaco livre a concentrações de 30 µM. Em conclusão, por meio da administração da sinvastatina utilizando micro e nanoemulsões neutras, foi viabilizada a otimização da dose citotóxica e a obtenção de elevada inibição tumoral quando em comparação à resultante do fármaco livre. Esses resultados destacam o potencial promissor das nano e microemulsões como uma abordagem de entrega terapêutica.

Palavras-chave

Agente Citotóxico, Cancro da próstata, Entrega, microemulsão, nanoemulsão, sinvastatina.

Abstract

Prostate cancer manifests globally as one of the leading causes of mortality, resulting in millions of fatalities annually. Despite the existence of a wide range of treatments considered standard, these are associated with low success rates and various debilitating side effects. Therefore, it remains of high importance to develop approaches that can improve therapeutic effectiveness and overcome the limitations of current treatments.

Simvastatin, a drug originally developed to reduce blood cholesterol levels, has shown potential to exert effects beyond its traditional use. Several studies have suggested that simvastatin has properties that could be explored in cancer treatment. These effects are intrinsically related to simvastatin's ability to inhibit the cholesterol synthesis pathway, through its notable inhibition of the enzyme hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase. In addition to modulating cholesterol levels, simvastatin appears to exhibit other notable properties (pleiotropic effects) that demonstrate anticancer potential. For example, it inhibits the synthetic pathway that plays a crucial role in the proliferation and cell signaling of both tumor and non-tumor cells.

The central focus of this work was on the development, enhancement, and analysis of the effectiveness of micro and nanoemulsions in delivering simvastatin to improve its therapeutic efficacy. More precisely, this research addresses the impact of simvastatin on the cellular growth of prostate tumor cells PC-3 and DU145. For this purpose, an initial assay of simvastatin's impact in the absence of transporters in the two aforementioned cell lines was conducted. This assay was crucial to establish a benchmark for comparison with the formulated drug.

Subsequently, optimization and development of micro and nanoemulsions were carried out. An initial screening of polyethylene glycol 4000 concentration (0.75%, 1%, 2%) and storage conditions (25°C and 4°C) were performed to ensure properties such as hydrodynamic size and homogeneity (Polydispersity Index, PDI) of droplets met desirable standards. A comparison of the developed formulations, both neutral and cationic, was conducted.

The in vitro drug release profiles were characterized using horizontal Ussing chambers, and their respective kinetic profiles were evaluated. A study on the impact of adding α -tocopherol on chemical stability at a temperature of 40 °C for 15 days was conducted. Drug quantifications in degradation release assays were performed using liquid chromatography coupled with UV detection, with prior validation. The micro and

nanoemulsions with the highest potential for intravenous administration were subsequently tested on the PC-3 and DU145 cell lines.

Both neutral nano and microemulsions with the drug demonstrated high homogeneity (PDI \leq 0.1). Neutral nanoemulsions with 5.55% simvastatin exhibited PDI values of 0.134 and 0.050, with droplet sizes around 160 nm and 130 nm before and after refrigeration at 4°C, respectively. Microemulsions with 8.93% simvastatin exhibited a PDI of 0.034 and a size of 31.2 nm.

The cationic formulations showed similar sizes of 29 nm and 27 nm in microemulsions with 2.9% and 5.95% drug, and 111 nm and 104 nm in nanoemulsions with 1.85% and 3.7% drug. The PDI was 0.16 and 0.04 in nanoemulsions and 0.07 and 0.06 in microemulsions. Unexpectedly, it was not possible to characterize the highest concentration of each formulation, 8.93% in microemulsion and 5.55% in nanoemulsion, due to their precipitation after dilution.

During in vitro release assays, incomplete release was observed, with total release percentages after 6 hours being only 9.2%, 16%, 9.2%, and 11.60% for cationic nanoemulsion, cationic microemulsion, neutral nanoemulsion, and neutral microemulsion, respectively. These low release rates resulted, in part, from the high adsorption of simvastatin by the membrane/Ussing chambers, which exhibited much higher rates than expected, with values of 37.48%, 76.24%, 46.26%, and 45.03% for cationic nanoemulsion, cationic microemulsion, neutral nanoemulsion, and neutral microemulsion, respectively. This demonstrates that the drug mostly remains retained or adsorbed rather than being released.

Using simvastatin with added antioxidant as the raw material, formulations without the addition of DL- α -tocopherol showed chemical stability for at least 15 days at 40°C.

The promotion of the inhibitory effect of simvastatin on cell growth was demonstrated with the new formulations compared to the free drug, indicating their efficacy as drug delivery vehicles. However, this promising effect was observed exclusively in the PC-3 cell line at concentrations of 1-3 μ M, achieving viability values of 31.7% in microemulsions and 35.2% in nanoemulsions, which was not observed in the DU145 line, maintaining viability values $>$ 85% in both types of emulsions. The use of carriers allowed the inhibition of cell growth at lower drug, demonstrating inhibitions of 30.1% with microemulsions and 26.8% with nanoemulsions at only 3 μ M. This level of inhibition was only observed with the free drug at the concentration of 30 μ M.

In conclusion, the administration of simvastatin using neutral micro and nanoemulsions allowed for the optimization of the cytotoxic dose and achieved high tumor inhibition compared to the result of the free drug. These results highlight the promising potential of nano and microemulsions as a therapeutic delivery approach.

Keywords

Cytotoxic Agent Microemulsion, Nanoemulsion, Prostate cancer, Simvastatin.

Índice

Índice de Figuras	xx
Índice de Tabelas.....	xxiii
Lista de acrónimos.....	xxv
Introdução	1
1.1 Cancro da próstata.....	1
1.1.1. Incidência e mortalidade	1
1.1.2 Anatomia da próstata	2
1.1.2.1 Composição celular da próstata.....	5
1.1.3 Causas e fatores de risco.....	6
1.1.4 Fatores prognósticos	7
1.1.4.1 Classificação de Gleason	7
1.1.4.2 Teste do antigénio específico da próstata (PSA)	8
1.1.4.3 Estágio clínico TNM	9
1.1.4.4 Estágios do cancro da próstata.....	9
1.1.5 Tratamento convencional de doentes com cancro da próstata.....	9
1.1.5.1 Tratamento para cancro localizado	10
1.1.5.2 Tratamento para cancro metastático	10
1.1.5.2.1 Quimioterapia.....	11
1.1.5.2.2 Terapia hormonal/privação de androgénios.....	12
1.1.6 Sinvastatina	13
1.1.6.1 Ação farmacológica e metabolismo da sinvastatina	13
1.1.6.2 Potencial terapêutico das estatinas e a implicação na regulação metabólica do cancro da próstata	15
1.1.7 Emulsões.....	19
1.1.7.1 Microemulsão.....	21
1.1.7.2 Nanoemulsão.....	22
1.1.8 Métodos analíticos usados na avaliação biológica, caracterização e avaliação da estabilidade de formulações.	23

1.1.8.1 Ensaio de redução de resazurina	23
1.1.8.2 Espalhamento dinâmico da luz	24
1.1.8.3 Cromatografia líquida de alta Eficiência.....	25
1.1.8.4 Ensaios de libertação com câmaras horizontais de Ussing.....	27
Objetivos.....	29
Materiais e Métodos	31
3.1 Materiais e Reagentes	31
3.2 Métodos	32
3.2.1 Soluções de sinvastatina.....	32
3.2.2 Culturas celulares	32
3.2.2.1 Manutenção e crescimento de culturas celulares	32
3.2.7 Estudos de Estabilidade Química e Física	39
3.2.8 Análise estatística	39
Resultados e Discussão.....	41
4.1. Estudo da influência do fármaco livre no crescimento celular de linhas de cancro da próstata.....	41
4.2 Caracterização de Micro e Nanoemulsões.....	42
4.3 Ensaio de libertação.....	49
4.4 Estudos de Estabilidade Química	55
4.5 Crescimento celular de linhas de cancro da próstata tratadas com Micro e Nanoemulsões de sinvastatina in vitro.....	56
Conclusão	61
Referências	63
Anexos	77

Índice de Figuras

Figura 1: Ranking (Próstata), número estimado de mortes em 2020	2
Figura 2 : Ilustração representativa da anatomia geral da próstata	3
Figura 3 : Anatomia zonal da próstata..	4
Figura 4: Ilustração da composição celular de uma glândula da próstata.....	5
Figura 5: Ilustração dos diferentes graus de classificação de Gleason e a granularidade tecidual associada.....	8
Figura 6: Estruturas moleculares de (A) hidroximetilglutaril-coenzima A, (B) sinvastatina na forma de lactona.	13
Figura 7: Via da síntese do colesterol e todos os posteriores intermediários	14
Figura 8: Interconversão da forma ácida para lactona	15
Figura 9: Emulsão O/A e a estrutura dos tensoativos na superfície da fase dispersa ...	20
Figura 10: Classificações das diferentes emulsões (A) Óleo em água, (B) Água em óleo, (C) Água em Óleo e em água, (D) Óleo em água e em óleo..	21
Figura 11: Figura ilustrativa de (A) microemulsões e (B) nanoemulsões.	22
Figura 12: Processo de redução de resazurina	24
Figura 13: Representação esquemática do processo analítico de espalhamento dinâmico de luz.....	25
Figura 14: Ilustração do método de cromatografia de fase reversa e as respectivas interações com a matriz.....	27
Figura 15: Imagem ilustrativa do ensaio da redução da resazurina.....	33
Figura 16: Imagem ilustrativa do procedimento de caracterização das diversas formulações	36
Figura 17: Ilustração do aparato das câmaras Ussing horizontais.....	36
Figura 18: Processo de Funcionamento e aparato do HPLC.....	38

Figura 19: Perfil de crescimento celular de duas linhas de cancro da próstata (PC-3 e DU145) após tratamento por 72 horas com diferentes concentrações (0.01 μ M a 30 μ M) de sinvastatina. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão, com replicados de n=1 de N=5 lotes independentes. Os dados correspondem ao estudo da significância estatística por ANOVA unidirecional, as diferenças entre os grupos de teste são destacadas pelos símbolos *. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ e ** $p < 0,01$41

Figura 20: A- Precipitação de NE Sinv 5,55%. B – Solubilização completa de NE Sinv 1,85 % e 3,7%. Em A a precipitação é visível sob forma de um depósito branco no fundo das cuvetes.47

Figura 21: Caracterização do tamanho de gotículas das nanoemulsões (NE) a e microemulsões (ME) catiónicas em função da concentração de sinvastatina). NE foi realizado com concentrações de 0%,1,85% e 3,7%, ME realizado com 0%, 2,94 % e 5,94 %. A – Índice de polidispersão (PDI) de ambas formulações (NE e ME). B – Diâmetro hidrodinâmico (DH) de ambas formulações (NE e ME). Os dados correspondem à média \pm desvio padrão, com replicados de n=2 cuvetes de N=3 lotes independentes, à temperatura de 25 °C (ME) e 4 °C (NE). 48

Figura 22: Perfil percentual de libertação do fármaco sinvastatina. Amostras foram coletadas entre 15 e 360 minutos. Quatro formulações diferentes, foram testadas, assim como uma solução de sinvastatina preparada em Transcutol® HP. Formulações catiónicas estão referidas como Cat, a solução de Transcutol como apenas Solução... 50

Figura 23: Perfil percentual de adsorção do fármaco sinvastatina. Amostras foram coletadas entre 15 e 360 minutos. Quatro formulações diferentes foram testadas, assim como uma solução de sinvastatina preparada em Transcutol® HP. Nano e microemulsão estão referidos como NE e ME, respetivamente. Formulações catiónicas estão referidas como Cat, a solução de Transcutol como apenas Solução..... 51

Figura 24: Perfil percentual de normalização da libertação da sinvastatina em relação a sua adsorção. Amostras foram coletadas entre 15 e 360 minutos. Quatro formulações diferentes, foram testadas, assim como uma solução de sinvastatina preparada em Transcutol® HP. Formulações catiónicas estão referidas como Cat, a solução de Transcutol como apenas Solução. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão, N=3 lotes independentes..... 52

Figura 25: Dados de libertação do fármaco de ambas as formulações ajustados com uma regressão linear a vários modelos cinéticos. (A) Libertação de ordem zero de ME e NE N;

(B) Liberação de primeira ordem ME e NE N; (C) Modelo de Higuchi de liberação ME e NE N; (D) Liberação de ordem zero de ME e NE Cat; (E) Liberação de primeira ordem ME e NE Cat; (F) Modelo de Higuchi de liberação ME e NE Neutras. Formulações catiónicas estão referidas como Cat. 53

Figura 26: Concentração de sinvastatina em percentagem ao longo do tempo utilizando seis diferentes estratégias de formulação. (A) NE Simv com 5,55% 0%, 0,05 %, 0,5 % de DL- α -Tocoferol. (B) ME Simv com 8,93% 0% ,0,01 %, 0,1 % de DL- α -Tocoferol. O armazenamento foi testado a temperatura de 40 °C. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão, com replicados de n=5 quantificações de N=2 lotes independentes.55

Figura 27: Ensaio de resazurina após tratamento das linhas celulares PC-3 e DU145 por 72 horas com diferentes concentrações (0,01 μ M a 3 μ M) de sinvastatina livre (repetição parcial dos resultados da Figura 19 para comparação) ou formulada numa nanoemulsão (NE) ou numa microemulsão (ME) neutras. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de n=1 de N=3 lotes independentes. Os dados correspondem ao estudo da significância estatística por ANOVA unidirecional, as diferenças entre os grupos de teste são destacadas pelos símbolos *. ** $p < 0,01$. Nanoemulsaos com e sem fármaco referido como NE c/sinv e NE s/sinv, respectivamente. Microemulsoes com e sem fármaco referido como ME c/sinv e ME s/sinv , respectivamente.57

Figura 28: Curvas dose-resposta e respetivos valores de IC₅₀ (Concentração Inibitória a 50%) para fármaco livre (FL), nanoemulsão (NE) e microemulsão (ME) na linha celular PC-3. 59

Índice de Tabelas

Tabela 1: Mortalidade em Portugal resultante de cancro da próstata entre 2011-2015...	2
Tabela 2: Tarefas e posterior objetivos a ser atingido a partir destas.	29
Tabela 3: Nome comercial e nome farmacêutico de cada matéria-prima, acrónimo usado no texto, se aplicável, e respetiva origem.	31
Tabela 4: Caracterização do índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico (DH) de nanoemulsões contendo diferentes concentrações de PEG (0,75%, 1,5% e 2%) na fase aquosa. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão, com replicado n=2 cuvetes de N=1 lote de formulação, a temperatura de 25 °C e 5,55% de sinvastina. Nanoemulsão com PEG referida como NE_PEG.....	43
Tabela 5: Índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico (DH) de NE e ME neutras a diferentes concentrações de Sinvastatina (0%, 5,55%, 8,93%). Os dados correspondem à média \pm desvio padrão, com replicado n=2 cuvetes de N=1, a temperatura de 25 °C e 4 °C. Para formulações com a ausência de fármaco este foi referido como 0% e com a presença foi exibido 5,55% e 8,83% para NE e ME, respetivamente.	44

Lista de acrónimos

CAT	Catiónicas
CP	Cancro da próstata
CRPC	Cancro da próstata resistente à castração
DCV	Doenças cardiovasculares
EAU	Rede Nacional de Urologia, do inglês <i>European Association of Urology</i>
HPLC	Cromatografia de alta eficiência
HPB	Hiperplasia prostática benigna
LDLR	Lipoproteína de baixa densidade
LDS	Gotículas lipídicas
ME	Microemulsões
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
NE	Nanoemulsões
OMS	Organização Mundial de Saúde, do inglês
PEG	Polietilenoglicol
PSA	Antigénio específico da próstata, do inglês <i>Prostate Specific Antigen</i>
PDI	Do inglês, <i>polydispersity index</i>
RNCA	Rede Nacional de Cancro Abrangente
RPMI	Do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TNM	Tumor-Nódulo-Metástase
TPA	Terapia hormonal/privação de androgénios

Capítulo 1

Introdução

O cancro apresenta-se mundialmente como uma das principais causas de morte e uma das maiores barreiras para o aumento da esperança de vida [1]. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2020 este grupo de doenças apresentava-se como a 6^a causa de morte no mundo, tendo sido responsável por mais de 1,8 milhões de ambos os sexos. Entre este número de óbitos inserem-se 375,304 mil mortes correspondentes apenas ao cancro da próstata, sendo o quinto tipo de cancro com maior taxa de mortalidade no sexo masculino.

Existe amplas gamas de fatores de risco para o cancro da próstata, no entanto, apresentam se entre os principais a etnia, idade e história familiar, fatores hormonais e genéticos. Outro fator com grande impacto na fatalidade desta a patologia é o seu diagnóstico tardio proporcionado pela ausência de sintomas na fase inicial, o que resulta em tratamentos com baixas taxas de sucesso [2]. Apesar dos constantes desenvolvimentos na área, os tratamentos indicados para esta patologia necessitam de constante otimização.

A sinvastatina, fármaco usado no tratamento de dislipidemias, tem despertado elevado interesse como candidata no tratamento de diversos cancros, atuando como reguladora de variadas vias específicas desta patologia. No entanto, devido a sua significativa toxicidade em altas concentrações, torna-se essencial a otimização da sua entrega [3]. No trabalho reportado nesta dissertação, novas formulações na forma de nano e microemulsões foram testadas com esse propósito.

1.1 Cancro da próstata

1.1.1. Incidência e mortalidade

O cancro da próstata apresenta-se como uma das principais preocupações de saúde pública, devido à sua alta incidência e impacto devastador na vida de milhões de homens [1]. Este ocupa o segundo lugar como o cancro mais frequentemente diagnosticado na população masculina e é a quinta principal causa de morte relacionada com o cancro entre os homens em todo o mundo. De acordo com OMS em 2020, foram registados cerca de 1,414 milhões de novos casos de cancro da próstata, resultando em 375,304 mil mortes, sendo a principal causa de morte relacionada com cancro em 48 países [4], [5] Infelizmente, é de esperar que o impacto do cancro da próstata venha a aumentar, devido

ao envelhecimento da população e ao crescimento económico. Até 2040, prevê-se que estes números cresçam para quase 2,3 milhões de novos casos e 740 mil mortes [6].

Mundialmente, o cancro da próstata tem maior taxa de mortes nos países mais desenvolvidos, em especial na América do Norte, oeste da Europa, Caraíbas, Austrália e Nova Zelândia, e África do Sul. Contrariamente, a Ásia e África do Norte, demonstram as taxas mais baixas (Figura 1). Esta relação pode ser justificável pela maior facilidade de acesso a serviços de saúde, e uma maior consciencialização sobre a doença, resultando num aumento da realização de exames e, subsequentemente, no estabelecimento de diagnósticos [7].

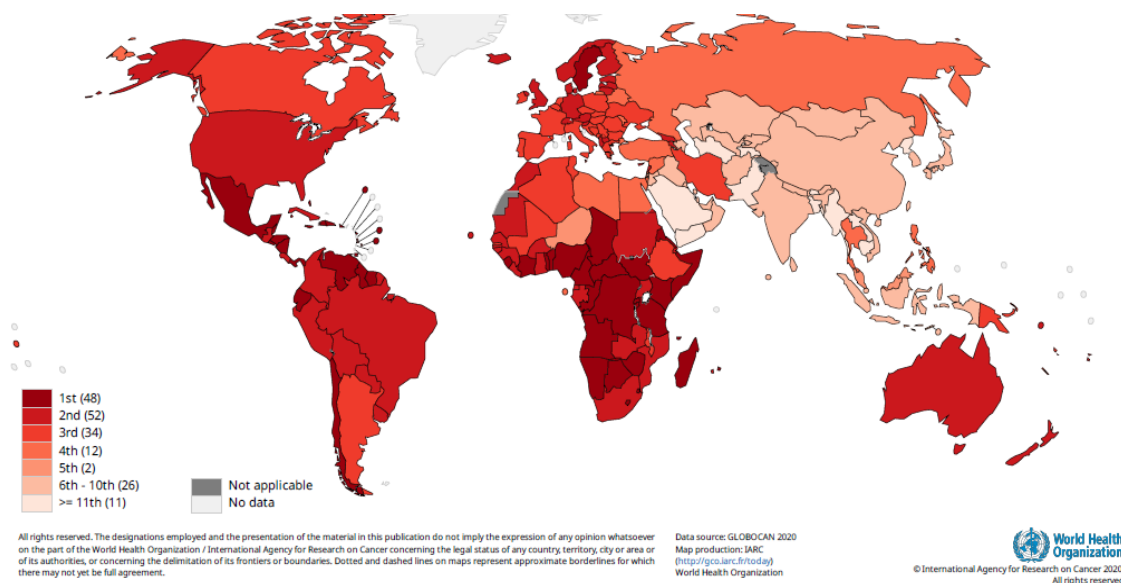


Figura 1: Ranking (Próstata), número estimado de mortes em 2020 [4].

Na Europa, os países com maior taxa de mortalidade foram a Estónia, Eslováquia e Letónia [4]. Também a nível nacional, esta patologia tem demonstrado elevadas taxas de mortalidade sendo demonstrado pela Direção nacional de Saúde um número bastante elevado e relativamente constante de óbitos entre 2011-2015 (Tabela 1).

Tabela 1: Mortalidade em Portugal resultante de cancro da próstata entre 2011-2015.

	2011	2012	2013	2014	2015
Número de óbitos	1815	1806	1714	1787	1723

1.1.2 Anatomia da próstata

A próstata é uma glândula exócrina de grande importância do sistema reprodutor masculino. Está localizada na zona inferior à bexiga, anterior ao reto e envolvente da uretra (Figura 2). A próstata não possui uma cápsula verdadeira do ponto de vista histológico. Em vez disso, é cercada por uma camada de tecido fibromuscular com

espessura de 2-3 mm denominada cápsula prostática. Essa camada é indistinguível do estroma prostático [8]. A base da próstata envolve o colo da bexiga urinária e circunda a parte inicial uretra, por onde a urina e o esperma passam. Esta tem uma forma similar a uma castanha e exhibe aproximadamente 3-4 cm de diâmetro com peso associado de certa de 20 gramas. No entanto, essas características têm tendência a alterar com o avançar da idade [9].

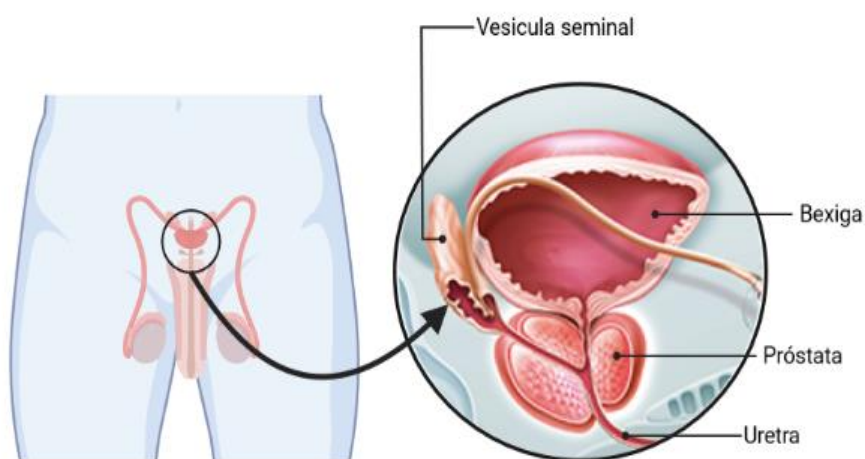


Figura 2 : Ilustração representativa da anatomia geral da próstata, realizado com Biorender.

A próstata possui um sistema de nervos intrincado. Recebe a inervação de neurónios mistos que fazem parte do plexo pélvico, composto por neurónios simpáticos e parassimpáticos [10]. Os neurónios simpáticos têm origem na coluna vertebral lombar, enquanto os parassimpáticos se originam na medula espinhal sacral. Essa inervação desempenha um papel fundamental no controlo da micção e da ejaculação.

A próstata é constituída por quatro zonas distintas, mas associadas, que possuem grande importância morfológica, funcional e anatómica [9] (Figura 3). A zona periférica, corresponde a cerca de 70% da glândula, é a parte mais externa da próstata. Esta é associada ao maior número de tumores, apresentando aproximadamente 75% dos carcinomas [11]. Esta zona deriva dos ductos periféricos, que se desenvolvem lateralmente no mesênquima posterior ao segmento uretral distal. Os orifícios mais proximais desses ductos situam-se lateralmente à base do verumontanum, e estende-se progressivamente até ao ápice da próstata. A composição do tecido é glandular e muscular, estando estes envolvidos por uma cápsula fibrosa. As glândulas desta zona são responsáveis pela produção do líquido prostático adicionado ao esperma durante a ejaculação. O tecido muscular é composto por pequenos músculos lisos controlados pelo sistema nervoso autónomo, o qual controla a função erétil e evacuação do líquido prostático durante a ejaculação. Este líquido é composto por uma mistura de proteínas e

substâncias nutritivas que ajudam a proteger, nutrir os espermatozoides e pela produção do antígeno prostático específico (PSA), o que melhora a motilidade e capacidade de fertilização.

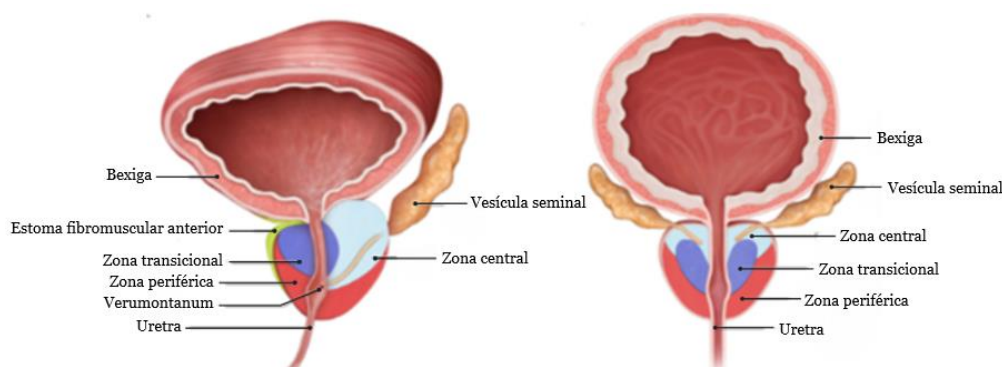


Figura 3 : Anatomia zonal da próstata, adaptado [12]. À esquerda apresenta-se a ilustração da direção anatômica sagital; à direita apresenta-se a coronal.

A zona central da próstata é composta principalmente por tecido muscular liso e granular, e representa cerca de 25% da próstata. As glândulas da zona central tendem a ser menores e menos abundantes do que as da zona periférica. A zona central é composta por dutos que se originam no mesênquima ao redor dos ductos ejaculatórios e estão localizados num pequeno círculo ao redor dos orifícios dos ductos ejaculatórios na convexidade do verumontanum [13]. Esta zona é contínua com a zona periférica, com ambas as zonas unidas num disco plano de tecido que se estende até o plano da coroa. O epitélio da zona periférica é simples com bordas distintas e núcleos pequenos, enquanto o epitélio da zona central consiste em células com membranas menos distintas, citoplasma mais opaco. Esta zona é a de menos significância a nível tumoral sendo responsáveis por < 5% dos carcinomas [14].

A zona de transição é a zona mais interna que envolve a uretra e representa cerca de 5% da próstata. É uma região que envolve a extremidade da uretra que está localizada antes da próstata (ou seja, pré-prostática) e se estende até aos ductos ejaculatórios e ao ápice da zona central [14]. O verumontanum demonstra-se como um constituinte importante, sendo este onde os ductos ejaculatório e prostático perfuram a parede posterior da uretra prostática permitindo a abertura dos ductos ejaculatórios na uretra prostática, permitindo a passagem do sêmen durante a ejaculação e marca a extremidade proximal da zona de transição. Esta zona é cercada pela zona central, que possui uma forma cônica. Esta é a área mais suscetível ao desenvolvimento de doenças da próstata como é o caso de hiperplasia prostática benigna (HPB). A nível tumoral está associado a 20%-25% dos carcinomas [11]. A HPB é uma condição caracterizada pelo aumento no número de

células estromais e epiteliais na zona de transição da próstata, que envolve a área ao redor da uretra. Esse crescimento excessivo causa compressão na uretra e leva ao desenvolvimento de obstrução do fluxo vesical [15], o que pode levar ao aparecimento de manifestações clínicas de disfunção urinária.

A última zona é o estroma fibromuscular. Ao contrário das zonas anteriores, ela é inteiramente não glandular e não tem relevância biológica ou patológica para a próstata. O estroma fibromuscular proporciona uma elevada espessura à glândula, ocupando 1/3 do espaço total desta. É característico de uma espessa bainha de tecido contínuo com o colo vesical, envolvendo o esfíncter interno do colo da bexiga e agindo como um envoltório de tecido muscular. Esse tecido forma toda a superfície anterior da próstata e entra em contato novamente com a uretra na extremidade distal, o ápice da próstata. O tecido espalha-se lateralmente para se fundir com a cápsula ao longo de toda a borda ântero-lateral da glândula prostática. O maior significado anatómico desse tecido é a proteção de este fornece as regiões glandulares previamente descritas as quais é fortemente aderente [16].

1.1.2.1 Composição celular da próstata

A próstata é um órgão composto por diferentes tipos de células, diferenciadas com base em critérios morfológicos, expressão de marcadores moleculares específicos e função celular. O tecido que reveste as glândulas da próstata (epitélio) contém células epiteliais que podem ser classificadas em células luminais, basais e neuroendócrinas [17], [18]. Em adição a estas, fora do epitélio, encontram-se ainda células musculares lisas na parede da próstata e as estromais no estroma (Figura 4).

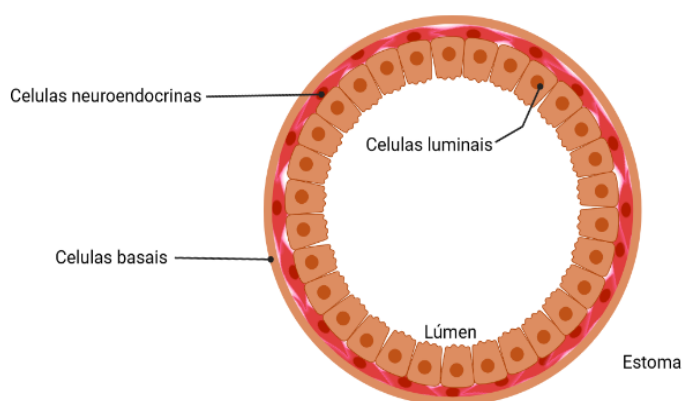


Figura 4: Ilustração da composição celular de uma glândula da próstata, criado com Biorender.

As células luminais são totalmente diferenciadas e dependentes de androgênios, apresentando uma proliferação relativamente baixa e um alto índice apoptótico. Em

contraste, as células basais são geralmente indiferenciadas e não dependem de androgénios, possuindo uma alta capacidade proliferativa e um baixo índice apoptótico. [19]. Biologicamente, os dois tipos de células também divergem pela presença de diferentes marcadores específicos. As células luminais são identificadas pela expressão do recetor de androgénio, assim como pelas citoqueratinas 8 e 18 e pelo marcador de superfície celular CD57. Já as células basais expressam citoqueratinas 5 e 14, assim como CD44, apresentam baixos níveis de androgénio e não produzem proteínas secretoras da próstata [20]. Morfologicamente, as células basais têm um tamanho inferior e um formato mais alongado e estreito do que as células luminais.

Dispersas entre as células epiteliais estão células neuroendócrinas, que produzem diversas hormonas que regulam a atividade das outras células da próstata. As células musculares lisas são responsáveis por contrair a próstata durante a ejaculação, permitindo a expulsão do sémen da uretra. Além disso, essas células são responsáveis por ajudar a regular o fluxo de urina através da próstata. As células musculares lisas da próstata são influenciadas por hormonas sexuais, como a testosterona, que regulam a sua atividade contrátil [20]. As células estromais fornecem suporte e nutrição às células epiteliais, produzem fatores de crescimento e citocinas que regulam a proliferação e diferenciação das células epiteliais e estão envolvidas na regulação da angiogénese. A presença de células estromais anormais na próstata tem sido associada ao desenvolvimento de doenças, como a hiperplasia benigna da próstata e o cancro da próstata.

1.1.3 Causas e fatores de risco

O cancro da próstata está associado a vários fatores, sendo os mais destacados idade, a raça/etnia e o histórico familiar/suscetibilidade genética. O cancro da próstata é uma patologia pouco frequente em indivíduos com menos de 40 anos, no entanto, a probabilidade do desenvolvimento desta aumenta substancialmente após os 50 anos. Aproximadamente 6 em 10 dos casos do cancro da próstata são diagnosticados em indivíduos com mais de 65 anos, evidenciando a idade avançada como um fator primário para o desenvolvimento desta enfermidade [21].

Em relação à influência da etnia, estudos epidemiológicos têm demonstrado que homens afro-americanos apresentam taxas mais elevadas de incidência e mortalidade em comparação com homens caucasianos. Homens afro-americanos têm uma das maiores taxas de cancro da próstata do mundo, com uma incidência quase 60% maior do que os homens caucasianos [22]. Além disso, a taxa de mortalidade para afro-americanos é significativamente mais alta do que todas as outras raças. Por outro lado, homens de

origem asiática e hispânica apresentam taxas de incidência e mortalidade mais baixas em relação a homens caucasianos e afro-americanos. Essas diferenças podem estar relacionadas a fatores genéticos, ambientais e socioeconômicos que ainda não foram completamente compreendidos [23].

Relativamente ao histórico familiar, foi demonstrado que não só afeta a probabilidade de desenvolvimento da patologia como de um desenvolvimento precoce, considerando a média de idade de diagnóstico sem influência de um histórico familiar da doença. Homens que possuem antecedentes familiares de cancro da próstata, especialmente com um pai ou irmão que tenha sido diagnosticado com a doença, enfrentam um risco maior de desenvolver cancro da próstata. Além disso, quanto maior o número de parentes de primeiro grau afetados, maior é o risco de desenvolver a doença [24]. É demonstrado que homens com antecedentes familiares positivos são diagnosticados mais cedo em média, 6 a 7 anos mais cedo do que aqueles sem parentes de primeiro grau afetados. Esses estudos estimam que 5% a 10% de todos os casos de cancro da próstata e até 40% dos casos que ocorrem antes dos 65 anos podem ter uma base hereditária [25]. No entanto, o histórico familiar pode não ser a razão primária, podendo esta incidência aumentar pela herança de um gene de suscetibilidade ou apenas sendo causado pela exposição a fatores ambientais comuns ou simplesmente por acaso. Contudo, o cancro da próstata está altamente associado a hereditariedade, sendo estimado que este tipo de o cancro é herdado em 57% dos casos [26].

1.1.4 Fatores prognósticos

O progresso no diagnóstico e tratamento do cancro da próstata, resultou numa classificação mais precisa dos pacientes e numa melhor escolha de tratamentos com base em prognósticos e nas preferências individuais. Os fatores prognósticos são, o nível inicial do PSA, o estágio clínico segundo a classificação tumor-nódulo-metástase (TNM) e a classificação de Gleason [27].

1.1.4.1 Classificação de Gleason

Esta classificação visa identificar a taxa de crescimento e a tendência de disseminação da doença. A pontuação é baseada na arquitetura das células malignas e nos padrões histológicos do crescimento tumoral, bem como no grau de diferenciação destas [28]. O sistema de pontuação é composto por um grau de anormalidade crescente da estrutura glandular [27], [29]. Quanto menos glandular for a aparência das células malignas, maior será o grau, mostrando o grau 1 uma aparência quase normal, com células de "baixo grau" tumoral, enquanto um grau de Gleason de 5 indica um padrão altamente anormal, com

células tumorais de "alto grau", com nenhuma característica glandular, apenas folhas de células anormais (Figura 5).

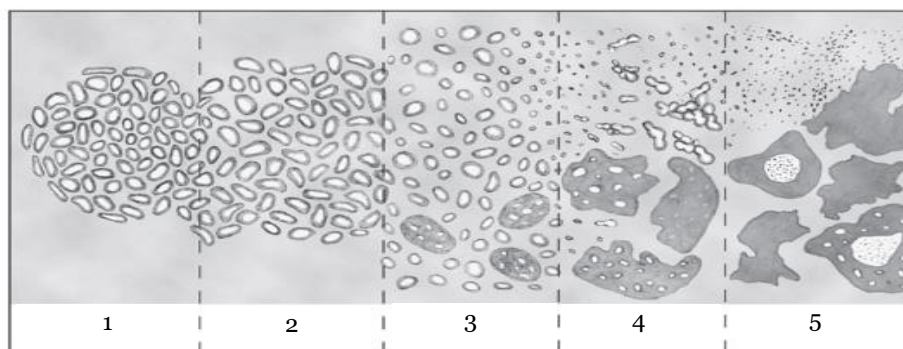


Figura 5: Ilustração dos diferentes graus de classificação de Gleason e a granularidade tecidual associada, adaptado [30].

Na análise histológica da biópsia, são identificadas duas áreas mais predominantes do tumor. Cada área recebe uma pontuação individual, e a soma dessas duas pontuações representa o grau de Gleason, que varia de 2 a 5 [31].

1.1.4.2 Teste do antígeno específico da próstata (PSA)

Esta glicoproteína pode ser encontrada tanto no sêmen como na via sanguínea [32]. De uma forma simplificada, o procedimento envolve a colheita de amostras sanguíneas, seguida da avaliação dos níveis de PSA. Estes são interpretados com base num limiar de referência de 4 ng/mL. Valores de PSA superiores a 4 ng/mL indicam a necessidade de exames adicionais, indivíduos com níveis entre 4 ng/mL e 10 ng/mL têm cerca de 1/4 de probabilidade de ter cancro da próstata. Quando os valores de PSA excedem 10 ng/mL, a probabilidade de ter cancro da próstata ultrapassam os 50% [33].

De forma geral são necessárias repetições dos mesmos exames para testar a sua veracidade. De acordo com ao Instituto Nacional do Cancro, atualmente o exame não passa apenas pela análise dos níveis de PSA, mas também pela avaliação de diversos parâmetros associados a este. A densidade e a velocidade são um dos exemplos de exames suplementares usados no uso da avaliação de PSA como forma de otimização do mesmo.

No entanto, importa salientar que o PSA é uma substância específica da glândula prostática, mas não exclusiva do cancro da próstata. Como tal, os níveis de antígeno prostático específico podem também refletir condições benignas como HPB e prostatite, e não apenas o cancro da próstata. Conforme indicado pelo Instituto Nacional do Cancro, este valor pode também variar com o avançar da idade, não sendo aconselhável para

homens com mais de 70 anos. A fiabilidade deste método revela-se, assim, questionável em alguns casos apesar do seu alto uso [34].

1.1.4.3 Estágio clínico TNM

Um critério internacionalmente aceite, auxiliar na descoberta do estágio da doença, é o sistema tumor-nódulo-metástase (TNM). O tamanho do tumor e crescimento local (T) são classificados de T₀ a T₄. A presença e extensão do cancro nos gânglios linfáticos próximos ao local do tumor primário (N) define a classificação entre N₀ e N₃. A ausência ou ocorrência de evidência de metástases distantes (M), define a atribuição da classificação M₀ ou M₁, respetivamente [30], [35]. Cada um desses componentes é combinado para fornecer um estágio clínico completo do tumor. Por exemplo, um tumor classificado como T₂N₀M₀ significa um tumor limitado a próstata sem metástases nos gânglios linfáticos regionais e sem metástases à distância. A tabela referente a esta classificação pode ser vista em anexo na secção A1.

1.1.4.4 Estágios do cancro da próstata

Após meticulosa avaliação e ponderação dos elementos mencionados previamente, abrangendo o tamanho do tumor (T), a existência de linfonodos afetados (N), a presença de metástases (M), os níveis de PSA e o *score* de Gleason é possível determinar com maior precisão a progressão do cancro da próstata de um determinado doente. O estágio da doença é posteriormente definido por uma combinação desses fatores numa classificação de I a IV, sendo o estágio I o menos grave e o IV o mais grave. Atualmente, os estágios do cancro da próstata são avaliados tendo em conta a classificação AJCC (2010) para o cancro de próstata, presente na secção A2 dos anexos.

1.1.5 Tratamento convencional de doentes com cancro da próstata

As opções terapêuticas disponibilizadas a um paciente são determinadas pela natureza do tumor, por fatores prognósticos, estágio da doença e pela probabilidade de recorrência [36]. Esta abordagem, individualizada e personalizada, é fundamental para a otimização do resultado terapêutico e minimização dos efeitos adversos. Atualmente, de acordo com Rede Nacional de Cancro Abrangente (RNCA) [37] e a Associação Europeia de Urologia (EAU) [36], [38] os tratamentos convencionais continuam a ser aconselhados e os mais frequentemente utilizados, mais especificamente a prostatectomia radical, braquiterapia/radioterapia, terapia hormonal ou privação de andrógenos e quimioterapia [39].

1.1.5.1 Tratamento para cancro localizado

Cancro localizado é definido como a presença de células neoplásicas restritas a uma área anatômica específica, sem evidência de disseminação para outras regiões ou tecidos, incluindo a ausência de metástases [40]. O tratamento do cancro localizado é geralmente menos agressivo e invasivo do que o tratamento do cancro avançado ou metastático, o que pode melhorar a qualidade de vida do paciente durante e após o tratamento. Além disso, a identificação precoce do cancro localizado pode evitar a progressão da doença para estágios mais avançados, reduzindo assim o risco de complicações e mortalidade associadas à doença.

De acordo com as diretrizes de RNCA [37], para cancro localizado é recomendado prostatectomia radical ou radioterapia, podendo a última referenciada ser administrada através da radioterapia de feixe externo ou de outros métodos radioterapia. Prostatectomia radical envolve uma cirurgia de remoção da próstata e tecidos adjacentes. Esta é segura e eficaz no tratamento do cancro da próstata localizado, com alta taxa de controlo do cancro [41]. Embora geralmente utilizada apenas em casos de doença localizada sem a presença de metástases, essa terapia também demonstrou ser benéfica em casos não localizados para a remoção do tumor principal [42].

A braquiterapia é uma forma de radioterapia interna que utiliza dois métodos principais [43], denominados braquiterapia permanente e temporária. Estes visam atingir as células cancerígenas e minimizar os danos aos tecidos saudáveis. A escolha entre estes métodos depende do estágio do cancro, das preferências médicas e do paciente. Esta abordagem encurta a duração do tratamento, otimizando o controlo local do cancro ao restringir o crescimento entre as sessões. Este tratamento é, sobretudo, aconselhável em casos de tumores de progressão rápida, uma vez que promove o controle local o que reduz significativamente as chances de regeneração e expansão das células cancerígenas nos intervalos entre as sessões de radioterapia [44].

1.1.5.2 Tratamento para cancro metastático

De acordo com associação de Cancro do Canada, cancro metastático é definido pela disseminação de células cancerígenas do tumor primário para outras regiões do organismo. Este fenómeno ocorre pelo desprendimento de células do tumor original e a sua posterior migração através do sistema circulatório ou linfático, dando origem a um novo tumor noutros tecidos. O tratamento do cancro metastático é frequentemente mais desafiador e agressivo do que tratamentos aplicados ao cancro localizado. O objetivo do tratamento para o cancro metastático é prolongar a vida da pessoa e

preservar a sua qualidade de vida. Os tratamentos têm o propósito de controlar e desacelerar o crescimento das metástases, embora seja incomum que elas desapareçam por completo.

De acordo com as diretrizes da RNCA [37], para pacientes com cancro metastático sem resistência a castração é recomendado terapia de privação de androgénio (TDA) com recombinação para intensificação do tratamento sistémico. As opções preferenciais incluem TDA com abiraterona, apalutamida, docetaxel ou enzalutamida. Para pacientes com cancro de próstata resistente à castração (CRPC) metastático, a TDA é mantida enquanto terapias sistêmicas adicionais são aplicadas de forma sequencial. As terapias sistêmicas para CRPC metastático incluem várias terapias hormonais secundárias, quimioterapia, imunoterapia, radioterapia. Mais especificamente, as diretrizes da EAU indicam a quimioterapia como uma das mais apropriadas [36], [38].

1.1.5.2.1 Quimioterapia

A quimioterapia consiste na administração de medicamentos anticancerígenos citotóxicos que induzem a morte celular, visando erradicar ou reduzir a carga tumoral, diminuindo assim os sintomas relacionados ao tumor e possivelmente, prolongar a vida do paciente [45]. Os medicamentos podem ser administrados de forma intravenosa ou oralmente, no entanto, estes são principalmente administrados de forma intravenosa. No contexto de tratamentos para cancros metastáticos, é também possível considerar a utilização da administração direcionada através de diferentes veículos, tais como lipossomas ou nanopartículas, para a entrega de medicamentos citotóxicos. Esta abordagem pode incluir, a encapsulação de inibidores hormonais ou fármacos quimioterapêuticos, como o docetaxel [46]. Essa abordagem visa viabilizar a utilização de doses mais elevadas, na esperança de alcançar um efeito anti tumoral mais eficaz. Permitindo ainda uma manutenção das células saudáveis devido a diminuição do efeito citotóxico nos tecidos adjacentes.

Normalmente, os medicamentos citotóxicos são administrados em combinações específicas, utilizando dois ou mais medicamentos. Essa estratégia visa aumentar as hipóteses de superar a resistência das células tumorais. Além disso, essas combinações buscam garantir a eficácia do tratamento contra diferentes clones de células tumorais [47].

De acordo com EAU [36], [38], o fármaco quimioterapêutico docetaxel é o mais recomendado como tratamento de primeira linha para candidatos que não receberam

quimioterapia anteriormente. Outra opção é o cabazitaxel, sendo este recomendado como segunda linha de tratamento para pacientes previamente tratados com docetaxel. Este método, apesar de aprimorado e com taxas de sobrevivência altas associadas, demonstra ainda a si relacionado os efeitos secundários e sequelas de longo prazo que continuam a ser uma preocupação significativa. Estes efeitos secundários podem incluir um variado leque de problemas graves gastrointestinais, redução de capacidades e da qualidade de vida do paciente, disfunções cognitivas. Adicionalmente, as alternativas disponíveis para contrapor estes mesmos efeitos, frequentemente proporcionam alívio incompleto, não abordando adequadamente as potenciais consequências de longo prazo e, em alguns casos, agravando o desconforto existente do paciente [48].

1.1.5.2.2 Terapia hormonal/privação de androgénios

A terapia hormonal de privação de androgénios, também conhecida como TDA ou castração química, é amplamente utilizada no tratamento avançado e/ou metastático do cancro da próstata. O seu mecanismo terapêutico baseia-se na inibição da produção de testosterona e de outras hormonas masculinas. A privação destas hormonas nas células cancerígenas, resulta na diminuição da estimulação do seu crescimento e proliferação. A TDA desempenha um papel crucial ao bloquear a ligação dos androgénios aos seus recetores presentes nas células da próstata, evitando a ativação de vias de sinalização que sustentam o desenvolvimento do tumor. Com a redução significativa dos níveis hormonais masculinos, o crescimento das células cancerígenas é inibido, o que diminui a progressão da doença e alivia os sintomas associados [49].

Como vantagens este método exhibe a possibilidade do seu uso como terapia complementar a outros tratamentos como cirurgia, quimioterapia ou radioterapia, eficácia do controlo do crescimento tumoral e apresenta-se como um processo menos evasivo relativamente a tratamentos que envolvam cirurgia. No entanto, assim como os outros métodos referidos, este também apresenta desvantagens associadas, como um amplo leque de efeitos secundários e desenvolvimento de resistência à castração. As células de cancro da próstata têm variados mecanismos pelos quais podem superar e tornar-se resistentes à TPA, pelo desenvolvimento de um fenótipo resistente à castração. Apesar da castração ou da inibição dos níveis de hormonas masculinas, como a testosterona, estas células cancerígenas continuam a crescer e a multiplicar-se de forma independente dos androgénios. Isto pode estar associado a variados fatores, incluindo mutações genéticas que tornam as células cancerígenas menos dependentes dos androgénios [50].

A necessidade de descobrir novas alternativas para o tratamento do cancro de próstata é óbvia e urgente, considerando os desafios e impactos dessa doença. Embora tenham sido feitos diversos avanços a nível de diagnóstico e terapias, os tratamentos tradicionais apresentam ainda inúmeras desvantagens, como resistência e efeitos colaterais debilitantes. Investir em pesquisas e terapias mais personalizadas é essencial para aumentar a sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes, superando as limitações dos tratamentos atuais.

1.1.6 Sinvastatina

1.1.6.1 Ação farmacológica e metabolismo da sinvastatina

A sinvastatina é um composto da classe das estatinas, altamente utilizada para o tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, principalmente hipercolesterolemia, devido ao seu alto poder inibitório da hidroximetilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) (Figura 6), responsável pela conversão de HMG-CoA em mavalonato nos hepatócitos, a primeira etapa e a etapa limitante na velocidade da biossíntese de colesterol [51].

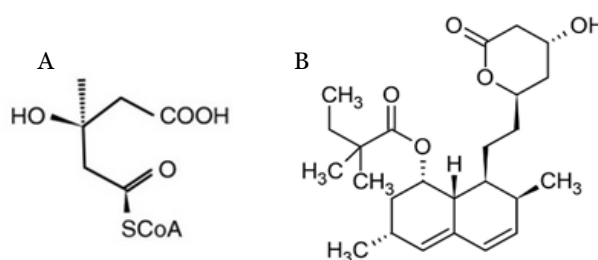


Figura 6: Estruturas moleculares de (A) hidroximetilglutaril-coenzima A, (B) sinvastatina na forma de lactona, adaptado [52].

O anel bicíclico da cadeia lateral da forma ativa da sinvastatina permite a ancoragem ao sítio ativo do HMG-CoA redutase [52] com 13000 vezes maior afinidade do que o substrato HMG-Coa, o que possibilita uma inibição eficaz [53] por indução de uma mudança conformacional na sua estrutura, a qual reduz não só a síntese intracelular de colesterol como a de intermediários isoprenóides (geranilpirofosfato e farnesilpirofosfato) na via da biossíntese do colesterol (Figura 7) [52].

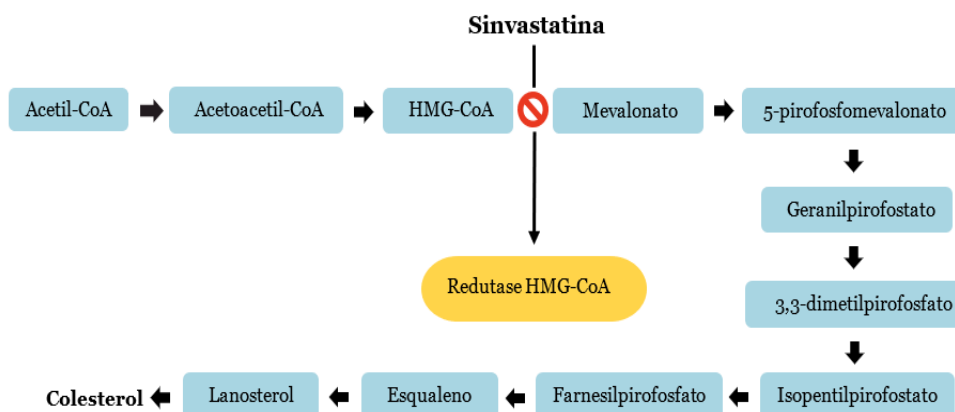


Figura 7: Via da síntese do colesterol e todos os posteriores intermediários, realizado no Biorender.

A sinvastatina é quimicamente sintetizada a partir da lovastatina, podendo esta ser produzida a partir da fermentação de várias espécies do fungo *Aspergillus*, no entanto a nível comercial o mais utilizado é o *Aspergillus terreus* [54]. Estruturalmente a sinvastatina difere da lovastatina pela adição de um grupo metil adicionado à cadeia lateral do éster, o que proporciona uma maior afinidade à HMG-CoA redutase.

As estatinas podem ser divididas em lipofílicas e hidrofílicas. A sinvastatina é um pró-fármaco, administrado na forma de uma lactona farmacologicamente inativa e lipofílica [55]. A lactona é convertida enzimaticamente por esterases, paraoxonases ou por simples hidrólise (independente de enzimas) a um metabolito na forma de β -hidroxiácido, uma forma ativa e com baixa lipofilicidade comparativamente a sua forma inativa (Figura 8) [56]. Esta reação é reversível e o β -hidroxiácido pode ser reconvertido a lactona na via dependente de Coenzima-A ou por glucuronização [57].

Como referido anteriormente, a sinvastatina apresenta elevada lipofilicidade [52]. Essa característica desempenha um papel crucial na farmacocinética da sinvastatina ao permitir a sua passagem pelas membranas celulares através de difusão passiva. Isso facilita a entrada da sinvastatina nas células, contribuindo para a sua acumulação nos hepatócitos. Além disso, a lipofilicidade também está ligada à metabolização das lactonas e dos seus metabolitos ativos [52].

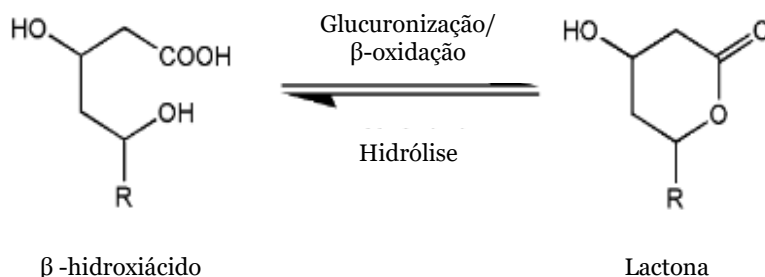


Figura 8: Interconversão da forma ácida para lactona, adaptado [55]

A sinvastatina, quando administrada por via oral, é bem absorvida no trato gastrointestinal, com uma taxa de absorção entre 60% a 85%. No entanto, a sua biodisponibilidade é considerada baixa, correspondendo a menos de 5% da dose ingerida [52] esta limitação na biodisponibilidade deve-se principalmente à significativa extração hepática, onde mais de 80% da sinvastatina é metabolizada pelo fígado [58]. Outro facto a ter em conta é a elevada afinidade de ligação da sinvastatina às proteínas plasmáticas, ultrapassando os 95%. Esta ligação às proteínas reduz a quantidade de sinvastatina livre e disponível para exercer a sua ação farmacológica. Além disso, a sinvastatina possui uma meia-vida curta, com uma permanência no organismo de apenas uma a duas horas [59], [60] Após a sua ativação e posterior metabolização pelo citocromo P450 (CYP 3A4) os seus metabolitos são eliminados do organismo, sendo excretados tanto pelas fezes (58%) quanto pela urina (13%) [52]

1.1.6.2 Potencial terapêutico das estatinas e a implicação na regulação metabólica do cancro da próstata

Este fármaco, para além de altamente utilizado em doenças cardiovasculares, como referido anteriormente, tem despertado bastante interesse em variadas patologias, incluindo no tratamento de diversos tipos de cancro, agindo como regulador de proliferação e migração, por modulação de variadas vias específicas [60].

A progressão do cancro da próstata é consequente de variadas mudanças no metabolismo celular, sendo um desses exemplos o aumento da síntese de biomassa [61] Os lípidos, um grupo diversificado de biomoléculas hidrofóbicas, que desempenham um papel crucial em várias vias metabólicas. É amplamente aceite que as células altamente proliferativas, como as células cancerígenas, necessitam de lípidos como blocos de construção para a síntese de membranas e outras biomoléculas para apoiar a replicação celular [62]. Alterações no metabolismo dos lípidos, especialmente no metabolismo dos ácidos gordos, são essenciais para a produção de energia, síntese de membranas e modificação pós-transducional de moléculas de sinalização [63]. Essas alterações são cada vez mais

reconhecidas como fatores críticos nas fases iniciais da transformação maligna e na progressão tumoral.

O colesterol, em particular, é um componente de membrana de grande importância, sendo responsável por aproximadamente 30% dos lípidos totais. Os níveis de colesterol são controlados pelo *uptake* da síntese e armazenamento de gotículas lipídicas (LD) na sua forma de colesterol esterificado. Devido a este *uptake*, os níveis de colesterol levam a um decréscimo da expressão de recetores de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) de forma a incentivar o decréscimo do *uptake* extracelular de colesterol derivado de LD. No cancro da próstata, e em outros tipos de neoplasias, este feedback é interrompido e, apesar da continua produção de colesterol, os níveis de LDLR não demonstram diminuição, continuando a aumentar exponencialmente. Este constante aumento leva ao aumento do *uptake* de colesterol e ácidos gordos que iram suportar o crescimento tumoral. Esta correlação é evidenciada através das disparidades no metabolismo celular observadas em diversos estágios do cancro. Nos tecidos tumorais, observa-se uma maior presença de LD, ao contrário do que se verifica em tecidos saudáveis ou em tecidos com crescimentos benignos, onde se regista uma baixa concentração destes compostos. Esta associação é igualmente evidente na maior acumulação de LD em cancros metastáticos e de grau mais elevado, em comparação com cancros localizados de baixo grau [64] Isso sugere a significativa relevância do aumento de ésteres de colesterol no contexto tumoral e, por conseguinte, a importância de fármacos que inibam a HMG-CoA. Com base nisso, torna-se de elevado interesse encontrar formas de interromper esta síntese contínua de colesterol esterificado através da inibição da HMG-CoA, uma vez que esta inibição leva a acumulação de colesterol livre e a diminuição de LDLR, o que leva consequentemente a um *uptake* reduzido de ácidos gordos.

Além da conhecida relação de inibição da HMG-CoA e sua associação com a redução dos níveis de colesterol, essa inibição proporciona uma ampla variedade de efeitos adicionais. As propriedades pleiotrópicas das estatinas têm sido objeto de intensa investigação científica, revelando implicações significativas em diversos aspectos da fisiologia e patologia do organismo. Conforme mencionado anteriormente, a redução da síntese de mavalonato tem um impacto direto na produção de intermediários de isoprenoides, que apresentam elevada importância para a modificações pós-transducional de várias proteínas [65]. Entre os principais isoprenoides envolvidos nesse mecanismo de modificação de proteínas, estão o farnesil pirofosfato e o geranyl pirofosfato, que desempenham um papel crítico na prenilação de proteínas [66] A prenilação, conhecido como um processo de modificação pós-transducional, afeta uma ampla variedade de proteínas intracelulares [65]. Esse grupo de proteínas inclui Ras, Rac

e Rho, que são membros da superfamília de proteínas GTPase [67], e desempenham funções cruciais na sinalização celular, influenciando processos como diferenciação celular, proliferação, organização do citoesqueleto, respostas inflamatórias, apoptose, diferenciação e sobrevivência [65], [67]. Quando estas proteínas não são adequadamente preniladas, a sua atividade e localização podem ser afetadas, o que por sua vez pode modificar os processos celulares regulados por estas. Dado o papel crucial desempenhado por estas proteínas preniladas, é plausível considerar que a redução da atividade da HMG-CoA redutase induzida pelas estatinas possa ter um impacto abrangente [65]–[67].

A nível de estudos clínicos, tem sido extensamente estudado o impacto do uso de estatinas na incidência do cancro da próstata, com destaque para a sinvastatina. Numa meta análise realizada em 2023 abrangendo 14 estudos observacionais, [68] foram analisados os efeitos das estatinas hidrofílicas (rosuvastatina, pravastatina) e lipofílicas (atorvastatina, sinvastatina, fluvastatina, lovastatina) e o seu impacto na incidência e melhoria prognóstica do cancro da próstata. Além disso, realizou-se uma comparação com grupos não expostos a estes fármacos. Foram detetados resultados notavelmente distintos entre os dois tipos de estatinas. Não se verificou uma diferença significativa na incidência de CP na população exposta a estatinas hidrofílicas (rosuvastatina, pravastatina) em comparação com a população não exposta. No entanto, a incidência de CP foi significativamente inferior na população exposta a estatinas lipofílicas (atorvastatina, sinvastatina, fluvastatina, lovastatina) em comparação com o grupo não exposto [68]. Esta apresentou um "*odds ratio*" de 83%, evidenciando que a probabilidade do desenvolvimento de cancro da próstata é cerca de 17% inferior para aqueles que foram tratados com sinvastatina em comparação com os que não receberam qualquer tratamento. Estes resultados demonstraram ser estatisticamente consistentes, sendo comprovado pelo um p de 0,016 e o enquadramento no intervalo de confiança de 95% de 0,71 - 0,94. Este valores demonstraram que a sinvastatina tem um impacto positivo na prevenção ou na redução do risco de cancro da próstata. É importante salientar que o estudo mencionou a ausência de ensaios clínicos randomizados e a presença de heterogeneidade significativa nos estudos incluídos [68]. No entanto, atualmente não existem ensaios clínicos disponíveis que possam confirmar o impacto direto da sinvastatina na proliferação tumoral.

Outras estatinas, contudo, já demonstraram resultados promissores a nível clínico, um exemplo é a fluvastatina. Num estudo realizado em 2020 para avaliar o impacto da fluvastatina na inibição da proliferação no cancro da próstata, 33 pacientes

diagnosticados com adenocarcinoma da próstata localizado receberam um tratamento de 40 mg duas vezes ao dia. A duração do tratamento variou de 4 a 12 semanas.

Os resultados revelaram que, embora não tenha ocorrido uma diminuição na proliferação, como esperado, houve uma atividade apoptótica significativa. Isso foi evidenciado pela quantificação da percentagem de Caspase 3 clivada, que apresentou um aumento mediano de 2,7 vezes nas células tumorais em comparação com a biópsia realizada pré-tratamento [69].

Não obstante, na literatura científica, podem ser encontrados vários estudos que relatam ensaios pré-clínicos *in vitro* e em *in vivo*, que demonstram o potencial das sinvastina para investigações clínicas futuras. É importante ressaltar, contudo, que os efeitos observados em experiências em modelos pré-clínicos podem diferir dos resultados obtidos em ensaios clínicos.

Um estudo de 2023 evidenciou que, a utilização de estatinas em culturas de células de cancro da próstata resultou numa redução significativa da capacidade de migração das células tumorais para os tecidos adjacentes. Estes resultados foram corroborados por descobertas clínicas que indicaram que os pacientes com cancro de próstata metastático que recorreram a estatinas apresentaram contagens reduzidas de células tumorais circulantes. Adicionalmente, foi observado um efeito inibitório notável *in vitro*, sendo a sinvastatina o fármaco em estudo que se demonstrou mais eficaz na inibição da proliferação celular [70].

É desta forma necessário realçar que apesar da relação observada entre exposição e diminuição de incidência e melhoria prognóstica há que considerar as limitações dos estudos e da necessidade de estudos clínicos que estudem estas relações.

1.1.6.3 Solubilidade e estabilidade da sinvastatina

Como mencionado anteriormente, a sinvastatina é altamente lipofílica [59] e praticamente insolúvel em água [71]. Essa baixa solubilidade resulta numa absorção lenta, o que gera uma biodisponibilidade insuficiente e irregular [72]. Em adição, o fármaco sofre alta metabolização hepática, o que representa uma barreira ao seu uso terapêutico para além da modulação do metabolismo lipídico do fígado. Isso implica a administração de doses mais elevadas de forma a alcançar concentrações terapêuticas necessárias e obter o efeito desejado. Normalmente, a dose diária de sinvastatina varia entre 10 e 40 mg. No entanto, pode ser necessário aumentar a dose para até 80 mg por dia. Todavia, a que ter em conta que o uso de concentrações mais elevadas deste fármaco

pode levar a crescentes níveis de toxicidade celular, aumentando o risco de desenvolver efeitos colaterais indesejados, como diferentes tipos de danos musculares, por exemplo, miopatia [51], [73]–[75].

A sinvastatina também apresenta baixa estabilidade, sendo afetada por problemas intrínsecos relacionados à sua estrutura. Mais especificamente, a sua suscetibilidade à hidrólise, cuja velocidade é influenciada pelo pH e pela temperatura. Observa-se uma maior degradação em meios neutros ou alcalinos, assim como em temperaturas mais elevadas. É importante salientar que, em pH mais elevados (pH 9), a hidrólise ocorre espontaneamente, mesmo em condições de temperatura ambiente [81], [82]. Além disso, esta também pode ser degradada por oxidação, o que requer armazenamento em condições específicas de ambiente sob atmosfera de azoto [72]. Uma alternativa para contornar esse desafio é a adição de antioxidantes à formulação do medicamento em pó, tornando menos crucial a manutenção em ambiente inerte.

Todas essas características são fatores críticos que limitam a obtenção de concentrações adequadas do medicamento para gerar uma resposta farmacológica satisfatória [76]. Para superar esses problemas, é de elevada importância considerar a utilização de sistemas de entrega de fármacos, como as emulsões de óleo em água. Essas emulsões proporcionam um ambiente ideal para reduzir a degradação da sinvastatina e melhorar sua estabilidade, evitando assim problemas como os mencionados anteriormente. As emulsões de óleo em água também podem ser empregues para melhorar a solubilidade da sinvastatina, uma vez que permitem a incorporação de fármacos lipofílicos em pequenas gotículas envoltas por uma solução aquosa. Isso resulta num aumento da concentração do fármaco, bem como da sua absorção e biodisponibilidade [73], [74]. Esta abordagem promissora tem o potencial de amplificar e aprimorar a eficácia de utilização da sinvastatina, melhorando conseqüentemente os seus efeitos terapêuticos.

1.1.7 Emulsões

As emulsões são sistemas complexos, constituídos primariamente por duas fases líquidas imiscíveis, uma fase lipídica (óleo), uma fase aquosa e quantidades apropriadas de tensoativo(s) e co-tensoativo(s). Quando essas fases são adequadamente misturadas e agitadas, formam uma dispersão heterogênea, onde pequenas gotículas de uma fase são dispersas na outra. Idealmente estes sistemas resultam em gotículas com diâmetros hidrodinâmicos bastante reduzidos, inferiores a 200 nm.

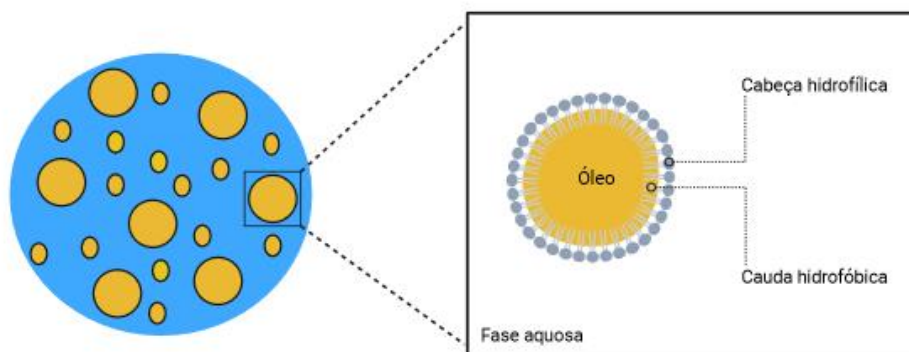


Figura 9: Emulsão O/A e a estrutura dos tensoativos na superfície da fase dispersa, realizado no Biorender.

A obtenção de emulsões estáveis por períodos prolongados é possibilitada pela presença de agentes tensoativos. Estas são moléculas anfílicas que têm a tendência de se adsorver na interface entre a água e o óleo, com os grupos hidrofílicos imersos na água e os grupos hidrofóbicos voltados para o óleo (Figura 9). Estas moléculas têm a capacidade de formar uma película de revestimento, seja de camada única ou múltipla, ao redor das pequenas gotículas dispersas [77], [78]. Este fenómeno desempenha um papel fundamental na estabilização das gotículas, impedindo que elas coalesçam, através da redução da tensão interfacial ou do aumento da repulsão entre as gotas [79].

Dependendo da qualidade (características físico-químicas) e das concentrações desses três componentes (óleo-água-tensioativo), bem como das condições ambientais nas quais as emulsões foram criadas, pode obter-se a uma ampla variedade de sistemas, com propriedades extremamente diversas [73], [77]. Em geral, quanto à natureza das fases as emulsões podem ser divididas em quatro categorias: água em óleo (A/O), óleo em água (O/A), água em óleo em água (A/O/A) e óleo em água em óleo (O/A/O). Existem também sistemas bifásicos contínuos, geralmente em estados intermediários [80]. Em emulsões O/A, o óleo e os aglomerados tensoativos são dispersos na água, enquanto o oposto ocorre nas emulsões A/O (Figura 10).

Além do sector farmacêutico, as emulsões também são utilizadas noutros sectores, como o alimentar, cosméticos, papel e celulose, agrícola, bem como na indústria de petróleo e gás [81].

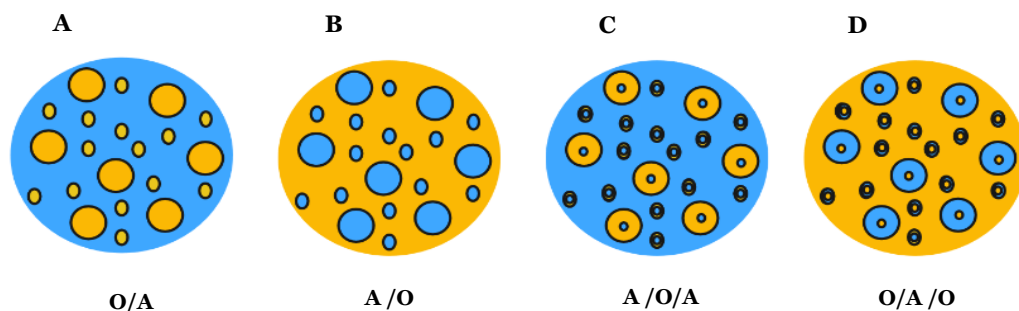


Figura 10: Classificações das diferentes emulsões (A) Óleo em água, (B) Água em óleo, (C) Água em Óleo e em água, (D) Óleo em água e em óleo. Realizado no Biorender.

1.1.7 1 Microemulsão

As microemulsões compartilham muitas semelhanças com as nanoemulsões, sendo ambas classificadas como emulsões de dimensões nanométricas. No entanto, estas representam uma classe distinta de sistemas. De acordo com Daniealsson e Lindman em 1981, microemulsão é um sistema de água, óleo, tensoativos e co-tensoativos, que dão origem a uma única solução líquida opticamente isotrópica, termodinamicamente estável [82], [83]. A sua notável estabilidade termodinâmica constitui uma das principais distinções em relação às nanoemulsões, caracterizando-se ainda por apresentar tamanhos de gotículas (ou micelas) geralmente inferiores a estas, frequentemente abaixo de 100 nm. Isto é possível devido à ação dos compostos anfílicos, resultantes da combinação de tensoativos e co-tensoativos, que reduzem de forma significativa a tensão interfacial. Essa redução minimiza a mudança positiva na energia livre da dispersão, que está associada à formação da interface [84]. Dado que essa energia é menor durante a formação de dispersões coloidais e maior nas fases separadas de óleo e água, significa que a dispersão de microemulsão é energeticamente favorecida [82], [83], tornando-o num processo de formação espontânea [83], [85], [86]. Por conseguinte, não é requerida qualquer forma de agitação de alto cisalhamento durante o processo de formação. O tamanho das partículas dispersas numa emulsão determina a sua aparência a olho nu. Quando o diâmetro das partículas dispersas é de 1 μm , a emulsão apresenta uma aparência leitosa; quando varia de 1 a 0,1 μm , torna-se branca-azulada; entre 0,1 e 0,05 μm , assume uma coloração cinza semi-transparente; e quando inferior a 0,05 μm , a emulsão torna-se transparente. Devido ao reduzido tamanho das gotículas, frequentemente inferior a 30 nm, as partículas não difratam a luz. Como resultado, as microemulsões são geralmente líquidos transparentes [91]. A sua administração pode ser feita pelo auxílio de diversas vias, tópica, oral, parenteral e intranasal. Este tipo de emulsão proporciona variadas vantagens, tais como a facilidade de preparação devido à

sua formação espontânea, a estabilidade termodinâmica e o aumento da solubilização e biodisponibilidade do fármaco. O aumento da permeabilidade da membrana celular também é favorecido devido ao uso de tensoativos, que facilitam a adsorção do fármaco [87]. Apesar das várias possibilidades de microemulsões, neste trabalho ocorreu estritamente o uso de formulações que originam microemulsões O/A, onde pequenas gotículas de óleo e tensoativo são dispersas num meio aquoso [88]. A mistura de óleo, tensoativo e co-tensoativo que forma as microemulsões pode ser designada de microemulsão pré-concentrada, pré-concentrado, ou sistema micro-autoemulsivo, em inglês “self-microemulsifying drug delivery system” que origina a sigla SMEDDS.

1.1.7.2 Nanoemulsão

Uma nanoemulsão é uma forma de emulsão onde, assim como nas microemulsões, ocorre a dispersão de uma fase líquida em outra fase líquida imiscível com a ajuda de emulsionantes ou tensoativos e co-tensoativos. No entanto, como dito no tópico anterior, este tipo de emulsão exibe tamanhos superiores às microemulsões (Figura 11). Os tamanhos apresentam-se na faixa de 100 a 200 nm [89] no entanto é discutido que podem atingir tamanhos superiores, próximos de 500 nm [83], [90].

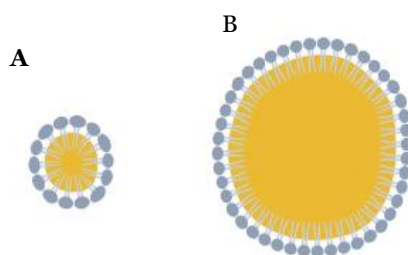


Figura 11: Figura ilustrativa de (A) microemulsões e (B) nanoemulsões, realizado em Biorender.

A estrutura das partículas de uma nanoemulsão O/A é semelhante às presentes nas microemulsões aquosas. Sendo estas constituídas por caudas não polares de moléculas de tensoativo que penetram o núcleo hidrofóbico formado pela fase de óleo, enquanto os grupos polares das moléculas de tensoativo se projetam na fase aquosa circundante [90]. Uma distinção, porém, relativamente às microemulsões, é possuírem habitualmente maior razão óleo/tensoativo hidrofílico. Devido ao reduzido tamanho de gotícula, essas emulsões apresentam alta estabilidade cinética (metastabilidade) [91] e são termodinamicamente instáveis, o que lhes confere uma maior predisposição à destabilização física [83], [89]. Esta destabilização leva ao aumento do diâmetro hidrodinâmico e na dispersão ao longo do tempo. Esta é resultante de diferentes fenômenos como coalescência, floculação e amadurecimento de Ostwald [86], [92]. Este

último mecanismo de destabilização é favorecido quando gotículas grandes e pequenas coexistem na mesma fase contínua. Essa coexistência resulta na dissolução das gotículas menores e numa alteração na composição de todas as gotículas [93]. Foi demonstrado por Higuchi e Misra que estes fenômenos podem ser atenuados e retardados pela adição de co-tensioativos, os quais diminuem a taxa de amadurecimento, tornando as nanoemulsões estáveis por um período mais longo [93]. A energia livre associada à dispersão coloidal é superior à energia livre das fases separadas, o que torna o processo de formação não espontâneo e desfavorecido para a formação de dispersões coloidais. Em contraste com as microemulsões, que tendem a ter a sua formação favorecida [83] (Figura 12). Convencionalmente, as nanoemulsões necessitam de métodos de alta energia para aumentar o nível de energia do sistema, de forma a potenciar as condições necessárias para a formação das dispersões. Abordagens mecânicas que utilizam forças disruptivas para quebrar as fases de óleo e água em gotículas menores, como ultrassonicação, ultra-homogeneização e microfluidização [83], [89], [91] são utilizadas são empregues para esta finalidade. No entanto, esses processos são dispendiosos, especialmente em termos de produção em larga escala. A produção de nanoemulsões com determinadas composições também pode ser conduzida utilizando métodos de baixa energia. Estes métodos são economicamente viáveis e de fácil implementação, já que requerem apenas agitação ou alterações nas condições ambientais. A produção de nanoemulsões com determinadas composições também pode ser conduzida utilizando métodos de baixa energia. Estes métodos são economicamente viáveis e de fácil implementação, já que requerem apenas agitação ou alterações nas condições ambientais. Estas alterações desestabilizam o sistema e resultam na formação de pequenas gotículas. A inversão de fase é um exemplos de técnicas de baixa energia [90], [93]–[95]. As Nanoemulsões podem ser do tipo óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O), tendo sido usado neste trabalho estritamente nanoemulsões de óleo-em-água (O/A). Nanoemulsões oferecem diversas vantagens assim como as microemulsões, incluindo baixa toxicidade, maior absorção do fármaco devido à sua área superficial elevada e melhor solubilização do fármaco [90], [96].

1.1.8 Métodos analíticos usados na avaliação biológica, caracterização e avaliação da estabilidade de formulações.

1.1.8.1 Ensaio de redução de resazurina

O ensaio de redução de resazurina é um método colorimétrico utilizado para avaliar a citotoxicidade em linhas celulares resultantes dos tratamentos aplicados, com base na atividade metabólica das células [97], [98]. A resazurina é um corante azul, com fraca

fluorescência, que por ação da enzima desidrogenase é reduzida a resorufina, um reagente altamente fluorescente com comprimento de onda superior a 550 nm e de coloração rosa [99] (Figura 12). Esta redução e posterior conversão ocorrem exclusivamente em células viáveis, uma vez que a enzima redutora está presente apenas em células metabolicamente ativas. Deste modo, é possível estabelecer uma associação direta entre a quantidade de resorufina produzida e o número de células viáveis

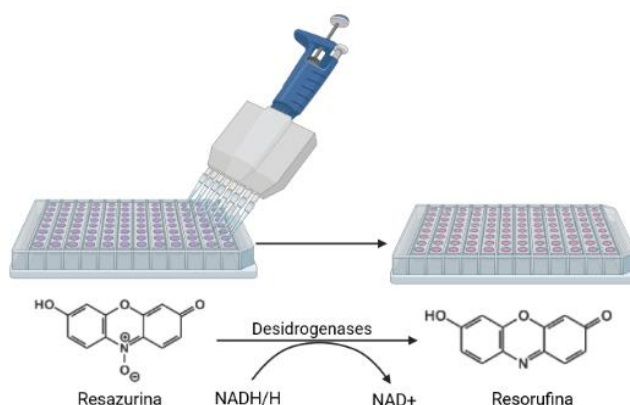


Figura 12: Processo de redução de resazurina, realizado em Biorender.

Embora seja uma técnica vantajosa devido à sua alta simplicidade, baixa toxicidade, rapidez e custo reduzido, o ensaio de redução de resazurina apresenta igualmente algumas desvantagens. Ensaio prolongados podem levar ao esgotamento da ação da resazurina, o que irá levar a perda da associação direta entre número de células viáveis e a redução de resazurina sendo um dos principais objetivos e vantagens do método [100].

1.1.8.2 Espalhamento dinâmico da luz

A técnica de espalhamento dinâmico de luz é amplamente utilizada para a avaliação de dimensões de partículas em dispersão coloidal. Este método baseia-se na incidência de uma luz monocromática em forma de laser e na subsequente dispersão dessa luz em todas as direções quando entra em contato com partículas em suspensão. Essa dispersão de luz é então detetada por um sensor ao longo de um intervalo de tempo. A análise dessas flutuações na intensidade da luz permite obter informações sobre a difusão das partículas. O movimento das moléculas é influenciado por vários fatores, incluindo o seu tamanho, bem como a viscosidade do solvente em que estão dispersas. A viscosidade do solvente, por sua vez, é significativamente influenciada pela temperatura do ambiente [101]. Ao monitorizar o movimento das partículas ao longo de um intervalo de tempo, podemos obter informações sobre os diâmetros hidrodinâmicos (DH) das moléculas. As partículas de maior tamanho difundem-se de forma mais lenta, mantendo posições

semelhantes em momentos distintos, ao passo que partículas menores, como as moléculas do solvente, movem-se mais rapidamente e não possuem uma posição fixa. [102], [103]. O sensor converte essas informações em espectros de distribuição de tamanho, o que possibilita a análise do DH em nanômetros (nm) e a polidispersão (PDI), expressa na forma de um índice que varia ente 0 e 1. O PDI é um indicador da distribuição dos pesos moleculares dos polímeros ou do tamanho de outro tipo de partículas ou moléculas colidais em avaliação e, conseqüentemente, da uniformidade dos tamanhos (Figura 13).

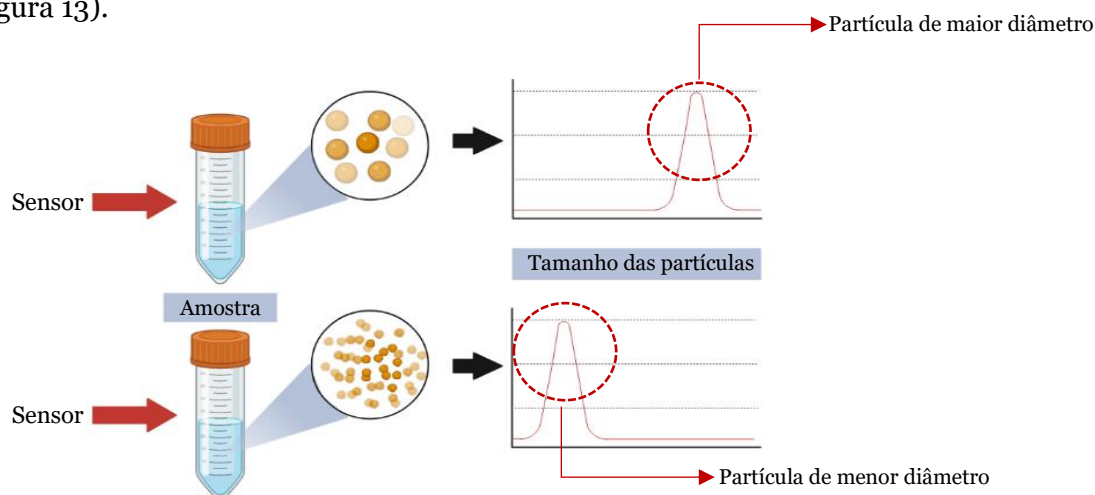


Figura 13: Representação esquemática do processo analítico de espalhamento dinâmico de luz, realizado no Biorender.

Idealmente, os valores da PDI devem ser baixos (<0) se o que é pretendido é uma população homogênea do coloide. O espalhamento dinâmico de luz é uma ferramenta poderosa que pode ser aplicada a uma ampla gama de sistemas moleculares para análise rápida e não destrutiva. Permite o estudo de uma ampla gama de tamanhos de partículas tanto em amostras puras como em misturas [103]. Entretanto, o método também apresenta algumas limitações. Um desses limites é o considerável impacto que a temperatura e a viscosidade têm sobre os coeficientes de difusão, os quais devem manter-se constantes para que a medição seja viável. Além disso, o método não é capaz de distinguir moléculas de alta similaridade, uma vez que possui uma resolução limitada.

1.1.8.3 Cromatografia líquida de alta Eficiência

A técnica de cromatografia em coluna proporciona a separação de diferentes substâncias presentes em matrizes complexas. Este método tem como base a aspiração de um efluente/fase móvel mediante uma bomba de alta pressão que mantém um fluxo constante ao longo da coluna. Após a injeção da amostra, esta será encaminhada para a coluna que contém a fase estacionária. O efluente da coluna é posteriormente direcionado para um detetor, que identifica a presença dos analitos eluídos. O tempo de

retenção na coluna varia de acordo com as interações das substâncias presentes na amostra com as fases estacionárias e móveis, resultando na eluição dos compostos em momentos distintos, os quais são detetados pelo sensor. O sinal captado pelo sensor é então processado por um software especializado, resultando em uma série de picos que correspondem aos diferentes compostos presentes na solução, possibilitando assim a quantificação e identificação dos mesmos [104].

Este método é aplicável a diversas análises bioquímicas devido à ampla variedade de princípios de separação, tais como cromatografia de adsorção, partição, troca iônica e exclusão. No caso específico da sinvastatina, destaca-se a técnica de fase reversa, a qual é um caso especial de cromatografia de partição. Esta técnica foi validada a nível bibliográfico como uma boa forma de determinação de sinvastatina [105], [106].

A cromatografia de fase reversa é uma técnica de separação amplamente utilizada na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para separar compostos apolares e polares de uma amostra. Esta técnica fundamenta-se na utilização de uma fase estacionária apolar, geralmente constituída por partículas sólidas revestidas com grupos hidrofóbicos, em conjunto com uma fase móvel composta por uma mistura de solventes polares, como água e acetonitrilo ou metanol. Os compostos apolares presentes na amostra têm uma maior afinidade pela fase estacionária, ao passo que os compostos mais polares eluem em primeiro lugar. Este processo culmina numa separação eficaz dos componentes da amostra (Figura 14). A sinvastatina apresenta hidrofobicidade [59], o que implica que esta interage fortemente com a fase estacionária da coluna cromatográfica, o que conduz a um maior tempo de retenção. Este facto é vantajoso, uma vez que viabiliza uma separação eficaz dos constituintes da amostra, ocorrendo a eluição por ordem crescente de polaridade. Este método apresenta como principais vantagens a sua rapidez, facilidade de uso e reprodutibilidade [106].

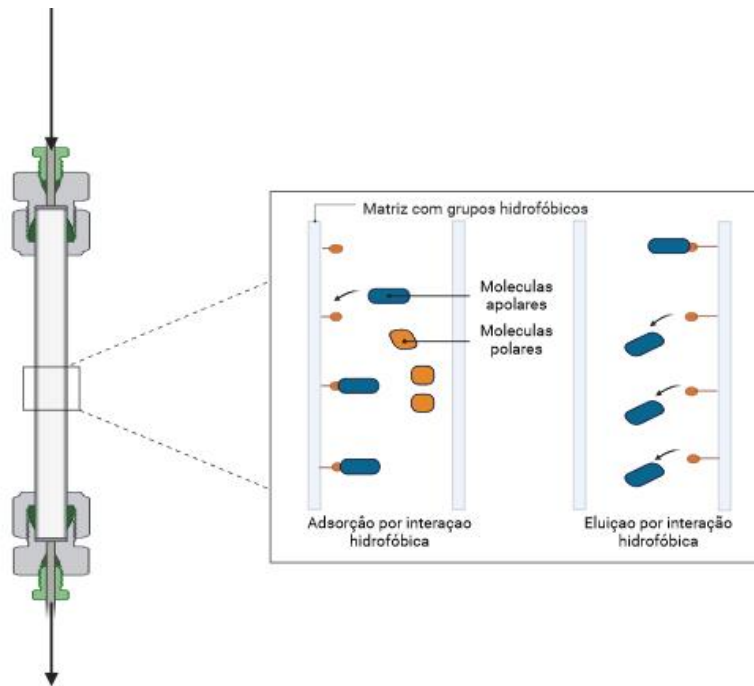


Figura 14: Ilustração do método de cromatografia de fase reversa e as respectivas interações com a matriz, realizado com o Biorender.

1.1.8.4 Ensaios de liberação com câmaras horizontais de Ussing

Classicamente, o sistema de câmaras de Ussing não é usado em estudos de liberação *in vitro*, mas sim utilizado para investigar o transporte de íons e permeação de diversas substâncias por meio de membranas biológicas, especialmente em tecidos epiteliais como, por exemplo do intestino [107]. Originalmente concebidas pelo fisiologista Hans Ussing, os usos dessas câmaras têm-se tornado padrão na pesquisa biológica e farmacêutica devido à sua eficácia na análise dos processos de transporte iônico e permeabilidade de tecidos [108].

Estas câmaras são projetadas para simular o ambiente tecidual, em que a superfície apical (a parte superior) dos tecidos ou membranas pode ser exposta a diferentes substâncias, como líquidos, compostos semissólidos ou gases. Enquanto isso, a superfície basolateral (a parte inferior) permanece em contato com um meio líquido a escolha. Um exemplo, o uso de tampão nasal no caso de ser querer ser testado permeação nasal. Ocorrerá, então, o transporte da substância inserida da parte superior para a parte inferior. Essas investigações simulam as condições fisiológicas dos tecidos e fornecem informações valiosas sobre a fisiologia de órgãos e tecidos, impulsionando o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas e melhorando a compreensão de condições de saúde e doença.

No entanto em ensaios de liberação, pode recorrer-se ao uso de membranas sintéticas como polietersulfona, em vez que tecidos biológicos. Neste caso, a passagem das substâncias da câmara dadora para a recetora depende unicamente da velocidade com que a preparação, colocada na câmara dadora, liberta o fármaco.

Apesar de pouco usual a nível bibliográfico já foram registados estudos anteriores que realizaram ensaios de liberação utilizando câmaras de Ussing. Destacam-se, em particular, os estudos relacionados com a liberação de sinvastatina [109], stiripentol [110] ou de perampanel [111].

Capítulo 2

Objetivos

O trabalho de investigação que conduziu a esta dissertação teve como principal objetivo a otimização, desenvolvimento e o estudo da eficácia de micro e nanoemulsões de sinvastatina, visando aprimorar a sua ação terapêutica.

Mais especificamente pretendeu-se determinar, o impacto da sinvastatina encapsulada em comparação com a sinvastatina livre na viabilidade de células tumorais PC-3 e DU145. Para tal, foram realizadas as seguintes tarefas experimentais, cada uma com o seu objetivo específico (Tabela 4).

Tabela 2: Tarefas experimentais e posteriores objetivos a ser atingidos.

Tarefa	Objetivo específico
Citotoxicidade do fármaco livre	Avaliar a viabilidade celular na ausência de transportadores, com o propósito de estabelecer um ponto de referência e uma base para a otimização.
Desenvolvimento dos transportadores	Otimização das condições de armazenamento e de fabrico. Fabrico de nanoemulsões e microemulsões que atendam a critérios específicos, visando melhorar as estratégias de entrega de fármacos. O foco é encontrar formulações que demonstrem propriedades ideais, como: <ul style="list-style-type: none">• PDI < 0,1, indicando uniformidade nas partículas dispersas.• Diâmetro hidrodinâmico < 200 nm, garantindo que as partículas sejam de tamanho adequado para uma administração eficiente.
Perfis de Liberação	Análise da cinética da libertação de forma a identificar possíveis tendências, comportamentos distintos e respostas ao sistema de entrega.
Ensaio de estabilidade	Avaliar o impacto da adição de um antioxidante, o DL- α -Tocoferol, à formulação, na estabilidade química das formulações em condições aceleradas de temperatura.
Citotoxicidade de Micro e Nanoemulsões <i>in vitro</i>	Avaliar o efeito da utilização de transportadores na viabilidade celular, visando potencialização da inibição do crescimento celular e otimização da dose farmacêutica. Analisar a toxicidade intrínseca dos veículos com o propósito de examinar a segurança e necessidade de otimização das formulações empregadas.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Materiais e Reagentes

Foram usadas as matérias-primas indicadas na tabela 5.

Tabela 3: Nome comercial e nome farmacêutico de cada matéria-prima, acrónimo usado no texto, se aplicável, e respetiva origem.

Nome comercial e/ ou apenas nome farmacopeico	Acrónimo	Origem
Kolliphor® RH 40 (Estearato hidroxilado de macroglicérol)	-	Oferecido por BASF (Ludwigshafen, Alemanha)
Transcutol® HP (Monoetil éter de dietilenoglicol)	-	Oferecido por Gattefossé (Saint-Priest, France)
Capryol® 90 (Monocaprato de propilenoglicol (tipo II) (NF))	-	Oferecido por Gattefossé (Saint-Priest, France)
Imwitor® 948 (Oleato de glicerila)	-	Oferecido por IOI Oleo GmbH (Hamburgo, Alemanha)
Água ultrapura	-	Obtido do sistema de purificação Mili-Q® e (Millipore, Billerica, Massachusetts, Estado Unidos da America)
Sinvastatina (98.03% de Pureza)	-	Obtido em Bld Pharmatech Ltd (Shangai, China)
Soro de albumina bovina	BSA	Obtido em Sigma-Aldrich, Inc (St. Louis, Missouri, Estado Unidos da America)
Polietilenoglicol 4000	PEG	Obtido em Acofarma® (Madrid, Espanha)
DL- α -Tocoferol	-	Oferecido por BASF (Ludwigshafen, Alemanha)
Acido málico	-	Obtido em Applichem (Darmstadt, Alemanha)

Foram ainda usados como reagentes o meio de cultura RPMI-1640 com L-Glutamina e vermelho de fenol, em pó, (Roswell Park Memorial Institute, adquirido à em BioWest (França), na sua posterior suplementação foi ainda utilizado 1% penicilina/estreptomocina obtido de Merck, Alemanha, 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (FBS) inativado por calor, 2 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). Por fim foi ainda usado o reagente, resazurina em pó (7-Hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido), obtido em Alfa Aesar (Estados Unidos da América).

3.2 Métodos

3.2.1 Soluções de sinvastatina

Uma solução-mãe de sinvastatina a 10000 μM foi preparada dissolvendo sinvastatina em DMSO. Em seguida, essa solução-mãe foi submetida a diluições sucessivas em meio RPMI-1640 suplementado.

Foram obtidas sete concentrações diferentes, variando de 0,1 a 30 $\mu\text{mol/L}$, nomeadamente: 0,1 $\mu\text{mol/L}$, 0,3 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$, 3 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 30 $\mu\text{mol/L}$ e 30 $\mu\text{mol/L}$. Estas diluições foram preparadas imediatamente antes do ensaio para garantir a máxima estabilidade possível.

3.2.2 Culturas celulares

3.2.2.1 Manutenção e crescimento de culturas celulares

As linhas celulares PC-3 (carcinoma da próstata; ATCC: CRL-174) e DU145 (carcinoma da próstata, ATCC: HTB-81) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (com L-Glutamina e vermelho de fenol) complementado, como mencionado anteriormente (seção 3.2.1). As células foram mantidas a uma temperatura de 37 °C, numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂.

Quando uma confluência superior a 60% foi atingida pelas células, a subcultura foi realizada para garantir a integridade das células em estudo e manter o número necessário de células para possíveis ensaios planeados. Neste procedimento, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS)[NaCl 137 mM (8,007 g/L), KCl 2,7 mM (0,201 g/L), Na₂HPO₄ 10 mM (1,42 g/L) e KH₂PO₄ 2,0 mM (0,272 g/L)] e posteriormente suspensas numa solução de tripsina (125 mg/L), EDTA (1 mM) e glucose (0,1%) em PBS a pH 7,4. Isso permite a digestão das proteínas de ligação intercelular e célula-substrato que fixam as células ao fundo da placa. As células podem ser mantidas ou semeadas para posteriormente ensaio.

3.2.2.2 Tratamento para avaliação do impacto sobre crescimento celular

Para a realização do tratamento, procedeu-se ao cultivo das células em uma placa de 96 poços. Foram adicionados 0,1 mL de suspensões celulares contendo 3000 células por poço da linhagem PC-3, ou 1500 células por poço da linhagem DU145, devidamente

diluídas em meio RPMI-1640, e posteriormente incubadas por 24 horas, sob as mesmas condições mencionadas na seção 3.2.2.1.

No dia seguinte, foi realizado a remoção dos 0,1 mL de meio RPMI previamente adicionados aos poços e procedeu-se à adição de 0,2 mL das soluções preparadas conforme descrito na seção 3.2.1, seguida pela incubação da placa.

Após 3 dias de incubação, foi feita à avaliação do impacto do tratamento na viabilidade celular por meio da redução da Resazurina.

3.2.2.3 Avaliação da viabilidade celular por redução de resazurina

Para a avaliação da viabilidade celular das linhas celulares após o tratamento, procedeu-se à remoção dos 0,2 mL de solução de tratamento de cada poço por aspiração, sendo posteriormente substituídos por 0,2 mL de uma solução de resazurina a 30 μM , a qual foi diluída em tampão de Krebs-Ringer bicarbonato (KRB). As células foram incubadas entre 1 hora e meia a 3 horas a 37 °C em atmosfera humidificada com 5% CO_2 (Figura 15).

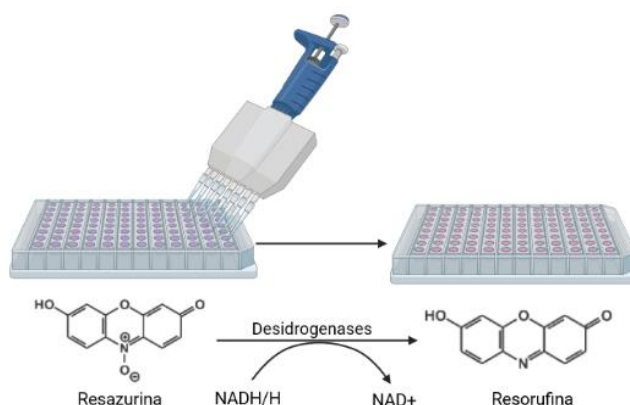


Figura 15: Imagem ilustrativa do ensaio da redução da resazurina, criado em Biorender.

A quantificação foi realizada por fluorimetria, num espectrofotômetro de microplacas (Spectramax Gemini™ EM) com excitação a 544 nm e emissão a 590 nm.

Para os tratamentos realizados com as formulações, foram empregues os mesmos métodos conforme previamente descritos na seção anterior.

3.2.3 Preparação das formulações

3.2.3.1 Nanoemulsões

Os excipientes foram adicionados por ordem decrescente de viscosidade, e agitados até dissolução completa de cada constituinte. Primeiro, pesou-se o agente tensioativo

hidrofílico, Kolliphor® RH 40 (16,67% m/m). Em seguida, acrescentou-se o agente tensoativo hidrofóbico, Imwitor® 948 (33,33% m/m) e por fim, o óleo Capryol® 90 (50% m/m). Após a adição de todos os excipientes, procedeu-se à homogeneização por vortex, concluindo assim a formação do pré-concentrado, que representa 50% da nanoemulsão final. As proporções dos excipientes, provêm de trabalhos anteriormente realizados pelo grupo de investigação [110].

A sinvastatina foi adicionada ao pré-concentrado e solubilizada por aquecimento, a uma temperatura de 40 °C – 50 °C (Dry Block Heater, VWR Analogue, Pensilvânia, Estados Unidos da América), com agitação intermitente em vortex. Todos os componentes foram pesados numa balança analítica (Radwag AS220.r2 Analytical Balance). A solubilização da sinvastatina foi considerada completa quando não era observado a formação de pellet após a centrifugação por 6 segundos.

Como fase aquosa foi preparada uma solução de PEG a 0,75%. Para obtenção da nanoemulsão, esta solução aquosa de PEG foi adicionada aos pré-concentrado em duas etapas. Primeiramente, pesou-se e adicionou-se ¼ da solução total, agitando vigorosamente até obter uma homogeneização completa. Em seguida, adicionou-se a restante solução e agitou-se novamente. Essa adição em dois passos permitiu a inversão das fases e a formação da nanoemulsão desejada. A confirmação do sucesso desta formação pode ser feita pela observação da aparência leitosa parcialmente translúcida.

Também foram preparadas nanoemulsões sem fármaco, sendo a única diferença da nanoemulsão anteriormente referida, a ausência do fármaco em estudo.

Para as nanoemulsões catiónicas, preparou-se uma solução de 0,25% de LC (Cloreto de cetiltrimetilamónio) em Capryol® 90, que foi adicionada à solução de pré-concentrado em substituição do Capryol® 90 simples, conforme mencionado anteriormente.

Na secção destinada aos resultados e discussão, as Nanoemulsões serão descritas através de um sistema codificado, cuja designação se inicia com "NE". Este sistema terá a função de esclarecer se foram efetuadas modificações ou não, nomeadamente no que se refere à concentração de sinvastatina (sinv x%), à presença e concentração do lípido catiónico na fase oleosa (LC y%).

3.2.3.2 Microemulsões

Primeiramente ocorreu a preparação da solução de pré-concentrado. Os constituintes da fase oleosa foram pesados e adicionados por ordem decrescente de viscosidade, desta

forma, ocorreu a adição de Kolliphorn® RH 40 (40% m/m), acetato de vitamina E (10% m/m) e Transcutol® HP (40% m/m), respetivamente. Este pré-concentrado constitui 90 % da formulação total. A adição e solubilização da sinvastatina seguiram o mesmo procedimento descrito para as nanoemulsões (secção 3.2.2.1). Por fim, a fase aquosa (10% m/m), composta por uma solução tampão de ácido málico a 30 mM, foi pesada usando uma balança de precisão e filtrada através de um filtro com poros de 0,20 µm (VWR International LLC, Pensilvânia, Estados Unidos da América). A mistura entre as duas fases foi realizada mediante agitação vigorosa do eppendorf, resultando numa solução transparente. A microemulsão propriamente dita só se formará mediante posterior diluição em água (por exemplo para a caracterização do tamanho de gotícula). Contudo, para simplificação de linguagem solução inicial também foi designada de microemulsão neste trabalho.

Assim como referido no ponto (3.2.2.1), também ocorreu a preparação de microemulsões sem fármaco.

Para obtenção de microemulsões catiónicas, foi preparada uma solução de LC de 0,5% em Transcutol® HP. Em adição, ajustou-se a proporção dos excipientes de forma a possibilitar a incorporação de uma quantidade superior de Vitamina E. Como previamente demonstrado em estudos realizados por membros do grupo de investigação [109] , esta alteração revelou-se uma mais-valia na produção de gotículas de menor dimensão e com maior capacidade de encapsulação de fármaco. Desta forma, procedeu-se à adição de Kolliphorn® RH 40 (30% m/m), acetato de vitamina E (20% m/m) e Transcutol® HP (40% m/m) com 0,5% LC.

Na secção destinada aos resultados e discussão, as microemulsões serão descritas através de um sistema codificado, cuja designação se inicia com "ME". Este sistema terá a função de esclarecer se foram efetuadas modificações ou não, nomeadamente no que se refere à concentração de sinvastatina (sinv x%), à presença e concentração do lípido catiónico na fase oleosa (LC y%).

3.2.4 Caracterização das formulações

3.2.4 .1 Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de Polidispersão

A caracterização das emulsões foi realizada pela medição do DH e do PDI, por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS Malvern® (Malvern, Reino Unido) e o software Zetasizer (versão 7.13).

As nanoemulsões foram diluídas 500 vezes, enquanto as microemulsões foram diluídas apenas 25 vezes. Ambas as diluições foram realizadas em cuvetes descartáveis contendo água ultrapura previamente filtrada através de um filtro de acetato de celulose com poros de 0,2 μm . Foi realizado um duplicado de cada emulsão, sendo esta automaticamente lida por três vezes a uma temperatura de 25 °C (Figura 16). As medições foram realizadas dentro de 30 minutos após a diluição. Os parâmetros de medição configurados no software Zetasizer consideraram a água como dispersante (Índice de Refração = 1,330 e Viscosidade = 0,8872 cP), e o material foi definido como lípido (Índice de Refração = 1.450).

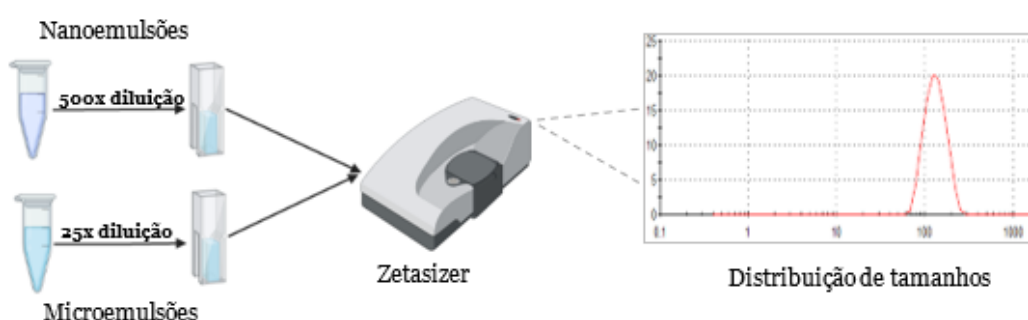


Figura 16: Imagem ilustrativa do procedimento de caracterização das diversas formulações, criado com Biorender.

3.2.5 Ensaio de liberação de fármaco

O estudo do perfil de liberação do fármaco, sinvastatina, foi realizado com sistemas de câmaras Ussing horizontais (Harvard Apparatus, NaviCyte, Hugstetten, Alemanha) (Figura 17). O ensaio foi feito com quatro câmaras colocadas num bloco de aquecimento de água, conectadas a um circulador termostático de banho de água (Grant Instruments Ltd Y-28-vF de (Cambridge, Reino Unido), e a uma placa de agitação magnética, (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG EKT Hei-Con, Schwabach, Alemanha), para potenciar uma fonte de aquecimento extra e agitação.

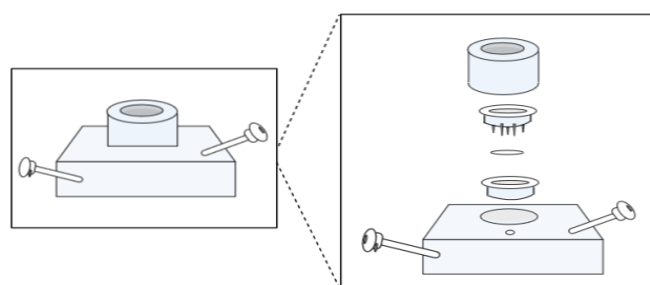


Figura 17: Ilustração do aparato das câmaras Ussing horizontais, realizado no Biorender.

Ocorreu a adição de micro agitadores de 2 mm às câmaras recetoras, a velocidade de agitação foi ajustada para 200 rpm, o que permitiu a homogeneização da solução. No entanto este processo pode potenciar a formação de bolhas de ar o que pode dificultar o processo de libertação. Para a separação das soluções de ambas às câmaras (dadora e recetora) foi adicionado uma membrana de polietersulfona hidrofílica Supor® com tamanho de poro de 0,2 µm (Pall Life Sciences, Nova York, Estados Unidos da América) entre as duas câmaras.

O ensaio começou com a adição de 1900 µL de tampão nasal a pH 5, a 3 das câmaras recetoras e de 100 µL da mesma solução às câmaras dadoras das mesmas, de forma a ser mantido a humificação das membranas durante o aquecimento. Como controlo de temperatura, numa das câmaras foi utilizado um sensor de temperatura acoplado à barra magnética (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG EKT Hei-Con, Schwabach, Alemanha), tendo essa câmara apenas água. Quando a temperatura atingiu 32 °C (temperatura nasal) foi retirado os 100 µL de tampão nasal inicialmente adicionados e adicionados 100 µL da solução com fármaco. Foram retiradas amostras de 100 µL das câmaras recetoras nos tempos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos, 180 minutos e 240 minutos. Seguidamente à colheita de cada amostra, foi imediatamente repostos 100 µL de tampão nasal para ocorrer a manutenção do volume.

A inclusão de um tampão nasal com pH de 5 é justificada pela maior estabilidade que o fármaco em estudo apresenta a esse pH. Isso ocorre porque a hidrólise do fármaco é favorecida em valores de pH mais alcalinos [58]. Além disso, essa escolha permite mimetizar o pH ácido do muco nasal, que, apesar de frequentemente ser ligeiramente superior (na faixa de 5,5-6,5)[112], é mantido dentro de parâmetros semelhantes. Nos ensaios de adsorção, foi preparada uma solução menos concentrada do fármaco, com uma concentração de 10 µM, utilizando o tampão nasal como solvente. Essa solução foi obtida a partir de uma solução inicial de 200 µM do fármaco, sendo posteriormente adicionada tanto à câmara doadora quanto à câmara recetora. Todos os outros procedimentos seguiram o mesmo padrão mencionado anteriormente no contexto do ensaio de libertação. Os 100 µL coletados foram diretamente quantificados por HPLC, utilizando o método descrito na seção (3.2.6).

3.2.6 Cromatografia de alta eficiência

3.2.6.1 Equipamento e Condições Cromatográficas

A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Figura 18) foi conduzida utilizando um sistema de Cromatografia Líquida LC-2010A HT acoplado a um detetor de arranjo de díodos SPD-M20A, o qual foi controlado automaticamente pelo software

de aquisição de dados LabSolutions 5.52 da Shimadzu (Kyoto, Japão). A separação cromatográfica ocorreu a uma temperatura de 30 °C em uma coluna de fase reversa (C18) com partículas de 3 µm e dimensões de 55 × 4 mm, protegida por uma pré-coluna de fase reversa (C18) com partículas de 5 µm e dimensões de 4 × 4 mm, ambos os modelos LiChroCART® Purospher® STAR adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Para a eluição, utilizou-se uma fase móvel isocrática a uma taxa de fluxo de 1 mL/min composta por 60% de acetonitrilo e 40% de água ácida com pH de 5 (v/v), previamente filtrada através de uma membrana Nylaflo com tamanho de poro de 0,2 µm (Pall, Estados Unidos da América) e degaseificada por 30 minutos em banho ultrassônico Labbox Labware ULTR (Barcelona, Espanha). A água ácida foi preparada pela adição de ácido ortofosfórico fornecido pela Fisher Chemical (Leicestershire, Reino Unido) à água ultrapura. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL e a detecção dos analitos ocorreu em 238 nm, com duração das corridas variando de 5 a 10 minutos.

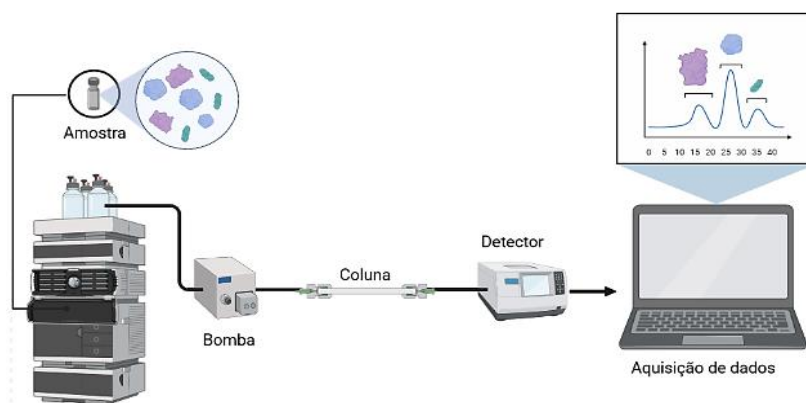


Figura 18: Processo de Funcionamento e aparato do HPLC, realizado com Biorender.

Foi usado um método desenvolvido por outro investigador, onde foi confirmada a sensibilidade, linearidade e seletividade [109]. Tudo foi realizado de acordo com a diretriz da European Medicines Agency (EMA) para validação de métodos bioanalíticos [113] e com o guia da Food and Drug Administration (FDA) para validação de métodos bioanalíticos [114].

As curvas de calibração preparadas demonstraram linearidade para a faixa de concentrações utilizada (0,024925 a 4,985 µg/mL). Após testar diferentes fatores de ponderação, foi selecionado o fator $1/x^2$ por apresentar a melhor linearidade e coeficiente de determinação ($r^2=0,9928$) (Tabela 6).

Tabela 6: Linearidade usando $1/x^2$ como fator de ponderação. Equação ($y = ax + b$).

Slope (a)	Y-Intercept (b)	r ²
33158.8276	56.5151	0,9928

3.2.7 Estudos de Estabilidade Química e Física

Foi testado o impacto da incorporação de DL- α -Tocoferol na estabilidade química da sinvastatina nas formulações selecionadas. Foram preparados 2 mL de cada formulação independentemente em triplicados, usando fases oleosas e aquosas recém-preparadas. Sendo as formulações colocadas a 40 °C durante 2 semanas. No início e no fim desse tempo a concentração de sinvastatina foi determinada usando o método HPLC previamente descrito na seção (3.2.6). Para a quantificação, as amostras foram diluídas 500 vezes em metanol e, em seguida, 100 vezes em tampão nasal. A ordem de degradação foi obtida com base na concentração residual do fármaco em relação ao tempo.

3.2.8 Análise estatística

A análise gráfica e estatística dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism® versão 8.01.

A taxa de liberação do fármaco foi calculada mediante a aplicação de três modelos distintos. No modelo de ordem zero, efetuou-se uma análise de regressão linear em que se calculou a concentração de Sinvastatina (Y) em função do tempo (X). No modelo de primeira ordem, a percentagem do fármaco (Y) foi obtida através da subtração da percentagem de liberação do fármaco a 100%, seguida de uma transformação logarítmica comum. Após a transformação, procedeu-se a uma regressão linear para analisar a relação entre Y e X. No modelo de Higuchi, tanto o tempo (X) como a percentagem de liberação do fármaco (Y) foram submetidos a transformações, sendo X transformado pela raiz quadrada, e Y dividido pela área da membrana utilizada no ensaio (0,64). Após estas transformações, aplicou-se uma regressão linear para avaliar a correlação entre X e Y. A seleção do modelo mais adequado baseou-se na comparação dos coeficientes de correlação (r^2) das regressões lineares obtidas para cada modelo.

Nas análises de estabilidade química, procedeu-se ao estudo do impacto do tempo e da temperatura na estabilidade química da sinvastatina, através de uma análise de variância do tempo, utilizando um teste ANOVA unidirecional. Com o intuito de determinar a ordem cinética da degradação da Sinvastatina, empregaram-se três modelos distintos. No modelo de ordem zero, realizou-se uma análise de regressão linear utilizando a concentração de Sinvastatina (Y) em função do tempo (X). No modelo de primeira ordem, a transformação de Y envolveu o cálculo do logaritmo comum, seguido de uma análise em relação a X. No modelo de segunda ordem, procedeu-se à transformação de Y através da inversão de 1 por Y, seguida da análise em relação a X através de uma regressão linear. A seleção do modelo mais adequado baseou-se na comparação dos coeficientes de correlação obtidos para cada modelo.

Nos estudos de estabilidade química, a análise estatística das variações entre as diferentes formulações e ao longo do tempo foi avaliada mediante uma análise de variância de dois fatores, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. O impacto do tempo e da temperatura na estabilidade química da Sinvastatina foi avaliado por meio de uma análise de variância de dois fatores. Para determinar a ordem cinética da degradação da Sinvastatina em diferentes temperaturas, foram utilizados três modelos distintos. No modelo de ordem zero, efetuou-se uma análise de regressão linear após o traçado da concentração de Sinvastatina (Y) em função do tempo (X). No modelo de primeira ordem, procedeu-se à transformação de Y através do cálculo do seu logaritmo comum, seguido do traçado em função de X, com subsequente análise de regressão linear. No modelo de segunda ordem, Y foi transformado dividindo 1 por Y e traçado em função de X, sendo igualmente submetido a uma análise de regressão linear. A seleção do modelo mais adequado baseou-se na comparação dos coeficientes de correlação obtidos.

Na caracterização das formulações a análise estatística das variações entre as diferentes formulações e foi avaliada mediante uma análise ANOVA unidirecional, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Nos estudos de estabilidade química, o impacto do tempo e da temperatura na estabilidade química da sinvastatina foi avaliado através de ANOVA Bidirecional. Para determinar a ordem cinética da degradação da sinvastatina em diferentes temperaturas, foram utilizados três modelos. No modelo de ordem zero, realizou-se uma análise de regressão linear após o traçado da concentração de sinvastatina (Y) em função do tempo (X). No modelo de primeira ordem, Y foi transformado calculando o seu logaritmo comum e traçado em função de X, seguido de uma análise de regressão linear. No modelo de segunda ordem, Y foi transformado dividindo 1 por Y e traçado em função de X, e em seguida foi feita uma análise de regressão linear. O melhor ajuste foi determinado pela comparação do coeficiente de correlação.

Na avaliação do IC₅₀, procedeu-se à análise da relação dose-resposta adotando o modelo inibição versus logaritmo das concentrações da fármaco, não normalizado e de declive variável. Dentro deste método, definimos Y como a média de cada ponto. No que diz respeito às restrições, implementamos o compartilhamento dos valores finais e das inclinações entre todos os pontos de dados. O valor inicial também foi partilhado por todos os pontos, com a restrição de que não ultrapassasse 100%.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1. Estudo da influência do fármaco livre no crescimento celular de linhas de cancro da próstata

O estudo teve início com a análise do impacto viabilidade celular após 72 horas de tratamento com sinvastatina livre nas linhas celulares PC-3 e DU145. A avaliação ocorreu através do método de redução de resazurina. O número de células viáveis num ensaio com esta duração reflete o crescimento da população de células que ocorre nesse intervalo de tempo, sendo influenciado tanto pela morte celular, como eventual inibição da proliferação/divisão celular.

Na gama de concentrações mais baixas do composto (0,01-1 μM), as linhas celulares DU145 e PC-3 exibiram resultados análogos de altas taxas de crescimento celular, em média entre 84% e 100% (Figura 19).

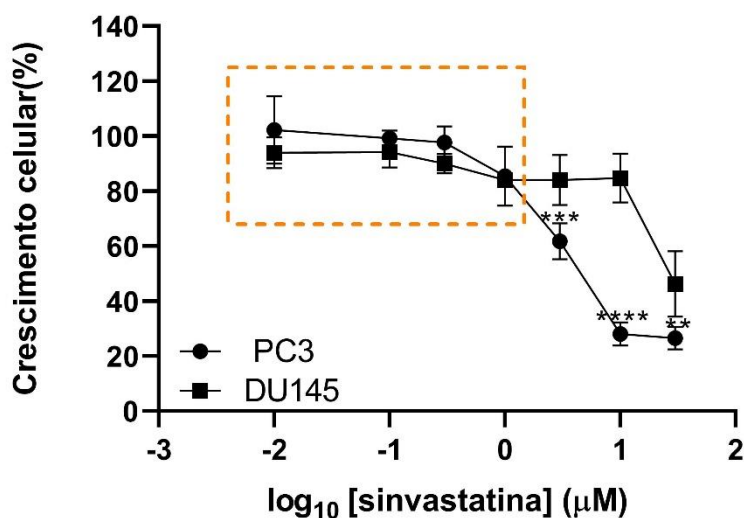


Figura 19: Perfil de crescimento celular de duas linhas de cancro da próstata (PC-3 e DU145) após tratamento por 72 horas com diferentes concentrações (0,01 μM a 30 μM) de sinvastatina. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão, com replicados de $n=1$ de $N=5$ lotes independentes. Os dados correspondem ao estudo da significância estatística por ANOVA unidirecional, as diferenças entre os grupos de teste são destacadas pelos símbolos *. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ e ** $p < 0,01$.

No entanto, quando sujeitas a concentrações mais elevadas (10-30 μM), foram identificadas disparidades entre as linhas celulares. A linha PC-3 evidenciou uma notável

redução na viabilidade celular a partir de 10 μM . Em contrapartida, a linha DU145 apresentou apenas uma diminuição mais substancial da viabilidade celular a partir de 30 μM de sinvastatina. Desta forma, a linha PC-3 demonstrou uma maior sensibilidade ao tratamento, comparativamente à DU145. Contudo, este resultado não se apresenta como ideal, sendo a inibição de crescimento celular observada apenas nas concentrações mais elevadas, as quais são difíceis de ser atingidas em vivo sem provocar toxicidade celular nos tecidos.

Este tipo de contraste na suscetibilidade das diferentes linhas também foi previamente documentado na literatura. Num estudo realizado em 2008 também foi evidenciada uma maior sensibilidade por parte da linha celular PC-3 em comparação com a DU145 [115]. Foi proposto pelos autores do estudo que as que as discrepâncias exibidas nos efeitos inibitórios do fármaco nas duas linhas celulares possam ser resultantes de diferentes impactos na fase G1 do ciclo celular de cada linha. Isso foi comprovado por um aumento significativamente maior de células na fase G1 do ciclo celular na linha PC-3, em comparação com a linha DU145. Esse padrão reflete uma notável redução na taxa de proliferação celular na linhagem PC-3, o que sugere que a discrepância de resposta à terapia com sinvastatina possa ser influenciada por fenômenos como a regulação diferencial da progressão do ciclo celular entre essas duas linhas.

4.2 Caracterização de Micro e Nanoemulsões

A composição das nano e micro emulsões e quantidade do fármaco associado, de 5,55% e 8,93%, foram otimizações anteriormente realizadas pelo grupo. Antes do presente trabalho, outro membro do grupo de investigação alcançou uma concentração de sinvastatina de 5,21% m/m, usando a mesma composição de nanoemulsão, sendo exibido apenas precipitação à concentração de 5,66% [116].

Serie 1:

Com o objetivo de otimizar a formulação das nanoemulsões, procedeu-se inicialmente a um estudo de distintas concentrações de PEG na fase aquosa (0,75%, 1,5% e 2%) e do seu impacto nas características do sistema, nomeadamente no DH e PDI das mesmas. Esta avaliação foi feita em NE com fármaco. O polioxietilenoglicol (PEG) é um poliéster sintético com propriedades hidrofílicas, caracterizando-se pela sua não toxicidade e não imunogenicidade. A inclusão do PEG na formulação teve como propósito melhorar diversos aspetos do processo ou da composição em questão.

Foi possível constatar, por meio de uma análise de variância unidirecional, com teste múltiplo de Tukeym que não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos em relação aos valores de PDI ($p = 0,0642$), nem de DH ($p = 0,3470$), em resposta às várias concentrações de PEG (Tabela 7), a apesar do valor aparentemente mais baixo de PDI com 0,75% de PEG do que com as outras as concentrações superiores.

Tabela 4 : Caracterização do índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico (DH) de nanoemulsões contendo diferentes concentrações de PEG (0,75%, 1,5% e 2%) na fase aquosa. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão, com replicado $n=2$ cuvetes de $N=1$ lote de formulação, a temperatura de 25 °C e 5,55% de sinvastina. Nanoemulsão com PEG referida como NE_PEG.

	NE_PEG 0,75%	NE_PEG 1,5%	NE_PEG 2%
PDI	0,051 \pm 0,004	0,152 \pm 0,024	0,117 \pm 0,025
DH	150,0 \pm 1,6	153,3 \pm 1,5	147,9 \pm 3,1

Foi possível concluir que, estatisticamente, não é possível considerar que o aumento de PEG tenha provocado um impacto significativo no PDI e no DH, embora o aparente menor PDI com a menor concentração de PEG. No entanto, é importante referir que todas as nanoemulsões podem ser assumidas como relativamente homogêneas devido ao $PDI < 0,2$. No que diz respeito ao DH, observaram-se valores de aproximadamente 150 nm com as 3 concentrações de PEG.

A nível bibliográfico, de acordo com um estudo realizado em 2017, a adição de quantidades crescentes de PEG parecem exercer um aumento, tanto do tamanho das partículas individuais como da sua consequente dispersão de tamanhos. proposto que este aumento possa ser resultante de uma maior probabilidade de aglomeração, aumento de viscosidade do meio, ou pela modificação de interações entre as partículas. Incluindo forças eletrostáticas, interações de Van der Waals e possíveis alterações conformacionais [117].

Serie 2:

Posteriormente, procedeu-se à caracterização e subsequente comparação das ME e NE PEG 0,75 %, avaliando o impacto da presença de sinvastatina e das condições de temperatura de armazenamento a curto prazo (*overnight*) a 4 °C ou 25 °C, no caso das NE (Tabela 8).

No que diz respeito à análise do impacto da temperatura nas NE, a comparação dos valores de PDI revelou diferenças estatisticamente significativas, com um valor de $p < 0,0001$, a um nível de confiança inferior a 0,05 (análise de variância unidirecional). O

teste múltiplo de Tukey demonstrou como significativa a diferença entre NE 5.55 % a 4 °C e a 25°C; ou seja, na NE com sinvastatina o PDI foi mais baixo a 4 °C.

Tabela 5 : Índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico (DH) de nanoemulsões (NE) e microemulsões (ME) neutras a diferentes concentrações de sinvastatina (0% e 5,55%) com 0,75% de PEG, a temperaturas de 25 °C e 4 °C. Os dados correspondem à média ± desvio padrão, de replicados de n=2 cuvetes de N=1 lote. Para formulações com a ausência de fármaco este foi referido como 0% e com a presença foi exibido 5,55% e 8,83% para NE e ME, respetivamente. PEG, polietilenoglicol 4000.

Temperatura	4 °C		25 °C			
Formulação	NE_PEG 0,75%		NE_PEG 0.75%		ME	
Sinvastatina (%)	0	5,55	0	5,55	0	8,93
PDI	0,052 ± 0,000	0,050 ± 0,002	0,031 ± 0,002	0,134 ± 0,008	0,034 ± 0,004	0,046 ± 0,004
DH	97,5 ± 1,7	128,6 ± 1,7	100,2 ± 1,5	159,9 ± 1,9	28,3 ± 0,3	31,2 ± 0,4

Na análise do DH os resultados acompanharam a tendência observada no estudo do PDI, demonstrando-se estatisticamente significativos para o fator temperatura, com um valor de $p < 0,0001$, a um nível de confiança inferior a 0,05. O teste múltiplo de Tukey demonstrou significância com p ajustado $< 0,0001$, havendo uma diminuição significativa do DH nas NE com sinvastatina, mas não nas NE sem sinvastatina após refrigeração.

A nível bibliográfico não é fácil encontrar justificação. Estudos prévios demonstraram que temperaturas mais baixas podem resultar não em tamanhos iniciais mais baixos, mas em maior estabilidade a longo prazo para nanoemulsões. Os autores demonstraram que a temperaturas mais baixas, ocorre a preservação da viscosidade e a retenção do composto solubilizado nas gotículas de óleo, sendo a degradação do composto minimizada [78], [92]. Pode ser sugerido que isto se deve ao facto de que temperaturas elevadas, as nanoemulsões enfrentam desafios de estabilidade e devido à agitação molecular intensificada resultante da baixa viscosidade e das resultantes colisões entre partículas. A mobilidade aumentada das moléculas pode levar à coalescência e aglomeração das gotículas dispersas e posterior aumento de PDI e tamanhos.

Contudo, foi demonstrado anteriormente que nesta nanoemulsão em particular a temperatura antes da diluição em água é essencial para a diminuição significativa do tamanho médio das gotículas. Foram demonstradas uma redução do DH para cerca de 100 nanómetros e uma diminuição do PDI para menos de 0,1, indicando maior uniformidade. Esse efeito ocorreu independentemente da homogeneização e foi

reversível, uma vez que o tamanho das gotículas voltou ao estado anterior ao retornar as emulsões à temperatura ambiente após arrefecimento [118]. Não se conhece a razão par tal efeito.

A diferenças de PDI entre ME e NE com sinvastatina a 25 °C foram estatisticamente significativas, com um valor de $p < 0,001$ (análise de variância unidirecional). De acordo com o teste múltiplo de Tukey, as diferenças entre veículos sem fármaco encapsulado (NE 0 % e ME 0 %) não apresentaram significância estatística no PDI, apresentando um $p > 0,05$.

Avaliando o efeito da presença de sinvastatina no DH, este fator contribui significativamente para a variância observada com um valor de $p < 0,0001$ (ANOVA unidirecional). No entanto, o teste de Tukey múltiplo revelou que as diferenças apresentaram alta significância estatística nas condições de NE (em ambas as temperaturas), embora a diferença entre ME 0% e ME 8,93 % tenha sido estatisticamente considerada insignificante.

No que se refere ao PDI, referente às ME, observamos que tanto a formulação com 0% de fármaco quanto a com 8,93% de fármaco apresentaram valores de PDI muito baixos (0,034 e 0,056, respetivamente). Não foi observado qualquer impacto na dispersão do DH de partículas com a adição de fármaco, e isso foi estatisticamente comprovado. Contudo, na nanoemulsão (NE), com a adição de fármaco verificou-se um aumento significativo de cerca de 0,103 no PDI a 25 °C. Este aumento demonstrou claramente o impacto significativo da adição do fármaco na homogeneidade das NE apenas à temperatura ambiente, mas não nas formulações refrigeradas.

Estes resultados sugerem uma distribuição de tamanho de partícula mais alargada na NE com fármaco encapsulado, o que pode ter um impacto na estabilidade da emulsão e na eficácia do transporte do fármaco. É relevante mencionar que ambas as formulações apresentam ainda assim uma distribuição homogênea do tamanho de partículas, com PDI inferior a 0,2, e um DH < 200 nm. o que é desejável.

É importante salientar que as formulações sem fármaco (NE 0% e ME 0%) apresentaram tamanhos significativamente distintos, com as nanoemulsões evidenciando um diâmetro superior em cerca de 70 nm em relação às microemulsões. As diferenças notáveis nos tamanhos das formulações foram ainda mais evidentes nas formulações com fármaco, onde se observou uma diferença de 128,7 nm entre as microemulsões e as nanoemulsões. Na presença de sinvastatina foi observado ainda menor PDI por parte das microemulsões.

A nível bibliográfico é ser sugerido que a maior uniformidade de tamanhos e menor diâmetro hidrodinâmico das microemulsões, possa ser resultante da sua baixa tensão superficial associada, o conseqüentemente favorece mais facilmente a dispersão de gotículas o que minimiza a coalescência e aglomeração das gotículas dispersas, que resultam em partículas com tamanhos mais consistentes (PDI inferior) e menores. No entanto na generalidade as nanoemulsões apresentam uma alta tensão superficial o que resulta num sistema com emulsões de maiores tamanhos e com menor homogeneidade [78], [92].

Conclui-se que as condições ideais para a formulação das NE passam por uma temperatura de armazenamento de 4 °C e uma concentração de PEG de 0,75 %. Esta conclusão baseia-se na diminuição registada nos valores de DH e PDI sob esta condição. Foi feito posteriormente a análise destes mesmos parâmetros num maior número de formulações, de forma a verificar a fiabilidade da manutenção destes ao longo de 3 lotes independentes após refrigeração, ou seja, se são resultados robustos. Foi constatado um valor ligeiramente superior no DH de $149,0 \pm 1,030$, em comparação com o valor anteriormente apresentado (128,6), no entanto, este continua a situar-se dentro dos parâmetros desejados, mantendo-se abaixo dos 200 nm. Quanto ao PDI, observou-se igualmente um aumento ligeiro para $0,088 \pm 0,031$ em relação ao valor anteriormente registado, que era de 0,05. Não obstante, ainda se mantém não só dentro dos limites desejados, como ainda inferior a 0,1.

Foi concluído que os valores não se afastam muito dos valores dos parâmetros obtidos anteriormente podendo ser estes considerados como fiável.

Serie 3:

Realizou-se a caracterização e subsequente comparação das micro e nanoemulsões catiónicas em semelhança ao procedimento efetuado com as formulações neutras. As condições de armazenamento e temperatura permaneceram inalteradas, conforme as otimizações feitas nas séries anteriores. A percentagem de PEG foi mantida a 0,75%, e as nanoemulsões, contendo LC a 0,25%, foram armazenadas a 4 °C, enquanto as microemulsões catiónicas, contendo 0,5% de lípido catiónico, foram armazenadas à temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C. Contudo, nestes novos lotes verificou-se que ocorreu a precipitação do fármaco nas concentrações mais elevadas de sinvastatina (5,55% nas nanoemulsões e 8,93% nas microemulsões) após a diluição em água filtrada na cuvete descartável, o que impossibilitou a sua caracterização. Esta precipitação pode ser resultante da baixa solubilidade em água por parte do fármaco.

Tornando-se essencial otimizar a percentagem de fármaco adicionado para viabilizar a sua caracterização adequada, procedeu-se ao estudo destes mesmos parâmetros em concentrações mais baixas, nomeadamente 1,85 % e 3,7 % nas NE, e 2,94 % e 5,94 % nas ME. Constatou-se que, a concentrações mais reduzidas, não se verificou a precipitação do fármaco, demonstrando uma solubilização completa (Figura 20).

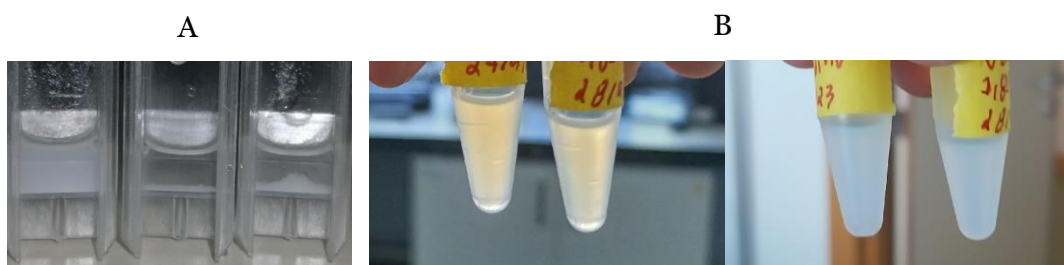


Figura 20: A- Precipitação de NE Sinv 5,55%. B – Solubilização completa de NE Sinv 1,85 % e 3,7%. Em A a precipitação é visível sob forma de um depósito branco no fundo das cuvetes.

As diferentes concentrações testadas exibiram ainda similar tonalidade, demonstrando que esta diminuição não provocou um efeito impactante na formação de emulsões de uma forma obvia. O que pode ser visualizado na Figura 20 B, onde se encontram as nanoemulsões com 1,85% e 3,7%. Contudo, o mesmo não se pode afirmar relativamente à formulação com 5,55%, ilustrada na Figura 20 A, a qual evidencia uma precipitação notória, com a aglomeração do fármaco no final da cuvete correspondente.

Posteriormente procedeu se então a caracterização das formulações otimizadas nas NE, houve uma diminuição tanto do PDI como do DH com o aumento da concentração de sinvastatina ($p < 0,0001$, ANOVA unidirecional). O PDI passou de 0,16 com 0% de fármaco para 0,07 e 0,06 com 1,85% e 3,7% de fármaco, e o DH aproximou-se de 100 nm (passou de 117,0 nm para 111,1 nm e para 103,6 nm), o que é favorável (Figura 21).

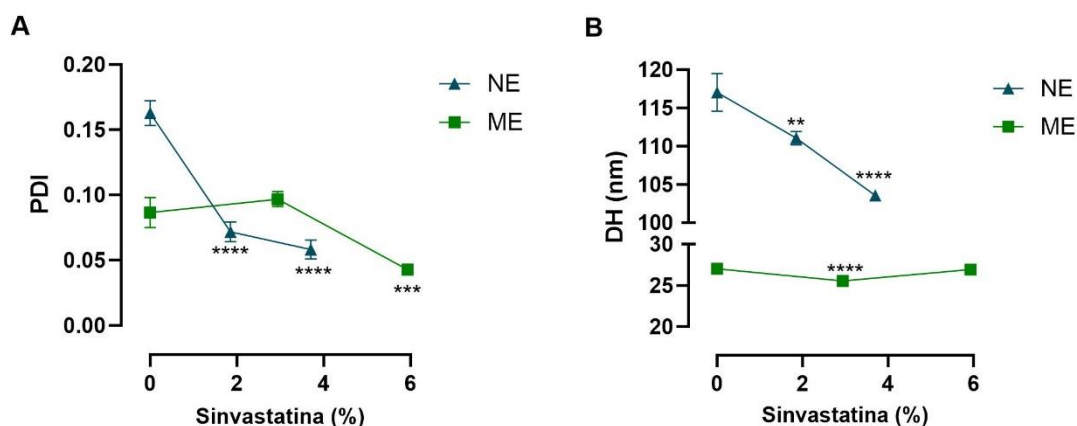


Figura 21: Caracterização do tamanho de gotículas das nanoemulsões (NE) a e microemulsões (ME) catiónicas em função da concentração de simvastatina. NE foi realizado com concentrações de 0%, 1,85% e 3,7%, ME realizado com 0%, 2,94 % e 5,94 %. A – Índice de polidispersão (PDI) de ambas formulações (NE e ME). B – Diâmetro hidrodinâmico (DH) de ambas formulações (NE e ME). Os dados correspondem à média \pm desvio padrão, com replicados de $n=2$ cuvetes de $N=3$ lotes independentes, à temperatura de 25 °C (ME) e 4 °C (NE). Os dados correspondem ao estudo da significância estatística por ANOVA unidirecional com teste multicomparativo de Dunnett, as diferenças entre os grupos de teste são destacadas pelos símbolos *. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, e ** $p < 0,01$.

Na ME o valor já baixo de PDI diminuiu ainda mais com o aumento a concentração de simvastatina, mas só com a de maior concentração ($p < 0,001$, ANOVA unidirecional) exibindo valores de 0,05. Já seu tamanho, apesar de uma pequena diferença com significado estatístico na concentração intermédia, não se alterou na maior concentração de simvastatina mantendo-se ≈ 27 nm.

Sem surpresa, as NE sem fármaco evidenciarem um DH significativamente superior de 90 nm em comparação com as ME. As notáveis diferenças nos tamanhos das diferentes formulações também foram evidentes nas formulações com maior concentração de fármaco, onde se observou uma diferença de 76,7 nm entre as ME com 5,93% e as NE com 3,7% de simvastatina.

Estes resultados indiciam uma distribuição de tamanho de partícula menos alargada e menor tamanho associado, nas formulações com fármaco encapsulado, o que poderá ter um impacto na estabilidade da emulsão e na eficácia do transporte do fármaco. O que resultou numa elevada divergência dos resultados observados nas formulações neutras, as quais demonstraram menor homogeneidade e maior tamanho de partícula associado com a encapsulação de concentrações crescentes de fármaco. Tanto o impacto da adição do fármaco como da incorporação de LC, foi observado em trabalhos anteriores

realizados pelo grupo de investigação, onde a adição de LC a formulações resultou num decréscimo bastante significativo do tamanho da partícula e um aumento na homogeneidade da mesma, face às formulações neutras sem LC, e tendo sido também demonstrado que a adição do fármaco contribuía para a manutenção destes mesmo parâmetros em valores desejáveis [109].

4.3 Ensaio de libertação

No ensaio de libertação, a gestão precisa da solubilidade do fármaco é de significativa relevância. Conforme o teste avança, a sinvastatina passa a ser libertada do meio lipofílico/oleoso da emulsão para a solução de tampão nasal. Esta solução atua como um meio aquoso, no qual a solubilidade da sinvastatina é notadamente reduzida. Como resultado, é imperativo adotar estratégias para evitar a saturação e a subsequente precipitação do fármaco. Isso é particularmente crucial para garantir a fidedignidade dos resultados.

Para enfrentar esse desafio, é necessário atentar às condições de imersão, também conhecidas como "sink conditions". De acordo com as diretrizes estabelecidas na Farmacopeia Europeia, essa abordagem traduz-se na aplicação de concentrações de sinvastatina que variam de 3 a 10 vezes abaixo de sua solubilidade na solução simuladora de tampão nasal. Essa abordagem parte do pressuposto de que a totalidade do fármaco será libertada e está intrinsecamente relacionada à manutenção da dissolução e solubilidade da sinvastatina.

As condições de imersão foram previamente avaliadas e confirmadas por um membro do grupo de investigação [109]. Um teste de solubilidade da sinvastatina na solução de tampão nasal foi conduzido, indicando uma solubilidade de 23,34 µg/mL a 32 °C. Essas condições foram então consideradas para a realização deste ensaio.

As seguintes formulações foram selecionadas para serem testadas, NE e ME neutras e NE e ME catiónicas (LC a 0,25% e 2 0,25%, respetivamente).

A fim de cumprir as condições de imersão, com uma concentração inicial de sinvastatina de 55,5 mg/g (5,55%) nas NE e 89,3 mg/g (8,93%) para ME, e após uma diluição de 500 vezes, era esperado uma concentração de 111 a 179 µg /mL. Nos 100 µL adicionados à câmara dadora um total 11 a 18 µg /mL de sinvastatina poderia ser libertado num volume de 1,9 mL. A concentração máxima prevista era cerca de 9 µg/mL, sendo esta aproximadamente 2,6 vezes inferior à solubilidade de 23,34 µg/mL da sinvastatina no tampão nasal. Isto veio a confirmar-se, tendo sido alcançado pela camara recetora um

máximo de 2,80 µg /mL, 3,83 µg/mL, 3,50 µg/mL, 1,78 µg /mL quando usadas a NE CAT, ME CAT, NE N e ME N, respetivamente. Esses valores respeitam as condições de afundamento, uma vez que são de 6 a 13 vezes menores que a solubilidade da sinvastatina em tampão.

A libertação da sinvastatina não foi completa em nenhuma das formulações testadas após 240 minutos, tendo atingido percentagens máximas de libertação de 9,2%, 16%, 9,2% e 11,60% na nanoemulsão catiónica, microemulsão catiónica, nanoemulsão neutra e microemulsão neutra, respetivamente, apresentando perfis semelhantes . Uma solução de sinvastatina a 0,200 mg/g foi preparada em Transcutol® HP e usada como controlo positivo, sendo esperado que o fármaco em solução proporcionasse uma libertação mais rápida e relativamente completa. No entanto, mais uma vez, a libertação da sinvastatina não foi completa. Surpreendentemente, a libertação de sinvastatina do controlo positivo foi apenas de 28,49% (Figura 22).

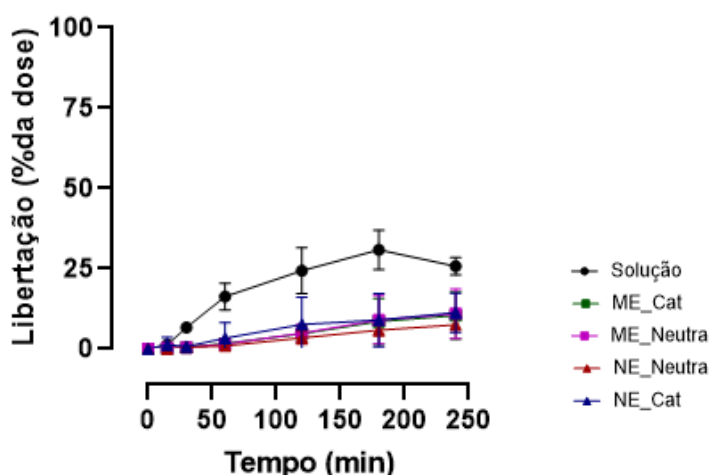


Figura 22: Perfil percentual de libertação do fármaco sinvastatina. Amostras foram coletadas entre 15 e 360 minutos. Quatro formulações diferentes, foram testadas, assim como uma solução de sinvastatina preparada em Transcutol® HP. Formulações catiónicas estão referidas como Cat, a solução de Transcutol como apenas Solução. Os dados correspondem à média ± desvio padrão, N=3 lotes independentes.

Como a libertação também foi incompleta a partir da solução de sinvastatina em Transcutol, usada como referência, suspeitou-se perda de sinvastatina por adsorção. Foi então conduzido um ensaio de adsorção, o qual possibilita determinar a percentagem de fármaco que é retida ou aderida à superfície a um material, neste caso possivelmente a membrana (Figura 23).

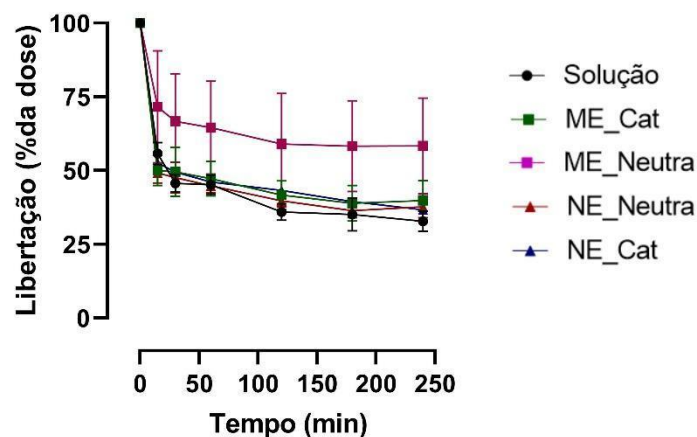


Figura 23: Perfil percentual de adsorção do fármaco sinvastatina. Amostras foram coletadas entre 15 e 360 minutos. Quatro formulações diferentes foram testadas, assim como uma solução de sinvastatina preparada em Transcutol® HP. Nano e microemulsão estão referidos como NE e ME, respetivamente. Formulações catiónicas estão referidas como Cat, a solução de Transcutol como apenas Solução. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão, $N=3$ lotes independentes.

Foi estabelecido que as percentagens adsorção se observaram numa generalidade muito superiores ao esperado, demonstrando-se muito superiores às percentagens de libertação, demonstrando valores de 37,48%, 76,24%, 46,26 % e 45,03% na microemulsão catiónica, nanoemulsão neutra e microemulsão neutra, respetivamente. Esses resultados evidenciam a significativa importância da adsorção do fármaco no processo de libertação. De facto, maior quantidade do fármaco é retido ou adsorvido em comparação com a pequena quantidade que é libertada.

Com estes valores foi possível realizar ainda uma análise de libertação a nível estatístico por normalização dos valores da libertação em relação à quantidade não adsorvida, podendo esta relação ser dada pela seguinte equação:

$$N = \frac{(\% \text{ massa de fármaco libertado})}{(\% \text{ massa de fármaco não adsorvido})} \times 100$$

Foi possível concluir que as taxas de libertação normalizadas se apresentaram, na generalidade, muito acima do valor real da libertação, tendo apresentado valores de 31%, 22,59%, 15% e 39% por NE CAT, ME CAT, ME N e NE N, respetivamente (Figura 24). A análise das percentagens de libertação normalizadas revela que, em geral, todas as formulações apresentaram uma libertação eficaz ainda que incompleta e lenta da sinvastatina, mas uma eficácia de libertação superior ao que aparentava não tendo em conta a quantidade de fármaco retida ou adsorvida.

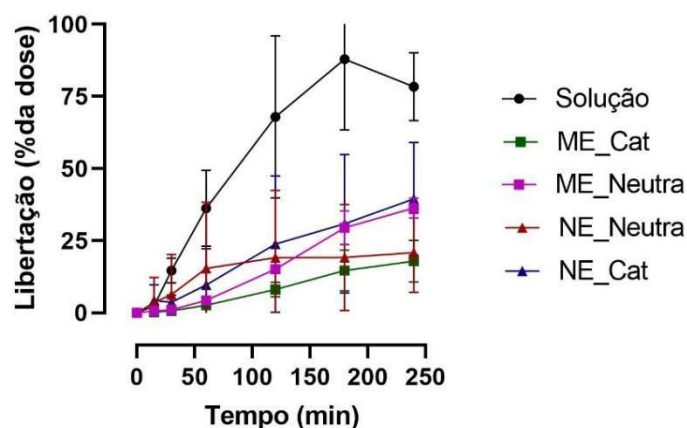


Figura 24: Perfil percentual de normalização da liberação da sinvastatina em relação a sua adsorção. Amostras foram coletadas entre 15 e 360 minutos. Quatro formulações diferentes, foram testadas, assim como uma solução de sinvastatina preparada em Transcutol® HP. Formulações catiónicas estão referidas como Cat, a solução de Transcutol como apenas Solução. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão, N=3 lotes independentes.

Como dito anteriormente, é pressuposto que os elevados níveis de adsorção e respetivos níveis de liberação, possam estar associados a retenção na membrana. Nenhuma informação sobre resultados semelhantes usando câmaras de Ussing foi encontrada na literatura. No entanto, noutros modelos de liberação de fármacos, a adsorção de fármacos à membrana polimérica tem sido relatada como um problema.

Outros modelos de liberação de fármacos usando um aparelho de diálise, também demonstraram o mesmo problema. Foi referido que a liberação do medicamento em métodos de diálise é prejudicada pela própria membrana de diálise, que representa uma barreira adicional para a difusão do medicamento para o compartimento recetor [120]. Um estudo que utilizou nanopartículas lipídicas de quitosano/lecitina carregadas com sinvastatina também sugeriu que força motriz pode ser um facto de influência na liberação posterior do fármaco. Mencionando que a presença de um transportador reduz a força motriz que governa o transporte do medicamento através da membrana de diálise. Essa redução pode alterar a taxa geral aparente de liberação do medicamento [119].

Esta suposição pode justificar o facto da sinvastatina dissolvida em Transcutol, presente uma liberação muito superior e descontrolada, e uma adsorção muito mais inferior face ao fármaco solubilizado nas emulsões. No entanto pode ser considerado como um resultado desejável, demonstrando assim que as emulsões realizam uma liberação lenta e controlada, o que é ideal para certos tipos de terapias.

Em termos de cinética de liberação, a NE Neutra apresentou a melhor correlação com o Modelo de Higuchi [120] enquanto a ME Neutra mostrou uma melhor correlação com a cinética de liberação de ordem zero. No entanto, relativamente as catiônicas, tanto as NE como as ME apresentaram a melhor correlação com a cinética de liberação de ordem zero. Assim é sugerido pelos respectivos modelos cinéticos que ME e NE catiônicas, como ME neutra que os perfis de liberação sejam resultado de liberação constantemente ao longo do ensaio. No entanto o modelo de NE Neutra, sugere uma liberação inversamente proporcional ao aumento do tempo. Os resultados dos três modelos testados estão apresentados na Figura 25.

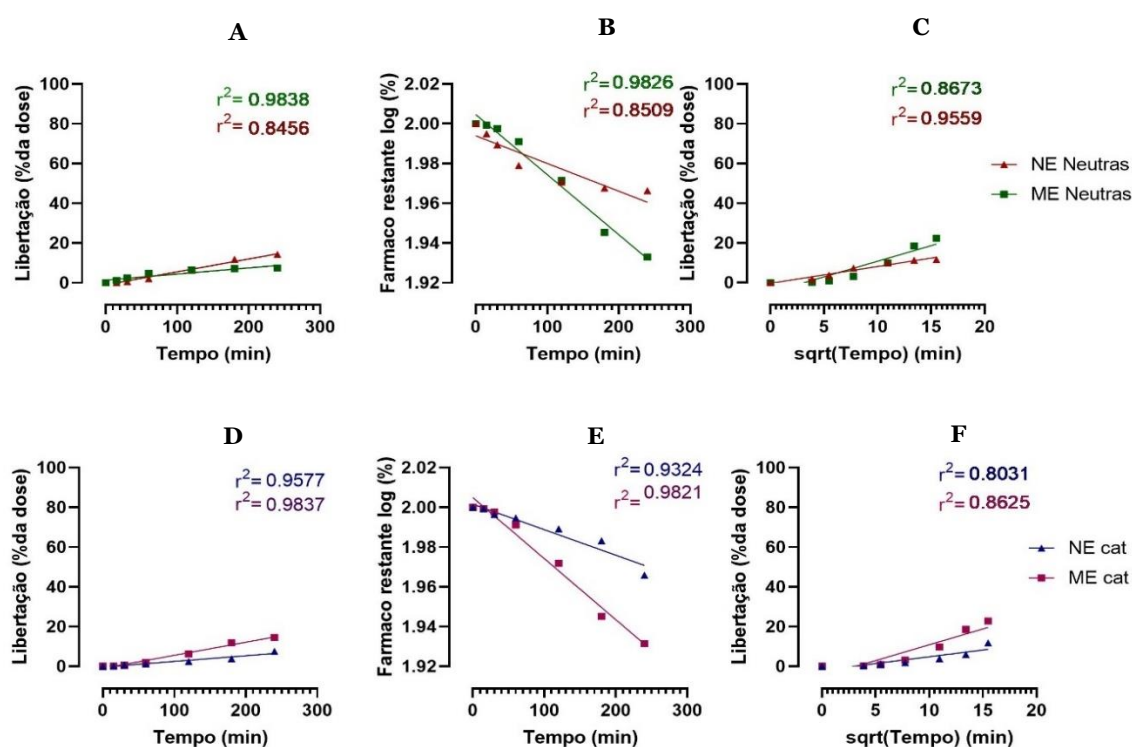


Figura 25: Dados de liberação do fármaco de ambas as formulações ajustados com uma regressão linear a vários modelos cinéticos. (A) Liberação de ordem zero de ME e NE N; (B) Liberação de primeira ordem ME e NE N; (C) Modelo de Higuchi de liberação ME e NE N; (D) Liberação de ordem zero de ME e NE Cat; (E) Liberação de primeira ordem ME e NE Cat; (F) Modelo de Higuchi de liberação ME e NE Neutras. Formulações catiônicas estão referidas como Cat.

Diversas suposições podem ser debatidas para elucidar os perfis de liberação adquiridos para ambas as formulações.

O método de difusão da formulação através da membrana pode constituir um fator digno de consideração. Dado que a sinvastatina é um composto de alta lipofilicidade, é concebível que ocorra a dissolução do fármaco no interior das gotículas lipídicas das emulsões em questão e a sua posterior translocação pela membrana. Tendo isso em conta, as dimensões das gotas e sua uniformidade podem desempenhar um papel nos

distintos perfis de libertação observados. As microemulsões, com dimensões inferiores (< 30 nm), possuem maior probabilidade de transpor os poros da membrana em comparação as da nanoemulsões, que apresentam tamanhos maiores d (ainda que < 200 nm) e, tornando a passagem através da membrana mais difícil. Portanto, seria esperado que as microemulsões demonstrassem uma libertação mais acentuada, em virtude desses fatores, o que não ocorreu.

O pH pode também pode ser sugerido como um facto de impacto na estabilidade e posterior libertação das diferentes formulações. As emulsões catiónicas apresentam uma carga positiva devido à presença de grupos funcionais catiónicos na sua superfície. A estabilidade destas estruturas nanométricas é frequentemente influenciada pela interação eletrostática que ocorre entre as cargas superficiais das nanopartículas e as espécies iónicas e moleculares presentes no ambiente circundante. A manipulação do pH pode ter um efeito notável na distribuição destas cargas superficiais.

No âmbito das emulsões catiónicas, é possível que estas sejam mais estáveis em pH ácido (5), como foi utilizado neste ensaio. Nestas condições, os grupos funcionais presentes nessas emulsões permaneceriam parcialmente ionizados, o que aumentaria a repulsão eletrostática entre as pequenas gotículas carregadas positivamente. Isso proporcionaria uma melhor a estabilidade das emulsões catiónicas, diminuindo a tendência para que as gotículas se fundam. Efeito que poderá ter resultado numa libertação mais lenta do fármaco. Contudo, em meios neutros, este efeito não é observado devido à carga neutra das partículas. Este facto pode ser sugerido como uma possível explicação para a menor libertação observada nas emulsões catiónicas, quando comparadas com as neutras, devido às mais elevadas taxas de adsorção.

Tendo em consideração os resultados expostos foram escolhidas as formulações neutras para a realização de posteriores ensaios. As emulsões neutras apresentam-se como mais seguras para uma possível administração intravenosa. Foi anteriormente demonstrando por um trabalho realizado por um membro do grupo de investigação, que a adição de LC aumentava significativamente a hemólise, tendo sido sugerido que aumento da potencial superficial positiva causada pelo LC possa induzir a hemólise [109], [121].

É também demonstrado a nível bibliográfico que que compostos catiónicos são mais facilmente reconhecidos pelo sistema imunitário devido à sua carga. Partículas positivas são eficazmente captadas tanto por macrófagos quanto por células dendríticas, uma vez que a atração eletrostática promove a ligação das partículas e subsequente internalização [121]. O reconhecimento mais eficaz das partículas catiónicas pelo sistema imunitário pode conduzir a um período de circulação mais curto, visto que estas são prontamente

capturadas e processadas pelas células do sistema imunitário. Este facto revela-se de grande relevância, uma vez que pode influenciar a biodisponibilidade e a eficácia destas partículas no organismo.

4.4 Estudos de Estabilidade Química

No total, seis estratégias de formulação foram testadas durante a caracterização da estabilidade química: NE Sinv 5,55% com 0%, 0,05% ou 0,5% de DL- α -Tocoferol (concentração final na NE), e ME Sinv 8,93% com 0%, 0,01 ou 0,1 de DL- α -Tocoferol.

As formulações tinham como objetivo determinar se uma melhor estabilidade poderia ser alcançada por quantidades crescentes de DL- α -Tocoferol. Este é uma forma de Vitamina E que tem demonstrado elevado potencial quando feita a sua integração em formulações, devidos as suas propriedades antioxidantes. Esta substância tem se destacado pela sua capacidade de retardar a oxidação lipídica, um processo de deterioração resultante da interação do oxigênio com os lípidos presentes em emulsões [122]. É de alto interesse o estudo desta potencial relação. Por essa razão, elas foram caracterizadas apenas em relação à estabilidade química. Esta foi analisada ao longo de 15 dias (Figura 26).

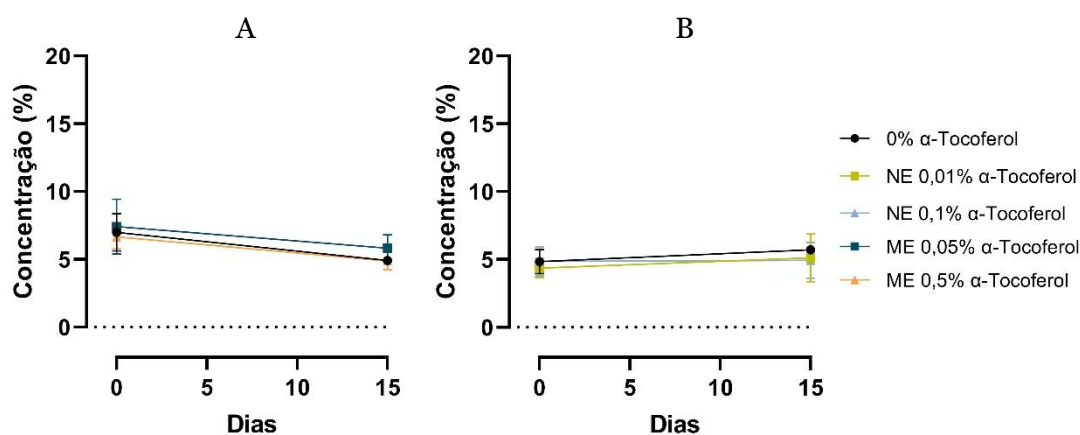


Figura 26: Concentração de simvastatina em percentagem ao longo do tempo utilizando seis diferentes estratégias de formulação. (A) ME Sinv com 8,935,55% e 0%, 0,05% ou 0,5% de DL- α -Tocoferol. (B) ME Sinv com 5,55% e 0%, 0,01%, 0,1% de DL- α -Tocoferol. O armazenamento foi testado a temperatura de 40 °C. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão, com replicados de $n=5$ quantificações de $N=2$ lotes independentes.

Não foram observadas uma diferenças estatisticamente significativas (ANOVA bidirecional, com teste de comparação múltipla de Tukey, com um p de 0,6159 para o efeito do tempo nas ME e de p de 0,944 para o efeito do tempo nas NE.

A diretriz da EMA ICH Q1E [123] estabelece uma mudança máxima de 5% no teor do medicamento em relação ao seu valor inicial para ser considerado estável. Foi possível observar que independentemente da adição de DL- α -Tocoferol houve manutenção as concentrações de sinvastatina ao longo do tempo. Na verdade, o stock usado de sinvastatina em pós já continha um antioxidante, o que pode contribuir para a estabilidade química da sinvastatina. Contudo, deveria ter sido avaliada a estabilidade por um tempo superior.

Estes resultados não foram observados quando feitos na ausência de DL- α -Tocoferol, tendo sido testado e observado anteriormente por outro membro do grupo de investigação que micro e nanoemulsões com sinvastatina sem a adição de tocoferol ou outro tipo de antioxidante demonstrava um decréscimo significativo da concentração do fármaco após apenas 15 dias, tendo sido essa diminuição apenas agravada com o tempo [109]. Isto sugere que a manutenção da estabilidade das formulações possa ser resultante da presença de antioxidante.

Foi demonstrado a nível bibliográfico que a adição deste composto não só parece provocar um aumento na estabilidade das formulações onde é empregue, como na sua posterior biodisponibilidade [124]. Num estudo feito por Sahafi e colaboradores, utilizaram nanoemulsões de óleo de semente de romã enriquecida com DL- α -Tocoferol sendo a estabilidade física avaliada ao longo de 50 dias. Os resultados demonstraram que o aumento da concentração de DL- α -Tocoferol leva a otimização do tamanho das gotículas (de 43 para 37 nm) e um PDI < 0,2, característico de formulações homogêneas. O DL- α -Tocoferol teve um efeito protetor na variação da temperatura, não sendo exibido diferenças significativas no tamanho das gotículas a temperaturas entre 20 °C a 50 °C. As nanoemulsões com enriquecimento de DL- α -Tocoferol apresentam maior atividade antioxidante quando comparadas as que não apresentavam DL- α -Tocoferol [122]. Isto demonstrou o seu possível potencial na melhoria da estabilidade química e da oxidação lipídica, tendo sido sugerida pela autora como um sistema de entrega promissor para a estabilidade oxidativa.

4.5 Crescimento celular de linhas de cancro da próstata tratadas com Micro e Nanoemulsões de sinvastatina in vitro

Dando seguimento ao tratamento anterior, no qual a sinvastatina foi administrada na sua forma livre, procedeu-se a uma investigação detalhada da viabilidade dessa substância quando administrada utilizando microemulsões e nanoemulsões neutras como veículos. Além disso, realizou-se uma análise da citotoxicidade intrínseca do

veículo. Esses resultados foram efetuados apenas com as concentrações em que a sinvastatina livre não apresentava citotoxicidade (até 3 μM) e estão representados na Figura 27.

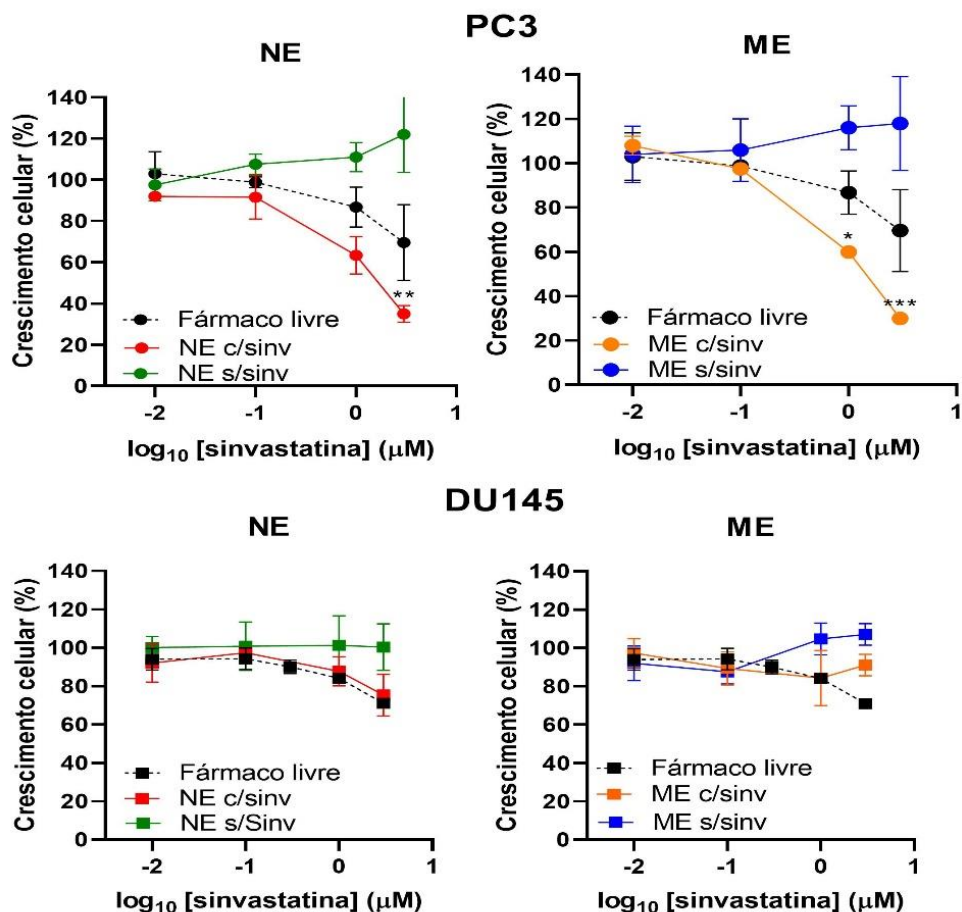


Figura 27: Ensaio de resazurina após tratamento das linhas celulares PC-3 e DU145 por 72 horas com diferentes concentrações (0,01 μM a 3 μM) de sinvastatina livre (repetição parcial dos resultados da Figura 19 para comparação) ou formulada numa nanoemulsão (NE) ou numa microemulsão (ME) neutras. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de $n=1$ de $N=3$ lotes independentes. Os dados correspondem ao estudo da significância estatística por ANOVA unidirecional, as diferenças entre os grupos de teste são destacadas pelos símbolos *. ** $p < 0,01$. Nanoemulsões com e sem fármaco referido como NE c/sinv e NE s/sinv, respectivamente. Microemulsões com e sem fármaco referido como ME c/sinv e ME s/sinv, respectivamente.

Tanto as micro como as nanoemulsões demonstraram alto impacto na viabilidade na linha celular PC-3. Foi observada uma diminuição significativa do crescimento celular nas maiores concentrações de fármaco (1-3 μM) em especial em 3 μM , sendo observado viabilidade celulares de 31,7 % nas microemulsões e 35,2 % nas nanoemulsões. Relativamente ao impacto da citotoxicidade intrínseca dos veículos, estes não

demonstraram qualquer impacto na viabilidade celular, demonstrando que o decréscimo da viabilidade dependeu apenas da citotoxicidade do fármaco entregue.

As linhas DU145 demonstraram resultados completamente divergentes da linha PC-3. Tanto micro como nanoemulsão não exibiram efeito significativo no decréscimo da viabilidade celular, demonstrando nas maiores concentrações o fármaco (3 μ M), valores de $91,7 \pm 2,2$ e $85,3 \pm 9,8$ de viabilidade celular. Os veículos mais uma vez não demonstram qualquer impacto na viabilidade celular.

Comparativamente aos resultados do fármaco livre, foi demonstrado um impacto muito maior na linha PC-3 quando recorrido ao uso de transportadores, sendo exibido um decréscimo de 30,1 % nas ME e 26,8% nas NE em relação aos valores de viabilidade do fármaco livre na sua concentração de 3 μ M. No entanto, nas linhas DU145 foi observado o mesmo fenômeno que no fármaco livre, não ocorrendo uma diminuição significativa da viabilidade, tanto nas NE como nas ME. Assim, como tinha acontecido com o fármaco livre, a linha PC-3 foi mais sensível ao tratamento, demonstrando as DU145 resultados nulos de decréscimo de viabilidade.

Com o propósito de esclarecer de maneira mais eficaz o efeito inibitório das formulações na linha celular PC-3, procedemos ao cálculo da Concentração Inibitória a 50% (IC₅₀). Este parâmetro desempenha um papel fundamental na pesquisa farmacológica e na avaliação de compostos bioativos. Esse indicador é de extrema importância para a quantificação da potência de um composto na inibição de uma resposta biológica específica, sendo essencial para a identificação das concentrações que resultam em efeitos terapêuticos relevantes. Foi primeiramente realizada o cálculo da percentagem inibida em exposição as diferentes concentrações (100 - % viabilidade).

O modelo demonstrou ser apropriado para o conjunto de dados em estudo, nanoemulsão, microemulsão e fármaco livre. Esta afirmação foi sustentada por coeficientes de determinação (R²) próximos de 1 em todos os grupos estudados, nomeadamente 0,9847, 0,9756 e 0,9944, respetivamente. Este apresentou posteriormente, uma elevada significância estatística, com um valor de $p < 0,001$. Especificamente, a análise estatística da variação entre grupos demonstrou também uma alta significância ao comparar o fármaco livre com as microemulsões, com um valor de $p < 0,001$. No entanto, ao comparar o fármaco livre com as nanoemulsões, observou-se um valor ligeiramente superior. A comparação entre as duas formulações não revelou significância estatística, com um valor de $p = 0,28$.

Os resultados relativos aos valores de IC_{50} para a linha celular PC-3, conforme ilustrado na Figura 28, revelaram uma distinta disparidade entre as três formas de administração do fármaco. O fármaco livre apresentou um IC_{50} mais elevado, registrando 2,9 μM . Em contraste, a nanoemulsão evidenciou uma melhoria na eficácia, com um IC_{50} de 1,3 μM , enquanto a microemulsão se destacou ainda mais, revelando um IC_{50} de apenas 0,9 μM . Esta redução nos valores de IC_{50} indica que tanto a nanoemulsão como a microemulsão foram capazes de inibir o crescimento celular com concentrações mais baixas do fármaco em comparação com a forma livre do fármaco.

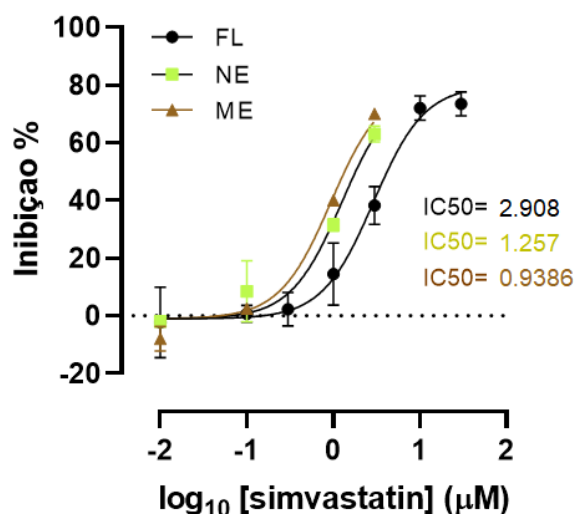


Figura 28: Curvas dose-resposta e respectivos valores de IC_{50} (Concentração Inibitória a 50%) para fármaco livre (FL), nanoemulsão (NE) e microemulsão (ME) na linha celular PC-3.

Os resultados deste estudo têm implicações significativas para a administração de fármacos e a otimização da eficácia terapêutica. A diferença nos valores de IC_{50} entre as formas de administração sugere que a encapsulação do fármaco em nanoemulsões e microemulsões melhora a sua biodisponibilidade celular e eficácia inibitória, sugerindo que a sua encapsulação permite uma otimização da dose farmacêutica.

Foi também atingida uma otimização das concentrações do fármaco que exercem uma inibição máxima da viabilidade das células PC-3, de 3 μM de fármaco em transportador, comparativamente a 10 μM de fármaco livre. Isto é de extrema importância, tendo sido um dos principais objetivos do uso de transportadores, sendo sugerido a nível bibliográfico que a utilização de maiores concentrações de fármaco pode provocar toxicidade celular excessiva, o que pode comprometer os benefícios terapêuticos desejados. Para comprovar um verdadeiro benefício seria, contudo, necessário confirmar que o mesmo aumento de citotoxicidade não se verificaria em células saudáveis, ou que

o fármaco seria direcionado para o tumor, atingindo menores concentrações no tecido muscular onde exerce efeitos tóxicos.

Capítulo 5

Conclusão

Considerando as composições e os diferentes atributos avaliados durante este trabalho, nano e microemulsões neutras de sinvastatina demonstraram-se igualmente promissoras para o tratamento de cancro da próstata. Atributos de qualidade como elevada dosagem e reduzidos tamanho médio de gota e PDI foram comprovados. Foram, por fim, demonstrados efeitos inibitórios do crescimento celular notáveis nas células em estudo, o que sugere a sua eficácia como veículos para administração de fármacos. No entanto, este efeito promissor foi observado exclusivamente na linha PC-3, com valores de viabilidade celular de 31,7 % após tratamento de 72 horas com as microemulsões e 35,2% com as nanoemulsões, a concentrações de 3 μM de sinvastatina. Estes valores demonstraram-se ainda muito menores relativamente ao tratamento de fármaco livre com a mesma concentração, sendo similares valores apenas atingidos a concentrações de 10 μM . Contrariamente, tratamento não demonstrou potencial na linha DU145, continuando as células tumorais a manter valores de viabilidade >85%. A utilização de transportadores permitiu otimizar a dose farmacêutica numa das linhas em estudo, demonstrando efeitos inibitórios substancialmente superiores com apenas 3 μM de sinvastatina. As formulações de veículos utilizadas não mostraram toxicidade significativa, o que reforça sua segurança para aplicações futuras.

Entretanto, são necessários estudos adicionais para compreender melhor diversos aspetos. Uma etapa fundamental nesse sentido seria a melhoria da caracterização das emulsões escolhidas e a potencial otimização dos seus constituintes, com o objetivo de obter um conhecimento mais detalhado das suas propriedades. Especificamente, seria vantajoso um aprofundamento da caracterização de formulações enriquecidas com DL- α -Tocoferol num maior período temporal, tanto a nível de estabilidade química como física, e um melhor entendimento do papel da capacidade antioxidante de este exibe.

Também seria essencial analisar a sua estabilidade a longo prazo, o que proporcionaria *insights* valiosos sobre a viabilidade e eficácia destas formulações em contextos clínicos. Um entendimento mais aprofundado das razões da libertação do fármaco ser incompleta e identificar as possíveis causas por detrás disso. A abordagem com Câmaras de Ussing horizontais, apesar de promissora, exige uma exploração mais detalhada e otimização para atingir a sua melhor eficácia. Por fim, também é essencial, compreender o porque da existência de variabilidade de suscetibilidade entre as linhas celulares em resposta aos

tratamentos e como o é possível ultrapassar. Seria também interessante aprofundar sobre outros potenciais efeitos induzidos pela sinvastatina a nível tumoral, como nos casos de propriedade propriedades pleiotrópicas ou síntese do colesterol, e noutros fenótipos de malignidade como a migração/invasão que são essenciais par a formação de metástases.

Referências

- [1] F. Bray, M. Laversanne, E. Weiderpass, and I. Soerjomataram, “The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide.,” *Cancer*, vol. 127, no. 16, pp. 3029–3030, Aug. 2021, doi: 10.1002/cncr.33587.
- [2] P. H. Gann, “Risk factors for prostate cancer.,” *Rev Urol*, vol. 4 Suppl 5, no. Suppl 5, pp. S3–S10, 2002, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16986064>
- [3] M. Jaiswal, R. Dudhe, and P. K. Sharma, “Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system,” *3 Biotech*, vol. 5, no. 2, pp. 123–127, 2015. doi: 10.1007/s13205-014-0214-0.
- [4] H. Sung *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [5] M. B. B. Culp, I. Soerjomataram, J. A. Efstathiou, F. Bray, and A. Jemal, “Recent Global Patterns in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates,” *European Urology*, vol. 77, no. 1, Elsevier B.V., pp. 38–52, Jan. 01, 2020. doi: 10.1016/j.eururo.2019.08.005.
- [6] M. B. Culp, I. Soerjomataram, J. A. Efstathiou, F. Bray, and A. Jemal, “Recent Global Patterns in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates.,” *Eur Urol*, vol. 77, no. 1, pp. 38–52, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.eururo.2019.08.005.
- [7] L. Tonon *et al.*, “Mutational Profile of Aggressive, Localised Prostate Cancer from African Caribbean Men Versus European Ancestry Men.,” *Eur Urol*, vol. 75, no. 1, pp. 11–15, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.eururo.2018.08.026.
- [8] S. Ishidoya, M. Endoh, H. Nakagawa, S. Saito, and Y. Arai, “Novel Anatomical Findings of the Prostatic Gland and the Surrounding Capsular Structures in the Normal Prostate,” *Tohoku J Exp Med*, vol. 212, no. 1, pp. 55–62, 2007, doi: 10.1620/tjem.212.55.
- [9] R. J. Rebello *et al.*, “Prostate cancer,” *Nat Rev Dis Primers*, vol. 7, no. 1, p. 9, Feb. 2021, doi: 10.1038/s41572-020-00243-0.

- [10] J. R. Keast, "Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in the male rat major pelvic ganglion," *Neuroscience*, vol. 66, no. 3, pp. 655–662, Jun. 1995, doi: 10.1016/0306-4522(94)00595-V.
- [11] J. E. McNeal, E. A. Redwine, F. S. Freiha, and T. A. Stamey, "Zonal Distribution of Prostatic Adenocarcinoma," *Am J Surg Pathol*, vol. 12, no. 12, pp. 897–906, Dec. 1988, doi: 10.1097/00000478-198812000-00001.
- [12] D. S. S. Surasi, B. Chapin, C. Tang, G. Ravizzini, and T. K. Bathala, "Imaging and Management of Prostate Cancer.," *Semin Ultrasound CT MR*, vol. 41, no. 2, pp. 207–221, Apr. 2020, doi: 10.1053/j.sult.2020.02.001.
- [13] J. E. McNeal, "Normal Histology of the Prostate," *Am J Surg Pathol*, vol. 12, no. 8, pp. 619–633, Aug. 1988, doi: 10.1097/00000478-198808000-00003.
- [14] S. W. Fine and R. Mehra, "Anatomy of the Prostate Revisited: Implications for Prostate Biopsy and Zonal Origins of Prostate Cancer," in *Genitourinary Pathology*, New York, NY: Springer New York, 2015, pp. 3–12. doi: 10.1007/978-1-4939-2044-0_1.
- [15] C. G. Roehrborn, "Pathology of benign prostatic hyperplasia," *Int J Impot Res*, vol. 20, no. S3, pp. S11–S18, Dec. 2008, doi: 10.1038/ijir.2008.55.
- [16] J. E. McNeal, "The zonal anatomy of the prostate," *Prostate*, vol. 2, no. 1, pp. 35–49, 1981, doi: 10.1002/pros.2990020105.
- [17] K. L. Lee and D. M. Peehl, "Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia.," *J Urol*, vol. 172, no. 5 Pt 1, pp. 1784–91, Nov. 2004, doi: 10.1097/01.ju.0000133655.71782.14.
- [18] M. M. Shen and C. Abate-Shen, "Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges," *Genes Dev*, vol. 24, no. 18, pp. 1967–2000, Sep. 2010, doi: 10.1101/gad.1965810.
- [19] J. A. Schalken and G. Van Leenders, "Cellular and molecular biology of the prostate: Stem cell biology," *Urology*, vol. 62, no. 5 SUPPL. 1, pp. 11–20, 2003, doi: 10.1016/S0090-4295(03)00758-1.
- [20] P. S. L. Vilamaior, S. R. Taboga, and H. F. Carvalho, "Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic

- transition in the rat ventral prostate after castration.,” *Cell Biol Int*, vol. 29, no. 9, pp. 809–16, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.cellbi.2005.05.006.
- [21] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2018,” *CA Cancer J Clin*, vol. 68, no. 1, pp. 7–30, Jan. 2018, doi: 10.3322/caac.21442.
- [22] L. X. Clegg, F. P. Li, B. F. Hankey, K. Chu, and B. K. Edwards, “Cancer Survival Among US Whites and Minorities,” *Arch Intern Med*, vol. 162, no. 17, p. 1985, Sep. 2002, doi: 10.1001/archinte.162.17.1985.
- [23] N. Hinata and M. Fujisawa, “Racial Differences in Prostate Cancer Characteristics and Cancer-Specific Mortality: An Overview,” *World J Mens Health*, vol. 40, no. 2, p. 217, 2022, doi: 10.5534/wjmh.210070.
- [24] G. D. Steinberg, B. S. Carter, T. H. Beaty, B. Childs, and P. C. Walsh, “Family history and the risk of prostate cancer,” *Prostate*, vol. 17, no. 4, pp. 337–347, 1990, doi: 10.1002/pros.2990170409.
- [25] B. S. Carter, T. H. Beaty, G. D. Steinberg, B. Childs, and P. C. Walsh, “Mendelian inheritance of familial prostate cancer.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 89, no. 8, pp. 3367–3371, Apr. 1992, doi: 10.1073/pnas.89.8.3367.
- [26] P. Tian, M. Zhong, and G.-H. Wei, “Mechanistic insights into genetic susceptibility to prostate cancer.,” *Cancer Lett*, vol. 522, pp. 155–163, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.canlet.2021.09.025.
- [27] G. Sauter *et al.*, “Clinical Utility of Quantitative Gleason Grading in Prostate Biopsies and Prostatectomy Specimens.,” *Eur Urol*, vol. 69, no. 4, pp. 592–598, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.eururo.2015.10.029.
- [28] S. W. Fine *et al.*, “A contemporary update on pathology reporting for prostate cancer: biopsy and radical prostatectomy specimens.,” *Eur Urol*, vol. 62, no. 1, pp. 20–39, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.eururo.2012.02.055.
- [29] B. Delahunt, R. J. Miller, J. R. Srigley, A. J. Evans, and H. Samaratunga, “Gleason grading: past, present and future,” *Histopathology*, vol. 60, no. 1, pp. 75–86, Jan. 2012, doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04003.x.
- [30] S. M. Telloni, “Tumor Staging and Grading: A Primer.,” *Methods Mol Biol*, vol. 1606, pp. 1–17, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6990-6_1.

- [31] P. M. Pierorazio, P. C. Walsh, A. W. Partin, and J. I. Epstein, "Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system.," *BJU Int*, vol. 111, no. 5, pp. 753–60, May 2013, doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11611.x.
- [32] R. F. Matshela, J. E. Maree, and C. van Belkum, "Prevention and Detection of Prostate Cancer," *Cancer Nurs*, vol. 37, no. 3, pp. 189–197, May 2014, doi: 10.1097/NCC.obo13e31829194d2.
- [33] N. Altwaijry *et al.*, "Regression of prostate tumors after intravenous administration of lactoferrin-bearing polypropylenimine dendriplexes encoding TNF- α , TRAIL, and interleukin-12," *Drug Deliv*, vol. 25, no. 1, pp. 679–689, Jan. 2018, doi: 10.1080/10717544.2018.1440666.
- [34] M. Adhyam and A. K. Gupta, "A Review on the Clinical Utility of PSA in Cancer Prostate," *Indian J Surg Oncol*, vol. 3, no. 2, pp. 120–129, Jun. 2012, doi: 10.1007/s13193-012-0142-6.
- [35] T. Lok Tio, "The TNM staging system," *Gastrointest Endosc*, vol. 43, no. 2, pp. S19–S24, Jan. 1996, doi: 10.1016/S0016-5107(96)81509-4.
- [36] A. Heidenreich *et al.*, "EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent—Update 2013," *Eur Urol*, vol. 65, no. 1, pp. 124–137, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.eururo.2013.09.046.
- [37] E. M. Schaeffer *et al.*, "NCCN Guidelines® Insights: Prostate Cancer, Version 1.2023.," *J Natl Compr Canc Netw*, vol. 20, no. 12, pp. 1288–1298, Dec. 2022, doi: 10.6004/jnccn.2022.0063.
- [38] "EAU - EANM - ESTRO - ESUR - ISUP - SIOG Guidelines on Prostate Cancer", Accessed: Aug. 16, 2023. [Online]. Available: : <http://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/>
- [39] J. L. Mohler *et al.*, "Prostate Cancer, Version 1.2016," *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, vol. 14, no. 1, pp. 19–30, Jan. 2016, doi: 10.6004/jnccn.2016.0004.
- [40] C. P. Filson, L. S. Marks, and M. S. Litwin, "Expectant management for men with early stage prostate cancer," *CA Cancer J Clin*, vol. 65, no. 4, pp. 264–282, Jul. 2015, doi: 10.3322/caac.21278.

- [41] P. C. WALSH, “RADICAL PROSTATECTOMY FOR LOCALIZED PROSTATE CANCER PROVIDES DURABLE CANCER CONTROL WITH EXCELLENT QUALITY OF LIFE: A STRUCTURED DEBATE,” *Journal of Urology*, vol. 163, no. 6, pp. 1802–1807, Jun. 2000, doi: 10.1016/S0022-5347(05)67547-7.
- [42] S. H. Culp, P. F. Schellhammer, and M. B. Williams, “Might men diagnosed with metastatic prostate cancer benefit from definitive treatment of the primary tumor? A SEER-based study.,” *Eur Urol*, vol. 65, no. 6, pp. 1058–66, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.eururo.2013.11.012.
- [43] C. Chargari *et al.*, “Brachytherapy: An overview for clinicians,” *CA Cancer J Clin*, vol. 69, no. 5, pp. 386–401, Sep. 2019, doi: 10.3322/caac.21578.
- [44] J.-M. Hannoun-Lévi, “Brachytherapy for prostate cancer: Present and future.,” *Cancer Radiother*, vol. 21, no. 6–7, pp. 469–472, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.canrad.2017.06.009.
- [45] M. Sekhoacha, K. Riet, P. Motloun, L. Gumenku, A. Adegoke, and S. Mashele, “Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches.,” *Molecules*, vol. 27, no. 17, p. 5730, Sep. 2022, doi: 10.3390/molecules27175730.
- [46] V. V. Veselov, A. E. Nosyrev, L. Jicsinszky, R. N. Alyautdin, and G. Cravotto, “Targeted Delivery Methods for Anticancer Drugs,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 3, p. 622, Jan. 2022, doi: 10.3390/cancers14030622.
- [47] P. Nygren and SBU-group. Swedish Council on Technology Assessment in Health Care, “What is cancer chemotherapy?,” *Acta Oncol*, vol. 40, no. 2–3, pp. 166–74, Jan. 2001, doi: 10.1080/02841860151116204.
- [48] K. Nurgali, R. T. Jagoe, and R. Abalo, “Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae?,” *Front Pharmacol*, vol. 9, no. MAR, Mar. 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00245.
- [49] E. D. Crawford, C. S. Higano, N. D. Shore, M. Hussain, and D. P. Petrylak, “Treating Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer: A Comprehensive Review of Available Therapies.,” *J Urol*, vol. 194, no. 6, pp. 1537–47, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.juro.2015.06.106.

- [50] D. R. Miller, M. A. Ingersoll, B. A. Teply, and M.-F. Lin, "Targeting treatment options for castration-resistant prostate cancer.," *Am J Clin Exp Urol*, vol. 9, no. 1, pp. 101–120, 2021, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33816699>
- [51] J. G. Robinson, "Simvastatin: present and future perspectives.," *Expert Opin Pharmacother*, vol. 8, no. 13, pp. 2159–27, Sep. 2007, doi: 10.1517/14656566.8.13.2159.
- [52] C. Stancu and A. Sima, "Statins: mechanism of action and effects," *J Cell Mol Med*, vol. 5, no. 4, pp. 378–387, Oct. 2001, doi: 10.1111/j.1582-4934.2001.tb00172.x.
- [53] A. Corsini, S. Bellosta, R. Baetta, R. Fumagalli, R. Paoletti, and F. Bernini, "New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins," 1999.
- [54] R. Aravindan, T. Viruthagiri, A. Seenivasan, and S. Subhagar, "Microbial production and biomedical applications of lovastatin," *Indian J Pharm Sci*, vol. 70, no. 6, p. 701, 2008, doi: 10.4103/0250-474X.49087.
- [55] I. B. Skottheim, A. Gedde-Dahl, S. Hejazifar, K. Hoel, and A. Åsberg, "Statin induced myotoxicity: The lactone forms are more potent than the acid forms in human skeletal muscle cells in vitro," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 33, no. 4–5, pp. 317–325, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.ejps.2007.12.009.
- [56] M. Bove, F. Fogacci, and A. F. G. Cicero, "Pharmacokinetic drug evaluation of ezetimibe + simvastatin for the treatment of hypercholesterolemia.," *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, vol. 13, no. 10, pp. 1099–1104, Oct. 2017, doi: 10.1080/17425255.2017.1381085.
- [57] T. Prueksaritanont *et al.*, "Glucuronidation of Statins in Animals and Humans: A Novel Mechanism of Statin Lactonization," *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 30, no. 5, pp. 505–512, May 2002, doi: 10.1124/dmd.30.5.505.
- [58] C. R. Sirtori, "The pharmacology of statins.," *Pharmacol Res*, vol. 88, pp. 3–11, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.phrs.2014.03.002.
- [59] E. Climent, D. Benaiges, and J. Pedro-Botet, "Hydrophilic or Lipophilic Statins?," *Front Cardiovasc Med*, vol. 8, May 2021, doi: 10.3389/fcvm.2021.687585.

- [60] D. C. Hess and S. C. Fagan, “Pharmacology and clinical experience with simvastatin,” *Expert Opin Pharmacother*, vol. 2, no. 1, pp. 153–163, Jan. 2001, doi: 10.1517/14656566.2.1.153.
- [61] N. N. Pavlova and C. B. Thompson, “The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism.,” *Cell Metab*, vol. 23, no. 1, pp. 27–47, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.cmet.2015.12.006.
- [62] J. Zhu and C. B. Thompson, “Metabolic regulation of cell growth and proliferation,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 20, no. 7, pp. 436–450, Jul. 2019, doi: 10.1038/s41580-019-0123-5.
- [63] N. Zaidi, L. Lupien, N. B. Kuemmerle, W. B. Kinlaw, J. V Swinnen, and K. Smans, “Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids.,” *Prog Lipid Res*, vol. 52, no. 4, pp. 585–9, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.plipres.2013.08.005.
- [64] G. Garg *et al.*, “Targeted metabolomic profiling of low and high grade serous epithelial ovarian cancer tissues: a pilot study.,” *Metabolomics*, vol. 14, no. 12, p. 154, Nov. 2018, doi: 10.1007/s11306-018-1448-3.
- [65] J. K. Liao, “Clinical implications for statin pleiotropy,” *Curr Opin Lipidol*, vol. 16, no. 6, pp. 624–629, Dec. 2005, doi: 10.1097/01.mol.0000191913.16321.60.
- [66] A. Jeong, K. F. Suazo, W. G. Wood, M. D. Distefano, and L. Li, “Isoprenoids and protein prenylation: implications in the pathogenesis and therapeutic intervention of Alzheimer’s disease.,” *Crit Rev Biochem Mol Biol*, vol. 53, no. 3, pp. 279–310, Jun. 2018, doi: 10.1080/10409238.2018.1458070.
- [67] D. Bar-Sagi and A. Hall, “Ras and Rho GTPases,” *Cell*, vol. 103, no. 2, pp. 227–238, Oct. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)00115-X.
- [68] Z. Cao *et al.*, “Association Between Statin Exposure and Incidence and Prognosis of Prostate Cancer,” *Am J Clin Oncol*, vol. 46, no. 7, pp. 323–334, Jul. 2023, doi: 10.1097/COC.0000000000001012.
- [69] J. Longo *et al.*, “A pilot window-of-opportunity study of preoperative fluvastatin in localized prostate cancer.,” *Prostate Cancer Prostatic Dis*, vol. 23, no. 4, pp. 630–637, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41391-020-0221-7.

- [70] M. Kafka, R. Gruber, H. Neuwirt, M. Ladurner, and I. E. Eder, “Long-Term Treatment with Simvastatin Leads to Reduced Migration Capacity of Prostate Cancer Cells,” *Biomedicines*, vol. 11, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.3390/biomedicines11010029.
- [71] G. Murtaza, “Solubility enhancement of simvastatin: a review.,” *Acta Pol Pharm*, vol. 69, no. 4, pp. 581–90, 2012, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22876598>
- [72] E. Rinaki, G. Valsami, and P. Macheras, “Quantitative Biopharmaceutics Classification System: The Central Role of Dose/Solubility Ratio,” 2003.
- [73] C. I. Barbalata, L. R. Tefas, M. Achim, I. Tomuta, and A. S. Porfire, “Statins in risk-reduction and treatment of cancer,” *World J Clin Oncol*, vol. 11, no. 8, pp. 573–588, Aug. 2020, doi: 10.5306/wjco.v11.i8.573.
- [74] T. R. Pedersen and J. A. Tobert, “Simvastatin: a review,” *Expert Opin Pharmacother*, vol. 5, no. 12, pp. 2583–2596, Dec. 2004, doi: 10.1517/14656566.5.12.2583.
- [75] C. R. Sirtori, “The pharmacology of statins,” *Pharmacol Res*, vol. 88, pp. 3–11, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.phrs.2014.03.002.
- [76] M. Schachter, “Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update.,” *Fundam Clin Pharmacol*, vol. 19, no. 1, pp. 117–25, Feb. 2005, doi: 10.1111/j.1472-8206.2004.00299.x.
- [77] S. Tamilvanan, “Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems,” *Prog Lipid Res*, vol. 43, no. 6, pp. 489–533, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.plipres.2004.09.001.
- [78] M. Li, D. J. McClements, X. Liu, and F. Liu, “Design principles of oil-in-water emulsions with functionalized interfaces: Mixed, multilayer, and covalent complex structures,” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 19, no. 6. Blackwell Publishing Inc., pp. 3159–3190, Nov. 01, 2020. doi: 10.1111/1541-4337.12622.
- [79] T. Ichikawa, “Electrical demulsification of oil-in-water emulsion,” *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 302, no. 1–3, pp. 581–586, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.colsurfa.2007.03.036.

- [80] D. J. McClements, “Enhanced delivery of lipophilic bioactives using emulsions: a review of major factors affecting vitamin, nutraceutical, and lipid bioaccessibility,” *Food Funct*, vol. 9, no. 1, pp. 22–41, Jan. 2018, doi: 10.1039/C7FO01515A.
- [81] G. Colucci, A. Santamaria-Echart, S. C. Silva, I. P. M. Fernandes, C. C. Sipoli, and M. F. Barreiro, “Development of Water-in-Oil Emulsions as Delivery Vehicles and Testing with a Natural Antimicrobial Extract.,” *Molecules*, vol. 25, no. 9, Apr. 2020, doi: 10.3390/molecules25092105.
- [82] G. Tartaro, H. Mateos, D. Schirone, R. Angelico, and G. Palazzo, “Microemulsion Microstructure(s): A Tutorial Review,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 9, p. 1657, Aug. 2020, doi: 10.3390/nano10091657.
- [83] D. J. McClements, “Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities,” *Soft Matter*, vol. 8, no. 6, pp. 1719–1729, Feb. 14, 2012. doi: 10.1039/c2sm06903b.
- [84] M. Kahlweit, “Microemulsions,” *Science (1979)*, vol. 240, no. 4852, pp. 617–621, Apr. 1988, doi: 10.1126/science.240.4852.617.
- [85] I. Danielsson and B. Lindman, “The definition of microemulsion,” *Colloids and Surfaces*, vol. 3, no. 4, pp. 391–392, Dec. 1981, doi: 10.1016/0166-6622(81)80064-9.
- [86] A. Froelich, T. Osmałek, B. Jadach, V. Puri, and B. Michniak-Kohn, “Microemulsion-based media in nose-to-brain drug delivery,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 2, MDPI AG, pp. 1–37, Feb. 01, 2021. doi: 10.3390/pharmaceutics13020201.
- [87] W. J. Xia and H. Onyuksel, “Mechanistic studies on surfactant-induced membrane permeability enhancement.,” *Pharm Res*, vol. 17, no. 5, pp. 612–8, May 2000, doi: 10.1023/a:1007581202873.
- [88] A. K. Sharma, T. Garg, A. K. Goyal, and G. Rath, “Role of microemulsions in advanced drug delivery,” *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 44, no. 4, pp. 1–9, Feb. 2015, doi: 10.3109/21691401.2015.1012261.
- [89] M. Bonferoni *et al.*, “Nanoemulsions for ‘Nose-to-Brain’ Drug Delivery,” *Pharmaceutics*, vol. 11, no. 2, p. 84, Feb. 2019, doi: 10.3390/pharmaceutics11020084.

- [90] N. Anton, J.-P. Benoit, and P. Saulnier, "Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review," *Journal of Controlled Release*, vol. 128, no. 3, pp. 185–199, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.jconrel.2008.02.007.
- [91] A. Gupta, H. B. Eral, T. A. Hatton, and P. S. Doyle, "Nanoemulsions: formation, properties and applications," *Soft Matter*, vol. 12, no. 11, pp. 2826–2841, 2016, doi: 10.1039/C5SM02958A.
- [92] F. Garavand, M. Jalai-Jivan, E. Assadpour, and S. M. Jafari, "Encapsulation of phenolic compounds within nano/microemulsion systems: A review," *Food Chem*, vol. 364, p. 130376, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130376.
- [93] C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, and M. J. Garcia-Celma, "Nano-emulsions," *Curr Opin Colloid Interface Sci*, vol. 10, no. 3–4, pp. 102–110, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.cocis.2005.06.004.
- [94] C. Solans and I. Solé, "Nano-emulsions: Formation by low-energy methods," *Curr Opin Colloid Interface Sci*, vol. 17, no. 5, pp. 246–254, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.cocis.2012.07.003.
- [95] I. Solè, A. Maestro, C. González, C. Solans, and J. M. Gutiérrez, "Optimization of nano-emulsion preparation by low-energy methods in an ionic surfactant system," *Langmuir*, vol. 22, no. 20, pp. 8326–8332, Sep. 2006, doi: 10.1021/la0613676.
- [96] M. Kumar, R. S. Bishnoi, A. K. Shukla, and C. P. Jain, "Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review," *Prev Nutr Food Sci*, vol. 24, no. 3, pp. 225–234, Sep. 2019, doi: 10.3746/pnf.2019.24.3.225.
- [97] C.-K. Kim, Y.-J. Cho, and Z.-G. Gao, "Preparation and evaluation of biphenyl dimethyl dicarboxylate microemulsions for oral delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 70, no. 1–2, pp. 149–155, Jan. 2001, doi: 10.1016/S0168-3659(00)00343-6.
- [98] M. Zare *et al.*, "Resazurin reduction assay, a useful tool for assessment of heavy metal toxicity in acidic conditions," *Environ Monit Assess*, vol. 187, no. 5, p. 276, May 2015, doi: 10.1007/s10661-015-4392-y.

- [99] R. T. Pace and K. J. L. Burg, "Toxic effects of resazurin on cell cultures," *Cytotechnology*, vol. 67, no. 1, pp. 13–17, Jan. 2015, doi: 10.1007/s10616-013-9664-1.
- [100] X. Gong, Z. Liang, Y. Yang, H. Liu, J. Ji, and Y. Fan, "A resazurin-based, nondestructive assay for monitoring cell proliferation during a scaffold-based 3D culture process," *Regen Biomater*, vol. 7, no. 3, pp. 271–281, Jun. 2020, doi: 10.1093/rb/rbaa002.
- [101] D. Shum *et al.*, "A high density assay format for the detection of novel cytotoxic agents in large chemical libraries," *J Enzyme Inhib Med Chem*, vol. 23, no. 6, pp. 931–945, Jan. 2008, doi: 10.1080/14756360701810082.
- [102] S. E. Harding and K. Jumel, "Light Scattering," *Curr Protoc Protein Sci*, vol. 11, no. 1, p. Unit 7.8, Feb. 1998, doi: 10.1002/0471140864.ps0708s11.
- [103] J. Stetefeld, S. A. McKenna, and T. R. Patel, "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences.," *Biophys Rev*, vol. 8, no. 4, pp. 409–427, Dec. 2016, doi: 10.1007/s12551-016-0218-6.
- [104] J. R. J. P. (1), and M. S. (2) Jacqueline M. R. B61anger (1), "High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles and Applications."
- [105] B. Nikolin, B. Imamović, S. Medanhodžić-Vuk, and M. Sober, "High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses.," *Bosn J Basic Med Sci*, vol. 4, no. 2, pp. 5–9, May 2004, doi: 10.17305/bjbms.2004.3405.
- [106] S. Ashour, S. Ashour, and S. Omar, "New Validated Analytical Method for Determination of Simvastatin in Tablet Formulations by RP–HPLC," *Drug and Drug Abuse*, pp. 1–8, Jul. 2020, doi: 10.31487/j.dda.2010.01.02.
- [107] L. L. Clarke, "A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine," *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 296, no. 6, pp. G1151–G1166, Jun. 2009, doi: 10.1152/ajpgi.90649.2008.
- [108] G. Boudry, "The Ussing chamber technique to evaluate alternatives to in-feed antibiotics for young pigs," in *Animal Research*, May 2005, pp. 219–230. doi: 10.1051/animres:2005014.

- [109] F. G. Sousa, “Intranasal administration of Simvastatin for Neuroprotection Development of Micro and Nanoemulsions for Intranasal Delivery of Simvastatin in Ischemic Stroke Versão final após defesa.”
- [110] S. Meirinho, M. Rodrigues, A. O. Santos, A. Falcão, and G. Alves, “Intranasal Microemulsion as an Innovative and Promising Alternative to the Oral Route in Improving Stiripentol Brain Targeting,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 6, Jun. 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15061641.
- [111] S. Meirinho, M. Rodrigues, A. O. Santos, A. Falcão, and G. Alves, “Nose-to-brain delivery of perampanel formulated in a self-microemulsifying drug delivery system improves anticonvulsant and anxiolytic activity in mice,” *Int J Pharm*, vol. 642, p. 123145, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.ijpharm.2023.123145.
- [112] S. Meirinho *et al.*, “Intranasal delivery of lipid-based nanosystems as a promising approach for brain targeting of the new-generation antiepileptic drug perampanel,” *Int J Pharm*, vol. 622, p. 121853, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121853.
- [113] E. Medicines Agency, “2** Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on bioanalytical method validation,” 1922. [Online]. Available: www.ema.europa.eu/contact
- [114] Fda, Cder, Beers, and Donald, “Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry,” 2015. [Online]. Available: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> and <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>
- [115] A. Hoque, H. Chen, and X. C. Xu, “Statin induces apoptosis and cell growth arrest in prostate cancer cells,” *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 17, no. 1, pp. 88–94, Jan. 2008, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0531.
- [116] C. Da Saúde, M. C. Fernandes, C. Farmacêuticas, O. : Doutora, and A. O. Santos, “Desenvolvimento de uma emulsão O/A de simvastatina para administração intranasal.”
- [117] S. K. Vignesh Kumar, P. Renuka Devi, S. Harish, and E. Hemananthan, “Synthesis and characterisation of PEG modified chitosan nanocapsules loaded with

- thymoquinone,” *IET Nanobiotechnol*, vol. 11, no. 1, pp. 104–112, Feb. 2017, doi: 10.1049/iet-nbt.2016.0055.
- [118] P. C. Pires *et al.*, “Innovative Aqueous Nanoemulsion Prepared by Phase Inversion Emulsification with Exceptional Homogeneity,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 7, p. 1878, Jul. 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15071878.
- [119] T. Tarvainen *et al.*, “Drug release from a porous ion-exchange membrane in vitro,” *Biomaterials*, vol. 20, no. 22, pp. 2177–2183, Nov. 1999, doi: 10.1016/S0142-9612(99)00122-2.
- [120] W. I. Higuchi and J. Misra, “Physical Degradation of Emulsions Via the Molecular Diffusion Route and the Possible Prevention Thereof,” *J Pharm Sci*, vol. 51, no. 5, pp. 459–466, May 1962, doi: 10.1002/jps.2600510514.
- [121] A. M. Carmona-Ribeiro, “Cationic Nanostructures for Vaccines,” in *Immune Response Activation*, InTech, 2014. doi: 10.5772/57543.
- [122] S. M. Sahafi, S. A. H. Goli, M. Kadivar, J. Varshosaz, and A. Shirvani, “Pomegranate seed oil nanoemulsion enriched by α -tocopherol; the effect of environmental stresses and long-term storage on its physicochemical properties and oxidation stability,” *Food Chem*, vol. 345, May 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128759.
- [123] “ICH Topic Q 1 E Evaluation of Stability Data Step 5 NOTE FOR GUIDANCE ON EVALUATION OF STABILITY DATA,” 2003.
- [124] A. Maldonado, N. Riquelme, O. Muñoz-Fariña, O. García, and C. Arancibia, “Stability and bioaccessibility of α -tocopherol-enriched nanoemulsions containing different edible oils as carriers,” *LWT*, vol. 174, p. 114419, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.lwt.2022.114419.

Anexos

A1- Classificação do estágio clínico. Adaptado [31].

T- Tumor Primário

TX: Tumor não pode ser avaliado

T0: Sem evidência de tumor primário

T1 - Tumor clinicamente imperceptível

T1a - Tumor em 5% ou menos do tecido ressecado

T1 - Tumor em mais do que 5% do tecido

T1c - Tumor identificado por biópsia com agulha

T2 - Tumor limitado à próstata

T2a - Tumor afeta até metade de um lóbulo.

T2b - Tumor afeta mais de metade de um dos lóbulos

T2c - Tumor afeta ambos os lóbulos

N- Gânglios linfáticos regionais

N0 - Sem metástases nos gânglios linfáticos regionais

N1 - Metástases nos gânglios linfáticos regionais

M-Metástases à Distância

N- Gânglios linfáticos regionais

N0 - Sem metástases nos gânglios linfáticos regionais

N1 - Metástases nos gânglios linfáticos regionais

M-Metástases à Distância

MX - Metástases à distância não avaliáveis

M0 - Sem metástases à distância

M1 - Metástase à distância

M1a - Gânglio(s) linfático(s) não regional

M1b - Osso(s)

M1c - Outra(s) localizações

A2- Agrupamento de estágios do American Joint Committee on Cancer (AJCC) (edição de 2010)

Estágio	T	N	M	PSA (ng/mL)	Gleason Score
I	T1a-c	No	Mo	<10	≤ 6
	T2a	No	Mo	<10	≤ 6
	T1-2a	No	Mo	X	X
	T1a-c	No	Mo	<20	7
	T1a-c	No	Mo	≥ 10 e <20	≤ 6
IIa	T2a	No	Mo	<20	7
	T2b	No	Mo	<20	≤ 7
	T2b	No	Mo	X	X
	T2c	No	Mo	Qualquer PSA	Qualquer
IIb	T1-2	No	Mo	≥ 20	Qualquer
	T1-2	No	Mo	Qualquer PSA	≥ 8
III	T3a-b	No	Mo	Qualquer PSA	Qualquer
IV	T4	No	Mo	Qualquer PSA	Qualquer
	Qualquer T	N1	Mo	Qualquer PSA	Qualquer
	Qualquer T	Qualquer N	M1	Qualquer PSA	Qualquer