

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SÁVIA CALDEIRA DE ARAÚJO LOPES

**LIPOSSOMAS CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO: DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE**

**Belo Horizonte
2014**

SÁVIA CALDEIRA DE ARAÚJO LOPES

**LIPOSSOMAS CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO: DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira

**Belo Horizonte
2014**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

UFMG

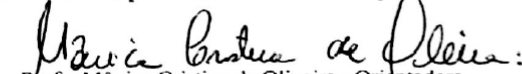
FOLHA DE APROVAÇÃO

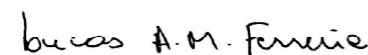
**LIPOSSOMAS CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO: DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE**

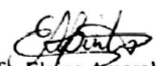
SÁVIA CALDEIRA DE ARAÚJO LOPES

Tese submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 14 de agosto de 2014, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Mônica Cristina de Oliveira - Orientadora
UFMG


Prof. Lucas Antônio Miranda Ferreira
UFMG


Prof. Elaine Amaral Leite
UFMG


Prof. Frederic Jean Georges Frezard
UFMG


Prof. Ricardo Bentes de Azevedo
UnB


Prof. Leide Passos Cavalcanti
Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

Belo Horizonte, 14 de agosto de 2014.

COLABORADORES

- Professor Dr. Fernão de Castro Braga – Laboratório de Fitoquímica - Departamento de Produtos Farmacêuticos – Faculdade de Farmácia – UFMG;
- Professor Dr. Ângelo Malachias – Departamento de Física – Instituto de Ciências Exatas - UFMG;
- Professor Dr. Rogério Magalhães Paniago – Departamento de Física – Instituto de Ciências Exatas - UFMG;
- Dra. Cláudia Salviano Teixeira – Laboratório de Pesquisa em Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia - UFMG;
- Dr. Márcio Tadeu Pereira – Laboratório de Irradiação Gama, Centro para Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear - Comissão Nacional de Energia Nuclear (CDTN-CNEN, Brasil).

Dedico esta tese a meus pais, meu marido, minha irmã e meu cunhado que sempre estiveram a meu lado tornando a realização deste sonho possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a graça e a força para persistir, mesmo em meio a tantos desafios e dificuldades, e conseguir alcançar a concretização deste trabalho.

Aos meus pais, Cícero e Marília, agradeço pela presença, pelo amor incondicional, pelas palavras de esperança e incentivo. Pelas orações que sempre me fortaceleram e me fizeram acreditar que tudo é possível quando confiamos na graça de Deus.

Ao meu marido Rafael, presente de Deus em minha vida, que sempre me compreendeu, me incentivou e esteve ao meu lado em todos os momentos. Obrigada pelo amor, confiança e paciência.

À minha querida irmã Flavinha e ao meu cunhado Sylvio, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e acreditando em mim. E agora, agradeço também à minha amada sobrinha Laura, pela alegria que já traz à nossa família neste momento especial.

À minha amada vó Lia, pelas orações, pelo amor e cuidado sempre recheados de deliciosas receitas que tornaram a caminhada mais doce.

À minha amada madrinha Irlanda agradeço por ter sido tão importante e tão inesquecível em toda minha vida. Saudades eternas..

À família do Rafael, que também considero como minha família, por me acolher sempre com tanto amor e carinho.

À Dona Maria e à Penha, pelo carinho conosco.

A todos os meus familiares: tios, tias, primos, primas pela força e incentivo.

Aos amigos das células Ágape e Unidos na Fé, da Paróquia Nossa Senhora Rainha, pela amizade e pelas orações que muito me fortaceleram.

À Professora Mônica, agradeço pela excelente orientação em mais este trabalho. Agradeço a oportunidade de imenso aprendizado científico e pessoal. É difícil expressar toda a admiração, consideração e respeito que tenho por ela, grande exemplo de competência, honestidade e profissionalismo. Obrigada pela confiança, paciência, incentivo e amizade.

Ao Professor Lucas, pelas contribuições científicas e pela amizade.

Ao Professor Fernão, agradeço pela competência e disponibilidade.

À Dra. Cláudia Salviano, pela amizade e pela imensa contribuição científica.

Ao Marcus Vinícius, por sua dedicação e competência.

Ao Professor Gilson, pelo apoio e amizade.

Aos Professores Rogério Paniago e Ângelo Malachias, pela grande contribuição na realização dos experimentos no LNLS.

Ao Dr. Mateus Cardoso, pela colaboração durante os experimentos no LNLS.

Ao Dr. Márcio Tadeu, por disponibilizar o laboratório de irradiação gama (CDTN) para os experimentos de esterilização.

Ao Guilherme Carneiro pela amizade e pelos grandes ensinamentos.

Aos amigos da Faculdade de Farmácia da UFMG, principalmente àqueles que trabalharam no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, de 2010 a 2014, pela amizade. Agradeço especialmente à Ana Luiza, Arianne, Bruno, Carol, Daniel, Danielle, Délia, Diêgo, Eduardo, Elaine, Elton, Flávia, Flaviana, Gabriela, Gisele, Guilherme, Juçara, Juliana, Linna, Liziane, Marcus Vinícius, Mariana, Marina, Martinha, Samuel, Talita e Valquíria pelo convívio e aprendizado.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro.

“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade.”

Santo Agostinho

RESUMO

O ácido triterpênico denominado ursólico (AU), tem demonstrado ação antitumoral em diversas linhagens de células tumorais, *in vitro*. Entretanto, AU apresenta-se muito pouco solúvel em meio aquoso, o que representa uma barreira ao seu emprego como fármaco devido às limitações farmacocinéticas relacionadas à administração e biodisponibilidade desse composto em meio biológico. Frente à esta limitação de solubilidade do AU, em meio aquoso, o emprego de lipossomas apresenta-se como uma estratégia promissora para veicular esta substância e possibilitar a administração intravenosa da mesma. Desta forma, a proposta do presente estudo consistiu no desenvolvimento, caracterização química, físico-química, morfológica e avaliação da estabilidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada como carreadores para o ácido ursólico (SpHL-AU), bem como a execução de estudos, *in vitro*, para avaliação da ação citotóxica desses nanossistemas. Os resultados do presente estudo demonstraram que os SpHL-AU apresentaram adequadas propriedades químicas e físico-químicas incluindo diâmetro médio de $191,1 \pm 6,4$ nm, potencial zeta igual a $1,2 \pm 1,4$ mV e teor de encapsulação de AU igual a $0,77 \pm 0,01$ mg/mL. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para os SpHL-AU permitiram a visualização de vesículas multilamelares com predomínio de vesículas de diâmetros inferiores a 100 nm. Além disso, SpHL-AU apresentaram estabilidade em termos de diâmetro médio, potencial zeta e teor de encapsulação de AU após armazenamento por 1 ano à 4 °C. Os estudos de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e de espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS), em condições de baixa hidratação, evidenciaram a ocorrência de interação de AU com a bicamada lipídica sem comprometimento das transições de fase do lípide estrutural dos SpHL-AU, a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), frente às mudanças de temperatura. Estudos de SAXS, em condições de maior hidratação, revelaram que a interação de AU com a membrana lipídica dos lipossomas resulta em maior estabilização na fase lamelar, dificultando assim a ocorrência de transição de fase lamelar da DOPE para a fase hexagonal frente à redução do pH. Observou-se também que AU promoveu maior estabilização da bicamada lipídica frente às interações com os componentes do meio biológico, o que

pode representar um benefício visto que a formulação estará sujeita a menor alteração na circulação sanguínea. Avaliou-se também os efeitos dos SpHL-AU na viabilidade de linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231) e de próstata (LNCaP) e os resultados demonstraram que após 48h o tratamento proposto promoveu a inibição da proliferação celular. Esses resultados sugerem que SpHL-AU podem representar uma alternativa promissora para administração intravenosa de AU no tratamento do câncer.

Palavras-chave: câncer, ácido ursólico, lipossomas, estabilidade, calorimetria exploratória diferencial, espalhamento de raios-x a baixo ângulo, citotoxicidade.

ABSTRACT

Ursolic acid (UA) is a triterpene that has been shown significant antitumor activity. However, UA presents a low solubility in aqueous medium, which presents a barrier to its biological applications due to pharmacokinetic limitations related to the administration and bioavailability. The use of liposomes presents a promising strategy to overcome this inconvenience. Thereby, the aims of this work were the development, physicochemical characterization and evaluation of the stability of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing ursolic acid (SpHL-UA), as well as the investigation of their cytotoxicity. The results of this study showed that the SpHL-UA presented adequate properties including a mean diameter of 191.1 ± 6.4 nm, a zeta potential of 1.2 ± 1.4 mV, and an amount of UA entrapped equal to 0.77 ± 0.01 mg/mL. The images of SpHL-UA obtained by TEM showed vesicles of varying diameters, but with a predominance of vesicle sizes of less than 100 nm. Moreover, this formulation showed a good stability after storage at 4 °C for 1 year. Studies of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Small Angle X-ray Scattering (SAXS), under low hydration conditions, revealed interactions between UA and the lipid bilayer without compromising the phase transitions of the structural lipid of SpHL-UA, dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE). SAXS studies, under higher hydration conditions, revealed that the UA interaction with the lipid membrane of the liposomes resulted in an increased stability at the lamellar phase, thus hindering the occurrence of the lamellar to hexagonal phase transition under conditions of low pH. It was also observed that UA promoted greater stabilization of the lipid bilayer toward interactions with components of the biological medium which may represent an advantage, since the formulation would suffer minor changes in the bloodstream. The viability studies on breast (MDA-MB-231) and prostate (LNCaP) cancer cell lines demonstrated that, after 48h, SpHL-UA treatment significantly inhibited cancer cell proliferation. These results suggest that SpHL-UA may represent a promising alternative to intravenous administration of UA in cancer treatment.

Key-words: cancer, ursolic acid, liposomes, stability, differential scanning calorimetry, small angle x-ray scattering, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura química do ácido ursólico (AU).....	30
2	Diagrama esquemático do direcionamento e extravasamento de nanossistemas a partir de vasos sanguíneos para a região tumoral.....	37
3	Organização estrutural dos lipossomas convencionais	40
4	Classificação de lipossomas de acordo com o diâmetro médio e número de bicamadas	41
5	Representação esquemática do efeito da modificação de superfície de nanopartículas pela incorporação de PEG na adsorção de proteínas plasmáticas e na biodistribuição	44
6	Representação esquemática da organização estrutural da DOPE na ausência e na presença de CHEMS e das modificações de fase desencadeadas pelo pH	47
7	Mecanismos propostos para a liberação intracitoplasmática do material incorporado aos lipossomas pH-sensíveis	48
8	Estruturas químicas de CHEMS (1), DOPE (2) e DSPE-mPEG₂₀₀₀ (3).....	49
9	Fases de agregação dos lípides em meio aquoso.....	55
10	Representação esquemática do empacotamento molecular das fases lamelar (A), hexagonal invertida (B) e cúbica invertida (C)	59
11	Esquema geral de preparo de SpHL-AU pelo método de Bangham.....	72
12	Esquema para determinação do teor de encapsulação de AU nos SpHL-AU.....	73
13	Reação de redução do MTT a cristais azuis de formazan pela redutase mitocondrial de células viáveis	74
14	Sobreposição de perfis cromatográficos obtidos para solução de AU padrão (verde) e lipossomas brancos (vermelho)	76
15	Curva de calibração para o doseamento de AU obtida pelo método de CLAE	77
16	Fotomicrografias obtidas por MET para SpHL-20AU1 em diferentes campos (A e B)	85
17	Estação experimental D1B-SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron	91
18	Curva de DSC da DOPE + tampão PBS pH 7,4	93
19	Difratogramas da mistura DOPE + tampão PBS obtidos em diferentes temperaturas.....	94
20	Curva de DSC do CHEMS	95
21	Curva de DSC da DOPE + CHEMS + tampão PBS pH 7,4.....	97
22	Difratogramas da mistura DOPE + CHEMS + tampão PBS obtidos em diferentes temperaturas	98
23	Curva de DSC do DSPE-mPEG₂₀₀₀	99
24	Curva de DSC da DOPE + CHEMS + DSPE-mPEG₂₀₀₀ + tampão PBS pH 7,4	100

25	Difratogramas da mistura DOPE + CHEMS + DSPE-mPEG₂₀₀₀ + tampão PBS obtidos em diferentes temperaturas	101
26	Representação esquemática da distribuição heterogênea das moléculas de DSPE-mPEG₂₀₀₀ na bicamada lipídica dos SpHL	101
27	Curva de DSC da DOPE + CHEMS + DSPE-mPEG₂₀₀₀ + AU + tampão PBS pH 7,4	105
28	Difratogramas da mistura DOPE + CHEMS + DSPE-mPEG₂₀₀₀ + AU + tampão PBS obtidos em diferentes temperaturas.....	105
29	Representação esquemática dos padrões de organização dos SpHL-AU	106
30	Representação esquemática das estruturas intermediárias micelares inversas (IMI) e das possibilidades de interações entre as membranas	109
31	Representação esquemática do preparo das amostras de SpHL-AU e SpHL-BR utilizadas nas análises por SAXS	114
32	Difratogramas obtidos para os SpHL-BR preparados em tampão PBS pH 7,4 ; 5,0 e 4,0.....	117
33	Difratogramas obtidos para os SpHL-AU preparados em tampão PBS pH 7,4 ; 5,0 e 4,0	118
34	Difratogramas obtidos para os SpHL-BR preparados em tampão PBS, meio de cultura (MC) e meio de cultura suplementado com SFB (MCS), em pH=7,4	121
35	Difratogramas obtidos para os SpHL-AU preparados em tampão PBS, meio de cultura (MC) e meio de cultura suplementado com SFB (MCS), em pH=7,4.....	122
36	Difratogramas obtidos para os SpHL-BR preparados em MC pH 7,4 e 4,0.....	124
37	Difratogramas obtidos para os SpHL-BR preparados em MCS pH 7,4 e 4,0.....	125
38	Difratogramas obtidos para os SpHL-AU preparados em MC pH 7,4 e 4,0.....	126
39	Difratogramas obtidos para os SpHL-AU preparados em MCS pH 7,4 e 4,0.....	127

LISTA DE TABELAS

1 Inibição da proliferação celular promovida por AU em diferentes linhagens celulares	32
2 Parâmetros obtidos na análise de regressão linear para doseamento de AU por CLAE	77
3 Determinação da precisão inter e intradia para o método de doseamento de AU por CLAE	78
4 Determinação da exatidão para o método de doseamento de AU por CLAE	79
5 Propriedades químicas e físico-químicas de lipossomas em presença e em ausência de AU.....	80
6 Distribuição do diâmetro das vesículas (%) para SpHL-20AU1	82
7 Influência do número de ciclos empregados no processo de homogeneização sob pressão a 500 Bar sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL-20AU1	83
8 Estabilidade química e físico-química de SpHL-20AU1	84
9 Valores de IC₅₀ para diferentes linhagens celulares	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	<i>Alanine aminotransferase</i> /Alanina aminotransferase
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i> /Fosfatase alcalina
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> /Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APAF-1	<i>Apoptotic protease-activating factor 1</i> /Fator apoptótico de ativação de protease 1
AST	<i>Aspartate transaminase</i> /Aspartato aminotransaminase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AU	Ácido ursólico
BAK	<i>BCL-2 antagonist killer</i> /Assassino 1 antagonista de BCL-2
BAX	<i>BCL-2 associated X protein</i> /Proteína X associada ao BCL-2
BCL-2	<i>B-cell CLL/Lymphoma 2</i> /Proteína de célula B de leucemia linfóide crônica
BCL-X _L	<i>BCL-2 related gene, long isoform</i> /Gene relacionado ao BCL-2, isoforma longa
BRAF	Proto-oncogene B-RAF
Caspases	<i>Cysteine-aspartic acid proteases</i> /Cisteíno proteases de ácido aspártico
CDK	<i>Cyclin-dependent kinases</i> /Cinases ciclinas-dependentes
c-FLIP	<i>Cellular FLICE-like inhibitory protein</i> /Proteína celular inibitória semelhante a FLICE
CHEMS	<i>Cholesteryl hemisuccinate</i> /Hemisuccinato de colesterila
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
d	Distância interplanar
Da	Dálton
DMEM	Meio de cultura <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> /Ácido desoxirribonucléico
DOPC	<i>Dioleoylphosphatidylcholine</i> /Dioleilfosfatidilcolina
DOPE	<i>Dioleoylphosphatidylethanolamine</i> /Dioleilfosfatidiletanolamina

DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	<i>Differential calorimetry scanning</i> /Calorimetria exploratória diferencial
DSPE-mPEG ₂₀₀₀	<i>Distearoylphosphoethanolamine-methoxypolyethyleneglycol 2000</i> /Diestearoilfosfatildiletanolamina-metoxipolietilenoglicol ₂₀₀₀
DRX	Difração de raios-x
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i> /Permeabilidade e retenção aumentados
FAS	<i>FAS ligand</i> / FAS ligante
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> /Isotiocianato de fluoresceína
GGT	<i>γ-glutamyl transferase</i> /γ-glutamilttransferase
H _{II}	Fase hexagonal II
HAP	Homogeneização sob alta pressão
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i> /Moléculas de adesão intercelular-1
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i> /Conferência Internacional sobre Harmonização
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Iodeto de propídio
Kda	Quilodáton
KRAS	Proto-oncogene K-RAS
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncroton
LUV	<i>Large unilamellar vesicles</i> /Lipossomas unilamelares grandes
L _α	Fase lamelar fluida
L _β	Fase lamelar gel
MC	Meio de cultura
MCS	Meio de cultura suplementado com soro fetal bovino
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MLV	<i>Multilamellar vesicles</i> /Lipossomas multilamelares
MMP	Metaloproteinase

MTT	Metiltiazoltetrazólio
NF- κ B	<i>Nuclear Factor Kappa B</i> /Fator nuclear kappa B
ODS	Octadecilsilano
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i> /Poli polimerase (ADP-ribose)
PBS	<i>Phosphate Buffer saline</i> /Tampão salina-fosfato
PCS	<i>Photo Correlation Spectroscopy</i> /Espectroscopia de correlação do fóton
PEG	Polietilenoglicol
p/p	Relação peso por peso
p/v	Relação peso por volume
p53	Gene supressor tumoral de peso molecular 53 Kda
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> /Fosfatidilinositol 3-cinase
q	Vetor de espalhamento
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> / Ácido ribonucléico
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAXS	<i>Small Angle X-ray Scattering</i> / Espalhamento de raios-x a baixo ângulo
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> / Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema Fagocitário Mononuclear
SpHL-AU	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo AU
SpHL-BR	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada em ausência de AU
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicles</i> / Lipossomas unilamelares pequenos
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> / Fator de crescimento endotelial vascular
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> / Fator de necrose tumoral α
Tm	Temperatura de transição de fase
u.a.	Unidades arbitrárias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	Câncer	26
2.2	Tratamento farmacológico do câncer	28
2.3	Atividade citotóxica e antitumoral de AU	31
2.4	Nanossistemas lipídicos como carreadores para AU	36
2.4.1	<u>Lipossomas como carreadores para AU</u>	39
2.5	Caracterização das propriedades físicas, químicas e físico-químicas dos lipossomas	49
2.5.1	<u>Diâmetro das vesículas</u>	49
2.5.2	<u>Potencial zeta</u>	51
2.5.3	<u>Teor de encapsulação</u>	52
2.5.4	<u>Morfologia dos lipossomas</u>	53
2.5.5	<u>Análise da transição de fase dos lípides</u>	54
3	OBJETIVOS GERAIS	61
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	61
CAPÍTULO 1 - DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, FÍSICO-QUÍMICA, MORFOLÓGICA E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO		63
1	INTRODUÇÃO	64
2	MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1	Material	65
2.2	Validação de metodologia analítica para doseamento de AU por CLAE	65
2.2.1	<u>Condições cromatográficas</u>	65
2.2.2	<u>Especificidade</u>	66
2.2.3	<u>Linearidade</u>	66
2.2.4	<u>Precisão inter e intradia</u>	67
2.2.5	<u>Exatidão</u>	67

2.2.6	<u>Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)</u>	68
2.3	Preparo de SpHL-AU e SpHL-BR pelo método de Bangham ..	69
2.3.1	<u>Calibração das vesículas</u>	69
2.3.2	<u>Purificação dos lipossomas</u>	70
2.3.3	<u>Esterilização final dos lipossomas</u>	72
2.4	Caracterização química, físico-química e morfológica dos SpHL-AU e SpHL-BR	72
2.4.1	<u>Determinação do diâmetro e do potencial zeta</u>	72
2.4.2	<u>Determinação do teor de encapsulação de AU nos SpHL-AU</u>	73
2.4.3	<u>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</u>	73
2.5	Avaliação da estabilidade química e físico-química dos SpHL-AU	74
2.6	Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de metabolização de metiltiazoltetrazólio (MTT)	74
2.7	Análise estatística	75
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1	Validação de metodologia analítica para doseamento de AU por CLAE	76
3.1.1	<u>Especificidade</u>	76
3.1.2	<u>Linearidade</u>	77
3.1.3	<u>Precisão inter e intradia</u>	78
3.1.4	<u>Exatidão</u>	79
3.1.5	<u>Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)</u>	79
3.2	Propriedades químicas e físico-químicas dos SpHL-AU e SpHL-BR obtidos pelo método de Bangham	80
3.2.1	<u>Avaliação da influência do número de ciclos de HAP sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL20AU1</u>	82
3.2.2	<u>Avaliação da estabilidade química e físico-química dos SpHL20AU1</u>	83
3.3	Avaliação morfológica dos SpHL-AU por MET	85
3.4	Avaliação da viabilidade celular	86

CAPÍTULO 2 - ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE OS COMPONENTES DOS LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO SOB CONDIÇÕES DE BAIXA HIDRATAÇÃO	87
1 INTRODUÇÃO	88
2 MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1 Material	89
2.2 Preparo de amostras	89
2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	90
2.4 Espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS)	90
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
3.1 Análises por DSC e SAXS	92

CAPÍTULO 3 - ESTUDO DO EFEITO DO pH E DOS CONSTITUINTES DO MEIO DE CULTURA SOBRE A ORGANIZAÇÃO SUPRAMOLECULAR DOS LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO UTILIZANDO DIFRAÇÃO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)	111
1 INTRODUÇÃO	112
2 MATERIAL E MÉTODOS	113
2.1 Material	113
2.2 Espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS)	113
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
3.1 Avaliação do efeito do pH na estabilidade dos SpHL-BR e SpHL-AU	115
3.2 Avaliação do efeito do meio na estabilidade dos SpHL-BR e SpHL-AU	120
3.3 Avaliação do comportamento de fase da DOPE, nos SpHL-BR e SpHL-AU, na presença dos constituintes do meio de cultura (MC) e do meio de cultura suplementado com SFB (MCS) frente à redução do pH	123
3.3.1 <u>Estudo comparativo dos difratogramas obtidos para os SpHL-BR preparados em meio de cultura (MC) em pH 7,4 e pH 4,0</u>	<u>123</u>
3.3.2 <u>Estudo comparativo dos difratogramas obtidos para os SpHL-BR preparados em meio de cultura completo (MCS) em pH 7,4 e pH 4,0</u>	<u>124</u>

3.3.3	<u>Estudo comparativo dos difratogramas obtidos para os SpHL-AU preparados em meio de cultura (MC) em pH 7,4 e 4,0</u>	125
3.3.4	<u>Estudo comparativo dos difratogramas obtidos para os SpHL-AU preparados em meio de cultura completo (MCS) em pH 7,4 e 4,0</u>	126
	CONCLUSÕES GERAIS	128
	PERSPECTIVAS	130
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
	ANEXOS	145

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer representa uma importante causa de morte no mundo e, por consequência, tornou-se uma preocupação de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, pode-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. No Brasil estima-se cerca de 580 mil casos novos da doença para 2014 reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2014a). Nesse contexto, a busca de novas alternativas para o tratamento farmacológico do câncer é de extrema urgência e importância.

Atualmente, diversos fármacos têm sido empregados como antitumorais. Entretanto, muitas células malignas não respondem à farmacoterapia disponível ou podem apresentar resistência a esses agentes. Além disso, grande parte desses compostos apresentam índice terapêutico bastante limitado e podem também ocasionar danos às células normais (WONG *et al.*, 2007; ISMAEL *et al.*, 2008). Desta forma, a descoberta de novos fármacos para a terapia antineoplásica tem se tornado cada vez mais necessária, devido à deficiência de um arsenal terapêutico abrangente, eficaz e seguro. Neste contexto, o estudo de substâncias derivadas de plantas, como protótipos, certamente pode contribuir para obtenção de fármacos mais efetivos e menos tóxicos (VECHIA *et al.*, 2009; SHANMUGAM *et al.*, 2013).

O ácido ursólico (AU) é um triterpeno pentacíclico encontrado em diversas espécies de plantas o qual tem demonstrado ação citotóxica em inúmeras linhagens de células tumorais. Esse composto exerce sua ação nas diferentes etapas do processo tumoral como: proliferação celular, angiogênese, invasão e metástase bem como pela indução de apoptose de células tumorais (LIU, 2005; OVESNA *et al.*, 2006; BONACCORSI *et al.*, 2008; SHANMUGAM *et al.*, 2013).

O AU é um composto muito pouco solúvel em meio aquoso, o que representa uma barreira ao seu emprego como fármaco devido às limitações farmacocinéticas relacionadas à administração e biodisponibilidade desse

composto em meio biológico (MEHNERT & MADER, 2001; LIU, 2005; TIAN *et al.*, 2006; GAO *et al.*, 2012). Esta dificuldade de veiculação de AU tem como consequência um número reduzido de estudos disponíveis, *in vivo*, e representa um entrave no avanço das pesquisas pré-clínicas que poderiam validar a aplicabilidade futura desse composto como agente antitumoral, em humanos.

Desta forma, diante da baixa solubilidade do AU em meio aquoso, o emprego de nanossistemas lipídicos, como os lipossomas, apresenta-se como uma estratégia promissora para veicular essa substância e possibilitar a administração endovenosa da mesma. Além disto, considerando-se a ação antitumoral desse triterpeno, a utilização de nanocarreadores como veículos pode propiciar o direcionamento desse composto para a região tumoral, possibilitando uma maior eficácia terapêutica (LOPES *et al.*, 2013a).

Portanto, a proposta desta tese de doutorado foi o desenvolvimento, a caracterização química, físico-química, morfológica e a avaliação da estabilidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo AU (SpHL-AU), bem como a execução de estudos, *in vitro*, para determinação da citotoxicidade desses nanossistemas.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

A palavra câncer representa a tradução latina para carcinoma (do grego *karkinos* = caranguejo) e foi usada primeiramente por Galeno (138-201 d.C.) para indicar um tumor maligno no qual as veias superficiais do órgão acometido eram ramificadas, semelhante às patas de um caranguejo. Esse termo generalizou-se sendo utilizado até hoje para indicar qualquer neoplasia maligna (BRASILEIRO-FILHO *et al.*, 2006).

As neoplasias referem-se a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento rápido e desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos. Com a constante multiplicação celular, há a necessidade de que novos vasos sanguíneos sejam formados para que haja a nutrição dessas células, em um processo denominado angiogênese. As células neoplásicas podem se desprender do tumor, migrar e invadir os tecidos vizinhos, alcançando o interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através desses, disseminar-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, dando origem às metástases (ALMEIDA *et al.*, 2005; INCA, 2014b).

O surgimento das neoplasias ocorre por meio da transformação de uma célula normal em célula cancerosa devido à alteração de seu DNA. Um grande número de agentes causam lesão e induzem transformação neoplásica das células. Dentre estes agentes pode-se citar os carcinógenos químicos, a energia radioativa e os vírus oncogênicos. Sabe-se que a persistência dos tumores, mesmo após passado o estímulo desencadeante, é resultante de alterações genéticas as quais permitem uma proliferação excessiva e não regulada que se torna autônoma, independente dos estímulos fisiológicos do crescimento (ALMEIDA *et al.*, 2005 ; KUMAR *et al.*, 2005).

Os principais alvos da lesão genética na formação de tumores são os genes que, em células normais, estão envolvidos com o controle do ciclo celular, o reparo de lesões no DNA ou a apoptose. Esses genes podem ser classificados

em oncogenes e genes supressores de tumor, dependendo da função que desempenham nas células, sendo ambos fundamentais para a manutenção do equilíbrio celular. Dentre estes, o gene p53 destaca-se como um gene supressor tumoral muito estudado cujas mutações estão presentes em mais de 50% dos tumores humanos. As principais atividades funcionais da proteína p53 são a parada do ciclo celular e o início da apoptose em resposta à lesão do DNA (KUMAR *et al.*, 2005).

A apoptose (ou morte celular programada) é um processo fisiológico essencial para eliminar células supérfluas ou defeituosas que pode ser desencadeado por diversos estímulos como privação de fatores de crescimento, radiação ionizante, radiação ultravioleta e ativação de receptores de morte da célula (MANU & KUTTAN, 2008). Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular, a saber: retração, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos. Muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre essas, as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases. A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e de que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular têm estimulado diversos estudos na investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer (GRIVICICH *et al.*, 2007).

O ciclo celular representa o conjunto de modificações pelo qual passa uma célula desde sua formação até sua própria duplicação. A intérfase se subdivide em três fases consecutivas denominadas G1, S e G2. Na fase G1 as células apresentam intensa atividade de síntese de RNA e de proteínas. Durante a fase S, a célula duplica o seu conteúdo de DNA e no período G2 ocorre discreta síntese de RNA e de proteínas essenciais para mitose. Após as fases da intérfase, o núcleo entra em processo de divisão ou mitose (M). Há um período onde não ocorre a proliferação das células que é denominado G0. O ciclo celular apresenta seus próprios controles internos chamados de pontos de verificação sendo dois os pontos de parada principais: um na transição G1/S e

outro em G2/M. Durante essas pausas no ciclo, são ativados mecanismos de reparo ao DNA, mediados pela proteína p53. Caso o reparo não seja possível, a p53 ativa genes indutores da apoptose (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000; KUMAR *et al.*, 2005; BRASILEIRO-FILHO *et al.*, 2006). Portanto, quando as células tem o DNA danificado durante o processo de divisão celular, são ativadas vias de bloqueio do ciclo. Dessa forma, evita-se a transferência de material genético danificado para células filhas (BERTOLLO, 2010).

Conforme dito anteriormente, o câncer representa, atualmente, uma importante causa de morte no mundo e, por consequência, tornou-se uma preocupação de saúde pública. No Brasil estima-se cerca de 580 mil casos novos da doença para 2014 reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem contabilizar os casos de câncer de pele não melanoma, estima-se um total de 395 mil casos novos. Para o sexo masculino, os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago; e para o sexo feminino os cânceres de pele não melanoma, mama, cólon e reto, colo do útero e pulmão (INCA, 2014a).

Nesse contexto, a busca de novas alternativas para o tratamento farmacológico do câncer é de extrema urgência e importância.

2.2 Tratamento farmacológico do câncer

O tratamento do câncer pode ser feito através de intervenção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia ou terapia hormonal. Mais recentemente tem-se usado a terapia de fotorradiação com derivados hematoporfirínicos e a imunoterapia. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma dessas modalidades de tratamento (DOLMANS *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2005; INCA, 2014c). Uma das principais formas de intervenção médica no tratamento do câncer é a quimioterapia, sendo que o principal desafio consiste no desenvolvimento de agentes antineoplásicos com baixa toxicidade e elevada eficácia antitumoral (LEITE *et al.*, 2012; MARONI *et al.*, 2012).

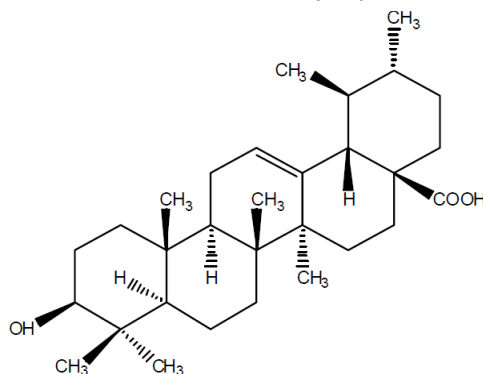
Atualmente, diversas classes de antineoplásicos são empregados no tratamento do câncer: os alquilantes polifuncionais (mostarda nitrogenada, mostarda fenil-alanina, ciclofosfamida, bussulfan, nitrossuréias, cisplatina, carboplatina e a ifosfamida); os agentes antimetabólitos (6-mercaptopurina e 6-tioguanina, 5-fluoruracil, metotrexato e citosina-arabinosídeo C); os antibióticos antitumorais (mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, bleomicina, daunorrubicina, actinomicina D, doxorubicina e seus análogos mitroxantona e epirubicina); os inibidores mitóticos como os alcalóides da vinca (vincristina, vimblastina e vindesina), o taxol e os derivados da podofilotoxina (o VP-16, etoposídeo; e o VM-26, teniposídeo) (ALMEIDA *et al.*, 2005 ; INCA, 2014d).

Além dos agentes antineoplásicos, acima citados, existem outros fármacos que não podem ser agrupados em uma determinada classe de ação farmacológica destacando-se a dacarbazina, a procarbazina, a L-asparaginase, altretamina (exametilamina), tiotepa (trietilenotiofosforamida), mitotano, hidroxiuréia e os derivados do ácido retinóico, etretinato e isotretinoína (ALMEIDA *et al.*, 2005 ; INCA, 2014d).

Entretanto, embora o foco principal dos agentes antineoplásicos seja a destruição das células tumorais, a maioria dos quimioterápicos apresentam índice terapêutico bastante limitado lesando tanto as células malignas quanto as normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrintestinais, as capilares e as do sistema imunológico. Esse fato explica a ocorrência de uma série de efeitos adversos altamente deletérios para o organismo em decorrência da quimioterapia. Além disto, muitas células malignas não respondem à farmacoterapia disponível ou podem apresentar resistência a esses agentes (ALMEIDA *et al.*, 2005 ; WONG *et al.*, 2007; ISMAEL *et al.*, 2008). Desta forma, a descoberta de novos fármacos para a terapia antineoplásica tem se tornado cada vez mais necessária, devido à deficiência de um arsenal terapêutico abrangente, eficaz e seguro. Neste contexto, o estudo de substâncias derivadas de plantas, como protótipos, certamente pode contribuir para obtenção de fármacos mais efetivos e menos tóxicos (VECHIA *et al.*, 2009; SHANMUGAM *et al.*, 2013).

O ácido ursólico [ácido 3 β -hidroxil-urs-12-en-28-óico] (AU) é um triterpeno pentacíclico (**Figura 1**), encontrado abundantemente em produtos alimentícios e em mais de 120 espécies de plantas (ZHOU *et al.*, 2009; PRADES *et al.*, 2011; SHANMUGAM *et al.*, 2013). AU tem demonstrado muitas ações biológicas promissoras, como a ação antiinflamatória (GAUTAM & JACHAK, 2009), a ação anti-hiperlipidêmica (LIU, 1995; SOMOVA *et al.*, 2003), a ação hepatoprotetora (LIU, 1995) e a ação anti-hipertensiva (SOMOVA *et al.*, 2003). Destaca-se, sobretudo, a ação citotóxica de AU em diversas linhagens de células tumorais (MIZUSHINA *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2002; TANIGUCHI *et al.*, 2002; CARDENAS *et al.*, 2004; HSU *et al.*, 2004; HARMAND *et al.*, 2005; CIPAK *et al.*, 2006; TIAN *et al.*, 2006; KASSI *et al.*, 2007; BONACCORSI *et al.*, 2008; MANU & KUTTAN, 2008; XAVIER *et al.*, 2009; MENG *et al.*, 2009; KASSI *et al.*, 2009; YAN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013; SHANMUGAM *et al.*, 2011; SHANMUGAM *et al.*, 2013).

Figura 1 – Estrutura química do ácido ursólico (AU)



Conforme observado na **Figura 1**, o AU possui em sua estrutura química um grupamento ácido ($pK_a = 5,29$) e apresenta máximo de absorção entre 205-210 nm (SCHNEIDER *et al.*, 2009; DU & CHEN, 2009). Além disto, AU é um composto consideravelmente lipofílico apresentando $\log P = 7,92$ (RAMOS *et al.*, 2008).

2.3 Atividade citotóxica e antitumoral de AU

Diversos estudos têm demonstrado a ação de AU em vários estágios de desenvolvimento do tumor devido à inibição dos processos de proliferação celular, angiogênese, invasão e metástase bem como pela indução de apoptose de células tumorais (LIU, 2005; OVESNA *et al.*, 2006; BONACCORSI *et al.*, 2008; SHANMUGAM *et al.*, 2013).

Muitos trabalhos têm relatado a inibição da proliferação celular promovida por AU em várias linhagens de células tumorais (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Inibição da proliferação celular promovida por AU em diferentes linhagens celulares^a

Linhagem Celular	IC50 (μM)	Metodologia	Referências
NUGC-3 - Carcinoma gástrico	30	MTT, 48h	MIZUSHINA <i>et al.</i> , 2000
HCT15 - Carcinoma de cólon humano	30	MTT, 72h	LI <i>et al.</i> , 2002
HSC-2- Carcinoma oral escamoso humano	63,6	MTT, 24h	TANIGUCHI <i>et al.</i> , 2002
M4Beu - Melanoma humano	12,5-15	Trypan Blue, 48h	HARMAND <i>et al.</i> , 2005
L1210 - Leucemia murina	14,6	Trypan Blue, 24h	CIPAK <i>et al.</i> , 2006
HL-60- Leucemia humana pró-mielocítica	10,9	Trypan Blue, 24h	CIPAK <i>et al.</i> , 2006
K562- Leucemia humana mielogênica	~24	Trypan Blue, 24h	OVESNÁ <i>et al.</i> , 2006
HepG2- Carcinoma hepatocelular humano	18	MTT, 48h	TIAN <i>et al.</i> , 2006
R-HepG2 - Carcinoma hepatocelular ^b	15	MTT, 48h	TIAN <i>et al.</i> , 2006
PC-3 - Carcinoma de próstata ^c	32,6	MTT, 24h	KASSI <i>et al.</i> , 2007
LNCaP - Carcinoma de próstata ^d	15,7	MTT, 24h	KASSI <i>et al.</i> , 2007
A-375 - Melanoma, U87 - glioblastoma, ARO - Carcinoma de tireóide	13-17	Hoechst 33258, 48h	BONACCORSI <i>et al.</i> , 2008
MDA-MB-231 - Carcinoma de mama	18,6	Sulforodamina B	VALADARES, 2009
	40	MTT, 48h	KIM <i>et al.</i> , 2011
MCF-7 - Carcinoma de mama	53	MTT, 48h	KASSI <i>et al.</i> , 2009
	40	MTT, 48h	WANG <i>et al.</i> , 2012a
BGC-823 - Carcinoma gástrico	25	MTT, 48h	WANG <i>et al.</i> , 2011
SGC-7901 - Carcinoma gástrico	60	MTT, 48h	ZHANG <i>et al.</i> , 2013

^a A tabela foi adaptada de Vechia *et al* (2009); ^b cepa resistente à quimioterapia; ^c PC-3- linhagem celular possuindo receptor de androgênio negativo e glicocorticóide positivo; ^d LNCaP- linhagem celular possuindo receptor androgênio positivo e glicocorticóide negativo.

Hsu e colaboradores (2004) avaliaram o efeito de AU na inibição da proliferação celular, desregulação do ciclo celular e indução de apoptose em células A549 de carcinoma de pulmão humano. Observou-se que AU promoveu retenção das células na fase G1 do ciclo celular mediada por p53/p21 e via inibição de quinases-ciclinas-dependentes (CDKs). AU alterou o balanço entre o fator transcricional pró-apoptótico (p53) e o fator transcricional

anti-apoptótico (NF- κ B) bem como aumentou os níveis de expressão de proteínas relacionadas à apoptose (Fas-APO1, Fas ligante, e Bax) e reduziu a expressão de fatores anti-apoptóticos (Bcl-2 e Bcl-XL). Outro estudo também investigou os efeitos apoptóticos de AU em outras duas linhagens de carcinoma de pulmão humano (H3255 e Calu-6). Observou-se que AU, na concentração de 2 a 16 μ M, promoveu aumento na fragmentação de DNA, redução na atividade da Na⁺-K⁺-ATPase e diminuição da produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). AU também induziu a supressão da expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM-1), fibronectina e metaloproteinases (MMPs). Esses resultados sugerem que AU seja um potente agente na inibição da progressão do carcinoma pulmonar com propriedades inibitórias também frente à invasão e metástase (HUANG *et al.*, 2011).

O efeito do AU como indutor de apoptose foi também investigado em células de melanoma M4Beu e demonstrou-se que o processo apoptótico foi caracterizado pelo aumento na expressão da proteína Bax, ativação de caspase-3 e colapso do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ m). Esses resultados mostram que AU induz apoptose, nessa linhagem específica, pela via intrínseca ou mitocondrial (HARMAND *et al.*, 2005). Em outro estudo, avaliou-se o tratamento de linhagens de células de melanoma B16F-10 com AU e demonstrou-se que a indução de apoptose ocorre pela inibição da via anti-apoptótica induzida por NF- κ B e subsequente ativação das vias pró-apoptóticas mediadas por p53 e caspase-3, induzidas pelo fator de necrose tumoral (TNF- α) (MANU & KUTTAN, 2008).

Kassi e colaboradores (2009) avaliaram os mecanismos de ação antitumoral de AU em células de câncer de mama, MCF-7, e verificaram que AU provocou a clivagem da poli-(ADP-ribose) polimerase (PARP) e induziu a apoptose associada à redução nos níveis da proteína Bcl-2. Nesse caso a indução de apoptose ocorreu também por meio da via intrínseca ou mitocondrial. A atividade apoptótica de AU foi também investigada em outra linhagem de carcinoma de mama, MDA-MB-231. Observou-se que AU induziu aparecimento do receptor Fas, clivagem de caspase 8, caspase 3 e PARP. AU também

induziu a expressão do fator Bax e inibiu a expressão do fator Bcl-2. Além disso, AU promoveu clivagem de caspase-9 e redução no potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Esses resultados sugerem que, nesta linhagem, a indução de apoptose promovida por AU ocorreu por ambas as vias, intrínseca e extrínseca (KIM *et al.*, 2011).

As ações relacionadas ao mecanismo de apoptose induzida por AU foram também examinadas em linhagens de células tumorais humanas de fígado HepG2, Hep3B, Huh7 e HA22T. Observou-se redução na viabilidade celular e aumento na fragmentação do DNA; redução no potencial de membrana mitocondrial; diminuição da atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e dos níveis de VEGF, aumento de atividade de caspase-3 e caspase-8 e redução nos níveis de ICAM-1 (YAN *et al.*, 2010).

A atividade citotóxica de AU foi estudada em linhagens de células de carcinoma de cólon humano, HCT15. Observou-se que AU promoveu um aumento na população de células no estágio G0/G1 com concomitante redução na população de células na fase S do ciclo celular, não sendo observadas frações apoptóticas. Tais resultados sugerem que AU apresenta efeito inibitório na proliferação celular da linhagem estudada, mediante o impedimento da progressão do ciclo celular (LI *et al.*, 2002). AU demonstrou também efeito antiproliferativo e pró-apoptótico em linhagens de células de carcinoma de cólon humano, HCT15 e CO115 com mutações nos genes KRAS e BRAF, respectivamente, devido à ação inibitória do gene PI3K o qual é responsável por promover crescimento celular e inibição de apoptose (XAVIER *et al.*, 2009). AU também promoveu indução de apoptose em células de carcinoma colorretal (HCT116, HT29 e Caco-2) por inibição da ativação de NF- κ B e por inibição de fatores de sobrevivência celular (Bcl-xL, Bcl-2, cFLIP e survivina), inibição da expressão de proteínas relacionadas à proliferação (ciclina D1) e à metástase (MMP-9, VEGF e ICAM-1) (PRASAD *et al.*, 2012).

Cipak e colaboradores (2006) realizaram a análise do ciclo celular de linhagens de células de leucemia murina (L1210) e humana (HL-60). Após tratamento

com AU, observaram retenção das células L1210 na fase G2/M e indução de apoptose nas fases S e G2/M do ciclo celular, para ambas as linhagens.

As enzimas DNA polimerase e topoisomerase são críticas para muitos processos celulares como replicação do DNA, reparo e recombinação e têm emergido recentemente como importantes alvos celulares no desenvolvimento de agentes antitumorais. Alguns estudos relacionaram a apoptose mediada pelo triterpeno AU à inibição dessas enzimas metabólicas do DNA de modo inespecífico afetando os processos de replicação e reparo celular podendo ocasionar a morte celular (VECHIA *et al.*, 2009). O efeito de AU sobre linhagens celulares de câncer estomacal, NUGC-3, foi avaliado e os resultados demonstraram que AU foi capaz de inibir o crescimento dessas células mediante a ação sobre DNA polimerases e DNA topoisomerases (MIZUSHINA *et al.*, 2000).

Bonaccorsi e colaboradores (2008) examinaram os efeitos do AU na proliferação e diferenciação de linhagens de células tumorais humanas de melanoma (A375), glioblastoma (U87) e carcinoma da tireóide (ARO). Os resultados demonstraram que AU promoveu a inibição da proliferação celular de todas as linhagens tumorais testadas bem como induziu a diferenciação das mesmas. Observou-se também que AU provocou inibição da atividade da transcriptase reversa (DNA-polimerase RNA-dependente), sugerindo que os efeitos citotóxicos do AU, nessas linhagens, estejam relacionados à esta enzima.

A atividade anti-angiogênica de AU foi também avaliada e os resultados evidenciaram que o triterpeno foi capaz de inibir o processo de angiogênese de forma dose-dependente mediante um efeito inibitório na proliferação de células endoteliais (SONH *et al.*, 1995). Cárdenas e colaboradores (2004) também confirmaram que AU foi capaz de inibir alguns estágios do processo de angiogênese, *in vitro*, como a proliferação, migração e diferenciação das células endoteliais. Entretanto, esses pesquisadores também observaram que AU estimulou outros níveis do processo de angiogênese e concluíram ser necessário ter-se cautela ao postular o efeito anti-angiogênico desse triterpeno. Lin e colaboradores (2011) relataram atividade anti-angiogênica de AU frente

às linhagens de carcinoma hepático (Hep3B, Huh7 e HA22T) por inibição de diversos fatores como: fator de crescimento de fibroblastos (bFGF), fator VEGF, interleucina-8, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO).

Alguns estudos têm relatado também atividade antitumoral de AU em diferentes modelos animais. O tratamento com AU, via intraperitoneal 200 mg/kg, duas vezes por semana, por 6 semanas, promoveu inibição do crescimento de células de carcinoma de próstata (DU145) em animais Balb/c nude. AU promoveu redução na expressão do fator VEGF e de vários produtos induzidos por NF- κ B os quais estão associados aos processos de proliferação, sobrevivência e angiogênese (SHANMUGAM *et al.*, 2011). AU também demonstrou atividade antitumoral quando administrado por via oral, 250 mg/Kg por dia, por 4 semanas, em camundongos nude acometidos por carcinoma colorretal sendo que AU promoveu redução do volume tumoral, inibição dos processos de ascite e de metástase (PRASAD *et al.*, 2012). Demonstrou-se também o efeito de AU no crescimento de células de carcinoma gástrico (BGC-803) tendo sido administrado por via oral a camundongos *Kunming*, na dose de 2,53 mg de AU por animal, por dia, durante 10 dias. Observou-se uma redução de 52,8% no crescimento tumoral e também um aumento na população de células no estágio G0/G1 com concomitante redução na população de células na fase S do ciclo celular. Esses resultados indicam que AU apresenta efeito inibitório na proliferação celular, da linhagem estudada, mediante o impedimento na progressão do ciclo celular. Nesse mesmo estudo, demonstrou-se também que AU promoveu indução de apoptose mediada pela ativação de caspase-3 e caspase-8 (WANG *et al.*, 2011).

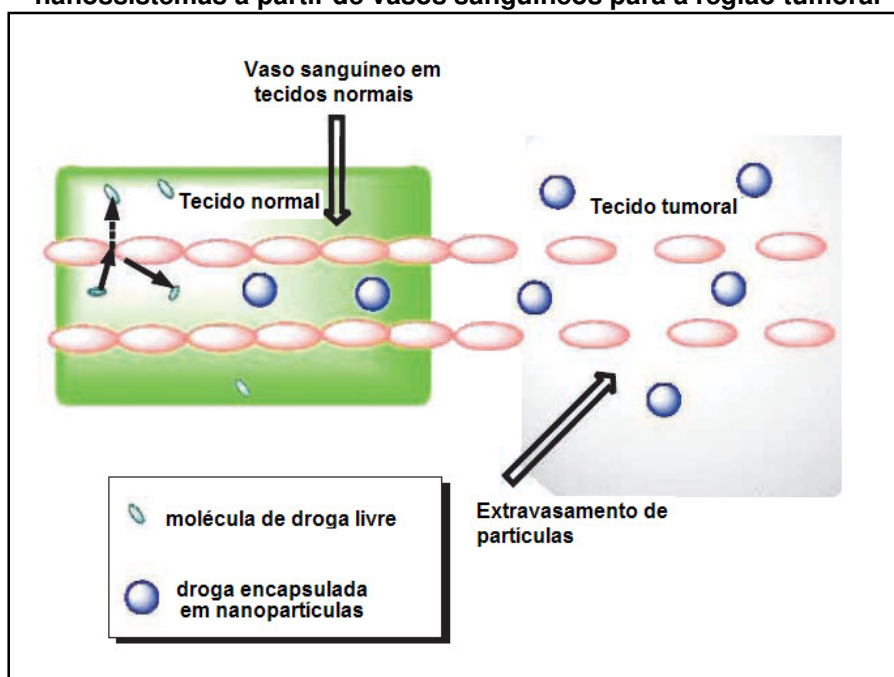
2.4 Nanossistemas lipídicos como carreadores para AU

A utilização de nanossistemas tem se apresentado cada vez mais como uma tecnologia estratégica para a veiculação racional e direcionada de agentes antitumorais no tratamento de diversos tipos de câncer (MALAM *et al.*, 2009). O desenvolvimento desses sistemas carreadores possibilita uma liberação controlada e localizada da droga relacionada à redução dos processos de inativação e degradação da droga bem como ao aumento da biodisponibilidade

e da fração presente nos tecidos-alvo, otimizando assim a eficácia e minimizando a toxicidade associadas ao tratamento (MEHNERT & MADER, 2001; LOPES *et al.*, 2013b).

Os capilares sanguíneos contínuos ou fenestrados, em tecidos normais, apresentam permeabilidade restrita a moléculas de acordo com o peso molecular. Entretanto, em tecidos tumorais há um aumento na permeabilidade vascular o que possibilita o extravasamento dos nanocarreadores (**Figura 2**). Além disso, o fluido intersticial no tecido tumoral possui uma drenagem inadequada pelo sistema linfático. Desta forma, essas características permitem que os nanossistemas, carreadores de drogas antitumorais, possam extravasar preferencialmente na região tumoral e serem retidos nesse local. Este mecanismo, que favorece o acúmulo e retenção dos nanossistemas na região tumoral, é conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR). Tal efeito possibilita uma entrega seletiva da droga, incorporada em nanossistemas, na região tumoral (TORCHILIN, 2007; WONG *et al.*, 2007; HUWYLER *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009; DANHIER *et al.*, 2010; TORCHILIN, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013).

Figura 2 - Diagrama esquemático do direcionamento e extravasamento de nanossistemas a partir de vasos sanguíneos para a região tumoral



Adaptado de WANG *et al.*, 2009.

Algumas linhagens de células tumorais apresentam um fenótipo de resistência à drogas como resultado da expressão aumentada de P-glicoproteína (P-gp). Essa glicoproteína é capaz de transportar ativamente diversos substratos incluindo muitos agentes antitumorais os quais são expulsos da célula por um mecanismo de bomba de efluxo. Nesses casos, o emprego de nanossistemas lipídicos pode ser também uma estratégia para driblar esse mecanismo de resistência por carregarem a droga, via endocitose, para o meio intracelular (WONG *et al.*, 2007).

O AU é um composto que apresenta baixa toxicidade. Ferreira e colaboradores (2010) avaliaram a toxicidade aguda de AU, administrados por via oral, em dose única de 2000 mg/Kg, a camundongos BALB/C. Não foram observados sinais de toxicidade nem de mortalidade após um período de 72 horas da administração de AU. Nesse estudo, realizou-se também a avaliação de alguns parâmetros bioquímicos após a administração oral de AU nas doses de 20 mg/Kg e de 50 mg/kg a ratos Wistar. Não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) nos níveis das enzimas hepáticas alanina aminotransaminase (ALT), aspartato aminotransaminase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e γ -glutamilttransferase (GGT). Também não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) nos níveis plasmáticos de glicose, uréia e creatinina após a administração de AU. Estudos conduzidos por XIE e colaboradores (2006) permitiram determinar a DL50 de AU, administrado por via endovenosa a camundongos Kunming, sendo essa igual a 7413 mg/Kg.

Entretanto, embora apresente a vantagem da baixa toxicidade, AU apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, o que representa uma barreira a seu emprego como fármaco devido às limitações farmacocinéticas relacionadas à administração e biodisponibilidade desse composto em meio biológico (MEHNERT & MADER, 2001; LIU, 2005; TIAN *et al.*, 2006). Algumas estratégias têm sido avaliadas para melhorar a solubilidade de AU em meio aquoso como a obtenção de derivados quimicamente modificados, a complexação não-covalente deste triterpeno com ciclodextrinas e o emprego de co-solventes (LIU, 2005). Entretanto, tais estratégias não são capazes de solucionar certas limitações, tais como: rápido metabolismo e rápida

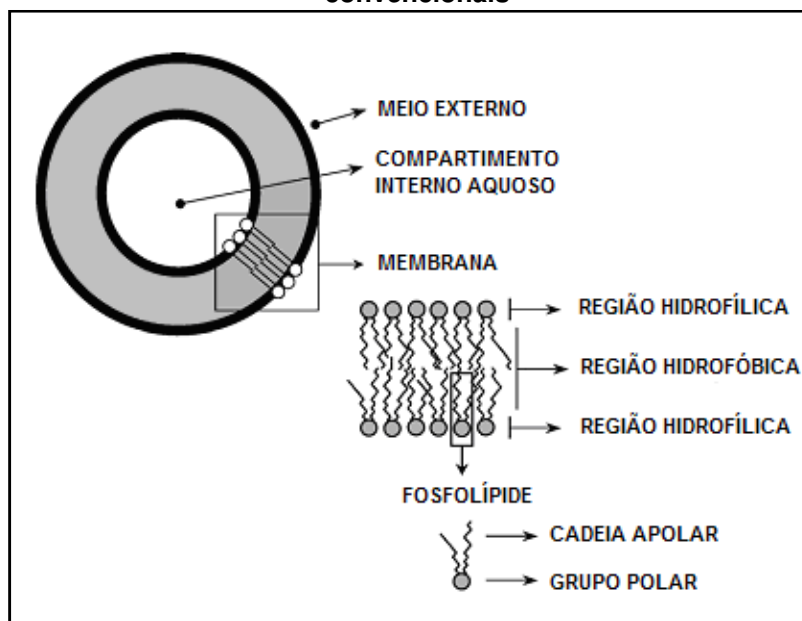
eliminação; distribuição para outros tecidos e elevada flutuação da concentração nos níveis plasmáticos acarretando variações da dose no sítio de ação (MEHNERT & MÄDER, 2001; MALAM *et al.*, 2009).

Desta forma, diante da baixa solubilidade de AU em meio aquoso e das limitações dos recursos empregados para melhorar a solubilidade, o emprego de nanossistemas lipídicos apresenta-se como uma estratégia promissora para veicular essa substância e possibilitar a administração endovenosa da mesma. Além disto, considerando-se a ação antitumoral desse triterpeno, a utilização de nanocarreadores como veículos pode propiciar o direcionamento desse composto para a região tumoral, possibilitando uma maior eficácia terapêutica (LOPES *et al.*, 2013a).

2.4.1 Lipossomas como carreadores para AU

Dentre as diversas classes de nanossistemas lipídicos destacam-se os lipossomas os quais se constituem como vesículas esféricas (0,05-5,0 μm) formadas espontaneamente quando fosfolípidos são dispersos em meio aquoso (**Figura 3**). Tais vesículas podem apresentar uma ou mais bicamadas lipídicas e substâncias de natureza química diversa podem ser encapsuladas na bicamada lipídica, no volume aquoso interno ou mesmo na interface das bicamadas (LASIC, 1998 ; NEW, 1990; LOPES *et al.*, 2013b).

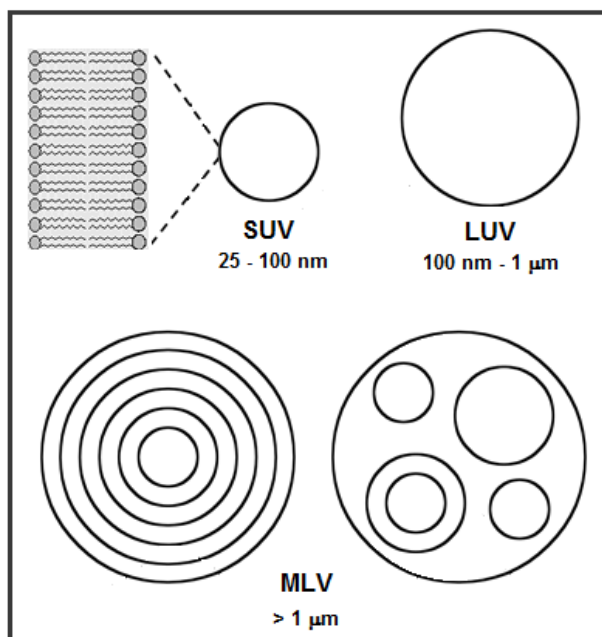
Figura 3 - Organização estrutural dos lipossomas convencionais



Adaptado de FREZARD *et al.*, 2007.

Os lipossomas podem ser classificados em termos de tamanho, número de bicamadas (uni e multilamelares) e composição. Vesículas unilamelares pequenas (SUV) são formadas por uma bicamada única com diâmetro médio de 25-100 nm; vesículas unilamelares grandes (LUV) também possuem uma bicamada única e apresentam diâmetro superior a 100 nm, enquanto as vesículas multilamelares (MLV) compreendem bicamadas lipídicas concêntricas com diâmetros de 1-5 μm (LASIC, 1998) (**Figura 4**).

Figura 4- Classificação de lipossomas de acordo com o diâmetro médio e número de bicamadas



LOPES *et al.*, 2013b.

Com relação à composição e ao mecanismo de liberação intracelular, as vesículas podem ainda ser classificadas como convencionais, de circulação prolongada e polimórficas, incluindo nessa última classe, os lipossomas pH-sensíveis, termosensíveis e catiônicos (BATISTA *et al.*, 2007).

Devido à sua versatilidade estrutural em termos de tamanho, composição, carga da superfície, fluidez da membrana e habilidade para incorporar fármacos hidrofílicos e/ou lipofílicos, lipossomas se tornaram potentes carreadores para vários tipos de fármacos, aumentando a eficácia e reduzindo os efeitos tóxicos dos mesmos (BATISTA *et al.*, 2007; LAOUINI *et al.*, 2012).

Wang e colaboradores (2012b) investigaram a dose máxima tolerada (DMT), a toxicidade dose-limitante (TDL) e o perfil farmacocinético de lipossomas contendo AU (LAU) em voluntários adultos saudáveis e em pacientes portadores de tumores sólidos avançados (linfoma Hodgkin e não-Hodgkin, carcinoma renal e hepatocarcinoma). Todos os voluntários saudáveis e pacientes receberam uma dose única de LAU (11, 22, 37, 56, 74, 98 e 130

mg/m²) administrada como infusão intravenosa durante 4 horas. A TDL foi encontrada nas doses de 74, 98 e 130 mg/m² e consistiu de hepatotoxicidade e diarreia. Outros efeitos adversos incluíram náusea, distensão abdominal, hematúria microscópica, elevação de sódio sérico e exantema. A DMT foi igual a 98 mg/m². Os parâmetros farmacocinéticos de dose única determinados revelaram que LAU apresentou um perfil farmacocinético linear. Zhu e colaboradores (2013) também avaliaram o perfil farmacocinético de dose única e de doses múltiplas de LAU, bem como a segurança desse tratamento em voluntários saudáveis e em pacientes portadores de tumores sólidos avançados. Vinte e quatro voluntários saudáveis receberam o tratamento em regime de dose única nas doses de 37, 74 e 98 mg/m². Oito pacientes receberam o tratamento em doses múltiplas na dose de 74 mg/m², durante 14 dias. LAU exibiu um perfil farmacocinético linear neste intervalo de dose avaliado. A infusão endovenosa de LAU foi bem tolerada, sendo que os efeitos adversos mais comuns foram náusea, diarreia e distensão abdominal. Concluiu-se então que a administração da infusão endovenosa de LAU apresentou-se segura nos pacientes e voluntários avaliados em ambos os estudos.

Uma desvantagem relacionada ao emprego de lipossomas convencionais é a rápida captação dessas partículas, *in vivo*, pelas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) após administração sistêmica (VEMURI & RHODES, 1995; HUWYLER *et al.*, 2008; AGGARWAL *et al.*, 2009; CAPRIOTTI *et al.*, 2012). O SFM é parte integrante do sistema imunológico e consiste em células fagocíticas localizadas no baço, linfonodo e fígado (na forma de células de Kupffer) as quais podem remover carreadores lipídicos da circulação sanguínea em minutos (WONG *et al.*, 2007).

2.4.1.1 Lipossomas de circulação prolongada

Alguns tipos especiais de lipossomas, denominados de circulação prolongada, são capazes de permanecer por maior tempo na circulação sanguínea driblando o processo de opsonização pelo SFM, e possibilitando, desta forma, um aumento na biodisponibilidade das substâncias veiculadas nessas

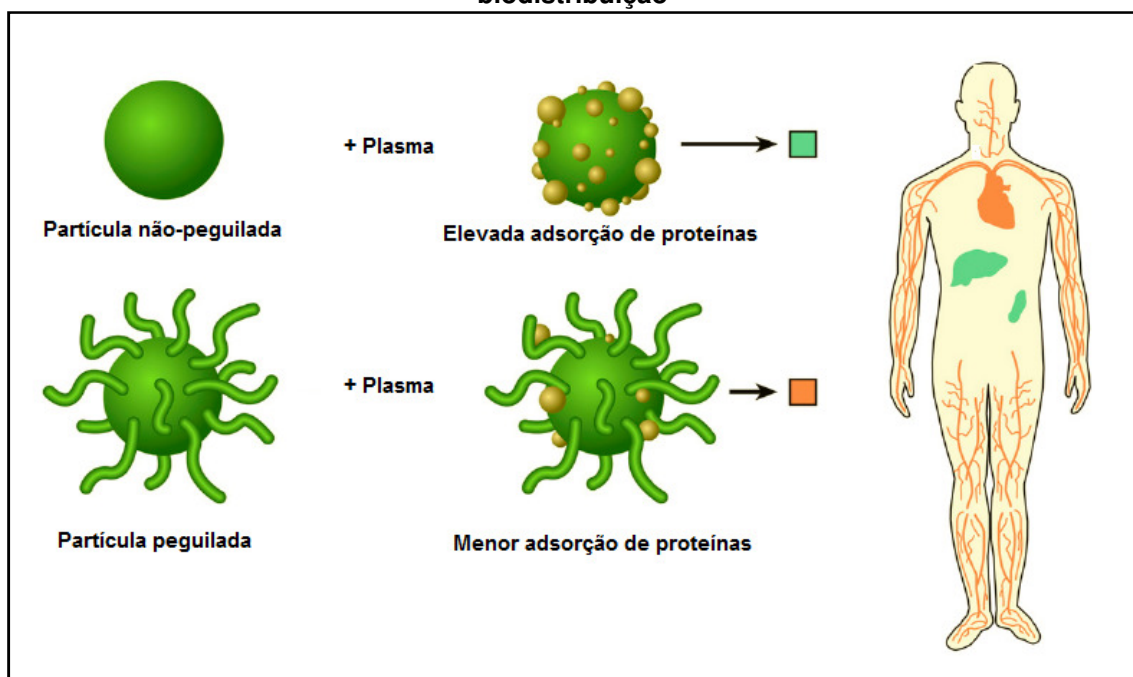
formulações (CAVALLI *et al.*, 2000; TORCHILIN, 2009; AGARWAL *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2013b).

Com o objetivo de se minimizar a ação do SFM sobre os lipossomas foram testados lipossomas de diâmetro reduzido, com membrana rígida e neutros. Entretanto, esse tipo de lipossoma apresenta desvantagens como sistema de liberação de fármacos, que incluem: pequeno volume interno de encapsulação, aumento do diâmetro das vesículas durante armazenamento, poucas substâncias disponíveis para esse tipo de formulação e perfil farmacocinético dose-dependente (PAPAHADJOPOULOS & GABIZON, 1995). Foram também desenvolvidos lipossomas de circulação prolongada contendo o monossialogangliosídeo GM1 tendo sido observada uma significativa redução na captação pelos macrófagos do SFM (ALLEN & CHONN, 1987).

Klibanov e colaboradores (1990) foram os primeiros a demonstrar que a incorporação de polímeros hidrofílicos sintéticos, como os polietilenoglicóis (PEG), na bicamada lipídica, promove um aumento significativo no tempo de circulação sanguínea dos lipossomas. Essa modificação química previne o processo de opsonização por meio da blindagem da carga superficial das partículas, aumento da hidrofiliidade da superfície, aumento da barreira estérica entre os lipossomas “peguilados” e os componentes plasmáticos bem como a formação de uma barreira polimérica que é impermeável às opsoninas. Concentrações de 5-10 % de fosfatidiletanolamina acoplado a PEG (PE-PEG) de massa molecular 1000-2000 Da conferem excelente estabilidade às formulações (ULRICH, 2002; GARBUZENKO *et al.*, 2005; TORCHILIN, 2007; VARGA *et al.*, 2013). Outro estudo demonstrou que a incorporação de concentrações de DSPE-PEG₂₀₀₀ $\leq$ 5% são suficientes para promover um aumento significativo no tempo de circulação sanguínea dos lipossomas sendo relatado que esse efeito está principalmente relacionado à barreira estérica formada pelas moléculas de PEG que impede a agregação dos lipossomas, e consequentemente, minimiza sua eliminação da circulação sanguínea (DOS SANTOS *et al.*, 2007).

A **Figura 5** ilustra o efeito da modificação de superfície de nanopartículas pela incorporação de PEG na adsorção de proteínas e na biodistribuição. Na superfície de nanopartículas não modificadas ocorre a adsorção de diversas proteínas havendo rápida captação dessas partículas por órgãos do SFM, principalmente fígado e baço (representados em verde). Por outro lado, as partículas peguiladas são menos opsonizadas pelas proteínas plasmáticas minimizando a captação pelo SFM possibilitando que permaneçam por mais tempo na circulação sanguínea (representada em laranja).

Figura 5 - Representação esquemática do efeito da modificação de superfície de nanopartículas pela incorporação de PEG na adsorção de proteínas plasmáticas e na biodistribuição



Adaptado de AGARWAL *et al.*, 2009.

Muitos estudos têm demonstrado que os efeitos antitumorais de drogas veiculadas em lipossomas “peguilados” podem ser significativamente aumentados devido aos efeitos de permeação/retenção no tecido tumoral uma vez que tais formulações apresentam circulação sanguínea prolongada (YANG *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2009).

2.4.1.2 Lipossomas pH-sensíveis

Apesar dos benefícios obtidos com as estratégias apresentadas anteriormente, os lipossomas convencionais e de circulação prolongada apresentam, em geral, uma liberação lenta do material encapsulado. Além disso, esses lipossomas podem não ser capazes de fundir com a membrana endossomal após a internalização celular. Neste contexto, tem sido proposta a inclusão de compostos com propriedades fusogênicas resultando na formação de lipossomas pH-sensíveis (LOPES *et al.*, 2013b; FERREIRA *et al.*, 2013).

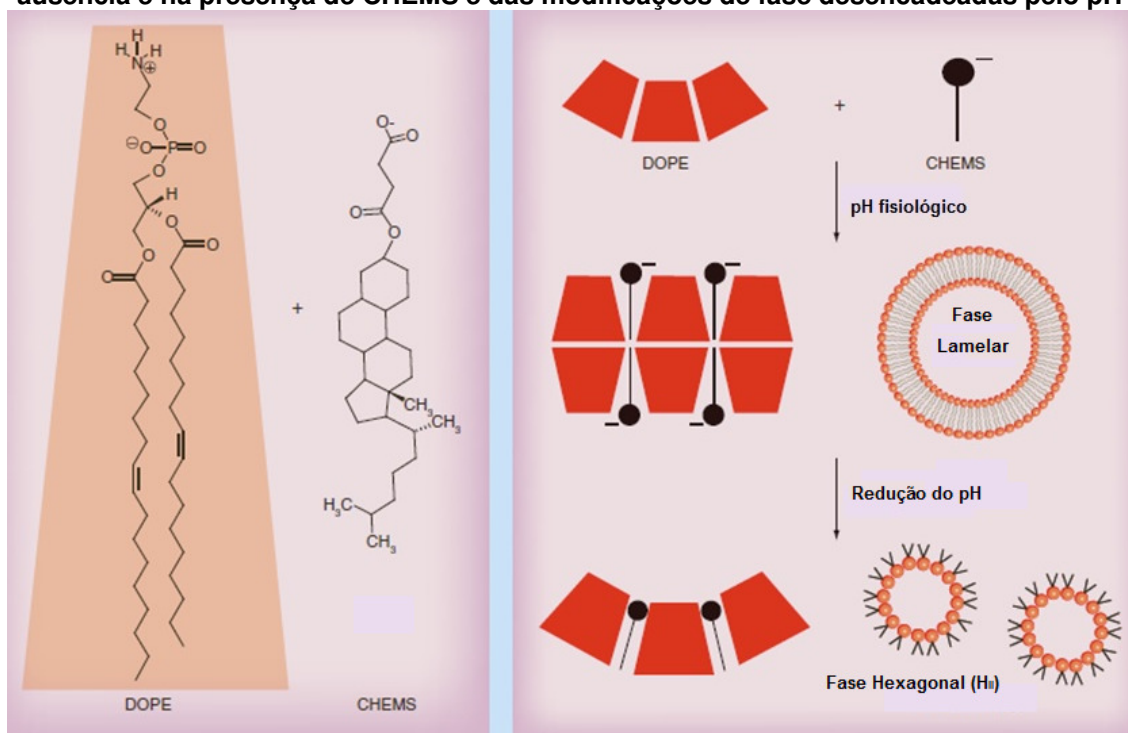
O desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis como sistemas de liberação de fármacos se baseou inicialmente no fato do meio extracelular em tecidos acometidos por infecções, inflamações e tumores ser mais ácido que o meio extracelular em tecidos normais (GULINO *et al.*, 1967; STUBBS *et al.*, 1999; ROBEY *et al.*, 2009). A acidez observada na região tumoral ocorre em razão do clearance ineficiente dos metabólitos ácidos resultantes da glicólise aeróbica intensa que ocorre nas células tumorais (STUBBS *et al.*, 1999; CUKIERMAN & KHAN, 2010; FERREIRA *et al.*, 2013).

Os lipossomas pH-sensíveis são considerados lipossomas polimórficos os quais se tornam reativos devido à mudanças na sua estrutura desencadeadas por uma alteração de pH (BATISTA *et al.*, 2007). O potencial desses lipossomas reside principalmente em sua capacidade de sofrer desestabilização no estágio endossomal, prevenindo desta forma a degradação no nível lisossomal, e consequentemente, aumentando o acesso dos fármacos a seus alvos citosólicos e nucleares (SIMÕES *et al.*, 2004; JÚNIOR *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2013).

A desestabilização dos lipossomas pH-sensíveis se deve ao fato desses lipossomas constituírem-se de fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) (**Figura 6 e Figura 8**). As moléculas de DOPE se organizam em meio aquoso, à temperatura ambiente, sob a forma hexagonal invertida (H_{II}), não sendo capazes de se apresentarem na forma de bicamadas (SIEGEL, 1986).

Diferentemente da maioria dos fosfolípides, a DOPE possui uma cabeça polar pequena e pouco hidratada que ocupa um pequeno volume, quando comparado com o das respectivas cadeias de hidrocarbonetos, resultando em uma geometria molecular do tipo cone. Esse formato favorece o estabelecimento de fortes interações intermoleculares entre os grupos amino e fosfato da sua cabeça polar, o que explica a tendência dessas moléculas a adquirirem a forma hexagonal invertida. A formação de lipossomas com esses fosfolípides requer a adição de agentes estabilizantes, normalmente lípides carboxilados, como o hemisuccinato de colesterol (CHEMS) (**Figura 6 e Figura 8**), que em pH fisiológico se encontram sob a forma ionizada. Esses estabilizantes são capazes de se inserirem entre as moléculas de fosfolípides, sendo que o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre os grupamentos carboxila, presentes no estabilizante, e os grupos fosfato da DOPE favorecem a organização lamelar, possibilitando a formação dos lipossomas. A exposição desses lipossomas pH-sensíveis a um meio ácido, como no interior dos endossomos, resulta na protonação dos agentes estabilizantes havendo então a desestabilização das vesículas e a liberação do material encapsulado (DE OLIVEIRA *et al.*, 1998; SIMÕES *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2013) (**Figura 6**).

Figura 6 - Representação esquemática da organização estrutural da DOPE na ausência e na presença de CHEMS e das modificações de fase desencadeadas pelo pH



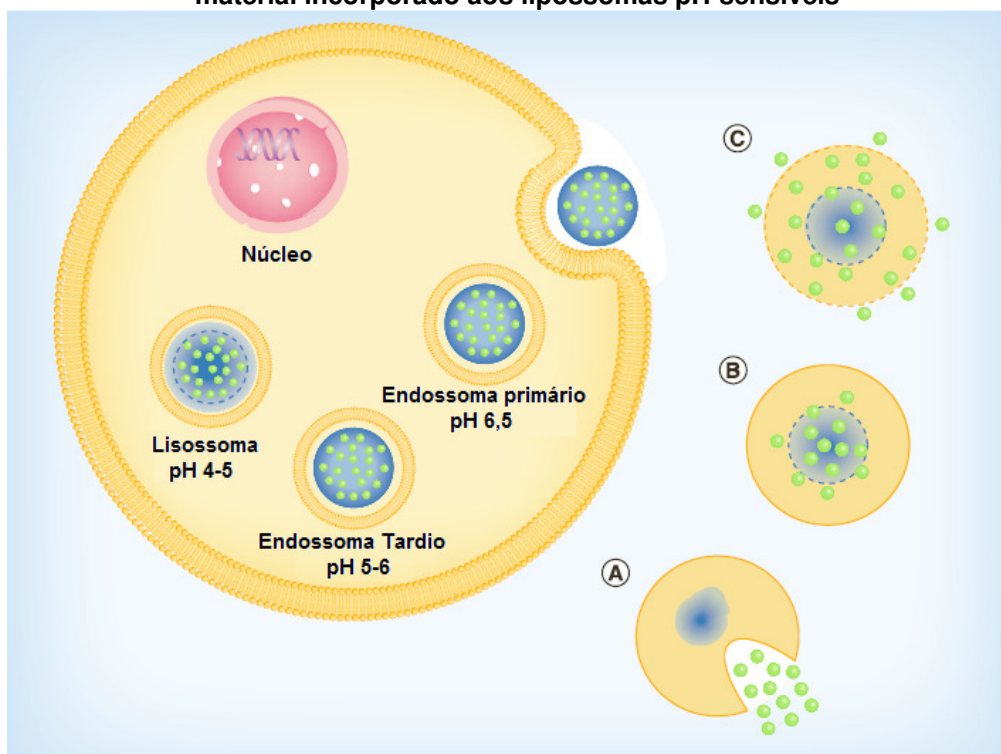
Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2013.

Os lipossomas pH-sensíveis (constituídos por derivados de PE) também apresentam maior capacidade de internalização celular devido à pobre hidratação da cabeça polar da PE e devido à tendência dessas moléculas de PE se organizarem na fase H_{II} , o que facilita o processo de fusão das membranas durante a internalização (FERREIRA *et al.*, 2013).

Os mecanismos moleculares pelos quais os lipossomas transpõem a membrana endossomal para alcançarem o citoplasma ainda não estão totalmente esclarecidos. Entretanto, algumas hipóteses são postuladas para explicar esse processo (**Figura 7**). Uma primeira hipótese propõe que após a endocitose, a membrana dos lipossomas pH-sensíveis pode se fundir à membrana endossomal havendo a liberação do material encapsulado para o citoplasma, sendo que esse processo ocorre devido às propriedades fusogênicas da bicamada constituída pela DOPE (**Figura 7-A**). Outra possibilidade é que após a desestabilização dos lipossomas, as moléculas encapsuladas se difundam pela membrana endossomal para o citoplasma (**Figura 7-B**). Por fim, sugere-se que a desestabilização dos lipossomas pH-

sensíveis promova o início da desestabilização da membrana endossomal, provavelmente pela formação de poros, que conduz à liberação do conteúdo encapsulado para o citoplasma (**Figura 7-C**) (SIMÕES *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2013).

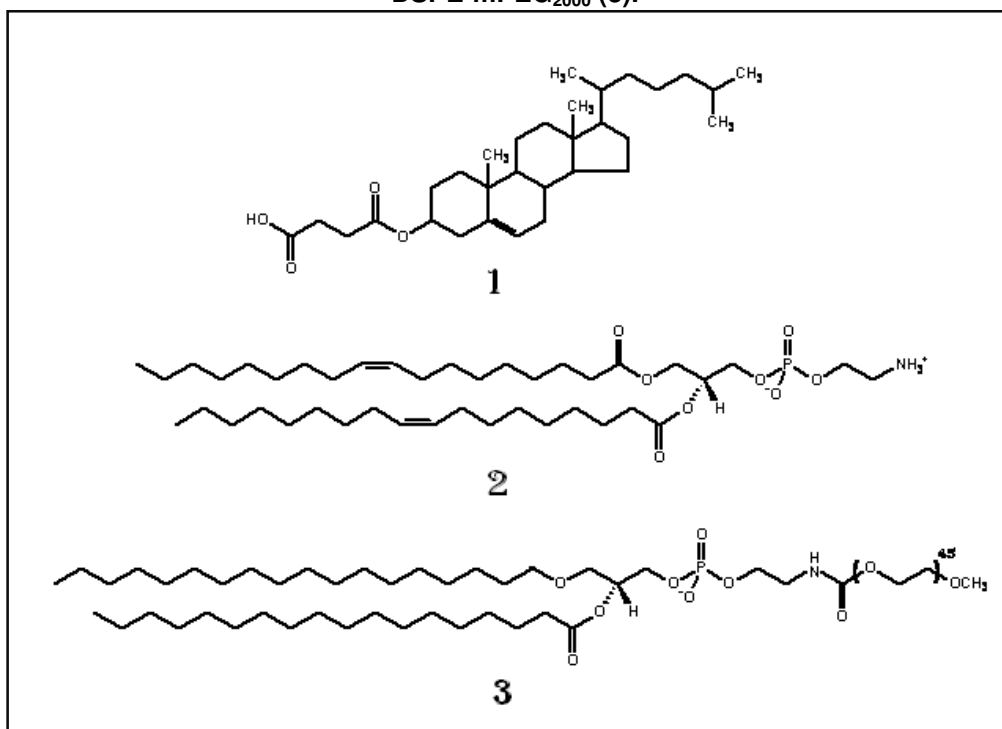
Figura 7- Mecanismos propostos para a liberação intracitoplasmática do material incorporado aos lipossomas pH-sensíveis



Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2013.

Embora tenha sido demonstrado que os lipossomas pH-sensíveis compostos de PE sejam eficientes em liberar diversas moléculas no citoplasma, sua aplicação *in vivo* é limitada devido a sua moderada estabilidade e/ou rápida remoção pelo SFM após administração intravenosa. Neste contexto, a associação do fosfolípide diestearilfosfatidiletanolamina acoplado ao metóxi-poli-etilenoglicol (DSPE-mPEG) (**Figura 8**) aos lipossomas pH-sensíveis contendo DOPE/CHEMS, possibilita um aumento no tempo de circulação sanguínea desses lipossomas mantendo-se as propriedades de pH-sensibilidade (DRUMOND *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2004; ROUX *et al.*, 2004).

Figura 8 – Estruturas químicas de CHEMS (1), DOPE (2) e DSPE-mPEG₂₀₀₀ (3).



2.5 Caracterização das propriedades físicas, químicas e físico-químicas dos lipossomas

O comportamento de lipossomas, tanto em relação à estabilidade de armazenamento como em meios biológicos, é determinado por fatores tais como diâmetro, carga de superfície das vesículas e a quantidade de soluto incorporado. Desta forma, é fundamental a determinação e controle de tais parâmetros para assegurar a eficiência terapêutica e a estabilidade das formulações lipossomais (NEW, 1990; LASIC, 1998).

2.5.1 Diâmetro das vesículas

O diâmetro das partículas é uma propriedade de fundamental relevância em relação à estabilidade e segurança dos nanossistemas lipídicos empregados para administração parenteral. Uma população de partículas de diâmetro elevado pode indicar decaimento de estabilidade da formulação mediante agregação/fusão das vesículas ou mesmo indicar inadequabilidade do processo de preparo dos nanossistemas (KLANG *et al.*, 1998). A evolução do

diâmetro das partículas ao longo do tempo pode ser utilizada para prever a estabilidade da preparação. A manutenção do diâmetro das partículas torna-se uma forte evidência que a estabilidade da formulação foi mantida (SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000). O diâmetro reduzido das partículas confere estabilidade contra a sedimentação, pois o movimento Browniano das partículas torna a taxa de difusão mais elevada que a sedimentação induzida pela força da gravidade (SOLANS *et al.*, 2005). O perfil de distribuição e a extensão da eliminação dos lipossomas, após administração, *in vivo*, também são influenciados pelo diâmetro e pela carga desses nanocarreadores. Além disso, o diâmetro das partículas na formulação deve ser rigorosamente controlado para se garantir a segurança na administração endovenosa das formulações. Partículas de diâmetro elevado, presentes em formulações para aplicação intravenosa, podem ocasionar embolia pulmonar com consequências drásticas e até mesmo fatais (HASKELL *et al.*, 1998).

Vários métodos podem ser empregados com o propósito de se avaliar o diâmetro das vesículas lipossomais, dentre estas estão compreendidas técnicas de espalhamento da luz (estático e dinâmico); técnicas microscópicas (microscopia eletrônica e microscopia de força atômica) e a técnica de cromatografia por exclusão de tamanho (EDWARDS & BAEUMNER A. J., 2006; LOPES *et al.*, 2013b). Destaca-se, sobretudo, a técnica denominada espectroscopia de correlação de fótons (*Photon Correlation Spectroscopy* - PCS) cujo fundamento consiste em atravessar determinada amostra com um feixe de laser, de modo que as partículas presentes espalhem a luz. O espalhamento da luz está relacionado ao movimento browniano das partículas, de modo que a intensidade da luz espalhada por estas forme um padrão de movimento. Por meio da dispersão da luz, torna-se então possível determinar o diâmetro médio das partículas. Partículas menores são capazes de movimentarem mais rapidamente e causam rápidas modificações no espalhamento da luz. Por outro lado, partículas de maior diâmetro, as quais possuem menores coeficientes de difusão, resultam em menores flutuações na intensidade do espalhamento da luz. As vantagens da técnica de PCS incluem a capacidade de realização de medidas no meio original das amostras; a sensibilidade do método a pequenas quantidades de agregados de elevado

peso molecular; necessidade de volume de amostra reduzido e facilidade no preparo da amostra para leitura. Entretanto, a técnica não possibilita informações a respeito da morfologia das vesículas sendo que esta informação poderá ser obtida pelo emprego de técnicas microscópicas de análise (HASKELL *et al.*, 1998; LAOUINI *et al.*, 2012).

2.5.2 Potencial zeta

O potencial zeta pode ser definido como o potencial existente na fronteira entre a superfície de uma partícula individual e seus íons associados, no plano de cisalhamento. A carga não pode ser medida diretamente, mas pode-se determinar a grandeza da carga elétrica pelas medidas de mobilidade eletroforética das partículas submetidas à aplicação de um determinado campo elétrico (FLORENCE & ATTWOOD, 2003). A maioria das dispersões coloidais apresentam cargas elétricas de superfície cuja origem está relacionada à natureza química dos constituintes da partícula e ao próprio meio de dispersão. Os mecanismos mais importantes para geração das cargas são a ionização dos grupos de superfície (dissociação de grupos ácidos ou bases) e adsorção de espécies carregadas à superfície das partículas (LAOUINI *et al.*, 2012).

A medida do potencial zeta é uma ferramenta muito útil na avaliação das interações repulsivas entre as partículas coloidais e é comumente utilizada para avaliar a sua estabilidade. Valores de potencial zeta elevados (negativa ou positivamente) indicam que haverá repulsão entre as partículas reduzindo assim a tendência de agregação das mesmas. Dispersões coloidais com valores de potencial zeta em torno de ± 30 mV são geralmente consideradas estáveis. Entretanto, esta regra não pode ser rigorosamente aplicada para sistemas que contêm estabilizantes estéricos, os quais diminuem o valor numérico do potencial zeta devido à mudança do plano de cisalhamento da partícula (NEW, 1990 ; HEURTAULT *et al.*, 2003; LAOUINI *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2013a).

Para a determinação do potencial zeta dos lipossomas utiliza-se um método que consiste na incidência de um feixe de luz e aplicação de um campo elétrico

de força conhecida através da amostra. Nesse, as partículas carregadas se deslocam com velocidades distintas induzindo deslocamentos da frequência do feixe de luz incidente, gerando um espectro de frequências. As frequências são então utilizadas para os cálculos das velocidades, as quais são convertidas para valores de mobilidades eletroforéticas (MALVERN INSTRUMENTS, 1996).

2.5.3 Teor de encapsulação

O maior desafio no desenvolvimento de lipossomas está relacionado à obtenção de eficiência e estabilidade na encapsulação do fármaco (LASIC, 1998). A caracterização química de lipossomas por determinação do teor de encapsulação é essencial uma vez que a eficácia de lipossomas *in vivo*, bem como suas propriedades físicas e físico-químicas, dependem do total de fármaco incorporado a esses nanossistemas (LOPES *et al.*, 2013b).

A obtenção de teores de encapsulação elevados é importante, e pode ser alcançada pela escolha correta do método de encapsulação bem como dos ajustes adequados na composição lipídica da membrana. A relação fármaco/lípide também deve ser maximizada, visto que determina a quantidade de lípide a ser administrada ao paciente. Assim, quanto menor for a quantidade de lípide veiculada, menores serão os riscos de efeitos colaterais associados aos mesmos (SWARBRICK & BOYLAN, 1994; FRÉZARD *et al.*, 2005).

Diversos métodos são empregados para análise do teor de encapsulação de fármacos nos lipossomas. Destacam-se os métodos de espectrofotometria, espectroscopia de fluorescência, métodos enzimáticos, técnicas eletroquímicas e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (SWARBRICK & BOYLAN, 1994; EDWARDS & BAEUMNER, 2006). Essas diferentes técnicas analíticas podem ser empregadas também para monitorar a estabilidade de armazenamento de lipossomas em relação à retenção/liberação do material encapsulado ao longo do tempo (LAOUIINI *et al.*, 2012).

2.5.4 Morfologia dos lipossomas

A caracterização morfológica dos lipossomas é de fundamental importância para garantir que as formulações desenvolvidas apresentem as propriedades físicas desejadas que terão impacto na incorporação do agente antitumoral nesses sistemas, no seu comportamento *in vivo* (biodistribuição e atividade antitumoral) assim como na sua estabilidade de armazenamento. O emprego da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) possibilita a análise morfológica dos lipossomas e objetiva a caracterização desses nanossistemas mediante a avaliação de parâmetros como lamelaridade e diâmetro, bem como a observação de alterações relacionadas aos fenômenos de agregação e fusão das partículas (NEW, 1990).

O princípio da técnica de MET consiste na emissão de um feixe de elétrons por um filamento de tungstênio aquecido que promove a emissão termoiônica de elétrons que são acelerados em um tubo sob alto vácuo em direção à amostra. O feixe eletrônico transmitido incide sobre uma tela fluorescente, um filme fotográfico ou uma câmera de vídeo, gerando a imagem da amostra (OREFICE *et al.*, 2006).

A principal vantagem relacionada ao emprego de MET é sua elevada resolução que possibilita a análise de detalhes estruturais de lipossomas como a lamelaridade (BIBI *et al.*, 2011). Entretanto, na análise de lipossomas por MET, o processo de desidratação durante o preparo da amostra pode causar o encolhimento da partícula e distorção no diâmetro e o pré-tratamento da amostra com corantes específicos pode gerar artefatos e causar alterações na estrutura original vesicular. As manchas dos próprios corantes podem também levar à formação de franjas claras e escuras que podem ser interpretadas como estruturas lamelares na amostra a ser analisada. Além disso, o alto vácuo e o bombardeamento de elétrons, característicos em MET, também podem causar alterações na morfologia dos lipossomas. Neste contexto, algumas variações relacionadas ao preparo de amostra podem otimizar a análise e reduzir a ocorrência de artefatos, como por exemplo, a adoção de processos de criofratura da amostra (SEDDON, 1990; BIBI *et al.*, 2011).

Uma das técnicas de preparo para análise por MET mais comumente utilizadas consiste na coloração negativa dos lipossomas. Como a possibilidade de espalhamento elástico é diretamente relacionada ao número atômico e considerando-se que as bicamadas de fosfolípides dos lipossomas são constituídas basicamente por carbono e hidrogênio, pode-se prever que haverá baixo espalhamento eletrônico por estas estruturas. Dessa forma, o contraste é fornecido por sais de metais pesados como o acetato de uranila, por tetróxido de ósmio ou por ácido fosfotúngstico, os quais espalham fortemente os elétrons. A partir da coloração negativa, o fundo encontra-se corado e os lipossomas não. Dessa forma, nas imagens por MET, a região exterior das vesículas aparecem em preto enquanto a área interna é visualizada na cor branca (NEW, 1990; BIBI *et al.*, 2011).

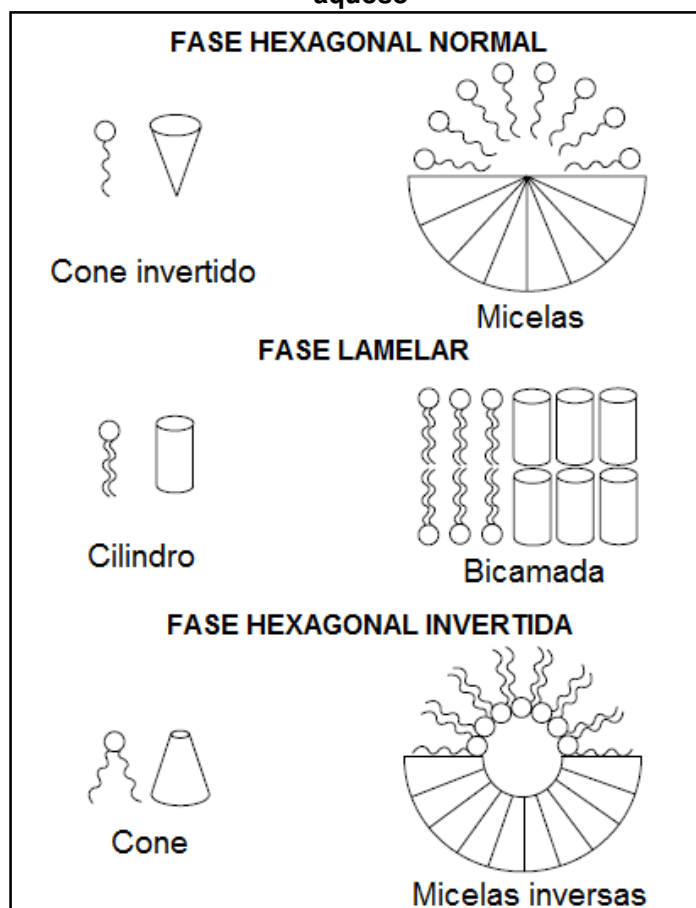
2.5.5 Análise da transição de fase dos lípides

Os fosfolípides, componentes das bicamadas dos lipossomas, são moléculas anfifílicas que, quando dispersos em água, podem formar diferentes fases. Dependendo da temperatura, geometria molecular dos lípides e as condições da mistura lípide-água, as moléculas dos lípides podem se organizar de diferentes formas. Alguns lípides monocatenários, como os lisolípides, nos quais a cabeça polar ocupa um maior volume do que a cadeia hidrofóbica, apresentam geometria em cone invertido e organizam-se na fase hexagonal normal. Já em outros tipos de fosfolípides bicatenários, como as fosfatidilcolinas, há um equilíbrio entre o volume ocupado pela porção polar e o volume ocupado pela porção hidrofóbica da molécula, apresentando uma geometria cilíndrica e organizando-se na fase lamelar. Já os fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina (como a DOPE), apresentam uma porção polar de tamanho reduzido a qual ocupa um menor volume que a porção hidrofóbica da molécula, apresentando geometria em cone e organizando-se na fase hexagonal invertida (H_{II}) (**Figura 9**) (SIMÕES *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2013).

As fases lamelares são classificadas em lamelar cristalina (L_C), lamelar gel (L_β) e lamelar fluida (L_α). As transições de fase dos lípides ocorrem a determinadas

temperaturas sendo que a principal transição de fase ocorre na temperatura na qual a membrana lipídica passa de uma fase lamelar ordenada rígida (L_{β}) para uma fase lamelar fluida (L_{α}) onde há elevado grau de liberdade das moléculas. A partir da fase L_{α} , podem ocorrer mais transições de fase com o aumento da temperatura. Essas transições são relativas à transição de uma fase lamelar para fases não lamelares do tipo invertido (água em óleo). Geralmente, a seqüência das fases não lamelares inicia-se com a fase cúbica invertida (Q_{II}) e depois passa para a fase hexagonal invertida (H_{II}). Nem todas as transições descritas anteriormente ocorrem necessariamente para um único fosfolípide, pois depende da estrutura molecular do mesmo (MARSH, 1991; NEW, 1990 ; LOPES *et al.*,2013b).

Figura 9 - Fases de agregação dos lípides em meio aquoso



Adaptado de LASIC,1998.

Sabe-se que a fluidez da bicamada, depende da temperatura de transição de fase do estado lamelar gel (L_{β}) para o estado lamelar fluido (L_{α}) (T_m). Quando a temperatura do meio é igual à T_m , as cadeias carbônicas dos lípides passam do estado ordenado (sólido) para o estado fluido no qual as cadeias carbônicas encontram-se desordenadas e têm grande liberdade de movimento. Desta forma, de acordo com a T_m , as membranas lipossomais de diferentes composições podem exibir diferentes níveis de fluidez sob as mesmas condições de temperatura. A permeabilidade da bicamada depende da fluidez da membrana e da natureza do soluto incorporado. A taxa de permeabilidade mais elevada ocorre na T_m e é menor no estado “gel” em comparação com o estado fluido (FRÉZARD *et al.*, 1999).

Uma grande variedade de métodos físicos são empregados na investigação das transições de fase dos fosfolípides. Esses incluem a calorimetria exploratória diferencial (DSC) para o estudo da termodinâmica e das temperaturas de transição de fase; difração de raios-x e microscopia eletrônica, para o estudo de mudanças estruturais e dimensionais; e, técnicas espectroscópicas, particularmente a ressonância magnética, para o estudo das mudanças na dinâmica lipídica (MARSH, 1991).

Neste contexto, um dos principais parâmetros avaliados na caracterização físico-química de lipossomas incluem a determinação da fase e das temperaturas de transição de fase dos lípides. A determinação das transições de fase e da fluidez da membrana lipídica são importantes, uma vez que esses parâmetros influenciam a estabilidade e a farmacocinética de lipossomas nos sistemas biológicos (LOPES *et al.*, 2013b).

2.5.5.1 Espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS)

O emprego da técnica de espalhamento de raios-x na identificação da organização supramolecular do fosfolípide estrutural na presença dos diferentes componentes dos lipossomas é de fundamental relevância para que se possa compreender os mecanismos de associação da droga aos

lipossomas bem como para o entendimento da estabilidade desses nanossistemas.

Os raios-x, utilizados rotineiramente em estudos de análise estrutural, podem ser obtidos a partir de fontes de luz síncroton. A radiação síncroton é emitida por elétrons ou pósitrons em velocidade próxima à velocidade da luz em um anel circular. Os elétrons emitem radiação síncroton quando são acelerados radialmente na passagem por campos magnéticos colocados em alguns pontos da trajetória do anel de armazenamento. A radiação síncroton tem fluxo de algumas ordens de grandeza maior (aproximadamente 10^{12} fótons/s) que as demais fontes, possibilitando obtenção de padrões de difração com elevado grau de informação (DONG & BOYD, 2011).

A partir das medidas de difração de raios-x é possível determinar a fase estrutural em que o sistema lipídico se encontra estudando as distâncias intermoleculares que estão relacionadas com o ângulo de espalhamento mediante o emprego da expressão:

$$n.\lambda = 2.d.\text{sen } \theta$$

onde n é um número inteiro de ordem de difração, λ é o comprimento de onda do feixe de raios-x incidente, d é a distância entre os planos cristalinos e θ é o ângulo de incidência.

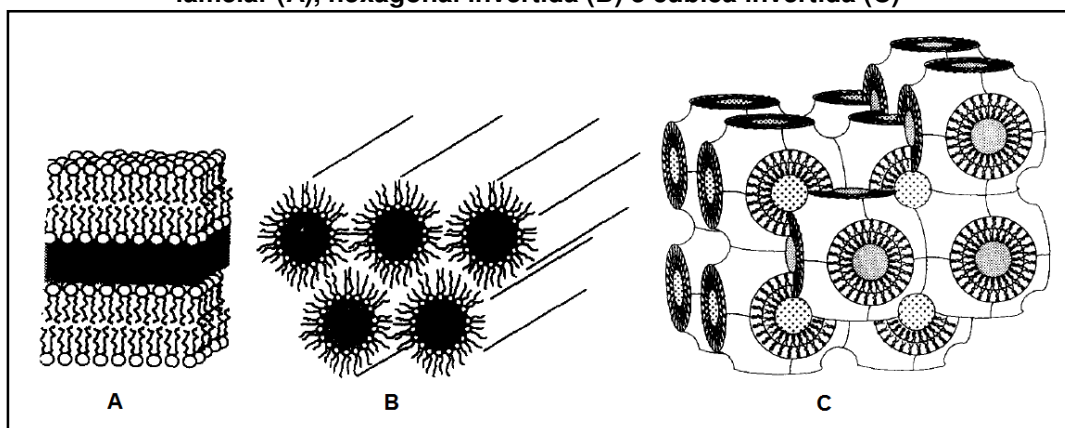
A técnica de espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS) é empregada para caracterizar a estrutura de macromoléculas com dimensões nanométricas. O emprego da técnica de SAXS na análise de lipossomas possibilita a obtenção de informações referentes às mudanças estruturais dos lipossomas desencadeadas após um estímulo específico (pH, temperatura, luz, etc.) o qual pode estar relacionado à desestruturação dos lipossomas com consequente liberação do material encapsulado (DONG & BOYD, 2011). Essas informações são dadas a partir da determinação das diferentes fases de organização das moléculas dos lípidos formadores dos lipossomas.

A caracterização das mesofases lipídicas por SAXS fundamenta-se primeiramente na simetria. Informações sobre a organização das fases estão contidas nas regiões de baixo ângulo dos padrões de difração: o ordenamento de longa extensão dos agregados lípide/água (bicamada, cilindros, micelas, etc) numa rede de uma, duas ou três dimensões fornece razões de reflexão de Bragg apresentando razões características para os diferentes espaços recíprocos, como por exemplo (LINDBLOM & RILFORS, 1989; SEDDON, 1990; TATE *et al.*, 1991):

- 1) Lamelar : razões iguais a 1, 2, 3, 4 ...
- 2) Hexagonal : razões iguais a 1, $\sqrt{3}$, 2, $\sqrt{7}$, 3, $\sqrt{12}$, $\sqrt{13}$...
- 3) Cúbicas : razões iguais a 1, $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$, 2, $\sqrt{6}$, $\sqrt{8}$, 3 ... (espaçamento $Pn3m$)
 razões iguais a 1, $\sqrt{2}$, 2, $\sqrt{6}$, $\sqrt{8}$, $\sqrt{10}$... (espaçamento $Im3m$)
 razões iguais a 1, $\sqrt{2}$, 2, $\sqrt{5}$, $\sqrt{6}$, $\sqrt{8}$... (espaçamento $Pm3n$)

O empacotamento molecular das diferentes fases descritas anteriormente encontra-se esquematizado na **Figura 10**.

Figura 10 - Representação esquemática do empacotamento molecular das fases lamelar (A), hexagonal invertida (B) e cúbica invertida (C)



Adaptado de TATE *et al.*,1991.

2.5.5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O emprego da técnica de DSC possibilita a medida da quantidade de energia que é absorvida ou liberada pela amostra em função da temperatura. Como consequência direta das medidas de energia, a temperatura precisa da amostra pode ser monitorada em qualquer ponto durante o experimento. Desta forma, as medidas obtidas pela técnica de DSC para os lipossomas permitem a identificação das temperaturas de transição de fase do fosfolípide estrutural (por exemplo, a DOPE), na presença dos diferentes componentes dos lipossomas e é de fundamental relevância para que se possa compreender os mecanismos de associação da droga aos lipossomas.

O comportamento de fase da DOPE revela a presença de fases essenciais para a formação e desestabilização dos lipossomas pH-sensíveis, as quais são a fase lamelar alfa (L_α) e fase hexagonal (H_{II}), respectivamente, sendo que a temperatura de transição entre essas fases pode ser determinada pelo emprego da técnica de DSC.

Portanto, as técnicas de SAXS e DSC são complementares no estudo de transição de fase estrutural e possibilitam a elucidação das interações entre a droga incorporada e os materiais formadores dos lipossomas.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS GERAIS

Esta tese de doutorado tem como objetivo desenvolver, caracterizar química, físico-química e morfologicamente, e avaliar a estabilidade dos lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo AU (SpHL-AU), bem como executar estudos, *in vitro*, para determinação da citotoxicidade desses nanossistemas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar método analítico para doseamento de AU por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Desenvolver lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo AU (SpHL-AU);
- Caracterizar os SpHL-AU mediante a determinação do diâmetro e morfologia das partículas, potencial zeta e teor de encapsulação;
- Estudar a estabilidade química e físico-química das formulações de SpHL-AU;
- Avaliar a citotoxicidade de SpHL-AU em linhagens de células tumorais de próstata (LNCaP) e de mama (MDA-MB-231);
- Estudar as transições de fase dos lípides constituintes dos SpHL-AU pelo emprego das técnicas de DSC e SAXS;
- Estudar o efeito da variação de pH e dos constituintes do meio de cultura sobre a organização supramolecular dos lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada não contendo AU (SpHL-BR) e dos SpHL-AU empregando-se a técnica de SAXS.

TRABALHO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 1

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA,
FÍSICO-QUÍMICA, MORFOLÓGICA E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE
CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO**

1 INTRODUÇÃO

Devido à necessidade de viabilizar a administração *in vivo* do AU, pelas razões discutidas previamente, a primeira etapa do trabalho consistiu no estudo do método de preparo dos SpHL-AU assim como na sua caracterização química, físico-química, morfológica e na avaliação da estabilidade de armazenamento. Além disso, foi investigada a ação citotóxica desses nanossistemas em linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231) e de próstata (LNCaP).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A DOPE e o DSPE-mPEG₂₀₀₀ foram comprados da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O AU padrão (grau de pureza 98%), hemisuccinato de colestera (CHEMS), cloreto de sódio, hidróxido de sódio, Triton X-100[®], tampão salina-fosfato (PBS), dodecilsulfato de sódio (SDS) foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St Louis, EUA). O meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), reagente metiltiazoltetrazólio (MTT), soro fetal bovino (SFB), penicilina, estreptomicina foram adquiridos da Gibco[®] (Grand Island, NE, EUA). O metanol de grau para CLAE foi obtido da Fisher Científica (Nova Jersey, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. A linhagem celular MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário) foi gentilmente fornecida pelo Professor Dr. Alfredo Miranda de Goes (Laboratório de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG). A linhagem LNCaP (carcinoma de próstata) foi adquirida da *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, Virgínia, EUA).

2.2 Validação de método analítico para doseamento de AU por CLAE

A validação foi realizada para garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atendesse às exigências analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Os parâmetros investigados para a avaliação do método de CLAE para doseamento de AU foram especificidade; linearidade e intervalo; precisão intradia e interdia; exatidão; limite de detecção e limite de quantificação (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

2.2.1 Condições cromatográficas

O aparato cromatográfico consistiu de uma bomba modelo 515, um auto-injetor modelo 717 Plus e um detector ultravioleta/visível modelo 2487 (Waters Instruments, Milford, MA, EUA) monitorados por um computador utilizando o

software Empower[®]. Para a separação de AU foi utilizada uma coluna Lichrospher[®], octadecilsílica C₁₈, 4,0 mm x 250 mm, 5 µm (Merck S.A. Indústrias Químicas, Darmstadt, Alemanha). O sistema eluente foi constituído pela mistura metanol/água na proporção de 90:10 (v/v), respectivamente. O volume das injeções foi de 20 µL, sendo mantida a velocidade de fluxo da fase móvel igual a 1,5 mL/min. O material eluído foi detectado no comprimento de onda de 210 nm.

2.2.2 Especificidade

Especificidade de um método analítico é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003). Com o objetivo de verificar a interferência de algum constituinte dos lipossomas na análise quantitativa de AU, comparou-se o cromatograma obtido para solução de AU a 40 µg/mL, com o cromatograma obtido após solubilização de lipossomas brancos (em ausência de AU).

2.2.3 Linearidade

Linearidade de um método analítico é a sua habilidade de fornecer resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de um determinado intervalo (ANVISA, 2003). Para a determinação da linearidade do método de CLAE empregado no doseamento de AU, foi construída uma curva de calibração apresentando cinco pontos relativos às diferentes concentrações de soluções de AU em metanol:água (90:10), preparadas em triplicata.

Inicialmente, preparou-se uma solução de 500 µg/mL de AU, solubilizando-se uma alíquota de 10 mg de AU em 20 mL de metanol:água (90:10), transferindo-se quantitativamente 10 mL dessa solução para um balão de 50 mL e completando-se o volume com metanol:água (90:10). A partir dessa solução (100 µg/mL de AU), foram transferidas alíquotas de 0,5 ;1; 2; 4 e 6 mL para

balões volumétricos de 10 mL. O volume de cada balão foi completado com metanol:água (90:10), para obtenção das respectivas concentrações: 5, 10, 20, 40 e 60 µg/mL. As soluções foram mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz, seguido de sua injeção no cromatógrafo líquido, utilizando-se as condições descritas no item 2.2.1. A partir das áreas dos picos obtidos, a curva de calibração foi construída e a linearidade do método foi avaliada mediante o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados utilizando os programas computacionais Microsoft Excel 2010 e Graphpad Prism 5. Foram avaliados os valores dos coeficientes de determinação (r^2) e de correlação (r).

2.2.4 Precisão inter e intradia

A precisão é a avaliação da proximidade das respostas obtidas quando uma série de medidas são realizadas para uma mesma amostra em idênticas condições de teste. Essa é verificada por, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) em triplicata ou um mínimo de seis determinações com 100% da concentração do teste (ANVISA, 2003).

A precisão do método foi determinada em um mesmo dia (intradia ou repetibilidade) e em dias diferentes (interdia ou precisão intermediária). A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR %). Para a determinação da repetibilidade foram preparadas soluções de AU, em triplicata, a 5 µg/mL (concentração baixa), 20 µg/mL (concentração média) e 60 µg/mL (concentração alta) em metanol:água (90:10), as quais foram injetadas em cromatógrafo líquido, utilizando-se as condições descritas no item 2.2.1. Para a determinação da precisão intermediária foram preparadas, em triplicata, as mesmas concentrações das soluções de AU do primeiro ensaio.

2.2.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é expressa pela

relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Os guias do ICH (2005) e da ANVISA (2003) indicam a análise de nove amostras, sendo três de concentração baixa, três de concentração média e três de concentração alta.

Sendo assim, a determinação da exatidão foi realizada em três níveis de concentração de AU (em triplicata), por meio da adição, às formulações de SpHL-BR, de concentrações de AU a 5 µg/mL (concentração baixa), 20 µg/mL (concentração média) e 60 µg/mL (concentração alta).

Os resultados da exatidão foram expressos em porcentagem de recuperação de AU adicionado às formulações, conforme a equação:

$$\text{Rec(\%)} = \frac{C_1 \times 100}{C_2}$$

Onde:

Rec(%)= Percentual de recuperação de AU adicionado

C₁= Concentração de AU determinada na amostra

C₂= Concentração de AU adicionada na amostra

2.2.6 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

A determinação do LD e do LQ foi realizada com base nas equações a seguir:

$$LD = \frac{3 \times \sigma}{b}$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{b}$$

onde σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e b é a inclinação da curva analítica. Estes parâmetros foram obtidos como resultados da análise da linearidade do método (ANVISA, 2003; ICH,2005).

2.3 Preparo de SpHL-AU e SpHL-BR pelo método de Bangham

Alíquotas de DOPE, CHEMS e DSPE-mPEG₂₀₀₀ dissolvidos em clorofórmio, na concentração lipídica total de 20 mM ou 40 mM (razão molar 5,7:3,8:0,5, respectivamente), foram transferidas para um balão de fundo redondo. Uma quantidade de AU equivalente a 0,1% (p/v) ou 0,05% (p/v), foi adicionada à essa solução lipídica. Um filme lipídico foi obtido mediante a evaporação do solvente em rotavapor (Buchi Labortechnik AG CH-9233, modelo R-210, Flawil, Suíça) acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com quantidade de NaOH suficiente para promover completa ionização do CHEMS e, a seguir, foi adicionado solução tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,4. A mistura obtida foi submetida à agitação vigorosa em um vórtex (Mini-shaker Ika, modelo MS1, Wilmington, EUA), originando lipossomas multilamelares.

2.3.1 Calibração das vesículas

A calibração das vesículas lipossomais foi realizada mediante a passagem da dispersão dos SpHL-AU e SpHL-BR em um homogeneizador de alta pressão de estágio único (HAP), modelo APV 2000 (Albertslund, Dinamarca) à 500 Bar, por 12 ciclos. Cada ciclo representa o tempo necessário para que toda a amostra seja homogeneizada, sob pressão constante.

Antes da calibração por HAP, realizou-se uma diluição dos SpHL (50 mL), em tampão PBS, para um volume final de 110 mL para atender o limite mínimo necessário para recirculação da amostra no equipamento.

2.3.1.1 Avaliação da influência do número de ciclos de HAP sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL

A fim de se otimizar as condições para a calibração dos SpHL durante o processo de HAP à 500 Bar, analisou-se a influência do número de ciclos de homogeneização sobre o diâmetro das vesículas lipossomais. Os SpHL foram acrescentados ao recipiente alimentador do HAP e a homogeneização foi realizada sob fluxo contínuo. Ao atingir a pressão desejada, iniciou-se a cronometragem de cada ciclo. O diâmetro das vesículas foi analisado por PCS, conforme será descrito no item 2.4.1, em alíquotas retiradas antes do processo de homogeneização (0 ciclo) e nos tempos correspondentes a 3, 6, 9 e 12 ciclos.

2.3.2 Purificação dos lipossomas

A purificação dos SpHL-AU foi realizada por ultrafiltração em sistema de filtração de fluxo tangencial (Labscale; Millipore, MA, EUA) contendo uma membrana de poliétersulfona modelo Biomax[®] de 500 kDa (Millipore Pellicon XL Device, MA, EUA).

Inicialmente, um volume de 100 mL da dispersão lipossomal foi acondicionado no reservatório de acrílico (recipiente alimentador) no qual era mantido sob agitação constante. Sua passagem foi impulsionada pela bomba peristáltica até a membrana, a qual separava a amostra em duas “fases”, sendo elas: 1) o permeado, composto por tampão PBS contendo AU livre e 2) o retido, composto pelos SpHL-AU. A amostra retida retornava ao reservatório de acrílico e foi recirculada até sua concentração a um volume de aproximadamente 25 mL. Ao final do ciclo, a amostra retida foi reservada. Um volume de 5 mL de solução de tampão PBS foi injetado na membrana para recuperar o volume “morto” de SpHL-AU restante no dispositivo de ultrafiltração

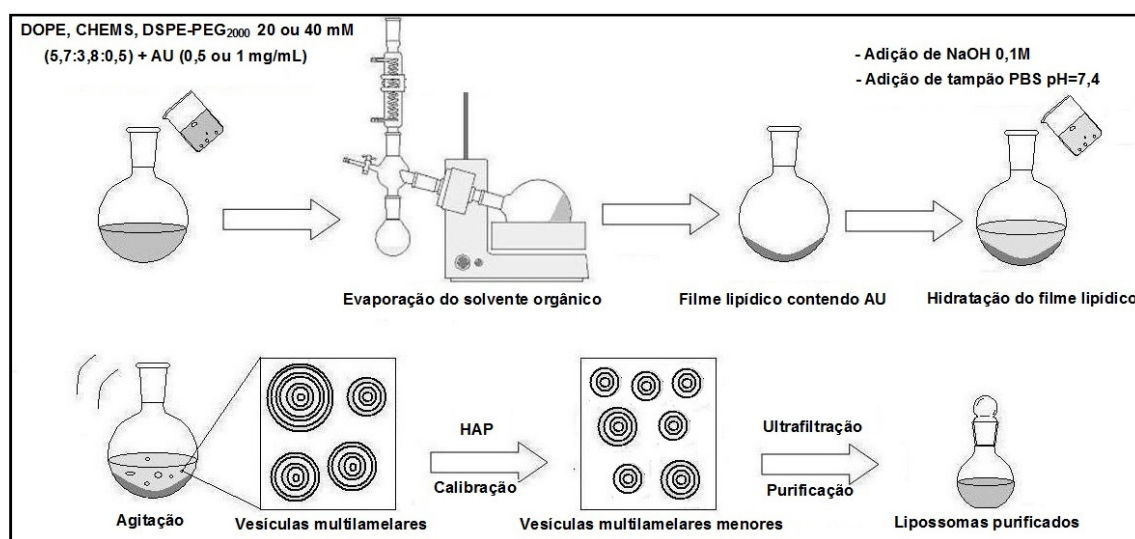
e adicionado à amostra retida, totalizando assim 30 mL de lipossomas purificados e concentrados. A dispersão retida pela membrana (SpHL-AU concentrado) foi reconstituída ao volume inicial de produção (50 mL) adicionando-se solução de tampão PBS.

Empregou-se também o método de purificação dos SpHL-AU por ultracentrifugação, a 150000 x g, a 10 °C, durante 90 minutos em ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-80 XP (Indianápolis, IN, EUA). Após a ultracentrifugação, o pellet foi reconstituído pela adição de tampão PBS, seguida de agitação sob vórtex. Esse método foi utilizado para a purificação dos SpHL-AU durante o estudo de estabilidade de armazenamento pelo fato das limitações de volume das amostras impedirem a utilização do método de ultrafiltração, descrito anteriormente.

Os SpHL-BR foram preparados conforme as etapas descritas anteriormente entretanto sem a etapa de adição de AU.

Os métodos gerais de preparo dos SpHL-AU, descritos anteriormente, encontram-se esquematizados na **Figura 11**.

Figura 11 - Esquema geral de preparo de SpHL-AU pelo método de Bangham



2.3.3 Esterilização final dos lipossomas

Para a esterilização final dos SpHL-AU e SpHL-BR, as preparações lipossomais foram submetidas à irradiação, na dose de 10 kGy, por cerca de 30 minutos (taxa de dose igual a 20,6 kGy/h) em um irradiador panorâmico multipropósito equipado com uma fonte de Cobalto-60 (modelo IR-214, MDS Nordion, Canadá) no Centro para Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear - Comissão Nacional de Energia Nuclear (CDTN-CNEN, Brasil).

2.4 Caracterização química, físico-química e morfológica dos SpHL-AU e SpHL-BR

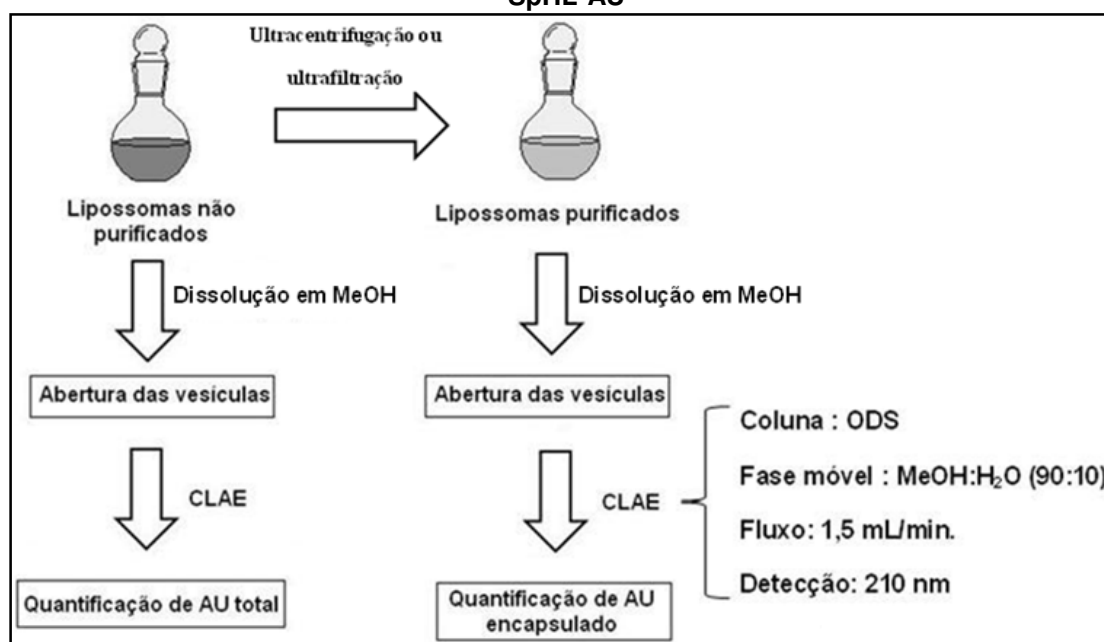
2.4.1 Determinação do diâmetro e do potencial zeta

A análise do diâmetro e do índice de polidispersão das partículas foi realizada por espectroscopia de correlação de fótons à 25 °C e ângulo de 90°. O potencial zeta foi avaliado por espalhamento dinâmico da luz associado à mobilidade eletroforética, à um ângulo de 90°. As medidas foram efetuadas utilizando-se o equipamento Zetasizer 3000Hs (Malvern Instruments Ltd., Inglaterra). As amostras foram diluídas em tampão PBS.

2.4.2 Determinação do teor de encapsulação de AU nos SpHL-AU

A determinação do teor de encapsulação de AU nos SpHL-AU foi realizada após os processos de purificação dos lipossomas, os quais foram então solubilizados com a adição de metanol. Para a determinação da quantidade total de AU nos lipossomas, antes do processo de purificação, os lipossomas foram também solubilizados com metanol. Após esse preparo das amostras, a quantificação de AU foi realizada pelo método de CLAE empregando-se as mesmas condições descritas no item 2.2.1 (**Figura 12**).

Figura 12 – Esquema para determinação do teor de encapsulação de AU nos SpHL-AU



2.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A avaliação morfológica dos SpHL-AU foi realizada pelo emprego da técnica de MET no Centro de Microscopia da UFMG. As amostras foram coradas com solução de contraste contendo ácido fosfotúngstico 2% (p/v), albumina sérica bovina 0,5% (p/v) e sacarose 0,5% (p/v). As amostras foram visualizadas utilizando-se o equipamento Tecnai G2-12-SpiritBiotwin FEI, 80 kV.

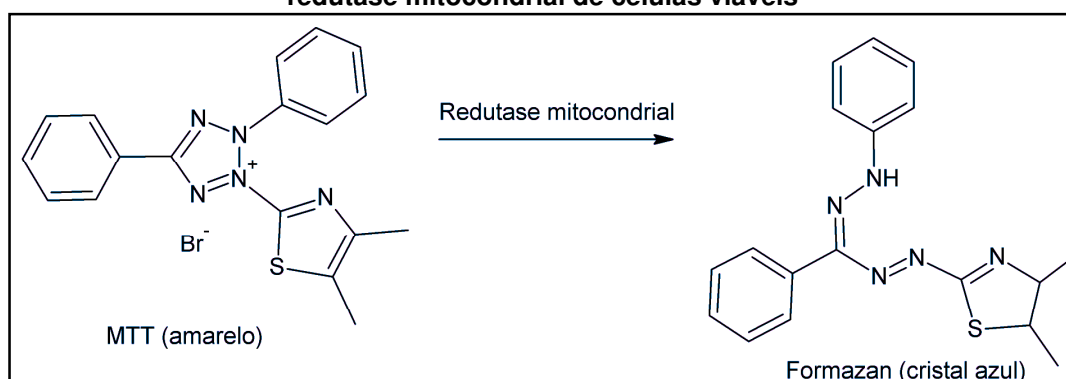
2.5 Avaliação da estabilidade química e físico-química dos SpHL-AU

A avaliação da estabilidade de armazenamento dos SpH-AU foi realizada nos períodos de 15, 30, 60, 90, 120, 180 e 365 dias após o preparo das formulações, as quais foram mantidas em geladeira, a 4 °C. Os parâmetros avaliados foram diâmetro médio, potencial zeta e teor de encapsulação. Os valores médios obtidos foram comparados com aqueles obtidos logo após o preparo das formulações (tempo 0).

2.6 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de metabolização de metiltiazoltetrazólio (MTT)

O ensaio de metabolização de MTT é um método colorimétrico sensível e quantitativo que mensura a viabilidade, proliferação e estado de ativação das células. Esse método baseia-se na capacidade das enzimas succinato desidrogenases, presentes nas mitocôndrias de células viáveis, promoverem a redução do reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio, a cristais de formazan (**Figura 13**), os quais são quantificados por método espectrofotométrico (MOSMANN, 1983).

Figura 13 – Reação de redução do MTT (amarelo) a cristais azuis de formazan pela redutase mitocondrial de células viáveis



Adaptado de KRONEK *et al.*, 2012.

Resumidamente, alíquotas contendo 1×10^4 (LNCaP) e 2×10^3 (MDA-MB-231) células por poço foram semeadas em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação a 37 °C e CO₂ a 5%, as soluções de AU livre e SpHL-AU foram

adicionadas aos poços (intervalo de concentração de AU de 1,2 a 40 μ M). AU livre foi dissolvido em DMSO antes da diluição. Após 48 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, o meio de tratamento foi removido e descartado e, em seguida, adicionou-se 100 μ L de meio de cultura contendo 10% de SFB (v/v) e 0,5 mg de tetrazólio/mL em cada poço da placa de cultura. Após duas horas de incubação, os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 μ L de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (p/v) em HCl 0,01 M. A viabilidade celular foi estimada pela medida da taxa de redução de MTT mediante a avaliação da absorbância dos cristais de formazan formados, no comprimento de onda de leitura de 595 nm. Os grupos controle foram constituídos por tratamentos com DMSO e com lipossomas brancos. Os valores de absorbância do grupo controle (isento de tratamento) foram considerados como 100% para cálculo da porcentagem de alteração da viabilidade celular induzida pelos tratamentos.

Após a execução do ensaio descrito acima, foi possível a determinação das concentrações de AU (na forma livre e incorporado aos lipossomas) necessárias para promover 50% de inibição da proliferação celular (IC₅₀), nas linhagens celulares estudadas. Os dados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em comparação com o controle (média $\pm$ D.P). Pelo menos três experimentos independentes foram realizados para cada linhagem tumoral estudada.

2.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni e valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos (Graphpad Prism 5.0, Graphpad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ D.P.

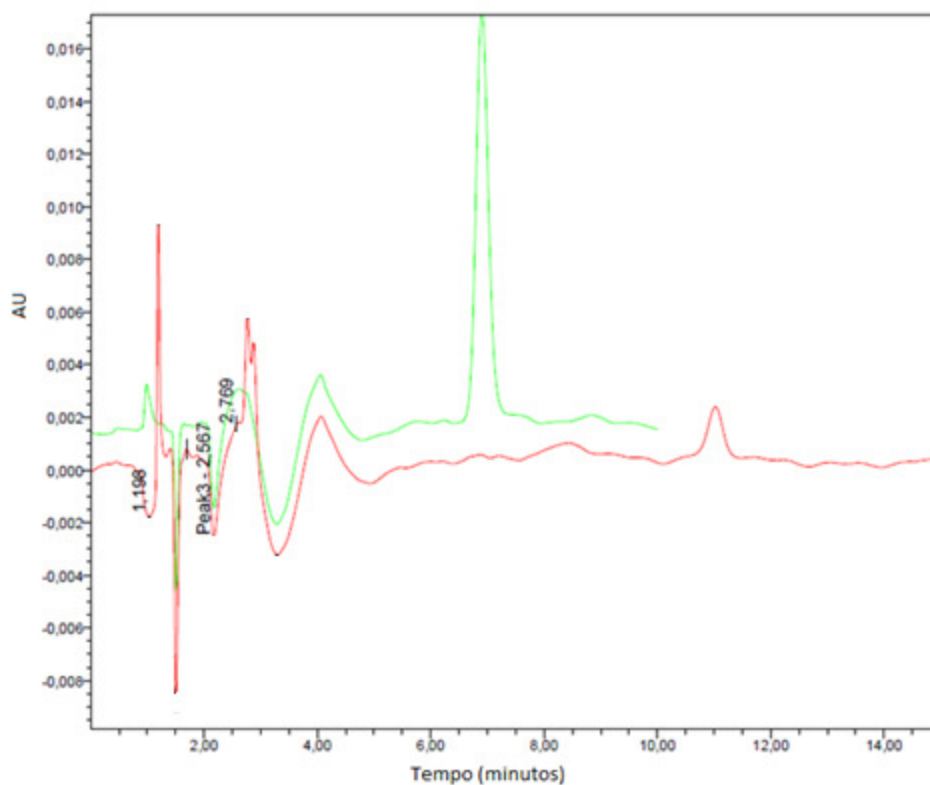
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação do método analítico para doseamento de AU em SpHL-AU por CLAE

3.1.1 Especificidade

Na **Figura 14** estão apresentados o cromatograma da solução de AU na concentração de 40 µg/mL (em verde) e o cromatograma obtido para os lipossomas brancos (em vermelho). O tempo de retenção do pico atribuído ao AU foi de aproximadamente 7 minutos. A análise da sobreposição dos perfis cromatográficos demonstrou que no cromatograma obtido para os lipossomas brancos não foi observado nenhum pico interferente próximo ao tempo de retenção de AU indicando que o método apresentou especificidade para determinação do AU incorporado em lipossomas.

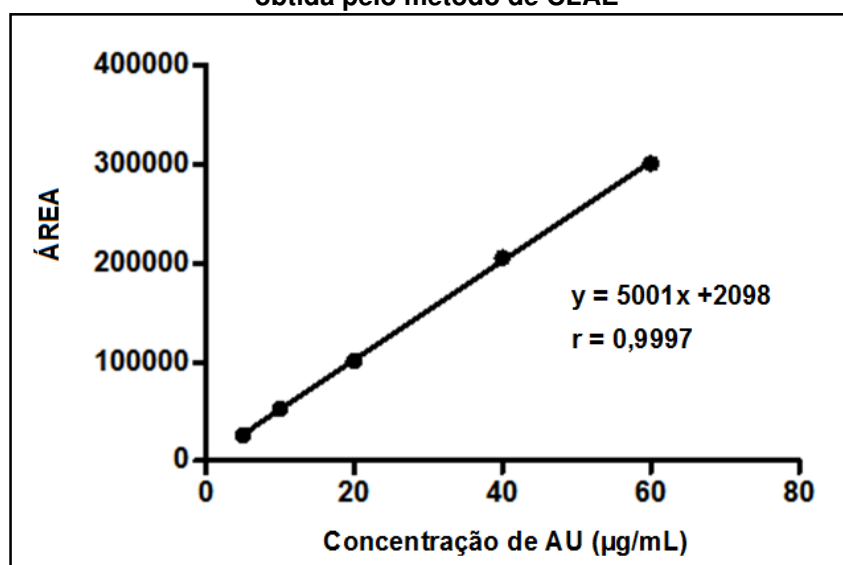
Figura 14 - Sobreposição de perfis cromatográficos obtidos para solução de AU padrão (verde) e lipossomas brancos (vermelho)



3.1.2 Linearidade

A linearidade do método de quantificação de AU por CLAE foi confirmada pela construção da curva padrão no intervalo de concentração de 5 a 60 µg/mL, apresentando um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9997, em conformidade com o especificado ($r > 0,99$) (ANVISA, 2003). A equação da curva de calibração encontrada foi igual a $y = 5001x + 2098$ (**Figura 15**).

Figura 15 – Curva de calibração para o doseamento de AU obtida pelo método de CLAE



Na **Tabela 2** estão listados os principais parâmetros obtidos na análise de regressão linear para doseamento de AU por CLAE.

Tabela 2 - Parâmetros obtidos na análise de regressão linear para doseamento de AU por CLAE

Parâmetros da regressão linear	
Inclinação	$5001 \pm 34,6$
Intercepto	2098 ± 1172
Coefficiente de determinação (r^2)	0,9994
Intervalo	5 – 60 µg/mL

3.1.3 Precisão inter e intradia

Na **Tabela 3** estão apresentados os valores médios das áreas dos picos e os desvios padrão relativos (DPR%) referentes às soluções de AU, de concentrações iguais a 5; 20 e 60 µg/mL, determinados em um mesmo dia e em dias diferentes, respectivamente.

Tabela 3 - Determinação da precisão inter e intradia para o método de doseamento de AU por CLAE.

AC por CEA:					
[] nominal de AU (µg/mL)		ÁREA	[] de AU determinada (µg/mL)	DPR INTRADIA (%)	DPR INTERDIA (%)
5	DIA 1	26280	4,65	3,42	3,59
		24901	4,37		
		26137	4,62		
	DIA 2	26141	4,81	0,24	
		26048	4,79		
		26053	4,79		
20	DIA 1	100900	19,95	3,63	3,64
		107277	21,25		
		107293	21,26		
	DIA 2	101384	19,85	0,3	
		100780	19,73		
		101090	19,79		
60	DIA 1	294544	59,64	1,7	1,26
		303430	61,46		
		295020	59,73		
	DIA 2	299642	59,5	0,49	
		302096	60		
		299625	59,49		

Os valores de DPR% foram inferiores a 5,0%, conforme preconizado pela ANVISA (2003), indicando boa precisão do método analítico empregado para

doseamento de AU em termos de repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia) dos dados.

3.1.4 Exatidão

A **Tabela 4** apresenta os resultados obtidos para a determinação da exatidão do método de doseamento de AU por CLAE.

Tabela 4 - Determinação da exatidão para o método de doseamento de AU por CLAE.

Amostra	[] de AU adicionada (µg/mL)	[] de AU determinada (µg/mL)	Recuperação (%)
1	5,2	5,4	103,8
2	5,2	5,5	105,8
3	4,9	5,1	104,1
1	20,8	20,8	100
2	20,5	20,1	98
3	20,5	20,4	99,5
1	62,9	62,2	98,9
2	61,8	61,8	100
3	63,4	63,9	100,8
Média			101,2
DPR (%)			2,6

Os resultados de exatidão foram satisfatórios, apresentando valores de desvio padrão relativo (DPR) (2,6%), menores que 5,0%, e a recuperação (101,2%) dentro do intervalo de 98 e 102% (GREEN, 1996).

3.1.5 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram determinados conforme equações descritas no item 2.2.6 e os resultados estão descritos abaixo :

LD= 0,7 µg/mL

LQ= 2,34 µg/mL

3.2 Propriedades químicas e físico-químicas dos SpHL-AU e SpHL-BR obtidos pelo método de Bangham

As características químicas e físico-químicas dos SpHL-AU, preparados em diferentes concentrações de lípidos e de AU, estão apresentadas na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Propriedades químicas e físico-químicas de lipossomas em presença e em ausência de AU*

Formulação	Concentração lipídica (mM)	Concentração de AU (mg/mL)	Diâmetro médio (nm)	Potencial zeta (mV)	Teor de encapsulação (mg/mL)
SpHL-20BR	20	---	105,8 ± 3,3	3,2 ± 1,0	---
SpHL-20AU1	20	1	191,1 ± 6,4	1,2 ± 1,4	0,77 ± 0,01
SpHL-20AU0.5	20	0,5	149,4 ± 1,5	1,7 ± 2,6	0,38 ± 0,01
SpHL-40BR	40	---	107,3 ± 2,6	2,9 ± 0,4	---
SpHL-40AU1	40	1	140,4 ± 1,2	4,1 ± 1,3	0,78 ± 0,05
SpHL-40AU0.5	40	0,5	122,8 ± 3,1	4,4 ± 0,5	0,35 ± 0,04

* Os valores são expressos como a média ± D.P (n=3).

Observa-se, pela análise da **Tabela 5**, que a presença de AU ocasionou um aumento no diâmetro médio das vesículas para todas as formulações analisadas. Verificou-se também que a formulação SpHL-20AU1 destacou-se por apresentar elevada concentração de AU incorporado aos lipossomas mesmo no menor nível de concentração lipídica (20 mM).

Seria esperado um maior teor de encapsulação de AU na formulação com maior concentração lipídica (40 mM). Entretanto, sugere-se que pode ter ocorrido a incorporação de praticamente todo o AU adicionado, durante o preparo dos lipossomas, nos dois níveis de concentração lipídica (20 e 40 mM). Então, a perda de AU incorporado (cerca de 20%), em ambos os níveis lipídicos, pode ter ocorrido durante o processo de calibração por HAP. Essas

suposições poderão ser confirmadas em um estudo futuro onde o teor de AU incorporado será avaliado logo após a calibração de SpHL-AU por HAP assim como mediante a adição de concentrações crescentes de AU, superiores a 1 mg/mL, até a observação do limite máximo de incorporação nos níveis lipídicos de 20 e 40 mM. Provavelmente, esse limite máximo seria superior nos lipossomas contendo a maior concentração lipídica.

Considerando-se os resultados representados na **Tabela 5**, a formulação SpHL20AU1 foi então selecionada para os estudos subseqüentes. Pela análise da distribuição das vesículas nos SpHL20AU1, observou-se que cerca de 88% das mesmas apresentavam-se menores que 300 nm (**Tabela 6**). Sabe-se que as preparações lipossomais empregadas no tratamento do câncer devem apresentar diâmetro de vesículas conforme as exigências preconizadas pelos órgãos regulatórios para garantir a segurança e a eficiência terapêutica das formulações (TORCHILIN, 2007).

GAO e colaboradores (2012) realizaram a incorporação do ácido oleanólico (AO), isômero de AU, em quantidade equivalente a 0,1% (p/v), em lipossomas constituídos por fosfatidilcolina de soja, colesterol, monoleato de polioxietileno sorbitano (Tween-80[®]) e PEG₂₀₀₀, pelo método de injeção etanólica. Os lipossomas obtidos nesse estudo apresentaram diâmetro de vesículas inferior a 200 nm e observou-se uma eficiência de encapsulação de AO de cerca de 85%. Esses resultados são similares aos observados para SpHL-20AU1, no presente trabalho, embora tenham sido empregados diferentes constituintes lipídicos e diferentes métodos de preparo (GAO *et al.*, 2012). Pode-se sugerir que a elevada eficiência de encapsulação de AU e AO observada nesses lipossomas esteja associada à alta lipofilicidade destes compostos que favorece as interações dessas drogas com fosfolípidos presentes na bicamada lipídica.

Tabela 6 - Distribuição do diâmetro das vesículas (%) para SpHL-20AU1*

Diâmetro médio (nm)	Distribuição do diâmetro das vesículas (%)			
	≤ 100 nm	≤ 300 nm	300-500 nm	≥ 500 nm
191,1 ± 6,4	72,4 ± 14,7	88,4 ± 7,3	7,1 ± 4,7	4,4 ± 2,6

* Os valores são expressos como a média ± D.P (n=3).

O diâmetro das vesículas lipossomais é um parâmetro extremamente relevante para o carregamento de agentes antitumorais, uma vez que os nanossistemas lipídicos, tais como os lipossomas, tendem a se acumular nos tecidos tumorais devido ao efeito EPR. Neste contexto, lipossomas que apresentam diâmetros médios inferiores a 200 nm demonstram acúmulo preferencial nos tecidos tumorais devido a esse efeito EPR. A vasculatura da região tumoral pode também apresentar poros maiores permitindo o extravasamento de lipossomas com diâmetro de vesículas até cerca de 400 nm. Além disto, usualmente, o diâmetro das vesículas de lipossomas está relacionada com a eficiência de encapsulação (aumenta com o maior diâmetro), com a estabilidade físico-química (reduz com o aumento do diâmetro) e com a habilidade de extravasamento nos alvos terapêuticos (menor com aumento do diâmetro). Desta forma, pode-se concluir que os diâmetros obtidos para os SpHL-20AU1 podem contribuir para a eficiência terapêutica da composição farmacêutica (YUAN *et al.*, 1995; LASIC, 1998; WONG *et al.*, 2007; HUWYLER *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009; TORCHILIN, 2011).

3.2.1 Avaliação da influência do número de ciclos de HAP sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL20AU1

Realizou-se um estudo complementar para investigação da influência do número de ciclos de homogeneização sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL-20AU1 durante o processo de HAP a fim de se otimizar o processo de calibração das vesículas (**Tabela 7**).

Observa-se, pela análise da **Tabela 7**, que os SpHL-20AU1 produzidos apresentaram um diâmetro médio de aproximadamente 390 nm, logo após a

hidratação do filme lipídico. Quando submetidos à homogeneização sob pressão igual a 500 Bar após 3 ciclos, observou-se uma redução significativa no diâmetro médio das vesículas (214 nm) e a obtenção de uma dispersão lipossomal de maior homogeneidade, com cerca de 82% das vesículas com diâmetro inferior a 300 nm. No entanto, não observou-se diferença estatisticamente significativa entre a distribuição do diâmetro de vesículas com o emprego de 3, 6, 9 ou 12 ciclos ($p > 0,05$). Isto indica que após 3 ciclos foi alcançado o limite ótimo de redução do diâmetro das vesículas, nas condições de pressão empregadas. Pode-se sugerir que a redução no número de ciclos, empregados no processo de calibração por HAP, poderá minimizar a suposta perda de AU relacionada a esse processo (discutida no item 3.2) e possibilitar um aumento no teor de incorporação de AU nos SpHL.

Tabela 7 - Influência do número de ciclos empregados no processo de homogeneização sob pressão a 500 Bar sobre o diâmetro das vesículas dos SpHL-20AU1*

Número de ciclos	Diâmetro médio (nm)	Distribuição do diâmetro das vesículas (%)			
		≤ 100 nm	≤ 300 nm	300-500 nm	≥ 500 nm
0	392,5 $\pm$ 39,2	14,0 $\pm$ 11,1	25,0 $\pm$ 12,8	32,8 $\pm$ 7,2	42,3 $\pm$ 12,2
3	213,9 $\pm$ 7,7 ^a	70,0 $\pm$ 9,3 ^a	81,7 $\pm$ 9,3 ^a	8,3 $\pm$ 7,6 ^a	10,1 $\pm$ 1,6 ^a
6	200,6 $\pm$ 5,0 ^a	74,8 $\pm$ 10,7 ^a	85,4 $\pm$ 9,7 ^a	8,7 $\pm$ 5,9 ^a	5,7 $\pm$ 3,8 ^a
9	193,7 $\pm$ 5,1 ^a	78,3 $\pm$ 8,1 ^a	87,2 $\pm$ 8,0 ^a	7,7 $\pm$ 5,0 ^a	4,9 $\pm$ 2,8 ^a
12	193,9 $\pm$ 8,0 ^a	78,4 $\pm$ 6,2 ^a	87,5 $\pm$ 6,4 ^a	7,5 $\pm$ 4,1 ^a	4,9 $\pm$ 2,2 ^a

* Os valores são expressos como a média $\pm$ D.P (n=3). ^a Não há diferença significativa entre os valores representados na mesma coluna ($p > 0,05$).

3.2.2 Avaliação da estabilidade química e físico-química dos SpHL20AU1

A avaliação da estabilidade dos SpHL-20AU1 foi realizada nos períodos de 15, 30, 60, 90, 120, 180 e 365 dias após o preparo das formulações, as quais foram mantidas em geladeira, à 4 °C. Os parâmetros avaliados foram diâmetro médio, potencial zeta e teor de encapsulação. Os valores médios obtidos foram comparados com aqueles obtidos logo após o preparo das formulações (tempo

0). Os SpHL-20AU1 demonstraram adequada estabilidade em termos de diâmetro médio, potencial zeta e teor de encapsulação durante o armazenamento por 1 ano, a 4 °C (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Estabilidade química e físico-química de SpHL-20AU1*

Tempo	Diâmetro médio (nm)	Potencial zeta (mV)	Teor de encapsulação (mg/mL)
Tempo 0	191,1 ± 6,4	1,2 ± 1,4	0,77 ± 0,01
15 dias	210,3 ± 15,2	-1,7 ± 3,1	0,76 ± 0,01
30 dias	221,9 ± 25,3	-1,6 ± 3,5	0,76 ± 0,01
60 dias	212,7 ± 15,3	-1,4 ± 3,6	0,77 ± 0,01
90 dias	208,9 ± 17,9	-0,5 ± 2,2	0,76 ± 0,02
120 dias	228,8 ± 25,8	-0,7 ± 4,8	0,80 ± 0,03
180 dias	209,9 ± 33,4	1,0 ± 2,1	0,77 ± 0,01
365 dias	201,4 ± 25,2	0,4 ± 1,9	0,76 ± 0,01**

* Os valores são expressos como a média ± D.P (n=3). ** Valor expresso como média ± D.P (n=2).

Um fenômeno típico associado à instabilidade das formulações lipossomais é o aumento do diâmetro das vesículas devido à agregação ou fusão das mesmas durante o período de armazenamento. Esse aumento no tamanho das partículas geralmente acarreta uma captação maior pelas células do SFM, após administração sistêmica, promovendo consequentemente eliminação mais rápida dos lipossomas. Além disto, a fusão das vesículas lipossomais também pode acarretar a liberação indesejada do material encapsulado (NEW, 1990; VEMURI & RODES, 1995.; YANG, *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2012).

Em geral, valores de potencial zeta iguais ou maiores que 30 mV (em módulo) contribuem para uma maior estabilidade da formulação, uma vez que há menor tendência de agregação das partículas devido à ocorrência de forças elétricas de repulsão (NEW, 1990). Entretanto, embora os resultados de potencial zeta dos SpHL-20AU1 tenham apresentado valores próximos à neutralidade, não

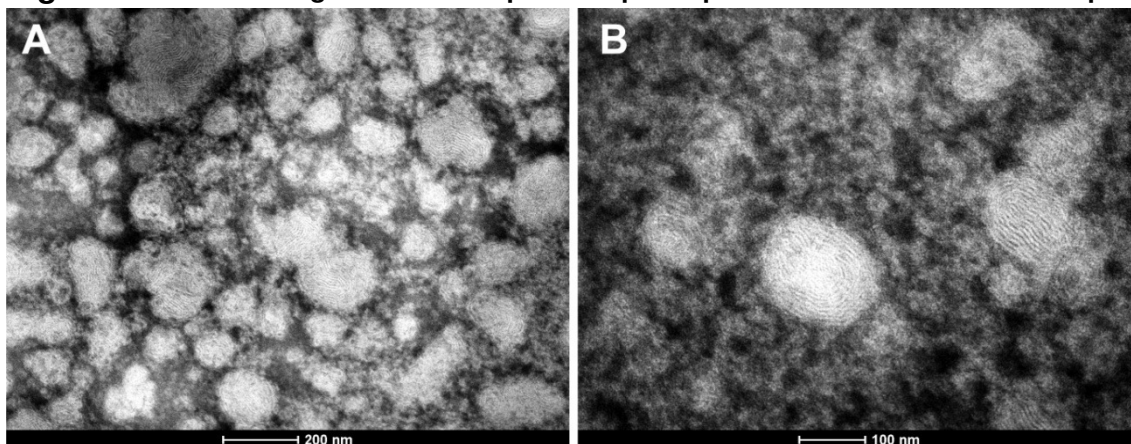
observou-se variação do diâmetro das vesículas ao longo do tempo (**Tabela 8**). Neste contexto, a manutenção do diâmetro das vesículas de SpHL-20AU1, ao longo do tempo de armazenamento, pode ser devido à presença das cadeias de PEG na superfície desses lipossomas as quais podem evitar a ocorrência de agregação de vesículas, e consequentemente, possibilitar a manutenção da estabilidade das formulações. Esse fato pode ser explicado pela ocorrência de repulsão estérica provocada pelas cadeias poliméricas presentes no DSPE-mPEG₂₀₀₀ (JOHNSSON & EDWARDS, 2003; IMMORDINO *et al.*, 2006; DOS SANTOS *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2012).

A estabilidade de SpHL-20AU1, em relação ao teor de encapsulação de AU, pode ser explicada pela elevada lipofilicidade de AU ($\log P = 7,92$) que possibilita uma forte interação da droga com fosfolípidos presentes na bicamada dos lipossomas impedindo a liberação indesejada de AU durante o período de armazenamento avaliado (RAMOS *et al.*, 2008).

3.3 Avaliação morfológica dos SpHL-AU por MET

As imagens obtidas por MET para os SpHL-20AU1 (**Figura 16**) permitiram a visualização de vesículas multilamelares de diâmetros variados tendo sido observadas, predominantemente, vesículas de tamanho inferior a 100 nm.

Figura 16 - Fotomicrografias obtidas por MET para SpHL-20AU1 em diferentes campos



3.4 Avaliação da viabilidade celular

A citotoxicidade de AU livre e de SpHL-20AU1 frente às linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231) e de próstata (LNCaP) foi determinada pelo ensaio MTT e os valores de IC_{50} obtidos para cada linhagem encontram-se descritos na **Tabela 9**. Não observou-se citotoxicidade significativa após tratamento nos grupos controle (DMSO e lipossomas brancos).

Tabela 9 - Valores de IC_{50} para diferentes linhagens celulares*

Linhagens	IC_{50} (μ M)	IC_{50} (μ M)
Celulares	AU livre	SpHL 20AU1
MDA-MB-231	$13,07 \pm 1,54^a$	$8,13 \pm 2,30$
LNCaP	$2,49 \pm 0,53$	$2,68 \pm 1,06$

*Os valores são expressos como a média $\pm$ D.P (n=3); ^a Há diferença significativa entre os valores representados na mesma linha da tabela ($p < 0.05$).

Pela análise da **Tabela 9**, pode-se observar que o valor de IC_{50} obtido após o tratamento com SpHL-20AU1 na linhagem MDA-MB-231 foi menor que o valor observado após o tratamento com AU livre ($p < 0,05$). Esse resultado indica que os SpHL podem facilitar a captação de AU por essas células tumorais e, desta forma, aumentar a citotoxicidade de AU. Não observou-se diferença significativa entre o valor de IC_{50} obtido após o tratamento com SpHL-20AU1 ou AU livre ($p > 0,05$) para a linhagem LNCaP. Esse resultado revela que não houve redução na atividade citotóxica de AU incorporado na formulação lipossomal quando comparada à atividade citotóxica de AU livre. Neste contexto, o emprego de SpHL-20AU1 pode representar uma estratégia promissora para carrear o AU e permitir a sua administração parenteral.

CAPÍTULO 2

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE OS COMPONENTES DOS
LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA
CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO SOB CONDIÇÕES DE
BAIXA HIDRATAÇÃO**

1 INTRODUÇÃO

A identificação da organização supramolecular do fosfolípide estrutural (DOPE) dos lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada é de extrema importância para que se possa garantir a estabilidade desse sistema assim como sua desestabilização em condições apropriadas. O comportamento de fase da DOPE revela a presença de fases essenciais para a formação e desestabilização dos lipossomas, as quais são a fase lamelar alfa (L_α), a fase cúbica (Q_{II}) e a fase hexagonal (H_{II}), sendo que a temperatura de transição entre essas fases pode ser determinada pelo emprego da técnica de DSC e a identificação das fases específicas pode ser realizada pelo emprego da técnica de SAXS.

O emprego da técnica de SAXS associada à técnica de DSC permite a elucidação das interações entre a droga incorporada e os materiais formadores dos lipossomas bem como fornece maior detalhamento sobre sua organização estrutural.

Dessa forma, nessa parte do trabalho, empregou-se as técnicas de DSC e SAXS para o estudo das interações entre os componentes dos SpHL-AU. As amostras foram preparadas sob condições de baixa hidratação para possibilitar maior clareza na verificação das possíveis interações entre os componentes desses lipossomas. Além disso, as condições de baixa hidratação viabilizam a identificação do comportamento lipídico em baixas temperaturas devido à menor possibilidade de formação de cristais de gelo (DE OLIVEIRA *et al.*, 1998).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A DOPE e o DSPE-mPEG₂₀₀₀ foram comprados da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O AU padrão (grau de pureza 98%), hemisuccinato de colesisterila (CHEMS) e tampão salina-fosfato (PBS), foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St Louis, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Preparo de amostras

Para o preparo de amostras, DOPE, CHEMS E DSPE-mPEG₂₀₀₀ foram dissolvidos em clorofórmio para obtenção de soluções nas concentrações de 500 mM, 500 mM e 50 mM respectivamente. O tampão PBS foi liofilizado separadamente. As amostras foram preparadas contendo as seguintes proporções dos componentes dos SpHL-AU:

- DOPE (22,8 µL de uma solução clorofórmica 500 mM) e Tampão PBS liofilizado (12,7 mg);
- CHEMS (20 µL de uma solução clorofórmica 500 mM);
- DOPE (22,8 µL de uma solução clorofórmica 500 mM), CHEMS (15,2 µL de uma solução clorofórmica 500 mM) e Tampão PBS liofilizado (12,7 mg);
- DSPE-mPEG₂₀₀₀ (20 µL de uma solução clorofórmica 50 mM);
- DOPE (22,8 µL de uma solução clorofórmica 500 mM), CHEMS (15,2 µL de uma solução clorofórmica 500 mM), DSPE-mPEG₂₀₀₀ (20 µL de uma solução clorofórmica 50 mM) e Tampão PBS liofilizado (12,7 mg);
- DOPE (22,8 µL de uma solução clorofórmica 500 mM), CHEMS (15,2 µL de uma solução clorofórmica 500 mM), DSPE-mPEG₂₀₀₀ (20 µL de uma solução clorofórmica 50 mM), AU (1 mg) , Tampão PBS liofilizado (12,7 mg).

As alíquotas de lípidos foram transferidas para os cadinhos de alumínio previamente pesados e o solvente orgânico foi evaporado, sob ligeiro aquecimento, até a formação de um filme. O tampão PBS liofilizado e o AU

foram adicionados sobre os respectivos filmes de cada amostra, conforme descrito anteriormente.

As amostras foram hidratadas até atingirem peso constante em uma cuba de hidratação com umidade relativa igual a 34,6% (a 5 °C) mediante o uso de uma solução saturada de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (WEXLER & HASEGAWA, 1954). Avaliou-se a fração de água absorvida por estas amostras que variou de 1 a 5% aproximadamente. Após estabilização, os diferentes cadinhos foram pesados, selados e analisados por DSC.

2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises calorimétricas foram realizadas no instrumento DSC 2910 Modulated TA Instruments (New Castle, EUA), no intervalo de temperatura de - 50 °C a 80 °C, com uma taxa de aquecimento de 5 °C/min. O índio foi utilizado para calibração da temperatura e da entalpia e o gás de purga utilizado foi o nitrogênio. As amostras foram submetidas a três corridas consecutivas a fim de permitir uma maior homogeneização do conteúdo colocado nos cadinhos. Os dados obtidos foram analisados pelo software de isotermas do próprio equipamento. As temperaturas de transição foram definidas pela posição dos picos observados nas curvas de DSC.

2.4 Espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS)

Neste estudo, os mesmos cadinhos contendo as amostras analisadas por DSC, descritos no item 2.2, foram abertos, os conteúdos foram retirados e depositados num suporte de metal os quais foram selados com um filme de poliimida (Kapton®).

As medidas de SAXS foram realizadas na linha D1B-SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, SP) (**Figura 17**), com a colaboração dos professores Dr. Rogério Magalhães Paniago e Dr. Ângelo Malachias de Souza (Departamento de Física, ICEx, UFMG). Utilizou-se um comprimento de onda fixo ($\lambda = 1.488 \text{ nm}$). O detector Pilatus 300k foi

posicionado a 1 m da amostra e a região de espaço recíproco variou de $q_{\min}=0,15 \text{ nm}^{-1}$ até $q_{\max}=4,0 \text{ nm}^{-1}$. Empregou-se um porta-amostras com sistema de aquecimento DSC-Linkam. Antes das análises das amostras, o substrato foi avaliado quanto à sua interferência nas medidas a serem realizadas e constatou-se que o mesmo não contribuiu com nenhum pico de difração nas condições utilizadas.

Figura 17 - Estação experimental D1B-SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, SP)



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises por DSC e SAXS

As amostras constituídas por misturas dos componentes dos SpHL-AU foram hidratadas até peso constante e submetidas à análise por DSC. Todas as amostras foram também analisadas por SAXS em diferentes temperaturas as quais foram selecionadas conforme os sinais presentes nas curvas de DSC, com o intuito de identificar a organização estrutural dos lípides e confirmar as modificações de fase do sistema.

Amostra I: DOPE + Tampão PBS pH 7,4

A curva de DSC da mistura DOPE + tampão PBS está representada na **Figura 18**. Pode-se observar picos endotérmicos centrados em -26 °C, -3 °C e 9 °C. O pico intenso observado em -3 °C está associado à fusão do gelo, conforme descrito previamente por De Oliveira e colaboradores (2000).

Os difratogramas da mistura DOPE + tampão PBS foram adquiridos nas temperaturas de -30 °C, -18 °C, 12 °C e 40 °C (**Figura 19**). Nos difratogramas obtidos a -30 °C e a -18 °C pode-se observar picos em valores de q iguais a 1,14; 2,28; 3,42 e 4,56 nm⁻¹. Esses picos correspondem a razões de reflexão de Bragg iguais a 1,2,3,4, indicando a organização das moléculas de DOPE na fase lamelar, em ambas as temperaturas, com distância interplanar (d) equivalente a 4,36 nm. Nos difratogramas a -30 °C e a -18 °C, pode-se observar também um pico largo com valor de q igual a 1,44 nm⁻¹ o qual está relacionado a uma fase hexagonal que se consolidará com o aumento da temperatura. Esse pico apresentou uma menor intensidade à -18 °C que à -30 °C. A ocorrência dessas mudanças estruturais nos domínios hexagonais, sob aquecimento, pode estar relacionada à discreta endoterma observada à -26 °C na curva de DSC.

No difratograma adquirido a 12 °C pode-se observar o desaparecimento dos sinais referentes à fase lamelar e o surgimento de picos, menos intensos e mais largos, com valores de $q = 1,52; 2,51; 2,98$ e 4 nm^{-1} que correspondem a razões de reflexão de Bragg iguais a $1, \sqrt{3}, 2, \sqrt{7}$, relacionados à fase hexagonal da DOPE. De modo semelhante, no difratograma adquirido a 40 °C pode-se observar picos com valores de $q = 1,54; 2,51; 3,1$ e $4,1 \text{ nm}^{-1}$ que correspondem a razões de reflexão de Bragg iguais a $1, \sqrt{3}, 2, \sqrt{7}$ relacionados à fase hexagonal da DOPE. Em ambas as temperaturas, a distância interplanar (d) foi equivalente a 4,1 nm. Diante desse resultado, pode-se sugerir que tenha ocorrido a transição de fase lamelar para fase hexagonal (H_{II}) da DOPE na temperatura de 9 °C, observada na curva de DSC.

Figura 18 - Curva de DSC da DOPE + tampão PBS pH 7,4

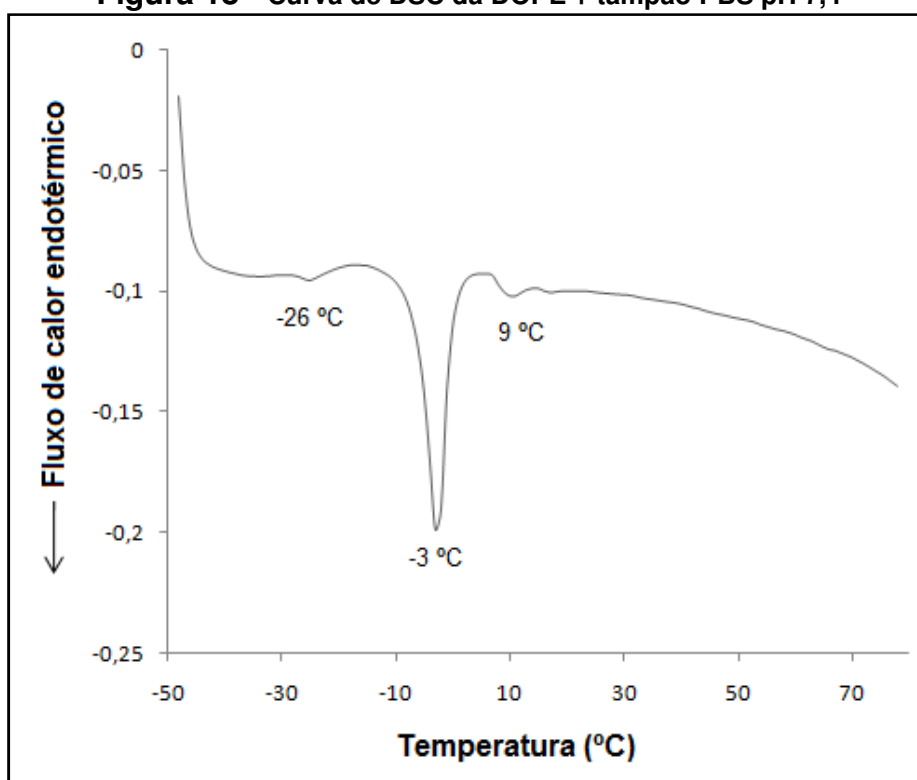
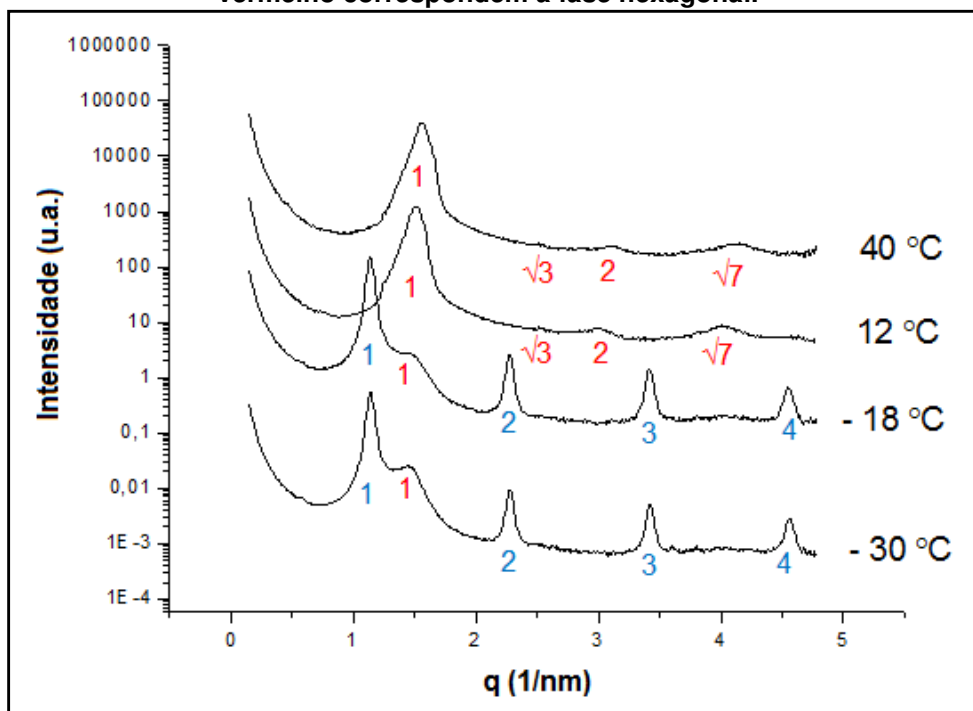
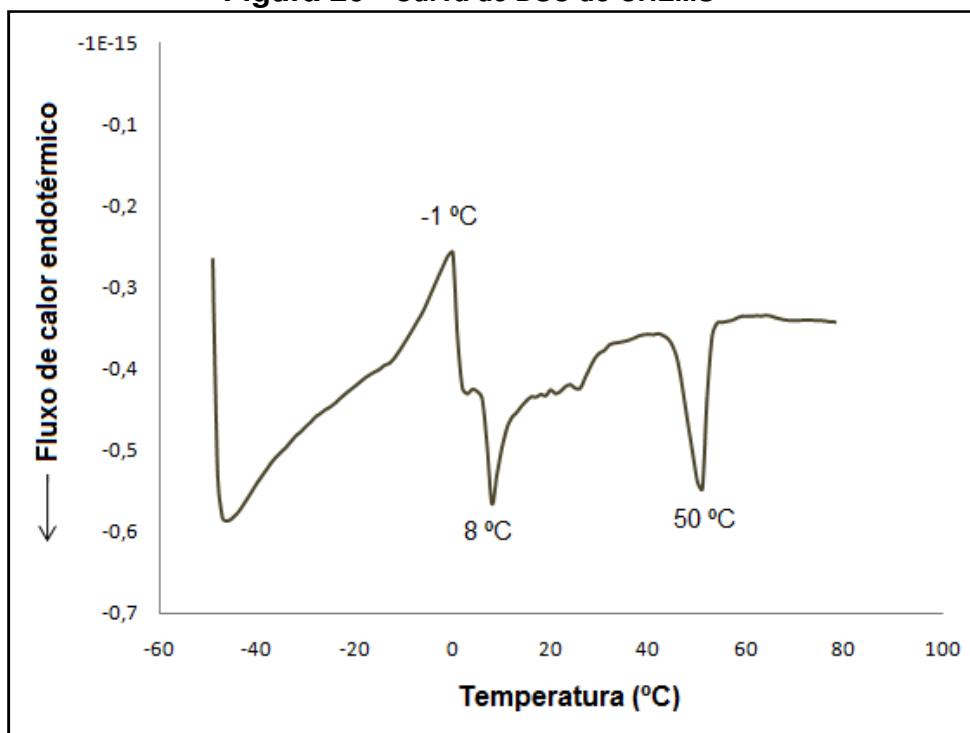


Figura 19 – Difrátogramas da mistura DOPE + tampão PBS obtidos em diferentes temperaturas. Os índices representados abaixo dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em azul são referentes à organização lamelar da DOPE. Os índices representados em vermelho correspondem à fase hexagonal.



Amostra II: CHEMS

A curva de DSC do CHEMS está representado na **Figura 20**. Observa-se a ocorrência de um pico exotérmico, centrado em torno de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esse pico pode estar relacionado com o processo de cristalização do CHEMS. Observa-se também dois picos endotérmicos centrados em $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Provavelmente, o pico endotérmico a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ é resultante da fusão das moléculas de CHEMS, entretanto o evento térmico referente ao pico endotérmico a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ não está ainda esclarecido.

Figura 20 - Curva de DSC do CHEMS**Amostra III: DOPE + CHEMS + Tampão PBS pH 7,4**

A curva de DSC da mistura DOPE + CHEMS + tampão PBS está representada na **Figura 21**. Pode-se observar picos centrados em -23 °C, 0 °C, 12 °C e 34 °C. Os picos exotérmicos observados em -23 °C e em 0 °C provavelmente referem-se à cristalização das moléculas de CHEMS as quais são distribuídas de forma heterogênea na bicamada lipídica. A redução na temperatura de cristalização do CHEMS, nesta amostra (em relação ao observado na amostra de CHEMS isolado), pode estar relacionada à presença dos sais do tampão PBS.

Os difratogramas da mistura DOPE + CHEMS + tampão PBS foram adquiridos nas temperaturas de -30 °C, -20 °C, 20 °C e 60 °C (**Figura 22**). O difratograma a -30 °C, apresentou picos em valores de q iguais a 1,16; 2,27; 3,41 e 4,54 nm⁻¹ que correspondem à razões de reflexão de Bragg iguais a 1,2,3,4 o que indica a existência de fase lamelar cuja espessura (d) é equivalente a 5,41 nm. A dimensão desta estrutura lamelar (5,41 nm) está de acordo com estudos

prévios os quais relataram uma espessura de cerca de 4 nm para bicamadas de lipossomas aniônicos constituídos por DOPE, ácido oléico e colesterol (DE OLIVEIRA *et al.*, 1998 ; DE OLIVEIRA *et al.*, 2000) e cerca de 4,5 nm para lipossomas aniônicos constituídos por DOPE e CHEMS (SILVA *et al.*, 2011). Nessa temperatura observou-se também uma sequência de picos em valores de q iguais a 1,37; 2,48; 2,86 e 3,59 nm⁻¹ que correspondem a razões de reflexão de Bragg iguais a 1, $\sqrt{3}$, 2, $\sqrt{7}$, características de fase hexagonal com distância interplanar (d) equivalente a 4,58 nm. No difratograma a -20 °C observa-se um padrão semelhante de picos de difração, sendo observadas as mesmas razões de reflexão de Bragg das observadas na temperatura de -30 °C. Observa-se que a cristalização do CHEMS não comprometeu a integridade da bicamada lipídica a qual manteve sua organização lamelar. A coexistência de fases lamelares e hexagonais pode ser resultante da distribuição heterogênea das moléculas de CHEMS entre as moléculas de DOPE ao longo da bicamada lipídica. A ausência de moléculas de CHEMS entre as moléculas de DOPE, em algumas regiões, possibilita a aproximação das moléculas de DOPE favorecendo as interações intermoleculares e a conseqüente formação de fase hexagonal (SILVA *et al.*, 2011).

Na temperatura de 20 °C, o difratograma apresentou picos em valores de q iguais a 1,59; 2,84; 3,56; 4,29 e 4,52 nm⁻¹ que correspondem a razões de reflexão de Bragg iguais a 1, $\sqrt{3}$, 2, $\sqrt{7}$, 3 indicando o predomínio de fase hexagonal, com distância interplanar (d) igual a 3,95 nm. Dessa forma, sugere-se então a ocorrência da transição da fase lamelar para a fase hexagonal da DOPE representada pelo pico centrado em 12 °C na curva de DSC.

Observa-se que a presença do CHEMS induziu um aumento na temperatura de transição de fase lamelar para fase hexagonal da DOPE, que pode ser explicado pelo impedimento da formação de ligações de hidrogênio intermoleculares entre os grupamentos amônio e fosfato das moléculas da DOPE, pois a sua organização supramolecular hexagonal é decorrente das mesmas (SEEDON, 1990; DE OLIVEIRA *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2011).

O difratograma a 60 °C apresentou picos de difração com valores de q iguais a 1,7; 2,84 e 3,54 nm^{-1} com razões de reflexão de Bragg semelhantes às observadas na temperatura de 20 °C e distância interplanar (d) igual a 3,70 nm.

A endoterma observada à 34 °C foi atribuída à fusão do CHEMS. Conforme mostrado anteriormente, a análise de DSC da amostra de CHEMS puro mostrou uma endoterma em 50 °C também atribuída à fusão das moléculas de CHEMS. O deslocamento do pico de fusão do CHEMS para uma temperatura menor pode estar relacionado à presença de outros componentes na amostra (DOPE e PBS).

Figura 21 - Curva de DSC da DOPE + CHEMS + tampão PBS pH 7,4

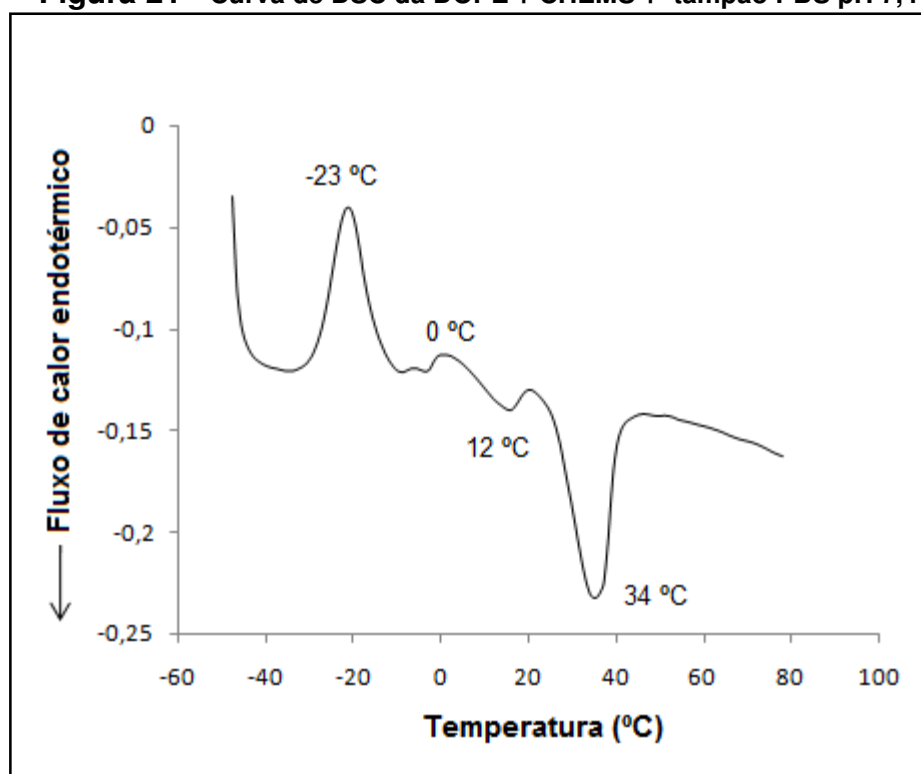
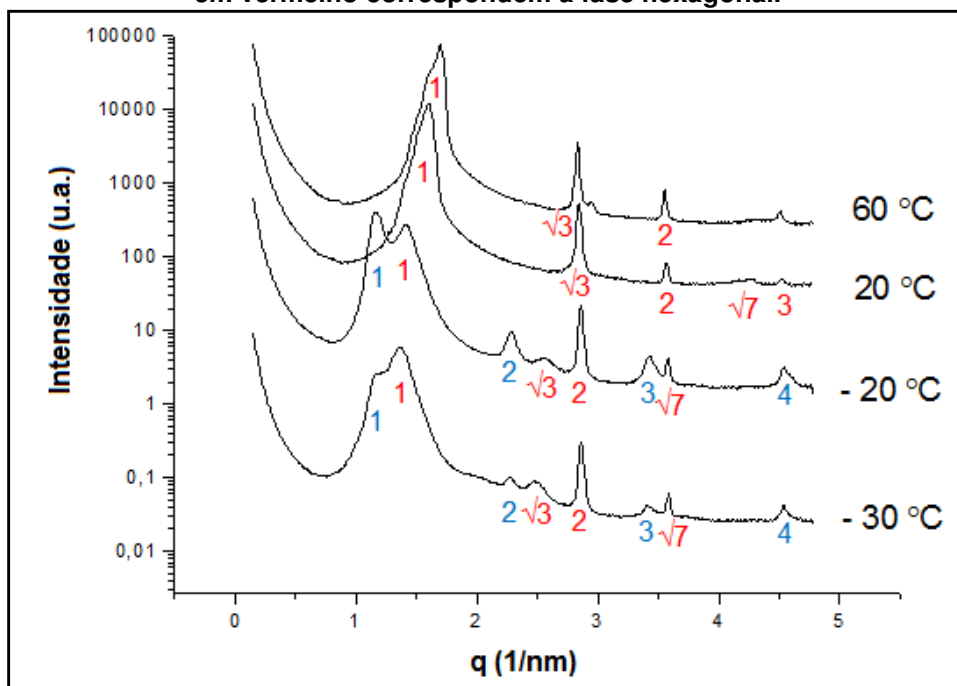
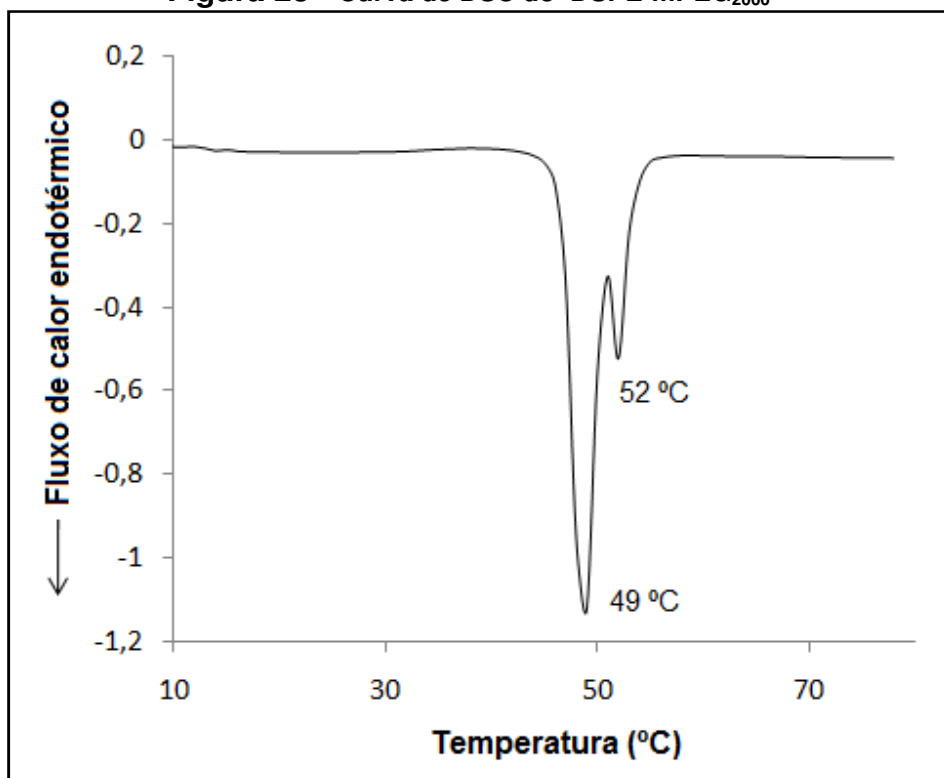


Figura 22 – Difratomogramas da mistura DOPE + CHEMS + tampão PBS obtidos em diferentes temperaturas. Os índices representados abaixo dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em azul são referentes à organização lamelar da DOPE. Os índices representados em vermelho correspondem à fase hexagonal.



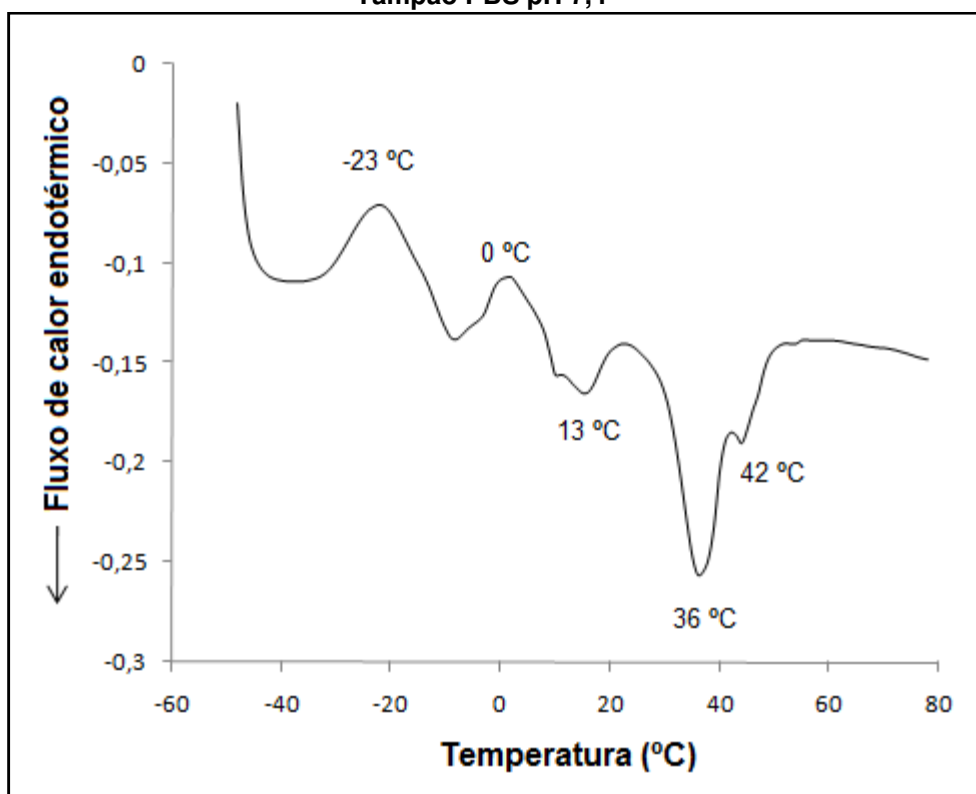
Amostra IV: DSPE-mPEG₂₀₀₀

A curva de DSC do **DSPE-mPEG₂₀₀₀** está representada na **Figura 23**. Foram detectados dois picos endotérmicos intensos centrados em 49 °C e 52 °C. Esses picos possivelmente se referem à fusão desse lípide. A dissociação do pico em dois sinais pode estar relacionada a uma hidratação heterogênea da amostra analisada.

Figura 23 - Curva de DSC do DSPE-mPEG₂₀₀₀**Amostra V: DOPE + CHEMS + DSPE-mPEG₂₀₀₀ + Tampão PBS pH 7,4**

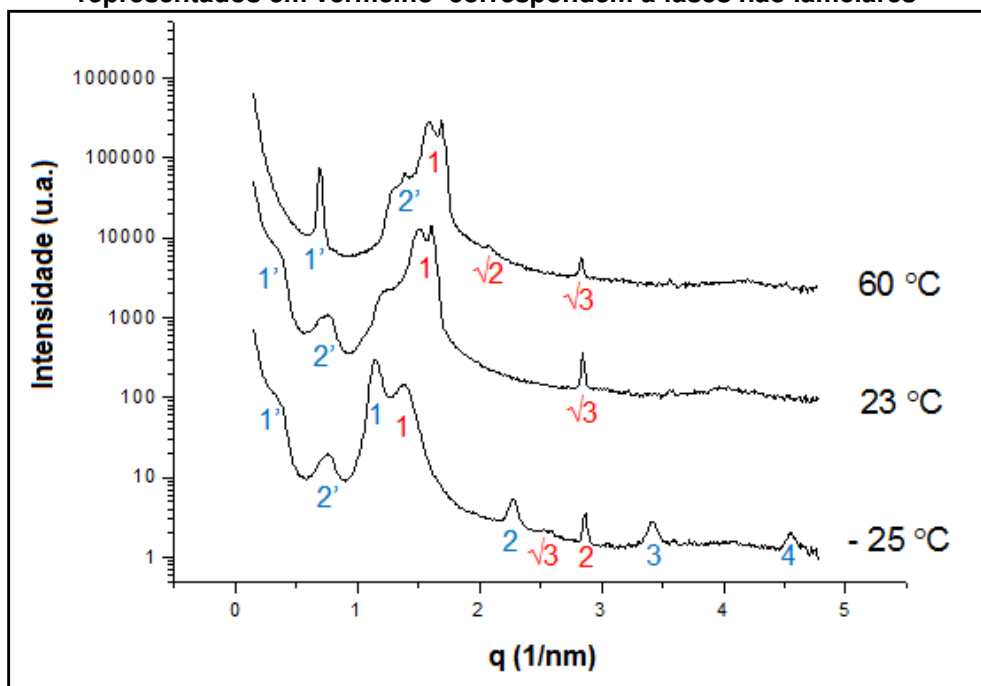
A curva de DSC da mistura DOPE + CHEMS + DSPE-mPEG₂₀₀₀ + tampão PBS apresenta picos nas temperaturas de -23 °C, 0 °C, 13 °C, 36 °C e 42 °C (**Figura 24**). Os picos exotérmicos observados nas temperaturas de -23 °C e de 0 °C podem estar relacionados à cristalização das moléculas do CHEMS, conforme relatado anteriormente.

Figura 24 - Curva de DSC da DOPE + CHEMS + DSPE-mPEG₂₀₀₀ + Tampão PBS pH 7,4



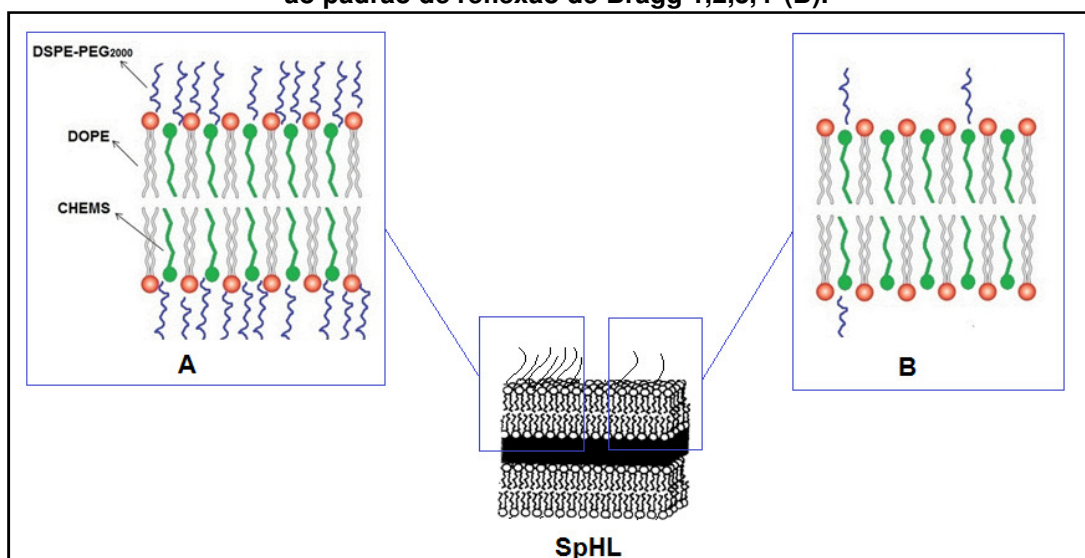
Os difratogramas da mistura DOPE + CHEMS + DSPE-mPEG₂₀₀₀ + tampão PBS foram adquiridos nas temperaturas de -25 °C, 23 °C e 60 °C (**Figura 25**). O difratograma obtido a -25 °C, apresenta picos em valores de q iguais a 1,15; 2,27; 3,43 e 4,56 nm⁻¹ que correspondem à razões de reflexão de Bragg iguais a 1,2,3,4 o que indica a existência de fase lamelar com distância interplanar igual a 5,46 nm. Observou-se também um segundo sistema lamelar em valores de q iguais 0,37 e 0,76 nm⁻¹ (razão de reflexão de Bragg de 1' e 2'), com distância interplanar igual a 16,9 nm, indicando um aumento na espessura da bicamada lipídica (não observado nas amostras anteriores), que deve estar relacionada à presença das moléculas de DSPE-mPEG₂₀₀₀.

Figura 25 – Difrátogramas da mistura DOPE + CHEMS + DSPE-mPEG₂₀₀₀ + tampão PBS obtidos em diferentes temperaturas. Os índices representados abaixo dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em azul são referentes à organização lamelar da DOPE. Os índices representados em vermelho correspondem às fases não lamelares



A observação de dois domínios lamelares diferentes pode estar relacionada à heterogeneidade da distribuição das moléculas de DSPE-mPEG₂₀₀₀ na bicamada lipídica (**Figura 26**).

Figura 26 – Representação esquemática da distribuição heterogênea das moléculas de DSPE-mPEG₂₀₀₀ na bicamada lipídica dos SpHL: as regiões com maior concentração de DSPE-mPEG₂₀₀₀ estão relacionadas ao padrão de reflexão de Bragg 1', 2' (A); as regiões com menor concentração de DSPE-mPEG₂₀₀₀ estão relacionadas ao padrão de reflexão de Bragg 1,2,3,4 (B).



Conforme já foi mencionado, estudos anteriores relataram uma espessura de cerca de 4 nm para bicamadas de lipossomas aniônicos constituídos por DOPE, ácido oléico e colesterol (DE OLIVEIRA *et al.*, 1998; DE OLIVEIRA *et al.*, 2000) e cerca de 4,5 nm para lipossomas aniônicos constituídos por DOPE e CHEMS (SILVA *et al.*, 2011). Entretanto, a inserção de derivados lipídicos contendo PEG pode promover um aumento da espessura da bicamada lipídica que pode chegar a aproximadamente 15 nm (GARBUNZENKO *et al.*, 2005; VARGA *et al.*, 2012).

No difratograma a -25 °C verifica-se também uma sequência de picos com razões de reflexão de Bragg iguais a 1, $\sqrt{3}$, 2 indicando a coexistência de domínio não lamelar nessa mesma temperatura.

No difratograma a 23 °C observa-se o desaparecimento da sequência de picos associados ao sistema lamelar com razões de reflexão de Bragg 1,2,3,4, observado à -25 °C, mas observa-se a permanência do segundo sistema lamelar (razão de reflexão de Bragg de 1' e 2') provavelmente associado à transições em regiões da bicamada lipídica enriquecidas em DSPE-mPEG₂₀₀₀. Observa-se também um padrão de picos em valores de q iguais a 1,61 e 2,84 nm⁻¹, com razões de reflexão de Bragg iguais a 1, $\sqrt{3}$ características de fase não lamelar com distância interplanar igual a 3,9 nm. Esses resultados sugerem a ocorrência da transição da fase lamelar para fase não lamelar da DOPE representada pelo pico centrado em 13 °C observado na curva de DSC. A endoterma observada à 36 °C foi atribuída à fusão das moléculas de CHEMS.

No difratograma a 60 °C, observou-se picos com razões de reflexão de Bragg iguais a 1, $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$ característicos de fase cúbica (*Pn3m*) da DOPE, com distância interplanar igual a 3,7 nm (TATE *et al.*, 1991). Também no difratograma a 60 °C, observa-se um deslocamento dos picos relacionados ao sistema lamelar para valores de q maiores, iguais a 0,69 e 1,38 nm⁻¹ (razão de reflexão de Bragg de 1' e 2'), com distância interplanar de 9,1 nm, indicando uma redução na espessura da bicamada lipídica (em relação ao padrão

observado à 23 °C), que deve estar relacionada à fusão das cadeias de DSPE-mPEG₂₀₀₀ o que torna a bicamada lipídica mais fluida. Dessa forma, o pico observado em 42 °C, na curva de DSC, pode ser atribuído à fusão das moléculas de DSPE-mPEG₂₀₀₀.

Amostra VI: DOPE + CHEMS + DSPE-mPEG₂₀₀₀ + AU + Tampão PBS pH 7,4

A curva de DSC da mistura DOPE + CHEMS + DSPE-mPEG₂₀₀₀ + AU + tampão PBS apresenta picos nas temperaturas de -20 °C, -1 °C, 15 °C, 36 °C e 43 °C (**Figura 27**). Os picos exotérmicos observados nas temperaturas de -20 °C e de -1 °C podem estar relacionados à cristalização das moléculas do CHEMS, conforme relatado anteriormente.

Os difratogramas da mistura DOPE + CHEMS + DSPE-mPEG₂₀₀₀ + AU + tampão PBS foram adquiridos nas temperaturas de -20 °C, 20 °C e 60 °C (**Figura 28**). O difratograma obtido a -20 °C, apresenta picos com valores de q iguais a 1,14; 2,26; 3,59 e 4,52 nm⁻¹ que correspondem à razões de reflexão de Bragg iguais a 1,2,3,4, o que indica a existência de fase lamelar com distância interplanar igual a 5,51 nm. Observa-se também um segundo sistema lamelar com valores de q iguais a 0,38 e 0,77 nm⁻¹ (razão de reflexão de Bragg de 1' e 2') com distância interplanar igual a 16,5 nm. A observação de dois domínios lamelares pode estar relacionada à heterogeneidade da distribuição das moléculas de DSPE-mPEG₂₀₀₀, conforme foi explicado anteriormente e ilustrado na **Figura 26**. Verificou-se também uma sequência de picos com razões de reflexão de Bragg iguais a 1, $\sqrt{3}$, 2 indicando a coexistência de domínios não lamelares nessa mesma temperatura com distância interplanar igual a 4,42 nm. Conforme explicado anteriormente, a coexistência de fases lamelares e não lamelares pode ser resultante da distribuição heterogênea das moléculas de CHEMS entre as moléculas de DOPE ao longo da bicamada lipídica.

No difratograma a 20 °C observa-se o desaparecimento da principal sequência de picos associados ao sistema lamelar (razões de reflexão de Bragg 1, 2, 3,

4), observado à -20 °C, mas observa-se a permanência do segundo sistema lamelar (razão de reflexão de Bragg de 1' e 2') provavelmente associado à transições da DOPE em regiões da bicamada lipídica enriquecidas em DSPE-mPEG₂₀₀₀. Observa-se também um padrão de picos com valores de q iguais a 1,47; 1,96; 2,84 e 3,58 nm⁻¹ que correspondem à razões de reflexão de Bragg iguais a 1, $\sqrt{2}$, 2, $\sqrt{6}$ características de fase cúbica (espaçamento $Im3m$) com distância interplanar igual a 4,27 nm. Esses resultados sugerem então a ocorrência da transição da fase lamelar para fase não lamelar da DOPE representada pelo pico centrado em 15 °C observado na curva de DSC. Conforme observado na amostra anterior, a endoterma centrada em 36 °C foi atribuída à fusão das moléculas de CHEMS.

No difratograma a 60 °C observa-se a ocorrência de picos com valores de q iguais a 1,57; 2,08 e 2,84 nm⁻¹ que correspondem à razões de reflexão de Bragg iguais a 1, $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$, características de fase cúbica (espaçamento $Pn3m$) com distância interplanar igual a 4 nm. (LINDBLOM & RILFORS, 1989; TATE *et al.*, 1991) (**Figura 29**). Nas fases cúbicas invertidas (Q_{II}), as regiões aquosas se interpenetram e estão separadas por uma única bicamada lipídica contínua (TATE *et al.*, 1991; RAND & FULLER, 1994).

No difratograma a 60 °C, observa-se também um deslocamento dos picos relacionados ao sistema lamelar para valores de q maiores, iguais a 0,69 e 1,39 nm⁻¹ (razão de reflexão de Bragg de 1' e 2'), com distância interplanar de 9,1 nm, indicando uma redução na espessura da bicamada lipídica (em relação ao padrão observado à 20 °C), que deve estar relacionada à fusão das cadeias de DSPE-mPEG₂₀₀₀. Dessa forma, o pico observado em 43 °C, na curva de DSC, pode ser atribuído à fusão das moléculas de DSPE-mPEG₂₀₀₀.

Figura 27 - Curva de DSC da DOPE + CHEMS + DSPE-mPEG₂₀₀₀ + AU + Tampão PBS pH 7,4

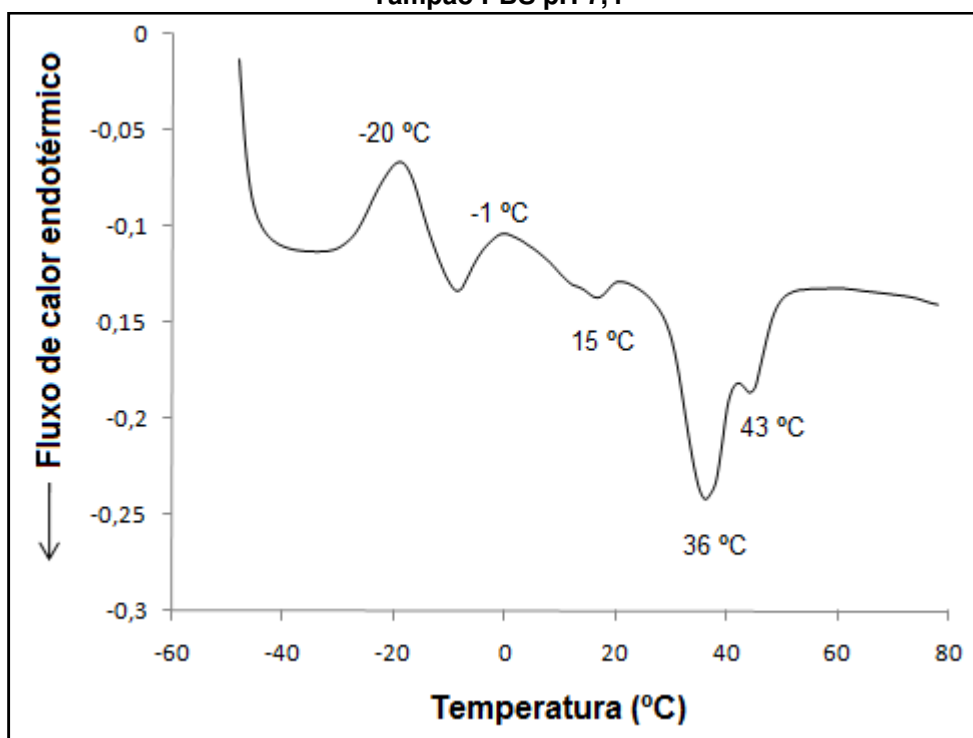


Figura 28 – Difractogramas da mistura DOPE + CHEMS + DSPE-mPEG₂₀₀₀ + AU + tampão PBS obtidos em diferentes temperaturas. Os índices representados abaixo dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em azul são referentes à organização lamelar da DOPE. Os índices representados em vermelho correspondem às fases não lamelares

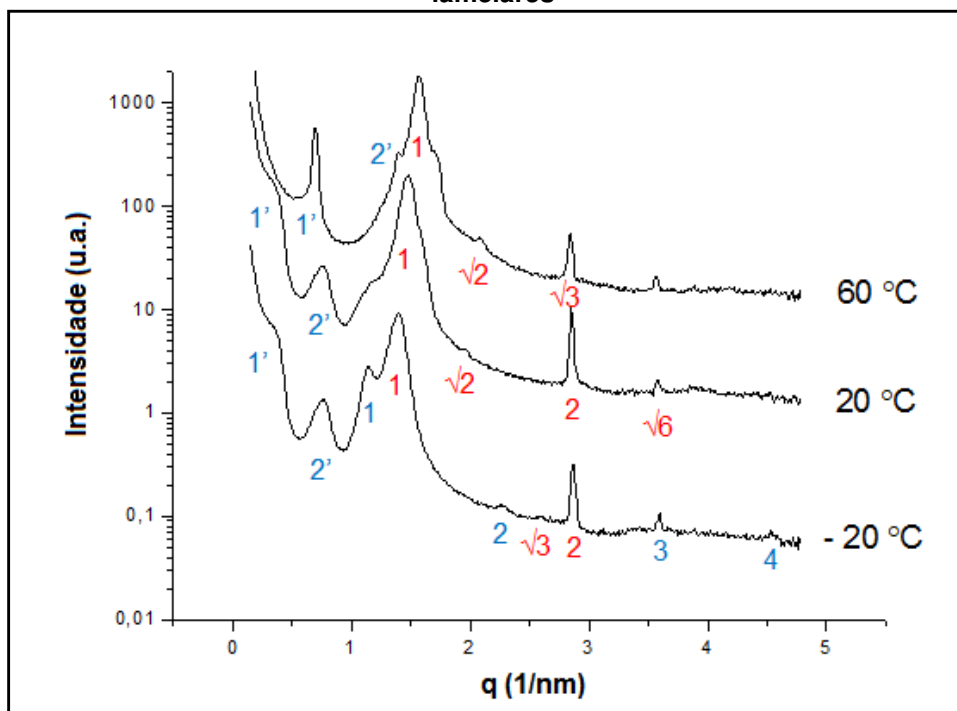
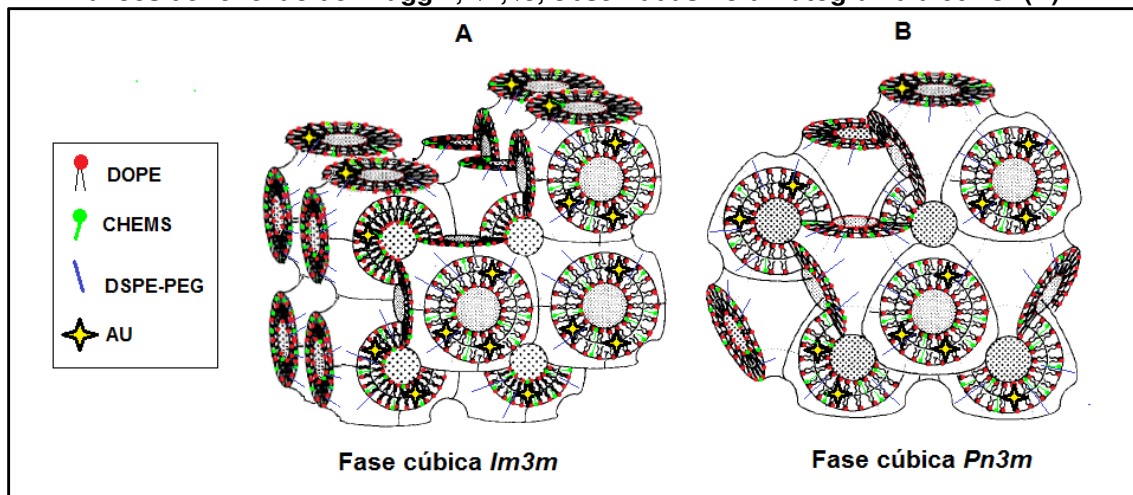


Figura 29 – Representação esquemática dos padrões de organização dos SpHL-AU: fase cúbica (espaçamento $Im3m$) relacionada às razões de reflexão de Bragg 1, $\sqrt{2}$, 2, $\sqrt{6}$, observadas no difratograma à 20 °C (A); fase cúbica (espaçamento $Pn3m$) relacionada às razões de reflexão de Bragg 1, $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$, observadas no difratograma à 60 °C (B).



Adaptado de TATE *et al.*, 1991.

As análises por SAXS demonstraram diferenças de intensidades e localizações de picos de difração para amostras em ausência (**Figura 25**) e em presença de AU (**Figura 28**), em todas as temperaturas analisadas.

Considerando-se a estrutura lipofílica do AU, pode-se sugerir a ocorrência de interações hidrofóbicas entre os anéis hidrofóbicos do AU e as cadeias hidrocarbônicas dos lípides na bicamada. Também é possível a ocorrência de interações eletrostáticas entre o grupo carboxílico das moléculas de AU e os grupos amino das moléculas de DOPE. Essas interações podem desempenhar um papel crucial para o controle da organização dos lípides na bicamada e para a determinação do comportamento de fase de moléculas de DOPE.

Os sistemas formados por lípides dispersos em meio aquoso se auto-organizam em fases nas quais as cabeças polares dos lípides formam uma interface contínua entre a água e as cadeias de hidrocarbonetos. Na fase lamelar (L_α), os lípides se dispõem em folhas estendidas organizando-se como uma bicamada. As camadas duplas são separadas uma da outra por camadas de água. Na fase hexagonal invertida (H_{II}), há longos núcleos cilíndricos de água que estão dispostos como uma matriz hexagonal. Esses núcleos de água

são revestidos pelas cabeças polares dos lípides e o restante da matriz é preenchido com as cadeias de hidrocarbonetos. Nas fases cúbicas invertidas (Q_{II}), as regiões aquosas se interpenetram e estão separadas por uma única bicamada lipídica contínua (TATE *et al.*, 1991; RAND & FULLER, 1994).

A curvatura da superfície da cabeça polar dos lípides pode também ser utilizada para categorizar sistematicamente as diferentes fases de organização dos lípides. Na fase lamelar (L_α) as curvaturas principais são iguais a zero. As fases não-lamelares, no entanto, são caracterizadas por uma curvatura da interface lípide-água a qual pode ser positiva ou negativa. As fases cúbicas invertidas (Q_{II}) têm curvatura média negativa e ocorrem entre as regiões L_α e H_{II} dos diagramas de fase. O comportamento de fase não depende somente da especificidade das moléculas dos lípides, mas sim de um conjunto de interações que determinam a curvatura final do sistema (GUNER *et al.*, 1985; TATE *et al.*, 1991). Nesse contexto, os diferentes padrões de organização de fase da DOPE na presença de AU podem estar associados com as interações específicas entre AU e DOPE, sugeridas anteriormente, as quais podem determinar a curvatura negativa do sistema o qual se organiza em fases não-lamelares (como na fase Q_{II}).

FUNARI e colaboradores (2011) investigaram as interações de duas hidroquinonas sintéticas (com diferentes graus de lipofilicidade) com um modelo de membrana constituída pelo lípide 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE). Observou-se a formação de fases cúbicas (P_{432} e $Im3m$) apenas no sistema constituído pela hidroquinona de maior hidrofobicidade e o lípide POPE. Sugeriu-se que a presença adicional da cadeia hidrofóbica, ligada ao anel aromático desta hidroquinona e ancorada na matriz lipídica, exerce um papel importante na organização do sistema nas fases cúbicas observadas nas diferentes condições de pH e temperatura avaliadas.

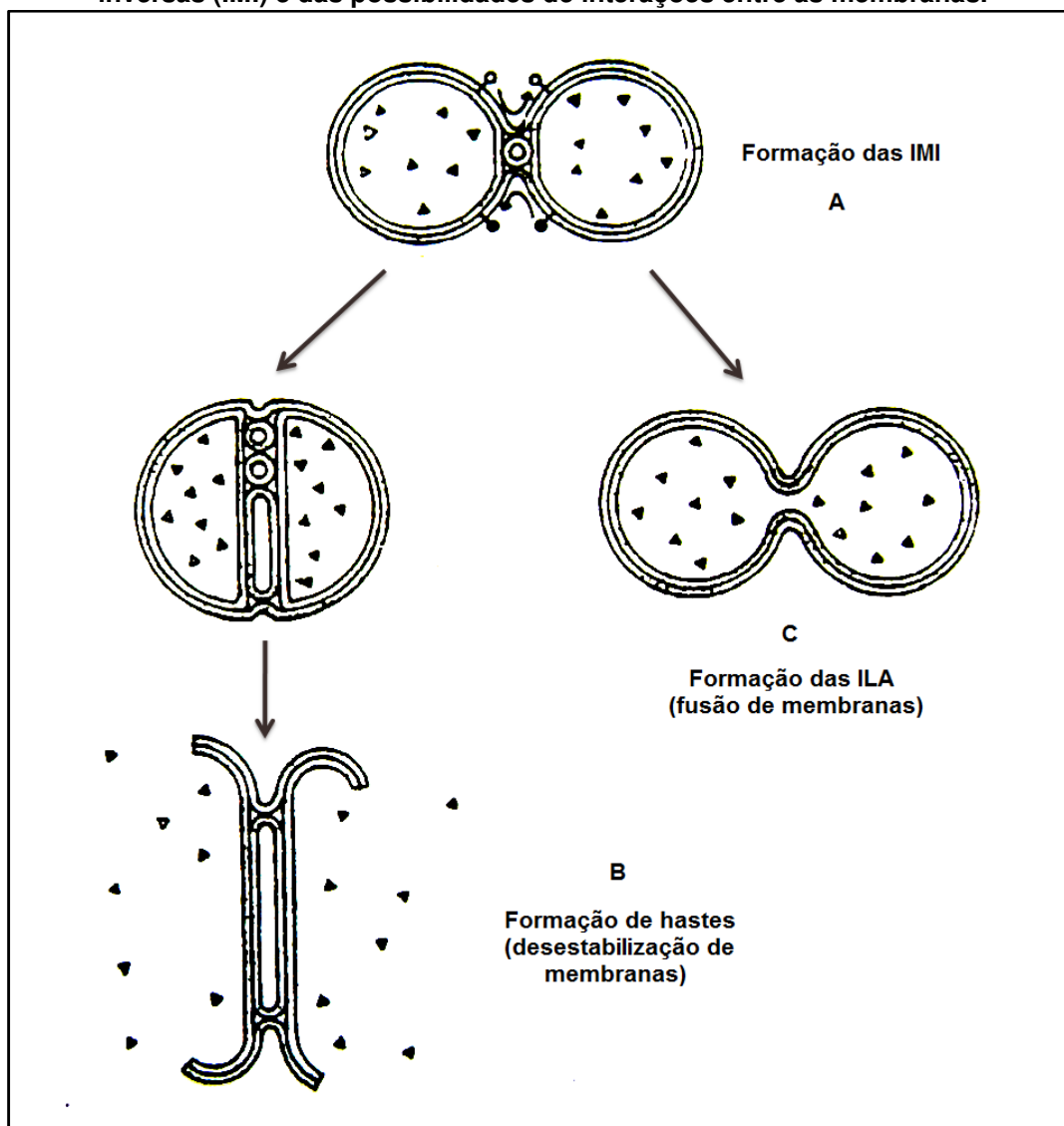
Considerando-se então as interações entre AU e DOPE, discutidas anteriormente, pode-se sugerir que a presença da cadeia hidrofóbica de AU, ancorada na matriz lipídica dos SpHL-AU, possa também desempenhar um

importante efeito na organização do sistema nas diferentes fases cúbicas ($Im3m$ e $Pn3m$) que foram observadas.

A tendência de membranas em formar fases não-lamelares pode estar relacionada a processos em que a topologia lamelar normal da membrana é transitoriamente interrompida, tal como ocorre durante o processo de fusão de membranas. Nesse contexto, as transições L_{α} - Q_{II} e L_{α} - H_{II} são de particular interesse e a transição L_{α} - Q_{II} pode também ser um modelo relevante para o processo de fusão de membranas (SEDDON, 1990; MARSH, 1991).

As formações da organização supramolecular hexagonal ou cúbica estão envolvidas nos processos de desestabilização e/ou fusão de membranas. Nesses processos, ocorre inicialmente a aproximação de duas bicamadas lipídicas, seguida da formação de estruturas intermediárias micelares inversas (IMI), que se localizam entre as bicamadas das membranas (**Figura 30 A**). Esses intermediários podem coalescer para formar hastes, que são precursores micelares da fase H_{II} , o que gera um aumento da tensão interfacial na região da parede das vesículas, seguido da ruptura e liberação do conteúdo presente na cavidade aquosa (**Figura 30 B**). Outra possibilidade é a fusão desses intermediários com as monocamadas exteriores para formar ligações interlamelares (ILA), que são precursores de fases cúbicas, o que resulta na mistura dos lípides e do conteúdo aquoso (**Figura 30 C**). A formação de fase cúbica (Q_{II}) ou da fase hexagonal (H_{II}) no processo de fusão de membranas dependerá de qual das vias apresenta-se energeticamente mais favorável (SIEGEL, 1986; SEDDON, 1990; MARSH, 1991).

Figura 30 – Representação esquemática das estruturas intermediárias micelares inversas (IMI) e das possibilidades de interações entre as membranas.



Adaptado de SIEGEL, 1986.

Neste contexto, pode-se sugerir que a tendência dos componentes dos SpHL-AU se organizarem em fases não lamelares, como na fase cúbica (Q_{II}), poderia favorecer a via de interação inter-membranas relacionada à essa fase, com a formação dos anexos interlamelares transitórios durante o processo da fusão da membrana lipossomal com a membrana endossomal para haver a consequente liberação de AU no citoplasma, a partir dos SpHL-AU.

Diante do exposto, apesar dos resultados obtidos por SAXS indicarem a ocorrência de interação de AU com os lípides na bicamada (**Figura 28**), é

importante ressaltar que tais interações não comprometeram as transições de fase da DOPE da fase lamelar para fases não lamelares (**Figura 27**), cuja ocorrência é indispensável para a desestabilização do sistema lipossomal mediante o processo de fusão de membranas nos endossomas com a conseqüente liberação do material encapsulado no citoplasma, a partir dos SpHL-AU (DE OLIVEIRA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013). Além disso, deve-se considerar que, nos endossomas, as moléculas de água estarão presentes em grande quantidade e poderão alterar o comportamento de fase das moléculas de DOPE.

Assim, com o objetivo de esclarecer melhor o comportamento de SpHL-AU em um meio biológico, foram também realizados estudos com amostras de SpHL em maior grau de hidratação, os quais serão apresentados no capítulo a seguir.

CAPÍTULO 3
ESTUDO DO EFEITO DO pH E DOS CONSTITUINTES DO MEIO
DE CULTURA SOBRE A ORGANIZAÇÃO SUPRAMOLECULAR
DOS LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO
PROLONGADA CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO
UTILIZANDO ESPALHAMENTO DE RAIOS-X
A BAIXO ÂNGULO (SAXS)

1 INTRODUÇÃO

Conforme explicado anteriormente, o emprego da técnica de SAXS para caracterização estrutural de lipossomas possibilita a identificação da fase em que o sistema lipídico se encontra. Sabe-se que é possível induzir transições de fases isotermicamente a partir de pequenas mudanças nas condições físico-químicas tais como hidratação, pH ou concentração de sais (SEDDON, 1990). Desta forma, o principal objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar o efeito das alterações de pH e da influência dos constituintes do meio de cultura sobre a organização supramolecular dos SpHL-BR e SpHL-AU e poder relacionar as informações estruturais destes sistemas com sua estabilidade e com sua propriedade de pH-sensibilidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

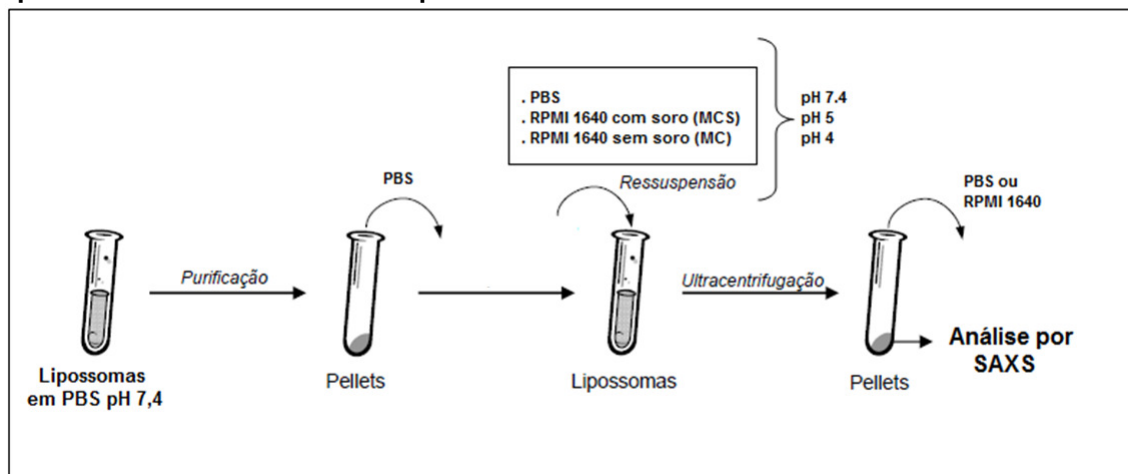
2.1 Material

O tampão salina-fosfato (PBS) foi adquirido da Sigma Chemical Company (St Louis, EUA). O meio de cultura Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI) e o soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da Gibco® (Grand Island, NE, EUA).

2.2 Espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS)

As medidas de SAXS foram realizadas nos *pellets* dos SpHL-AU e SpHL-BR obtidos após o processo de preparação descrito anteriormente (capítulo 1, item 2.3). Inicialmente, as amostras foram submetidas à ultracentrifugação a 150.000 x g por 90 min. a 10 °C (OPTIMA™ L-80XP, Beckman Coulter – Fullerton, CA, EUA). Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e um volume de solução, igual ao do sobrenadante, foi adicionado aos *pellets*. As soluções utilizadas foram: tampão PBS ou meio de cultura RPMI 1640, com e sem a presença de 10% de SFB, nos valores de pH de 7,4 ;5,0 ou 4,0. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex, para a ressuspensão dos lipossomas e, em seguida, foram submetidas, novamente, à ultracentrifugação a 150.000 x g por 90 min. a 10 °C. Finalmente, os sobrenadantes foram descartados obtendo-se os *pellets* finais das amostras (Figura 31).

Figura 31 – Representação esquemática do preparo das amostras de SpHL-AU e SpHL-BR utilizadas nas análises por SAXS.



Os pellets obtidos foram então colocados em suportes de metal, os quais foram selados com um filme de poliimida (Kapton®). As medidas de SAXS nessas amostras de maior teor de hidratação foram também realizadas na linha D1B-SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, SP) (**Figura 17**), com a colaboração dos professores Dr. Rogério Magalhães Paniago e Dr. Ângelo Malachias de Souza (Departamento de Física, ICEX, UFMG). Utilizou-se um comprimento de onda fixo ($\lambda = 1,488$ nm). O detector Pilatus 300k foi posicionado a 1 m da amostra e a região de espaço recíproco variou de $q_{\min} = 0,15 \text{ nm}^{-1}$ até $q_{\max} = 4,0 \text{ nm}^{-1}$. Empregou-se um porta-amostras com sistema de aquecimento DSC-Linkam. Antes das análises das amostras, o substrato foi avaliado quanto à sua interferência nas medidas a serem realizadas e constatou-se que o mesmo não contribuiu com nenhum pico de difração nas condições utilizadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do efeito do pH na estabilidade dos SpHL-BR e SpHL-AU

Para avaliação do efeito do pH sobre a organização supramolecular das moléculas de DOPE nos SpHL-BR e SpHL-AU, os difratogramas de SAXS foram adquiridos na temperatura de 25 °C para as amostras preparadas em tampão PBS 7,4; 5,0 e 4,0. A avaliação das amostras em condições mais ácidas (pH 4,0) foi realizada com o intuito de verificar a ocorrência de modificação estrutural dos sistemas uma vez que, para algumas amostras, em pH 5 (correspondente ao pH tardio do interior dos endossomas) não foi observada nenhuma alteração da organização supramolecular dos mesmos.

Para todos os difratogramas de SAXS, obtidos nesse estudo, a periodicidade das reflexões de Bragg foi calculada por intermédio da fórmula $d = 2\pi/q$.

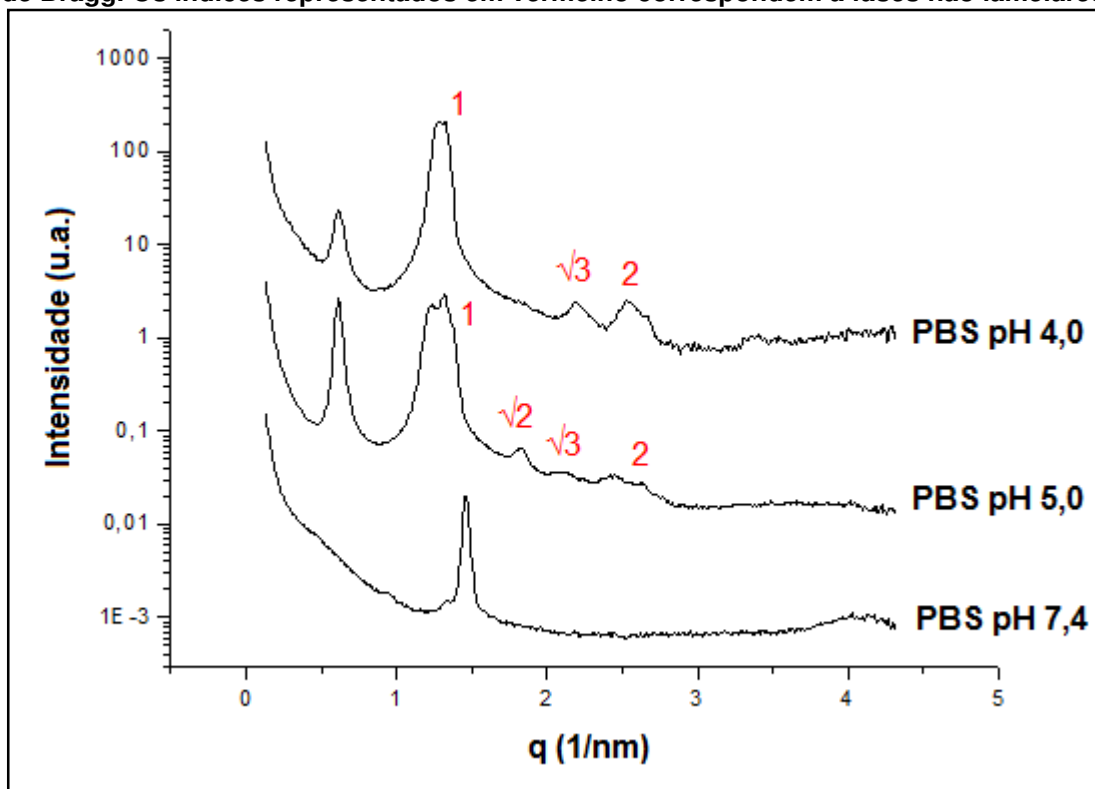
Na **Figura 32** estão apresentados os difratogramas das amostras de SpHL-BR preparadas em tampão PBS pH 7,4 ; 5,0 e 4,0. Para as amostras de SpHL-BR, preparadas em tampão PBS pH 7,4, foi possível detectar a presença de um pico de difração localizado em $q=1,45 \text{ nm}^{-1}$, com distância interplanar (d) igual a 4,33 nm, valor condizente com o relatado para espessura da bicamada lipídica de sistemas lipossomais semelhantes constituídos por DOPE:colesterol:ácido oleico ou DOPE:CHEMS (DE OLIVEIRA *et al.*, 1998; DE OLIVEIRA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2011).

Pela análise do difratograma obtido para a amostra de SpHL-BR preparada em tampão PBS pH 5, pode-se observar a ocorrência de mudanças estruturais significativas em relação às amostras preparadas em pH 7,4. Observa-se a presença de picos em $q = 1,32; 1,83; 2,13 \text{ e } 2,63 \text{ nm}^{-1}$, os quais correspondem a espaçamentos de rede (d) iguais a 4,76; 3,43; 2,95 e 2,39 nm, com razões de reflexão de Bragg em torno de 1, $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$ e 2, indicando a organização das moléculas de DOPE na fase cúbica invertida (Q_{II}) com espaçamento $Pn3m$. Um pico em $q = 0,613 \text{ nm}^{-1}$, para o qual não encontrou-se associação, foi também observado. De modo semelhante, no difratograma obtido para a amostra de

SpHL-BR preparada em tampão PBS pH 4, pôde-se observar a presença de picos em $q = 1,33$; $2,18$ e $2,53 \text{ nm}^{-1}$, os quais correspondem a espaçamentos de rede (d) iguais a $4,72$; $2,88$ e $2,48 \text{ nm}$ com razões de reflexão de Bragg em torno de 1 , $\sqrt{3}$ e 2 , indicando a organização das moléculas de DOPE na fase hexagonal. Além disso, foi também observado um pico de difração em $q = 0,612 \text{ nm}^{-1}$, para o qual não foi atribuído nenhuma razão de reflexão de Bragg. A seqüência de ocorrência de fases não lamelares encontrada em pH 5 e 4 é coerente com o esperado, uma vez que sob alteração de temperatura e/ou pH, há formação de fase cúbica invertida (Q_{II}) seguida da transição para a fase hexagonal invertida (H_{II}) (MARSH, 1991; NEW, 1990 ; LOPES *et al.*, 2013b).

Essas mudanças estruturais observadas nas amostras de SpHL-BR preparadas em tampão PBS pH 5 e em pH 4 podem ser explicadas pela ocorrência de transição das moléculas da DOPE da fase lamelar para fases não lamelares (fase cúbica e fase hexagonal) em decorrência da redução do pH do meio. Sabe-se que as moléculas de CHEMS, quando ionizadas, induzem a uma repulsão eletrostática entre seus grupos carboxílicos e os grupos fosfatos das moléculas da DOPE. Esse fato inibe a formação das ligações de hidrogênio entre os grupos fosfato e amônio das moléculas da DOPE, possibilitando a constituição da bicamada lipídica na fase lamelar em pH 7,4. Nos meios de pH 5 e 4, as moléculas de CHEMS são protonadas levando à uma desestabilização da bicamada lipídica onde pode-se observar a organização das moléculas de DOPE em fases não lamelares (fases cúbica e hexagonal) (DE OLIVEIRA *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013). A ilustração dessas transições de fase está representada na **Figura 6**.

Figura 32 – Difratomogramas dos SpHL-BR preparados em tampão PBS pH 7,4 ; 5,0 e 4,0. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices representados em vermelho correspondem à fases não lamelares.

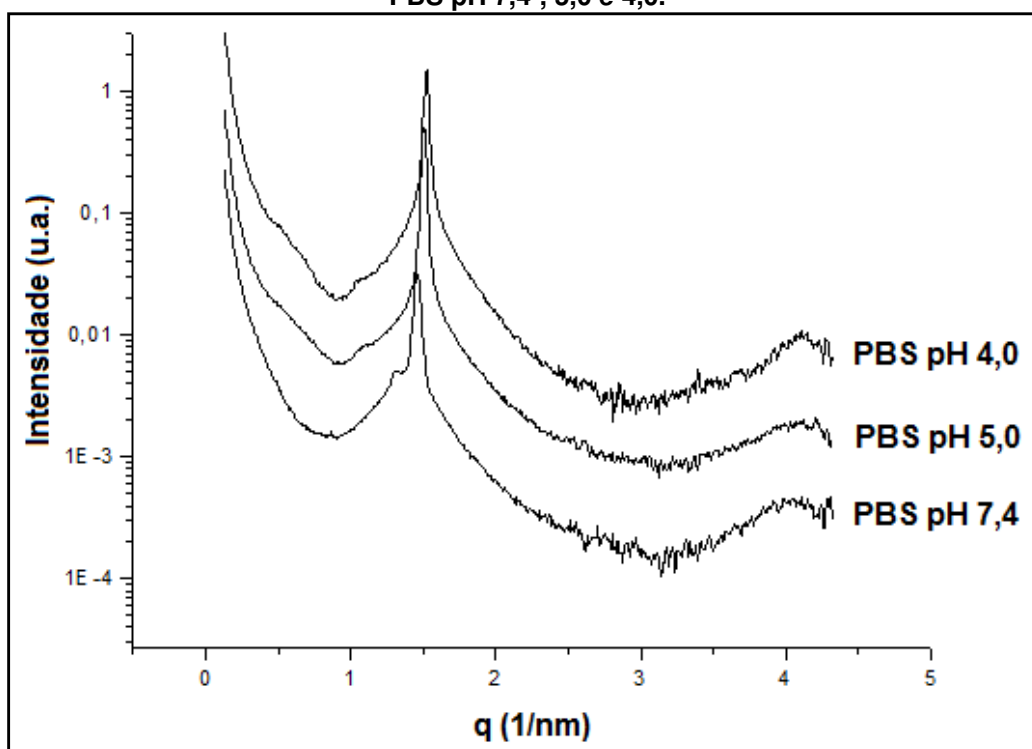


O efeito da presença de AU no padrão de difração dos lipossomas pH-sensíveis pode ser visto na **Figura 33**. Pelos difratogramas das amostras de SpHL-AU, preparadas em tampão PBS pH 7,4; 5,0 e 4,0, não foi possível a determinação de razões de reflexão de Bragg, e consequentemente, não conseguiu-se demonstrar as fases de organização das moléculas de DOPE. Para amostra de SpHL-AU preparada em tampão PBS pH 7,4 observa-se um pico principal localizado em $q = 1,45 \text{ nm}^{-1}$ com distância interplanar igual a 4,33 nm, valor condizente com o observado na amostra de SpHL-BR também preparada em PBS pH=7,4.

Comparando-se os difratogramas dos SpHL-AU, em tampão PBS nos três diferentes valores de pH avaliados (7,4 ; 5,0 e 4,0) (**Figura 33**), pôde-se observar que com a redução do pH ocorreu um alargamento dos picos de difração, em relação aos picos de difração em tampão PBS 7,4, e o desaparecimento do pico em $q \approx 1,3 \text{ nm}^{-1}$ (presente em pH 7,4), sugerindo a formação de estruturas menos ordenadas. Entretanto, a transição de fase das

moléculas de DOPE frente à redução do pH nos lipossomas contendo AU parece ocorrer de forma menos pronunciada do que a observada nos SpHL-BR (**Figura 32**). Esse fato pode ser explicado devido à presença de AU, o qual promove uma maior estabilização da bicamada lipídica, dificultando assim a transição de fase da DOPE e a desestruturação lipossomal frente à redução do pH.

Figura 33 – Difrátogramas obtidos para os SpHL-AU preparados em tampão PBS pH 7,4 ; 5,0 e 4,0.



A molécula de AU apresenta similaridade estrutural à molécula de colesterol o que explica sua forte tendência de interação com biomembranas, com consequente modulação de suas propriedades estruturais. O grau de permeação de AU no interior da bicamada lipídica depende do balanço entre o número de contatos hidrofóbicos e as ligações de hidrogênio com a água. Sendo assim, a composição lipídica é determinante para a definição do posicionamento do triterpeno na bicamada (PRADES *et al.*, 2011).

Han e colaboradores (1997) estudaram o efeito de AU na fluidez e estabilidade da bicamada lipídica lipossomal constituída por dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) pela medida de fluorescência de polarização e pela liberação de

calceína e evidenciaram que AU exerce um efeito modulador da bicamada lipídica reduzindo a fluidez da mesma na fase lamelar fluida (L_α). Esse efeito é comparável ao efeito do colesterol e pode estar relacionado à presença do anel pentacíclico rígido de AU que restringe a mobilidade das cadeias hidrocarbônicas na fase lamelar fluida (L_α). Esse estudo demonstrou também que AU exerce forte efeito estabilizador da membrana lipídica evidenciado pela reduzida liberação de calceína a partir dos lipossomas contendo AU.

Em outro estudo, os efeitos de ácidos triterpênicos pentacíclicos, dentre eles o AU, como moduladores das propriedades físicas da membrana lipídica constituída por DPPC e colesterol, foram avaliados por DSC, SAXS e espectroscopia de ressonância magnética. Os resultados revelaram que AU promove uma alteração no ordenamento da fase lamelar gel (L_β) sem desestabilizar a bicamada lipídica. Por outro lado, foi possível evidenciar que AU promove maior organização da bicamada lipídica na fase lamelar fluida (L_α), enfatizando o efeito estabilizador desse triterpeno na membrana lipossomal (PRADES *et al.*, 2011).

Desta forma, estes dados da literatura, descritos acima, corroboram com nossos resultados os quais indicaram que a presença de AU promove uma maior estabilização dos SpHL-AU na fase lamelar, dificultando assim a transição de fase das moléculas da DOPE, e a consequente, desestruturação dos lipossomas frente à redução de pH. Essa suposição poderá ser confirmada, em um estudo futuro, para determinação da pH-sensibilidade dos lipossomas onde a variação do diâmetro e do potencial zeta dos SpHL-AU, em função do pH, será avaliada.

O processo de desestabilização dos lipossomas pH-sensíveis no compartimento endossomal está principalmente relacionado ao efeito do pH na desestruturação da bicamada lipídica. Entretanto, essa desestabilização pode ocorrer também devido à fusão da membrana dos lipossomas pH-sensíveis com a membrana endossomal havendo a liberação do material encapsulado para o citoplasma, sendo que esse processo ocorre devido às propriedades fusogênicas intrínsecas das moléculas de DOPE (SIMÕES *et al.*, 2004;

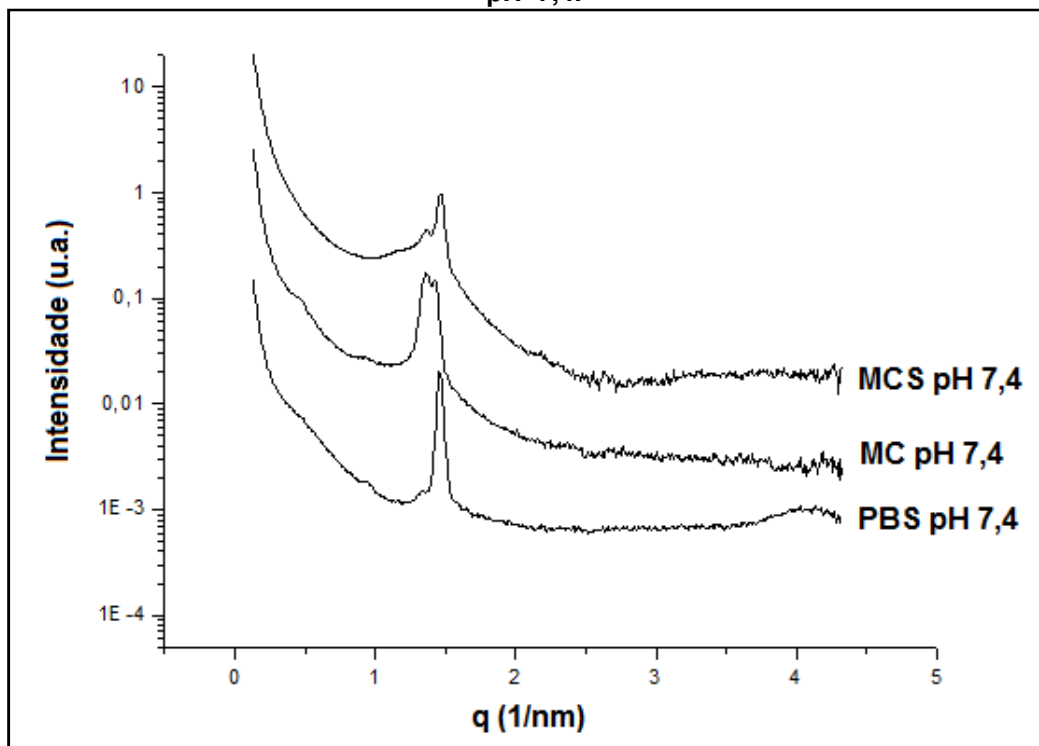
FERREIRA *et al.*, 2013). Desta forma, embora os SpHL-AU tenham apresentado uma menor sensibilidade frente à redução do pH, evidenciada pelos resultados de SAXS, sua atividade citotóxica (capítulo 1, item 3.4) pode estar relacionada à liberação de AU a partir dos lipossomas, no nível endossomal, devido a esse processo de fusão de membranas. Para se confirmar a importância da presença do componente fusogênico (DOPE) para desestruturação lipossomal nos endossomas, pode-se propor um estudo comparativo da atividade citotóxica de lipossomas pH-sensíveis contendo AU (constituídos por DOPE) e de lipossomas não pH-sensíveis contendo AU (constituídos por outro fosfolípideo não fusogênico, como por exemplo, a dioleilfosfatidilcolina, DOPC).

3.2 Avaliação do efeito do meio na estabilidade dos SpHL-BR e SpHL-AU

Para avaliação do efeito do meio sobre a organização supramolecular das moléculas de DOPE nos SpHL-BR e SpHL-AU, os difratogramas foram adquiridos em temperatura de 25 °C para as amostras preparadas em diferentes meios em pH=7,4 : tampão PBS, meio de cultura RPMI 1640 (MC) e meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB (MCS).

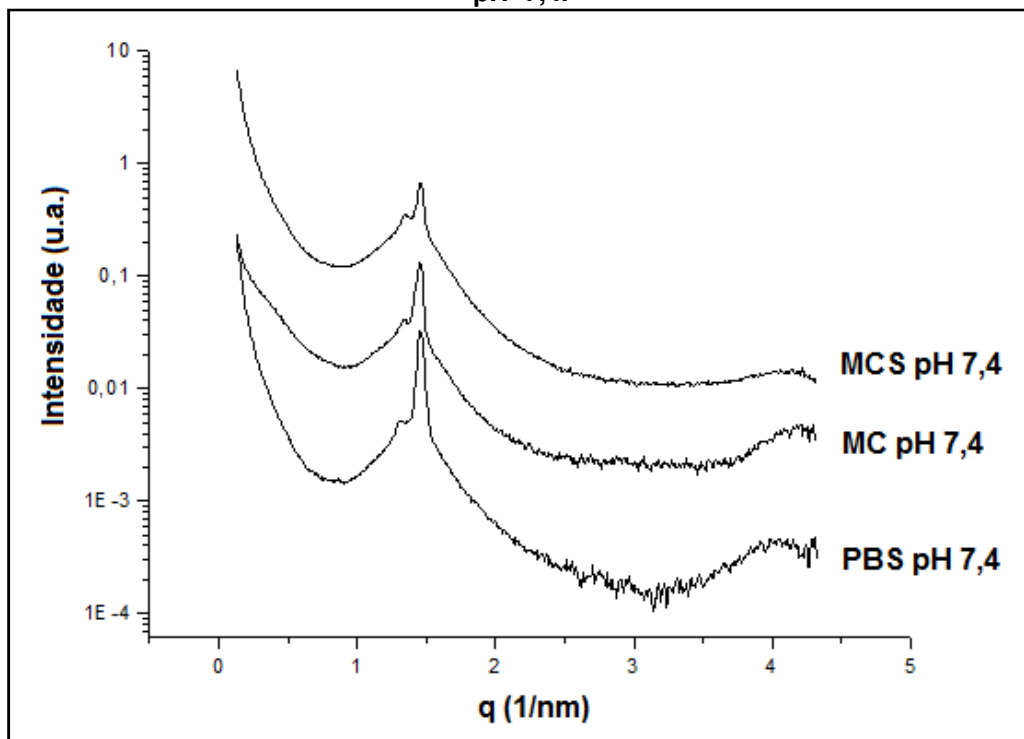
Na **Figura 34** estão apresentados os difratogramas das amostras de SpHL-BR preparadas em tampão PBS, meio de cultura (MC) e meio de cultura suplementado com SFB (MCS), em pH=7,4. A partir desses difratogramas não foi possível a determinação de razões de reflexão de Bragg, e consequentemente, não conseguiu-se demonstrar a organização de fase das moléculas de DOPE. Entretanto, comparando-se os difratogramas obtidos nos três diferentes meios avaliados (PBS, MC e MCS), é possível constatar que em MC e MCS ocorreu um alargamento e diminuição da intensidade dos picos de difração, em relação aos picos de difração dos SpHL-BR em PBS, sugerindo a existência de interação entre os constituintes do meio de cultura (em MC) e os lípides, bem como das proteínas do soro (em MCS) e os lípides, o que conduz à formação de estruturas menos ordenadas, em ambos os casos. Resultado semelhante foi observado por SILVA e colaboradores (2011) para lipossomas constituídos por DOPE e CHEMS.

Figura 34 – Difratomogramas obtidos para os SpHL-BR preparados em tampão PBS, meio de cultura (MC) e meio de cultura suplementado com SFB (MCS), em pH=7,4.



Na **Figura 35** estão apresentados os difratogramas das amostras de SpHL-AU preparadas em tampão PBS, MC e MCS em pH=7,4. Comparando-se os difratogramas obtidos nos três diferentes meios avaliados (PBS, MC e MCS), observa-se que em MC e MCS ocorreu um alargamento e diminuição da intensidade dos picos de difração, em relação aos picos de difração dos SpHL-AU em PBS, entretanto esses efeitos ocorrem de maneira menos pronunciada do que o observado para as amostras de SpHL-BR. Desta forma, sugere-se que ocorra menor interação entre os constituintes do meio de cultura (em MC) e os lípides, bem como das proteínas do soro (em MCS) e os lípides nos SpHL-AU.

Figura 35 - Difrátogramas obtidos para os SpHL-AU preparados em tampão PBS, meio de cultura (MC) e meio de cultura suplementado com SFB (MCS), em pH=7,4.



Sabe-se que as interações entre lipossomas e as proteínas séricas são diversas e complexas e podem resultar em efeitos dramáticos na estabilidade dos lipossomas e em seu comportamento *in vivo*. As lipoproteínas séricas podem potencialmente desestabilizar a bicamada lipídica levando à ruptura das vesículas e perda do material encapsulado. Além disso, outros componentes do soro como fibronectinas, imunoglobulinas e proteína C reativa podem modificar o comportamento dos lipossomas em meio biológico por promoverem interações com as células do sistema retículo-endotelial e ou a ativação do sistema complemento favorecendo o processo de opsonização (BONTÉ & JULIANO, 1986; LYNCH & DAWSON, 2008; AGGARWAL *et al.*, 2009; CAPRIOTTI *et al.*, 2012).

Neste contexto, comparando-se as mudanças nos padrões de difração que ocorrem nos SpHL-BR (**Figura 34**) e nos SpHL-AU (**Figura 35**), nos três diferentes meios avaliados (PBS, MC e MCS) em pH 7,4, pode se inferir que a presença de AU na bicamada lipídica promoveu uma maior estabilização de SpHL frente às interações com os componentes do meio biológico o que

poderia representar um benefício visto que a formulação estará sujeita a menor alteração na circulação sanguínea mantendo uma maior integridade até o alvo terapêutico.

3.3 Avaliação do comportamento de fase da DOPE, nos SpHL-BR e SpHL-AU, na presença dos constituintes do meio de cultura (MC) e do meio de cultura suplementado com SFB (MCS) frente à redução do pH

Estas análises foram realizadas com o objetivo de se avaliar os efeitos dos constituintes do meio de cultura (MC) e das proteínas presentes no meio de cultura suplementado com SFB (MCS) sobre a responsividade dos SpHL-BR e SpHL-AU frente à redução do pH.

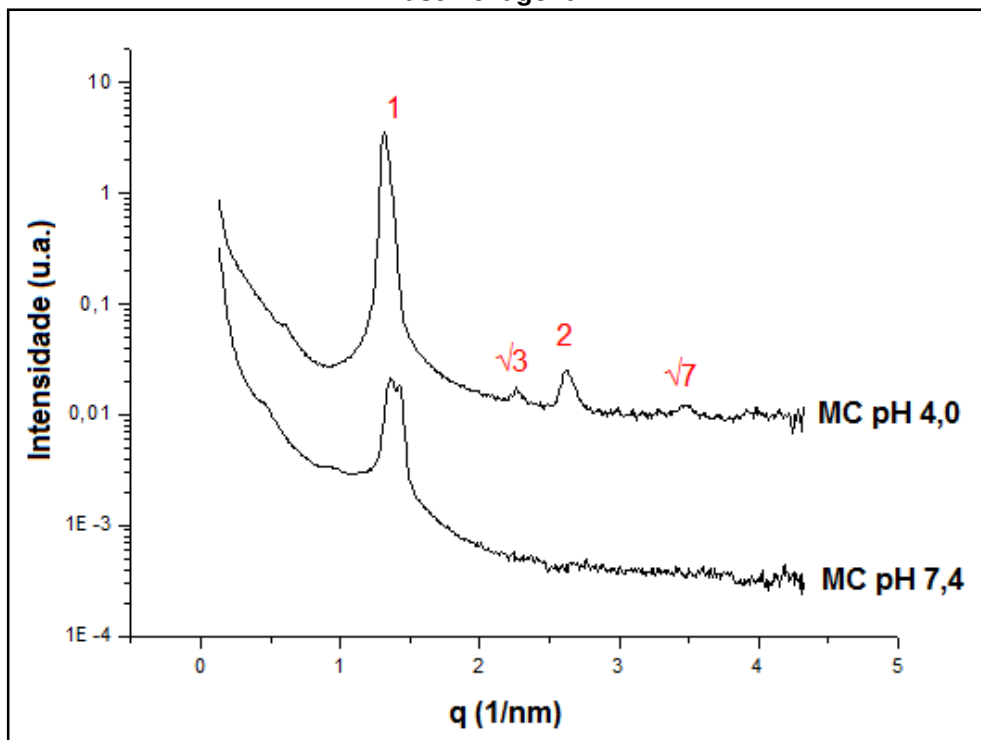
3.3.1 Estudo comparativo dos difratogramas obtidos para os SpHL-BR preparados em meio de cultura (MC) em pH 7,4 e pH 4,0

Na **Figura 36** estão apresentados os difratogramas das amostras dos SpHL-BR preparados em MC em pH 7,4 e 4.

Em pH 7,4 não foi possível a determinação de razões de reflexão de Bragg, e consequentemente, não conseguiu-se demonstrar a organização de fase das moléculas de DOPE. Entretanto, observou-se neste pH um pico principal localizado em torno de $q=1,45 \text{ nm}^{-1}$, com distância interplanar em torno de 4,3 nm, valor condizente com a espessura lamelar e com o valor observado anteriormente na amostra de SpHL-BR preparada em PBS pH=7,4 (**Figura 32**).

Em pH 4, observou-se picos em $q=1,32$; $2,26$; $2,62$ e $3,48 \text{ nm}^{-1}$ os quais correspondem a espaçamentos de rede (d) iguais a $4,76$; $2,78$; $2,4$ e $1,8 \text{ nm}^{-1}$, com razões de reflexão de Bragg em torno de 1, $\sqrt{3}$, 2 e $\sqrt{7}$ indicando a organização das moléculas de DOPE na fase hexagonal. Desta forma, embora tenha sido demonstrada anteriormente uma suposta interação entre os constituintes do MC e dos lípides presentes em SpHL-BR (**Figura 34**), pode-se concluir que esta interação não prejudicou a pH-sensibilidade destes lipossomas, os quais continuaram respondendo à variação de pH.

Figura 36 - Difrátogramas dos SpHL-BR preparados em MC pH 7,4 e 4,0. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices representados em vermelho correspondem à fase hexagonal.



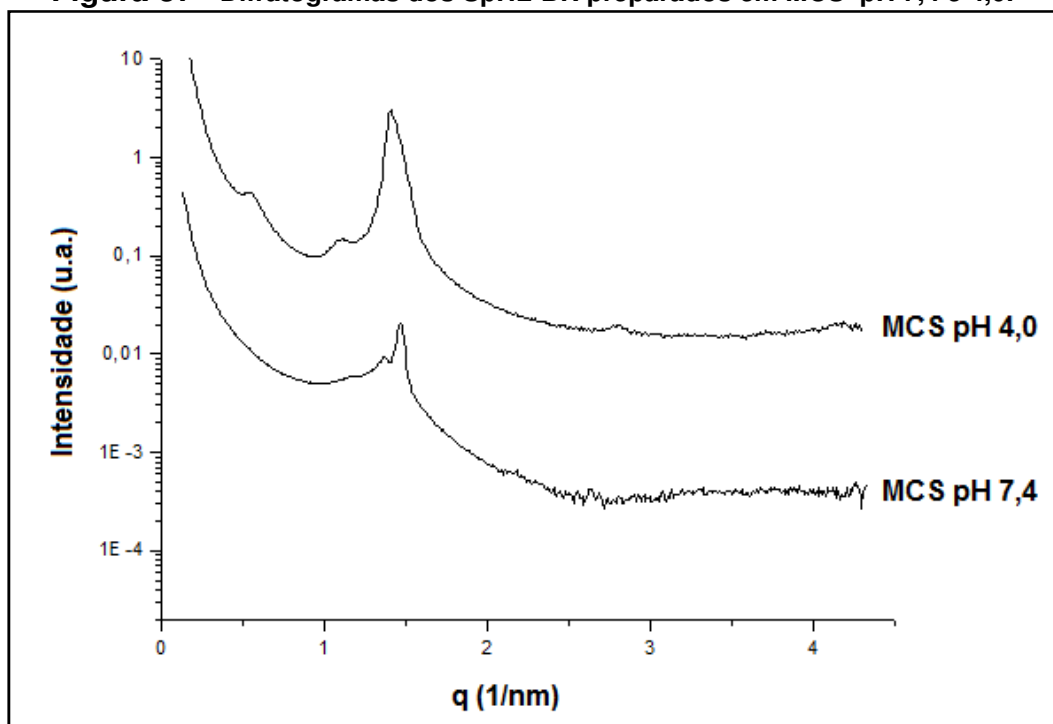
3.3.2 Estudo comparativo dos difratogramas obtidos para os SpHL-BR preparados em meio de cultura completo (MCS) em pH 7,4 e pH 4,0

Na **Figura 37** estão apresentados os difratogramas das amostras dos SpHL-BR preparados em MCS em pH 7,4 e 4.

Em pH 7,4 foi possível identificar picos com valores de $q = 1,36$ e $1,46 \text{ nm}^{-1}$ para os quais não foi possível estabelecer razões de reflexão de Bragg. Conforme já foi demonstrado anteriormente (**Figura 34**), pode-se observar que em MCS ocorreu um alargamento e diminuição da intensidade do pico principal de difração em relação à amostra preparada em MC, pH 7,4, sugerindo que as proteínas do soro fetal bovino (SFB), presentes no MCS, podem interagir com os constituintes dos lipossomas formando estruturas ainda menos ordenadas do que as formadas em presença de meio de cultura sem proteínas.

Em pH 4, foi possível identificar picos mais largos com valores de $q = 0,53$; $1,1$, $1,39$ e $2,8 \text{ nm}^{-1}$ para os quais também não foi possível estabelecer razões de reflexão de Bragg. Entretanto, neste pH, observou-se um diferente padrão de picos de difração, em relação ao padrão em pH 7,4, indicando que a transição de moléculas de DOPE frente à redução do pH, pode não ter sido abolida mesmo com a ocorrência de interação entre as proteínas constituintes do MCS e os lípides.

Figura 37 - Difratomogramas dos SpHL-BR preparados em MCS pH 7,4 e 4,0.



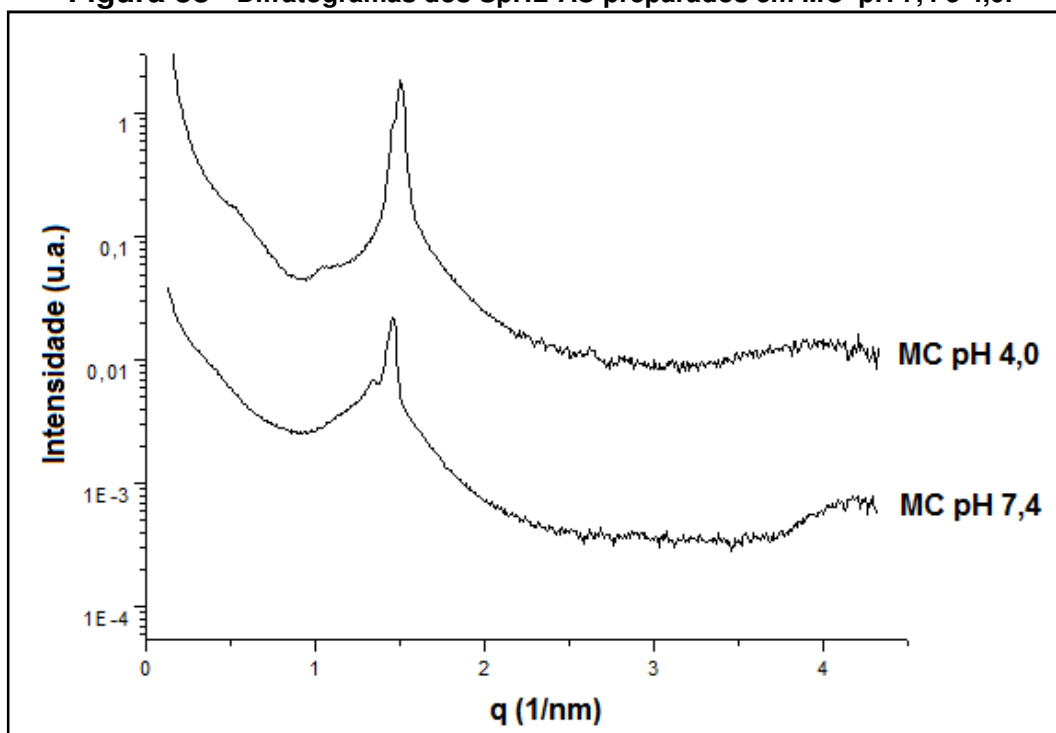
3.3.3 Estudo comparativo dos difratogramas obtidos para os SpHL-AU preparados em meio de cultura (MC) em pH 7,4 e 4,0

Na **Figura 38** estão apresentados os difratogramas das amostras dos SpHL-AU preparados em MC em pH 7,4 e 4 para os quais não foi possível estabelecer razões de reflexão de Bragg.

Comparando-se os difratogramas em pH 7,4 e pH 4 pode-se observar que com a redução do pH ocorreu desaparecimento do pico em $q \approx 1,3 \text{ nm}^{-1}$ (presente em pH 7,4). Entretanto, a transição de fase das moléculas de DOPE frente à redução do pH nos lipossomas contendo AU preparados em MC, ocorre de

forma menos pronunciada do que a observada nos SpHL-BR (**Figura 36**). Este resultado é semelhante ao observado anteriormente para os SpHL-AU preparados em tampão PBS (**Figura 33**) e pode ser explicado devido à presença de AU o qual promove uma maior estabilização da bicamada lipídica, dificultando assim a transição de fase da DOPE e a desestruturação lipossomal frente à redução do pH. Desta forma, pode-se sugerir que a presença dos constituintes do meio de cultura não promoveu uma alteração significativa no padrão de estabilização da bicamada lipídica promovida por AU e, conseqüentemente, não houve mudanças na responsividade destes lipossomas à redução do pH neste meio.

Figura 38 - Difratomogramas dos SpHL-AU preparados em MC pH 7,4 e 4,0.

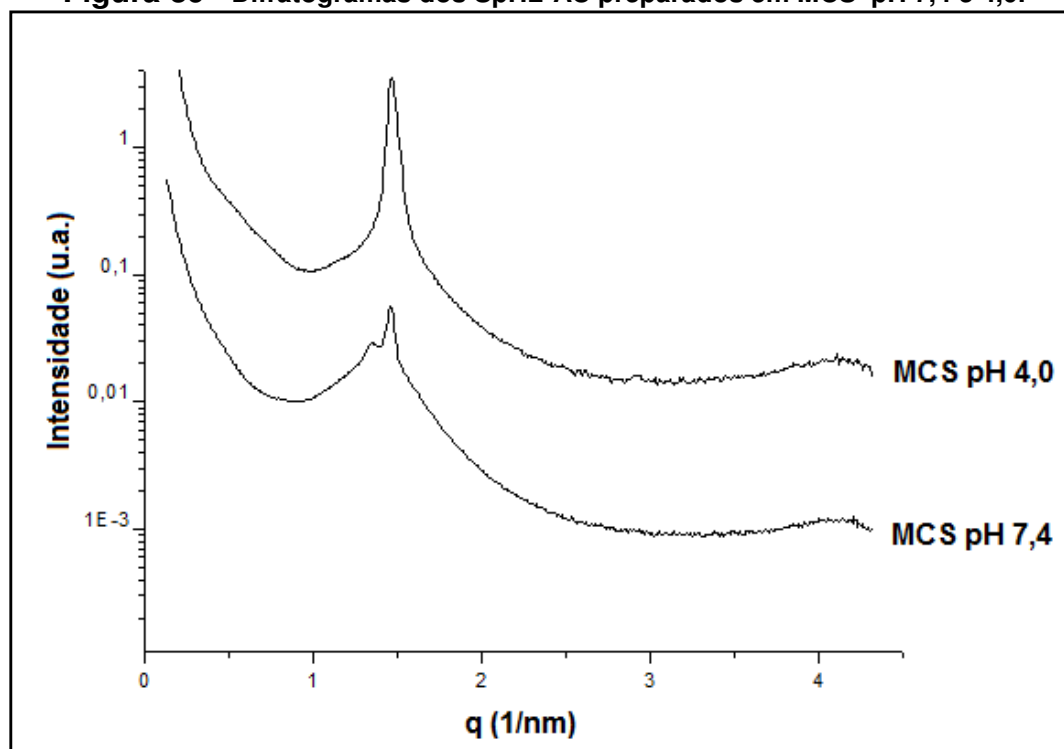


3.3.4 Estudo comparativo dos difratogramas obtidos para os SpHL-AU preparados em meio de cultura completo (MCS) em pH 7,4 e 4,0

Na **Figura 39** estão apresentados os difratogramas das amostras dos SpHL-AU preparados em MCS em pH 7,4 e 4.

Comparando-se os difratogramas em pH 7,4 e pH 4 pode-se observar que com a redução do pH ocorreu desaparecimento do pico em $q \approx 1,3 \text{ nm}^{-1}$ (presente em pH 7,4). Entretanto, de modo semelhante ao discutido anteriormente, a transição de fase das moléculas de DOPE frente à redução do pH nos lipossomas contendo AU preparados em MCS, ocorre de forma menos pronunciada do que a observada nos SpHL-BR (**Figura 37**). Sugere-se então que as proteínas do SFB, presentes no MCS, não modificaram o padrão de estabilização da bicamada lipídica promovida por AU não tendo sido observadas mudanças significativas na responsividade dos SpHL-AU ao pH, neste meio, em relação ao que foi observado em tampão PBS e em MC.

Figura 39 - Difratogramas dos SpHL-AU preparados em MCS pH 7,4 e 4,0.



CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente trabalho demonstraram que os SpHL-AU apresentaram adequada estabilidade química e físico-química em termos de diâmetro médio, potencial zeta e teor de encapsulação de AU após armazenamento por 1 ano, a 4 °C. Desta forma, pode-se concluir que a produção dos lipossomas proposta neste trabalho possibilitou a obtenção de uma formulação com características adequadas para futuras aplicações como produto farmacêutico.

Os estudos de DSC e de SAXS, em condições de baixa hidratação, evidenciaram a ocorrência de interação de AU com a bicamada lipídica sem comprometimento das principais transições de fase da DOPE. Essas transições são indispensáveis para a desestabilização do sistema lipossomal mediante o processo de fusão de membranas nos endossomas, com a conseqüente liberação do material encapsulado no citoplasma.

Os estudos de SAXS, em condições de maior hidratação, revelaram que a interação de AU com a membrana lipídica dos lipossomas resulta em maior estabilização da mesma, dificultando assim a ocorrência de transição de fase da DOPE para fases não lamelares, frente à redução do pH, nos diferentes meios avaliados. Observou-se também que AU promoveu maior estabilização da bicamada lipídica frente às interações com os componentes do meio biológico o que pode representar um benefício, visto que a formulação estará sujeita a menor alteração na circulação sanguínea.

Avaliou-se também os efeitos dos SpHL-AU na viabilidade de linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231) e de próstata (LNCaP) e os resultados demonstraram que, após 48h, o tratamento proposto promoveu redução na viabilidade celular. Esses resultados sugerem que SpHL-AU pode representar uma alternativa promissora para administração intravenosa de AU no tratamento do câncer.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Com base nos resultados do presente estudo, pode-se propor algumas perspectivas, a saber:

- Estudo para determinação da pH-sensibilidade dos SpHL-AU, por meio de titulação, onde a variação do diâmetro e do potencial zeta dos SpHL-AU, em função do pH, pode ser avaliada.
- Estudo comparativo da atividade citotóxica de lipossomas pH-sensíveis contendo AU (constituídos por DOPE) e de lipossomas não pH-sensíveis contendo AU (constituídos por outro fosfolípido não fusogênico, como por exemplo, a dioleilfosfatidilcolina, DOPC), visando a confirmação da importância da presença do componente fusogênico (DOPE) para desestruturação lipossomal nos endossomas.
- Estudos para investigação dos mecanismos da atividade citotóxica dos SpHL-AU em linhagens tumorais. Propõe-se os seguintes ensaios: determinação do conteúdo de DNA subdiploide, por citometria de fluxo, para medida quantitativa da morte celular ; ensaio de dupla coloração com anexina V-FITC e IP, para quantificação de células em apoptose e/ou em necrose; ensaios para detecção de ativação das caspases 8 e 9 e ensaio para detecção de caspase-3 ativa, por citometria de fluxo.
- Estudo para avaliação da atividade antitumoral dos SpHL-AU em modelo animal experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, P.; HALL, J.B.; McLELAND, C.B.; DOBROVOLSKAIA, M.A.; McNEIL, S.E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, p.428–437, 2009.

ALLEN, T.M.; CHONN, A. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Letters*, v.23, p.42-46, 1987.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclocelular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v.28, p. 118-129, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para Validação de Métodos Analíticos. Resolução nº 899, de 20 de maio de 2003. Disponível em: < www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 10 de julho de 2011.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, p. 167-179, 2007.

BERTOLLO, C. M. Mecanismos de morte celular induzida pela radiação γ e expressão de proteínas nas novas linhagens de câncer de mama MACL-1 e MGSO-3. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

BIBI, S.; KAUR, R.; HENRIKSEN-LASEY, M.; McNEIL, S. E.; WILKHU, J.; LATTMANN, E.; CHRISTENSEN, D.; MOHAMMED, A.R.; PERRIE, Y. Microscopy imaging of liposomes: From coverslips to environmental SEM. *International Journal of Pharmaceutics*, v.417, p. 138-150, 2011.

BONACCORSI, I.; ALTIERI, F.; SCIAMANNA, I.; ORICCHIO, E.; GRILLO, C.; CONTARTESE, G.; GALATI, E.M. Endogenous reverse transcriptase as a mediator of ursolic acid's anti-proliferative and differentiating effects in human cancer cell lines. *Cancer Letters*, v. 263, p. 130–139, 2008.

BONTÉ, F.; JULIANO, R.L. Interactions of liposomes with serum proteins. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 40, p. 359-372, 1986.

BRASILEIRO-FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do Crescimento e da Diferenciação Celular. In: Brasileiro-Filho, G. Bogliolo Patologia. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 175-236.

CAPRIOTTI, A.N.; CARACCIOLO, G.; CAVALIERE, C.; FOGLIA, P. POZZI, D.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Do plasma proteins distinguish between liposomes of varying charge density? *Journal of Proteomics*, v. 75, p.1924-1932, 2012.

CARDENAS, C.; QUESADA, A. R.; MEDINAB, M. A. Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 320, p. 402–408, 2004.

CAVALLI, R.; CAPUTO, O.; GASCO, M.R. Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 10, p. 305–309, 2000.

CIPAK, L.; GRAUSOVA, L.; MIADOKOVA, E.; NOVOTNY, L.; RAUKO, P. Dual activity of triterpenoids: apoptotic versus antidifferentiation effects. *Archives of Toxicology*, v. 7, p. 429 – 435, 2006.

CUKIERMAN, E.; KHAN, D. R. The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, v. 80, p.762-70, 2010.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 148, p.135–146, 2010.

DE OLIVEIRA, M. C.; FATTAL, E.; COUVREUR, P.; LESIEUR, P.; BOURGAUX, C.; OLLIVON, M.; DUBERNET, C. pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in quasi-anhydrous samples. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1372, p. 301-310, 1998.

DE OLIVEIRA, M. C.; ROSILIO, V.; LESIEUR, P.; BOURGAUX, C.; COUVREUR, P.; OLLIVON, M.; DUBERNET, C. pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in excess water. *Biophysical Chemistry*, v. 87, n. 2, p. 127-137, 2000.

DOLMANS, D.E.J.G.J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. Photodynamic therapy for câncer. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, p. 381-387, 2003.

DONG, Y-D.; BOYD, B.J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 417, p. 101-111, 2011.

DOS SANTOS, N.; ALLEN, C.; DOPPEN, A-M.; ANANTHA, M.; COX, K.A.K.; GALLAGHER, R.C.; KARLSSON, G.; EDWARDS, K.; KENNER, G.; SAMUELS, L.; WEBB, M.S.; BALLY, M.B. Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: Relating plasma circulation lifetimes to protein binding. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1768, p.1367–1377, 2007.

DRUMMOND, D. C.; ZIGNANI, M.; LEROUX, J.C. Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Progress in Lipid Research*, v. 39, p. 409-460, 2000.

DU, H.; CHEN, X. CD-MEKC Method to Analyze Triterpene Acids in Traditional Chinese Medicines. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 20, p. 1268-1274, 2009.

EDWARDS K. A.; BAEUMNER A. J. Analysis of liposomes. *Talanta*, v.68(5) p. 1432–1441, 2006.

FERREIRA, D. S.; ESPERANDIM, V.R.; TOLDO, M.P.; SARAIVA, J.; CUNHA, W.R.; ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. *Parasitology Research*, v. 106, p. 985–989, 2010.

FERREIRA, D. S. ; LOPES, S.C.A. ; FRANCO, M. S. ; Oliveira, M. C. . pH-sensitive liposomes for drug delivery in cancer treatment. *Therapeutic delivery*, v. 4(9), p. 1-24, 2013.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. Emulsões, suspensões e dispersões. Em: *Princípios Físico-químicos em Farmácia*. 3 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 2003. Cap. 7, p. 345-411.

FRÉZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. *Brazilian Journal of Biological Research*, n. 32, p. 181-189, 1999.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A.; ROCHA, O.G.F; DEMICHELI, C. Lipossomas: Propriedade físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

FRÉZARD, F.; SILVA-BARCELOS, N. M.; SANTOS, R.A.S. A novel approach based on nanotechnology for investigating the chronic actions of short-lived peptides in specific sites of the brain. *Regulatory Peptides*, v. 138, p. 59–65, 2007.

FUNARI, S.S.; REBBIN, V.; MARZORATI, L.; DI VITTA, C. Membrane morphology modifications induced by hydroquinones. *Langmuir*, v.27, p.8257-8262, 2011.

GARBUZENKO, O.; BARENHOLZ, Y, PRIEV, A Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.135, p.117-129, 2005.

GAO, D.; TANG, S.; TONG, Q. Oleanolic acid liposomes with polyethylene glycol modification: promising antitumor drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, p. 3517-3526, 2012.

GAUTAM, R.; JACHAK, S. M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews*, v. 29, n. 5, p. 767-820, 2009.

GREEN, J. M. A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry News & Features*, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53(3), p. 335-343, 2007.

GULINO, P.M., GRANTHAM, F.H., SMITH, S.H., HAGGERTY, A. C. Modification of the acid-basic status of the internal milieu of tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 34, p. 857-869, 1967.

GUNER, S.M., CULLIS, P.R., HOPE, M.J., TILCOCK, C.P.S. Lipid polymorphism: the molecular basis of nonbilayer phases. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, v. 14, p. 211-238, 1985.

HAN, S.K.; KO, Y.; PARK, S.J.; JIN, I.J.; KIM, Y.M. Oleanolic acid and ursolic acid stabilize liposomal membranes. *Lipids*, v. 32, p. 769-773, 1997.

HARMAND, P.O.; DURVAL, R.; DELAGE, C. SIMON, A. Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells. *International Journal of Cancer*, v. 114, p. 1-11, 2005.

HASKELL, R.J.; SHIFFLETT, J.R.; ELZINGA, P.A. Particle size technologies for submicron emulsion. In: BENITA, S. *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery*. [s. 1.]: Harwood academic publishers. 1998. p. 8-19.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.E.; BENOIT, J.P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

HSU, Y.L.; KUO, P.L.; LIN, C.C. Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Life Sciences*, v. 75, p. 2303-2316, 2004.

HUANG, C.Y.; LIN, C-Y.; TSAI, C-W.; YIN, M-C. Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by ursolic acid in human lung cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*, v. 25, p. 1274-1280, 2011.

HUWYLER, J.; DREW, J.; KRAHENBUHL, S. Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs. *International Journal of Nanomedicine*, v. 3(1), p. 21-29, 2008.

ICH. Steering Committee. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, Q2(R1), 2005.

IMMORDINO, M.L.; F. DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*, v. 1, p. 297-315, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. 2014a. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site+/home+/noticias>

/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014. Acesso em 6 de junho de 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. 2014b. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>. Acesso em 6 de junho de 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. 2014c. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>. Acesso em 6 de junho de 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. 2014d. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101. Acesso em 11 de junho de 2014.

ISMAEL, G.F.V.; ROSA, D.D.; MANO, M.S.; AWADA, A. Novel cytotoxic drugs: Old challenges, new solutions. *Cancer Treatment Reviews*, v. 34, p. 81– 91, 2008.

JOHNSON, M.; EDWARDS, K. Liposomes, disks and spherical micelles: aggregate structure in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly(ethyleneglycol)-phospholipids. *Biophysical Journal*, v. 8, p. 3839–3847, 2003.

JUNIOR, A. D. C.; MOTA, L. G.; NUNAN, E. A.; WAINSTEIN, A. J.; WAINSTEIN, A. P.; LEAL, A. S.; CARDOSO, V. N.; DE OLIVEIRA, M. C. Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice. *Life Sciences*, v. 80, p. 659-664, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J.A. O núcleo celular. In: *Histologia Básica*, 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000. Cap. 3, p. 51-65.

KASSI, E.; PAPOUTSI, Z.; PRATSINIS, H.; ALIGIANNIS, N.; MANOUSSAKIS, M.; MOUTSATSOU, P. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, demonstrates anticancer activity on human prostate cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 133, p. 493-500, 2007.

KASSI, E.; SOURLINGAS, T.G.; SPILIOTAKI, M.; PAPOUTSI, Z.; PRATSINIS, H.; ALIGIANNIS, N.; MOUTSATSOU, P. Ursolic Acid Triggers Apoptosis and Bcl-2 Downregulation in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Cancer Investigation*, v. 27, p. 723-733, 2009.

KIM, K.H.; SEO, H.S.; CHOI, H.S.; CHOI, I.; SHIN, Y.C.; KO, S-G. Induction of apoptotic cell death by ursolic acid through mitochondrial death pathway and extrinsic death receptor pathway in MDA-MB-231 cells. *Archives of Pharmacal Research*, v. 34, p.1363-1372, 2011.

KLANG, S. H.; PARNAS, M.; BENITA, S. Emulsions as drug carriers – possibilities, limitations and future perspectives. Em: MULLER et al. (Ed.).

Emulsions and nanosuspensions for the formulations of poorly soluble drugs. Stuttgart: Medpharm, pp. 31-65, 1998.

KLIBANOV, A. L.; MARUYAMA, K.; TORCHILIN V. P.; HUANG, L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Letters*, v. 268(1), p.235-237, 1990.

KRONEK, J.; PAULOVICOVA, E.; PAULOVICOVA, L.; KRONEKOVA, Z.; LUSTON, J. 2012. Biocompatibility and Immunocompatibility. Assessment of Poly(2-Oxazolines). Practical Applications in Biomedical Engineering, Dr. Adriano Andrade (Ed.). Disponível em : <http://www.intechopen.com/books/practical-applications-in-biomedical-engineering/biocompatibility-and-immunocompatibility-assessment-of-poly-2-oxazolines>. Acesso em 18 de dezembro de 2013.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N (eds). Neoplasia. In: Robbins & Cotran. Bases Patológicas das Doenças. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005. Cap. 7, p. 281-356.

LAOUINI, A.; JAAFAR-MAALEJ, C.; LIMAYEM-BLOUZA, I.; SFAR,S.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, v. 1, p. 147–168, 2012.

LASIC, D.D. Novel application of liposomes. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 307-321, 1998.

LEITE, E.A., LANA, A.M., JUNIOR, A.D., COELHO, L.G., DE OLIVEIRA. M.C. Acute toxicity study of cisplatin loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes administered in mice. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 8, p. 229-239, 2012.

LI, J.; GUO, W.J.; YANG, Q.Y. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World Journal of Gastroenterology*, v. 8, p. 493-495, 2002.

LIN, C.C.; HUANG,C.Y.; MONG, M.C.; CHAN, C.Y.; YIN, M.C. Antiangiogenic potential of three triterpenic acids in human liver cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p.755-762, 2011.

LINDBLOM, G.; RILFORS, LEIF. Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids – possible biological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 288, p. 221-256, 1989.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 49, p. 57-68, 1995.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 92-94, 2005.

LOPES, S.C.A.; NOVAIS, M.V.M.; TEIXEIRA, C.S.; HONORATO-SAMPAIO, K.; PEREIRA, M.T.; FERREIRA, L.A.M.; BRAGA, F.C.; OLIVEIRA, M.C. Preparation, Physicochemical Characterization, and Cell Viability Evaluation of Long-Circulating and pH-Sensitive Liposomes Containing Ursolic Acid. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-7, 2013a.

LOPES, S.C.A.; GIUBERTI, C.S.; ROCHA, T.G.R.; FERREIRA, D.S.; LEITE, E.A.; OLIVEIRA, M.C. Liposomes as carriers of anticancer drugs. In: Leticia Rangel. (Org.). *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches*. 1ed. Rijeka, Croácia: InTech, v. 1, p. 85-124, 2013b.

LYNCH, I.; DAWSON, K.A. Protein-nanoparticles interaction. *Nanotoday*, v.3, p.41-47, 2008.

MALAM, Y., LOIZIDOU, M., SEIFALIAN, A.M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 30, p. 592-599, 2009.

MALVERN INSTRUMENTS. Zeta potential - Theory of operation. Em: Zetasizer Theory Manual. Spring Lane South, Inglaterra, 1996, p. 2.2-2.6.

MANU, K. A.; KUTTAN, G. Ursolic acid induces apoptosis by activating p53 and caspase-3 gene expressions and suppressing NF- κ B mediated activation of bcl-2 in B16F-10 melanoma cells. *International Immunopharmacology*, v. 8, p. 974-98, 2008.

MARONI, L.C.; SILVEIRA, A.C.O.; LEITE, E.A.; MELO, M.M.; RIBEIRO, A.F.C.; CASSALI, G.D.; SOUZA, C.M.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; CALDAS, I.R.; ARAUJO, M.S.S.; MARTINS-FILHO, O.A.; OLIVEIRA, M.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. Antitumor effectiveness and toxicity of cisplatin-loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes against Ehrlich ascitic tumor. *Experimental Biology and Medicine*, n. 237, p. 973-984, 2012.

MARSH, D. General features of phospholipids phase transitions. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 57, p. 109-120, 1991.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 47, p. 165-196, 2001.

MENG, Y.Q.; LIU, D.; CAI, L.L.; CHEN, H.; CAO, B.; WANG, Y.Z. The synthesis of ursolic acid derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.17, p. 848-854, 2009.

MIZUSHINA, Y.; IIDA, A.; OHTA, K.; SUGAWARA, F.; SAKAGUCHI, K. Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase. *The Biochemical Journal*, v. 350, p. 757-763, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NEW, R. R. Introduction. In: *Liposomes a Practical Approach*. England: Oxford University Press, 1990. p. 1-32.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. P.; MANSUR, H.S. Biomateriais-fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 200p.

OVESNÀ, Z.; KOZICS, K.; SLAMENOVÁ, D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutation research*, v. 600, p. 131 -137, 2006.

PAPAHADJOPOULOS, D.; GABIZON, A.A. Sterically stabilized (Stealth®) liposomes: pharmacological properties and drug carrying potential in cancer. In: PHILIPPOT, J.R.; SCHUBER, F. *Liposomes as tools in basic research and industry*. CRC Press. 1995. Cap. 11, p. 177-188.

PRADES, J.; VOGLER, O.; ALEMANY, R.; GOMEZ-FLORIT, M.; FUNARI, S.S.; RUIZ-GUTIERREZ, V.; BARCELÓ, F. Plant pentacyclic triterpenic acids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1808, p. 752-760, 2011.

PRASAD, S.; YADAV, V.R.; SUNG, B.; REUTER, S.; KANNAPPAN, R.; DEORUKHKAR, A. et al. Ursolic acid inhibits growth and metastasis of human colorectal cancer in an orthotopic nude mouse model by targeting multiple cell signalling pathways: chemosensitization with capecitabine. *Clinical Cancer Research*, v. 18, p. 4942-4953, 2012.

RAMOS, A.A.; LIMA, C.F.; PEREIRA, M.L.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WILSON, C. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay. *Toxicology Letters*, v.177, p.66-73, 2008.

RAND, R.P., FULLER, N.L. Structural dimensions and their changes in a reentrant hexagonal-lamellar transition of phospholipids. *Biophysical Journal*, v. 66, p. 2127-2138, 1994.

ROBEY, I.F.; BAGGETT, B.K.; KIRKPATRICK, N.D.; ROE, D.J.; DOSESCU, J.; SLOANE, B.F.; HASHIM, A.I.; MORSE, D.L.; RAGHUNAND, N.; GATENBY, R.A.; GILLIES, R.J. Bicarbonate Increases Tumor pH and Inhibits Spontaneous Metastases. *Cancer Research*, v. 69, p. 2260-2268, 2009.

ROUX, E. et al. Serum-stable and long-circulating, PEGylated, pH-sensitive liposomes. *Journal of Controlled Release*, v. 94, p. 447-451, 2004.
SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 208, p. 71-80, 2000.

SCHNEIDER, P.; HOSSEINY, S.S.; SZCZOTKA, M. JORDAN, V. SCHLITTER, K. Rapid solubility determination of the triterpenes oleanolic acid and ursolic acid by UV-spectroscopy in different solvents. *Phytochemistry Letters*, v. 2, p. 85–87, 2009.

SEDDON, J. M. Structure of the inverted hexagonal (H_{II}) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1031, p. 1-69, 1990.

SHANMUGAM, M.K.; RAJENDRAN, P.; LI, F.; NEMA, T.; VALI, S.; ABBASI, T. et al. Ursolic acid inhibits multiple cell survival pathways leading to suppression of growth of prostate cancer xenograft in nude mice. *Journal of Molecular Medicine*, v. 89, p.713-727, 2011.

SHANMUGAM, M.K.; DAI, X.; KUMAR, A.P.; TAN, B.K.H.; SETHI, G.; BISHAYEE, A. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. *Biochemical Pharmacology*, v. 85, p. 1579-1587, 2013.

SIEGEL, D. P. Inverted micellar intermediates and the transitions between lamellar, cubic, and inverted hexagonal lipid phases-II. Implications for membrane-membrane interactions and membrane fusion. *Biophysical Journal*, v. 49, p. 1171-1183, 1986.

SILVA, S. M. L; COELHO, L.; MALACHIAS, A.; PEREZ, C. A.; PESQUERO, J. L.; PANIAGO, R. M.; DE OLIVEIRA, M. C. Study of the structural organization of cyclodextrin-DNA complex loaded anionic and pH-sensitive liposomes. *Chemical Physics Letters*, v. 506, p. 66-70, 2011.

SIMÕES, S.; MOREIRA, J.N.; FONSECA, C.; DÜZGÜNES, N.; LIMA, M.C.P. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 947-965, 2004.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloidal & Interface Science*, v. 10, p. 102-110, 2005.

SOMOVA, L. O.; NADAR, A.; RAMMANAN, P.; SHODE, F. O. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine*, v. 10, p. 115–121, 2003.

SONG, C. K.; JUNG, S. H.; KIM, D.D.; JEONG, K.S.; SHIN, B.C.; SEONG, H. Disaccharide-modified liposomes and their in vitro intracellular uptake. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 380, p. 161–169, 2009.

SONH, K. H.; LEE, H. Y.; CHUNG, H. Y.; YOUNG, H. S.; YIC, S. Y.; KIM, K. W.. Anti-angiogenic activity of triterpene acids. *Cancer Letters*, v. 94, p. 213-218, 1995.

STUBBS, M.; Mc SHEEHY, P.M.J.; GRIFFITHS, R. Causes and consequences of acid pH in tumors: a magnetic resonance study. *Advances in Enzyme Regulation*, v. 39, n. 1, p. 13-30, 1999.

SWARBRICK, J.; BOYLAN, J.C. Liposome as Pharmaceutical Dosage Forms. In: Dekker M. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. New York:Oxford University Press; p. 1-39, 1994.

TANIGUCHI, S.; IMAYOSHI, Y.; KOBAYASHI, E.; TAKAMATSU, Y.; ITO, H., HATANO, T.; SAKAGAMI, H.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; SUGITA, D.; SHIMURA, S.; YOSHIDA, T. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry*, v. 59, p. 315-23, 2002.

TATE, M. W.; EIKENBERRY, D.C.; TURNER, D.C.; SHYAMSUNDER, E.; GRUNER, S.M. Nonbilayer phases of membrane lipids. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.57, p.147-164, 1991.

TIAN, Z.; LIN, G.; ZHENG, R. X.; HUANG, F.; YANG, M. S.; XIAO, P. G. Anti-hepatoma activity and mechanism of ursolic acid and its derivatives isolated from *Aralia decaisneana*. *World Journal of Gastroenterology*, v. 12, p. 874-879, 2006.

TORCHILIN. V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 71, p. 431–444, 2009.

TORCHILIN. V. Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging *The AAPS Journal*, v. 9 (2). p. 128-147, 2007.

TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 63, p.131–135, 2011.

ULRICH, A. S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience Reports*, v. 22, p. 129-150, 2002.

VALADARES, Y. M. *Remijia ferruginea* D.C, *Jacaranda caroba* D.C e *Solanum paniculatum* L: fitoquímica, atividades biológicas e síntese de derivados dos ácidos ursólico e oleanólico. 2009. 269 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

VARGA, Z.; WACHA, A.; VAINIO, U.; GUMMEL, J.; BÓTA, A. Characterization of the PEG layer of sterically stabilized liposomes: a SAXS study. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 165, p. 387-392, 2012.

VARGA, Z.; MIHÁLY, J.; BERÉNYI, Sz.; BOTÁ, A. Structural characterization of the poly(ethylene glycol) layer of sterically stabilized liposomes by means of FTIR spectroscopy. *European Polymer Journal*, v. 49, p. 2415–2421, 2013.

VECHIA, L. D.; GNOATTO, S.C.B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. *Química Nova*, v. 32, p. 1245-1252, 2009.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, n. 70, p. 95-111, 1995.

WANG, X.; WANG, Y.; CHEN, Z.; SHIN, D.M. Advances of Cancer Therapy by Nanotechnology. *Cancer Research Treatment*, v. 41(1), p.1-11, 2009.

WANG, X.; ZHANG, F.; YANG, L.; MEI, Y.; LONG, H.; ZHANG, X., et al. Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2011, p. 1-8, 2011.

WANG, J-S.; REN, T-N.; XI, T. Ursolic acid induces apoptosis by suppressing the expression of FoxM1 in MCF-7 human breast cancer cells. *Medical Oncology*, v.29, p. 10-15, 2012a.

WANG, X-H.; ZHOU, S-Y.; QIAN, Z-Z.; ZHANG, H-L.; QIU, L-H.; SONG, Z.; ZHAO, J.; WANG, P.; HAO, X-S.; WANG, H-Q. Evaluation of toxicity and single dose pharmacokinetics of intravenous ursolic acid liposomes in healthy adult volunteers and patients with advanced solid tumors. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v. 8, p. 1-9, 2012b.

WEXLER, A.; HASEGAWA, S. Relative humidity-temperature relationships of some saturated salt solutions in the temperature range 0° to 50 °C. *Journal of the National Bureau of Standards*, v.53(1), p.19-26, 1954.

WONG, H.L.; BENDAYAN, R.; RAUTH, A.M.; LI, Y.; WU, X.Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 491-504, 2007.

XAVIER, C.P.R.; LIMA, C.F.; PRETO, A.; SERUCA, R.; FERREIRA, M.F.; WILSON, C.P. Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells. *Cancer Letters*, v. 281, p. 162–170, 2009.

XIE, J.M.; BAI, Y. YI, Y.; YANG, G.; ZHANG, C.G. Freeze-dried lecithin nanometer powder injection of ursolic acid and its preparation method. C.I. 424/489; 514/169 US, 21 nov. 2002, 16 fev. 2006.

YAN, S.L.; HUANG, C. Y.; WUA, S. T.; YIN, M. C. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*, v. 24, p. 842–848, 2010.

YANG, T.; CUI, F. D.; CHOI, M.K.; CHO, J.W.; CHUNG, S.J.; SHIM, C.K.; KIM, D.D. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: *In vitro*

and *in vivo* evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 338, p. 317–326, 2007.

YUAN, F.; DELLIAN, M.; FUKUMURA, D.; LEUNIG, M.; BERK, D.A.; TORCHILIN, V.P.; JAIN, R.K. Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence and Cutoff Size. *Cancer Research*, v.55, p. 3752-3756, 1995.

ZHANG, H.; LI, X.; DING,J.; XU, H.; DAI,X.; HOU,Z.; ZHANG,K.; SUN,K.; SUN,W. Delivery of ursolic acid (UA) in polymeric nanoparticles effectively promotes the apoptosis of gastric cancer cells through enhanced inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *International Journal of Pharmaceutics*, v.441, p. 261-268, 2013.

ZHOU, X.J.; HU, X.M.; YI, Y.M.; WAN, J. Preparation and Body Distribution of Freeze-Dried Powder of Ursolic Acid Phospholipid Nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 35, p. 305-310, 2009.

ZHU, Z.; QIAN, Z.; YAN, Z.; ZHAO, C.; WANG, H.; YING, G. A phase I pharmacokinetic study of ursolic acid nanoliposomes in healthy volunteers and patients with advanced solid tumors. *International Journal of Nanomedicine*, v.8, p.129-136,2013.

ANEXO I - Primeira página do artigo “Preparation, physicochemical characterization and cell viability evaluation of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing ursolic acid”

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2013, Article ID 467147, 7 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/467147>



Research Article

Preparation, Physicochemical Characterization, and Cell Viability Evaluation of Long-Circulating and pH-Sensitive Liposomes Containing Ursolic Acid

Sávia Caldeira de Araújo Lopes,¹ Marcus Vinicius Melo Novais,¹ Cláudia Salviano Teixeira,¹ Kinulpe Honorato-Sampaio,² Márcio Tadeu Pereira,³ Lucas Antônio Miranda Ferreira,¹ Fernão Castro Braga,¹ and Mônica Cristina Oliveira¹

¹ Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

² Centro de Microscopia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

³ Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN)/Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), Avenida Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

Correspondence should be addressed to Mônica Cristina Oliveira; monica@farmacia.ufmg.br

Received 4 January 2013; Accepted 8 July 2013

Academic Editor: Andrei Surguchov

Copyright © 2013 Sávia Caldeira de Araújo Lopes et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. Although several drugs are used clinically, some tumors either do not respond or are resistant to the existing pharmacotherapy, thus justifying the search for new drugs. Ursolic acid (UA) is a triterpene found in different plant species that has been shown to possess significant antitumor activity. However, UA presents a low solubility in aqueous medium, which presents a barrier to its biological applications. In this context, the use of liposomes presents a promising strategy to deliver UA and allow for its intravenous administration. In this work, long-circulating and pH-sensitive liposomes containing UA (SpHL-UA) were developed, and their chemical and physicochemical properties were evaluated. SpHL-UA presented adequate properties, including a mean diameter of 191.1 ± 6.4 nm, a zeta potential of 1.2 ± 1.4 mV, and a UA entrapment of 0.77 ± 0.01 mg/mL. Moreover, this formulation showed a good stability after having been stored for 2 months at 4°C. The viability studies on breast (MDA-MB-231) and prostate (LNCaP) cancer cell lines demonstrated that SpHL-UA treatment significantly inhibited cancer cell proliferation. Therefore, the results of the present work suggest the applicability of SpHL-UA as a new and promising anticancer formulation.

1. Introduction

Ursolic acid (UA) is a triterpenoid compound that exists abundantly in the plant kingdom. UA has been reported to have an interesting bioactivity, including anti-inflammatory [1, 2], antihyperlipidemic [3, 4], and hepatoprotective [3] properties. Recent studies have shown that UA has revealed antitumor effects and cytotoxic activity towards various types of cancer cell lines [5–12].

However, although UA presents the advantage of low toxicity, the clinical application of UA is limited due to

several problems, such as its limited water solubility, which leads to a low bioavailability and poor pharmacokinetics *in vivo* and subsequently restricts its effectiveness [13]. Another limitation is its nonspecific distribution throughout the body when administered intravenously. Thus, it is desirable to explore novel formulations of UA that overcome these inconveniences [12]. In this context, the use of nanosystems as carriers, such as liposomes, consists of a promising strategy to deliver this substance and allow for its intravenous administration. Moreover, considering the antitumor action of this triterpene, the use of nanocarriers as vehicles can enable the

ANEXO II - Primeira página do capítulo “Liposomes as carriers of anticancer drugs”

Chapter 4

Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs

Sávia Caldeira de Araújo Lopes,
Cristiane dos Santos Giuberti,
Talita Guieiro Ribeiro Rocha,
Diêgo dos Santos Ferreira, Elaine Amaral Leite and
Mônica Cristina Oliveira

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/55290>

1. Introduction

Nanotechnology and nanoscience present a highly positive prospective of bringing benefits to many research areas and applications. Nanosized vehicles have received considerable attention over the past 30 years as pharmaceutical carriers with a wide range of applications, including drug delivery vehicles, adjuvants in vaccinations, signal enhancers/carriers in medical diagnostics and analytical biochemistry, solubilizers for various materials, as well as their role as a support matrix for chemical ingredients and as penetration enhancers in cosmetic products. More recent developments have reported on the field of liposomal drugs, from the viewpoint of clinically approved products, with cancer therapy representing the main area of interest [1-3]. In this context, liposomes can be used to improve current cancer treatment regimens due to their capacity to increase the solubility of poorly water-soluble antitumor drugs. Moreover, these also act to decrease the mononuclear phagocyte system's (MPS) uptake by using long-circulating liposomes which promote a passive directing toward the tumor region and can lead to an active directing toward the tumor site by connecting specific ligands to the liposome surface [4,5]. These strategies minimize drug degradation and inactivation upon administration, as well as increase the drug's bioavailability and the fraction of drug delivered within the pathological area, thus improving efficacy and/or minimizing drug toxicity.

ANEXO III - Primeira página do comprovante do depósito de pedido da patente:
“Composição farmacêutica contendo ácido ursólico, processo de obtenção e uso.”

Inventores: LOPES, S.C.A.; NOVAIS, M.V.M.; TEIXEIRA, C.S.; BRAGA, F.C.; FERREIRA, L.A.M.; OLIVEIRA, M.C.



< Uso exclusivo do INPI >

vio ufmg

339

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA

Tipo de Documento:

Formulário

DIRPA

Página:

1/3

Título do Documento:

Depósito de Pedido de Patente

Código:

FQ001

Versão:

2

Procedimento:

DIRPA-PQ006

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Universidade Federal de Minas Gerais
 1.2 Qualificação: Instit. de Ensino e Pesquisa
 1.3 CNPJ/CPF: 17217985000104
 1.4 Endereço Completo: Av. Antonio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brasil
 1.5 CEP: 31270-901
 1.6 Telefone: (31) 3409-4774 1.7 Fax: (31) 3409-6430
 1.8 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

☒ continua em folha anexa

- 2. Natureza:** ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO

☐ continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão:** do pedido Nº **Data de Depósito:**

- 5. Prioridade:** ☐ Interna (66) ☐ Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

☐ continua em folha anexa



7/1

ANEXO IV - Primeira página do artigo de revisão “pH-sensitive liposomes for drug delivery in cancer treatment”

REVIEW



pH-sensitive liposomes for drug delivery in cancer treatment

In recent years, liposomes have been employed with growing success as pharmaceutical carriers for antineoplastic drugs. One specific strategy used to enhance *in vivo* liposome-mediated drug delivery is the improvement of intracytoplasmic delivery. In this context, pH-sensitive liposomes (pHSLip) have been designed to explore the endosomal acidification process, which may lead to a destabilization of the liposomes, followed by a release of their contents into the cell cytoplasm. This review considers the current status of pHSLip development and its applicability in cancer treatment, focusing on the mechanisms of pH sensitivity and liposomal composition of pHSLip. The final section will discuss the application of these formulations in both *in vitro* and *in vivo* studies of antitumor efficacy.

Cancer is a leading cause of death worldwide, and the success and efficiency of cancer therapy depends on the improvement of knowledge concerning cancer physiopathology, the discovery of new anticancer drugs, and the development of novel biomedical technologies [1]. Conventional chemotherapeutic drugs distribute throughout the body in a non-specific manner and can affect both cancerous and healthy cells, resulting in dose-related side effects and inadequate drug concentrations actually reaching the tumor. To overcome these problems and to improve anticancer therapies, the R&D of multifunctional nanosystems has received considerable attention [2,3]. In this light, the possibility of exploring the vascular abnormalities of tumors, in an attempt to prevent penetration into normal tissue interstitium while allowing access to the tumors, becomes particularly interesting. In this context, tumor-targeting using nanosystems, such as **liposomes**, has emerged as an interesting approach to overcoming the lack of specificity of conventional chemotherapeutic agents [1]. By using both passive and active targeting strategies, liposomes can increase the intracellular concentration of drugs in cancer cells while minimizing toxicity in normal cells, thereby enhancing anticancer effects and reducing systemic toxicity [2,4]. Moreover, liposomes can also be used to improve current cancer treatment regimens due to their capacity to increase the solubility of poorly water-soluble antitumor drugs.

Strategies used to enhance *in vivo* liposome-mediated drug delivery include the improvement of intracytoplasmic release. The application of such strategies would result in liposomes that represent important tools to improve the

therapeutic efficiency of many drugs that exert their effect at the intracellular level [5]. In this context, **pH-sensitive liposomes** (pHSLip) have been designed to release their contents when submitted to an acidic environment. It is known that average extracellular tumor pH is between 6.0 and 7.0, whereas in normal tissues and blood, the extracellular pH is approximately 7.4 [1]. However, the sites of greatest acidity in tumors are often the most distant from the tumor microvasculature, where liposomes often fail to reach [6]. Moreover, the pH of the tumor interstitium rarely declines below pH 6.5, thus rendering it technically difficult to engineer liposomes that become disrupted in such a narrow window of pH. Otherwise, following binding to cells, the liposomes are internalized through the endocytotic pathway and are retained in endosomes. The potential of pHSLip lies in their ability to undergo destabilization at the endosomal stage, which presents pH values below 5.0, thereby preventing their degradation at the lysosomal level and promoting the drug's release into the cytoplasm [5,7,8]. Therefore, encapsulated compounds are planned to be transported into the cytoplasm through the destabilization of or fusion with the endosome membrane [5,9]. pHSLip have been extensively studied as an alternative to conventional liposomes to effectively target and accumulate anticancer drugs in tumors.

Development of liposomes for drug delivery in cancer treatment

Liposomes can be defined as spherical vesicles formed spontaneously by the dispersion of phospholipids in aqueous media. The resulting bilayers can accommodate amphiphilic or

Diego dos Santos Ferreira, Sáva Caldeira de Araújo Lopes, Marina Santiago Franco & Mônica Cristina Oliveira*

Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenue Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
*Author for correspondence:
E-mail: monica@farmacia.ufmg.br

FUTURE SCIENCE part of **fsg**

ANEXO V - Primeira página do manuscrito "Ursolic acid incorporation does not prevent the formation of non-lamellar phase in pH-sensitive and long-circulating liposomes" submetido na Revista Langmuir

URSOLIC ACID INCORPORATION DOES NOT PREVENT THE FORMATION OF NON-LAMELLAR PHASE IN pH-SENSITIVE AND LONG-CIRCULATING LIPOSOMES

Sávia C. A. Lopes¹; Marcus V. M. Novais¹; Diêgo S. Ferreira¹; Fernão C. Braga¹, Rogério M. Paniago²; Ângelo Malachias²; Mônica C. OLIVEIRA^{1*}.

¹Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

²Physics Department, Institute of Exact Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

*email: itabra2001@yahoo.com.br or monicacristina@ufmg.br

ABSTRACT

Ursolic acid (UA) is a triterpene found in different plant species that has been shown to possess significant antitumor activity. However, UA presents a low water solubility, which presents a barrier to its biological applications. In this context, our research group has proposed the incorporation of UA in long-circulating and pH-sensitive liposomes (SpHL-UA). These liposomes, composed of dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE)/cholesteryl hemisuccinate (CHEMS)/distearoylphosphatidylethanolamine-polyethyleneglycol₂₀₀₀ (DSPE-PEG₂₀₀₀), showed to be very promising carriers for UA. Considering that the release of UA from SpHL-UA and its antitumor activity depend on the occurrence of the lamellar to non-lamellar phase transition of DOPE, in the present work the interactions of UA with the components of the liposomes were evaluated aiming to clarify their role in the structural organization of DOPE. The study was carried out by differential scanning calorimetry (DSC) and small angle X-ray scattering (SAXS) under low hydration conditions. DSC studies revealed that DOPE phase transition temperatures did not shift significantly by UA addition. On the other hand, in SAXS studies, a different pattern of DOPE phase organization was observed in the