

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

GUILHERME CARNEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES LIPÍDICOS CONTENDO ÁCIDO
RETINÓICO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER**

Belo Horizonte - MG
2013

GUILHERME CARNEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES LIPÍDICOS CONTENDO ÁCIDO
RETINÓICO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER**

Tese apresentada como requisito parcial,
para obter o grau de doutor em Ciências
Farmacêuticas, submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia
da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Antônio
Miranda Ferreira. – UFMG

Coorientadores: Prof. Dra Mônica Cristina
de Oliveira e Prof. Dr. Alfredo Miranda de
Góes

Dedico esta tese de doutorado aos meus pais, Ede e Rita, que um dia sonharam em gerar e criar um homem.

Dedico também aos meus avós, Benedita, Eugênia e Sebastião, que acreditaram que um dia eu iria ser um “doutorzinho”, mas infelizmente não estão aqui para ver este dia chegar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai onipotente e de imensa bondade e misericórdia. Sou muito grato por Sua presença em cada segundo da minha vida. Que Sua infinita Providência sempre seja na minha vida.

Ao meu querido professor Lucas, meu grande mestre, meu grande educador. Receio que palavras não sejam suficientes para expressar toda a minha gratidão. Agradeço por cada momento dedicado a me ensinar, não somente na vida acadêmica e profissional, mas em toda a minha vida. Agradeço por cada conselho, por cada orientação, por cada momento agradável que vivemos juntos. Após estes 10 anos de trabalhos juntos, posso dizer que meu carinho e admiração por você são como o de um filho por seu pai. Agradeço a Deus por ter me dado um orientador tão presente, tão gentil e tão humano como você é.

Aos meus pais, Ede e Rita, por todo o apoio nos altos e baixos deste trabalho e de toda a minha vida. Apoio este mesmo sem muitas vezes compreender a totalidade deste trabalho e até mesmo do significado de se fazer um doutorado.

A todos os meus familiares, tios, tias e primos, que se preocupam com minha vida e sempre rezam a Deus pela minha proteção e sucesso nos meus afazeres. Agradeço especialmente à Adriana, minha querida prima, que sempre me apoiou e me incentivou a buscar uma vida fora dos limites interioranos.

Aos meus irmãos Déborah (Hermione) e Wenderson (Chefe) por dividirem seus caminhos comigo, por viverem minhas alegrias e minhas tristezas, por comemorarem minhas vitórias e por prantearem meus fracassos, por sua presença incondicional em cada momento necessário. Sem vocês, tudo seria muito mais difícil. Ao meu outro grande irmão Kildrei, um amigo para todas as horas. Sou muito grato por todos os ensinamentos que você me passou, por todo o apoio, pela sua presença na minha vida.

Aos meus amigos codutorandos comigo, agradeço todo o apoio e toda a preocupação no decorrer deste longo processo.

À professora Mônica, coorientadora deste trabalho, agradeço por toda a gentileza e por toda a doçura dispensada em todos os bons momentos de convivência. Sua contribuição sempre é muito valiosa para mim. Sem dúvida alguma, você é um grande modelo para a minha vida profissional.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Arianne, Bruno, Camila Filizzola, Daniel Christian, Daniel Costa, Danielle, Diego, Elaine, Fernanda, Flávia, Gabriela, Gisele, Juçara, Júlia, Juliana Saliba, Leila, Leonardo, Linna, Lívia, Lorena, Mariana, Marina, Marcus Vinícius, Michelle, Samuel e Talita, meu agradecimento por me ajudarem a tornar o trabalho muito mais agradável de ser realizado, por todos os momentos agradáveis que passamos juntos nos diversos momentos. Sentirei muita falta de todos vocês.

Ao Elton, um amigo presente em todos os momentos deste trabalho e em vários outros da minha vida. Je te remercie pour ta présence, pour chaque fois que tu as étendit la main vers moi et m'as aidé à combattre mes fantômes intérieurs. Je remercie pour chaque moment heureux que nous avons eu ensemble. Tu es présent dans chaque ligne écrite de cette thèse, qui est aussi la tienne.

Aos meus amigos André Luís, Cristiane Giuberti, Délia, Flaviana e Sália, agradeço por todas as vezes em que se dispuseram a me escutar, por cada conselho que vocês me deram e que se revelava muito válido posteriormente, por me ajudarem muito a direcionar este trabalho. Vocês são amigos muito especiais para mim.

Às minhas alunas de iniciação científica, Ana Paula, Layssa e Lidiane, agradeço por cada momento que vocês dedicaram ao nosso trabalho. Vocês tiveram um papel fundamental em diversas partes deste trabalho e eu sou muito grato a cada uma de vocês.

Ao professor Alfredo Góes, coorientador deste trabalho, agradeço por abrir as portas do laboratório para que iniciássemos uma colaboração e por toda a confiança em

mim dispensada. É um grande modelo de pesquisador e de professor para mim; que um dia eu consiga alcançar pelo menos uma parte da imensidão que é este professor.

Ao professor Dawidson Gomes, agradeço por cada contribuição, por cada conselho, por cada ensinamento valioso, por cada tempo gasto na construção de um futuro doutor. Que possamos ainda desenvolver muitos outros trabalhos juntos, em colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Alexandra, Ana Carolina, Ana Cláudia, Arthur, Betinha, Carolina Melo, Carolina Andrade, Ciça, Cinthia, Juliana Lott, Maira, Mariana, Pedro, Thaís agradeço por toda a acolhida e paciência que tiveram. Agradeço também por todos os momentos felizes de convívio que tivemos durante estes últimos anos.

À minha amiga Natássia, a “mulher mais próxima de Deus”, agradeço por me ensinar a cultivar células e a fazer experimentos com elas, sempre com muita paciência e muita gentileza. Agradeço por cada momento feliz que tivemos dentro e fora do laboratório. Agradeço, enfim, por todos os ensinamentos concedidos que vão além dos muros da Universidade. Sua presença permeia cada experimento biológico deste trabalho.

À Jerusa, agradeço por sua ajuda na realização de alguns experimentos biológicos posteriores e por toda a compreensão nos momentos em que eu não entendia muito bem o que deveria ser feito. Sou muito grato por cada um dos seus ensinamentos e, claro, pelos momentos felizes do convívio no laboratório.

À professora Elaine Souza-Fagundes, colaboradora deste trabalho, agradeço por toda a atenção, por todas as análises dos experimentos biológicos e por todas as sugestões, sempre muito úteis.

À Juliana e à Carla, alunas da professora Elaine, pela ajuda na condução de alguns experimentos biológicos.

Aos meus queridos amigos Betânia e Fernando, meu agradecimento por todo o apoio e por todos os divertidos momentos vividos. Vocês dois são os que de fato compreendem como é difícil conciliar a vida de professor e de aluno de doutorado. Sou grato por sempre me ajudarem a seguir em frente.

À professora Renata Barbosa, por todo o seu carinho e cuidado em todos os momentos de convivência. Agradeço por transmitir sua energia e empolgação em todas as ideias que surgem e por nunca deixar de acreditar no novo. Que possamos ter muitas e muitas ideias para dividir e iniciar novos trabalhos!

À professora Ana Paula Fernandes, por cada palavra carinhosa e por todo o incentivo, especialmente na reta final do doutorado. Agradeço por ter tido a oportunidade de trabalhar brevemente com ela, o que, sem dúvida alguma, foi uma experiência riquíssima.

Ao professor Frédéric Frézard e aos seus alunos Ana Paula, Erly, Kelly, Lígia, Mateus e Priscila, por toda ajuda e permissão para a realização de análises de tamanho e potencial zeta das formulações.

Ao professor Rodrigo Oréfice e a seu aluno Anderson pela prestatividade e cuidado nas análises de difração de raios X.

Aos funcionários do Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC), Cynthia, Margareth e Vilela, por toda a ajuda na realização das imagens de microscopia de luz polarizada.

Aos amigos professores e coordenadores das instituições de ensino das quais faço ou fiz parte em algum momento deste doutorado, Alexandre Ferry, Annaline, Claudmeire, Claudiney, Cristina, Dalton, Daniela Quadros, Danielle D'Ávila, Érica Brito, Ivana Raimundo, Jussara Júlia, Lorena Fialho, Míriam, Paula Enéas, Tatiane Braga, agradeço por todos os bons momentos de convívio e por me auxiliarem a conciliar a dura vida de professor e de aluno de doutorado.

Aos amigos e funcionários do LTF, Eduardo, Luíza e Ernane, agradeço por todo o apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À Adelaide e ao Batista, funcionários do Biotério da Faculdade de Farmácia, agradeço sempre a gentileza e a prontidão para nos auxiliar em diversos momentos.

A cada uma das pessoas mencionadas anteriormente, peço a Deus que as abençoe e as guie sempre no melhor caminho possível.

“Deus ao mar o perigo e o abismo deu,

Mas nele é que espelhou o céu.”

(Fernando Pessoa, *Mar Português*)



RESUMO

Os fármacos antitumorais apresentam pobre especificidade, elevada toxicidade e incidência de reações adversas. O direcionamento destes agentes carregados em sistemas nanoestruturados para a região tumoral pode contornar tais inconvenientes. Os derivados da vitamina A (retinol) tais como o ácido todo-trans retinoico (AR), um fármaco lipofílico (log P igual a 4,6), podem ser utilizados no tratamento dos vários tipos de câncer, especialmente a leucemia. Os nanocarreadores lipídicos, nanoemulsões (NE) e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), são sistemas particularmente interessantes para fármacos lipofílicos tais como o AR. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral de NE e NLS carregadas com AR para o tratamento do câncer. A formação *in situ* de um par iônico entre o AR e uma amina foi investigada como alternativa para aumento da retenção na matriz lipídica. NE carregadas com AR e estearilamina (SA) ou trietilamina (TA) e NLS carregadas com AR e SA, TA ou benetamina (BA) foram desenvolvidas. A presença das aminas aumentou significativamente o teor de encapsulação do AR em ambos os nanocarreadores. A atividade citotóxica *in vitro* do AR encapsulado nos carreadores lipídicos foi maior que a do AR livre, sendo que as NLS promoveram maior aumento nesta atividade que as NE. As formulações contendo SA carregadas ou não com AR foram citotóxicas em células normais e cancerosas. Entre as aminas escolhidas, a BA foi a que promoveu maior aumento de atividade citotóxica e retenção do AR na matriz lipídica das NLS ao longo do tempo. Em suma, estes achados sugerem que as NLS carregadas com AR e BA são uma alternativa promissora para a administração intravenosa do AR no tratamento do câncer.

Palavras-chave: nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas, ácido retinoico todo-trans, câncer, atividade anticâncer, par iônico.

ABSTRACT

The antitumor drugs have poor specificity, high toxicity and adverse reactions. The targeting of these agents loaded in nanostructured systems to the tumor region can overcome such drawbacks. The vitamin A (retinol) derivatives such as all-trans retinoic acid (RA), a lipophilic drug (log P equal to 4.6) may be used in the treatment of several cancer types, especially leukemia. The lipid nanocarriers, nanoemulsions (NE) and solid lipid nanoparticles (SLN) are particularly interesting systems for lipophilic drugs such as RA. Therefore, the objective of this study was to develop, characterize and evaluate the antitumor activity of NE and SLN loaded with RA for the treatment of cancer. The *in situ* formation of an ion pairing between RA and an amine was investigated as an alternative for increased retention in the lipid matrix. NE loaded with RA and stearylamine (SA) or triethylamine (TA) and SLN loaded with RA and SA, TA or benethamine (BA) were developed. The presence of amines significantly increased the encapsulation efficiency of RA in both nanocarriers. The *in vitro* cytotoxic activity of RA encapsulated in the lipid carriers was higher than the RA free, and the NLS promoted the highest increase in this activity than the NE. Formulations containing SA loaded or not with RA were cytotoxic to normal and cancer cells. Among the amines chosen, BA was the one that promoted the highest increase in cytotoxic activity and the retention of RA in the lipid matrix of the SLN over time. Taken together, these findings suggest that the RA-BA-loaded SLN are a promising alternative to intravenous administration of RA in the cancer treatment.

Keywords: nanoemulsions, solid lipid nanoparticles, all-trans retinoic acid, cancer, anticancer activity, ion pairing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação diagramática do sistema vascular. (A) Tecido normal. (B) Tumor sólido. Em vermelho, está representado o sangue arterial oxigenado. O azul representa o sangue venoso pobre em oxigenação; o verde representa os vasos linfáticos (Tredan <i>et al.</i> , 2007).....	28
Figura 2. Estágio de diferenciação das Leucemias Mieloides Agudas (Zago <i>et al.</i> , 2005)	30
Figura 3. Estruturas químicas dos principais retinoides e do β -caroteno (Zusi <i>et al.</i> , 2002; Bertram e Vine, 2005).....	34
Figura 4. Fórmula Estrutural do AR.....	36
Figura 5. Representação esquemática do direcionamento de nanopartículas para a região tumoral por meio do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) (Prakash <i>et al.</i> , 2011).....	39
Figura 6. Relação do tamanho de partícula à aparência visual de dispersões contendo partículas (Adaptado de Baker e Naguib, 2005).....	43
Figura 7. Fotografia de uma NE (à esquerda) e uma macroemulsão (à direita), com tamanho de glóbulos de 35 nm e 1 μ m, respectivamente (Solans <i>et al.</i> , 2005).....	44
Figura 8. Representação esquemática de lipossomas, microesferas poliméricas e NLS (Adaptado de Castro e Ferreira, 2008).....	47
Figura 9. NLS de triestearina vistas em microscopia eletrônica de transmissão (Adaptado de Bunjes <i>et al.</i> , 2007).....	48
Figura 10. Representação esquemática da preparação das NE pelo método de homogeneização a quente seguido por ultrassom.....	57
Figura 11. Estrutura química das aminas utilizadas como par iônico do ácido retinoico: estearilamina ou octadecilamina (A) e trietilamina (B).....	58
Figura 12. Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração total do AR.....	60
Figura 13. Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração do AR filtrado.	61
Figura 14. Reação de redução do MTT (amarelo) a cristais azuis de formazan pela redutase mitocondrial de células viáveis.....	63

Figura 15. Efeito da concentração de SA no teor de encapsulação (TE) de AR nas NE.....	67
Figura 16. Estabilidade da encapsulação do AR em NE preparadas com estearilamina (SA) e trietilamina (TA).....	68
Figura 17. Estudos de viabilidade celular, avaliados por ensaio de MTT, do AR livre, NE branca e carregada com AR em células MCF-7 após 48h de tratamento.....	70
Figura 18. Representação esquemática da preparação das NLS pelo método de homogeneização a quente seguido por ultrassom.....	77
Figura 19. Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração total do AR.....	79
Figura 20. Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração do AR encapsulado.....	80
Figura 21. Estrutura química das aminas lipofílicas e respectivos log P: benetamina (A) e estearilamina (B).....	85
Figura 22. Estabilidade de encapsulação do AR em NLS preparadas com trietilamina (TA) ou benetamina (BA).....	86
Figura 23. Microscopia de luz polarizada da NLS sem amina (A) e das NLS contendo amina TA ou BA (B).....	86
Figura 24. (A) Difratoograma dos principais componentes da NLS: Compritol® e AR; (B) Difratoograma normalizado das NLS carregadas com AR e TA; (C) Difratoograma normalizado das NLS carregadas com AR e BA.....	88
Figura 25. Estudos de viabilidade celular, avaliados por ensaio de MTT, do AR livre, NLS brancas e carregadas com AR em células tumorais, MCF-7 e HCT-116, após 48h de tratamento.....	89
Figura 26. Estudos de viabilidade celular, avaliados por ensaio de MTT, do AR livre, NLS brancas e carregadas com AR em células leucêmicas, Jurkat e HL-60, após 48h de tratamento.....	90
Figura 27. Estudos de viabilidade celular, avaliados por ensaio de MTT, do AR livre, NLS brancas e carregadas com AR em células normais (PBMC) após 48h de tratamento.....	91

Figura 28. Estudos de viabilidade celular, avaliados por ensaio de MTT, do AR livre, NLS brancas, NLS contendo AR e TA e NLS contendo AR e BA em células MCF-7 após 48h de tratamento.....	92
Figura 29. Estudos de viabilidade celular, avaliados por ensaio de MTT, do AR livre e do par iônico entre AR e BA em células MCF-7 após 48h de tratamento...	93
Figura 30. Histogramas de fluorescência de DNA de células MCF-7 coradas com iodeto de propídeo após 48h de incubação com meio de cultura (A), NLS brancas (B), AR livre (C) ou NLS contendo AR e BA (D).....	94
Figura 31. Estudos de viabilidade celular, avaliados por ensaio de MTT, do AR livre, NLS brancas e NLS contendo AR e BA em células HL-60 e Jurkat após 48h de tratamento.....	97
Figura 32. Histogramas de fluorescência de DNA de células HL-60 coradas com iodeto de propídeo após 48h de incubação com meio de cultura (A), NLS brancas (B), AR livre (C) ou NLS contendo AR e BA (D).....	98
Figura 33. Histogramas de fluorescência de DNA de células Jurkat coradas com iodeto de propídeo após 48h de incubação com meio de cultura (A), NLS brancas (B), AR livre (C) ou NLS contendo AR e BA (D).....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das Leucemias Mieloides Agudas segundo o grupo FAB.....	30
Tabela 2. Classificação das Leucemias Mieloides Agudas segundo a OMS.....	31
Tabela 3. Atividade clínica representativa de retinoides na terapia de câncer e quimioprevenção (Freemantle <i>et al.</i> , 2003).....	36
Tabela 4. Composição das NE contendo diferentes concentrações de AR (% p/p).....	57
Tabela 5. Composição das NE contendo diferentes concentrações de SA (% p/p).....	58
Tabela 6. Composição das NE contendo aminas lipofílica e hidrofílica (% p/p)...	58
Tabela 7. Efeito da concentração de AR nas características das NE.....	66
Tabela 8. Efeito da concentração de SA nas características das NE.....	66
Tabela 9. Efeito do tipo de amina nas características das NE.....	67
Tabela 10. Composição das NLS contendo AR (% p/p).....	77
Tabela 11. Influência do tipo de amina no tamanho de partículas, índice de polidispersão, potencial zeta e TE do AR em NLS.....	84
Tabela 12. Efeitos dos diferentes tratamentos das células MCF-7 na fragmentação de DNA e na distribuição das células nos estágios do ciclo celular.....	95
Tabela 13. Efeitos dos diferentes tratamentos das células HL-60 e Jurkat na fragmentação de DNA e na distribuição das células nos estágios do ciclo celular.	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância <i>one-way</i>
AR	Ácido retinoico todo-trans
ATCC	American Type Culture Collection
BA	Benetamina
Chol	Cholesterol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i>
DOTAP	1,2-dioleoil,3-trimetilamôniopropano
DOX	Doxorrubicina
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPE-PEG	Dipalmitoilfosfatidiletanolamina associado ao polietilenoglicol
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aumentada
FA	Fase aquosa
FAB	Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico
FO	Fase oleosa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IFN α	Interferon α
IFN- α -2b	interferon α -2b
IL-12 pDNA	DNA plasmidial de interleucina 12
LLA	Leucemia linfoide aguda
LMA	Leucemias mieloides agudas
log P	log do coeficiente de partição
LPA	Leucemia promielocítica aguda
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NE	Nanoemulsões
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
NPM	<i>Nucleophosmin</i>
NuMA	<i>Nuclear Mitotic Apparatus</i>
O/A	Óleo em água
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
pH _e	pH extracelular

pH _i	pH intracelular
PLZF	<i>Promyelocytic Leukemia Zinc Finger</i>
PML	Leucemia promielocítica
RAR	Receptor ácido retinoico
RES	Sistema reticuloendotelial
RXR	Receptor retinoide X
SA	Estearilamina
Sd	Desvios-padrão
SFB	Soro fetal bovino
Stat5b	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TA	Trietilamina
TE	Teor de encapsulação
THF	Tetraidrofurano

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
REVISÃO DA LITERATURA.....	24
1 CÂNCER.....	25
1.1 Tumores Sólidos.....	26
1.2 Leucemias.....	28
1.3 Quimioterapia do Câncer.....	32
2 RETINOIDES.....	33
2.1 Ácido Retinoico.....	36
3 NANOCARREADORES LIPÍDICOS CONTENDO AR NO TRATAMENTO DE CÂNCER.....	38
3.1 Lipossomas.....	39
3.2 Outros Nanocarreadores Lipídicos.....	42
4 NANOEMULSÕES.....	43
5 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS.....	47
5.1 Aplicação das NLS no tratamento do câncer.....	49
OBJETIVOS.....	51
OBJETIVO GERAL.....	52
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
CAPÍTULO 1 – DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E CITOTOXICIDADE DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÁCIDO RETINOICO...	53
1 INTRODUÇÃO.....	54
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
2.1 Materiais.....	56
2.2 Preparo das Nanoemulsões.....	56
2.3 Caracterização Química e Físico-Química.....	59
2.3.1 Determinação do Diâmetro dos Glóbulos.....	59
2.3.2 Determinação do Potencial Zeta dos Glóbulos.....	59
2.3.3 Determinação do Teor de Encapsulação do AR.....	59
2.3.4 Determinação da Concentração do AR por CLAE.....	61
2.3.4.1 Condições Cromatográficas.....	61
2.4 Estudos de Atividade <i>In Vitro</i>	62

2.4.1 Linhagens Celulares.....	62
2.4.2 Viabilidade Celular: Método do MTT.....	62
2.5 Análises Estatísticas.....	64
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
3.1 Influência dos parâmetros sobre as características das NE contendo AR.....	65
3.1.1 Influência da concentração de AR.....	65
3.1.2 Concentração de SA.....	66
3.1.3 Tipo de Amina.....	67
3.2 Estudo de Estabilidade Preliminar.....	68
3.3 Citotoxicidade <i>In Vitro</i>	69
4 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	72
CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO ÁCIDO RETINOICO.....	73
1 INTRODUÇÃO.....	74
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
2.1 Materiais.....	76
2.2 Preparo das Nanopartículas Lipídicas Sólidas.....	76
2.3 Síntese do Par Iônico.....	78
2.4 Caracterização Química e Físico-Química.....	78
2.4.1 Determinação do Diâmetro das Partículas.....	78
2.4.2 Determinação do Potencial Zeta das Partículas.....	78
2.4.3 Determinação do Teor de Encapsulação do AR.....	78
2.4.4 Determinação da Concentração do AR por CLAE.....	80
2.4.5 Microscopia de Luz Polarizada.....	81
2.4.6 Difração de Raios X.....	81
2.5 Estudos de Atividade <i>In Vitro</i>	81
2.5.1 Linhagens Celulares.....	81
2.5.2 Isolamento das Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano.....	82
2.5.3 Viabilidade Celular: Método do MTT.....	82
2.5.4 Conteúdo de DNA subdiploide e análise do ciclo celular.....	83

2.6 Análises Estatísticas.....	83
3 RESULTADOS.....	84
3.1 Preparo e Caracterização das NLS.....	84
3.2 Microscopia de Luz Polarizada.....	86
3.3 Difração de Raios-X.....	87
3.4 Citotoxicidade e Atividade Antitumoral <i>In Vitro</i>.....	88
3.5 Conteúdo de DNA Subdiploide e Análise do Ciclo Celular.....	93
3.6 Atividade <i>in vitro</i> em células leucêmicas.....	96
6 DISCUSSÃO.....	102
7 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	105
DISCUSSÃO GERAL.....	106
CONCLUSÃO GERAL.....	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
ANEXOS.....	120

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A vitamina A e seus derivados têm a habilidade de reduzir o crescimento de tumores e de induzir a apoptose e diferenciação em vários tipos de câncer. Em particular, o ácido retinoico todo-trans (AR) tem sido estudado para o tratamento do câncer, incluindo leucemia e câncer de mama. A ação do AR é atribuída à sua ligação aos receptores nucleares: receptor ácido retinoico (RAR) e receptor retinoide X (RXR), que regulam uma variedade de genes. O AR pode geralmente bloquear o ciclo celular na fase G₁, causando inibição da proliferação e apoptose (Tang e Gudas, 2011). O uso clínico mais efetivo do AR para doenças humanas foi demonstrado no tratamento da leucemia promielocítica aguda (Niles, 2004; Bushue e Wan, 2010).

Em ensaios clínicos, o AR é administrado a pacientes com câncer pela via oral. Entretanto, a biodisponibilidade do AR oral é baixa e bastante variada (Adamson *et al.*, 1993). Além disso, o tratamento contínuo com o AR oral é associado com redução progressiva da concentração plasmática, potencialmente a níveis abaixo dos requeridos para gerar seu efeito, provavelmente devido à indução do metabolismo dependente do citocromo P450 (Muindi *et al.*, 1992). Estes fatores limitam o uso clínico do AR oral e uma formulação intravenosa pode contornar este problema.

O AR, um fármaco hidrofóbico com um log do coeficiente de partição (log P) de 4,6 (Abdulmajed e Heard, 2004), tem baixa solubilidade aquosa, o que pode ser uma grande desvantagem para administração intravenosa. Alguns esforços têm sido feitos no sentido de permitir sua administração por esta via usando nanocarreadores, especialmente os sistemas lipídicos como os lipossomas, as nanoemulsões (NE) e as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) (Lim *et al.*, 2004; Chansri *et al.*, 2006; Kawakami *et al.*, 2006).

Dentre as vantagens associadas às NE e NLS está, mais notadamente, o fato de que sua produção é facilmente transponível para a escala industrial e que ambos os sistemas não requerem o uso de solventes orgânicos. Entretanto, comparadas com as NE, que são preparadas com lípidos líquidos, as NLS têm maior potencial para liberação controlada devido à sua matriz sólida (Muller *et al.*, 2000; Jennings *et al.*, 2002; Joshi e Muller, 2009).

A encapsulação do AR em NLS é geralmente baixa (Jenning e Gohla, 2001), a menos que uma elevada relação tensoativo/lípide seja utilizada (Lim e Kim, 2002; Hu *et al.*, 2004). Isto favorece a localização do fármaco na interface devido à anfifilicidade do AR (Kayali *et al.*, 1991), reduzindo assim os benefícios obtidos pela encapsulação na matriz lipídica (estabilidade aumentada, liberação prolongada e efeito de direcionamento para alvo específico).

Previamente, foi relatado que a formação *in situ* de um par iônico entre o AR, um ácido lipofílico e diferentes aminas proporciona uma alternativa interessante para aumentar a sua encapsulação em NLS. Dentre as aminas testadas, a estearilamina, uma amina lipofílica, proporcionou a mais alta encapsulação (Castro *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009). Estas investigações prévias se deram no contexto do desenvolvimento e avaliação de formulações para o tratamento tópico da acne. Diante disso, a hipótese deste trabalho é que NE e NLS carregadas com AR e diferentes aminas poderiam ser alternativas interessantes para permitir a sua administração para tratamento do câncer. Neste estudo, pretendeu-se desenvolver NE e NLS carregadas com AR para a administração parenteral, avaliando a influência de diferentes aminas: duas lipofílicas (estearilamina e benetamina) e uma hidrofílica (trietilamina). A atividade anticâncer *in vitro* de NLS carregadas com AR e as aminas foi investigada contra diferentes linhagens celulares de câncer.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

1 CÂNCER

As neoplasias são uma das principais causas de morte na atualidade. Em 2008 foram registrados aproximadamente 12,7 milhões de novos casos e cerca de 7,6 milhões de mortes em todo o mundo. Dentre os tumores de maior incidência estão os cânceres de pulmão (1,61 milhões de casos novos), mama (1,38 milhões), cólon e reto (1,24 milhões). Em homens, o mais comum é o câncer de pulmão (1,09 milhões), seguido pelo câncer de próstata (0,89 milhões). Em relação às mulheres, o mais frequente é o câncer de mama (1,38 milhões) (WHO, 2012).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2013 são de 518.510 novos casos de câncer para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Esperam-se 52.680 casos novos de câncer da mama, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. No que se refere às leucemias, em 2013, estimam-se 4.570 casos novos em homens e 3.940 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5 casos novos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2012).

Entende-se por neoplasia ou tumor uma massa anormal de tecido, cujo crescimento é descontrolado e ultrapassa o do tecido normal, persistindo da mesma maneira excessiva após o término dos estímulos que provocaram a alteração. Um tumor pode ser classificado como benigno, quando suas características micro e macroscópicas sugerirem que o novo tecido permanecerá localizado e, portanto, na maioria das vezes, é inofensivo ao paciente. Os tumores malignos, também denominados câncer, são aqueles cuja lesão poderá invadir tecidos adjacentes e se disseminar para locais distantes (metástases) podendo, muitas vezes, causar a morte do paciente (Robbins e Cotran, 2006).

Carcinogênese é um processo crônico e composto por várias etapas, que ocorre devido ao dano mutagênico a genes reguladores da multiplicação e diferenciação celular que leva, por fim, ao desenvolvimento de cânceres invasivos ou metastáticos. Estas alterações podem ser causadas por diversos fatores como vírus, bactérias, parasitas, agentes químicos e físicos. Estes agentes carcinogênicos podem atuar de duas maneiras: primeiro, causando danos aos genes que controlam

a proliferação e migração celular; segundo, promovendo a multiplicação das células neoplásicas (Pauwels *et al.*, 1998).

A transformação de células normais para células malignas é resultado de passos definidos, incluindo: (a) iniciação, onde ocorre dano ao DNA; (b) promoção, onde mudanças genéticas e epigenéticas adicionais aumentam o dano genômico anterior; e (c) progressão para uma doença localmente invasiva ou metastática à distância (Dragnev *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002).

Acredita-se que a exposição carcinogênica forma “campos” de células alteradas muito antes de a doença maligna invasiva ser detectada clinicamente. Ainda não se sabe quais mudanças carcinogênicas são limitantes na manutenção ou na progressão de lesões pré-neoplásicas. Estas mudanças são distintas para cada tipo de tecido ou cada agente carcinogênico (Dragnev *et al.*, 2000).

É possível identificar alguns traços que são apresentados pelas células tumorais, independentemente de sua origem. Destacam-se os seguintes traços: autonomia frente à fatores de crescimento, insensibilidade à fatores de inibição, evasão da apoptose, capacidade replicativa ilimitada, angiogênese sustentada e capacidade de invasão tecidual e metástase (Hanahan e Weinberg, 2000).

Os caminhos patogênicos requeridos para desenvolver ou manter um fenótipo transformado em determinado tecido podem representar potenciais alvos terapêuticos para a prevenção e tratamento do câncer. As etapas de iniciação, promoção, progressão e invasão ou metástase podem ser alvos de agentes antiproliferativos, além de indutores de diferenciação ou de apoptose (Dragnev *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002).

1.1 Tumores Sólidos

Os tumores sólidos são estruturas semelhantes a órgãos, porém heterogêneos e complexos estruturalmente. Englobam células cancerosas e do estroma (isto é, fibroblastos e células inflamatórias), que estão embutidas numa matriz extracelular, e são nutridas por uma rede vascular. Cada um destes componentes pode variar de um local para outro no mesmo tumor (Tredan *et al.*, 2007).

A despeito de todas as mutações ocorridas nas células, os tumores não podem crescer mais do que 1 a 2 mm de diâmetro sem que eles sejam

vascularizados. As células neoplásicas, assim como as células normais, necessitam de nutrientes para a manutenção de seu elevado metabolismo. A angiogênese é o desenvolvimento de uma nova rede vascular a partir de vasos sanguíneos pré-existentes e/ou de células tronco endoteliais circulantes e é fundamental no processo de crescimento tumoral e metástase (Virrey *et al.*, 2008; Chua *et al.*, 2010; Jun *et al.*, 2010).

O estroma do tumor é associado com matriz extracelular alterada e aumento do número de fibroblastos que sintetizam fatores de crescimento, quimiocinas e moléculas de adesão. A composição e a estrutura dos componentes do estroma podem contribuir para um aumento na pressão do fluido intersticial, o que dificulta a entrada de macromoléculas no tecido. Além disso, a estrutura tridimensional compacta do tumor sólido pode influenciar na sensibilidade das células à radiação e à quimioterapia (Tredan *et al.*, 2007).

Outra característica marcante dos tecidos tumorais é o fato do pH extracelular (pH_e) ser mais ácido que o pH dos tecidos normais. O pH intracelular (pH_i) de ambos os tecidos é relativamente similar devido à necessidade de se manter um ambiente favorável para as várias atividades citoplasmáticas. Portanto, o pH_e substancialmente reduzido no tumor quando comparado com o tecido normal promove um gradiente de pH celular diferente nestes dois tecidos. Uma das hipóteses mais aceitas para explicar o baixo pH_e nos tecidos tumorais é o *clearance* ineficiente dos metabólitos ácidos produzidos durante a glicólise aeróbica intensa das células cancerosas (Stubbs *et al.*, 1999; Patrick, 2005).

O carcinoma, tumor de origem epitelial, pode ser classificado como *in situ*, quando se restringe apenas ao sítio no qual se originou; ou infiltrante, quando se estende a tecidos vizinhos. No caso do câncer de mama, por exemplo, as alterações podem ocorrer nos ductos mamários (carcinoma ductal) ou nas glândulas secretoras de leite (carcinoma lobular) e gerar carcinomas *in situ* ou infiltrante. O mais frequente tipo de adenocarcinoma de mama é o carcinoma ductal infiltrante, que representa 65 a 85% dos casos, seguido pelo carcinoma lobular infiltrante, com 5 a 10% dos tumores diagnosticados (Abreu e Koifman, 2002).

A resposta do tumor à quimioterapia é influenciada diretamente e indiretamente pela vasculatura e pelo fluxo sanguíneo, que é anormal em tumores sólidos. Os vasos sanguíneos tumorais geralmente são dilatados e com ramificações, caracterizadas por excessivas curvas nas junções entre arteríolas e

veias (Figura 1). Esses vasos não são organizados em arteríolas, capilares e vênulas, mas compartilham características de todas essas estruturas e suas paredes podem ter fenestrações, membranas basais descontínuas ou ausentes e podem não apresentar músculo liso perivascular. Tais alterações aumentam a permeabilidade desses vasos em comparação com os normais e isto pode ser relevante na quimioterapia, já que os fármacos ganham acesso aos tumores via corrente sanguínea e as alterações metabólicas (incluindo a hipóxia) também influenciam a sensibilidade das células aos fármacos (Tredan *et al.*, 2007).

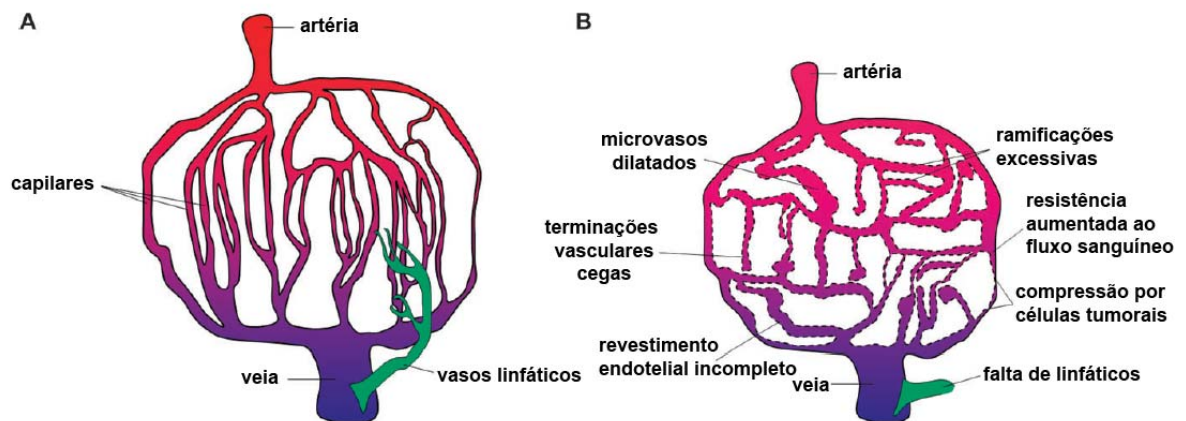


Figura 1 – Representação diagramática do sistema vascular. (A) Tecido normal. (B) Tumor sólido. Em vermelho, está representado o sangue arterial oxigenado. O azul representa o sangue venoso pobre em oxigenação; o verde representa os vasos linfáticos (Tredan *et al.*, 2007).

A quimioterapia permanece como uma das melhores alternativas terapêuticas na oncologia e é usada para tratamento primário, terapia adjuvante e paliativa. Tem um benefício particular na doença disseminada, que é particularmente difícil de ser tratada com radiação e cirurgia. Nos últimos 50 anos, têm sido realizados numerosos avanços nas propriedades dos agentes quimioterápicos, sendo que existem, portanto, diversos agentes quimioterápicos atualmente reconhecidos (Chabner e Roberts, 2005; Mellor e Callaghan, 2008).

1.2 Leucemias

Leucemia é uma doença maligna progressiva dos órgãos formadores de sangue, caracterizada por proliferação e desenvolvimento perturbados dos leucócitos e seus precursores no sangue e na medula óssea (Robbins e Cotran, 2006; Bogliolo e Brasileiro Filho, 2011).

Inicialmente, as leucemias eram chamadas de agudas ou crônicas baseadas na expectativa de vida do paciente, mas atualmente são classificadas de acordo com a maturidade celular. As leucemias agudas consistem no aumento rápido da produção de células predominantemente imaturas; e as leucemias crônicas são compostas de leucócitos mais maduros, mas ainda anormais (Robbins e Cotran, 2006).

Adicionalmente, as doenças podem ser subdivididas de acordo com o tipo de célula afetada. Assim, tem-se a leucemia linfoblástica ou linfocítica e a leucemia mieloide ou mielogênica. Na leucemia linfoblástica, a neoplasia se dá nas células da medula óssea que dão origem aos linfócitos, especialmente o linfócito B; na leucemia mieloide, a alteração cancerosa se dá nas células que dão origem aos eritrócitos, outros tipos de leucócitos e plaquetas (Robbins e Cotran, 2006; Bogliolo e Brasileiro Filho, 2011).

A leucemia linfóide aguda (LLA) resulta da proliferação clonal de precursores linfóides anormais na medula óssea. Embora possa ocorrer em qualquer idade, sua incidência é maior entre crianças de 2 a 5 anos, diminuindo em adolescentes e adultos jovens, voltando a crescer após os 60 anos de idade. De acordo com o grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB), pode ser classificada em 3 categorias, L1 a L3, conforme parâmetros morfológicos (Bennett *et al.*, 1976; Zago *et al.*, 2005).

As leucemias mieloides agudas (LMA; Figura 2) constituem um grupo heterogêneo de doenças caracterizado por uma expansão clonal no tecido hematopoético com proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mieloide, ocasionando produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais. Em geral, a LMA é acompanhada de neutropenia, anemia e plaquetopenia. Este tipo de leucemia representa 15 a 20% das leucemias agudas da infância e 80% das leucemias agudas que ocorrem em adultos (Zago *et al.*, 2005; Jacomo *et al.*, 2008).

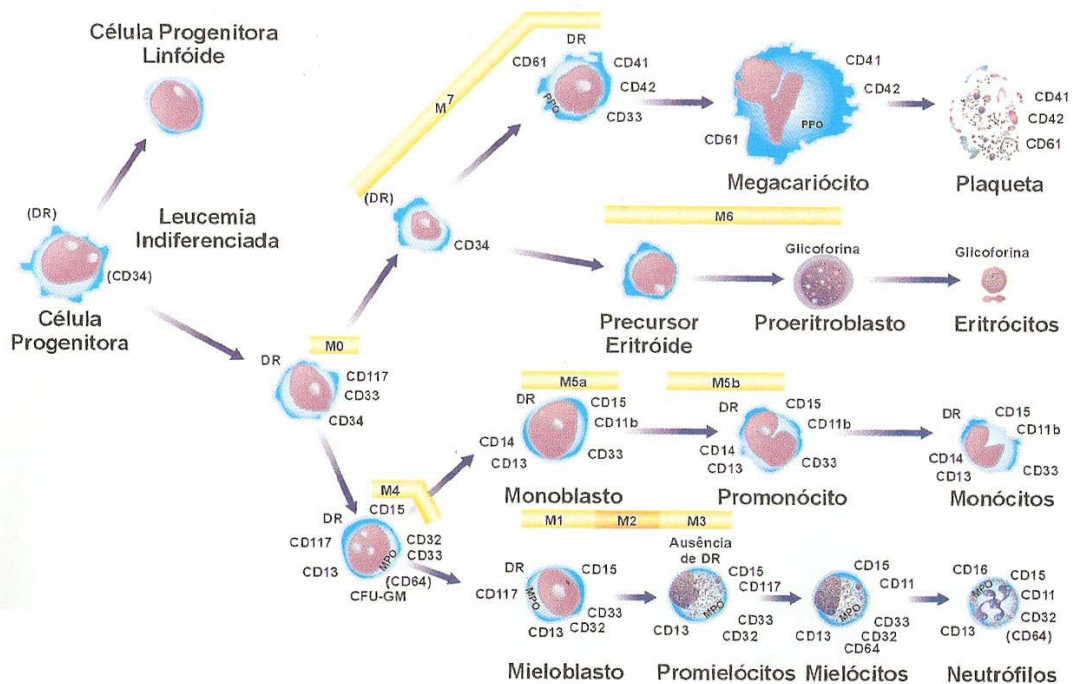


Figura 2 – Estágio de diferenciação das Leucemias Mieloides Agudas (Zago *et al.*, 2005)

De acordo com o grupo FAB, a LMA pode ser classificada em 8 subtipos (Tabela 1), utilizando aspectos morfológicos, citoquímicos e marcadores imunofenotípicos para realizar esta classificação (Bennett *et al.*, 1976; Zago *et al.*, 2005; Harrison e Fauci, 2008).

Tabela 1 – Classificação das Leucemias Mieloides Agudas segundo o grupo FAB

Classificação	Denominação
M0	LMA com Mínima Diferenciação
M1	LMA sem Maturação
M2	LMA com Maturação
M3	Leucemia Promielocítica Hipergranular
M4	Leucemia Mielomonocítica Aguda
M5	Leucemia Monoblástica e Monocítica Aguda
M6	Leucemia Eritroide Aguda
M7	Leucemia Megacarioblástica Aguda

Além disso, numa tentativa de ampliar a classificação, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a Classificação das LMA, destacando as alterações

genéticas e sua influência na resposta ao tratamento e na sobrevida (Tabela 2) (Harrison e Fauci, 2008).

Tabela 2 – Classificação das Leucemias Mieloides Agudas segundo a OMS

I.	LMA com anormalidades genéticas recorrentes LMA com t(8;21)(q22;q22);AML1(CBF α)/ETO LMA com eosinofilia de medulla óssea anormal [inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22);CBF β /MYH11] Leucemia promielocítica aguda [LMA with t(15;17)(q22;q12) (PML/RAR α e variantes)] LMA com anormalidades 11q23 (MLL)
II.	LMA com displasia multilinhagem Seguindo uma síndrome mielodisplásica ou síndrome mielodisplásica/alteração mieloproliferativa Sem antecedente de síndrome mielodisplásica
III.	LMA e síndrome mielodisplásica, relacionadas à terapia Relacionadas a agente alquilante Relacionadas a inibidor de topoisomerase tipo II Outros tipos
IV.	LMA não categorizada de outra forma LMA minimamente diferenciada LMA sem maturação LMA com maturação Leucemia mielomonocítica aguda Leucemia monoblástica e monocítica aguda Leucemia eritroide aguda Leucemia megacarioblástica aguda Leucemia basofílica aguda Panmielose aguda com mielofibrose Sarcoma mieloide

A leucemia promielocítica aguda (LPA) é a LMA geneticamente caracterizada pela presença de translocações cromossômicas específicas, de classificação M3 conforme o grupo FAB. Na grande maioria dos pacientes com LPA, as células leucêmicas apresentam a translocação t(15;17)(q22;q21), que funde o gene RAR α com o gene para a leucemia promielocítica (PML) (Chen *et al.*, 1997). Entretanto, há algumas variantes moleculares já bem definidas, nas quais o RAR α está associado a

outros genes: PLZF (do inglês, *Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*), resultante da translocação variante t(11;17)(q23;q21); NPM (do inglês, *Nucleophosmin*), resultante da translocação t(5;17)(q35;q21); NuMA (do inglês, *Nuclear Mitotic Apparatus*), de t(11;17)(q13;q21); e Stat5b (do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription*). A LPA é o primeiro modelo de doença genética adquirida tratada com um fármaco específico, o AR, que induz diferenciação terminal seguida de apoptose das células leucêmicas. A associação entre o AR e antracíclicos induz à remissão em mais de 90% dos pacientes (Chen *et al.*, 1997; Jacomo *et al.*, 2008).

1.3 Quimioterapia do Câncer

O uso de mostardas nitrogenadas como agentes alquilantes, no início da década de 40, marcou o início da quimioterapia. Nos 20 anos seguintes, outros agentes alquilantes foram desenvolvidos, como a ciclofosfamida e o clorambucil. Uma segunda abordagem surgiu logo após a 2ª Guerra Mundial, com os análogos de folato (antifolatos), como a aminopterinina e o metotrexato, que apresentaram atividade antitumoral em várias formas de câncer, como o de mama, ovário, bexiga, cabeça e pescoço, além de coriocarcinoma, osteossarcoma e leucemia. Outros antineoplásicos foram desenvolvidos no início dos anos 50, como os análogos de purina (6-mercaptopurina), seguidos pela descoberta dos alcaloides da *Vinca* (vincristina, vimblastina) (Chabner e Roberts, 2005).

A partir daí, diversos outros agentes têm sido relatados como antineoplásicos. O 5-fluorouracil, inibidor de síntese de DNA, os taxanos como paclitaxel (taxol, um antimetabólito), a camptotecina (inibidora de topoisomerase I, uma enzima que reduz o estresse de torção do DNA super-espinalado), compostos de platina como a cisplatina e a carboplatina, as nitrosoureas (que alquilam e fazem ligações cruzadas no DNA), o fosfato de fludarabina (análogo de purina), as antraciclina e as epipodofilotoxinas (ambas inibem a ação da topoisomerase II, uma enzima crucial para a replicação, transcrição e reparo do DNA) podem ser citados (Chabner e Roberts, 2005).

O grande desafio no desenvolvimento de fármacos antineoplásicos não é a identificação de agentes capazes de destruir as células cancerosas, mas sim a de encontrar agentes que associem eficácia com segurança. Muitos dos agentes quimioterápicos usados têm índices terapêuticos baixos (Kaelin, 2005).

A maioria destes fármacos tem a capacidade de destruir rapidamente as células cancerosas *in vitro*, porém, quando administrados ao paciente, podem também lesar as células normais que se dividem rapidamente, como precursores hematopoéticos da medula óssea e células epiteliais da mucosa gastrintestinal. Além disso, podem ser tóxicos a células que não estão se dividindo rapidamente, dentre eles inclui a doxorrubicina (cardiotóxica), a bleomicina (tóxica ao pulmão) e a citarabina (tóxica ao cerebelo) (Kaelin, 2005).

Por fim, um agente antineoplásico adequado deve possuir uma meia-vida longa e baixa taxa de metabolismo por enzimas como a família do citocromo P450. Além disso, este agente deve ser bem absorvido caso seja administrado pela via oral ou possuir uma boa solubilidade e um perfil farmacocinético adequado, se for administrado por via injetável. Enfim, deve também mostrar um perfil de toxicidade favorável em doses biologicamente efetivas, com efeitos limitados na medula óssea e no epitélio intestinal (Chabner e Roberts, 2005).

Diante disto, em comparação com outros fármacos, os antineoplásicos citotóxicos apresentam problemas únicos, como pobre especificidade, elevada toxicidade e susceptibilidade para induzir resistência. Além disso, distribuem-se indiscriminadamente pelos tecidos corporais e somente uma fração atinge o tumor (Wong *et al.*, 2007).

Recentemente, tem crescido o interesse na utilização de retinoides como agentes para o tratamento de determinados tipos de câncer, como as leucemias, além de alguns tumores sólidos, sejam isoladamente ou em combinação com outros fármacos. Este uso está associado às propriedades antiproliferativas, imunomodulatórias, de diferenciação e indutoras de apoptose conferidas pelos retinoides.

2 RETINOIDES

Os retinoides, moléculas estruturalmente relacionadas à vitamina A lipossolúvel (retinol), constituem uma família de substâncias importantes nos processos de sinalização de várias células e tecidos, exercendo funções importantes especialmente na visão, proliferação e diferenciação celular, função imune, neural e no desenvolvimento inicial do organismo. Um retinoide contém um grupo final cíclico

(um anel β -ionona), uma cadeia lateral polieno e um grupo final polar (Figura 3) (Tang e Gudas, 2011).

A vitamina A, componente essencial da dieta, é necessária para o desenvolvimento normal do embrião, manutenção do crescimento e diferenciação das células epiteliais, atividade reprodutora masculina, funções imunológicas e visão noturna (Niles, 2004). Na dieta, a vitamina A é obtida como éster retinil a partir da carne ou como β -caroteno (Figura 3), o qual é encontrado em uma variedade de vegetais como cenouras e pimentões vermelhos (Niles, 2004).

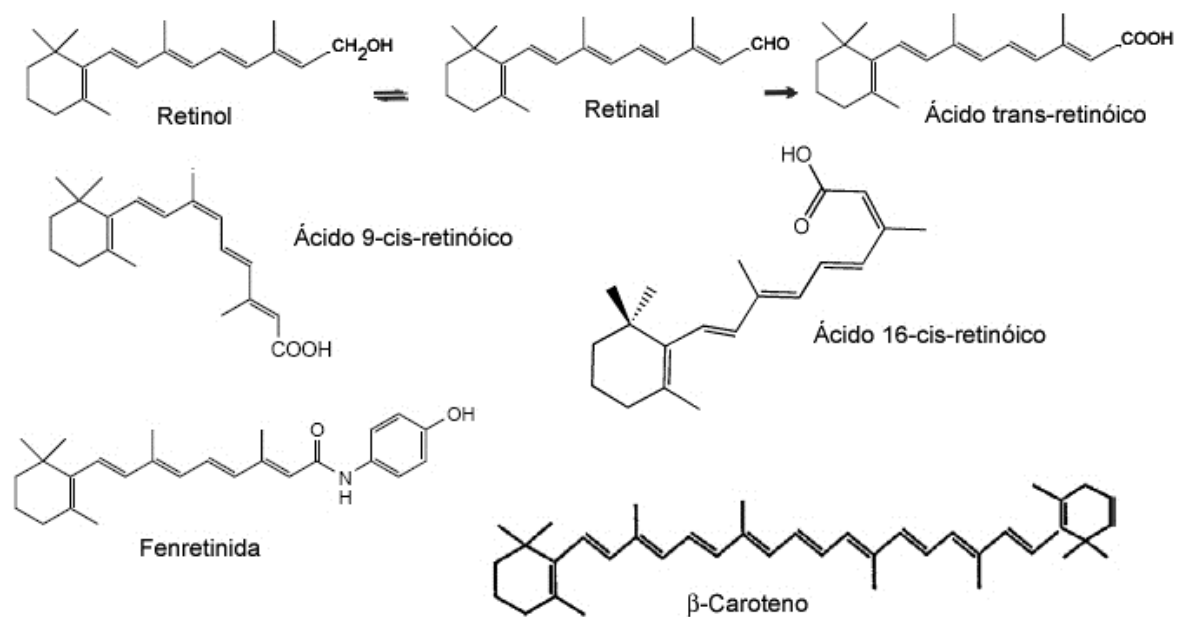


Figura 3 – Estruturas químicas dos principais retinoides e do β -caroteno (Zusi *et al.*, 2002; Bertram e Vine, 2005)

O retinol é oxidado a compostos mais ativos, tais como o AR, o qual exerce efeitos múltiplos sobre o desenvolvimento embrionário e organogênese, a homeostase dos tecidos, a proliferação celular, a diferenciação e apoptose. A conexão entre retinoides e o desenvolvimento do câncer foi descoberta junto com a descoberta da estrutura química do retinol, por volta de 1925, quando a vitamina A foi considerada como necessária para a homeostase das células epiteliais. Estudos posteriores mostraram que sua deficiência induz aumento no número de tumores espontâneos ou quimicamente induzidos em animais (Dragnev *et al.*, 2000; Tang e Gudas, 2011).

O AR e o ácido 9-cis-retinoico (alitretinoína) são metabólitos ativos que regulam a expressão de genes alvo através da ligação e ativação de receptores

retinoides nucleares: receptores do ácido retinoico (RAR) e receptores retinoide X (RXR) (Ortiz *et al.*, 2002).

Estes receptores possuem sequências homólogas com outros membros da superfamília dos receptores esteroides, incluindo o receptor para a vitamina D, receptor glicorticoide, receptor estrogênio e outros. Os receptores RAR e RXR são codificados por 3 genes distintos designados α , β e γ . Os retinoides se ligam em sítios específicos de receptores nucleares, que, por sua vez, contêm domínios que se ligam ao DNA, ativando ou reprimindo a expressão de genes. Os retinoides atuam de diversas formas: o ácido 9-cis-retinoico, por exemplo, é capaz de ativar ambos os receptores, enquanto que o AR ativa somente o RAR. Todos os mecanismos contribuem para que os retinoides possuam propriedades antiproliferativas, imunomodulatórias, de diferenciação e indutoras de apoptose (Dragnev *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002; Lei e De Thé, 2003).

Diversos estudos demonstraram que a vitamina A e seus derivados têm a capacidade de reduzir o crescimento de tumores, induzir a apoptose e a diferenciação em diferentes tipos de câncer, como de pulmão, cabeça e pescoço e mama (Dragnev *et al.*, 2000; Niles, 2004). Diversos benefícios clínicos têm sido relatados com o tratamento de câncer utilizando-se retinoides (Tabela 3). Doenças pré-neoplásicas, incluindo leucoplasia oral, displasia cervical uterina e xeroderma pigmentoso, têm sido tratadas com retinoides. Eles também são usados na redução de malignidades secundárias no fígado, no trato respiratório, digestivo e na mama. Além disso, os retinoides demonstraram atividade no tratamento de certas doenças como a LPA, leucemia mieloide crônica juvenil, micose fungoide (linfoma cutâneo de células T), sarcoma de Kaposi e neuroblastoma de alto risco. Quando combinado com interferon- α -2A, a isotretinoína (ácido 13-cis-retinoico) mostrou atividade no tratamento de doenças epiteliais específicas, que incluem cânceres de células escamosas na pele ou cérvix uterina e câncer renal avançado (Ortiz *et al.*, 2002; Freemantle *et al.*, 2003).

Entretanto, existem diversos problemas relacionados à utilização de retinoides, como seu efeito reversível, que requer tratamentos prolongados geralmente associados à toxicidade e desenvolvimento de resistência. Muitos retinoides são também teratogênicos (Ortiz *et al.*, 2002).

Tabela 3 – Atividade clínica representativa de retinoides na terapia de câncer e quimioprevenção (Freemantle *et al.*, 2003)

Aplicação terapêutica	Composto
<i>Doença maligna</i>	
Leucemia promielocítica Neuroblastoma Sarcoma de Kaposi Linfoma cutâneo de célula T	Ácido <i>trans</i> -retinoico (Tretinoína) Ácido 13- <i>cis</i> -retinoico (Isotretinoína) Ácido 9- <i>cis</i> -retinoico (Alitretinoína) Bexaroteno (LDG1069 targretina)
<i>Doença pré-maligna</i>	
Leucoplasia oral Xeroderma pigmentoso	Ácido 13- <i>cis</i> -retinoico (Isotretinoína) Ácido 13- <i>cis</i> -retinoico (Isotretinoína)
<i>Quimiopreventivo</i>	
Cânceres de mama secundários Carcinomas hepatocelulares primários	Fenretinida (4-HPR) Retinoide acíclico (Ácido poliprenoico)
<i>Terapia por combinação</i>	
Carcinoma de células escamosas Câncer cervical uterino	Ácido 13- <i>cis</i> -retinoico com Interferon- α -2A

2.1 Ácido Trans-Retinoico

O AR (Figura 4), um dos principais retinoides endógenos, controla o crescimento e a diferenciação de tecidos epiteliais e hematológicos (Parthasarathy e Mehta, 1998). Trata-se de um metabólito da vitamina A, que age como um potente modificador de resposta biológica, capaz de induzir a expressão gênica da mesma forma que outros retinoides (Lindner *et al.*, 1997). Um dos principais efeitos biológicos do AR é inibir a proliferação celular por meio de estacionamento na fase G1 do ciclo celular (Bushue e Wan, 2010).

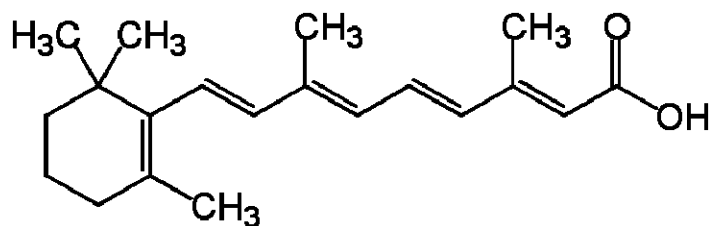


Figura 4 – Fórmula Estrutural do AR

Diversos estudos têm oferecido suporte para o uso do AR no tratamento da LPA, um subtipo da LMA. A eficácia clínica é elevada tanto na LPA recém-diagnosticada quanto naquela decorrente de recidiva (Asou, 2007). O AR tem sido administrado em tais estudos pela via oral numa dose diária de 45 mg/m² de área superficial corporal até completa remissão ou por 90 dias (Castaigne *et al.*, 1990; Degos *et al.*, 1995; Tallman *et al.*, 2002).

Porém, após a administração do AR, observa-se eventualmente um rápido aumento de leucócitos, o que é acompanhado da Síndrome de Diferenciação, anteriormente denominada Síndrome do Ácido Retinoico (Cunha De Santis *et al.*, 2007), a principal reação adversa associada ao uso desta substância. Esta síndrome manifesta-se primariamente com febre e desconforto respiratório, seguidos por infiltrados pulmonares intersticiais, ganho de peso, derrame pleural ou pericárdico, hipotensão episódica e insuficiência renal. Além disso, muitos pacientes apresentam recidiva quando tratados com AR isoladamente. Assim, a duração da remissão é curta, a menos que seja consolidada com um regime de associação de quimioterápicos, como a antraciclina e citarabina. A combinação de AR e outros agentes tem resultado em melhoras na sobrevida quando comparada com a administração isolada de quimioterápico (Ortiz *et al.*, 2002; Tallman *et al.*, 2002; Asou, 2007).

Estudos sugerem que o AR pode ser efetivo contra outros tipos de câncer, como mieloma múltiplo humano, carcinoma de células escamosas bucal humano, tumores hepáticos (indutor de apoptose), carcinomas mamários e tem sido investigado como agente quimiopreventivo no tratamento de leucoplasia oral (Epstein e Gorsky, 1999; Shimizu *et al.*, 2003).

Numerosos estudos *in vitro* e em modelos animais têm demonstrado sinergismo entre o AR e outros quimioterápicos. A associação de AR com interferon α (IFN α), por exemplo, tem mostrado resultados positivos contra células derivadas de câncer de cabeça e pescoço, mama, ovário, cervical uterino, além de leucemia mieloide crônica ou mieloma múltiplo avançado. Combinações de AR com vitamina D3 atuam, de forma sinérgica, para inibir crescimento de células do câncer de mama, próstata, pulmão e ovário, além de serem efetivas em reduzir a massa do tumor de mama em camundongos *nude*. Finalmente, a associação do AR com outros agentes quimioterápicos, como a cisplatina, taxol/paclitaxel, camptotecina,

etoposídeo, vimblastina, gencitabina e citosina arabinosídeo tem mostrado resultados promissores contra diversos tipos de câncer (Ortiz *et al.*, 2002).

A biodisponibilidade do AR, administrado por via oral, é reduzida e isto pode ser atribuído à sua baixa solubilidade em água. Além disso, o tratamento prolongado com o AR oral proporciona redução progressiva de sua concentração plasmática, o que pode ser atribuído ao aumento do seu metabolismo (Muindi *et al.*, 1992). Por fim, tratamento oral costuma ser problemático em pacientes com dificuldades de deglutição, ou com sonda nasogástrica, ou mesmo em crianças (Douer *et al.*, 2001). Considerando que tais fatores limitam o uso clínico de AR oral, uma formulação intravenosa pode ser uma alternativa interessante.

Entretanto, sua baixa solubilidade aquosa constitui também um obstáculo para a administração intravenosa. Assim, nanocarreadores lipídicos de fármacos tais como lipossomas, nanoemulsões (NE) e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) têm sido desenvolvidos como alternativas para viabilizar a administração intravenosa do AR. Adicionalmente, estes sistemas podem contribuir para o aumento da eficácia e redução da toxicidade devido ao potencial para acúmulo das nanopartículas na região tumoral graças à permeabilidade vascular aumentada dos vasos tumorais.

3 NANOCARREADORES LIPÍDICOS CONTENDO AR NO TRATAMENTO DE CÂNCER

A incorporação de AR, um fármaco lipofílico e muito pouco solúvel em água, em nanocarreadores lipídicos constitui uma alternativa interessante para viabilizar sua administração intravenosa em substituição ao uso oral. Além disso, estes sistemas apresentam potencial para acúmulo do fármaco na região tumoral, por meio de um direcionamento passivo chamado de “efeito de permeabilidade e retenção aumentada” (EPR).

Nos tumores sólidos o revestimento endotelial da parede do vaso sanguíneo é mais permeável, possuindo fenestrações que permitem a passagem de grandes moléculas e partículas de tamanho variando entre 10 e 500 nm. Dessa forma, nanossistemas carreando fármacos podem ser levados espontaneamente para a área tumoral com maior facilidade, liberando o agente ativo no local. Além disso, o sistema de drenagem linfática do tumor é comprometido e há uma retenção aumentada das nanopartículas (Figura 5). Baseados nisso, diversos estudos têm

mostrado o potencial das nanopartículas como sistemas carreadores de fármacos antitumorais. Para que o efeito de EPR seja efetivo, é necessário que o sistema nanoestruturado apresente uma circulação prolongada na corrente sanguínea, possibilitando maior acúmulo na região tumoral (Mooney, 2005; Torchilin, 2011).

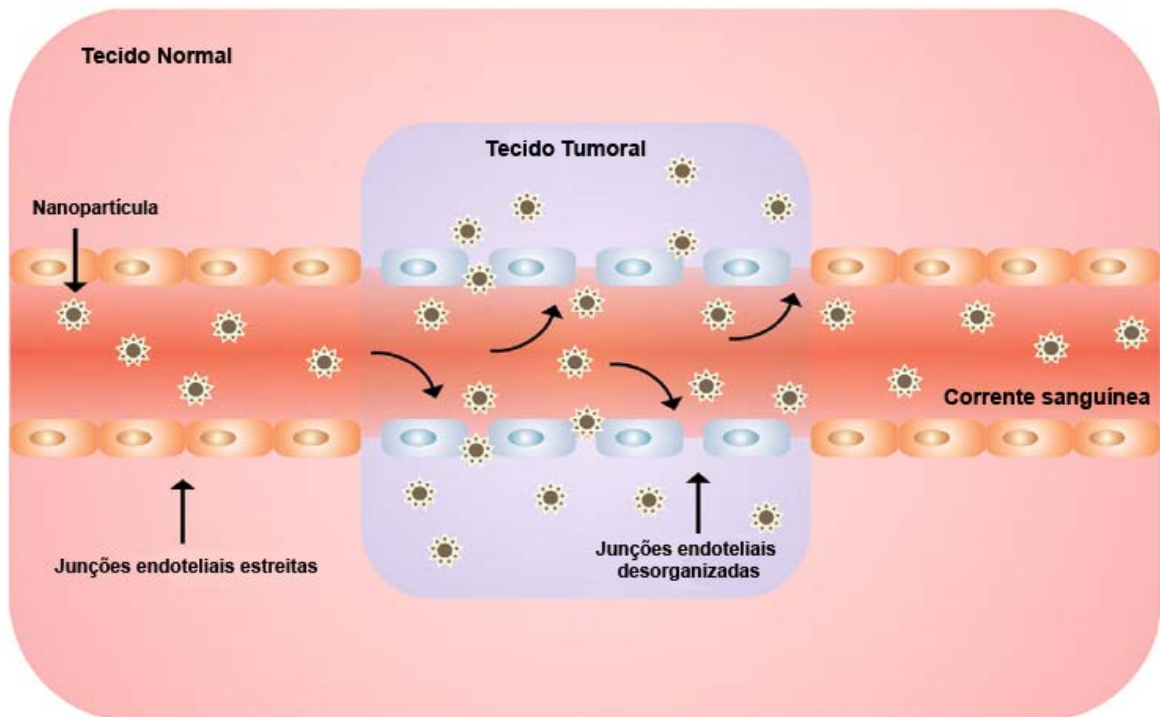


Figura 5 – Representação esquemática do direcionamento de nanopartículas para a região tumoral por meio do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) (Prakash *et al.*, 2011).

3.1 Lipossomas

Uma formulação lipossomal contendo AR foi desenvolvida e atualmente está disponível comercialmente (Atragen[®], Aronex Pharmaceuticals), o que foi possível graças a uma série de estudos desenvolvidos a partir do início dos anos 90.

Drach *et al.* (1993) conduziram estudos *in vitro* utilizando culturas com as células HL-60, KG-1 e THP-1 (todas de LMA humana) e células obtidas a partir de pacientes com LPA e LMA. Os lipossomas de AR (Atragen[®]) foram tão efetivos quanto o AR livre em induzir diferenciação celular.

Um dos grandes problemas associados ao AR é a incapacidade de manter a remissão da doença, fato atribuído à diminuição da sua concentração plasmática a níveis que não são capazes de manter os efeitos indutores da diferenciação. Mehta *et al.* (1994) mostraram que uma formulação lipossomal foi capaz de prolongar os

níveis plasmáticos do AR e diminuir seu metabolismo, via citocromo P450, em comparação com sua forma livre. Parthasarathy e Mehta (1998) mostraram também que o metabolismo do AR lipossomal, avaliado em microssomas de ratos e em cultura de células neoplásicas, foi menor que aquele observado para o AR livre.

Um estudo em pacientes portadores de algumas doenças hematológicas malignas, como a LPA, confirmou os dados de Mehta *et al.* (1994), sendo que o Atragen[®], administrado por via parenteral, proporcionou concentrações plasmáticas maiores e constantes ao longo do tempo em comparação com o AR oral (Estey *et al.*, 1996). Posteriormente, administrando o Atragen[®] em pacientes saudáveis, Ozpolat *et al.* (2003) também verificaram este mesmo perfil farmacocinético.

Estey *et al.* (1999) avaliaram a atividade do Atragen[®] em pacientes com LPA recém-diagnosticada. Os dados mostraram que, na maioria dos pacientes, o Atragen[®] induziu a cura da LPA e impediu a recidiva com baixa incidência de reações adversas. Posteriormente, Douer *et al.* (2001) observaram que o Atragen[®] é efetivo em induzir remissão completa da LPA em pacientes recém-diagnosticados e naqueles que apresentavam recidivas, com um perfil de segurança aceitável.

A utilização de sistemas lipossomais carregados com AR também tem sido sugerida para o tratamento de outros tipos de tumores. Parthasarathy *et al.* (1994) mostraram que um lipossoma carregado com AR foi capaz de induzir diferenciação em uma linha celular de carcinoma de células escamosas. Dentre as várias formulações testadas, a que continha dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e estearilamina (SA) apresentou elevada encapsulação do AR, além de alta estabilidade e mínima toxicidade a hemácias. Em outro estudo, Shimizu *et al.* (2003) observaram que AR lipossomal, administrado pela via intravenosa, em camundongos portando metástase hepática de tumor M5076 (histiocitoma murino de camundongos), apresentou maior eficácia antitumoral, avaliada por meio da taxa de sobrevivência dos animais, em comparação ao placebo. A administração oral do AR livre, neste modelo animal, apresenta eficácia antitumoral desprezível, similar àquela observada para o placebo.

Com o objetivo de promover o direcionamento pulmonar e, com isso o tratamento de tumores pulmonares, foram propostos lipossomas catiônicos de AR. Kawakami *et al.* (2006) demonstraram que tais lipossomas catiônicos, compostos por 1,2-dioleoil,3-trimetilamôniopropano (DOTAP) e colesterol (Chol), carregados com AR, foram eficientemente internalizados *in vitro* por células de carcinoma

pulmonar humano, e, conseqüentemente, conduziram a um efeito citotóxico maior do que aquele observado para o AR livre ou AR em lipossomas neutros. Suzuki *et al.* (2006) mostraram que lipossomas catiônicos inibiram tumores pulmonares metastáticos de células CT-26 (adenocarcinoma de cólon), levando ao acúmulo do AR no pulmão de camundongos após injeção intravenosa. Isto pode explicar o aumento na eficácia deste lipossoma em comparação com o AR livre ou incorporado em lipossomas neutros.

Parthasarathy *et al.* (1999) mostraram que lipossomas catiônicos, compostos por DPPC e SA, administrados na forma de aerossol, proporcionaram níveis elevados do AR no tecido pulmonar, além de promover distribuição e toxicidade sistêmicas mínimas. A maior captação dos lipossomas pelas células pulmonares foi atribuída à sua carga positiva.

A associação entre o AR lipossomal e outros antineoplásicos foi investigada. A associação de AR incorporado a lipossomas e interferon α -2b (IFN- α -2b) também foi avaliada em alguns estudos clínicos de fase 1 e 2, em pacientes acometidos com carcinoma de células renais. A encapsulação do AR promoveu níveis séricos mais prolongados e sugere-se que esta associação pode promover os efeitos da terapia baseada em IFN, contribuindo para uma resposta mais durável (Goldberg *et al.*, 2002; Boorjian *et al.*, 2007).

Charoensit *et al.* (2010) avaliaram a administração intravenosa de um lipossoma catiônico contendo associação entre AR e DNA plasmidial de interleucina 12 (IL-12 pDNA) em camundongos CDF-1 previamente inoculados com células colon26 (adenocarcinoma murino). A partir deste tratamento, foi observada uma inibição do crescimento de tumores de pulmão metastáticos por meio de indução de apoptose, bem como uma toxicidade reduzida em relação aos animais não tratados ou aos tratados apenas com lipossomas catiônicos de AR.

Partindo do princípio de que a recidiva de câncer pode ser devido à presença de células tronco cancerosas, Li *et al.* (2011) avaliaram nessas células a atividade antitumoral de lipossomas furtivos contendo AR e sua combinação com lipossomas furtivos de vinorelbina. Quando comparado com AR livre, o AR encapsulado promoveu um efeito mais pronunciado e esta atividade foi ainda mais intensa quando foi realizada a terapia combinada com vinorelbina. Este mecanismo foi associado à promoção da diferenciação das células tronco e a parada do ciclo celular em G₀/G₁.

3.2 Outros Nanocarreadores Lipídicos

Outros sistemas carreadores lipídicos têm sido sugeridos para a incorporação do AR. Dentre eles, destacam-se microemulsões, NE e as NLS.

Hwang *et al.* (2004) mostraram que o perfil farmacocinético do AR carregado em uma microemulsão foi similar àquele observado para o fármaco livre. A eficácia antitumoral *in vitro* em linhagens celulares de câncer humano, LPA e carcinoma de mama também foi similar para as duas formulações. Esses achados mostram que este sistema, a microemulsão, apresenta sérias limitações como carreadores do AR.

Chansri *et al.* (2006) mostraram que a incorporação de AR em NE, administrada pela via intravenosa, pode reduzir sua eliminação da corrente sanguínea, em comparação com AR em solução. A NE carregada com AR proporcionou aumento da sua concentração no fígado em comparação com o AR livre. A eficácia antitumoral do AR carregado na NE, avaliada em camundongos portando metástase hepática de células de carcinoma de cólon, foi maior do que aquela observada para o fármaco livre.

Em uma tentativa de proporcionar aumento da atividade, Su *et al.* (2008) propuseram uma NE de carregada com AR e tributirina. A tributirina, pró-fármaco do ácido butírico, além de constituir a fase oleosa, também apresenta uma atividade antitumoral sinérgica com a do AR (Chen e Breitman, 1994; Giermasz *et al.*, 2001). Desta forma, a atividade antitumoral da NE contendo AR e tributirina contra células hepáticas (HepG2) ou colônicas (Caco-2) foi maior que a apresentada pelo AR livre. Entretanto, não é possível separar os efeitos da combinação de AR e tributirina daqueles da encapsulação do fármaco.

O conjunto destes dados mostra que os sistemas carreadores podem ser uma alternativa inovadora para viabilizar a administração intravenosa do AR, tendo também um potencial para promover aumento da eficácia antineoplásica. As NLS, sistemas carreadores particularmente indicados para fármacos lipofílicos, tais como o AR, podem ser uma alternativa promissora para o transporte do AR em substituição aos sistemas poliméricos e lipossomas. Estes sistemas apresentam uma série de vantagens em relação aos demais, notadamente o fato de que a produção destas formulações é facilmente transponível para a escala industrial com baixo custo e sem a utilização de solventes orgânicos. Adicionalmente, em

comparação com as NE, as quais são preparadas com lípides líquidos, as NLS apresentam ainda maior potencial para liberação sustentada devido à sua matriz sólida.

4 NANOEMULSÕES

As NE, sendo emulsões (Figura 6), são sistemas heterogêneos nos quais um líquido imiscível é disperso na forma de gotas em outro líquido. Estes sistemas são estabilizados termodinamicamente pela adição de um componente ou mistura de componentes que exibem propriedades emulsificantes. Invariavelmente, um dos dois líquidos imiscíveis é água; e o segundo, uma substância oleosa, geralmente um triglicerídeo de cadeia média ou longa. As emulsões farmacêuticas desenvolvidas para administração parenteral apresentam a fase oleosa dispersa como gotículas pela fase aquosa, sendo referida, portanto, como emulsão óleo em água (O/A) (Benita e Levy, 1993).

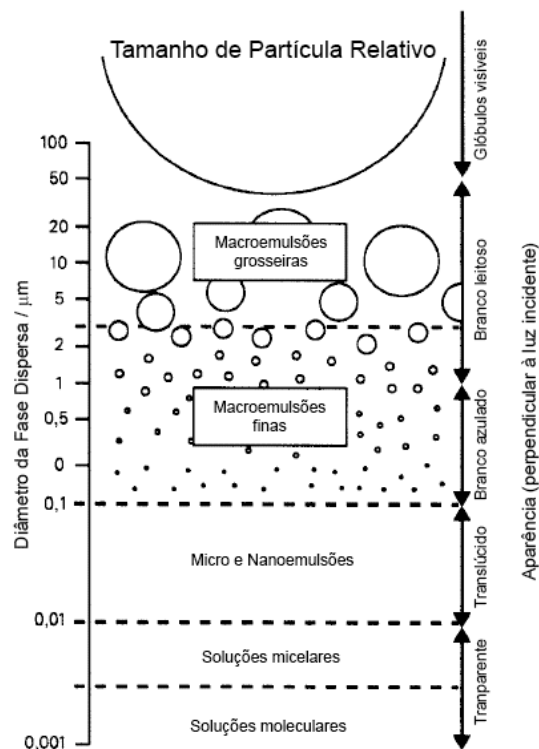


Figura 6 – Relação do tamanho de partícula à aparência visual de dispersões contendo partículas (Adaptado de Baker e Naguib, 2005)

Emulsões com tamanho do glóbulo na escala nanométrica (tipicamente na faixa de 20-200 nm) são também referidas geralmente como miniemulsões, emulsões ultrafinas, emulsões submicrônicas, dentre outros termos. O termo

nanoemulsão é preferível porque dá uma ideia da faixa de tamanho dos glóbulos em nanômetros, é um termo conciso e evita confusões com as microemulsões, que são sistemas termodinamicamente estáveis. Devido às suas características de tamanho, NE podem ser transparentes ou translúcidas a olho nu (Figura 7) (Solans *et al.*, 2005).



Figura 7 – Fotografia de uma NE (à esquerda) e uma macroemulsão (à direita), com tamanho de glóbulos de 35 nm e 1 μ m, respectivamente (Solans *et al.*, 2005).

Essas formulações têm sido utilizadas como carreadoras de fármacos de baixa solubilidade aquosa, tais como o propofol, por exemplo. Além disso, as NE também têm sido utilizadas para promover a estabilização de compostos susceptíveis à hidrólise, redução de irritação ou toxicidade de fármacos administrados pela via intravenosa, potencial para formas de liberação prolongada, e possível direcionamento dos fármacos para determinados órgãos. Outras vantagens que as NE podem oferecer são a facilidade no preparo e no escalonamento, além de baixo custo (Benita e Levy, 1993; Santos-Magalhães *et al.*, 2000; Baker e Naguib, 2005; Date e Nagarsenker, 2008). Todas essas características tornam as NE mais vantajosas que outras formulações como as micelas, os lipossomas e o uso de ciclodextrinas.

Entretanto, as NE apresentam algumas desvantagens, como pobre estabilidade física com armazenamento em longo prazo, risco de formação de êmbolos, necessidade de manipulação asséptica e possibilidade de rápido crescimento de microrganismos (Date e Nagarsenker, 2008).

Devido aos requerimentos restritos de produtos parenterais, poucos excipientes são aceitáveis para uso parenteral. Os excipientes devem ser biocompatíveis, esterilizáveis, disponíveis em grau apirogênico e não serem hemolíticos. Além disso, as emulsões devem ser estéreis, isotônicas, apirogênicas, atóxicas, biodegradáveis e estáveis fisicamente e quimicamente. Outros parâmetros físico-químicos também são desejáveis, tais como o pH entre 6,0 e 9,0, um tamanho médio de glóbulo menor ou igual a 500 nm, uma porcentagem de glóbulos maior que 5 µm em não mais que 0,05%; e uma quantidade de ácidos graxos livres menor ou igual 0,07 mEq/g (Benita e Levy, 1993; Driscoll, 2006; Date e Nagarsenker, 2008). De toda forma, em geral, as NE são desenvolvidas com tamanho de glóbulo menor que 150 nm.

Para promover a formação das NE, é importante a escolha com cautela dos componentes a serem utilizados na fase oleosa, como surfactante e como cossurfactante. Usualmente, um óleo que possua máximo potencial para solubilização do fármaco é selecionado como fase oleosa da formulação. Desta forma, podem ser utilizados óleos fixos, como óleo de soja ou de mamona; triglicérides de cadeia média, como os triglicérides dos ácidos cáprico e caprílico; e, por fim, ésteres de ácidos graxos, como oleato de etila, miristato de isopropila e palmitato de isopropila (Benita e Levy, 1993; Date e Nagarsenker, 2008).

A escolha do surfactante também é crítica, já que são os componentes que apresentam maior potencial de toxicidade. Assim, têm sido utilizados como tensoativos de escolha os polissorbatos (monooleato de sorbitano etoxilado, monolaurato de sorbitano etoxilado), os ésteres de sorbitano (monolaurato de sorbitano), copolímeros de óxido de etileno e de propileno (Poloxamer 188), álcoois graxos etoxilados, óleos etoxilados (óleo de mamona etoxilado) e, por fim, os fosfolípides (lecitina de soja ou de ovo, dioleil fosfatidilcolina, fosfolípides peguilados, dimiristoil fosfatidilcolina). Na maioria das vezes, um tensoativo sozinho não reduz suficientemente a tensão interfacial, sendo necessária a utilização de um co-surfactante, que penetra na monocamada do surfactante promovendo fluidez adicional ao filme interfacial (Benita e Levy, 1993; Date e Nagarsenker, 2008).

Vários agentes utilizados no tratamento de câncer necessitam ser administrados pela via parenteral. Considerando que sua solubilidade aquosa em geral é pobre e que apresentam um elevado grau de toxicidade, sua incorporação em NE tem sido uma alternativa interessante. Dentre os fármacos que têm sido

incorporados em emulsões submicrônicas, encontram-se o paclitaxel e a vincristina (He *et al.*, 2003; Junping *et al.*, 2003; Date e Nagarsenker, 2008).

Por outro lado, a utilização de NE como sistemas carreadores apresenta algumas limitações. Primeiramente, não é uma alternativa razoável para fármacos hidrofílicos, já que estes permanecem na fase externa aquosa e seu perfil farmacocinético não é alterado (Kleinstern *et al.*, 1993). Para que um fármaco lipofílico seja incorporado em NE e seja retido na formulação, gerando um perfil farmacocinético alterado, é necessário que seu coeficiente de partição octanol-água seja de pelo menos 108. Caso contrário, o fármaco é liberado rapidamente do carreador após administração intravenosa, devido à extensa diluição (Kakutani *et al.*, 1991). Outro inconveniente de NE é sua frágil estabilidade física e sensibilidade à rápidas alterações ambientais, como calor, agitação, luz e condições de armazenamento. Elas precisam ser suficientemente estáveis para serem produzidas, esterilizadas (preferencialmente por autoclavação) e ter um prazo de validade de pelo menos um ano, sem apresentar coalescência ou agregação durante este período. Além disso, fármacos susceptíveis à hidrólise não são protegidos completamente e, com o tempo, são observadas degradações químicas, como no caso da anfotericina B, por exemplo (Chattopadhyay e Mittal, 1996). Por fim, eletrólitos interagem fortemente com coloides estabilizados por carga, como emulsões estabilizadas por fosfolípidos, reduzindo a estabilidade (Washington *et al.*, 1989; Washington *et al.*, 1991). Considerando que eletrólitos são muito utilizados para ajustar a tonicidade da formulação, pode-se dar preferência ao glicerol para realizar este papel.

Portanto, as NE apresentam-se como alternativas interessantes para carrear fármacos utilizados na terapia do câncer, com vantagens evidentes em comparação a soluções convencionais. Entretanto, os trabalhos previamente publicados com NE carreando o AR apresentaram melhorias restritas em relação à atividade antitumoral do AR, provavelmente devido à sua rápida liberação a partir do sistema. Assim, a formação do par iônico entre o AR e aminas hidrofílicas e lipofílicas pode apresentar um potencial para promover a retenção do AR na formulação e, com isso, aumentar a sua atividade.

5 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

As NLS são partículas derivadas das emulsões para nutrição parenteral pela simples substituição do lípido líquido (óleo) por um lípido sólido (Figura 8). Estes sistemas apresentam como principal vantagem quando comparados com as NE o potencial para liberação controlada do fármaco devido à matriz lipídica sólida. Entretanto, diferentemente das emulsões para nutrição parenteral, as quais normalmente são estabilizadas com lecitina, as NLS podem ser estabilizadas com outros tensoativos ou polímeros, e suas misturas (Muller *et al.*, 2000).

As NLS podem ser preparadas usando uma grande variedade de lipídios incluindo ácidos graxos, mono, di ou triglicerídeos, misturas de glicerídeos complexos ou mesmo ceras (Wissing *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2007). As NLS podem ser produzidas com o uso de homogeneizador de alta pressão, similar àqueles usados na fabricação em larga escala de emulsões para nutrição parenteral, o que representa uma vantagem quando se compara com a fabricação dos sistemas poliméricos e lipossomas (Mehnert e Mader, 2001).

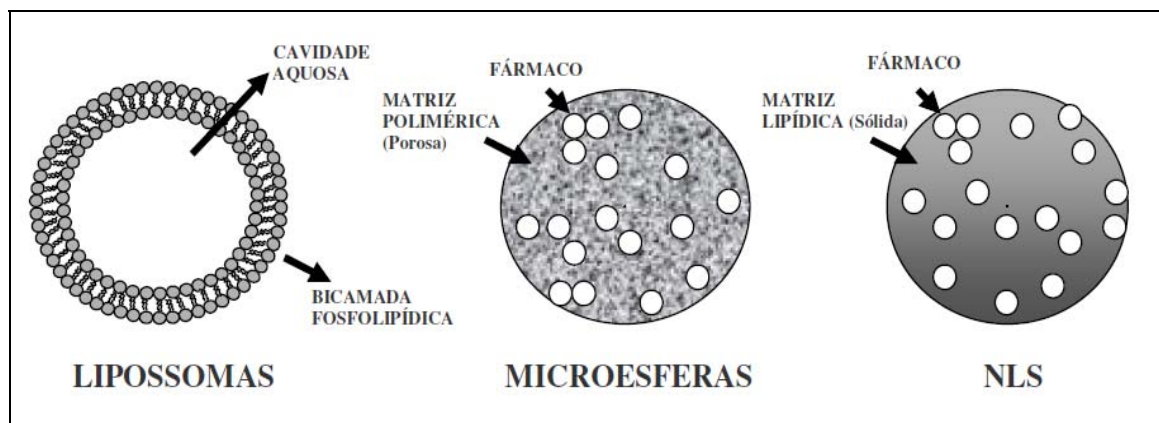


Figura 8 – Representação esquemática de lipossomas, microesferas poliméricas e NLS (Adaptado de Castro e Ferreira, 2008).

As principais vantagens de NLS em relação à aplicação parenteral são: excelente estabilidade física, proteção contra a degradação de fármacos incorporados, liberação controlada de fármacos (rápida ou prolongada) dependendo do modelo de incorporação, boa tolerabilidade e direcionamento do fármaco para regiões específicas. Como potenciais desvantagens têm-se a capacidade de

encapsulação insuficiente e a expulsão do fármaco depois da transição polimórfica durante o armazenamento (Wissing *et al.*, 2004).

A capacidade de encapsulação de NLS convencionais é limitada (geralmente até 25% em relação ao conteúdo lipídico da matriz) pela solubilidade do fármaco no lípide fundido, pela estrutura e o estado polimórfico da matriz lipídica. Se a matriz lipídica é constituída por moléculas similares (triestearina ou tripalmitina, por exemplo), um cristal com poucas imperfeições é formado. Como os fármacos incorporados estão localizados entre as cadeias de ácidos graxos, entre as camadas lipídicas e também em imperfeições dos cristais, uma rede cristalina altamente organizada não pode acomodar grandes quantidades de fármaco. Assim, o uso de lípides mais complexos (mono, di e triglicerídeos, com diferentes tamanhos de cadeia carbônica) proporciona maior teor de encapsulação (Wissing *et al.*, 2004). De qualquer forma, ao se escolher o lípide e o tensoativo utilizado, deve-se buscar, com isso, a produção de partículas com um diâmetro médio variando de aproximadamente 50 a 1000 nm (Figura 9).

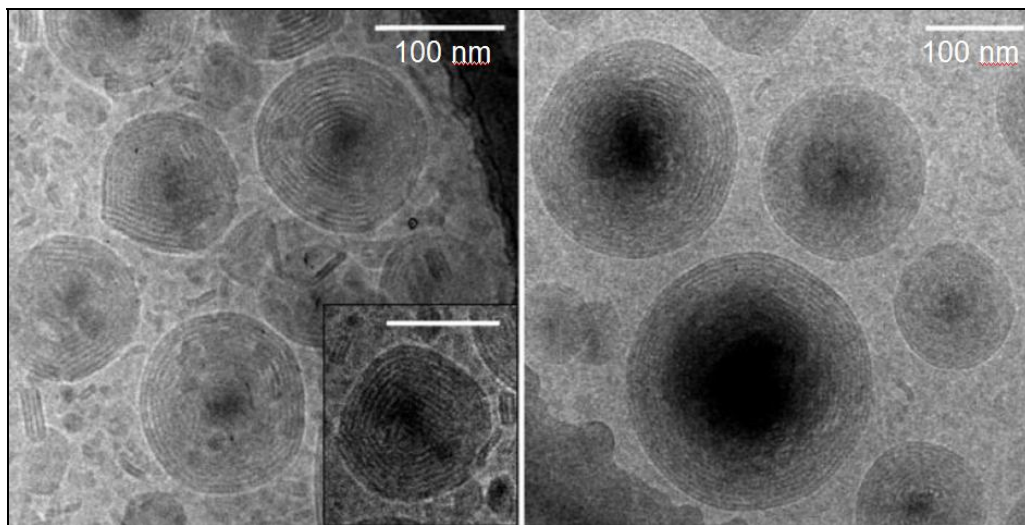


Figura 9 – NLS de triestearina vistas em microscopia eletrônica de transmissão (Adaptado de Bunjes *et al.*, 2007).

A preparação e a caracterização de NLS contendo AR têm sido relatadas na literatura. Normalmente, o teor de encapsulação do AR nas NLS é baixo (menos de 1 % em relação à concentração total de lípides) (Jenning e Gohla, 2001), exceto se é utilizada uma relação tensoativo/lípide elevada (Lim e Kim, 2002; Hu *et al.*, 2004).

Castro *et al.* (2007) desenvolveram uma nova formulação de NLS carregadas com AR com elevado teor de encapsulação graças à formação de um par iônico

entre o AR e uma amina lipofílica (estearilamina). Esta formulação, desenvolvida para o tratamento tópico da acne, mostrou uma excelente estabilidade e tem potencial para uso em outras doenças como o câncer.

5.1 Aplicação das NLS no tratamento do câncer

Para serem utilizadas no tratamento do câncer, é importante que o tamanho das NLS seja planejado de forma que ela passe pelas fenestrações do endotélio canceroso defeituoso. Como o sistema linfático do tumor é defeituoso, há permeabilidade aumentada e retenção do fármaco. Outra possibilidade é promover o direcionamento ativo. Assim, pode-se associar à nanopartícula um ligante que irá interagir com receptores expressos pelas células cancerosas. Um exemplo disso é a adição de folato, uma vez que alguns aumentam a expressão de receptores para folato (Wong *et al.*, 2007; Haley e Frenkel, 2008).

O tamanho da partícula também determina se a nanopartícula circulante é opsonizada e rapidamente retirada da circulação pelo sistema reticuloendotelial (RES), sendo predominantemente distribuída no fígado, pulmões, baço e medula óssea. A menos que seja desejada uma liberação do fármaco nestes tecidos (para metástases hepáticas ou hepatocarcinoma primário), a superfície das nanopartículas deve ser modificada para escapar do RES. Isto pode ser conseguido por diversas formas, sendo que uma delas é a produção de partículas com a adição de polietilenoglicol à superfície, constituindo as denominadas partículas furtivas (*stealth*) (Haley e Frenkel, 2008).

Zara *et al.* (1999) administraram, via endovenosa, NLS carreando doxorubicina (DOX), um antineoplásico hidrofílico, em ratos e compararam sua biodistribuição com aquela de uma solução do fármaco. As NLS modificaram o perfil farmacocinético e de biodistribuição da DOX, aumentando a área sob a curva (AUC) da concentração plasmática versus tempo e redução da concentração no fígado, coração e rins em comparação com a solução. A fim de viabilizar a incorporação da DOX hidrofílica na matriz lipídica da NLS, a formação de um par iônico com o hexadecilfosfato foi proposta.

O paclitaxel, um antineoplásico de baixa solubilidade, é administrado por via endovenosa numa formulação comercial baseada numa solução micelar do fármaco em Cremophor® EL (tensoativo; óleo de mamona etoxilado). Esta solução apresenta

elevada incidência de reações adversas associadas ao tensoativo. As NLS representam uma alternativa inovadora para administração deste fármaco. Cavalli *et al.* (2000) propuseram NLS furtivas e não-furtivas como carreadores do paclitaxel. Foi observado que estas formulações apresentaram tamanho médio e teor de encapsulação adequados para administração intravenosa. Chen *et al.* (2001) avaliaram a liberação *in vitro* e a farmacocinética em camundongos de duas NLS de longa circulação sanguínea, uma contendo Brij® 78 e outra contendo a mistura Poloxamer® F68 e dipalmitoilfosfatidiletanolamina associado ao polietilenoglicol (DPPE-PEG). A liberação foi lenta para ambas e o perfil farmacocinético do paclitaxel foi modificado de forma marcante a partir das NLS em comparação com uma solução. Lee *et al.* (2007) prepararam NLS furtivas contendo fosfolípides ligados a grupos de polietilenoglicóis, e avaliaram a liberação e a atividade citotóxica *in vitro*. As NLS promoveram liberação lenta em comparação com a formulação convencional, sendo que ambas apresentaram toxicidade similar para células de carcinoma ovariano humano e do câncer de mama humano.

A atividade antitumoral das NLS carregadas com AR foi avaliada em algumas linhagens de células cancerosas, como HL-60 (leucemia mieloide humana), MCF-7 (câncer de mama humano) e KB (carcinoma oral humano). Apesar da atividade das NLS carregadas com AR ter sido similar àquela observada para fármaco livre, estes carreadores induziram menor toxicidade hemolítica, um efeito adverso comumente associado à administração de AR livre (Lim *et al.*, 2004).

Desta forma, as NLS também se apresentam como sistemas inovadores para carrear fármacos antineoplásicos com vantagens evidentes em comparação a soluções convencionais. Entretanto, os trabalhos previamente publicados com NLS carreando o AR não apresentaram melhorias em relação à atividade antitumoral do AR. Assim, a formação do par iônico entre o AR e aminas hidrofílicas e lipofílica, explorada previamente no contexto da acne, apresenta também potencial para promover a retenção do AR na matriz lipídica, permitindo maior captação celular e, com isso, aumentar sua atividade anticâncer.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade anticâncer *in vitro* de nanocarreadores lipídicos contendo um par iônico entre o AR e aminas para o tratamento de câncer.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência de aminas lipofílicas e hidrofílicas sobre as características físico-químicas dos sistemas preparados;
- Caracterizar as formulações selecionadas na ausência ou presença do AR, avaliando tamanho, índice de polidispersão, difração de raios X, microscopia de luz polarizada;
- Determinar o teor de encapsulação do AR nos nanossistemas;
- Avaliar a estabilidade preliminar dos nanossistemas carregados com AR;
- Avaliar a atividade anticâncer *in vitro* do AR encapsulado nos nanossistemas.

CAPÍTULO 1
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E CITOTOXICIDADE DE
NANOEMULSÕES CONTENDO ÁCIDO RETINOICO

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E CITOTOXICIDADE DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÁCIDO RETINOICO

1 INTRODUÇÃO

O ácido retinoico todo *trans* (AR) tem se mostrado eficiente no tratamento da leucemia promielocítica aguda (LPA), administrado pela via oral numa dose diária de 45 mg/m² de área superficial corporal até completa remissão ou por 90 dias (Castaigne *et al.*, 1990; Degos *et al.*, 1995; Tallman *et al.*, 2002; Asou, 2007). Além da LPA, tem-se sugerido que o AR possa ser efetivo contra outros tipos de câncer, como mieloma múltiplo humano, carcinoma de células escamosas orais, tumores hepáticos e carcinomas mamários. O AR tem sido investigado também como agente quimiopreventivo no tratamento de leucoplasia oral (Epstein e Gorsky, 1999; Shimizu *et al.*, 2003).

Entretanto, após a administração do AR, observa-se eventualmente um rápido aumento de leucócitos o que é acompanhado da “Síndrome de Diferenciação”, anteriormente denominada “Síndrome do Ácido Retinoico”, a principal reação adversa associada ao uso desta substância (Ortiz *et al.*, 2002; Tallman *et al.*, 2002; Asou, 2007). Por outro lado, quando administrado por via oral, sua biodisponibilidade é reduzida e isto pode ser atribuído à sua baixa solubilidade em água. Além disso, o tratamento prolongado com o AR oral proporciona redução progressiva de sua concentração plasmática, o que pode ser atribuído ao aumento do seu metabolismo (Muindi *et al.*, 1992).

A incorporação de AR, um fármaco lipofílico e muito pouco solúvel em água, em nanocarreadores lipídicos constitui uma alternativa interessante para viabilizar sua administração intravenosa em substituição ao uso oral. Além disso, estes sistemas apresentam potencial para acúmulo do fármaco na região tumoral, por meio de um direcionamento passivo chamado de permeabilidade e retenção aumentada (EPR). Desta forma, têm sido desenvolvidas formulações lipídicas como os lipossomas (Drach *et al.*, 1993; Parthasarathy *et al.*, 1994; Ozpolat *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 2003; Kawakami *et al.*, 2006), as microemulsões (Hwang *et al.*, 2004) e as nanoemulsões (Chansri *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2008).

Nossa hipótese é de que a formação do par iônico entre o AR, um ácido lipofílico, e diferentes aminas seria uma alternativa interessante para aumentar a

lipofilicidade do fármaco e, desta forma, a sua incorporação e retenção em carreadores lipídicos. Considerando o interesse das nanoemulsões como carreadores de fármacos lipofílicos, esta etapa deste trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de NE carregadas com AR usando a formação do par iônico com uma amina lipofílica (estearilamina – SA) e uma hidrofílica (trietilamina – TA). Ao se manter o AR retido no interior das NE, espera-se que a captação celular do AR seja aumentada e, com isso, a sua atividade citotóxica *in vitro* em células cancerosas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Ácido retinoico (AR) foi fornecido pela Basf (Ludwigshafen, Alemanha). Estearilamina (SA), colesterol e trietilamina (TA) foram obtidas da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, EUA). Crodamol™ GTCC (triglicérides do ácido cáprico e caprílico) e monooleato de sorbitano etoxilado de grau super refinado (Polissorbato 80; SuperRefined Tween 80®) foram fornecidos pela Croda Inc (Edison, EUA).

Para os estudos *in vitro*, o meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), soro fetal bovino (SFB), metiltiazoltetrazólio [MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio], glutamina 200 mM, estreptomicina 100 µg/mL penicilina 100 UI/mL, estaurosporina e iodeto de propídio foram adquiridos da Gibco® Life Technologies (Carlsbad, EUA).

Foi utilizada a linhagem celular MCF-7, que foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, EUA).

Todos os demais reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Preparo das Nanoemulsões

As NE foram preparadas pelo método de homogeneização a quente. Primeiramente, a fase oleosa (FO) e a aquosa (FA) foram pesadas separadamente e aquecidas a 85 °C. Mantendo esta temperatura, a FA foi lentamente vertida sobre a FO sob agitação constante a 8.000 rpm por 2 minutos em um agitador Ultra Turrax T-25 (Ika Labortechnik, Germany). Esta emulsão foi imediatamente submetida a uma homogeneização com uma sonda de ultrassom de alta intensidade (CPX 500, Cole-Palmer Instruments, Vernon Hills, USA), durante 10 minutos em 20% de amplitude (Figura 10). O pH das formulações foi ajustado para 7,0 com soluções de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio 0,01 M, com o auxílio de um medidor de pH (Digimed DM 20, Santo Amaro, Brasil).

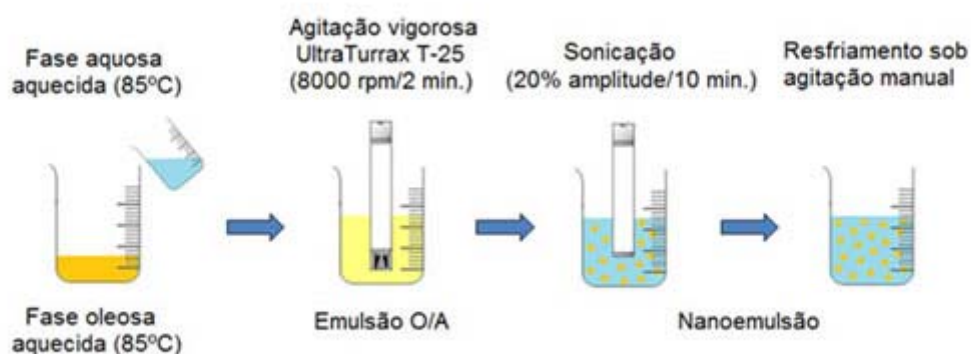


Figura 10 – Representação esquemática da preparação das NE pelo método de homogeneização a quente seguido por ultrassom.

As formulações foram preparadas com o Crodamol™ GTCC como matriz lipídica e apresentou o Tween 80® super refinado como tensoativo e o colesterol como co-tensoativo. Glicerol 2,25% foi utilizado como isotonzante e uma combinação de α -tocoferol 0,01% e de EDTA 0,04% foi utilizada quando foi necessário obter-se uma formulação com maior estabilidade química, reduzindo-se reações de oxidação do AR.

Primeiramente, foi avaliada a influência da concentração de AR (0,05, 0,1 e 0,2%) sobre a sua encapsulação nas NE (Tabela 4). Em seguida, foi avaliada a concentração de amina (SA, 0, 0,1 e 0,2%) e sua influência na encapsulação do AR (Tabela 5).

Tabela 4 – Composição das NE contendo diferentes concentrações de AR (% p/p)

Componentes	NE A	NE B	NE C
Fase oleosa			
AR	0,05	0,1	0,2
Crodamol	2	2	2
Colesterol	0,2	0,2	0,2
Tween 80	1,5	1,5	1,5
SA	0,2	0,2	0,2
Fase aquosa			
Água purificada qsp	100	100	100

Tabela 5 – Composição das NE contendo diferentes concentrações de SA (% p/p)

Componentes	NE A	NE D	NE E
Fase oleosa			
AR	0,05	0,05	0,05
Crodamol	2	2	2
Colesterol	0,2	0,2	0,2
Tween 80	1,5	1,5	1,5
SA	0,2	0,1	-
Fase aquosa			
Água purificada qsp	100	100	100

Por fim, a influência da formação de um par iônico entre o AR e uma amina lipofílica (SA) e outra hidrofílica (TA) foi investigada (Figura 11). A composição das formulações se encontra descrita na Tabela 6. A concentração de aminas nas formulações foi o suficiente para eliminar a acidez livre do Crodamol GTCC® e para reagir com todo o AR.

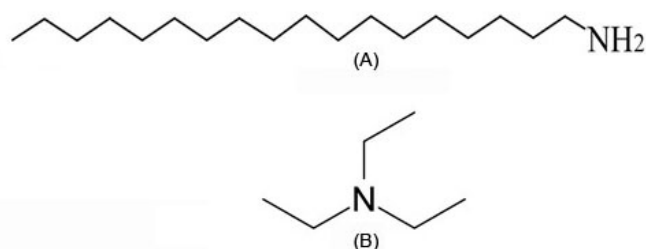


Figura 11 – Estrutura química das aminas utilizadas como par iônico do ácido retinoico: estearilamina ou octadecilamina (A) e trietilamina (B).

Tabela 6 – Composição das NE contendo aminas lipofílica e hidrofílica (% p/p)

Componentes	NE D	NE F
Fase oleosa		
AR	0,05	0,05
Crodamol	2	2
Colesterol	0,2	0,2
Tween 80	1,5	1,5
SA	0,1	-
TA	-	0,1
Fase aquosa		
Água purificada qsp	100	100

2.3 Caracterização Química e Físico-Química

2.3.1 Determinação do Diâmetro dos Glóbulos

O diâmetro médio dos glóbulos foi determinado por análise unimodal por meio de espalhamento dinâmico da luz, utilizando-se o Zetasizer 3000 HSA (Malvern, Worcestershire, Inglaterra), em ângulo fixo de 90° e em temperatura de 25 °C. Para a realização das medidas, as formulações foram diluídas em água destilada e filtrada (membranas de éster de celulose, 0,45 µm, Millipore, Billerica, EUA), de forma a se obter um KCps entre 50 e 100 (1000 contagens por segundo). Os resultados são apresentados como tamanho do glóbulo, avaliado como a média de dez medidas, e índice de polidispersão.

2.3.2 Determinação do Potencial Zeta dos Glóbulos

O potencial zeta foi determinado pela análise da mobilidade eletroforética dos glóbulos e do seu espalhamento dinâmico de luz. As análises foram feitas em triplicata em alíquotas diluídas, de forma a se obter um KCps entre 100 e 1000. As leituras foram realizadas empregando-se o Zetasizer 3000 HSA (Malvern, Worcestershire, Inglaterra), na temperatura de 25 °C, a um ângulo de 90°. Com a medida do potencial zeta pode-se estimar a estabilidade das dispersões coloidais. Em geral, a agregação de glóbulos eletricamente carregados é menos provável que a dos não carregados, devido à repulsão eletrostática.

2.3.3 Determinação do Teor de Encapsulação do AR

O teor de encapsulação (TE) para o AR em NE foi determinado de acordo com método previamente descrito (Castro *et al.*, 2009). Este método foi baseado na determinação da concentração do AR nas NE antes (AR total) e depois de filtração (membranas de éster de celulose, 0,45 µm, Millipore, Billerica, EUA). Os cristais de AR, geralmente medem poucos micrômetros e apresentam formas características, podendo ser facilmente separados das NE (Jenning e Gohla, 2001). A ausência de cristais de AR após filtração pôde ser confirmada através de microscopia óptica.

A concentração de AR na fase aquosa externa das NE foi determinada pelo método de ultrafiltração em uma membrana com limite para massa molecular de 100 kDa (Amicon[®] 100 k, Millipore, Billerica, EUA). A concentração de AR na fase aquosa foi insignificante, devido à sua baixa solubilidade em água.

Para análise do teor total de AR antes da filtração, pesou-se a NE contendo AR em um balão volumétrico e completou-se o volume com tetraidrofurano (THF). Após homogeneização, a solução obtida deve ser límpida, devido à completa solubilização das formulações contendo AR. Em seguida, procedeu-se a uma diluição da solução com a fase móvel. Essa solução foi filtrada em filtro de 0,45 µm (Millipore, Billerica, EUA) e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Figura 12).

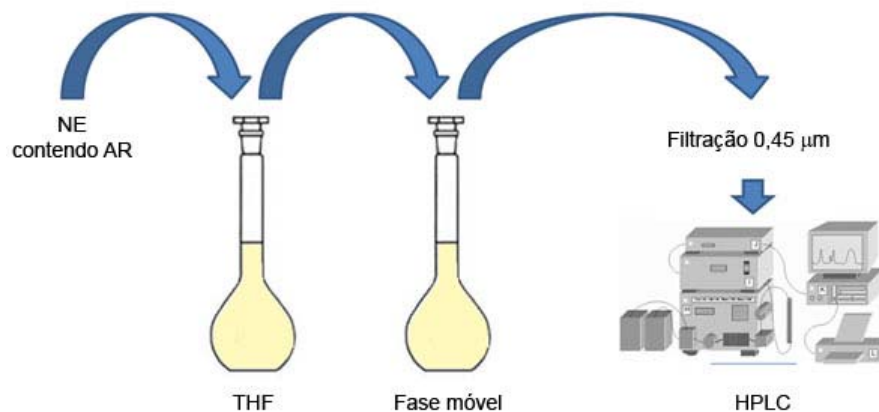


Figura 12 – Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração total do AR.

Para a análise do AR após a filtração (teor encapsulado), a NE foi filtrada em membranas de éster de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore, Billerica, EUA) para remoção dos cristais de AR não encapsulados. Em seguida, o filtrado foi transferido para um balão volumétrico e foi adicionado THF, homogeneizando a solução para promover a completa solubilização das formulações contendo AR. Em seguida, completou-se o volume com a fase móvel. Essa solução foi, por fim, filtrada em filtro de 0,45 µm (Millipore, Billerica, EUA) e analisada por HPLC (Figura 13).

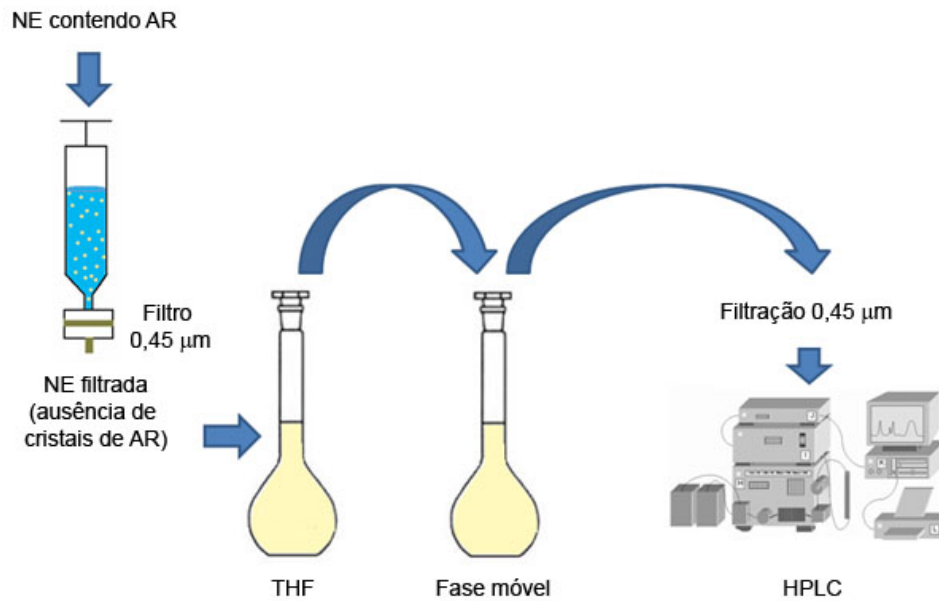


Figura 13 – Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração do AR filtrado.

A determinação da concentração do AR nas dispersões antes da filtração (AR total) e após filtração (AR encapsulado) foram analisadas por HPLC de acordo com o método descrito previamente (Castro *et al.*, 2007). O teor de encapsulação foi calculado pela fórmula:

$$TE (\%) = [AR \text{ do filtrado} / AR \text{ teor total}] \times 100$$

2.3.4 Determinação da Concentração do AR por HPLC

O método de análise para a determinação da concentração do AR por HPLC foi previamente utilizado por Castro *et al.* (2007). As condições cromatográficas são descritas a seguir.

2.3.4.1 Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas definidas abaixo foram utilizadas no método para determinação da concentração do ácido retinoico nas formulações.

- Fase móvel: Acetonitrila : Água : Ácido fosfórico 85% (80 : 19,9 : 0,1)
- Fluxo: 1,0 mL/min

- Volume de injeção: 20 µL
- Detecção: 340 nm
- Temperatura: 25 °C
- Equipamento: Módulo de bomba isocrática Waters 515; injetor automático Waters 717 Plus e detector de arranjo de fotodiodos Waters 2996 (Milford, EUA).
- Coluna: Fase reversa C18 (LichroCart 125 mm x 4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha)

2.4 Estudos de Atividade *In Vitro*

2.4.1 Linhagens Celulares

Estudos de atividade *in vitro* foram conduzidos utilizando a linhagem MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), que foi cultivada em DMEM, suplementados com 10% de SFB, glutamina 200 mM e antibióticos (estreptomicina 100 µg/mL e penicilina 100 UI/mL). Todas as culturas foram mantidas em uma estufa umidificada em ambiente de 5% de gás carbônico (CO₂) em 37°C.

2.4.2 Viabilidade Celular: Método do MTT

A proliferação celular foi medida pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), baseado na redução do sal tetrazólio a cristais de formazan (Figura 14) na mitocôndria de células viáveis (Mosmann, 1983). Foram semeadas em placas de 96 poços as células MCF-7 ($7,0 \times 10^3$ células/poço), que foram pré-incubadas por 24 h em 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ para permitir a adaptação antes da adição das formulações testadas.

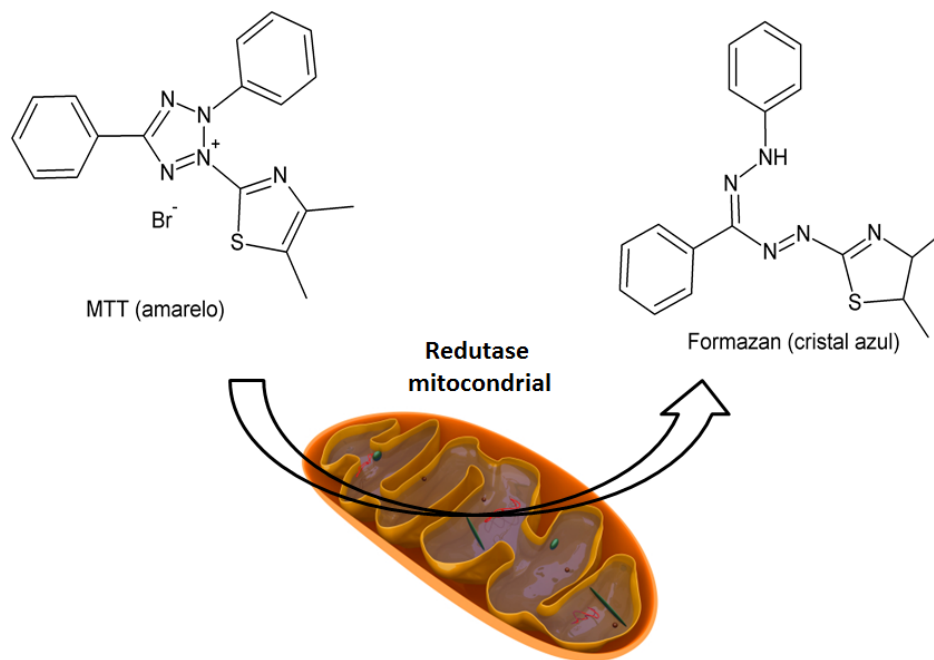


Figura 14 – Reação de redução do MTT (amarelo) a cristais azuis de formazan pela redutase mitocondrial de células viáveis

Solução de AR livre e formulações recém-preparadas foram testadas em 6 concentrações decrescentes: 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 μM . O AR livre foi dissolvido em etanol absoluto (4 mM) antes da diluição. Depois de 48h de incubação em atmosfera de 5% de CO_2 em 37 °C, 20 μL de solução de MTT a 5 mg/mL foram adicionados a cada poço. As placas foram novamente incubadas em atmosfera de 5% de CO_2 em 37 °C, por 4 h e então o meio foi removido e substituído por 200 μL de ácido clorídrico 0,04 M em isopropanol. A viabilidade celular foi estimada pela medida da taxa de redução mitocondrial, determinada pela medida da absorbância dos cristais obtidos em comprimento de onda de 595 nm. Os valores de absorbância obtidos dos poços nos quais as células foram mantidas apenas no meio, sem tratamento, foram considerados como 100% de viabilidade celular.

Os grupos controle incluíram tratamento com etanol (controle negativo) e estaurosporina (controle positivo). Foi observado 100% de viabilidade celular após tratamento com controle negativo (etanol), enquanto a estaurosporina foi efetiva em promover inibição do crescimento celular. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle das células. Todas as amostras foram testadas em sextuplicata, em 3 experimentos independentes.

2.5 Análises Estatísticas

Os valores médios e os desvios-padrão (sd) foram calculados para todos os experimentos descritos anteriormente. A análise estatística foi feita por meio de análise de variância *one-way* (ANOVA), com pós-teste de Tukey ou por teste t de Student. Para todas as análises, a diferença foi considerada significativa quando o valor de p foi menor que 0,05.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influência dos parâmetros sobre as características das NE contendo AR

Primeiramente, esta etapa de desenvolvimento de formulações teve por objetivo verificar a influência exercida pela variação da concentração de AR e de SA, além do tipo de amina, nas características das NE, como tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de encapsulação.

3.1.1 Influência da concentração de AR

As principais características das NE preparadas com diferentes concentrações de AR (0,05, 0,1 e 0,2%), estão listadas na tabela 7. O diâmetro médio dos glóbulos sofre redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com o aumento da concentração de AR, de 70 ± 6 nm (NE A) para 55 ± 4 nm (NE C). O potencial zeta das NE foi positivo e isto pode ser explicado pela presença da SA, uma amina lipofílica, na interface dos glóbulos oleosos. O aumento da concentração do AR, um ácido lipofílico, promove diminuição do potencial zeta, de 66 ± 12 mV para 21 ± 3 mV. Isto pode ser explicado pelo aumento do consumo de SA decorrente da concentração aumentada do AR diminuindo a quantidade de amina protonada na interface. Esses achados estão em consonância com dados previamente publicados, os quais mostraram diminuição do potencial zeta de NLS carregadas com SA e AR em comparação com NLS com SA na ausência do AR (Castro *et al.*, 2007).

O teor de encapsulação do AR foi alto para todas as formulações investigadas mantendo-se em torno de 100% para todas as concentrações testadas ($99 \pm 3,5\%$ para a NE A, $99 \pm 0,9\%$ para a NE B e $102 \pm 1,3\%$ para a NE C). Estes dados estão em acordo com os apontados em outros estudos, que mostraram o desenvolvimento de NE com um alto potencial de retenção do AR na fase oleosa, com TE bem elevado (Chansri *et al.*, 2006; Chinsriwongkul *et al.*, 2007).

Tabela 7 – Efeito da concentração de AR nas características das NE

Parâmetros	NE A	NE B	NE C
% AR	0,05	0,1	0,2
Tamanho (nm)	70 ± 6	68 ± 0,7	55 ± 4
IP	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,03	0,27 ± 0,06
Potencial Zeta (mV)	66 ± 12	38 ± 3	21 ± 3
Teor de Encapsulação	99 ± 3,5	99 ± 0,9	102 ± 1,3

Dados expressos como média ± sd (n=3).

3.1.2 Concentração de SA

Foram preparadas NE com duas concentrações de SA, 0,1 e 0,2% e uma NE sem SA, cujas características estão listadas na tabela 8. Observa-se que a presença de SA possibilita a obtenção de NE com diâmetro de glóbulos menores (70 ± 6 nm e 75 ± 5 nm para NE A e NE D, respectivamente), quando comparados com uma NE na ausência da amina (121 ± 2 nm). Além disso, observa-se uma redução drástica no potencial zeta das formulações com a redução da concentração de amina, chegando a valores negativos com a ausência da amina. De fato, tem-se um potencial zeta de 66 ± 12 mV para a NE A (0,2% de SA), 37 ± 3 para a NE D (0,1% de SA) e -38 ± 9 mV para a NE E (sem SA).

Tabela 8 – Efeito da concentração de SA nas características das NE

Parâmetros	NE A	NE D	NE E
% SA	0,2	0,1	0
Tamanho (nm)	70 ± 6	75 ± 5	121 ± 2
IP	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0	0,3 ± 0,03
Potencial Zeta (mV)	66 ± 12	37 ± 3	-38 ± 9

Dados expressos como média ± sd (n=3).

A Figura 15 mostra a influência da concentração da SA sobre o TE do AR em NE. Pode-se observar claramente que a presença da amina é relevante para a obtenção de elevados valores de TE para o AR em NE. De fato, na formulação sem amina, o TE para o AR foi baixo ($62 \pm 4,5\%$). No que se refere à formulação com 0,1% de SA, o TE foi de $98 \pm 3,5\%$ e na formulação contendo 0,2% de SA, o TE foi de $99 \pm 3,5\%$. Resultados similares foram obtidos previamente quando o aumento da

concentração de amina (SA) proporcionou elevado TE do AR em NLS (Castro *et al.*, 2007).

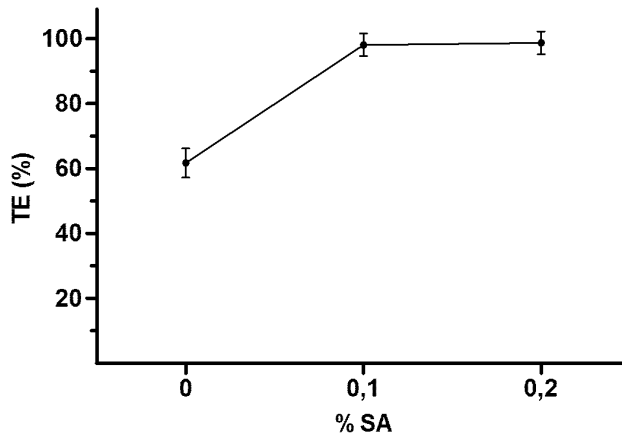


Figura 15 – Efeito da concentração de SA no teor de encapsulação (TE) de AR nas NE. Dados expressos como média \pm sd (n=3).

3.1.3 Tipo de Amina

Um terceiro estudo foi conduzido para avaliar a influência do tipo de amina, uma hidrofílica (trietilamina – TA) e outra lipofílica (estearilamina – SA), sobre as características da NE (Tabela 9). Pode-se observar que a utilização de TA promoveu a formação de NE com tamanho maior (113 ± 1 nm) que o observado para as NE de SA (75 ± 5 nm). Além disso, observa-se uma clara variação no potencial zeta. Estas NE foram negativamente carregadas (potencial zeta de -32 ± 3 mV), em contraste com as NE contendo SA, as quais se apresentaram positivamente carregadas (37 ± 3 mV). Por fim, ambas as aminas proporcionaram uma elevada encapsulação do AR nas NE, próximo a 100%, o que é um indício da necessidade da formação de par iônico entre o AR e alguma amina para que se obtenham elevados TE.

Tabela 9 – Efeito do tipo de amina nas características das NE

Parâmetros	NE D	NE F
Amina	SA	TA
Tamanho (nm)	75 ± 5	113 ± 1
IP	$0,30 \pm 0$	$0,29 \pm 0,03$
Potencial Zeta	37 ± 3	-32 ± 3
Teor de Encapsulação (%)	$98 \pm 3,5$	$99 \pm 1,5$

Dados expressos como média \pm sd (n=3).

3.2 Estudo de Estabilidade Preliminar

Considerando o desenvolvimento de NE contendo dois tipos de aminas, uma lipofílica (SA) e outra hidrofílica (TA), as duas formulações foram submetidas à avaliação da estabilidade. Estas formulações foram preparadas e, em seguida, armazenadas por 30 dias em temperatura de 4 °C para avaliação do TE.

Desta forma, conforme mostrado na figura 16, depois de 30 dias, ocorre uma diminuição drástica no TE do AR nas NE contendo TA (de $99 \pm 1,5\%$ para $36 \pm 4\%$). O mesmo não aconteceu para a formulação contendo SA, cujo TE se mantém constante ($98 \pm 3,5\%$ e $103 \pm 4\%$, no intervalo de tempo inicial e após 30 dias, respectivamente). Desta forma, a formação de par iônico promove elevado TE inicial para o AR em NE, mas o aumento da lipofilicidade da amina aumenta a capacidade da NE de reter o AR encapsulado ao longo tempo.

Dados publicados previamente mostraram que a produção de nanossistemas como as NLS contendo par iônico entre AR e aminas poderia gerar TE mais elevado e formulações mais estáveis. Este efeito foi mais evidente na medida em que o caráter lipofílico da amina aumentou (Castro *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009). De fato, a formulação estudada, contendo SA, apresentou estabilidade por até 90 dias (dados não mostrados).

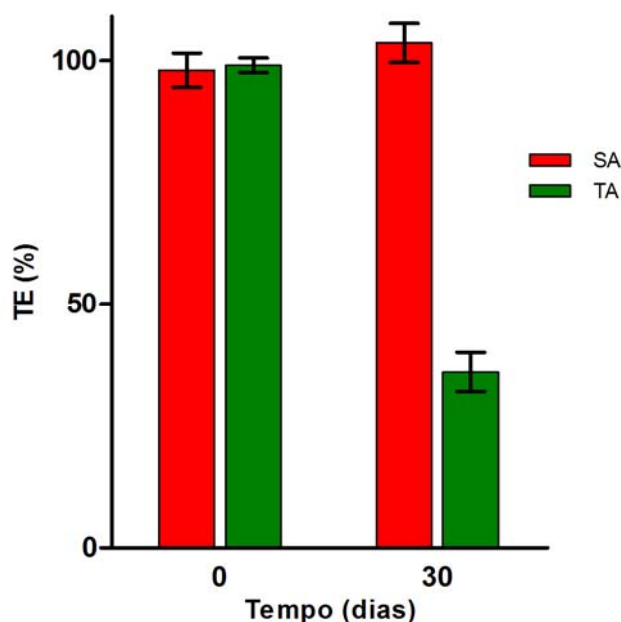


Figura 16 – Estabilidade da encapsulação do AR em NE preparadas com estearilamina (SA) e trietilamina (TA)
Dados expressos como média \pm sd (n=3).

3.3 Citotoxicidade *In Vitro*

Para investigar se a citotoxicidade do AR seria afetada pela encapsulação em NE contendo aminas, foi utilizado o ensaio de metabolização do MTT para avaliar a viabilidade celular. Neste caso, o MTT, ao ser convertido a formazan pela redutase mitocondrial, indica que a célula ainda está viável metabolicamente. A viabilidade de células MCF-7 incubadas com AR em solução e encapsulado em NE carregadas com diferentes aminas (SA lipofílica e TA hidrofílica) foi investigada. Para verificar a citotoxicidade da matriz da formulação, as células foram também tratadas com as formulações brancas.

Assim, primeiramente, foi observada uma elevada toxicidade para a NE branca carregada com SA, sendo que este efeito foi independente da concentração (dado não mostrado). Esta citotoxicidade foi atribuída à presença da amina catiônica lipofílica SA. De fato, quando a NE branca sem SA é incubada com essas células, o efeito desaparece completamente e a viabilidade foi em torno de 100%. Esses achados estão em consonância com dados previamente publicados com NLS ou lipossomas estabilizados por lípides catiônicos. A interação entre moléculas catiônicas anfifílicas com os fosfolípides aniônicos da membrana celular induz o aparecimento de danos na membrana e, com isso, uma citotoxicidade inespecífica (Roberts e Addy, 1981; Lappalainen *et al.*, 1994; Scholer *et al.*, 2001).

Desta forma, para prosseguir com os estudos de viabilidade celular, as NE contendo TA, branca e carregada com AR, foram testadas contra as células MCF-7. Os resultados estão apontados na figura 17. Interessantemente, observou-se que a formulação branca contendo TA, desta vez não apresentou atividade citotóxica contra MCF-7. A viabilidade celular ficou em torno de 100%, independente da concentração testada. Estes dados indicam que esta formulação apresenta citotoxicidade desprezível quando comparada com a NE branca contendo SA, podendo ser uma nova alternativa potencial para o desenvolvimento de formulações para administração intravenosa do AR.

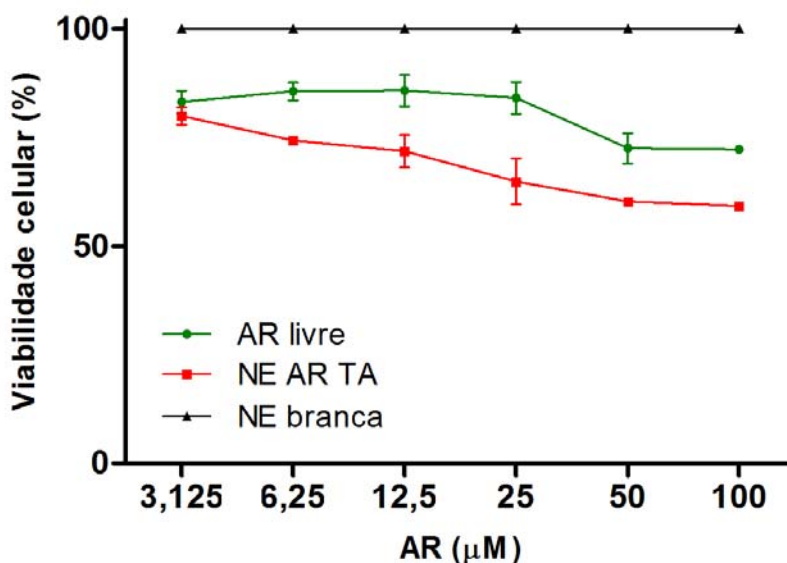


Figura 17 – Estudos de viabilidade celular, avaliados por ensaio de MTT, do AR livre, NE branca e carregada com AR em células MCF-7 após 48h de tratamento. Dados expressos como média \pm sd de três experimentos independentes. As formulações brancas foram diluídas na mesma proporção que as carregadas com AR.

Adicionalmente, a NE carregada com AR e TA apresentou efeito citotóxico significativamente maior que aquele observado para o AR livre em todas as concentrações testadas. Foi também observada uma clara relação dose-dependente entre a concentração de fármaco e a viabilidade celular para as NE, enquanto que isto não foi observado para o AR livre. A redução mais expressiva da viabilidade celular nas células tratadas com a NE foi observada nas concentrações de 50 e 100 μ M com viabilidade de $60 \pm 0,1\%$ e $59 \pm 0,9\%$, respectivamente.

Assim, foi observado um aumento na atividade antitumoral de NE carregadas com AR em comparação com AR livre. A formação *in situ* do par iônico entre o AR e a TA favorece a retenção do fármaco na matriz lipídica. Após a diluição das nanopartículas no meio de cultura, se o AR fosse liberado rapidamente a partir das NE antes de ser captado pelas células, seria esperado que a atividade das NE contendo AR fosse similar àquela observada para o AR livre. Considerando que nossos dados mostraram uma atividade maior para as NE, a hipótese mais provável é que o AR permanece associado com a fase lipídica das NE após a diluição no meio, permitindo captação aumentada do fármaco pelas células tumorais. De fato, no estudo conduzido por Martins *et al.* (2012), para investigar os mecanismos de captação de nanocarreadores lipídicos carregados com rodamina 123, foi observada

fluorescência intracelular apenas de células tratadas com as nanosistemas, mas não com a rodamina livre. Portanto, as nanopartículas lipídicas favorecem a captação celular do fármaco e, após a captação, este ativo estará apto a exercer a sua atividade.

Esta situação pode ser ilustrada por meio de dois estudos que envolveram a incorporação de AR em emulsões. No primeiro estudo (Chansri *et al.*, 2006), foi observada maior inibição de metástases hepáticas em camundongos inoculados com células CT26, promovida por uma NE quando comparada com o AR livre. De fato, a liberação *in vitro* do AR a partir desta NE foi lenta e controlada. Por outro lado, no segundo estudo, ao se incorporar o AR em microemulsões, sistemas conhecidos por serem instáveis após diluição, observou-se que a atividade citotóxica em HL-60 e MCF-7 das microemulsões de AR foi similar àquela observada para o AR livre. Além disso, a liberação do AR a partir das microemulsões também foi similar àquela observada para o AR livre (Hwang *et al.*, 2004). Sugere-se, desta forma, que o aumento da atividade citotóxica pode estar associado à capacidade de retenção do AR no sistema até posterior captação pelas células tumorais.

Por fim, é importante notar que o estudo de Su *et al.* (2008) mostrou aumento na atividade de NE carregada com AR e tributirina, um pró-fármaco do ácido butírico, contra células hepáticas ou colônicas em relação ao AR livre. O ácido butírico é um inibidor das histonas desacetilases e tem emergido como uma nova classe de agentes anticâncer. Porém, considerando que a combinação de AR com tributirina proporciona um efeito anticâncer sinérgico, é difícil separar os efeitos da combinação de AR e tributirina daqueles relacionados à encapsulação (Chen e Breitman, 1994; Giermasz *et al.*, 2001).

4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Foram desenvolvidas e caracterizadas diversas NE contendo AR, um ácido lipofílico. O teor de encapsulação do AR em NE é baixo, a menos que seja utilizada uma amina para promover a formação de um par iônico. O aumento da concentração de AR, além de promover redução no potencial zeta das NE, apresentou TE próximo de 100%, independente da concentração testada. A presença de SA promove aumento no TE do AR, mas 0,1% é uma concentração razoável para se obter TE elevado, sem a necessidade de maior concentração da amina.

Ambas as aminas, a lipofílica (SA) e a hidrofílica (TA), promoveram elevado TE inicial; entretanto, esta encapsulação é reduzida ao longo de 30 dias nas formulações contendo a amina hidrofílica. A formulação contendo SA apresentou toxicidade inespecífica para as células testadas. Já a formulação contendo TA não apresentou toxicidade inespecífica e claramente promoveu aumento na atividade citotóxica do AR.

Desta forma, estes achados sugerem que as NE contendo um par iônico entre AR e uma amina, além de ser uma alternativa interessante para veicular este fármaco pela via intravenosa, apresentam a capacidade de promover aumento da atividade citotóxica do AR. Entretanto, estudos posteriores serão necessários para promover a estabilidade dessas formulações ao longo do tempo.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO ÁCIDO RETINÓICO

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO ÁCIDO RETINÓICO

1 INTRODUÇÃO

No Capítulo 1, foram desenvolvidas formulações de NE contendo o AR para viabilizar a sua administração parenteral e promover aumento na atividade antitumoral deste fármaco. Entretanto, ainda que ambas as aminas, a lipofílica (SA) e a hidrofílica (TA), promoveram elevado TE inicial, esta encapsulação é reduzida ao longo de 30 dias nas formulações contendo TA. Por outro lado, a formulação contendo SA apresentou toxicidade inespecífica para as células testadas, enquanto que a NE contendo TA aumentou a atividade citotóxica do AR quando comparada com o fármaco livre.

As NLS, diferentemente das NE, são constituídas por um lípide sólido ao invés de um lípide líquido (óleo). Estes sistemas apresentam como principal vantagem quando comparados com as NE o potencial para liberação controlada do fármaco devido à matriz lipídica sólida (Muller *et al.*, 2000). Além disso, as NLS apresentam diversas vantagens em relação à aplicação parenteral: excelente estabilidade física, proteção contra a degradação de fármacos incorporados, liberação controlada de fármacos (rápida ou prolongada) dependendo do modelo de incorporação, boa tolerabilidade e direcionamento do fármaco para regiões específicas (Wissing *et al.*, 2004).

Como potenciais desvantagens têm-se a capacidade de encapsulação insuficiente e a expulsão do fármaco depois da transição polimórfica durante o armazenamento (Wissing *et al.*, 2004). Diante disso, dentre os desafios de se desenvolverem NLS, têm-se a obtenção de formulações estáveis e de elevado TE inicial. A preparação e a caracterização de NLS contendo AR têm sido relatadas, mas o TE do AR nas NLS é baixo (menos de 1% em relação à concentração total de lípidos) (Jenning e Gohla, 2001), exceto se é utilizada uma relação tensoativo/lípide elevada (Lim e Kim, 2002; Hu *et al.*, 2004). Castro *et al.* (2007), por outro lado, desenvolveram uma nova formulação de NLS carregada com AR com elevado TE, graças à formação de um par iônico entre o fármaco e uma amina lipofílica (estearilamina).

Diante disso, nossa hipótese seguinte é de que a formação do par iônico entre o AR e diferentes aminas, incluindo a SA, não só aumentaria o TE do AR e a sua retenção nas NLS, mas também a atividade antitumoral *in vitro* deste fármaco em linhagens celulares tumorais. Diante disso, esta etapa seguinte do trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de NLS carregadas com AR usando a formação do par iônico com aminas lipofílicas (SA e benetamina - BA) e uma hidrofílica (TA). Ao se manter o AR retido no interior das NLS, que contém uma matriz lipídica sólida, espera-se que a captação celular do AR seja aumentada e, com isso, a sua atividade citotóxica *in vitro* em células cancerosas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Ácido retinoico foi fornecido pela Basf (Ludwigshafen, Alemanha). Estearilamina (SA), colesterol, trietilamina (TA) e benetamina (BA) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, EUA). Compritol 888 ATO [berrenato de glicerila, mistura de mono, di e triacilglicerois do ácido berrênico (C₂₂)] foi cedido pela Gattefossé (Lyon, França). Monooleato de sorbitano etoxilado de grau super refinado (Polissorbato 80; SuperRefined Tween 80[®]) foi fornecido pela Croda Inc (Edison, EUA).

Para os estudos *in vitro*, o meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 foi obtido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). Meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), soro fetal bovino (SFB), metiltiazoltetrazólio [MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio], Glutamina 200 mM, estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100 UI/mL, estaurosporina e iodeto de propídio foram adquiridos da Gibco[®] Life Technologies (Carlsbad, EUA).

As seguintes linhagens celulares foram utilizadas: HL-60, HCT-116, MCF-7 e MDA-MB-231, adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, EUA) e Jurkat, cedida por Gustavo Amarante-Mendes, da Universidade de São Paulo.

Todos os demais reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Preparo das Nanopartículas Lipídicas Sólidas

As NLS foram preparadas pelo método de homogeneização a quente (Figura 18). Primeiramente, FO e FA foram pesadas separadamente e aquecidas a 85 °C. Mantendo esta temperatura, a FA foi lentamente vertida sobre a FO sob agitação constante a 8.000 rpm por 2 minutos em um agitador Ultra Turrax T-25 (Ika Labortechnik, Germany). Esta emulsão foi imediatamente submetida a uma homogeneização com uma sonda de ultrassom de alta intensidade (CPX 500, Cole-Palmer Instruments, USA), durante 10 minutos em 20% de amplitude. O pH das formulações foi ajustado para 7,0 com soluções de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio 0,01 M, com o auxílio de um medidor de pH (Digimed DM 20, Brasil).

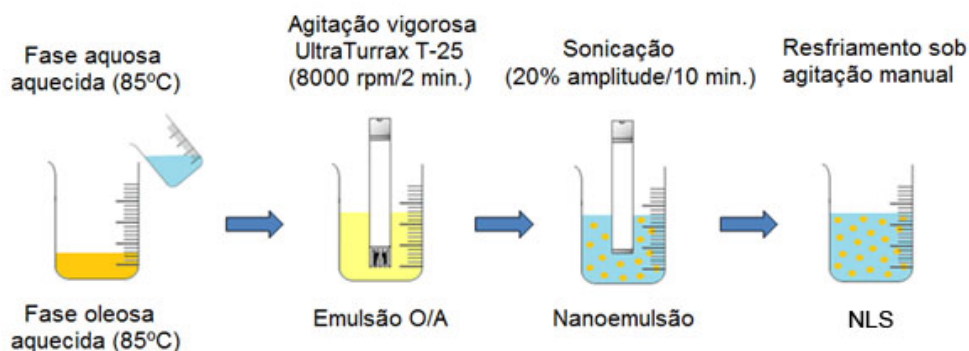


Figura 18 – Representação esquemática da preparação das NLS pelo método de homogeneização a quente seguido por ultrassom.

A composição das NLS preparadas está apresentada na tabela 10. A influência da formação de um par iônico entre o AR e aminas lipofílicas (SA e BA) e hidrofílica (TA) foi investigada. A concentração de aminas nas formulações foi o suficiente para eliminar a acidez livre do Compritol 888 ATO[®] (acidez máxima: 4 mg KOH/g de lípide) e para reagir com todo o AR.

As formulações foram preparadas com o Compritol 888 ATO[®] como matriz lipídica e apresentou o Tween 80[®] super refinado como tensoativo e o colesterol como co-tensoativo. Glicerol 2,25% foi utilizado como isotonzante e uma combinação de α -tocoferol 0,01% e de EDTA 0,04% foi utilizada quando foi necessário obter-se uma formulação com maior estabilidade química, reduzindo-se reações de oxidação do AR.

Tabela 10 – Composição das NLS contendo AR (% p/p)

Componentes	Sem Amina	SA	TA	BA
Fase oleosa				
AR	0,1	0,1	0,1	0,1
Compritol 888 ATO [®]	2	2	2	2
Colesterol	0,2	0,2	0,2	0,2
Tween 80 [®]	1,5	1,5	1,5	1,5
SA	-	0,2	-	-
TA	-	-	0,2	-
BA	-	-	-	0,2
Fase Aquosa				
Água Destilada qsp	100	100	100	100

2.3 Síntese do Par Iônico

Quantidades estequiométricas de AR e de BA foram dissolvidas em metanol:clorofórmio (1:1) e submetidas à agitação magnética por 24 h à temperatura de 25 °C. Após este período, o solvente foi evaporado utilizando um rotavapor.

2.4 Caracterização Química e Físico-Química

2.4.1 Determinação do Diâmetro das Partículas

O diâmetro médio das partículas foi determinado por análise unimodal por meio de espalhamento dinâmico da luz, utilizando-se o Zetasizer 3000 HSA (Malvern, Inglaterra), em ângulo fixo de 90° e em temperatura de 25 °C. Para a realização das medidas, as formulações foram diluídas em água destilada e filtrada (membranas de éster de celulose, 0,45 µm, Millipore, Billerica, EUA), de forma a se obter um KCps entre 50 e 100 (1000 contagens por segundo). Os resultados são apresentados como tamanho de partícula, avaliado como a média de dez medidas, e índice de polidispersão.

2.4.2 Determinação do Potencial Zeta das Partículas

O potencial zeta foi determinado pela análise da mobilidade eletroforética das partículas e do seu espalhamento dinâmico de luz. As análises foram feitas em triplicata em alíquotas diluídas, de forma a se obter um KCps entre 100 e 1000. As leituras foram realizadas empregando-se o Zetasizer 3000 HSA (Malvern, Inglaterra), na temperatura de 25 °C, a um ângulo de 90°. Com a medida do potencial zeta pode-se estimar a estabilidade das dispersões coloidais. Em geral, a agregação de partículas eletricamente carregadas é menos provável que a das não carregadas, devido à repulsão eletrostática.

2.4.3 Determinação do Teor de Encapsulação do AR

O TE para o AR em NLS foi determinado de acordo com método previamente descrito (Castro *et al.*, 2009). Este método foi baseado na determinação da

concentração do AR nas NLS antes (AR total) e depois de filtração (membranas de éster de celulose, 0,45 μm , Millipore, Billerica, EUA). Os cristais de AR, geralmente medem poucos micrômetros e apresentam formas características, podendo ser facilmente separados das NLS (Jenning e Gohla, 2001). A ausência de cristais de AR após filtração pôde ser confirmada através de microscopia óptica.

A concentração de AR na fase aquosa externa das NLS foi determinada pelo método de ultrafiltração em uma membrana com limite para massa molecular de 100 kDa (Amicon[®] 100 k, Millipore, Billerica, EUA). A concentração de AR na fase aquosa foi desprezível, devido à sua baixa solubilidade em água.

Para análise do teor total de AR antes da filtração, pesou-se a dispersão de NLS contendo AR em um balão volumétrico e completou-se o volume com THF. Após homogeneização, a solução obtida deve ser límpida, devido à completa solubilização das formulações contendo AR. Em seguida, procedeu-se a uma diluição da solução com a fase móvel. A solução resultante deve manter o AR solúvel, mas propiciar a precipitação do lípide sólido. Essa dispersão foi filtrada em filtro de 0,45 μm (Millipore, Billerica, EUA) e analisada por HPLC (Figura 19).

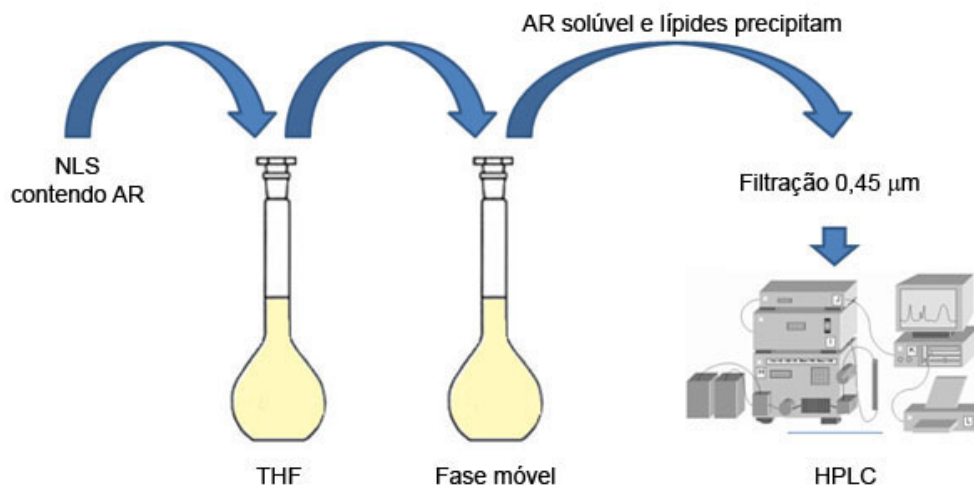


Figura 19 – Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração total do AR.

Para a análise do AR após a filtração (teor encapsulado), a dispersão foi filtrada em membranas de éster de celulose com 0,45 μm de diâmetro de poro (Millipore, Billerica, EUA) para remoção dos cristais de AR não encapsulados. Em seguida, a dispersão filtrada foi transferida para um balão volumétrico e foi adicionado THF, homogeneizando a solução para promover a completa

solubilização das formulações contendo AR. Em seguida, completou-se o volume com a fase móvel. A solução resultante deve manter o AR solúvel e precipitar o lípido sólido. Essa dispersão foi, por fim, filtrada em filtro de 0,45 µm (Millipore, Billerica, EUA) e analisada por HPLC (Figura 20).

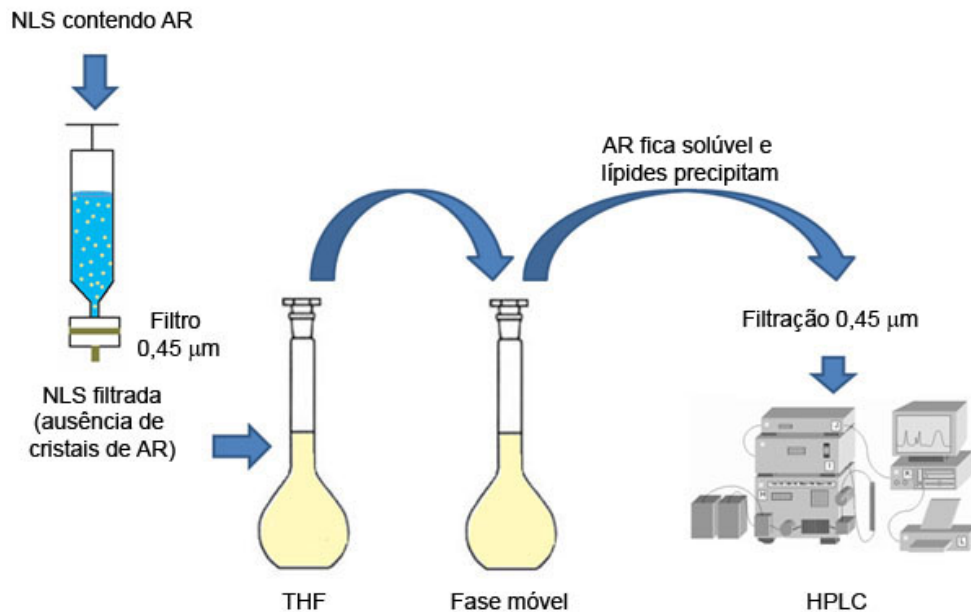


Figura 20 – Representação esquemática da metodologia para determinação da concentração do AR encapsulado.

A determinação da concentração do AR nas dispersões antes da filtração (AR total) e após filtração (AR encapsulado) foram analisadas por HPLC de acordo com o método descrito previamente (Castro *et al.*, 2007). O teor de encapsulação foi calculado pela fórmula:

$$TE (\%) = [AR \text{ do filtrado} / AR \text{ teor total}] \times 100$$

2.4.4 Determinação da Concentração do AR por HPLC

O método de análise para a determinação da concentração do AR a partir das NLS por HPLC foi o mesmo utilizado para a determinação em NE, conforme descrito no Capítulo 1 (item 2.3.4).

2.4.5 Microscopia de Luz Polarizada

A presença de cristais de AR nas NLS foi avaliada utilizando um microscópio óptico com luz polarizada (Microscópio Leica DML; Suplementos DMLP e DMLM; Leica Microsystems, Solms, Alemanha) equipado com um software apropriado (Leica IM 1000 Software, Solms, Alemanha) e uma câmera digital JVC (Modelo TK-C1480U, Yokohama, Japão). Esta técnica foi previamente utilizada para avaliar o TE do AR em NLS (Westesen *et al.*, 1997; Jennings e Gohla, 2001).

2.4.6 Difração de Raios X

NLS liofilizadas foram obtidas usando um liofilizador Modulyod-115 (ThermoFisher, EUA). Ao mergulhar o frasco contendo a formulação em nitrogênio líquido, foi realizado um rápido congelamento da amostra. As amostras foram então liofilizadas por 72h em uma temperatura de -45°C.

A difração de raios X (DRX) em pó (de $2\theta = 3$ até 90°) foi realizada usando um difratômetro de raios X (PANalytical, Phillips, Eindhoven, Holanda), equipado com um anodo de cobre ($\text{Cu K}\alpha_1 = 1,5406\text{nm}$ e $\text{K}\alpha_2 = 1,5443 \text{ nm}$). As NLS liofilizadas e os materiais puros (AR e Compritol) foram dispersas em lâminas de vidro para análises de DRX.

2.5 Estudos de Atividade *In Vitro*

2.5.1 Linhagens Celulares

Estudos de atividade *in vitro* foram conduzidos contra células normais e cancerosas. Jurkat (leucemia linfoblástica aguda), HL-60 (leucemia mieloide aguda), HCT-116 (carcinoma colorretal), MCF-7 e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano) foram cultivadas no meio RPMI ou DMEM, suplementados com 10% de SFB, glutamina 200 mM e antibióticos (estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$ e penicilina 100 UI/mL). Todas as culturas foram mantidas em uma estufa umidificada em ambiente de 5% de gás carbônico (CO_2) em 37°C .

2.5.2 Isolamento das Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano

As células normais (células mononucleares do sangue periférico; PBMC) foram obtidas em acordo com a Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (HEMOMINAS; protocolo nº 105/2004) a partir de voluntários adultos saudáveis de ambos os sexos por centrifugação do sangue venoso heparinizado em solução Ficoll cushion. PBMC foram coletados na interfase após a separação do Ficoll e lavadas por 3 vezes em RPMI antes de processamento posterior (Souza-Fagundes *et al.*, 2002). Todas as culturas foram realizadas em RPMI suplementado com 5% (v/v) de *pool* de soro AB inativado pelo calor e L-glutamina em 2 mM. Uma solução de antibiótico/antimicótico contendo penicilina a 1000 UI/mL, estreptomicina a 1000 µg/mL e Fungizone® 25 µg/mL foram adicionados para controlar contaminação bacteriana e fúngica.

2.5.3 Viabilidade Celular: Método do MTT

A proliferação celular foi medida pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), baseado na redução do sal tetrazólio a cristais de formazan na mitocôndria de células viáveis (Mosmann, 1983). Foram semeadas em placas de 96 poços as células MCF-7 ($7,2 \times 10^3$ células/poço), HL-60 ($9,0 \times 10^3$ células/poço), Jurkat e HCT-116 ($1,8 \times 10^4$ células/poço) ou PBMC ($3,6 \times 10^4$ células/poço), que foram pré-incubadas por 24 h em 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ para permitir a adaptação antes da adição das formulações testadas.

Solução de AR livre e formulações recém-preparadas foram testadas em 8 concentrações decrescentes: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 e 0,78 µM. O AR livre foi dissolvido em etanol absoluto (4 mM) antes da diluição. Depois de 48h de incubação em atmosfera de 5% de CO₂ em 37 °C, 20 µL de solução de MTT a 5 mg/mL foram adicionados a cada poço. As placas foram novamente incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ em 37 °C, por 4 h e então o meio foi removido e substituído por 200 µL de ácido clorídrico 0,04 M em isopropanol. A viabilidade celular foi estimada pela medida da taxa de redução mitocondrial, determinada pela medida da absorbância dos cristais obtidos em comprimento de onda de 595 nm. Os valores de absorbância obtidos dos poços nos quais as células foram mantidas apenas no meio, sem tratamento, foram considerados como 100% de viabilidade celular.

Os grupos controle incluíram tratamento com etanol (controle negativo) e estaurosporina (controle positivo). Foi observado 100% de viabilidade celular após tratamento com controle negativo (etanol), enquanto que a estaurosporina foi efetiva em promover inibição do crescimento celular. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle das células. Todas as amostras foram testadas em sextuplicata, em 3 experimentos independentes.

2.5.4 Conteúdo de DNA subdiploide e análise do ciclo celular

Um ensaio de citometria de fluxo de fragmentação de DNA foi empregado como uma medida quantitativa do conteúdo subdiploide e fases do ciclo celular (Riccardi e Nicoletti, 2006). As células MCF-7, HL-60 e Jurkat foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^4 células/poço em placas de 24 poços e tratadas com AR livre e NLS carregadas ou não com AR por 48 horas (concentração de AR foi 25 μ M). Depois deste tempo, células foram centrifugadas em 200 g por 5 minutos em temperatura ambiente, e o meio de cultura foi removido. O pellet foi gentilmente ressuspendido em 300 μ L de solução hipotônica fluorocrômica contendo 0,5% de Triton[®] X-100 e 50 μ g/mL de iodeto de propídeo. Em seguida, as células foram incubadas no escuro a 4 °C por 4 horas e analisadas com um citômetro Guava[®] EasyCyte[™] 6-2L Base System (Millipore, Billerica, EUA). Análises dos dados foram realizadas com o FlowJo[™] 7.6.5 (Tree Star Inc., Ashland, EUA), para determinar porcentagens de conteúdo subdiploide e fases do ciclo celular.

2.6 Análises Estatísticas

Os valores médios e os desvios-padrão (sd) foram calculados para todos os experimentos descritos anteriormente. A análise estatística foi feita por meio de análise de variância *one-way* (ANOVA), com pós-teste de Tukey ou por teste t de Student. Para todas as análises, a diferença foi considerada significativa quando o valor de p foi menor que 0,05.

3 RESULTADOS

3.1 Preparo e Caracterização das NLS

As principais características das NLS carregadas com AR e aminas lipofílicas (SA ou BA) e hidrofílica (TA) estão listadas na tabela 11.

Tabela 11 – Influência do tipo de amina no tamanho de partículas, índice de polidispersão, potencial zeta e TE do AR em NLS

Parâmetro	Sem Amina	SA	TA	BA
Diâmetro médio (nm)	155 ± 1	104 ± 4	96 ± 1	95 ± 1
Índice de polidispersão	0,24 ± 0	0,24 ± 0	0,3 ± 0.1	0,24 ± 0,01
Potencial zeta (mV)	-30 ± 4	20 ± 2	-33 ± 4	-39 ± 0,2
TE (%)	36 ± 6	97 ± 2	90 ± 2	100 ± 1

Dados representados por média ± dp, n = 3

O diâmetro médio das partículas reduziu de 155 ± 1 nm (NLS sem amina) para 104 ± 4 nm e 95 ± 5 nm para NLS contendo SA e BA, respectivamente. Partículas negativamente carregadas foram obtidas para NLS sem amina (-30 ± 1 mV) e NLS carregadas com BA (-39 ± 0,2 mV). Em contraste, ao se utilizar SA, resultou-se na formação de partículas positivamente carregadas com potencial zeta de 20 ± 2 mV. Estas diferenças na carga da partícula podem ser explicadas pelo fato de que SA apresenta um elevado potencial para adsorção interfacial, em comparação com a BA. De fato, a lipofilicidade da SA é maior do que aquela observada para a BA (Figura 21). É importante destacar que o TE do AR em NLS aumentou de 36 ± 6% (NLS sem amina) para 97 ± 2% e 100 ± 1% para NLS carregadas com SA e BA, respectivamente. Desta forma, SA e BA promoveram um aumento significativo do TE do AR em NLS. Uma explicação plausível para o aumento no TE poderia ser a formação de um par iônico entre o AR e as aminas lipofílicas. O par iônico aumenta as propriedades lipofílicas do fármaco, tornando mais fácil a sua incorporação na matriz lipídica. Estes achados estão em acordo com observações prévias que mostraram que a capacidade de incorporação em NLS está relacionada à lipofilicidade da substância (Munster *et al.*, 2005; Schafer-Korting *et al.*, 2007).

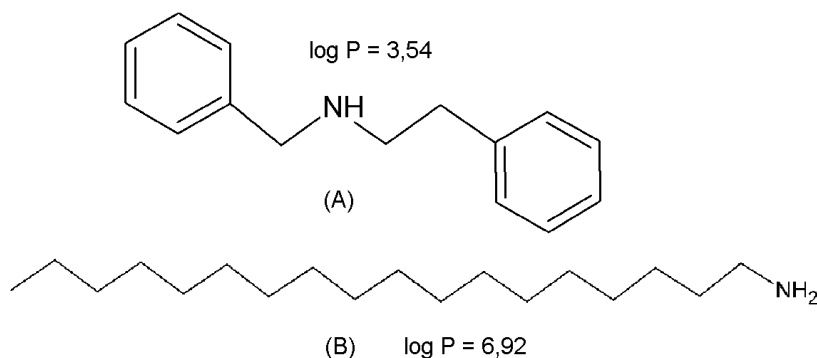


Figura 21 – Estrutura química das aminas lipofílicas e respectivos log P: benetamina (A) e estearilamina (B).

Para as NLS preparadas com a TA (amina hidrofílica), uma redução no diâmetro de partícula para 96 ± 1 nm foi também observada. Estas NLS foram negativamente carregadas (potencial zeta de -33 ± 4 mV), e isto pode ser explicado pelo fato de que a adsorção interfacial da TA ser desfavorável devido ao seu caráter hidrofílico. TA também promoveu um aumento significativo no TE do AR em NLS ($90 \pm 2\%$), quando comparado com NLS sem amina (Tabela 11). Entretanto, como mostrado na figura 22, depois de 30 dias de armazenamento a 4°C , foi observada uma redução drástica no TE para o AR em NLS contendo TA (de $90 \pm 2\%$ para $27 \pm 0,1\%$).

Em contraste significativo, o TE em NLS contendo BA foi elevado imediatamente depois da preparação e permaneceu constante depois de 30 dias ($98 \pm 2\%$). Estes achados estão de acordo com dados obtidos previamente, os quais mostraram que foi possível produzir NLS carregadas com AR com elevado TE e estabilidade empregando par iônico entre AR e amina. Aumentando a lipofilicidade da amina, aumenta a capacidade de incorporação do fármaco em NLS devido ao aumento na lipofilicidade do par iônico formado (Castro *et al.*, 2009).

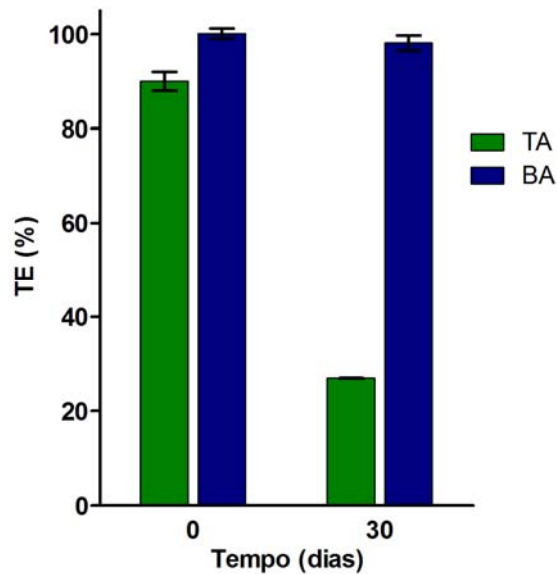


Figura 22 – Estabilidade de encapsulação do AR em NLS preparadas com trietilamina (TA) ou benetamina (BA). Dados expressos como média \pm sd de três experimentos independentes.

3.2 Microscopia de Luz Polarizada

A presença de cristais de AR insolúveis na fase aquosa externa das NLS foi investigada por microscopia de luz polarizada. Esta investigação foi realizada em NLS sem amina e com as aminas TA e BA. No caso da NLS sem amina, o TE foi baixo ($36 \pm 6\%$) e no caso da NLS contendo as aminas, o TE foi alto ($90 \pm 2\%$ para TA e $100 \pm 1\%$ para BA). As imagens obtidas estão compiladas na figura 23.

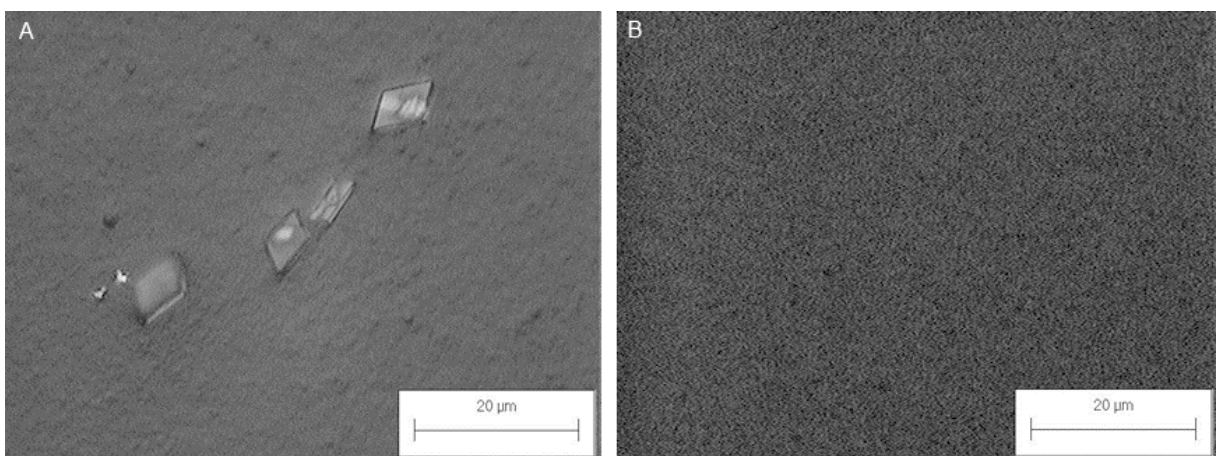


Figura 23 – Microscopia de luz polarizada da NLS sem amina (A) e das NLS contendo amina TA ou BA (B).

A imagem obtida para as NLS contendo amina, um campo escuro, é representativa para ambas as formulações fotografadas. Teor de encapsulação do AR foi baixo para a NLS sem amina ($TE = 36 \pm 6\%$) e alto para a NLS com TA ou BA ($TE = 90 \pm 2\%$ e $100 \pm 1\%$, respectivamente).

Cristais micrométricos de AR podem ser claramente observados na fase externa da NLS sem amina (Figura 23A), enquanto que estas estruturas não foram observadas em nenhuma das NLS contendo amina (Figura 23B). Estes achados confirmam o fármaco de fato se encontra encapsulado em grande quantidade na NLS contendo TA ou BA, estando o AR associado com a matriz lipídica. Por outro lado, para a NLS sem amina, a expulsão do fármaco incorporado foi claramente visualizada pela microscopia de luz polarizada. Dados similares foram observados para a NLS contendo SA (não apresentados). Dados previamente publicados mostraram que o aumento de TE para o AR em NLS contendo SA permitiu a incorporação do AR na matriz lipídica e, como consequência, a eliminação dos cristais de fármaco da fase aquosa da NLS (Castro *et al.*, 2007).

Outro aspecto que dever ser considerado é uma clara mudança na cor que pôde ser observada nas NLS como função do teor de encapsulação. NLS sem amina é amarela devido à presença de cristais de AR na fase externa, enquanto que NLS contendo aminas é esbranquiçada. A cor amarela desapareceu devido à encapsulação do AR na NLS (não apresentados). Esses achados estão consonância com os dados previamente relatados para as NLS-AR contendo SA e isto também se aplica para as NLS contendo TA ou BA (Castro *et al.*, 2007).

3.3 Difração de Raios-X

Os experimentos de DRX em pó foram realizados como estudos posteriores das interações entre os componentes das formulações. Na figura 24A estão dispostos os perfis de DRX dos principais componentes das NLS (Compritol e AR); na figura 24B, os padrões para NLS contendo AR e TA; e na figura 24C, os padrões para NLS contendo AR e BA. Na figura 24A, é possível observar os picos de difração característicos do lipídio (Compritol) e do AR. O difratograma do AR mostrou vários picos pontiagudos, tais como os dos ângulos $2\theta = 13,5, 14,4, 22,8$ e $24,8^\circ$.

Em contraste, os picos de difração devidos ao AR cristalino não foram observados para a NLS contendo TA ou BA (Figuras 24B e 24C). O difratograma de raios X mostrou claramente que o estado cristalino do AR não existe nas NLS contendo aminas, uma vez que todos os picos do material puro desapareceram.

Estes achados sugerem que o AR esteja integrado na matriz lipídica das NLS numa forma não cristalina. Por outro lado, esses dados confirmam aquelas da encapsulação, sugerindo uma intensa combinação entre os constituintes do par iônico (AR e TA ou BA) com a matriz lipídica da NLS.

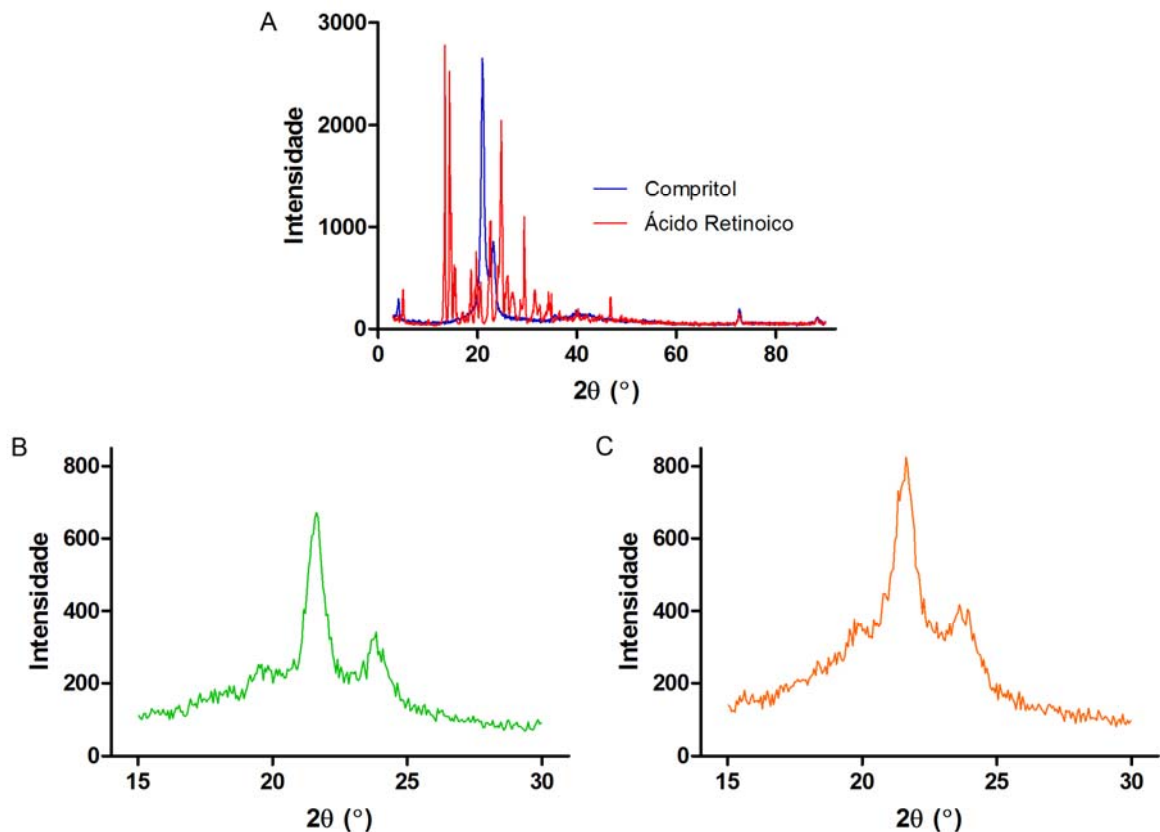


Figura 24 – (A) Difratoograma dos principais componentes da NLS: Compritol® e AR; (B) Difratoograma normalizado das NLS carregadas com AR e TA; (C) Difratoograma normalizado das NLS carregadas com AR e BA.

3.4 Citotoxicidade e Atividade Antitumoral *In Vitro*

Para investigar se a citotoxicidade do AR foi afetada pela incorporação em NLS contendo aminas, um ensaio de viabilidade celular utilizando MTT foi realizado em células normais e cancerosas. Primeiramente, foi avaliada a viabilidade celular após tratamento com NLS carregadas com a SA lipofílica. Células normais (PBMC) e cancerosas (MCF-7, Jurkat, HL-60, HCT-116) foram incubadas com AR livre, NLS brancas e NLS carregadas com SA e AR. Os dados obtidos, expressos como porcentagem de viabilidade celular, estão mostrados nas figuras 25, 26 e 27. Independente da linhagem celular avaliada, a atividade citotóxica observada para o

AR livre (viabilidade celular de aproximadamente 80%) foi significativamente menor do que aquela observada para os demais tratamentos. As células MCF-7 foram mais sensíveis ao AR livre, enquanto células Jurkat e HCT-116 foram as menos sensíveis.

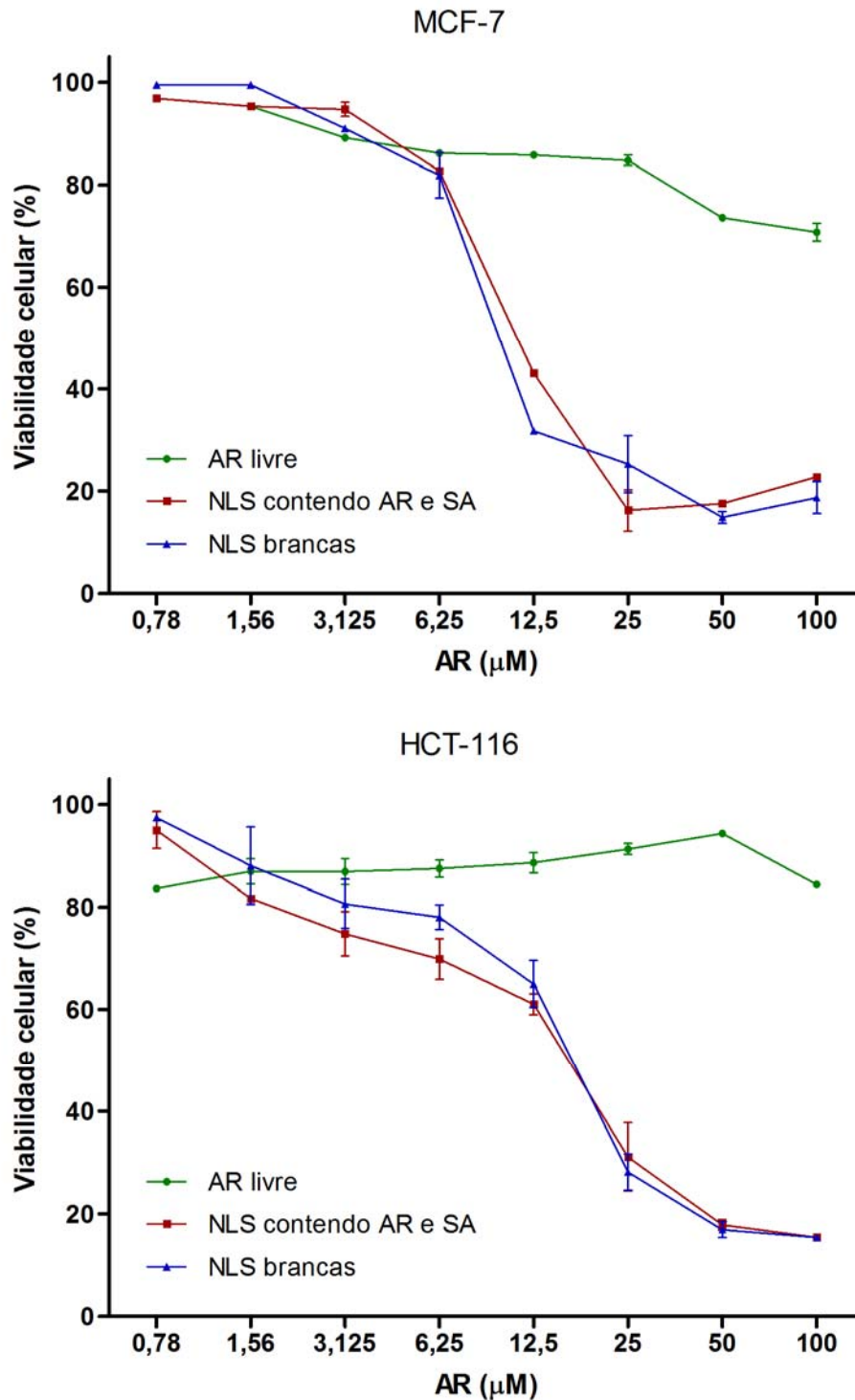


Figura 25 – Estudos de viabilidade celular, avaliados por ensaio de MTT, do AR livre, NLS brancas e carregadas com AR em células tumorais, MCF-7 e HCT-116, após 48h de tratamento. Dados expressos como média \pm sd de três experimentos independentes. As formulações brancas foram diluídas na mesma proporção que as carregadas com AR.

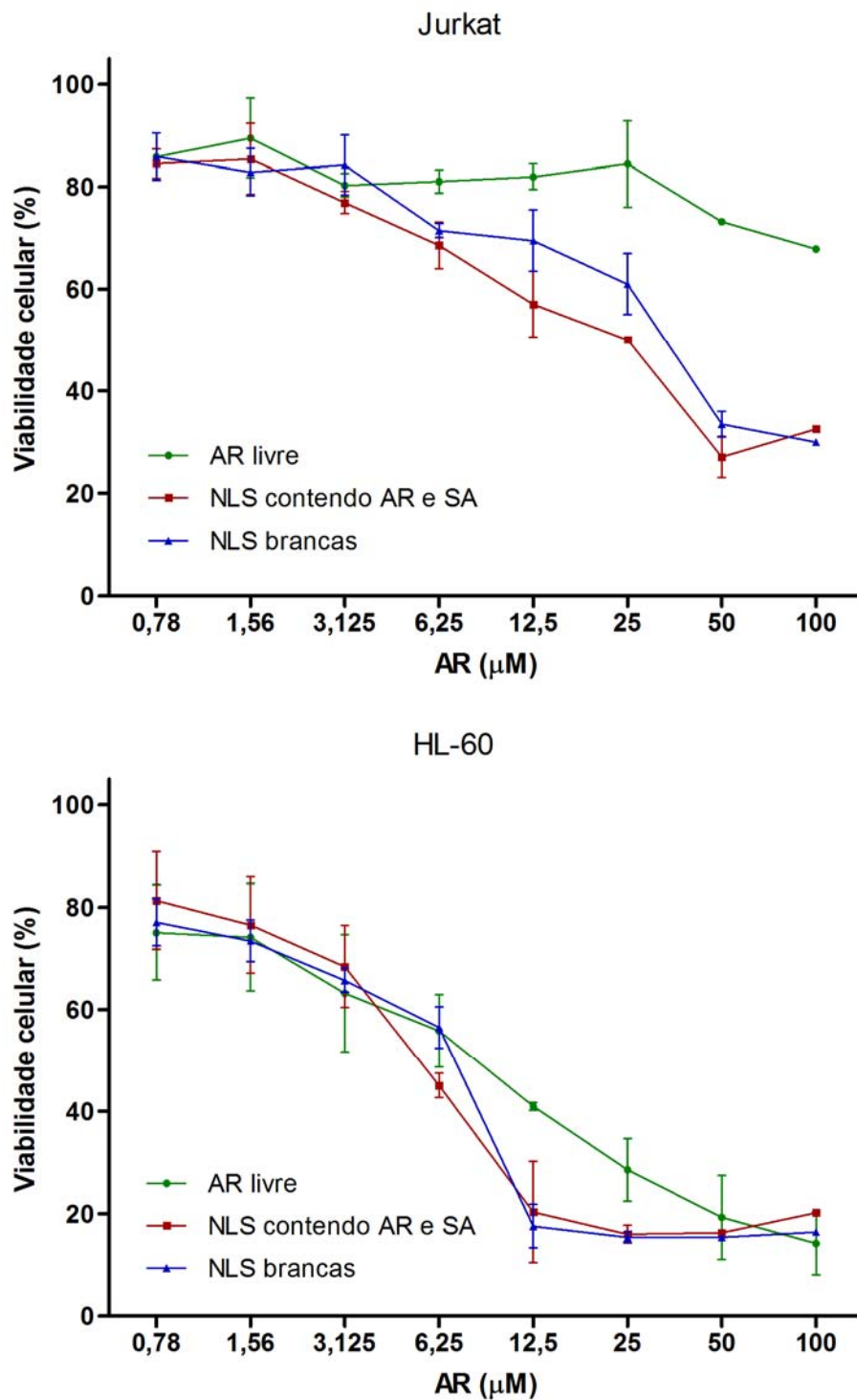


Figura 26 – Estudos de viabilidade celular, avaliados por ensaio de MTT, do AR livre, NLS brancas e carregadas com AR em células leucêmicas, Jurkat e HL-60, após 48h de tratamento. Dados expressos como média \pm sd de três experimentos independentes. As formulações brancas foram diluídas na mesma proporção que as carregadas com AR.

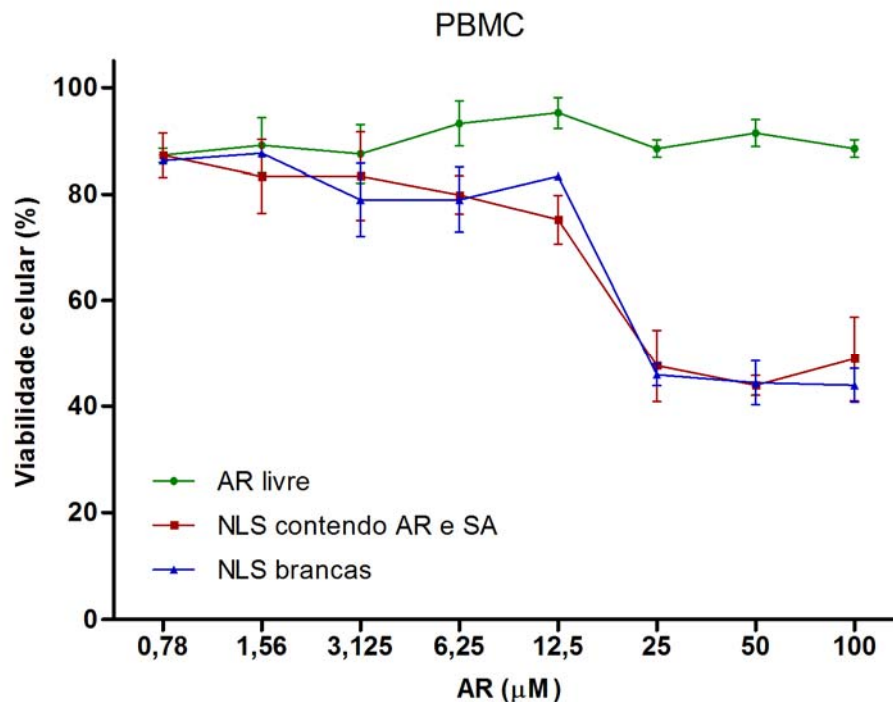


Figura 27 – Estudos de viabilidade celular, avaliados por ensaio de MTT, do AR livre, NLS brancas e carregadas com AR em células normais (PBMC) após 48h de tratamento. Dados expressos como média \pm sd de três experimentos independentes. As formulações brancas foram diluídas na mesma proporção que as carregadas com AR.

Em contrapartida, a atividade das NLS carregadas com SA e AR foi muito maior do que a observada para o AR livre, com as células MCF-7 mostrando maior sensibilidade, comparadas com outras células cancerosas. Entretanto, o efeito citotóxico das NLS não carregadas (brancas) contra células tumorais também foi elevado. É interessante notar que estes efeitos citotóxicos também foram observados contra células normais (PBMC). A citotoxicidade das NLS brancas foi atribuída à presença da amina catiônica SA. De fato, NLS brancas sem SA foram preparadas e seus efeitos citotóxicos foram investigados. Estes efeitos desapareceram completamente (dados não mostrados). Considerando que as células MCF-7 foram mais sensíveis ao AR, estas células foram selecionadas para estudos futuros.

Para investigar se as NLS carregadas com as aminas hidrofílica (TA) e lipofílica (BA), as quais foram utilizadas para a formação *in situ* de um par iônico com o AR, mostrariam o mesmo padrão de atividade, as células MCF-7 foram incubadas com NLS brancas, NLS carregadas com AR e TA, NLS carregadas com AR e BA ou AR livre e analisadas quanto à sua viabilidade metabólica. Os dados obtidos,

expressos como porcentagem de viabilidade celular (ou metabolismo de MTT), estão representados na figura 28. Interessantemente, NLS brancas carregadas com TA ou BA não mostraram efeito inibitório, sendo a viabilidade celular próxima a 100%. Estes dados demonstraram que NLS brancas carregadas com TA ou BA apresentaram citotoxicidade desprezível, quando comparadas com NLS brancas carregadas com SA, e apresentam potencial para o desenvolvimento de formulações para administração intravenosa do AR. Além disso, NLS carregadas com AR e TA ou BA apresentaram efeitos citotóxicos significativamente maiores do que aqueles observados para o AR livre em todas as concentrações testadas. Pode ser observada também uma clara relação dose-dependente entre concentração e viabilidade celular para estas NLS, o que não foi observado para o AR livre. A máxima redução na viabilidade celular, observada na concentração de 100 μM , para NLS carregadas com AR e TA, NLS carregadas com AR e BA e AR livre foi de $45 \pm 5\%$, $34 \pm 4\%$ e $71 \pm 2\%$, respectivamente. As diferenças entre NLS carregadas com BA e com TA foram significativas ($p < 0,05$).

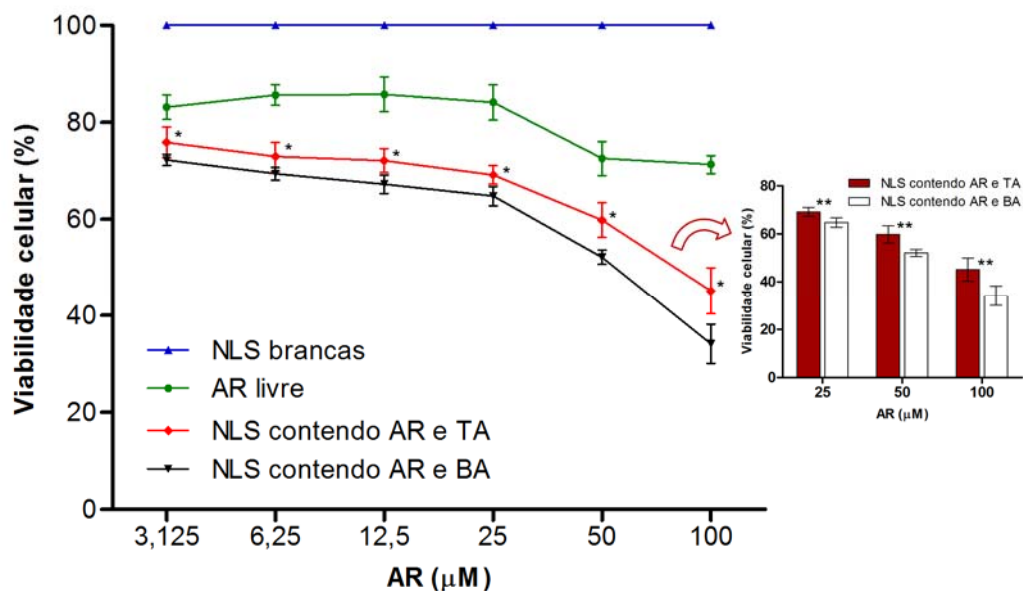


Figura 28 – Estudos de viabilidade celular, avaliados por ensaio de MTT, do AR livre, NLS brancas, NLS contendo AR e TA e NLS contendo AR e BA em células MCF-7 após 48h de tratamento. Dados expressos como média \pm sd de três experimentos independentes. Os dados para as formulações brancas, que foram diluídas na mesma proporção que as contendo AR, representam sobreposição dos valores encontrados para NLS contendo TA e para NLS contendo BA. * Diferença significativa comparada com o AR livre ($p < 0,05$); ** Diferença significativa entre as duas formulações ($p < 0,05$).

A fim de investigar se o par iônico livre (AR + BA), o qual foi sintetizado conforme descrito em materiais e métodos (item 2.3), tem alguma influência na viabilidade celular, um estudo foi conduzido. As células MCF-7 foram incubadas com o par iônico ou AR livre durante 48 h e a viabilidade foi avaliada pelo método de MTT. Os dados obtidos estão representados na figura 29. Não foram observadas diferenças significativas entre a atividade do par iônico e AR livre, exceto na concentração de 3,125 μM , na qual a viabilidade após o tratamento com o AR livre foi menor que aquela observada para o par iônico. Assim, o tratamento das células MCF-7 com o par iônico não provoca um aumento na atividade citotóxica do AR, sendo necessário, portanto, sua incorporação em NLS para que esta atividade seja aumentada.

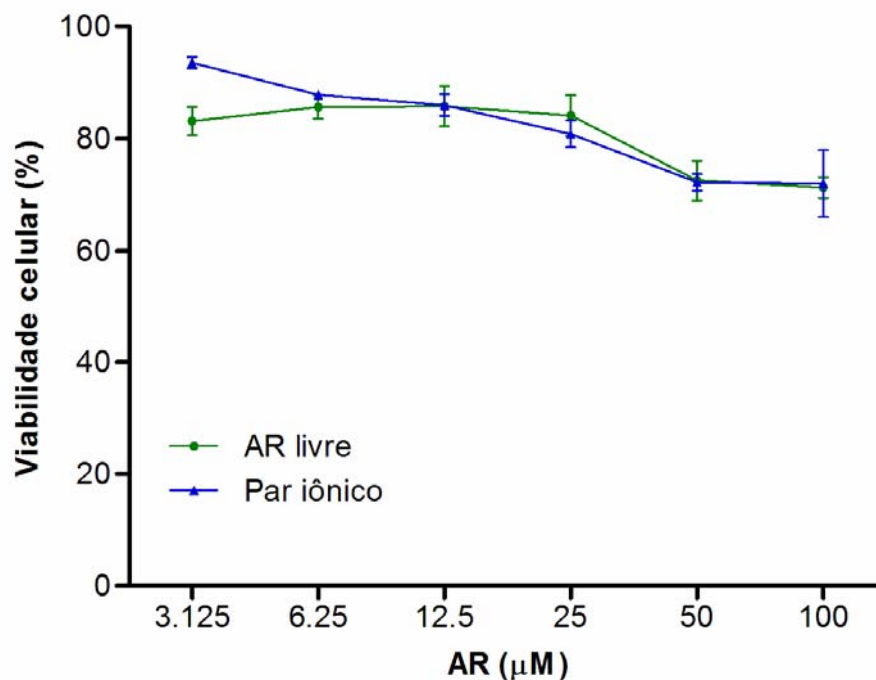


Figura 29 – Estudos de viabilidade celular, avaliados por ensaio de MTT, do AR livre e do par iônico entre AR e BA em células MCF-7 após 48h de tratamento. Dados expressos como média \pm sd de três experimentos independentes.

3.5 Conteúdo de DNA Subdiploide e Análise do Ciclo Celular

Para determinar se o aumento na atividade citotóxica do AR depois da sua incorporação em NLS carregadas com BA estava associado com alterações na progressão do ciclo celular e na fragmentação do DNA, estudos de citometria de

fluxo foram conduzidos. Foi utilizado o protocolo descrito por Riccardi e Nicoletti (2006), o qual é baseado no princípio de que células apoptóticas, entre outros aspectos típicos, são caracterizadas por fragmentação do DNA e, conseqüentemente, perda do conteúdo de DNA nuclear. O uso de um fluorocromo, como o iodeto de propídeo, o qual é capaz de se ligar e marcar o DNA viabiliza uma avaliação rápida e precisa do conteúdo de DNA por análise de citometria de fluxo e subsequente identificação de células subdiploides.

Os histogramas representativos de conteúdo de DNA após marcação com iodeto de propídeo estão dispostos na figura 30 e os dados obtidos estão descritos na tabela 12.

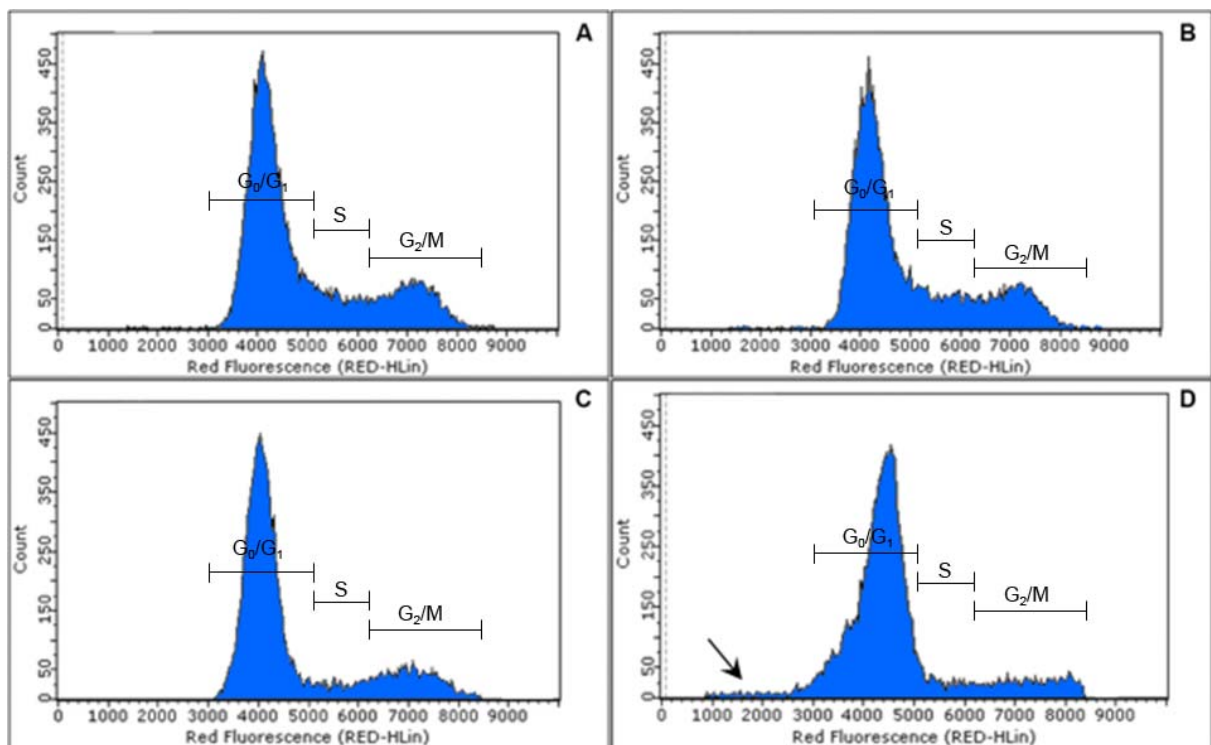


Figura 30 – Histogramas de fluorescência de DNA de células MCF-7 coradas com iodeto de propídeo após 48h de incubação com meio de cultura (A), NLS brancas (B), AR livre (C) ou NLS contendo AR e BA (D).

Os tratamentos foram aplicados contendo AR na concentração de 25 μ M. Cada histograma representativo foi obtido a partir da contagem de 20.000 eventos. A seta indica o conteúdo de DNA subdiploide.

Tabela 12 – Efeitos dos diferentes tratamentos das células MCF-7 na fragmentação de DNA e na distribuição das células nos estágios do ciclo celular

Amostra	Conteúdo subdiploide (%)	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
Controle	0,2 ± 0,1	60,5 ± 1,0	14,8 ± 0,7	24,2 ± 0,4
AR livre	0,4 ± 0,1	70,6 ± 0,5	10,8 ± 0,1	16,2 ± 0,3
NLS com TA				
NLS brancas	0,4 ± 0,2	64,0 ± 0,6	16,8 ± 0,0	17,5 ± 0,7
NLS contendo AR	0,5 ± 0,2	73,0 ± 0,5	12,4 ± 0,6	14,1 ± 0,3
NLS com BA				
NLS brancas	0,7 ± 0,1	62,8 ± 0,8	17,1 ± 0,4	19,3 ± 1,0
NLS contendo AR	6,1 ± 0,7	73,8 ± 0,6	6,8 ± 0,2	13,3 ± 0,9

Dados expressos como média ± sd de três experimentos independentes. O ciclo celular foi determinado após 48h de tratamento.

O aumento no conteúdo DNA subdiploide foi desprezível para o tratamento com NLS contendo AR e TA ($0,5 \pm 0,20\%$) e AR livre ($0,4 \pm 0,05\%$), quando comparado com o controle. Depois de 48 h de tratamento, o conteúdo de DNA subdiploide para NLS contendo AR e BA ($6,1 \pm 0,65\%$) foi significativamente aumentado com uma fragmentação de DNA 12 e 17 vezes maior do que aquela observada para as NLS contendo AR e TA e o AR livre, respectivamente. As NLS brancas (com TA ou BA) não mostraram aumento significativo no conteúdo subdiploide em comparação com o controle. Estes dados estão em consonância com aqueles obtidos nos estudos de viabilidade celular, sugerindo que as NLS contendo BA apresentam mais vantagens como carreadores do AR do que as NLS contendo TA.

Dados relacionados à distribuição nos estágios do ciclo celular mostraram um aumento significativo na fase G₀/G₁ depois do tratamento das células com NLS carregadas com AR ($73,0 \pm 0,5\%$ e $74 \pm 0,6\%$ para NLS contendo TA e BA, respectivamente) em comparação com aqueles obtidos para o grupo controle ($60,5 \pm 1,0\%$). Este aumento foi maior do que aquele observado para o tratamento das células com AR livre ($70,6 \pm 0,5\%$).

Além disso, a frequência de células MCF-7 na faixa de conteúdo de DNA correspondente à fase S diminuiu quando os tratamentos são comparados com o grupo controle. Esta redução foi mais evidente para as NLS com BA ($8 \pm 0,3\%$) do que para as NLS com TA ($12,4 \pm 0,6\%$). O AR livre também mostrou uma diminuição significativa na fase S ($10,8 \pm 0,1\%$) em comparação com o grupo controle ($14,8 \pm$

0,7%). Esta redução se revelou menor do que aquela observada para o tratamento com NLS contendo AR e BA. Estes achados estão em consonância com observações prévias, as quais mostraram que o tratamento de células MCF-7 com AR induz parada do ciclo celular em G₁ antes de induzir apoptose (Zhu *et al.*, 1997; Mangiarotti *et al.*, 1998).

3.6 Atividade *in vitro* em células leucêmicas

A citotoxicidade do AR livre ou incorporado em NLS contendo BA e das NLS brancas também foi avaliada por meio de ensaio de viabilidade celular utilizando MTT e por citometria de fluxo usando como marcador o iodeto de propídeo, em células leucêmicas HL-60 e Jurkat. Os dados obtidos, expressos como porcentagem de viabilidade celular estão representados na figura 31. As NLS brancas contendo BA não mostraram efeito inibitório para ambas as linhagens celulares, apresentando viabilidade celular próxima a 100%. Estes dados estão em consonância com aqueles obtidos previamente para as células MCF-7. Além disso, as NLS carregadas com AR e BA apresentaram atividade significativamente maior do que aquela observada para o AR livre. Isto foi observado para as duas linhagens de células (HL-60 e Jurkat). Foi também claramente observada uma relação dose-dependente entre concentração de fármaco e viabilidade celular quando as células HL-60 foram tratadas com as NLS e AR livre. No entanto, isto não foi tão evidente para as células Jurkat. As células HL-60 foram mais sensíveis do que as células Jurkat. Esses achados estão em consonância com dados previamente publicados os quais mostraram que as células HL-60 são mais sensíveis ao tratamento com o AR (Dimberg e Oberg, 2003; Ozeki e Shively, 2008). A máxima redução na viabilidade das células HL-60, observada na concentração de 25 μ M, foi de $14 \pm 6\%$ e $28 \pm 6\%$ para NLS-AR e AR livre, respectivamente. Em relação às células Jurkat, os valores observados foram de $60 \pm 1,5\%$ e $76 \pm 5\%$, respectivamente. As diferenças entre NLS contendo AR e TA e AR livre foram significativas ($p < 0,05$).

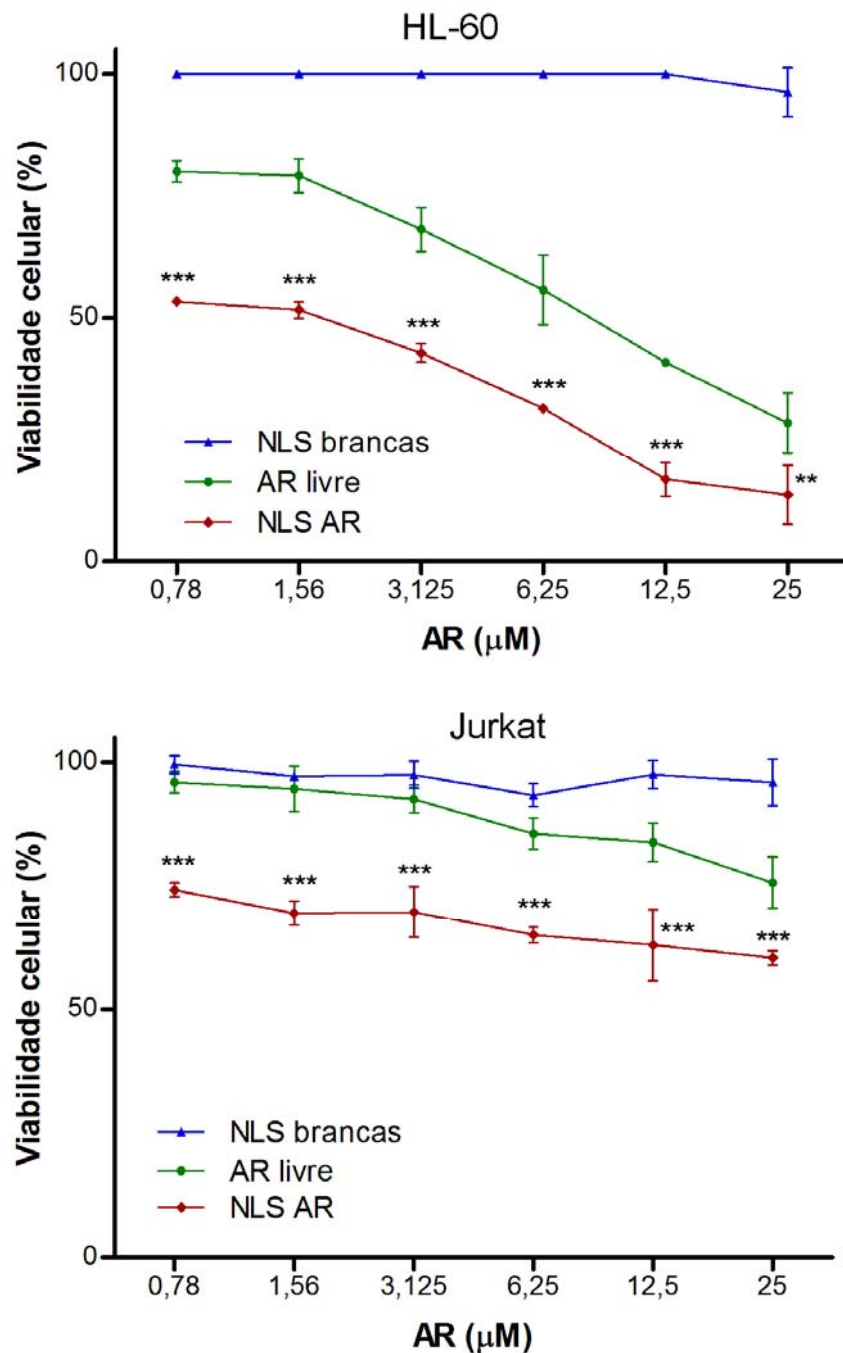


Figura 31 – Estudos de viabilidade celular, avaliados por ensaio de MTT, do AR livre, NLS brancas e NLS contendo AR e BA em células HL-60 e Jurkat após 48h de tratamento.

Dados expressos como média \pm sd de três experimentos independentes. As formulações brancas foram diluídas na mesma proporção que as contendo AR.

** Diferença significativa comparada com o AR livre ($p < 0,01$); *** Diferença significativa comparada com o AR livre ($p < 0,001$).

Para avaliar as alterações na progressão do ciclo celular e na fragmentação do DNA das células leucêmicas promovidas pelo AR livre ou encapsulado, estudos de citometria de fluxo, utilizando o iodeto de propídeo como fluorocromo, foram conduzidos. Os histogramas representativos de conteúdo de DNA após marcação

com iodeto de propídeo estão dispostos nas figuras 32 e 33 e os dados obtidos estão descritos na tabela 13.

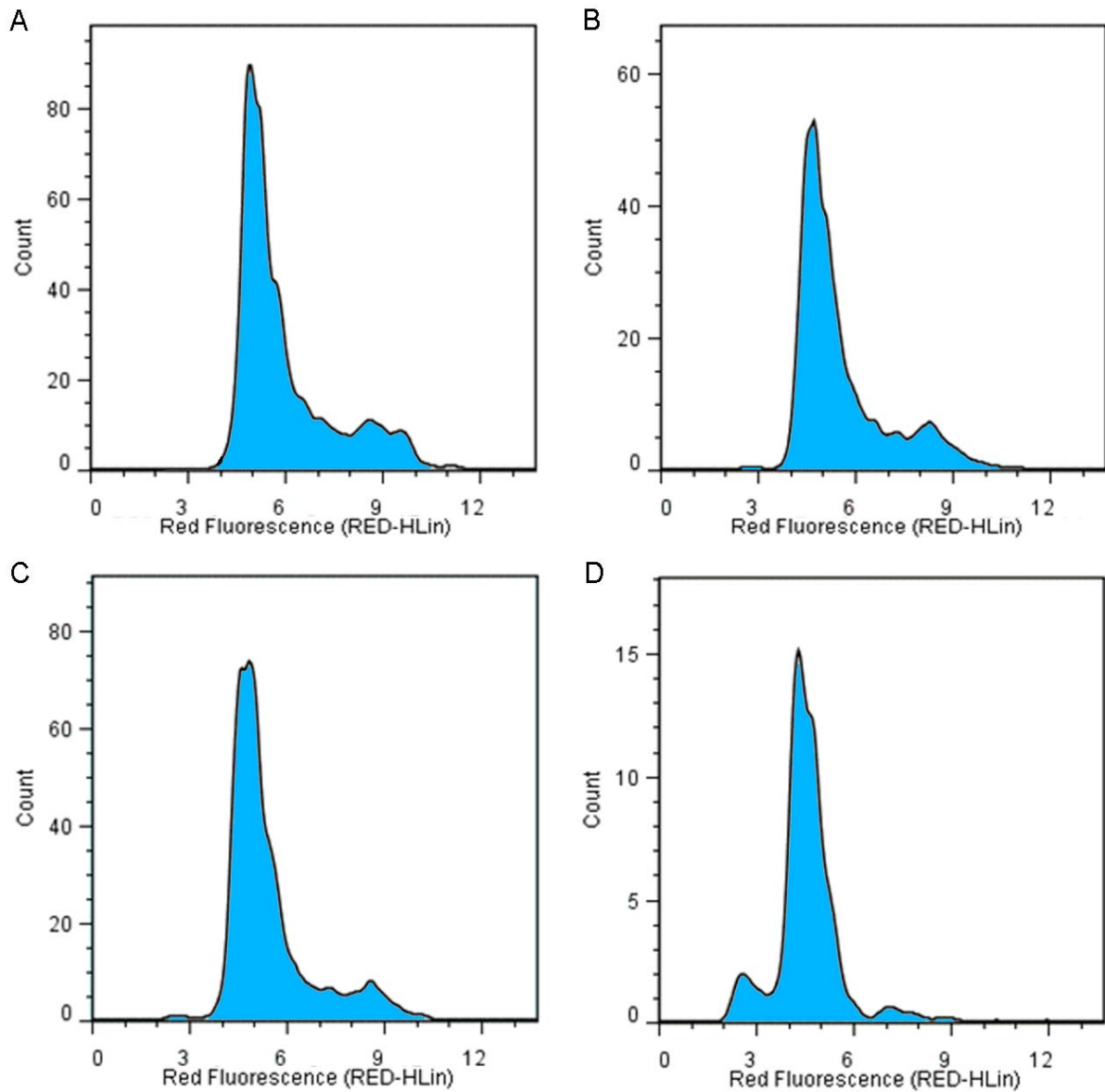


Figura 32 – Histogramas de fluorescência de DNA de células HL-60 coradas com iodeto de propídeo após 48h de incubação com meio de cultura (A), NLS brancas (B), AR livre (C) ou NLS contendo AR e BA (D). Para estes estudos, o AR foi usado na concentração de 25 μ M. Cada histograma representativo foi obtido a partir da contagem de 20.000 eventos. A seta indica o conteúdo de DNA subdiploide.

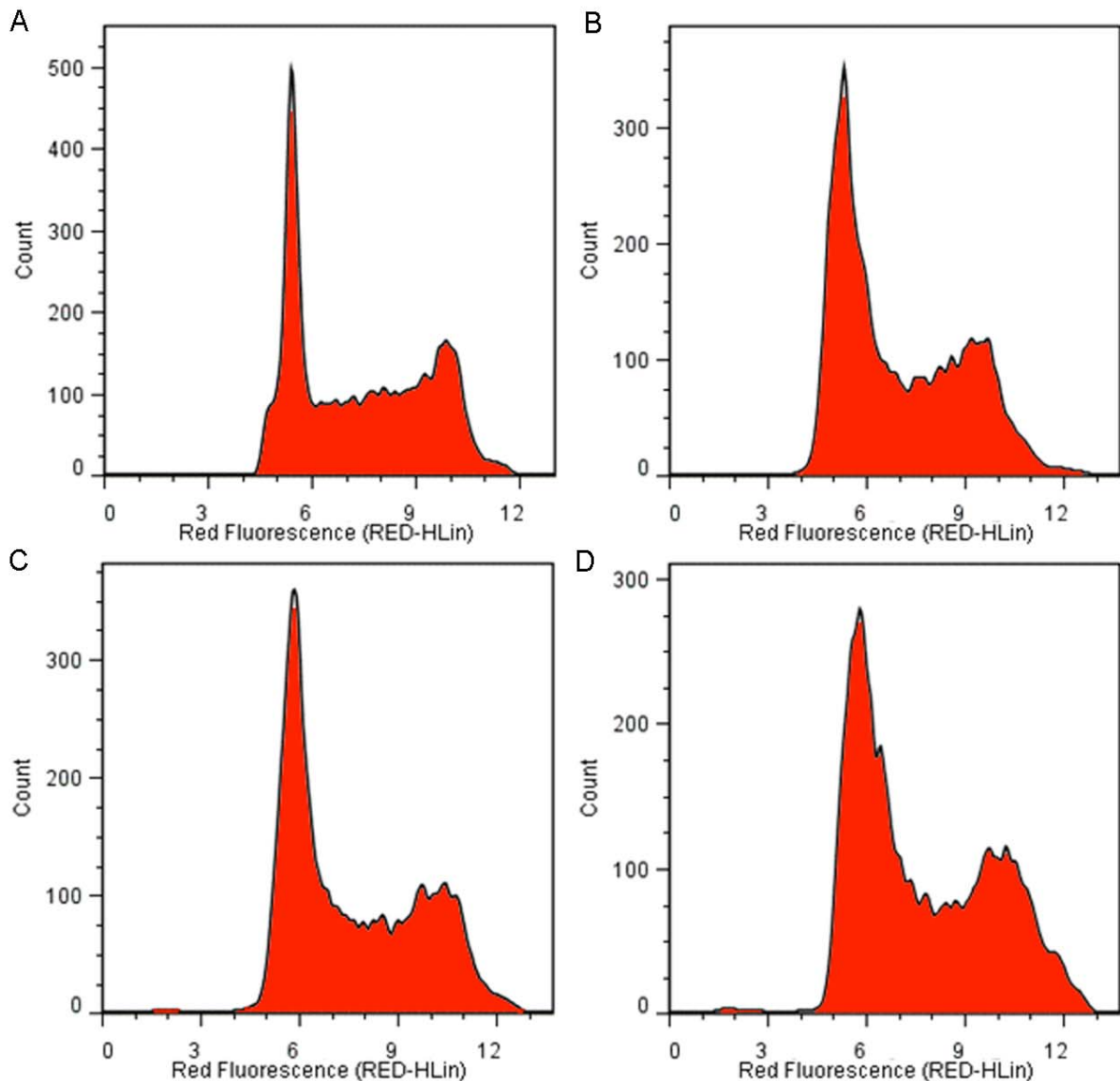


Figura 33 – Histogramas de fluorescência de DNA de células Jurkat coradas com iodeto de propídeo após 48h de incubação com meio de cultura (A), NLS brancas (B), AR livre (C) ou NLS contendo AR e BA (D).

Para estes estudos, o AR foi usado na concentração de 25 μ M. Cada histograma representativo foi obtido a partir da contagem de 20.000 eventos. A seta indica o conteúdo de DNA subdiploide.

O aumento no conteúdo de DNA subdiploide nas células HL-60 foi desprezível para o tratamento com AR livre ($0,4 \pm 0,1\%$), quando comparado com o controle. Entretanto, para NLS contendo AR e BA ($10,6 \pm 0,1\%$), o conteúdo de DNA subdiploide foi significativamente aumentado. A fragmentação de DNA para as NLS foi 25 vezes maior do que aquela observada para o AR livre. As NLS brancas não mostraram aumento significativo no conteúdo subdiploide em comparação com o controle. Por outro lado, em relação às células Jurkat, o conteúdo de DNA

subdiploide observado após o tratamento com AR livre ($0,5 \pm 0,03\%$) e NLS AR ($0,5 \pm 0,07\%$) foi desprezível. Novamente, as NLS brancas não mostraram aumento significativo no conteúdo subdiploide, em relação ao controle. Estes dados, tomados juntos, reforçam que NLS contendo BA mostram vantagens como carreadores do AR.

Tabela 13 – Efeitos dos diferentes tratamentos das células HL-60 e Jurkat na fragmentação de DNA e na distribuição das células nos estágios do ciclo celular

Amostra	Conteúdo subdiploide (%)	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
HL-60				
Controle	$0,1 \pm 0,0$	$77,1 \pm 0,5$	$15,7 \pm 1,0$	$12,8 \pm 0,5$
NLS brancas	$1,1 \pm 0,4$	$77,5 \pm 1,3$	$12,4 \pm 1,2$	$8,9 \pm 0,1$
AR livre	$0,4 \pm 0,1$	$78,2 \pm 1,8$	$7,6 \pm 0,5$	$13,5 \pm 1,6$
NLS-AR	$10,6 \pm 0,1$	$83,6 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,01$
Jurkat				
Controle	$1,0 \pm 0,28$	$42,5 \pm 0,35$	$16,9 \pm 0,07$	$39,8 \pm 0,0$
NLS brancas	$0,3 \pm 0,03$	$51,1 \pm 1,1$	$15,9 \pm 1,0$	$32,7 \pm 0,1$
AR livre	$0,5 \pm 0,03$	$49,6 \pm 0,4$	$14,6 \pm 0,6$	$35,2 \pm 0,2$
NLS -AR	$0,5 \pm 0,07$	$53,6 \pm 1,8$	$11,6 \pm 0,8$	$34,3 \pm 1,0$

Dados relacionados à distribuição nos estágios do ciclo celular mostraram um aumento significativo na fase G₀/G₁ após o tratamento das células leucêmicas com NLS carregadas com AR em comparação com o controle. Estes dados são evidentes tanto para HL-60 ($83,6 \pm 0,5\%$ para NLS AR e $77,1 \pm 0,5\%$ para o controle) quanto para Jurkat ($53,6 \pm 1,8\%$ para NLS AR e $42,5 \pm 0,4\%$ para o controle). Estes aumentos foram significativamente maiores do que aqueles observados para o tratamento das com AR livre ($78,2 \pm 1,8\%$ e $49,6 \pm 0,4\%$ para as células HL-60 e Jurkat, respectivamente).

Por outro lado, foi observada uma redução na fase S, mais pronunciado para HL-60 do que para Jurkat. De fato, para HL-60, a frequência de células na fase S foi de $15,7 \pm 1,0\%$ no controle, reduzindo para $7,6 \pm 0,5\%$ e $3,4 \pm 0,2\%$ após o tratamento das células com AR livre e NLS-AR, respectivamente. Desta forma, a redução foi de aproximadamente 2 e 5 vezes, respectivamente. Por outro lado, para Jurkat, o controle apresentou uma frequência de células na fase S de $16,9 \pm 0,07\%$,

reduzindo para $14,6 \pm 0,6\%$ e $11,6 \pm 0,8\%$ após o tratamento das células com AR livre e NLS contendo AR, respectivamente.

Finalmente, foi também observada uma redução na fase G₂/M, novamente mais evidente para as células HL-60 do que para as células Jurkat. Para HL-60, a frequência de células na fase G₂/M foi de $12,8 \pm 0,5\%$ para o controle, reduzindo para $2,3 \pm 0,01\%$ após o tratamento com NLS AR. O tratamento com AR livre não provocou alteração significativa nesta fase do ciclo celular ($13,5 \pm 1,6\%$) quando comparado com o controle. No que se refere às células Jurkat, a frequência de células na fase G₂/M foi de $39,8 \pm 0,0\%$ reduzindo para $35,2 \pm 0,2\%$ e $34,3 \pm 1,0\%$ após o tratamento das células com AR livre e NLS contendo AR, respectivamente. Estes achados estão em consonância com observações prévias as quais mostraram que o tratamento de células HL-60 com AR induz parada do ciclo celular em G₁ antes de induzir apoptose (Wang *et al.*, 2002; Dimberg e Oberg, 2003).

6 DISCUSSÃO

As NLS têm ganhado atenção como sistema particulado para o encapsulamento de fármacos lipofílicos tais como o AR devido à alta afinidade destas moléculas com a matriz lipídica (Muller *et al.*, 2000; Jennings e Gohla, 2001). Entretanto, inesperadamente, o TE para o AR em NLS é geralmente baixo e a formação de um par iônico *in situ* entre o AR e uma amina proporciona uma alternativa interessante para aumentar a encapsulação do fármaco (Castro *et al.*, 2009). Assim, neste trabalho foi proposto desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral *in vitro* de NLS carregadas com AR e diferentes aminas. Três aminas foram avaliadas: uma hidrofílica (TA) e duas lipofílicas (SA e BA).

Diferenças marcantes entre as formulações foram observadas quando os dados referentes à encapsulação do AR em NLS foram avaliados. Os dados obtidos mostram claramente que o TE foi significativamente aumentado em NLS contendo SA, TA ou BA quando comparados com NLS sem amina. Para NLS sem aminas, cristais de AR amarelos foram claramente observados na suspensão de NLS. De fato, imagens obtidas por microscopia de luz polarizada e dados de DRX confirmaram estes achados, mostrando que os cristais de AR não foram observados para NLS contendo TA ou BA, mas somente para NLS sem amina. Comparando as aminas, os dados mostram que o TE para AR em NLS carregadas com aminas lipofílicas (BA e SA) foi maior que o observado para NLS contendo TA. Adicionalmente, a estabilidade (retenção do fármaco) de NLS carregadas com a BA lipofílica foi muito maior do que aquela observada para NLS contendo TA. Apesar de TA ser considerada base mais forte que BA ou SA (o valor de pK_b para TA é mais baixo que o das outras aminas), as diferenças em basicidade entre as aminas são relativamente baixas. Por outro lado, os dados obtidos mostram que a retenção de AR na matriz lipídica aumenta com a hidrofobicidade do contraíon utilizado na formação do par iônico, revelando que a lipofilicidade, mais que a basicidade, foi o parâmetro mais relevante. Estes achados estão consistentes com observações prévias, as quais mostraram que o TE para AR em NLS aumenta significativamente quando a lipofilicidade da amina aumenta, produzindo NLS mais estáveis (Castro *et al.*, 2007). Estes achados demonstram que a lipofilicidade da amina desencadeia uma intensa interação do AR com a matriz lipídica.

Efeitos citotóxicos contra células cancerosas e normais foram investigados. Foi claramente observado que a atividade citotóxica *in vitro* das NLS contendo AR e SA foi maior que aquela observada para o AR livre. Os resultados obtidos para o AR livre são comparáveis com outros previamente descritos (Fanjul *et al.*, 1996; Hong e Lee-Kim, 2009). Entretanto, efeitos citotóxicos para NLS não carregadas também foram elevados tanto em células cancerosas quanto normais. Este fenômeno foi atribuído ao lípide catiônico (SA), uma vez que NLS brancas sem SA não mostraram efeito citotóxico contra as células MCF-7. Estes dados estão de acordo com achados prévios, os quais revelaram que NLS ou lipossomas estabilizados por lípidos catiônicos mostraram efeitos citotóxicos. Os mecanismos propostos de citotoxicidade são interações eletrostáticas destas moléculas catiônicas anfífilas com os fosfolípidos aniônicos da membrana celular levando a dano no sistema de retenção das células (Roberts e Addy, 1981; Lappalainen *et al.*, 1994; Scholer *et al.*, 2001).

Para reduzir a toxicidade, NLS carregadas com TA ou BA foram produzidas e testadas contra células MCF-7. NLS brancas, que apresentaram partículas negativamente carregadas, não mostraram toxicidade contra as células de câncer testadas. Em contraste, NLS carregadas com AR mostraram um aumento marcante na atividade antitumoral contra a linhagem de célula de câncer de mama humano MCF-7 em comparação com o AR livre. A redução na viabilidade celular observada para NLS contendo BA foi ainda significativamente maior que a observada para as NLS contendo TA, sendo que as diferenças entre as duas formulações foi ainda mais proeminente quando foram avaliados os dados para conteúdo de DNA subdiploide. Além disso, foi observado que as NLS contendo AR foram capazes de diminuir a frequência de células MCF-7 na fase S e promover acúmulo nas fases G_0/G_1 . Estes efeitos foram ainda mais pronunciados que aqueles observados para o AR livre e são consistentes com dados reportados previamente (Zhu *et al.*, 1997; Mangiarotti *et al.*, 1998).

Achados similares foram encontrados para as células leucêmicas, particularmente a HL-60, após o tratamento com NLS contendo AR e BA. Foi observada uma pronunciada inibição da viabilidade celular associada a um grande acúmulo das células nas fases G_0/G_1 e no conteúdo de DNA subdiploide, junto a uma diminuição nas fases S e G_2/M . Estes efeitos são consistentes com dados reportados previamente, os quais mostraram uma parada do ciclo celular em G_0/G_1 induzida pelo AR (Wang *et al.*, 2002; Dimberg e Oberg, 2003). Além disso, tem sido

reportado que o AR, além de promover a redução da viabilidade celular, tem a capacidade de induzir a diferenciação de células HL-60 (Ozeki e Shively, 2008).

Estudos prévios não mostraram aumento significativo na atividade citotóxica de nanocarreadores lipídicos carregados com AR quando comparados ao AR livre (Hwang *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2004). Por outro lado, Su *et al.* (2008) mostraram que a atividade de NE carregadas com tributirina e AR contra células hepáticas ou colônicas foi maior que a do AR livre. Porém, é bem conhecido que a combinação de AR com tributirina, um pró-fármaco do ácido butírico, tem efeito anticâncer sinérgico (Chen e Breitman, 1994; Giermasz *et al.*, 2001). Portanto, é difícil separar os efeitos da combinação de AR e tributirina daqueles relacionados à encapsulação.

Por fim, este estudo mostrou pela primeira vez um aumento marcante na atividade antitumoral de NLS carregadas com AR em comparação com AR livre. A formação *in situ* do par iônico entre o AR e a BA favorece a retenção do fármaco na matriz lipídica. Depois da diluição das nanopartículas no meio de cultura, dois cenários opostos podem ocorrer: o AR pode ser liberado (ligado ou não à amina) ou permanecer associado com as NLS. Se o AR é liberado a partir das NLS como um par iônico, uma troca iônica reversa pode ocorrer, com íons do meio de cultura substituindo os contraíons (aminas), resultando novamente na formação do fármaco inicial (Lengsfeld *et al.*, 2002). Neste caso, seria esperado que a atividade das NLS fosse similar àquela observada para o AR livre. Considerando que nossos dados mostraram uma atividade maior para as NLS, a hipótese mais provável é que o AR permanece associado com a matriz lipídica das NLS após a diluição no meio, permitindo captação aumentada do fármaco pelas células tumorais (Martins *et al.*, 2012). Estudos prévios têm reportado níveis intracelulares aumentados de fármacos anticâncer carregados em NLS, a despeito das partículas serem negativamente carregadas (Serpe *et al.*, 2004).

7 CONCLUSÕES PARCIAIS

Foram desenvolvidas e caracterizadas NLS contendo AR, um ácido lipofílico, e três aminos: duas lipofílicas (SA e BA) e uma hidrofílica (TA). Da mesma forma que havia sido observado anteriormente para as NE, todas as aminos promoveram elevada encapsulação inicial, mas a formulação contendo TA não apresentou estabilidade de encapsulação significativa após 30 dias e a formulação contendo SA apresentou citotoxicidade inespecífica.

Assim, foi desenvolvida e avaliada uma formulação de NLS carregadas com AR e a BA. Foi possível obter uma alta eficiência de incorporação do AR (quase 100%) em NLS. Além disso, NLS carregadas com AR e BA promoveram uma atividade antitumoral *in vitro* aumentada quando comparada com o AR livre. Estes achados sugerem que formulação de NLS carregadas com AR e BA é uma alternativa promissora para administração intravenosa do AR no tratamento de câncer.

DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL

O objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade anticâncer *in vitro* de sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados contendo um par iônico entre o AR e aminas para o tratamento de câncer. Foram propostos dois nanossistemas, as nanoemulsões (NE) e as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).

A incorporação de AR, um fármaco lipofílico e muito pouco solúvel em água, em nanocarreadores lipídicos constitui uma alternativa interessante para viabilizar sua administração intravenosa em substituição ao uso oral. Estes sistemas apresentam diversas vantagens, como o fato de que sua produção é facilmente transponível para a escala industrial, e que ambos os sistemas não requerem o uso de solventes orgânicos. Além disso, estes sistemas apresentam potencial para acúmulo do fármaco na região tumoral, por meio de um direcionamento passivo chamado de efeito de permeabilidade e retenção aumentada.

Apesar de ser um fármaco hidrofóbico, com um log P de 4,6 (Abdulmajed e Heard, 2004), o AR apresenta baixa encapsulação nestes nanossistemas, a menos que seja utilizada uma elevada relação tensoativo/lípide na formulação. Uma alternativa para aumentar a quantidade de AR incorporado nos nanossistemas pode ser a formação *in situ* de um par iônico entre o AR e diferentes aminas, como a estearilamina, a benetamina e a trietilamina. De fato, foi observado que a formação deste par iônico promove elevados teores de encapsulação do AR tanto em NE quanto em NLS, próximos a 100%.

Comparando a atividade citotóxica da NE carregada com AR e TA com a NLS carregada com AR e TA, pode-se observar atividade aumentada para ambas, quando comparadas ao AR livre. Entretanto, as NLS promovem maior aumento de atividade quando comparadas com as NE ($34 \pm 4\%$ e $59 \pm 0,9\%$ de viabilidade celular, observada a $100 \mu\text{M}$ para NLS e NE, respectivamente). Isso ocorre, provavelmente pelo fato das NLS terem maior potencial para liberação controlada devido à sua matriz sólida (Muller *et al.*, 2000; Jennings *et al.*, 2002; Joshi e Muller, 2009).

A NE, desta forma, durante a diluição no meio de cultura, poderia liberar parcialmente o par iônico antes que os glóbulos sejam captados pelas células cancerosas (Martins *et al.*, 2012). Assim, ao ser liberado, o par iônico pode sofrer uma troca iônica reversa com íons do meio de cultura substituindo os contraíons

(aminas), resultando novamente na formação do AR livre inicial (Lengsfeld *et al.*, 2002). Considerando que isso pode ocorrer parcialmente na NE, o incremento de atividade citotóxica devido ao AR encapsulado é menor. Diante deste quadro, as NLS apresentam maior potencial como nanossistemas carreadores do AR do que a NE.

Apesar de se ter observado um aumento na atividade citotóxica promovida pelo AR encapsulado nas NLS, surge uma questão se isto seria devido à encapsulação do AR e posterior captação dos nanossistemas pelas células cancerosas, ou se o par iônico seria liberado antes desta captação e, por aumento na difusão pela membrana, o par iônico promoveria aumento na citotoxicidade. A fim de investigar esta questão, o par iônico entre o AR e a BA foi incubado com células MCF-7 e sua atividade citotóxica foi avaliada. De fato, foi observado que a atividade do par iônico foi similar àquela observada para o AR livre. Este fato sugere que, se o par iônico fosse liberado antes da captação da NLS pelas células cancerosas, a atividade anticâncer não teria sido aumentada.

Os estudos com as NLS foram conduzidos com diferentes aminas para a formação *in situ* do par iônico com o AR. A AS, uma amina primária com cadeia carbônica normal de 18 carbonos, é bastante lipofílica (log P igual a 6,92). A BA, uma amina secundária apresentando grupos aromáticos, tem um log P de 3,54 sendo, portanto, menos lipofílica que a SA. Por outro lado, a presença dos grupos aromáticos gera impedimento estérico diminuindo a reatividade desta amina com ácidos como o AR. Por fim, a TA é uma amina terciária mais hidrofílica, com log P de 1,65. Assim, em ordem de lipofilicidade, tem-se que SA > BA > TA.

Estudos prévios do nosso grupo mostraram que as NLS carregadas com AR e SA foram muito estáveis apresentando retenção do AR na matriz lipídica 360 dias após a preparação das formulações (Castro *et al.*, 2009). Entretanto, os achados deste trabalho revelaram que a presença da SA foi responsável pela citotoxicidade inespecífica das NLS limitando o uso destas formulações. Em contrapartida, NLS com BA e TA não foram tóxicas e foram consideradas alternativas atraentes para contornar os problemas de citotoxicidade descritos acima. Estudos de estabilidade com as NLS mostraram que a formulação contendo BA manteve a encapsulação do AR ao longo de 30 dias, ao contrário do que foi observado para as NLS contendo TA. De fato, a presença de cristais de AR não encapsulados foi facilmente observada alguns dias após a fabricação das NLS contendo TA. Por outro lado, isso

não foi observado nas formulações contendo BA. Considerando que se trata de uma amina mais lipofílica, espera-se que a BA promova um par iônico que apresente maior interação com a matriz lipídica.

Entretanto, vale a pena ressaltar que esses estudos foram conduzidos por um período de tempo reduzido e isto constitui uma limitação do presente estudo. Assim sendo, a avaliação da estabilidade por um período tempo prolongado deve ser investigada posteriormente. Por fim, a liofilização das NLS constitui uma alternativa interessante para se promover aumento da estabilidade da encapsulação dos fármacos nas NLS e este procedimento pode ser avaliado caso isto se revele necessário (Schwarz e Mehnert, 1997; Wissing *et al.*, 2004).

Finalmente, diversos estudos têm apontado a importância do AR no controle de doenças metabólicas como o diabetes e a obesidade por meio da ativação de RXR e seus heterodímeros. O tratamento com o AR pode reduzir o peso corporal e a adiposidade, e aumentar a tolerância à glicose e sensibilidade à insulina (Altucci *et al.*, 2007; Bonet *et al.*, 2012). Para aumentar a biodisponibilidade o AR tem sido administrado pela via oral como uma emulsão e pela via subcutânea como uma solução oleosa. Assim, a estratégia final deste trabalho, a formação do par iônico entre AR e aminas em NLS pode ser explorada para aumentar a eficácia e a biodisponibilidade do AR no tratamento de obesidade e diabetes.

CONCLUSÃO GERAL

CONCLUSÃO GERAL

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento, caracterização e avaliação de atividade anticâncer *in vitro* de nanocarreadores lipídicos contendo AR para a administração intravenosa deste fármaco no tratamento do câncer.

Na primeira parte, foram desenvolvidas e caracterizadas NE contendo par iônico do AR e uma amina. Duas aminas testadas: uma lipofílica (SA) e outra hidrofílica (TA). Estas aminas promoveram aumento na encapsulação do AR em NE atingindo valores próximos a 100%. Entretanto, ao longo de 30 dias, a encapsulação é reduzida nas NE carregadas com TA, o que não acontece com NE contendo SA. Por outro lado, nos estudos de atividade anticâncer *in vitro*, foi observada toxicidade inespecífica promovida pela SA, o que não ocorreu com a TA. A NE contendo o par AR e TA claramente promoveu aumento na atividade citotóxica do AR.

Na segunda parte, foram desenvolvidas e caracterizadas NLS contendo AR e três aminas: duas lipofílicas (SA e BA) e uma hidrofílica (TA). As aminas promoveram aumento significativo da encapsulação do AR em NLS, porém a formulação contendo TA não apresentou estabilidade de encapsulação após 30 dias. As NLS contendo SA apresentou citotoxicidade inespecífica, observada nos estudos de atividade anticâncer *in vitro*. Além disso, a atividade anticâncer *in vitro* do AR foi aumentada após a incorporação nas NLS. Assim, as NLS contendo um par iônico entre AR e BA são sistemas interessantes para veicular este fármaco pela via intravenosa e para aumentar a sua atividade anticâncer.

Em suma, a formação *in situ* de um par iônico entre o AR e uma amina em NLS constitui uma alternativa inovadora para aumento da encapsulação e atividade citotóxica do AR. Esta nova formulação, cujo procedimento de fabricação é simples e de fácil transposição para a escala industrial, representa também uma alternativa interessante para a administração intravenosa do AR com o objetivo de se realizar o tratamento de câncer, com maior eficácia quando comparado ao fármaco livre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULMAJED, K.; HEARD, C. M. Topical delivery of retinyl ascorbate co-drug. 1. Synthesis, penetration into and permeation across human skin. **Int J Pharm**, v. 280, n. 1-2, p. 113-24, 2004.
- ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 113-31, 2002.
- ADAMSON, P. C. et al. Variability in the oral bioavailability of all-trans-retinoic acid. **J Natl Cancer Inst**, v. 85, n. 12, p. 993-6, 1993.
- ALTUCCI, L. et al. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 10, p. 793-810, 2007.
- ASOU, N. 2. All-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. **Intern Med**, v. 46, n. 2, p. 91-3, 2007.
- BAKER, M. T.; NAGUIB, M. Propofol: the challenges of formulation. **Anesthesiology**, v. 103, n. 4, p. 860-76, 2005.
- BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **J Pharm Sci**, v. 82, n. 11, p. 1069-79, 1993.
- BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol**, v. 33, n. 4, p. 451-8, 1976.
- BERTRAM, J. S.; VINE, A. L. Cancer prevention by retinoids and carotenoids: independent action on a common target. **Biochim Biophys Acta**, v. 1740, n. 2, p. 170-8, 2005.
- BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. **Patologia**. 8. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- BONET, M. L.; RIBOT, J.; PALOU, A. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. **Biochim Biophys Acta**, v. 1821, n. 1, p. 177-89, 2012.
- BOORJIAN, S. A. et al. Phase 1/2 clinical trial of interferon alpha2b and weekly liposome-encapsulated all-trans retinoic acid in patients with advanced renal cell carcinoma. **J Immunother**, v. 30, n. 6, p. 655-62, 2007.
- BUNJES, H.; STEINIGER, F.; RICHTER, W. Visualizing the structure of triglyceride nanoparticles in different crystal modifications. **Langmuir**, v. 23, n. 7, p. 4005-11, 2007.
- BUSHUE, N.; WAN, Y. J. Retinoid pathway and cancer therapeutics. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, n. 13, p. 1285-98, 2010.
- CASTAIGNE, S. et al. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. **Blood**, v. 76, n. 9, p. 1704-9, 1990.
- CASTRO, G. A. et al. Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. **Int J Pharm**, v. 381, n. 1, p. 77-83, 2009.
- CASTRO, G. A.; FERREIRA, L. A. Novel vesicular and particulate drug delivery systems for topical treatment of acne. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 5, n. 6, p. 665-79, 2008.
- CASTRO, G. A. et al. Development of a new solid lipid nanoparticle formulation containing retinoic acid for topical treatment of acne. **J Microencapsul**, v. 24, n. 5, p. 395-407, 2007.

- CAVALLI, R.; CAPUTO, O.; GASCO, M. R. Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel. **Eur J Pharm Sci**, v. 10, n. 4, p. 305-9, 2000.
- CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G., JR. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65-72, 2005.
- CHANSRI, N. et al. Inhibition of liver metastasis by all-trans retinoic acid incorporated into O/W emulsions in mice. **Int J Pharm**, v. 321, n. 1-2, p. 42-9, 2006.
- CHAROENSIT, P. et al. Enhanced growth inhibition of metastatic lung tumors by intravenous injection of ATRA-cationic liposome/IL-12 pDNA complexes in mice. **Cancer Gene Ther**, v. 17, n. 7, p. 512-22, 2010.
- CHATTOPADHYAY, A. K.; MITTAL, K. L. **Surfactants in solution**. New York: M. Dekker, 1996. xiii, 415 p.
- CHEN, D. B. et al. In vitro and in vivo study of two types of long-circulating solid lipid nanoparticles containing paclitaxel. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 49, n. 11, p. 1444-7, 2001.
- CHEN, Z.; WANG, Z. Y.; CHEN, S. J. Acute promyelocytic leukemia: cellular and molecular basis of differentiation and apoptosis. **Pharmacol Ther**, v. 76, n. 1-3, p. 141-9, 1997.
- CHEN, Z. X.; BREITMAN, T. R. Tributyrin: a prodrug of butyric acid for potential clinical application in differentiation therapy. **Cancer Res**, v. 54, n. 13, p. 3494-9, 1994.
- CHINSRIWONGKUL, A. et al. Physicochemical properties of lipid emulsions formulated with high-load all-trans-retinoic acid. **PDA J Pharm Sci Technol**, v. 61, n. 6, p. 461-71, 2007.
- CHUA, T. C. et al. Impact of tumor angiogenesis in peritoneal mesothelioma after radical cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. **Pathol Oncol Res**, v. 16, n. 2, p. 217-22, 2010.
- CUNHA DE SANTIS, G. et al. Adhesion molecules and Differentiation Syndrome: phenotypic and functional analysis of the effect of ATRA, As₂O₃, phenylbutyrate, and G-CSF in acute promyelocytic leukemia. **Haematologica**, v. 92, n. 12, p. 1615-22, 2007.
- DATE, A. A.; NAGARSENKER, M. S. Parenteral microemulsions: an overview. **Int J Pharm**, v. 355, n. 1-2, p. 19-30, 2008.
- DEGOS, L. et al. All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 85, n. 10, p. 2643-53, 1995.
- DIMBERG, A.; OBERG, F. Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines. **Leuk Lymphoma**, v. 44, n. 10, p. 1641-50, 2003.
- DOUER, D. et al. Treatment of newly diagnosed and relapsed acute promyelocytic leukemia with intravenous liposomal all-trans retinoic acid. **Blood**, v. 97, n. 1, p. 73-80, 2001.
- DRACH, J. et al. Induction of differentiation in myeloid leukemia cell lines and acute promyelocytic leukemia cells by liposomal all-trans-retinoic acid. **Cancer Res**, v. 53, n. 9, p. 2100-4, 1993.
- DRAGNEV, K. H.; RIGAS, J. R.; DMITROVSKY, E. The retinoids and cancer prevention mechanisms. **Oncologist**, v. 5, n. 5, p. 361-8, 2000.
- DRISCOLL, D. F. Lipid injectable emulsions: Pharmacopeial and safety issues. **Pharm Res**, v. 23, n. 9, p. 1959-69, 2006.
- EPSTEIN, J. B.; GORSKY, M. Topical application of vitamin A to oral leukoplakia: A clinical case series. **Cancer**, v. 86, n. 6, p. 921-7, 1999.

ESTEY, E. et al. Alterations in tretinoin pharmacokinetics following administration of liposomal all-trans retinoic acid. **Blood**, v. 87, n. 9, p. 3650-4, 1996.

ESTEY, E. H. et al. Molecular remissions induced by liposomal-encapsulated all-trans retinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 94, n. 7, p. 2230-5, 1999.

FANJUL, A. N. et al. Potential role for retinoic acid receptor-gamma in the inhibition of breast cancer cells by selective retinoids and interferons. **Cancer Res**, v. 56, n. 7, p. 1571-7, 1996.

FREEMANTLE, S. J.; SPINELLA, M. J.; DMITROVSKY, E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7305-15, 2003.

GIERMASZ, A. et al. Antitumor activity of tributyrin in murine melanoma model. **Cancer Lett**, v. 164, n. 2, p. 143-8, 2001.

GOLDBERG, J. S. et al. Phase I trial of interferon alpha2b and liposome-encapsulated all-trans retinoic acid in the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma. **Cancer**, v. 95, n. 6, p. 1220-7, 2002.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urol Oncol**, v. 26, n. 1, p. 57-64, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HARRISON, T. R.; FAUCI, A. S. **Harrison: Medicina Interna**. 17. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2008.

HE, L.; WANG, G. L.; ZHANG, Q. An alternative paclitaxel microemulsion formulation: hypersensitivity evaluation and pharmacokinetic profile. **Int J Pharm**, v. 250, n. 1, p. 45-50, 2003.

HONG, T. K.; LEE-KIM, Y. C. Effects of retinoic acid isomers on apoptosis and enzymatic antioxidant system in human breast cancer cells. **Nutr Res Pract**, v. 3, n. 2, p. 77-83, 2009.

HU, L.; TANG, X.; CUI, F. Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. **J Pharm Pharmacol**, v. 56, n. 12, p. 1527-35, 2004.

HWANG, S. R. et al. Phospholipid-based microemulsion formulation of all-trans-retinoic acid for parenteral administration. **Int J Pharm**, v. 276, n. 1-2, p. 175-83, 2004.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. 2012. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/> >. Acesso em: 20/12/2012.

JACOMO, R. H.; FIGUEIREDO-PONTES, L. L.; REGO, E. M. [From the molecular model to the impact on prognosis: an overview on acute promyelocytic leukemia]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 54, n. 1, p. 82-9, 2008.

JENNING, V.; GOHLA, S. H. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). **J Microencapsul**, v. 18, n. 2, p. 149-58, 2001.

JENNING, V.; LIPPACHER, A.; GOHLA, S. H. Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization. **J Microencapsul**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2002.

JOSHI, M. D.; MULLER, R. H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 71, n. 2, p. 161-72, 2009.

JUN, H. Y. et al. Visualization of tumor angiogenesis using MR imaging contrast agent Gd-DTPA-anti-VEGF receptor 2 antibody conjugate in a mouse tumor model. **Korean J Radiol**, v. 11, n. 4, p. 449-56, 2010.

- JUNPING, W. et al. Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of PEG-lipid, oleic acid, vitamin E and cholesterol. **Int J Pharm**, v. 251, n. 1-2, p. 13-21, 2003.
- KAELIN, W. G., JR. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 9, p. 689-98, 2005.
- KAKUTANI, T. et al. O/W lipid microemulsion for parenteral drug delivery. **Proc Int Symp Controlled Release of Bioactive Materials**, v. 18, p. 359-360, 1991.
- KAWAKAMI, S. et al. Induction of apoptosis in A549 human lung cancer cells by all-trans retinoic acid incorporated in DOTAP/cholesterol liposomes. **J Control Release**, v. 110, n. 3, p. 514-21, 2006.
- KAYALI, I. et al. Interactions of retinoic acid with a model of stratum corneum lipids. **J Dermatol Clin Eval Soc**, v. 2, p.7-17, 1991.
- KLEINSTERN et al. The effect of oil nature in o/w submicron emulsion on the oral absorption profile of physostigmine salicylate in rats. **STP Pharma Sci**, v. 3, n. 2, p. 163-9, 1993.
- LAPPALAINEN, K. et al. Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. **Pharm Res**, v. 11, n. 8, p. 1127-31, 1994.
- LEE, M. K.; LIM, S. J.; KIM, C. K. Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxel-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles. **Biomaterials**, v. 28, n. 12, p. 2137-46, 2007.
- LEI, M.; DE THÉ, H. Retinoids and retinoic acid receptor in cancer. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 1, n. 2, p. 13-18, 2003.
- LENGSFELD, C. S. et al. Dissolution and partitioning behavior of hydrophobic ion-paired compounds. **Pharm Res**, v. 19, n. 10, p. 1572-6, 2002.
- LI, R. J. et al. All-trans retinoic acid stealth liposomes prevent the relapse of breast cancer arising from the cancer stem cells. **J Control Release**, v. 149, n. 3, p. 281-91, 2011.
- LIM, S. J.; KIM, C. K. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. **Int J Pharm**, v. 243, n. 1-2, p. 135-46, 2002.
- LIM, S. J.; LEE, M. K.; KIM, C. K. Altered chemical and biological activities of all-trans retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticle powders. **J Control Release**, v. 100, n. 1, p. 53-61, 2004.
- LINDNER, D. J.; BORDEN, E. C.; KALVAKOLANU, D. V. Synergistic antitumor effects of a combination of interferons and retinoic acid on human tumor cells in vitro and in vivo. **Clin Cancer Res**, v. 3, n. 6, p. 931-7, 1997.
- MANGIAROTTI, R. et al. All-trans retinoic acid (ATRA)-induced apoptosis is preceded by G1 arrest in human MCF-7 breast cancer cells. **Br J Cancer**, v. 77, n. 2, p. 186-91, 1998.
- MARTINS, S. et al. Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: an investigation of the uptake mechanism and pathway. **Int J Pharm**, v. 430, n. 1-2, p. 216-27, 2012.
- MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 47, n. 2-3, p. 165-96, 2001.
- MEHTA, K. et al. Liposome encapsulation circumvents the hepatic clearance mechanisms of all-trans-retinoic acid. **Leuk Res**, v. 18, n. 8, p. 587-96, 1994.
- MELLOR, H. R.; CALLAGHAN, R. Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response. **Pharmacology**, v. 81, n. 4, p. 275-300, 2008.
- MOONEY, D. Cancer: one step at a time. **Nature**, v. 436, n. 7050, p. 468-9, 2005.

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

MUINDI, J. et al. Continuous treatment with all-trans retinoic acid causes a progressive reduction in plasma drug concentrations: implications for relapse and retinoid "resistance" in patients with acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 79, n. 2, p. 299-303, 1992.

MULLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 50, n. 1, p. 161-77, 2000.

MUNSTER, U. et al. RU 58841-myristate--prodrug development for topical treatment of acne and androgenetic alopecia. **Pharmazie**, v. 60, n. 1, p. 8-12, 2005.

NILES, R. M. Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. **Mutat Res**, v. 555, n. 1-2, p. 81-96, 2004.

ORTIZ, M. A. et al. Retinoids in combination therapies for the treatment of cancer: mechanisms and perspectives. **Drug Resist Updat**, v. 5, n. 3-4, p. 162-75, 2002.

OZEKI, M.; SHIVELY, J. E. Differential cell fates induced by all-trans retinoic acid-treated HL-60 human leukemia cells. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 3, p. 769-79, 2008.

OZPOLAT, B. et al. Pharmacokinetics of intravenously administered liposomal all-trans-retinoic acid (ATRA) and orally administered ATRA in healthy volunteers. **J Pharm Pharm Sci**, v. 6, n. 2, p. 292-301, 2003.

PARTHASARATHY, R.; GILBERT, B.; MEHTA, K. Aerosol delivery of liposomal all-trans-retinoic acid to the lungs. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 43, n. 4, p. 277-83, 1999.

PARTHASARATHY, R.; MEHTA, K. Altered metabolism of all-trans-retinoic acid in liposome-encapsulated form. **Cancer Lett**, v. 134, n. 2, p. 121-8, 1998.

PARTHASARATHY, R. et al. Interaction of liposome-associated all-trans-retinoic acid with squamous carcinoma cells. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 34, n. 6, p. 527-34, 1994.

PATRICK, G. L. Anticancer Agents. In: (Ed.). **An introduction to medicinal chemistry**. 5. New York: Oxford University Press, 2005.

PAUWELS, E. K. et al. FDG accumulation and tumor biology. **Nucl Med Biol**, v. 25, n. 4, p. 317-22, 1998.

PRAKASH, S. et al. Polymeric nanohybrids and functionalized carbon nanotubes as drug delivery carriers for cancer therapy. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, n. 14-15, p. 1340-51, 2011.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nat Protoc**, v. 1, n. 3, p. 1458-61, 2006.

ROBBINS, K.; COTRAN. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 7. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

ROBERTS, W. R.; ADDY, M. Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetyl pyridinium chloride and hexetidine. Relevance to mode of action. **J Clin Periodontol**, v. 8, n. 4, p. 295-310, 1981.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S. et al. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, n. 1-2, p. 71-80, 2000.

SCHAFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, n. 6, p. 427-43, 2007.

- SCHOLER, N. et al. Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. **Int J Pharm**, v. 221, n. 1-2, p. 57-67, 2001.
- SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). **Int J Pharm**, v. 157, n. 2, p. 171-179, 1997.
- SERPE, L. et al. Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 58, n. 3, p. 673-80, 2004.
- SHIMIZU, K. et al. Stability and antitumor effects of all-trans retinoic acid-loaded liposomes contained sterylglucoside mixture. **Int J Pharm**, v. 258, n. 1-2, p. 45-53, 2003.
- SOLANS, C. et al. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, n. 3-4, p. 102-110, 2005.
- SOUZA-FAGUNDES, E. M. et al. Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1207-12, 2002.
- STUBBS, M.; MCSHEEHY, P. M.; GRIFFITHS, J. R. Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study. **Adv Enzyme Regul**, v. 39, p. 13-30, 1999.
- SU, J.; ZHANG, N.; HO, P. C. Evaluation of the pharmacokinetics of all-trans-retinoic acid (ATRA) in Wistar rats after intravenous administration of ATRA loaded into tributyrin submicron emulsion and its cellular activity on caco-2 and HepG2 cell lines. **J Pharm Sci**, v. 97, n. 7, p. 2844-53, 2008.
- SUZUKI, S. et al. Inhibition of pulmonary metastasis in mice by all-trans retinoic acid incorporated in cationic liposomes. **J Control Release**, v. 116, n. 1, p. 58-63, 2006.
- TALLMAN, M. S. et al. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol. **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4298-302, 2002.
- TANG, X. H.; GUDAS, L. J. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 345-64, 2011.
- TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, n. 3, p. 131-5, 2011.
- TREDAN, O. et al. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. **J Natl Cancer Inst**, v. 99, n. 19, p. 1441-54, 2007.
- VIRREY, J. J. et al. Stress chaperone GRP78/BiP confers chemoresistance to tumor-associated endothelial cells. **Mol Cancer Res**, v. 6, n. 8, p. 1268-75, 2008.
- WANG, J. et al. Retinoid-induced G1 arrest and differentiation activation are associated with a switch to cyclin-dependent kinase-activating kinase hypophosphorylation of retinoic acid receptor alpha. **J Biol Chem**, v. 277, n. 45, p. 43369-76, 2002.
- WASHINGTON, C. et al. The electrokinetic properties of phospholipid-stabilized fat emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 54, n. 3, p. 191-197, 1989.
- WASHINGTON, C. et al. The electrokinetic properties of phospholipid stabilized fat emulsions. V. The effect of amino acids on emulsion stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 77, n. 1, p. 57-63, 1991.
- WESTESEN, K.; BUNJES, H.; KOCH, M. H. J. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. **Journal of Controlled Release**, v. 48, n. 2-3, p. 223-236, 1997.

WHO - World Health Organization. 2012. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr/> >. Acesso em: 20/12/2012.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MULLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 56, n. 9, p. 1257-72, 2004.

WONG, H. L. et al. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, n. 6, p. 491-504, 2007.

YANG, Q.; SAKURAI, T.; KAKUDO, K. Retinoid, retinoic acid receptor beta and breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 76, n. 2, p. 167-73, 2002.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2005.

ZARA, G. P. et al. Pharmacokinetics of doxorubicin incorporated in solid lipid nanospheres (SLN). **Pharmacol Res**, v. 40, n. 3, p. 281-6, 1999.

ZHU, W. Y. et al. Retinoic acid inhibition of cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. **Exp Cell Res**, v. 234, n. 2, p. 293-9, 1997.

ZUSI, F. C.; LORENZI, M. V.; VIVAT-HANNAH, V. Selective retinoids and rexinoids in cancer therapy and chemoprevention. **Drug Discov Today**, v. 7, n. 23, p. 1165-74, 2002.

ANEXOS

25/10/2012 014120002563
 15:41 DEMG


BR 10 2012 027363 2

Espaço reservado ao protocolo

Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

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

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: PATENTE DE INVENÇÃO

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

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO RETINÓIDES ASSOCIADOS À AMINA HIDROFÍLICA OU LIPOFÍLICA COM ATIVIDADE ANTITUMORAL E PROCESSO DE PREPARAÇÃO

 continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão:** do pedido N° Data de Depósito:

5. **Prioridade:** interna unionista

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

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: LUCAS ANTÔNIO MIRANDA FERREIRA
 6.2 Qualificação: PROFESSOR 6.3 CPF: 370.834.226-72
 6.4 Endereço completo: RUA FABIO COURI, 34, APTO. 201, BAIRRO LUXEMBURGO, BELO HORIZONTE, MG
 6.5 CEP: 30.380-560 6.6 Telefone: 31 - 3409-4774 6.7 Fax: 31 - 3409-6430
 6.8 E-Mail: patentes@ctit.ufmg.br

 continua em folha anexa


7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de seqüências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).

Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.

Listagem de seqüências em formato impresso: fls.

Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	01 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	16 fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	12 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	02 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	01 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) Anexo de Depositantes, Anexo de Inventores, Portaria.				04 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 36 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Belo Horizonte, 25/10/2012

Local e Data



Assinatura e Carimbo

Prof. Renato de Lima Santos
Pró-Reitor de Pesquisa / UFMG
Delegação de Competência
Portaria nº 042 / 2010

ANEXO DE DEPOSITANTES

Título: COMPOSIÇÃO FARMACÉUTICA DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS
CONTENDO RETINÓIDES ASSOCIADAS À AMINA HIDROFÍLICA OU LIPOFÍLICA...

Página 1

Nome: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

Qualificação: Fundação

CNPJ / CPF / Número INPI: 21949888000183

Endereço Completo: Rua Raul Pompéia, 101, 11º andar, Bairro São Pedro, Belo Horizonte - MG

CEP: 30.330-080

Telefone: (31) 3409-4774

FAX: (31) 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

2

Sci

MI
O
PA

P

ni

P

V

ANEXO DE INVENTORES

Título: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS
CONTENDO RETINÓIDES ASSOCIADAS À AMINA HIDROFÍLICA OU LIPOFÍLICA...

Página 1

Nome: GUILHERME CARNEIRO

Qualificação: FARMACÊUTICO

CPF: 051.219.856-06

Endereço Completo: RUA BOAVENTURA, 771, BLOCO H, APTO. 402, BAIRRO LIBERDADE, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 31.270-020

Telefone: 31 - 3409-4774

FAX: 31 - 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

Nome: ALFREDO MIRANDA DE GOES

Qualificação: PROFESSOR

CPF: 084.342.205-04

Endereço Completo: RUA ESTADOS UNIDOS, 215, BAIRRO JARDIM COPACABANA, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 31.550-430

Telefone: 31 - 3409-4774

FAX: 31 - 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

Nome: ELAINE MARIA DE SOUZA FAGUNDES

Qualificação: PROFESSORA

CPF: 572.064.906-97

Endereço Completo: RUA ÉZIO MARIO TERENCEZI, 120, APTO. 101, BAIRRO MINASLANDIA, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 31.812-080

Telefone: 31 - 3409-4774

FAX: 31 - 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

Nome: NATÁSSIA CAROLINE RESENDE CORRÊA

Qualificação: BIÓLOGA

CPF: 068.024.026-88

Endereço Completo: AV. ALEXANDRE RIBEIRO GUIMARÃES, 533, APTO. 101, BAIRRO SARAIVA, UBERLÂNDIA, MG

CEP: 38.408-050

Telefone: 31 - 3409-4774

FAX: 31 - 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

Nome: ELTON LUIZ SILVA

Qualificação: FARMACÊUTICO

CPF: 012.704.046-36

Endereço Completo: RUA SÃO JOAQUIM, 471, APTO. 101, BAIRRO SAGRADA FAMILIA, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 31.035-470

Telefone: 31 - 3409-4774

FAX: 31 - 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA - UFMG



ANEXO DE INVENTORES

**Título: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS
CONTENDO RETINÓIDES ASSOCIADAS À AMINA HIDROFÍLICA OU LIPOFÍLICA...**

Página 2

Nome: MÔNICA CRISTINA DE OLIVEIRA

Qualificação: PROFESSORA

CPF: 649.058.616-91

Endereço Completo: RUA JOSÉ MENDES DE CARVALHO, 257, APTO. 102, BAIRRO CASTELO, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 30.840-350

Telefone: 31 - 3409-4774

FAX: 31 - 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br



Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and anticancer activity of all-trans retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles

Guilherme Carneiro¹
Elton Luiz Silva¹
Layssa Alves Pacheco¹
Elaine Maria de Souza-Fagundes²
Natássia Caroline Resende Corrêa³
Alfredo Miranda de Goes³
Mônica Cristina de Oliveira¹
Lucas Antônio Miranda Ferreira¹

¹Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ²Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ³Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Correspondence: Lucas Antônio Miranda Ferreira
Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Av Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Tel +55 31 3409 6939
Fax +55 31 3409 6830
Email lucas@farmacia.ufmg.br

Abstract: This work aims to develop solid lipid nanoparticles (SLNs) loaded with retinoic acid (RA) to evaluate the influence of two lipophilic amines, stearylamine (SA) and benethamine (BA), and one hydrophilic, triethylamine (TA), on drug-encapsulation efficiency (EE) and cytotoxicity in cancer cell lines. The SLNs were characterized for EE, size, and zeta potential. The mean particle size decreased from 155 ± 1 nm (SLNs without amine) to 104 ± 4 , 95 ± 1 , and 96 ± 1 nm for SLNs prepared with SA, BA, and TA, respectively. SA-RA-loaded SLNs resulted in positively charged particles, whereas those with TA and BA were negatively charged. The EEs were significantly improved with the addition of the amines, and they increased from $36\% \pm 6\%$ (without amine) to $97\% \pm 2\%$, $90\% \pm 2\%$, and $100\% \pm 1\%$ for SA, TA, and BA, respectively. However, stability studies showed higher EE for BA-RA-loaded SLNs than TA-RA-loaded SLNs after 30 days. The formulations containing SA loaded or unloaded (blank SLNs) with RA were cytotoxic in normal and cancer cell lines. In contrast, the blank SLNs containing TA or BA did not show cytotoxicity in human breast adenocarcinoma cells (MCF-7), while RA-loaded SLNs with the respective amines were significantly more cytotoxic than free RA. Furthermore, the cytotoxicity of BA-RA-loaded SLNs was significantly higher than TA-RA-loaded SLNs. These findings are in agreement with the data obtained in the evaluation of subdiploid DNA content and cell-cycle analysis, which showed better anticancer activity for BA-RA-loaded SLNs than TA-RA-loaded SLNs and free RA. Taken together, these findings suggest that the BA-RA-loaded SLN formulation is a promising alternative for the intravenous administration of RA in the treatment of cancer.

Keywords: solid lipid nanoparticles, all-trans retinoic acid, cancer, treatment, antitumor activity, ion pairing

Introduction

Vitamin A and its derivatives have the ability to reduce tumor growth and to induce apoptosis and differentiation in several types of cancer. In particular, all-trans retinoic acid (RA) has been studied for the treatment of cancer, including leukemia and breast cancer. The action of RA is attributed to its binding to the nuclear receptors, retinoic acid receptors, and retinoid X receptors, which regulate a variety of genes. RA can generally block the cell cycle in the G1 phase, causing cell proliferation inhibition and apoptosis.¹ The most effective clinical use of RA for human diseases was demonstrated in the treatment of acute promyelocytic leukemia.^{2,3}

In clinical trials, RA has been given to cancer patients by oral administration. However, the bioavailability of oral RA has been considered low and quite variable.⁴

Moreover, continuous treatment with oral RA has been associated with progressive reduction of plasma concentrations, potentially to levels below those required to carry out its effect, probably due to the induced cytochrome P-450-dependent metabolism of RA.⁵ Whereas these factors limit the clinical use of oral RA, an intravenous formulation could circumvent this problem.

RA, a hydrophobic drug with an octanol/water partition coefficient log of 4.6,⁶ has poor aqueous solubility, and this can be a great disadvantage for endovenous administration. Some efforts have been made to enable intravenous administration of RA using nanocarriers, and a number of previous publications demonstrated that nanoparticles loaded with RA have significant influence over cancer cell viability.⁷ In addition, lipid nanocarriers such as liposomes, nanoemulsions, and solid lipid nanoparticles (SLNs) have also been used.⁸⁻¹⁰

Among the advantages associated with SLNs are, most notably, the fact that their production is easily transposed to an industrial scale, as they do not require the use of organic solvents. In addition, compared with the nanoemulsions, which are prepared with liquid lipids, SLNs have more potential for controlled release, due to their solid matrix.¹¹⁻¹³ However, the RA encapsulation in SLNs is usually low¹⁴ unless a high surfactant/lipid ratio is used.^{15,16} This favors the drug location at the interface because of RA amphiphilicity,¹⁷ thereby reducing the benefits obtained by the encapsulation in lipid matrix (increased stability, controlled release, and targeting effect).

We previously reported that the in situ formation of an ion pairing between RA, a lipophilic acid (Figure 1A), and different amines provides an interesting alternative to increased RA encapsulation in SLNs. Among the tested amines, stearylamine (SA) (Figure 1C), a lipophilic amine, provided the highest encapsulation.^{18,19} These previous investigations were performed aiming for the development and evaluation of formulations for the topical treatment of acne. We hypothesized that SLNs loaded with RA, and different

amines could be an interesting alternative for enabling intravenous administration of RA for cancer treatment. In the present study, we aimed to develop RA-loaded SLNs for parenteral administration, evaluating the influence of three amines: two lipophilic amines (SA and benethamine [BA]) (Figure 1B) and a hydrophilic one (triethylamine [TA]) (Figure 1D). The in vitro anticancer activity of SLNs loaded with RA and SA, TA, or BA was investigated against different cancer cell lines.

Materials and methods

Materials

Retinoic acid (RA), Compritol® 888 ATO (glyceryl behenate, mixture of mono-, di-, and triacylglycerols of behenic acid [C₂₂]) and Super Refined Tween 80™ (Polysorbate 80) were kindly provided by Basf (Ludwigshafen, Germany), Gattefossé (Lyon, France), and Croda Inc (Edison, NJ, USA), respectively. SA (octadecylamine), cholesterol, TA, and BA were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

For in vitro studies, the Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 was obtained from Sigma-Aldrich; Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), and staurosporine were purchased from Gibco (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

The following cancer cell lines were used: Jurkat (immortalized line of T lymphocyte) was provided by Gustavo Amarante-Mendes (São Paulo University, São Paulo, Brazil). HCT-116 (colorectal carcinoma) and MCF-7 (human breast adenocarcinoma) cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). All other chemicals were of analytical grade.

Preparation of SLNs

SLNs were prepared by the hot melting homogenization method using an emulsification-ultrasound.¹⁹ The

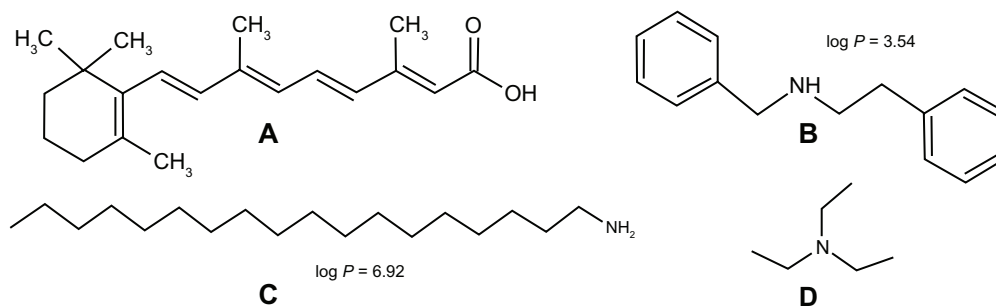


Figure 1 Chemical structure of RA (A), benethamine (B), stearylamine (C), and triethylamine (D).
Abbreviation: RA, all-trans retinoic acid.

composition of the SLNs has previously been described, but with some modifications.¹⁹ Considering the intended use of SLNs (intravenous administration), Tween 80™ was selected as surfactant. Briefly (batch 20 mL), the oily phase, composed of Compritol (400 mg), cholesterol (40 mg), Tween 80™ (300 mg), RA (10 mg), and the aqueous phase were heated separately to 85°C. Next, the aqueous phase was gently dropped onto the oily phase with constant agitation, at 8000 rpm in an Ultra Turrax T-25 homogenizer (Ika Labortechnik, Staufen, Germany). This emulsion was immediately submitted to the high-intensity probe sonication (20% amplitude) for 10 minutes, using a high-intensity ultrasonic processor (CPX 500 model; Cole-Palmer Instruments, East Bunker Court Vernon Hills, IL, USA). The influence of the in situ formation of an ion pairing between RA and amines was investigated. The SA or BA, and TA were selected as lipophilic and hydrophilic amines, respectively (RA/amine molar ratio was 1/2). The pH of the SLNs containing the amines was adjusted to 7.0 with a solution of 0.01 M HCl (Digimed DM 20, Santo Amaro, São Paulo, Brazil).

Particle size analysis

The mean particle diameter of SLNs in the dispersion was determined by unimodal analysis through dynamic light scattering using a Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments, Malvern, UK), at a fixed angle of 90° and at 25°C. The SLN dispersions were diluted in distilled and filtered water (cellulose ester membrane, 0.45 µM, Millipore, Billerica, MA) up to a count rate of 50 to 300 Kcps (1000 counts per second). The data reported were particle size, evaluated as the intensity obtained from three repeat measurements, and the polydispersity index.¹⁹

Zeta potential

Zeta potential measurements were carried out by the electrophoretic mobility determination at 90° and 25°C. Before the measurements, SLN dispersions were diluted in filtered 1 mM NaCl solution (cellulose ester membrane, 0.45 µM, Millipore) up to a count rate of 100 to 1000 Kcps. All measurements were performed in triplicate using a Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments).

Drug-encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency (EE) for RA in SLNs was determined according to the method previously described.¹⁹ This method was based on the determination of RA concentration in the SLNs before (total RA) and after filtration (cellulose ester membrane, 0.45 µM, Millipore). The RA crystals,

usually measuring a few micrometers across, present characteristic forms and can be easily distinguished from SLNs.¹⁴ RA concentration in the external aqueous phase of the SLNs was determined by ultrafiltration method (Amicon® 100 k, Millipore) with a 100 kDa molecular weight cutoff membrane. RA concentration in the aqueous phase was negligible, owing to its low solubility in water.¹⁵

RA concentration in SLNs (before and after filtration) or in the aqueous phase was determined according to the method described by Castro et al.¹⁸ Briefly, an aliquot of the SLN dispersion was dissolved in tetrahydrofuran and later diluted in a mixture of acetonitrile, distilled water, and phosphoric acid (80:19.9:0.1). This mixture keeps the RA in solution (dissolved), but causes lipid precipitation. This dispersion was filtered in a 0.45 µM Millex HV filter (Millipore) and analyzed by HPLC. EE was calculated using the following formula: $EE (\%) = (\text{filtered RA} / \text{total RA}) \times 100$.

To investigate the influence of the amines on stability (RA retention in lipid matrix), two SLN formulations loaded with lipophilic BA or hydrophilic TA were prepared. The two SLN formulations were injected into 10 mL glass containers within a nitrogen atmosphere and were stored at 4°C. Sampling aliquots were withdrawn at 30 days, and the EE was determined as previously described.

High performance liquid chromatography (HPLC) consisted of a Waters 515 HPLC Pump (Milford, MA), a Waters 717 Plus Auto-sampler, and a photodiode array detector (Waters 2996). A C₁₈ reverse-phase column (125 mm of length, 4 mm of width, and particles of 5 µm) (LichroCart 125-4, Merck, Darmstadt, Germany) was used. The mobile phase was a mixture of acetonitrile, distilled water, and phosphoric acid (80:19.9:0.1). The detection was carried out at 340 nm, with a flow rate of 1.0 mL/minute and 20 µL of sample. The five-point (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, and 5.0 µg/mL) linear regression analysis resulted in the following linear equation: $y = -2435 + 137200 \times (r = 0.9998)$.

Cell cultures

Cell viability studies were conducted against both normal and cancer cells. Cancer cell lines (Jurkat, HL-60, HCT-116, and MCF-7) were cultured in RPMI or Dulbecco's modified Eagle's medium containing fetal bovine serum (10%), 200 mM glutamine, and antibiotics (100 µg/mL streptomycin and 100 UI/mL penicillin). All cultures were kept in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C. Normal cells (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) were obtained through agreement with the Minas Gerais Hematology and Hemotherapy Center Foundation – HEMOMINAS –

(protocol n° 105/2004) from healthy adult volunteers of both sexes by centrifugation of heparinized venous blood over a Ficoll cushion. PBMCs were collected from the interphase after Ficoll separation and washed three times in RPMI before further processing.²⁰ All PBMC cultures were carried out in RPMI medium, supplemented with 5% (v/v) heat-inactivated, pooled AB sera, and 2 mM L-glutamine. An antibiotic/antimicotic solution containing 1000 U/mL penicillin, 1000 µg/mL streptomycin, and 25 µg/mL fungizone was added to control fungal and bacterial contamination.

Analysis of cell viability

Cell proliferation was measured by MTT assay based on the reduction of tetrazolium salt to formazan crystals by living cells.²¹ Briefly, aliquots containing 7.0×10^3 (MCF-7), 9×10^3 (HL60), 1.8×10^4 (Jurkat and HCT-116), or 3.6×10^4 (PBMC) cells/well were seeded into 96-well plates. After 24 hours of incubation at 37°C and 5% CO₂, freshly prepared solutions of free RA and SLNs were added to the wells (RA concentration ranged from 0.78 µM to 100 µM). Free RA was dissolved in absolute ethanol (4 mM) prior to dilution. After 48 hours of incubation at 37°C and 5% CO₂, 20 µL of the 5 mg/mL MTT solution was added to each plate. Plates were incubated at 37°C for 4 hours, and then the medium was replaced by 200 µL of 0.04 M HCl solution in isopropanol. Cell viability was estimated by measuring the rate of mitochondrial reduction of MTT, determined by evaluating the absorbance of the converted dye at a wavelength of 595 nm. Absorbance values of the wells in which the cells were maintained in medium alone were considered as 100% of cell viability. Control groups included treatment with ethanol (negative control) and staurosporine (positive control). Cell viability was found to be 100% after treatment with negative control (ethanol), while staurosporine was effective in promoting cell-growth inhibition. Data were expressed as percentage of cell viability compared to the control (mean ± standard deviation [SD]). At least three independent experiments were performed.

Subdiploid DNA content and cell-cycle analysis

A flow-cytometric DNA fragmentation assay was employed as a quantitative measure of subdiploid content and phases of the cell cycle.²² MCF-7 cells were plated at a density of 5×10^4 cells/well on 24-well plates and treated with free RA, RA-loaded SLNs, or blank SLNs for 48 hours (RA concentration was 25 µM). After this time, cells were centrifuged at 200 g (gravities) for 5 minutes at room temperature, and

the culture medium was aspirated off. The pellet was gently resuspended in 300 µL of hypotonic fluorochrome solution containing 0.5% Triton X-100 and 50 µg/mL propidium iodide. Cells were incubated in the dark at 4°C for 4 hours and analyzed with a Guava® EasyCyte™ 6-2L Base System cytometer (Millipore). Data analysis was performed with FlowJo™ 7.6.5 (Tree Star Inc, Ashland, OR, USA), to determine percentages of subdiploid content and phases of the cell cycle.

Data analysis

Analysis of the cytotoxicity and cell-cycle studies were carried out using one-way ANOVA followed by Tukey's test. For all analyses, the difference was considered significant when the *P* value was <0.05.

Results

Preparation and characterization of SLNs

The main characteristics of RA-loaded SLNs prepared with lipophilic (SA or BA) and hydrophilic (TA) amines are listed in Table 1. The mean particle size decreased from 155 ± 1 nm (SLNs without amine) to 104 ± 4 nm and 95 ± 1 for SLNs loaded with SA and BA lipophilic amines, respectively. Negatively charged particles were obtained for SLNs without amine (-30 ± 1 mV) and SLNs loaded with BA (zeta potential of -39 ± 0.2 mV). In contrast, using SA resulted in positively charged particles with a zeta potential of 20 ± 2 mV. These differences in particle charge can be explained by the fact that SA presents a higher potential for interfacial adsorption, in comparison to BA. In fact, the lipophilicity of SA is higher than that of BA (Figure 1). It is noteworthy that EE for RA in SLNs increased from $36\% \pm 6\%$ (SLNs without amine) to $97\% \pm 2\%$ and $100\% \pm 1\%$ for SLNs loaded with SA and BA, respectively. Therefore, SA and BA promoted a significant increase of EE for RA in SLNs. A plausible explanation for the EE increase could be the formation of an ion pairing between RA and the lipophilic amines.

Table 1 Influence of the amine type on the particle size, polydispersion index, zeta potential and EE of RA in SLNs

Parameter	Without amine	SA	TA	BA
Mean diameter (nm)	155 ± 1	104 ± 4	96 ± 1	95 ± 1
Polydispersion index	0.24 ± 0	0.24 ± 0	0.3 ± 0.1	0.24 ± 0.01
Zeta potential (mV)	-30 ± 4	20 ± 2	-33 ± 4	-39 ± 0.2
EE (%)	36 ± 6	97 ± 2	90 ± 2	100 ± 1

Note: Data are shown as mean ± SD (n = 3).

Abbreviations: BA, benethamine; EE, encapsulation efficiency; RA, all-trans retinoic acid; SLN, solid lipid nanoparticle; SA, stearylamine; SD, standard abbreviation; TA, triethylamine.

The ion pairing increases the lipophilic properties of the drug, making its incorporation into the lipid matrix easier. These findings are in agreement with previous observations that showed that the loading capacity in SLNs is related to drug lipophilicity.^{23,24}

For the SLNs prepared with TA, a reduction in the particle diameter to 96 ± 1 nm was also observed. These SLNs were negatively charged (zeta potential of -33 ± 4 mV), and this can be explained by the fact that interfacial adsorption of hydrophilic TA is unlikely. TA also promoted a significant increase in EE for RA in SLNs ($90\% \pm 2\%$), when compared with SLNs without amine (Table 1). However, as shown in Figure 2, after 30 days of storage at 4°C , a dramatic decrease in EE for RA in RA-TA-loaded-SLNs was observed (from $90\% \pm 2\%$ to $27\% \pm 0.1\%$). In significant contrast, the EE for BA-loaded SLNs was high immediately after preparation and remained constant after 30 days ($98\% \pm 2\%$). These findings are in agreement with our previous data, which showed that it was possible to produce RA-loaded SLNs with high EE and stability by employing RA-amine ion pairing. Increasing the lipophilicity of the amine increases the drug-loading capacity in SLNs due to the increase in lipophilicity of the ion pair formed.¹⁹

Cell viability studies

To investigate whether cytotoxicity of RA was affected by loading in SLNs containing amines, the cell viability assay using MTT was investigated in cancer and normal cells. First, the cell viability of SLNs loaded with lipophilic SA was assayed. Normal and human cancer cells were incubated with

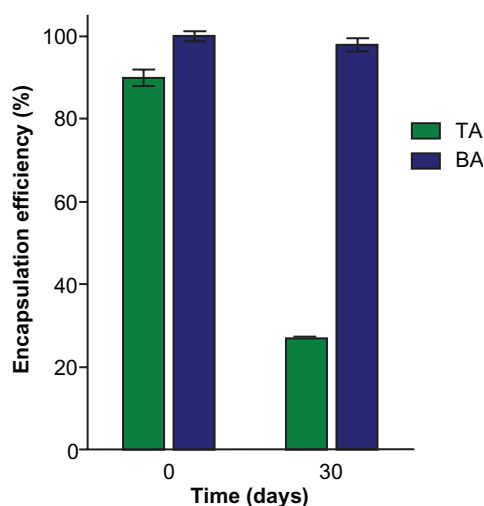


Figure 2 Stability of encapsulation efficiency (EE) of RA in SLNs prepared with triethylamine (TA) or benethamine (BA).

Note: Data represent mean \pm SD ($n = 3$).

Abbreviations: RA, all-trans retinoic acid; SD, standard deviation; SLN, solid lipid nanoparticle.

free RA, unloaded (blank) SLNs, or RA-SA-loaded SLNs and analyzed for their viability. The data obtained, expressed as cell viability (percentage), are shown in Figure 3. The lowest antitumor activity was observed for the free RA (cell viability was approximately 80%), independent of the cell lines evaluated. MCF-7 cells were more sensitive to free RA, while the Jurkat and HCT-116 cells were the least sensitive. In contrast, the activity of SA-RA-loaded SLNs was much higher than that observed for the free RA, with MCF-7 cells showing greater sensitivity, compared with other cancer cells. However, the cytotoxic effects of unloaded (blank) SLNs against tumor cells were also high. It is interesting to note that these cytotoxic effects were also observed against normal cells (PBMCs). The cytotoxicity of the blank SLNs was attributed to the presence of the cationic lipophilic SA. In fact, blank SLNs without SA were prepared and their cytotoxic effects against MCF-7 cells investigated. These effects had disappeared completely (data not shown). Considering that the MCF-7 cells were more sensitive to RA, these cells were selected for further studies.

To investigate whether SLNs loaded with hydrophilic TA or lipophilic BA, which were used as amines for the in situ formation of an ion pairing with RA, would show the same pattern of activity, MCF-7 cancer cells were incubated with unloaded (blank) SLNs, RA-TA-loaded SLNs, RA-BA-loaded SLNs, or free RA and analyzed for their metabolic viability. The data obtained, expressed as percentage of MTT metabolism, are shown in Figure 4. Interestingly, blank SLNs loaded with TA or BA showed no inhibitory effect, with cell viability near 100%. These data demonstrate that blank SLNs loaded with TA or BA present negligible cytotoxicity, when compared with the blank SLNs loaded with SA, and they are a potential new alternative for development of formulations for intravenous administration of RA. In addition, RA-loaded SLNs containing BA or TA presented cytotoxic effects significantly higher than those observed for the free RA in all drug concentrations tested; a dose-dependent relationship between drug concentration and cell viability was clearly observed. The maximum reductions in cell viability for RA-TA-loaded SLNs, RA-BA-loaded SLNs, and free RA, observed at the concentration $100 \mu\text{M}$, were $45\% \pm 5\%$, $34\% \pm 4\%$, and $71\% \pm 2\%$, respectively. The differences between BA-loaded SLNs and TA-loaded SLNs were significant.

Subdiploid DNA content and cell-cycle analysis

In order to determine whether the improvement of the cytotoxic activity of RA after incorporation into BA-

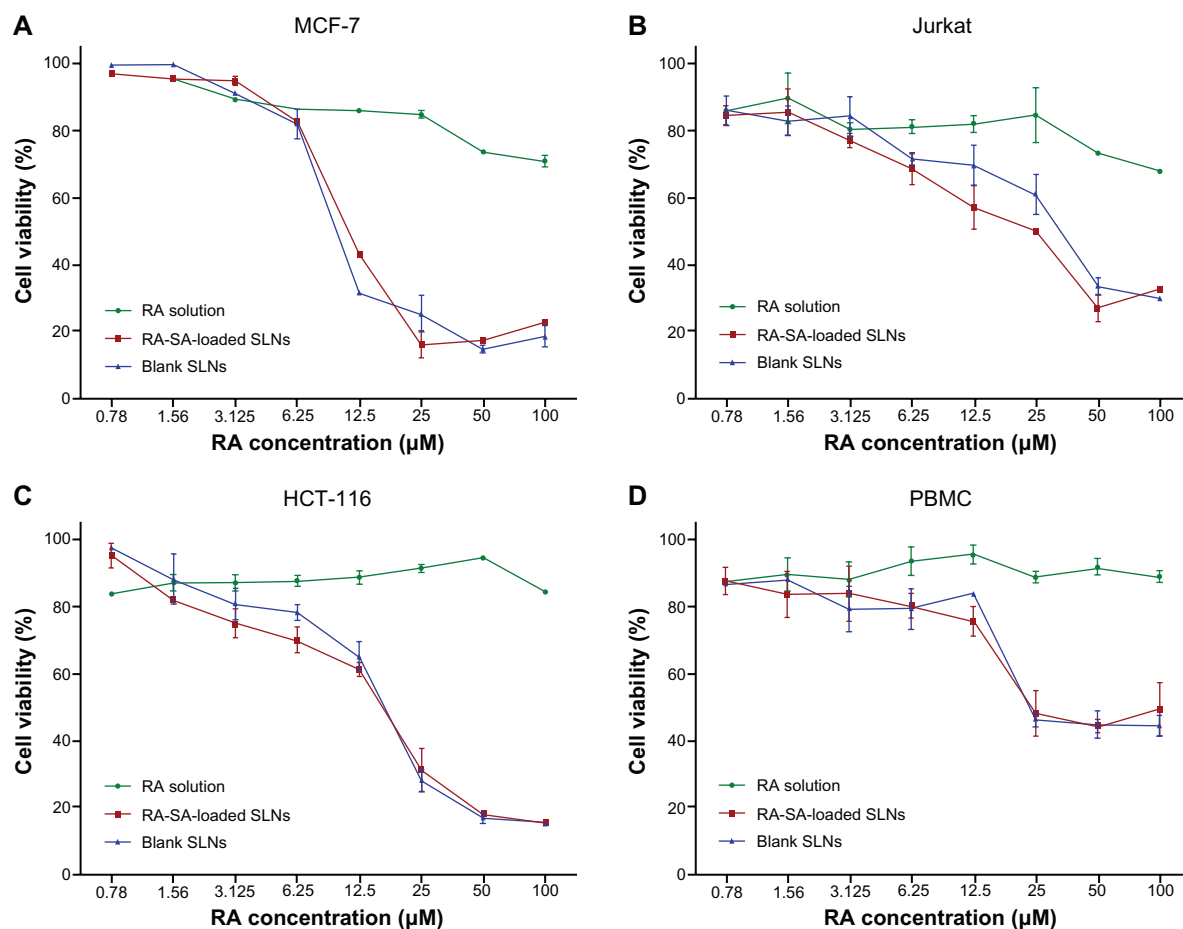


Figure 3 Cell viability studies, as evaluated by MTT assay, of blank SLNs, RA-SA-loaded SLNs, and free RA in cancer and normal cells, MCF-7 (A), Jurkat (B), HCT-116 (C), and PBMCs (D), after 48 hours of exposure.

Notes: Data were expressed as mean \pm SD of three independent experiments. The blank SLNs were diluted at the same proportion as RA-loaded SLNs.

Abbreviations: MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; RA, all-trans retinoic acid; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; SA, stearylamine; SD, standard deviation; SLN, solid lipid nanoparticle.

loaded SLNs was associated with alterations in cell-cycle progression and DNA fragmentation, we performed flow cytometry studies. We used the protocol described by Riccardi and Nicoletti,²² that is based on the principle that apoptotic cells, among other typical features, are characterized by DNA fragmentation and, consequently, loss of nuclear DNA content. The use of a fluorochrome, such as propidium iodide, that is capable of binding and labeling DNA makes it possible to obtain a rapid and precise evaluation of cellular DNA content by flow-cytometric analysis and subsequent identification of hypodiploid cells. Representative histograms of DNA content after PI staining are shown in Figure 5. The data are summarized in Table 2. The increase in subdiploid DNA content was negligible for the treatment with RA-TA-loaded SLNs ($0.5\% \pm 0.20\%$) and free RA ($0.4\% \pm 0.05\%$), when compared with the control. After 48 hours of treatment, the subdiploid DNA content for RA-BA-loaded SLNs ($6.1\% \pm 0.65\%$) was significantly

increased, inducing DNA fragmentation 12 and 17 times higher than that observed for the RA-TA-loaded SLNs and free RA, respectively. Blank SLNs (with TA or BA) showed no significant increase in subdiploid content in comparison with the control. These data suggest that BA-containing SLNs show more advantages as carriers of RA than the TA-loaded SLNs, as observed in the improvement of their cytotoxic effects.

Data concerning the cell-cycle stage distribution clearly showed a significant increase in the G_0/G_1 phase after treatment with RA-loaded SLNs ($73.0\% \pm 0.5\%$ and $74\% \pm 0.6\%$ for SLNs with TA and BA, respectively), when compared with the control ($60.5\% \pm 1.0\%$). This increase was higher than that observed for the treatment with free RA ($70.6\% \pm 0.5\%$). Also, the frequency of MCF-7 cells in the S-phase range of DNA content decreased. This reduction was more evident in SLNs with BA ($8\% \pm 0.3\%$) than in SLNs with TA ($12.4\% \pm 0.6\%$), when compared with the

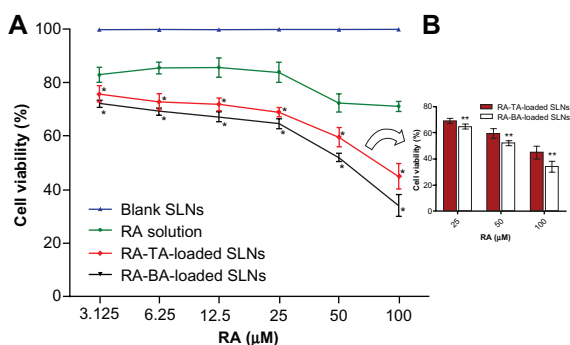


Figure 4 Cell viability studies, as evaluated by MTT assay, of blank SLNs, RA-TA-loaded SLNs, RA-BA-loaded SLNs and free RA in MCF-7 cells after 48-hour exposure.

Notes: Data were expressed as mean \pm SD of three independent experiments. The data for blank SLNs, which were diluted at the same proportion as RA-loaded SLNs, represent overlapping values for TA-based SLNs and BA-based SLNs. *Significant difference compared to free RA; ^bsignificant difference between TA-based SLNs and BA-based SLNs.

Abbreviations: MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide; BA, benethamine; RA, all-trans retinoic acid; SLN, solid lipid nanoparticle; TA, triethylamine.

control ($14.8\% \pm 0.7\%$). Free RA also showed a significant decrease in the S-phase ($10.8\% \pm 0.1\%$), which was revealed to be lower than that observed for the treatment with RA-BA-loaded SLNs. These findings are in agreement with previous observations that showed that RA treatment of MCF-7 cells induces G1 arrest before inducing apoptosis.^{24,25}

Discussion

SLNs have gained attention as particulate systems that improve the delivery of lipophilic drugs, such as RA, due to the high affinity of these molecules for the lipid matrix.^{11,12} However, unexpectedly, the EE for RA in SLNs is usually low, and the in situ formation of an ion pairing between RA and an amine provides an interesting alternative to enhance the drug encapsulation.¹⁹ Therefore, this work aimed to develop, characterize, and evaluate the in vitro antitumor activity of SLNs loaded with RA and different amines. Three amines were evaluated: one hydrophilic (TA) and two lipophilic amines (SA and BA).

Marked differences between formulations were observed when the data concerning the RA encapsulation in SLNs were evaluated. Our data clearly show that EEs were significantly increased in SLNs containing SA, TA, or BA, when compared with SLNs without amines. Comparing the amines, the data show that the EEs for RA in SLNs loaded with lipophilic amines (BA and SA) were higher than that observed for SLNs containing TA. In addition, the stability (drug retention) of SLNs loaded with lipophilic BA was much higher than that observed for SLNs containing TA. Although TA is considered a stronger base than BA or SA (the pK_b value for TA is lower than that for other amines), the differences in

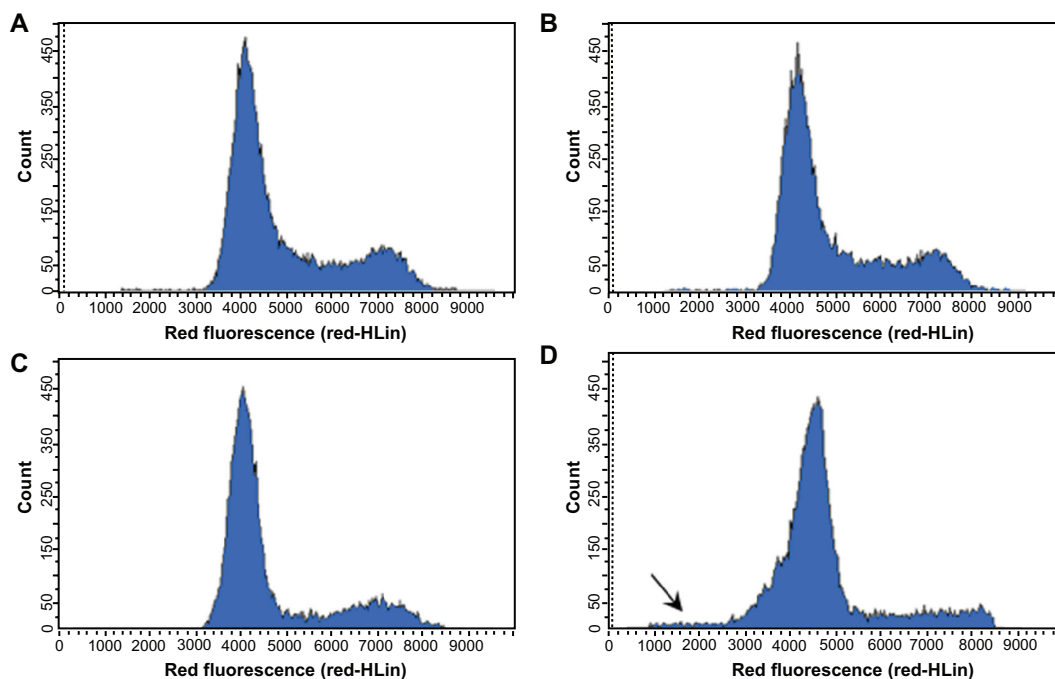


Figure 5 DNA fluorescence histograms of PI-stained MCF-7 cells after 48 hours of incubation under various experimental conditions: medium alone (A), blank SLNs (B), free RA (C), or BA-RA-loaded SLNs (D).

Notes: RA was used at 25 μ M. BA-RA-loaded SLNs induce cell-cycle arrest accompanied by reduction in the S phase in MCF-7 cells. Data from one representative experiment that represents 20,000 events (cells) are shown.

Abbreviations: BA, benethamine; PI, propidium iodide; RA, all-trans retinoic acid; SLN, solid lipid nanoparticle.

Table 2 Effects of different treatments of MCF-7 cancer cells on DNA fragmentation and cell-cycle stage distribution

Sample	Subdiploid content (%)	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
Control	0.2 ± 0.1	60.5 ± 1.0	14.8 ± 0.7	24.2 ± 0.4
Free RA	0.4 ± 0.1	70.6 ± 0.5	10.8 ± 0.1	16.2 ± 0.3
SLNs with TA				
Blank SLNs	0.4 ± 0.2	64.0 ± 0.6	16.8 ± 0.0	17.5 ± 0.7
RA-loaded SLNs	0.5 ± 0.2	73.0 ± 0.5	12.4 ± 0.6	14.1 ± 0.3
SLNs with BA				
Blank SLNs	0.7 ± 0.1	62.8 ± 0.8	17.1 ± 0.4	19.3 ± 1.0
RA-loaded SLNs	6.1 ± 0.7	73.8 ± 0.6	6.8 ± 0.2	13.3 ± 0.9

Notes: MCF-7 cells were treated with RA-loaded SLNs, free RA, and unloaded (blank) SLNs, as indicated in the methods section. Cell-cycle distributions were determined after 48 hours of treatment. The data are representative of three independent experiments. Mean ± SD is shown.

Abbreviations: BA, benethamine; RA, all-trans retinoic acid; SLN, solid lipid nanoparticle; SD, standard deviation; TA, triethylamine.

basicity among amines are relatively low. On the other hand, our data showed that RA retention in lipid matrix increases with the hydrophobicity of the counterion used for the ion pair formation, revealing that lipophilicity rather than basicity was the most relevant parameter. These findings are consistent with our previous observations, which showed that EE for RA in SLNs significantly increased when the lipophilicity of the amine increased, producing more-stable SLNs.¹⁸ These findings demonstrate that the lipophilic amine triggered an intense interaction of RA with the lipid matrix.

Cytotoxic effects against both cancer and normal cells were investigated. It was clearly observed that *in vitro* antitumor activity of RA-SA-loaded SLNs was higher than that observed for free RA. Data for free RA compare with findings previously described.^{25,26} However, cytotoxic effects for unloaded (blank) SLNs were also high against both cancer and normal cells. This phenomenon was attributed to the cationic lipid (SA), since blank SLNs without SA showed no cytotoxic effects against MCF-7 cells. These data are in agreement with previous findings, which demonstrated that cationic lipid-stabilized SLNs or liposomes show cytotoxic effects. The proposed mechanisms of the cytotoxicity are the electrostatic interactions of these cationic amphiphilic molecules, with the anionic phospholipids of the cell membrane leading to membrane damage.^{27–29}

To reduce the toxicity, SLNs loaded with TA or BA were produced and tested in MCF-7 cells. Blank SLNs, which displayed negatively charged particles, revealed no cytotoxicity against the tested cancer cells. In contrast, RA-loaded SLNs showed a remarkable increase in antitumor activity against the human breast cancer cell line MCF-7, in comparison with the free RA. The reduction in cell viability observed for BA-loaded

SLNs were significantly higher than that observed for TA-loaded SLNs, and differences between the two formulations were even more prominent when the data for subdiploid DNA content were evaluated. Furthermore, it was observed that RA-loaded SLNs were able to decrease the frequency of MCF-7 cells in the S-phase and to accumulate cells in the G₀/G₁-phases. These effects were more pronounced than those observed for free RA and are consistent with data reported previously.^{30,31}

Previous studies showed no significant increase in the anticancer activity of RA-loaded lipid nanocarriers when compared to free RA.^{8,32} Su and colleagues³³ showed that the cytotoxicity of RA-loaded tributyrin nanoemulsion against hepatic or colonic cancer cells was higher than that of free RA. However, the combination of RA with tributyrin, a prodrug of butyric acid, was reported to have synergistic anticancer effects.^{34,35} Therefore, it is difficult to separate the effects of the combination of RA and tributyrin from those of drug encapsulation.

The present study reported for the first time a remarkable increase in anticancer activity of RA-BA-loaded SLNs in comparison with free RA. The *in situ* formation of an ion pairing between RA and BA favors drug retention in lipid matrix. After dilution of the nanoparticles in the culture medium, two opposing scenarios can occur: RA may be released (bound or not to the amine) or remain associated with the SLNs. If RA is released from SLNs as an ion pair, reverse ion exchange can occur, with ions from the culture medium substituting the counterions (amines), resulting in the reformation of the parent drug.³⁶ In this case, it would be expected that the activity of the SLNs was similar to that observed for the free RA. Considering that our data showed a higher activity for the SLNs, the most probable hypothesis is that RA remained associated with the lipid matrix of the SLNs after dilution in the medium, enabling improved drug uptake by the tumor cells.³⁷ Previous studies have reported enhanced – despite negatively charged particles – intracellular levels of anticancer drugs loaded in SLNs.³⁸

Finally, studies have pointed out the important role RA plays in the control of metabolic diseases such as diabetes and obesity through its activation of the retinoid X receptor and its heterodimers pathways. Treatment with RA can reduce body weight and adiposity, and enhance glucose tolerance and insulin sensitivity.^{39,40} To improve bioavailability, RA has been administered orally as an emulsion and subcutaneously as an oily solution. For novel formulations, the ion pair formation in SLNs can be explored as a strategy to improve the efficacy and bioavailability of RA in the treatment of obesity and diabetes.

Conclusion

In summary, an SLN formulation loaded with RA, a lipophilic acid, and a lipophilic amine (BA) was designed and evaluated. It was possible to obtain high encapsulation efficiency (almost 100%) for RA in SLNs. Moreover, RA-BA-loaded SLNs promoted enhanced in vitro antitumor activity when compared to the free RA and other SLN formulations. These findings suggest that the RA-BA-loaded SLN formulation is a promising alternative for the administration of RA in the treatment of cancer.

Acknowledgments

This study was supported by the Minas Gerais State Agency for Research and Development (FAPEMIG, Brazil) and by the Brazilian agencies CAPES and CNPq. The authors wish to thank Glenn Hawes from the American Language Program of the University of Georgia for editing this manuscript.

Disclosure

The authors state no conflict of interest and have received no payment in preparation of this manuscript. All authors have approved the final article.

References

- Tang XH, Gudas LJ. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:345–364.
- Niles RM. Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutat Res.* 2004;555(1–2):81–96.
- Bushue N, Wan YJ. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(13):1285–1298.
- Adamson PC, Pitot HC, Balis FM, Rubin J, Murphy RF, Poplack DG. Variability in the oral bioavailability of all-trans-retinoic acid. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(12):993–996.
- Muindi JR, Frankel SR, Huselton C, et al. Clinical pharmacology of oral all-trans retinoic acid in patients with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Res.* 1992;52(8):2138–2142.
- Abdulmajed K, Heard CM. Topical delivery of retinyl ascorbate co-drug. 1. Synthesis, penetration into and permeation across human skin. *Int J Pharm.* 2004;280(1–2):113–124.
- Chung KD, Jeong YI, Chung CW, Kim do H, Kang DH. Anti-tumor activity of all-trans retinoic acid-incorporated glycol chitosan nanoparticles against HuCC-T1 human cholangiocarcinoma cells. *Int J Pharm.* 2012;422(1–2):454–461.
- Lim SJ, Lee MK, Kim CK. Altered chemical and biological activities of all-trans retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticle powders. *J Control Release.* 2004;100(1):53–61.
- Chansri N, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Inhibition of liver metastasis by all-trans retinoic acid incorporated into O/W emulsions in mice. *Int J Pharm.* 2006;321(1–2):42–49.
- Kawakami S, Suzuki S, Yamashita F, Hashida M. Induction of apoptosis in A549 human lung cancer cells by all-trans retinoic acid incorporated in DOTAP/cholesterol liposomes. *J Control Release.* 2006;110(3):514–521.
- Muller RH, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000;50(1):161–177.
- Jenning V, Lippacher A, Gohla SH. Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization. *J Microencapsul.* 2002;19(1):1–10.
- Joshi MD, Muller RH. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;71(2):161–172.
- Jenning V, Gohla SH. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *J Microencapsul.* 2001;18(2):149–158.
- Lim SJ, Kim CK. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. *Int J Pharm.* 2002;243(1–2):135–146.
- Hu L, Tang X, Cui F. Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *J Pharm Pharmacol.* 2004;56(12):1527–1535.
- Kayali I, Ward AJ, Suhery T, Friberg SE, Simion A, Rhein LD. Interactions of retinoic acid with a model of stratum corneum lipids. *J Dermatol Clin Eval Soc.* 1991;2:7–17.
- Castro GA, Orefice RL, Vilela JM, Andrade MS, Ferreira LA. Development of a new solid lipid nanoparticle formulation containing retinoic acid for topical treatment of acne. *J Microencapsul.* 2007;24(5):395–407.
- Castro GA, Coelho AL, Oliveira CA, Mahecha GA, Orefice RL, Ferreira LA. Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 2009;381(1):77–83.
- Souza-Fagundes EM, Queiroz AB, Martins Filho OA, et al. Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(8):1207–1212.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1–2):55–63.
- Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1458–1461.
- Munster U, Nakamura C, Haberland A, et al. RU 58841-myristate – prodrug development for topical treatment of acne and androgenetic alopecia. *Pharmazie.* 2005;60(1):8–12.
- Schafer-Korting M, Mehnert W, Korting HC. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(6):427–443.
- Fanjul AN, Bouterfa H, Dawson M, Pfahl M. Potential role for retinoic acid receptor-gamma in the inhibition of breast cancer cells by selective retinoids and interferons. *Cancer Res.* 1996;56(7):1571–1577.
- Hong TK, Lee-Kim YC. Effects of retinoic acid isomers on apoptosis and enzymatic antioxidant system in human breast cancer cells. *Nutr Res Pract.* 2009;3(2):77–83.
- Roberts WR, Addy M. Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetyl pyridinium chloride and hexetidine. Relevance to mode of action. *J Clin Periodontol.* 1981;8(4):295–310.
- Lappalainen K, Jaaskelainen I, Syrjanen K, Urtti A, Syrjanen S. Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharm Res.* 1994;11(8):1127–1131.
- Scholer N, Olbrich C, Tabatt K, Muller RH, Hahn H, Liesenfeld O. Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. *Int J Pharm.* 2001;221(1–2):57–67.
- Zhu WY, Jones CS, Kiss A, Matsukuma K, Amin S, De Luca LM. Retinoic acid inhibition of cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 1997;234(2):293–299.
- Mangiarotti R, Danova M, Alberici R, Pellicciari C. All-trans retinoic acid (ATRA)-induced apoptosis is preceded by G1 arrest in human MCF-7 breast cancer cells. *Br J Cancer.* 1998;77(2):186–191.
- Hwang SR, Lim SJ, Park JS, Kim CK. Phospholipid-based microemulsion formulation of all-trans-retinoic acid for parenteral administration. *Int J Pharm.* 2004;276(1–2):175–183.

33. Su J, Zhang N, Ho PC. Evaluation of the pharmacokinetics of all-trans-retinoic acid (ATRA) in Wistar rats after intravenous administration of ATRA loaded into tributyrin submicron emulsion and its cellular activity on caco-2 and HepG2 cell lines. *J Pharm Sci.* 2008;97(7):2844–2853.
34. Chen ZX, Breitman TR. Tributyrin: a prodrug of butyric acid for potential clinical application in differentiation therapy. *Cancer Res.* 1994;54(13):3494–3499.
35. Giermasz A, Nowis D, Jalili A, et al. Antitumor activity of tributyrin in murine melanoma model. *Cancer Lett.* 2001;164(2):143–148.
36. Lengsfeld CS, Pitera D, Manning M, Randolph TW. Dissolution and partitioning behavior of hydrophobic ion-paired compounds. *Pharm Res.* 2002;19(10):1572–1576.
37. Martins S, Costa-Lima S, Carneiro T, Cordeiro-da-Silva A, Souto EB, Ferreira DC. Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Int J Pharm.* 2012;430(1–2):216–227.
38. Serpe L, Catalano MG, Cavalli R, et al. Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58(3):673–680.
39. Altucci L, Leibowitz MD, Ogilvie KM, de Lera AR, Gronemeyer H. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(10):793–810.
40. Bonet ML, Ribot J, Palou A. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(1):177–189.

International Journal of Nanomedicine

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

Dovepress

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.