

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

CAROLINE MARI RAMOS ODA

**DESENVOLVIMENTO DE MICELAS POLIMÉRICAS CARREADORAS
DE PACLITAXEL RADIOMARCADAS COM TECNÉCIO-99m PARA
APLICAÇÃO NO TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO DE CÂNCER**

**Belo Horizonte - MG
2015**

CAROLINE MARI RAMOS ODA

**DESENVOLVIMENTO DE MICELAS POLIMÉRICAS CARREADORAS
DE PACLITAXEL RADIOMARCADAS COM TECNÉCIO-99m PARA
APLICAÇÃO NO TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO DE CÂNCER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial, para a obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Amaral Leite

Co-Orientador: Prof. Dr. André Luís Branco de Barros

**Belo Horizonte - MG
2015**

COLABORADORES

Departamento de Produtos Farmacêuticos, UFMG:

Prof. Dr. Ricardo José Alves

Prof(a). Dr(a). Mônica Cristina de Oliveira

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, UFMG:

Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG:

Prof. Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta

Departamento de Física, UFMG

Prof. Dr. Ângelo Malachias

Prof. Dr. Rogério Magalhães Paniago

Dedico este trabalho àqueles que sempre me deram todo apoio e incentivo: os meus amados pais, Betânia e Arnaldo; as minhas queridas irmãs, Dani, Tati e Lelê; o meu sempre companheiro, Fabrício, e a minha querida tia, Célia.

AGRADECIMENTOS

Sobretudo, agradeço a Deus, pois cada detalhe desse trabalho foi obra dele, cada linha escrita, cada pessoa envolvida, cada dia vivido, foram graças concedidas por Deus.

Agradeço aos meus pais, Arnaldo e Betânia, pelo amor incondicional, por me dar todo suporte e incentivo nas minhas decisões, por serem meus maiores exemplos de força, perseverança e superação. Papai e mamãe, a vocês a minha mais sincera gratidão, por tudo que vocês sempre fizeram e fazem por mim.

Às minhas irmãs, Danieli, Tatiana e Alessandra, minhas eternas amigas e companheiras, muito obrigada pelo amor, carinho e apoio.

Ao Fabrício, por estar sempre preocupado com meu bem estar e felicidade. Pelas idas à UFMG só para me buscar nas noites que tive que trabalhar até tarde e pelas vezes que teve que acordar mais cedo só pra me levar no HC pra pegar ^{99m}Tc . Obrigada por todo amor, dedicação, incentivo e, sobretudo, pela paciência e compreensão.

À minha tia Célia e sua família, por todo apoio e incentivo, por não me deixar desistir e por me dar um lar quando vim morar em BH. Serei eternamente grata a você.

Às minhas avós, pelas orações e pelo carinho.

À minha orientadora Elaine, por, mais uma vez, aceitar me orientar, com toda paciência e dedicação. Agradeço imensamente por toda a confiança, pelos ensinamentos, pela disponibilidade, pela amizade, pelo incentivo e pelo carinho. Você é um grande exemplo de profissionalismo e competência.

Ao André, meu segundo orientador, por confiar a mim este trabalho. Obrigada por estar sempre disponível, por todo apoio e dedicação, pelas palavras de incentivo, pelo carinho, pelas longas conversas e risadas, e, sobretudo, pela amizade. Admiro muito sua competência e dedicação para com tudo e com todos.

Ao prof. Ricardo, por toda prontidão, ensinamentos e contribuição na execução desse trabalho.

À prof.(a) Mônica, por ter me acolhido em sua equipe com todo carinho e amizade.

Ao prof. Gilson, pelas conversas e risadas, por toda a amizade e carinho.

Aos prof. Lucas, Gisele e Martinha, pelo suporte e simpatia.

Ao Prof. Valbert, pela contribuição com a execução deste trabalho.

Aos prof. Ângelo Malachias e Rogério Paniago, pela contribuição com as análises de SAXS.

Ao prof. Adriano M. de C. Pimenta, pela disponibilização do equipamento espectrômetro de massas.

Ao prof. Frédéric Frezard, pela disponibilização do equipamento espectrofluorímetro.

Ao Lucas Lopardi, Raquel e Daniel Santos, pela contribuição e disponibilidade com as análises de caracterização da síntese química.

À Renata, por todo companheirismo e toda a ajuda nas horas intermináveis de experimentos *in vivo*.

À Sávia, pelos ensinamentos, pela amizade e pelo cultivo das células 4T1.

À Liziane, por ser a melhor minha irmã de bancada possível. Obrigada por me acolher quando cheguei ao LTF, por sempre me ajudar quando precisei, pela paciência e por todo carinho.

À Ana, por todas as vezes que prontamente me ajudou e pela amizade.

À Nicolý, por toda a ajuda no laboratório.

A todos os amigos do LTF, Délia, Marina(s), Aina, Michele, Lizi, Ana, Renata, Pequena, Ju, Sávia, Dalila, Flávia, Marcela, Mayara, Fernanda, Nayara, Dani, Gabi, Valquíria, Daniel, Diego, Lívia, Mariana, Lorena, agradeço pelos grandes momentos de descontração e pelo apoio dentro e fora do laboratório.

Aos funcionários José Batista, Adelaide e Clarete pela simpatia e disponibilidade.

Aos meus amigos, pelos bons momentos compartilhados.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pelo apoio financeiro e pela disponibilização da sua infraestrutura para a realização de parte desse trabalho.

À CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

RESUMO

O paclitaxel (PTX) é um agente quimioterápico altamente efetivo contra vários tipos de câncer, entretanto, seu uso é limitado devido sua baixa hidrossolubilidade e elevada toxicidade sistêmica. O uso de nanocarreadores baseados em micelas poliméricas é uma alternativa promissora para contornar seus inconvenientes e ampliar o seu uso clínico. Micelas constituídas de distearoil-fosfatidiletanolamina-*N*-polietilenoglicol2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀) apresentam propriedades vantajosas para o uso no tratamento e no diagnóstico de tumores sólidos. A funcionalização dessas micelas com o radioisótopo tecnécio-99m (^{99m}Tc) complexado ao ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), possibilita a criação de uma plataforma teranóstica anticâncer. Nesse sentido, desenvolveu-se uma formulação micelar de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA (95:5) carreadora de PTX e propriedades físico-químicas tais como concentração micela crítica (CMC), diâmetro médio, potencial zeta e teor de encapsulação foram avaliadas. O complexo DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA foi sintetizado para possibilitar a radiomarcagem das micelas. As micelas radiomarcadas com ^{99m}Tc tiveram seus perfis farmacocinético e de biodistribuição avaliados em camundongos Balb/c. O sistema desenvolvido apresentou uma CMC de $1,8 \times 10^{-5}$ mol/L e um teor de encapsulação de $91 \pm 6\%$. Ambas as micelas brancas e contendo PTX apresentaram diâmetro e potencial zeta em torno de 10 nm e -3 mV, respectivamente. O complexo DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA foi sintetizado com rendimento em massa de 56%. A incorporação do mesmo nas micelas permitiu uma eficiente radiomarcagem, com rendimento de $94 \pm 2\%$ e o sistema se manteve estável em solução salina 0,9% p/v e plasma de camundongo por 8 horas, a 25 e 37 °C, respectivamente. Os estudos *in vivo* demonstraram um tempo de meia-vida de 71 minutos, com acentuada captação no fígado e no baço e com acúmulo significativo na região tumoral. Os resultados obtidos indicam que a formulação desenvolvida apresenta significativa aptidão para ser utilizada para aumentar a concentração de PTX e ^{99m}Tc em tumores sólidos, de forma a potencializar o tratamento e diagnóstico do câncer.

Palavras-chave: câncer; micelas poliméricas; DSPE-PEG; paclitaxel; radiomarcagem; teranóstico; farmacocinética; biodistribuição.

ABSTRACT

Paclitaxel (PTX) is a highly effective chemotherapeutic agent against a variety of cancers, however the use of this drug is limited due to its low aqueous solubility and high systemic toxicity. Nanocarriers based on polymeric micelles might be a promising alternative to overcome PTX's drawbacks and expand its clinical use. Micelles composed of (polyethylene glycol)2000-*N*-distearoyl phosphatidylethanolamine (DSPE-PEG₂₀₀₀) exhibit advantageous properties for application in the treatment and diagnosis of solid tumors. The functionalization of PTX-loaded micelles, with the radioisotope ^{99m}Tc complexed to diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), enables the creation of an anticancer theranostic platform. In this sense, it was developed a micellar formulation made of DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA (95:5) loading PTX, and physico-chemical and biological properties, required for treatment and diagnosis of cancer, were evaluated. The physicochemical properties evaluated were, critical micelle concentration (CMC), size, zeta potential and encapsulation efficiency. The micelles radiolabeled with ^{99m}Tc had their pharmacokinetic and biodistribution profiles evaluated after injection in Balb/c mice. The developed system had a CMC of $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ and encapsulating efficiency of $91 \pm 6\%$. Both, blank and micelles loading PTX, showed size and zeta potential around 10 nm and -3 mV, respectively. The DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA complex was successfully synthesized, with a mass yield of 56%. Radiolabeling yield was $94 \pm 2\%$, and the complex showed stable in saline and mice plasma within 8 hours, at 25 and 37 °C, respectively. *In vivo* studies showed a half-life of 71 minutes, with pronounced uptake in the liver and spleen and significant accumulation in the tumor region. The data indicated that the developed formulation shows suitable characteristics to increase the concentration of PTX and ^{99m}Tc in solid tumors, and consequently, improve cancer treatment and diagnosis.

Key-words: cancer; polymeric micelles; DSPE-PEG; paclitaxel; radiolabeling; theranostics; pharmacokinetics; biodistribution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação química do ^{99m} Tc complexado ao DTPA.	24
Figura 2 – Estrutura química do Paclitaxel.	26
Figura 3 – Esquema representativo da estrutura de um microtúbulo e da ação do PTX.	28
Figura 4 – Efeito EPR e direcionamento passivo.	32
Figura 5 – Esquema representativo de nanocarreadores funcionalizados.	33
Figura 6 – Nanocarreadores mais utilizados.	35
Figura 7 – Representação esquemática da formação de uma micela em solução aquosa. ---	36
Figura 8 – Mecanismo de direcionamento passivo de micelas poliméricas em tumores sólidos.	39
Figura 9 – Estrutura química do DSPE-PEG.	41
Figura 1.1 – Intensidade de fluorescência do pireno em função da concentração de DSPE-PEG ₂₀₀₀ para determinação da CMC.	60
Figura 1.3 – Percentual de micelas brancas em volume em função do diâmetro.	61
Figura 1.2 – Distribuição do diâmetro de micelas brancas.	61
Figura 1.4 – Avaliação da distribuição do diâmetro de micelas contendo PTX após a exposição ao processador ultrassônico.	64
Figura 1.5 - Variação das concentrações de PTX e do TE em micelas expostas ao ultrassom em diferentes tempos.	65
Figura 1.6 – Avaliação da distribuição dos diâmetros de micelas contendo diferentes concentrações de PTX.	67
Figura 1.7 – Variação do DM das micelas de DSPE-PEG ₂₀₀₀ preparadas com diferentes concentrações de PTX avaliado ao longo de 7 dias.	68
Figura 1.8 – Micelas antes e após perda de PTX.	69
Figura 1.9 – Avaliação da estabilidade do PTX no interior das micelas de DSPE-PEG ₂₀₀₀ em formulações preparadas em diferentes concentrações.	69
Figura 1.10 – Comparação da concentração de PTX encapsulada em micelas de DSPE-PEG ₂₀₀₀ no dia do preparo e após 1, 2 e 7 dias.	70
Figura 1.11 – Difractogramas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo de micelas contendo ou não PTX.	72
Figura 2.1 – Representação do mecanismo da síntese do DSPE-PEG ₂₀₀₀ -DTPA.	78
Figura 2.2 – Esquema representativo da processo utilizado para obtenção do produto DSPE-PEG ₂₀₀₀ -DTPA.	79
Figura 2.3 – Equação da reação de síntese do DSPE-PEG-DTPA.	80

Figura 2.4 – Produto de obtenção da síntese após liofilização.	84
Figura 2.5 – Espectros de absorção obtidos na região do UV para os reagentes e o produto da síntese.	85
Figura 2.6 – Espectros de absorção no IV do DTPA, DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ e DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA.	87
Figura 2.7 – Sobreposição dos espectros de massa do DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ e do produto da reação.	88
Figura 2.8 – Estudos de estabilidade de marcação de micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀: DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA em solução salina 0,9% (p/v) e em plasma de camundongo.	90
Figura 3.1 – Curva de depuração sanguínea das micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA avaliado em camundongos Balb/c sadios (n = 5).	98
Figura 3.2 – Perfil de biodistribuição das micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA em animais Balb/c sadios.	100
Figura 3.3 – Imagens cintilográficas de camundongos Balb/c sadios após administração de micelas DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA-^{99m}Tc.	100
Figura 3.4 – Perfil de biodistribuição das micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA em animais Balb/c acometidos com tumor de mama 4T1.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Técnicas de diagnóstico por imagem e suas características.	22
Tabela 2 – CMC e diâmetro de micelas de lipídico-poliméricas de diferentes composições.	41
Tabela 3 – Propriedades físico-químicas e biológicas de micelas carreadoras de PTX.	43
Tabela 1.1 – Diluições necessárias para determinação da CMC.	52
Tabela 1.2 – Determinação das intensidades de fluorescência de diferentes concentrações de DSPE-PEG₂₀₀₀.	59
Tabela 1.3 – Distribuição de diâmetros de partículas das formulações de micelas de PTX submetidas a diferentes tempos exposição ao processador ultrassônico.	63
Tabela 1.4 – Parâmetros físico-químicos obtidos para as formulações de micelas de PTX preparadas a partir de diferentes concentrações do fármaco.	66
Tabela 3.1 – Relação alvo/não-alvo entre tumor e músculo de camundongos Balb/c a partir da ROI e da %ID/g.	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

10-DABIII	10-Desacetilbacatina III
%ID/g	Percentual de dose injetada por grama
ASC	Área Sob a Curva
ATCC	<i>American Type Culture Colection</i>
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance/</i> Refletância Total Atenuada
CEBIO	Centro de Bioterismo
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Concentração Micelar Crítica
CrEL	Cremophor EL
⁶⁴ Cu	Cobre-64
DLS	<i>Dynamic Light Scattering/</i> Espalhamento Dinâmico de Luz
DM	Diâmetro Médio
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOTA	Ácido tetraazociclododecanotetraacético
DP	Desvio Padrão
DSPE-PEG ₂₀₀₀	Distearoilfosfatidiletanolamina- <i>N</i> -(polietilenoglicol)2000
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -	Distearoilfosfatidiletanolamina- <i>N</i> -(polietilenoglicol)2000 ligado ao
DTPA	ácido dietilenotriaminopentacético
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -	Distearoilfosfatidiletanolamina- <i>N</i> - Amino(polietilenoglicol)2000
NH ₂	
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention/</i> Aumento da Permeabilidade e Retenção
¹⁸ F	Fluor-18
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy/</i> Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GTP	Trifosfato de Guanosina

^{67}Ga	Gálio-67
^{131}I	Iodo-131
^{125}I	Iodo-125
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICG	<i>Indocyanine Green/</i> Indocianina verde
INCA	Instituto Nacional do Câncer
^{111}In	Índio-111
IV	Infravermelho
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MALDI – TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight/</i> Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Vôo
NIRF	<i>Near Infrared Fluorescence</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAM	Proteínas Associadas aos Microtúbulos
PCL	Poli- ϵ -Caprolactona
PDLLA	Poli ácido D,L-Lático
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenoglicol
PEG-PLA	Polietilenoglicol- <i>N</i> -ácido polilático
PTX	Paclitaxel
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
RM	Ressonância Magnética
ROI	<i>Region of Interest/</i> Região de Interesse
SAXS	<i>Small Angle X-ray Scattering/</i> Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
s-DHB	Ácido 2,5-di-hidroxibenzóico
SFB	Soro Fetal Bovino
SFM	Sistema Fagocitário Mononuclear
SnCl_2	Cloreto Estanoso
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
SPECT/CT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography/ Computed Tomography</i>
$T_{1/2}$	Tempo de meia vida

TC	Tomografia Computadorizada
Tc	Tecnécio
^{99m} Tc	Tecnécio-99 metaestável
TE	Teor de Encapsulação
TGPS	Succinato de α -Tocoferil- <i>N</i> -Polietilenoglicol1000
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Neoplasias	19
2.2 Epidemiologia do câncer	19
2.3 Diagnóstico	20
2.3.1 Tecnécio-99m	22
2.3.2 Preparo de radiofármacos com ^{99m} Tc	23
2.4 Tratamento	24
2.5 Paclitaxel	25
2.6 Sistemas nanoestruturados carreadores de fármacos na oncologia	31
2.7 Micelas	35
2.7.1 Micelas poliméricas	36
2.8 Micelas de DSPE-PEG como uma plataforma teranóstica	42
Erro! Indicador não definido.	
2 OBJETIVOS	46
2.1 Objetivo geral	46
2.2 Objetivos específicos	46
CAPÍTULO 1 – DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE MICELAS DE DSPE-PEG₂₀₀₀	48
1 INTRODUÇÃO	49
2 MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 Material	51
2.2 Métodos	51
2.2.1 Determinação da CMC	51
2.2.2 Padronização do método de preparo das micelas poliméricas	52
2.2.3 Avaliação do diâmetro	54

2.2.4	Avaliação do teor de PTX	55
2.2.5	Avaliação do Potencial zeta	56
2.2.6	Otimização da encapsulação do PTX	56
2.2.7	Avaliação de estabilidade	56
2.2.8	Análise estatística	57
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1	Determinação da concentração de DSPE-PEG ₂₀₀₀ a ser utilizada no preparo das formulações	58
3.2	Caracterização físico-química de micelas brancas de DSPE-PEG ₂₀₀₀	60
3.3	Caracterização físico-química de micelas de DSPE-PEG ₂₀₀₀ contendo PTX	62
3.4	Otimização da encapsulação do PTX	66
3.5	Avaliação da estabilidade do sistema micelar	67
3.6	Avaliação do DM por SAXS	71
4	CONCLUSÃO	73
CAPÍTULO 2 – SÍNTESE DO COMPLEXO DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA E RADIOMARCAÇÃO DE MICELAS COM ^{99m}Tc		
		74
1	INTRODUÇÃO	75
2	MATERIAL E MÉTODOS	77
2.1	Material	77
2.2	Métodos	77
2.2.1	Síntese do DSPE-PEG ₂₀₀₀ -DTPA	77
2.2.2	Caracterização química do DSPE-PEG ₂₀₀₀ -DTPA	80
2.2.3	Marcação radioquímica de micelas de DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG ₂₀₀₀ -DTPA	81
2.2.5	Análise estatística	83
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1	Síntese química do DSPE-PEG ₂₀₀₀ -DTPA	84
3.2	Caracterização química do DSPE-PEG ₂₀₀₀ -DTPA	84
3.3	Marcação radioquímica de micelas de DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG ₂₀₀₀ -DTPA	89

3.3.1	Estabilidade in vitro da radiomarcção	89
-------	---------------------------------------	----

4	CONCLUSÃO	92
---	-----------	----

**CAPÍTULO 3 – ESTUDOS IN VIVO: DEPURAÇÃO SANGUÍNEA;
BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS CINTILOGRÁFICAS EM CAMUNDONGOS**

Balb/c.		93
---------	--	----

1	INTRODUÇÃO	94
---	------------	----

2	MATERIAL E MÉTODOS	95
---	--------------------	----

2.1	Animais e cultura de células	95
-----	------------------------------	----

2.2	Métodos	95
-----	---------	----

2.2.1	Animais sadios	95
-------	----------------	----

2.2.2	Animais acometidos com tumor de mama da linhagem 4T1	96
-------	--	----

2.2.3	Análise estatística	97
-------	---------------------	----

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
---	------------------------	----

3.1	Animais sadios	98
-----	----------------	----

3.1.1	Depuração Sanguínea	98
-------	---------------------	----

3.1.2	Biodistribuição e imagens cintilográficas	99
-------	---	----

3.2	Animais acometidos com tumor de mama da linhagem 4T1	101
-----	--	-----

3.2.1	Biodistribuição e imagens cintilográficas	101
-------	---	-----

4	CONCLUSÃO	105
---	-----------	-----

3	CONCLUSÃO GERAL	106
---	-----------------	-----

4	PERSPECTIVAS	107
---	--------------	-----

	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
--	----------------------------	-----

1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado um dos maiores problemas de saúde pública no cenário mundial da saúde (INCA, 2015; JEMAL *et al.*, 2011). Sabe-se que por ser uma doença de difícil diagnóstico, o qual, frequentemente, ocorre em estágios avançados, a busca por novas alternativas de diagnóstico e tratamento tem crescido consideravelmente. Nesse sentido, o uso de sistemas nanocarreadores tem assumido um papel importante como alternativa para aumentar a entrega do agente diagnóstico e/ou fármaco a sítios específicos como tumores, favorecendo um diagnóstico precoce da doença bem como potencializando os efeitos terapêuticos dos agentes antitumorais.

O PTX tem apresentado considerável importância na terapia antitumoral uma vez que apresenta ação contra um amplo espectro de tipos de câncer (SURAPANENI *et al.*, 2012). No entanto, é um fármaco com baixa biodisponibilidade oral e baixa hidrossolubilidade o que dificulta sua administração por via parenteral (ZHANG *et al.*, 2013). A formulação comercialmente disponível, conhecida como Taxol[®], consiste na dispersão micelar do fármaco em uma mistura (1:1) de etanol e *Cremophor*[®] EL. No entanto, esses solventes são tóxicos, o que aumenta a possibilidade de efeitos adversos ao tratamento (OOSTENDORP *et al.*, 2010). A fim de contornar esses inconvenientes, novas formulações têm sido preparadas alcançando relativa redução da toxicidade e manutenção da atividade antitumoral (PILLAI, 2014; ZHANG *et al.*, 2013). Embora a viabilidade da nanomedicina para entrega PTX tenha sido provada, a questão de segurança ainda é uma preocupação principal e, portanto, a busca por novas preparações que apresentem vantagens sobre aquelas já relatadas é de extrema relevância. Entre os nanocarreadores existentes, as micelas poliméricas demonstram ser um sistema vantajoso para carrear o PTX, devido as suas características de tamanho e de estrutura, que favorecem o acúmulo no tumor por direcionamento passivo, além de permitir a modificação de sua superfície com diferentes ligantes como agentes de imagem (TORCHILIN, 2006; 2007; OERLENMANS *et al.*, 2010). Por outro lado, estudos conduzidos em nosso laboratório demonstraram a capacidade dos átomos de Tecnécio-99m (^{99m}Tc) em complexar com o ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) presente na superfície

de nanopartículas, indicando a capacidade de utilização desse quelante para marcação de nanoestruturas como micelas (DE BARROS *et al.*, 2015).

Dessa maneira, a proposta desse trabalho foi desenvolver um sistema micelar polimérico com núcleo lipídico, constituído por distearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol (DSPE-PEG), com propriedades para carrear o PTX e o radionuclídeo ^{99m}Tc e avaliar seu potencial como uma plataforma teranóstica para tumores sólidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Neoplasias

Sabe-se que nos organismos multicelulares a taxa de proliferação celular é controlada por um sistema integrado que permite que a replicação ocorra dentro de certos limites, o que mantém a população normal em níveis homeostáticos. A divisão celular ocorre, portanto, continuamente, uma vez que as células normais envelhecem, morrem e são substituídas. Entretanto, casualmente, as células podem sofrer algum dano no seu material genético e perdem o controle dos mecanismos regulatórios, levando a uma proliferação anormal e descontrolada das células, resultando na formação de neoplasias (BRASILEIRO-FILHO *et al.*, 2011).

Neoplasias ou tumores, como são mais comumente conhecidas, consistem em uma proliferação anormal e descontrolada de um tecido. As características morfológicas e de crescimento celular determinam a classificação das neoplasias em dois tipos principais, de acordo com seu comportamento biológico: neoplasias benignas e malignas. As neoplasias benignas apresentam um crescimento lento e expansivo, levando a formação de uma pseudocápsula fibrosa ao seu redor. Enquanto nas neoplasias malignas, também conhecidas como cânceres, o crescimento é muito rápido e desordenado, o que não permite a formação da pseudocápsula, sendo, portanto, altamente invasivos e destrutivos. Além dessas diferenças, tumores benignos possuem, assim como os tecidos saudáveis, um parênquima, representado pelas células em atividade metabólica ou duplicação e um estroma, representado pelo tecido conjuntivo vascularizado, cuja função é dar sustentação e nutrição ao parênquima. Por outro lado, nos tumores malignos ocorre uma desproporção entre o parênquima tumoral e o tecido vascularizado gerando áreas de necrose e áreas de hemorragia (BRASIL, 2010; BRASILEIRO-FILHO *et al.*, 2011; ROBBINS, COTRAN, KUMAR, 2010).

2.2 Epidemiologia do câncer

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2015), é denominado câncer, o conjunto de mais de 100 doenças que tem como característica em comum o

crescimento celular desordenado de forma invasiva, atingindo órgãos e tecidos. Entre os principais fatores de risco relacionados à doença, os fatores ambientais e hereditários são os mais prevalentes. Cerca de 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais, sendo os mais comuns o tabagismo, a ingestão de bebidas alcoólicas, a exposição aos raios solares, os hábitos alimentares, os hábitos sexuais e os fatores ocupacionais. Os órgãos mais acometidos incluem o pulmão, as mamas, o colo do útero, a próstata, o intestino grosso, a pele, o estômago, o esôfago, a medula óssea e a cavidade oral (INCA, 2015a).

Atualmente, o câncer é considerado o maior problema de saúde pública em países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento sua incidência tem aumentado em decorrência do envelhecimento populacional, bem como da mudança no estilo de vida da população, com aumento no consumo de álcool, fumo e alimentos industrializados, além do sedentarismo (GAO *et al.*, 2013; JEMAL *et al.*, 2011). O câncer foi responsável por aproximadamente 8,2 milhões das causas de mortes em todo o mundo em 2012, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS). Ainda, segundo a OMS, a incidência global de câncer em 2012 foi de cerca de 14 milhões de novos casos da doença, sendo que os tipos mais comuns entre os homens são os de pulmão, próstata, estômago, fígado e colorretal, e entre as mulheres prevalecem os cânceres de mama, pulmão, estômago, colorretal e de colo do útero (WHO, 2012).

2.3 Diagnóstico

O câncer é uma doença de difícil diagnóstico, uma vez que os tumores podem se localizar em qualquer parte do corpo além de não possuir sinais e sintomas específicos e característicos da doença propriamente dita. Em função disso, a doença é diagnosticada tardiamente em estágios mais avançados, o que dificulta também a escolha e a eficácia da terapia (INCA, 2015b).

O diagnóstico clínico inicial do câncer é baseado na anamnese e no exame físico do paciente, os quais direcionam a definição dos exames complementares a serem realizados. Os exames complementares incluem os exames laboratoriais, endoscópicos e de diagnóstico por imagem, os quais contribuem para confirmar o

diagnóstico e podem auxiliar na avaliação da extensão do tumor, detecção de recidivas e monitoramento da terapia (INCA, 2015b).

Os exames por imagem são de extrema importância, uma vez que podem auxiliar na identificação precoce da doença aumentando as chances de cura dos pacientes. As técnicas de diagnóstico por imagem incluem os métodos que fornecem informações anatômicas, como a tomografia computadorizada (TC), a ressonância magnética (RM) e a ultrassonografia, bem como métodos em medicina nuclear que proporcionam resultados a nível funcional, como a tomografia por emissão de prótons (PET, do inglês *Positron Emission Tomography*) e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT- do inglês *Single Photon Emission Computed Tomography*) (RYVOLOVA *et al.*, 2012; GRALLERT *et al.*, 2012; BLANCO *et al.*, 2009). Algumas características importantes dessas técnicas estão apresentadas na **Tabela 1**.

Dentre essas, as técnicas cintilográficas são vantajosas em relação às demais devido à elevada sensibilidade, uma vez que possibilitam identificar alterações moleculares nos tumores, utilizando concentrações muito baixas, na ordem de 10^{-10} mol/L, de isótopos radioativos para que se possa visualizar o sítio de interesse (DE BARROS *et al.*, 2012; STACY *et al.*, 2012; HONG *et al.*, 2009; OERLEMANS *et al.*, 2010). A existência de uma grande variedade de sondas de imagem disponíveis para essas técnicas favorece amplamente o uso das mesmas para análise de processos moleculares e celulares *in vivo* (STACY *et al.*, 2012). Para a obtenção de imagens planares e/ou por SPECT, podem ser usados diversos emissores de radiação gama com energia na faixa de 100 a 300 keV, tais como o ^{99m}Tc , o Índio-111 (^{111}In), o Iodo-131 (^{131}I) e o Gálio-67, (^{67}Ga) e, no caso de imagens por PET, emissores de pósitron, como o Fluor-18 (^{18}F) e o Cobre-64 (^{64}Cu) (DE BARROS *et al.*, 2012). Outra vantagem dessas técnicas é o fato de não possuírem limite de penetração nos tecidos e de permitirem a quantificação do radiotraçador captado pelo tecido de interesse (DE BARROS *et al.*, 2012; STACY *et al.*, 2012; HONG *et al.*, 2009). Algumas limitações frequentemente descritas para as técnicas cintilográficas incluem a dificuldade de visualizar a anatomia circundante e a baixa resolução temporal (OERLEMANS *et al.*, 2010; HONG *et al.*, 2009). Contudo, por permitirem a visualização *in vivo*, a caracterização e quantificação a nível molecular e celular de

processos biológicos, com quantidades baixas de radiação, essas técnicas são consideradas apropriadas para o uso em diagnóstico (DE BARROS *et al.*, 2012; STACY *et al.*, 2012; OERLEMANS *et al.*, 2010; XING *et al.*, 2014).

Tabela 1 – Técnicas de diagnóstico por imagem e suas características

Modalidade de imagem	Resolução espacial	Profundidade de penetração	Sensibilidade (mol/L)
PET	1 a 2 mm	Sem limites	10^{-11} a 10^{-12}
SPECT	0,3 a 1 mm	Sem limites	10^{-10} a 10^{-11}
RM	50 a 25 μ m	Sem limites	10^{-3} a 10^{-5}
TC	25 a 150 μ m	Sem limites	-
Ultrassom	30 a 300 μ m	mm a cm	10^{-6} a 10^{-9}

Adaptado de DE BARROS *et al.*, 2012.

2.3.1 Tecnécio-99m

O tecnécio (Tc), elemento químico de número atômico 43, foi isolado e identificado, em 1937, pelos pesquisadores italianos Emilio Segrè e Carlo Perrier. Segrè o extraiu de uma placa defletora de molibdênio utilizada em um ciclotron da Califórnia, EUA (JONES, 1995). Posteriormente, bombardeando molibdênio com nêutrons, obtiveram alguns isótopos do elemento, o qual foi denominado tecnécio, do grego *technétos*, que significa “artificial”, por ter sido o primeiro elemento produzido artificialmente pelo homem (SCHWOCHAU, 2000). O primeiro relato de um gerador de Tc é datado de 1958, mas somente em 1970 a FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) aprovou o uso do radioisótopo para a obtenção de imagens em medicina nuclear (JONES, 1995).

O Tc possui um total de 21 isótopos, entretanto, nenhum é estável, sendo o Tecnécio-99 metaestável (^{99m}Tc) o isótopo que apresenta as melhores propriedades

físicas e químicas para a aplicação em imagens cintilográficas (SCHWOCHAU, 2000).

Dentre os radionuclídeos emissores de radiação gama, o ^{99m}Tc é o preferido para a obtenção de imagens cintilográficas (THRALL; ZIESSMAN, 2003; VARSHNEY *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2014). Isso ocorre devido às suas propriedades favoráveis a utilização como radiofármaco: meia-vida física de 6,02 horas; emissão gama de baixa energia, com um fóton único de 140 keV, facilidade de obtenção por meio de geradores de Molibdênio-99/Tecnécio-99m (Mo-99/Tc-99m), além de apresentar um custo relativamente baixo (DE BARROS *et al.*, 2013; VARSHNEY *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2014). A importância de se ter um tempo de meia-vida como o do ^{99m}Tc é que ele é longo o suficiente para permitir uma preparação farmacêutica e obter imagens *in vivo*, mas não demasiadamente longo, uma vez que a meia-vida é determinante no tempo de exposição dos pacientes à radiação (VARSHNEY *et al.*, 2012; THRALL; ZIESSMAN, 2003).

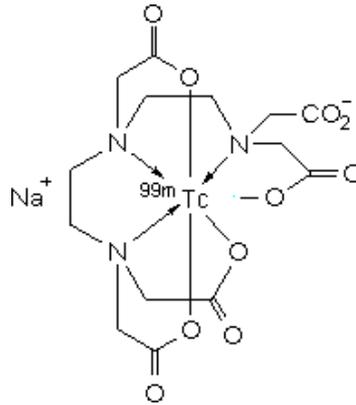
2.3.2 Preparo de radiofármacos com ^{99m}Tc

A complexação do ^{99m}Tc com o ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) descrita em 1971 foi o marco para o desenvolvimento de inúmeros agentes de imagens (JONES, 1995). Desde então, muitos radiofármacos desenvolvidos foram baseados na complexação do ^{99m}Tc com diferentes agentes quelantes após a redução do primeiro por meio do uso do íon estanoso. Essa etapa é necessária visto que o metal é eluído do gerador na forma de pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), com estado de oxidação +7 e, portanto, não reativo. (DEWANJEE, 1990; THRALL; ZIESSMAN, 2003). Dentre os quelantes utilizados, o ^{99m}Tc pode ser facilmente complexado com poli-aminocarboxilatos multidentados, tais como o DTPA, o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e o ácido tetraazaciclododecanotetraacético (DOTA) (HAZARI *et al.*, 2010).

Os ligantes polidentados devido a sua capacidade de adotar uma conformação organizada, na qual o íon metálico fica aprisionado de maneira estável na sua região central são de grande interesse na obtenção de radiofármacos (HAZARI *et al.*, 2010). Essa propriedade proporciona um aumento no contraste da imagem e na

estabilidade do mesmo *in vivo* uma vez que previne a transquelação durante o tempo de circulação do radionuclídeo na corrente sanguínea (VARSHNEY *et al.*, 2012). Em particular a complexação do DTPA (**Figura 1**) com ^{99m}Tc tem mostrado bom resultados como um agente de imagem nuclear (HAZARI *et al.*, 2010).

Figura 1 – Representação química do ^{99m}Tc complexado ao DTPA.



Reproduzido de WHO, 2014.

2.4 Tratamento

O tratamento do câncer tem como principal objetivo a eliminação das células tumorais e a erradicação da doença. As principais modalidades de tratamento são a cirurgia, a radioterapia e terapia sistêmica ou quimioterapia. A escolha da modalidade dependerá de diversos fatores, como o tipo e características do tumor e a condição clínica do paciente, mas a seleção deve ser baseada em evidências do melhor tratamento existente e dos recursos disponíveis (WHO, 2015). Nesse sentido, o tratamento de primeira escolha na maioria das vezes é a ressecção cirúrgica, pois elimina rapidamente todo ou a maior parte do tecido tumoral. No entanto, no caso de tumores malignos dificilmente consegue-se, de forma cirúrgica, retirar todo o tumor seja por se encontrar em locais inoperáveis ou pelo surgimento de metástases. Nesses casos, a radioterapia poderia ser uma alternativa, no entanto, nem todos os tumores são elegíveis para esse tratamento, como os tumores hematopoiéticos e aqueles que possuem órgãos adjacentes radiosensíveis (OERLEMANS *et al.*, 2010). Uma terceira alternativa de tratamento é a quimioterapia sistêmica, a qual primariamente tem como propósito a destruição somente das

células neoplásicas. Entretanto, os agentes quimioterápicos agem de forma inespecífica, o que provoca também a lesão das células normais, principalmente aquelas com alta taxa de divisão, como as células gastrointestinais e células do sistema imunológico, levando a efeitos adversos como queda de cabelo, náuseas e baixa imunidade (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Existem cerca de 90 agentes quimioterápicos antineoplásicos aprovados pela FDA para uso clínico, porém, em função da baixa ou nenhuma especificidade e da alta susceptibilidade ao desenvolvimento de resistência, a busca por uma terapia eficaz e mais sítio-específica tem sido constante (BLANCO *et al.*, 2009; CHABNER; ROBERTS, 2005).

Nesse sentido, os agentes quimioterápicos associados às nanoestruturas como lipossomas, dendrímeros, nanopartículas poliméricas e micelas surgiram como uma nova modalidade na terapia, devido a sua capacidade de favorecer o direcionamento de fármacos a locais específicos, como os tumores (OERLEMANS *et al.*, 2010; BLANCO *et al.*, 2009).

É sabido que os fármacos quimioterápicos agem em diferentes alvos e alguns têm ação específica nas fases do ciclo celular (G_0 , G_1 , S, G_2 e M) enquanto outros agem nas células independentemente de estarem em processo da divisão celular (ALMEIDA *et al.*, 2005; HARDMAN, LIMBIRD, 2005). Considerando que a maioria dos tumores se caracteriza pela rápida e descontrolada proliferação celular, agentes quimioterápicos que atuam durante a divisão celular são de grande interesse. Eles são basicamente divididos em fármacos que atuam direta ou indiretamente na síntese do DNA, durante a fase S, como a doxorrubicina e o metotrexato e fármacos que inibem o fuso mitótico durante a fase M. Essa última classe é representada pelos alcaloides da vinca, como a vincristina e vinblastina, e pelos taxanos, como o docetaxel e o paclitaxel (ALMEIDA *et al.*, 2005).

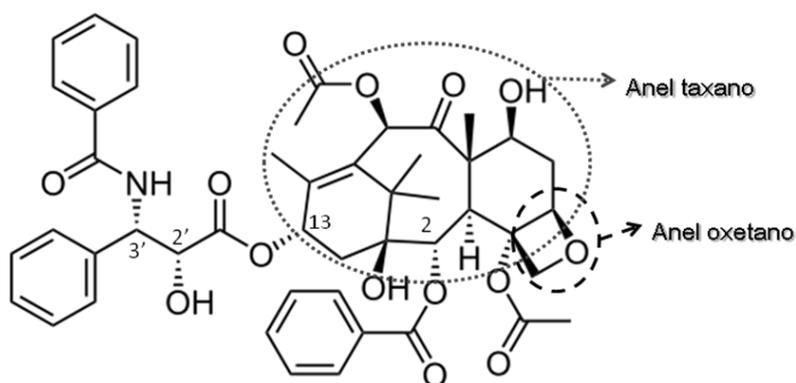
2.5 Paclitaxel

O paclitaxel (PTX) é um agente antineoplásico de origem natural, pseudo-alcalóide, derivado originalmente da árvore *Taxus brevifolia* ou Teixo do Pacífico. Essa

substância foi isolada e identificada, pela primeira vez, no fim da década de 60 pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (HENNENFENT; GOVINDAN, 2006; ZHANG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014). Atualmente, o PTX é obtido por semi-síntese, por um processo de acetilação do precursor 10-desacetilbacatina III (10-DABIII), produto de extração das agulhas de Teixo europeu (*Taxus baccata*), uma espécie renovável e mais abundante (SOUZA, 2004; SURAPANENI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2015).

O PTX, fórmula molecular $C_{47}H_{51}NO_{14}$ e peso molecular de aproximadamente 854 Da (**Figura 2**), consiste em uma estrutura diterpenóide centrada em um anel taxano volumoso e complexo de conformação rígida, composto por vários substituintes hidrofóbicos, o que contribui para uma elevada lipofilicidade (log P igual a 3,96) e baixa solubilidade em água (inferior a 0,01 mg/mL). Sua atividade anticâncer ocorre, principalmente, devido à presença do grupo benzoíla no carbono C2 e do anel oxetano localizados no anel taxano. Além disso, os grupamentos presentes nos carbonos C3' e C13 são responsáveis por manter a atividade antineoplásica e a hidroxila no C2' potencializa essa atividade (ZHANG *et al.*, 2013).

Figura 2 – Estrutura química do Paclitaxel.



Adaptado de SURAPANENI *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013.

Seu mecanismo de ação ocorre durante a fase mitótica de divisão celular e envolve a ligação irreversível à subunidade-beta da tubulina, o que resulta na estabilização dos microtúbulos impedindo sua reorganização e consequentemente a divisão

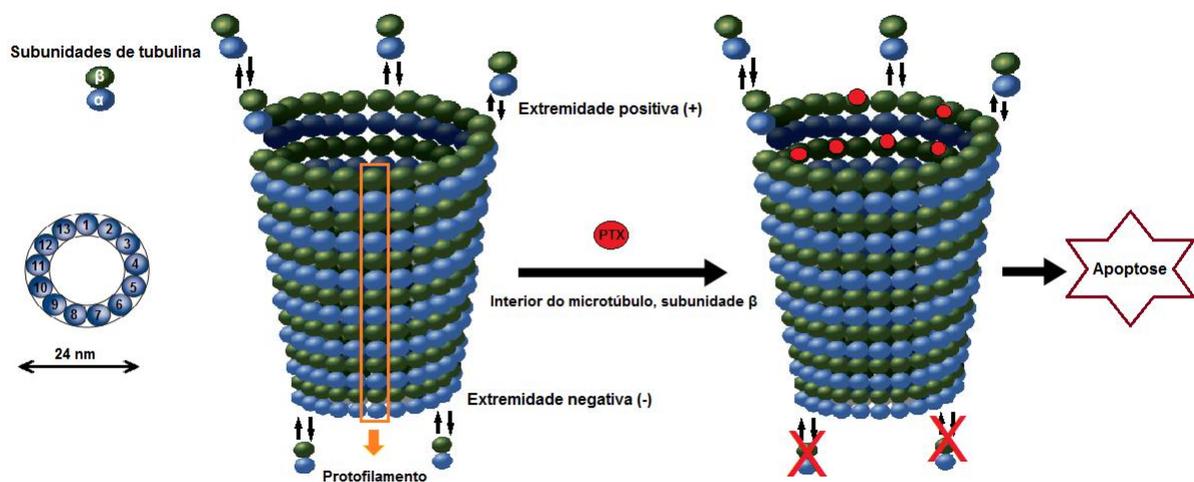
celular, levando as células neoplásicas à morte celular por apoptose (**Figura 3**) (BINDER, 2013; SURAPANENI *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014).

Os microtúbulos são estruturas tubulares importantes na composição das células eucarióticas, sendo parte essencial do citoesqueleto e/ou constituindo o arcabouço estrutural de segregação das cromátides irmãs durante a divisão celular (WANG *et al.*, 2015). São constituídos por 13 protofilamentos, organizados de maneira a formar um “tubo” de 24 nm de diâmetro. Os protofilamentos são formados por proteínas heterodiméricas, compostas por duas subunidades (α e β -tubulina). Portanto, os microtúbulos possuem uma extremidade contendo tubulinas α , as quais constituirão a extremidade negativa e outra contendo tubulinas β , que formarão a extremidade positiva (**Figura 3**) (JORDAN; WILSON, 2004). A formação dos microtúbulos ocorre basicamente pelo rearranjo das tubulinas, as quais são estruturas constituídas por cerca de 440 aminoácidos cada, que, quando não estão na sua forma heterodimérica, organizam entre si por ligações de hidrogênio para formar os microtúbulos. A organização microtubular é um processo altamente regulado por magnésio, proteínas associadas aos microtúbulos (PAM) e trifosfato de guanosina (GTP), e ocorre basicamente em duas etapas, a iniciação e a alongação (SOUZA, 2004; WANG *et al.*, 2015). Esse processo baseia-se na perda e ganho contínuo (despolimerização/polimerização) de subunidades tubulina pelas extremidades negativa e positiva, respectivamente, de forma a manter sempre um equilíbrio. A manutenção desse equilíbrio é fundamental para os processos de divisão, sinalização e motilidade, além da manutenção da forma das células (BINDER, 2013; JORDAN; WILSON, 2004; WANG *et al.*, 2015).

O PTX age fundamentalmente afetando esse equilíbrio tubulina-microtúbulo. Ele se liga diretamente no domínio β -tubulina, especificamente na superfície interna do microtúbulo, o que inibe o processo de despolimerização (JORDAN; WILSON, 2004). A ausência de despolimerização dos microtúbulos leva à estabilização dos mesmos, o que impede a separação dos centrômeros e interrompe o processo mitótico na fase G₂/M do ciclo celular, induzindo à morte celular por um processo apoptótico (BINDER, 2013; JORDAN; WILSON, 2004; STIRLAND *et al.*, 2013; WANG, 2015).

Além da ação por inibição mitótica, por meio de estudos das propriedades farmacodinâmicas do PTX, pesquisadores descobriram uma propriedade adicional de ação do mesmo, a atividade antiangiogênica. Esses efeitos começaram a ser relatados em 1995, desde então surgiram vários estudos no sentido de investigar o efeito do PTX na função celular endotelial e na angiogênese. Estudos *in vitro* demonstraram que ele promove a inibição da proliferação, da motilidade e da capacidade de invasão de células endoteliais, sendo essa inibição dependente da concentração do fármaco. Além disso, estudos relataram que a atividade de inibição da quimiotaxia e a capacidade de invasão de células endoteliais são decorrentes do efeito de supressão da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) no tumor promovido pelo PTX. No entanto, ainda não foi estabelecido um consenso sobre o efeito antiangiogênico promovido pelo fármaco *in vivo*, devido à variação nas respostas obtidas em diferentes modelos experimentais (BELOTTI *et al.*, 1996; BOCCI *et al.*, 2013; SURAPANENI *et al.*, 2012).

Figura 3 – Esquema representativo da estrutura de um microtúbulo e da ação do PTX.



Adaptado de BINDER, 2013; JORDAN; WILSON, 2004.

O PTX foi o primeiro da classe dos taxanos a ser aprovado pela FDA para utilização clínica e desde então tem sido amplamente utilizado em tratamentos

quimioterápicos. Apresenta atividade comprovada contra um amplo espectro de tipos de câncer, incluindo câncer de mama metastático, pulmão, cabeça e pescoço, de cólon, bexiga, carcinoma ovariano resistente e sarcoma de Kaposi (BOCCI *et al.*, 2013; SURAPANENI *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2013). Entretanto, apesar da sua elevada potência anticâncer, o PTX apresenta características que limitam a sua aplicação clínica, entre elas a elevada lipofilicidade e a baixa solubilidade em água; além disso, ele possui uma alta taxa de ligação a proteínas plasmáticas, o que resulta em uma baixa biodisponibilidade do fármaco (SURAPANENI *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014). Nesse sentido, destaca-se a necessidade de se desenvolver sistema de entrega de fármacos que aumente a sua solubilidade e a sua biodisponibilidade *in vivo* (WANG *et al.*, 2014).

A companhia americana Bristol-Myers Squibb desenvolveu a formulação comercial Taxol[®], na qual o PTX é preparado com uma mistura de co-solventes contendo óleo de rícino polioxietilado (Cremophor EL - CrEL) e etanol desidratado na proporção de 1:1 (v/v) (BINDER, 2013; HENNENFENT; GOVINDAN, 2006; STIRLAND *et al.*, 2013). Porém, além dos efeitos adversos já conhecidos dos citotóxicos que agem no processo de divisão celular, como a mielossupressão e toxicidade gastrointestinal, o Taxol[®] apresentou outros efeitos, como nefrotoxicidade, neuropatias sensoriais periféricas, broncoespasmos, hipotensão e reações de hipersensibilidade, os quais estão relacionados com a presença do CrEL, que é uma substância biológica e farmacologicamente ativa, o que limita ainda mais a dose utilizada na clínica (HENNENFENT; GOVINDAN, 2006; STIRLAND *et al.*, 2013; ZUYLEN *et al.*, 2001). Considerando que a formulação comercial de PTX é um medicamento administrado por infusão via intravenosa, um fator essencial para minimizar os efeitos do óleo de rícino é a velocidade da infusão, a qual pode variar de 3 a 24 horas dependendo do tipo de tumor a ser tratado. Sabe-se que uma rápida infusão de CrEL induz a liberação de histamina e leva à hipotensão e à reações de hipersensibilidade (BINDER, 2013; SURAPANENI *et al.*, 2012; ZUYLEN *et al.*, 2001). Além disso, para a infusão, o medicamento deve ser diluído de 5 a 20 vezes em solução salina (0,9% p/v) ou 5% de solução de dextrose, o que resulta em uma concentração final de PTX variando de 0,3 a 1,2 mg/mL, portanto, muito superior a sua solubilidade aquosa levando a sérios riscos de precipitação do fármaco e formação de êmbolos (BINDER, 2013; SURAPANENI *et al.*, 2012).

Diante disso, observa-se a real necessidade de desenvolver novas estratégias para veicular o PTX, de forma a reduzir a toxicidade e aumentar a solubilidade aquosa e a biodisponibilidade do fármaco. Nesse sentido, o emprego da nanotecnologia no desenvolvimento de nanocarreadores para o PTX tem se mostrado uma abordagem promissora (HENNENFENT; GOVINDAN, 2006; STIRLAND *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2010; WAN *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013).

Estudos pré-clínicos e clínicos com nanoestruturas carreadoras como lipossomas (KAN *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2013), micelas poliméricas (EMAMI *et al.*, 2015; KATRAGADDA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2013), nanopartículas lipídicas sólidas (BAEK; CHO, 2015; CHIRIO *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2015), entre outras, têm demonstrado vantagens no tratamento de diversos tipos de câncer. No entanto, apenas três preparações já foram aprovadas para o uso clínico: Abraxane[®], Lipusu[®] e Genexol-PM[®]. O Abraxane[®], uma formulação de nanopartículas de albumina carreadoras de PTX comercializado pela corporação Celgene (EUA), demonstrou grandes ganhos de eficácia e segurança em relação ao Taxol[®], permitindo uma infusão com maior concentração de fármaco e em um tempo menor. O uso do Abraxane[®] foi aprovado primeiramente, em 2005, pelo FDA, e em maio de 2011 já havia sido aprovado em mais 41 países, incluindo Canadá, Índia e Japão (PILLAI, 2014; YAMAMOTO *et al.*, 2014). O Lipusu[®], produzido pela Sike Pharmaceutica ICo. (China), consiste em uma formulação lipossomal carreadora de PTX, aprovada em 2006 na China. Esse sistema demonstrou um perfil toxicológico mais favorável quando comparado à formulação contendo CrEL (XU *et al.*, 2013). O uso do Genexol-PM[®], uma formulação de micelas poliméricas composta por polietilenoglicol-acido polilático (PEG-PLA) desenvolvida pela companhia Samyang (Coreia), foi aprovado na Coreia em 2007. As vantagens observadas com o uso do Genexol-PM[®] foram relacionadas à menor toxicidade do sistema em relação ao Taxol[®], entretanto não demonstrou ganhos quanto à eficácia terapêutica (FAN *et al.*, 2015; PILLAI, 2014).

Diante disso percebe-se que a viabilidade da nanomedicina para entrega do PTX foi comprovada, entretanto, a questão de segurança ainda é uma preocupação e a

busca por novas preparações que apresentem vantagens quanto à segurança e eficácia sobre aquelas já relatadas é de extrema relevância.

2.6 Sistemas nanoestruturados carreadores de fármacos na oncologia

O interesse pelo emprego da nanotecnologia na entrega de agentes terapêuticos e diagnósticos de forma mais eficiente e segura foi estabelecido há cerca de 40 anos, sendo atualmente um dos ramos que cresce mais rapidamente na área de nanotecnologia, apresentando mais de 200 produtos já aprovados ou em fases de pesquisa clínica (BERTRAND *et al.*, 2013; SVENSON, 2014).

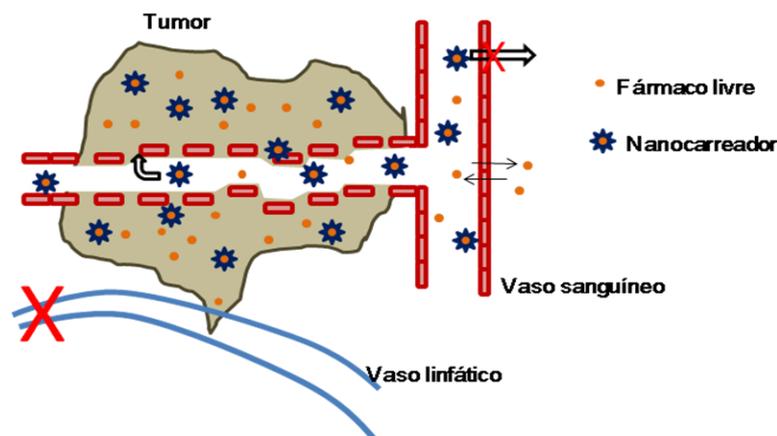
Sistemas nanoestruturados carreadores de fármacos são estruturas de tamanho nanométrico, que apresentam grande potencial para encapsular substâncias fracamente hidrossolúveis (HUH *et al.*, 2008), proteger moléculas (GREGORY *et al.*, 2013), modificar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico de substâncias (LEITE *et al.*, 2012; YOU *et al.*, 2014) e direcioná-los para um sítio alvo (LU *et al.*, 2013), com o objetivo de diagnosticar e monitorar processos físicos e patológicos bem como tratar e controlar sistemas biológicos (BERTRAND *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2013; PEER *et al.*, 2007).

Essas características são particularmente interessantes na área da oncologia, uma vez que os principais entraves dos tratamentos quimioterápicos estão relacionados com a baixa eficácia e toxicidade inespecífica dos agentes citotóxicos (BERTRAND *et al.*, 2013; FANG *et al.*, 2011; STIRLAND *et al.*, 2013; SVENSON, 2012). A baixa eficácia e elevada toxicidade estão relacionadas principalmente com a baixa solubilidade nos fluidos biológicos de muitos quimioterápicos; o grande volume de distribuição de muitos fármacos, tornando necessário o uso de maiores doses para alcançar uma dose terapêutica na área tumoral; o rápido reconhecimento pelas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) e a rápida depuração do corpo. Esses problemas podem ser contornados com o uso de nanocarreadores (SVENSON, 2012).

O fator que favorece o uso de nanocarreadores na oncologia é a característica peculiar da maioria dos tumores sólidos, que, devido à grande necessidade de

suprimento de oxigênio e de nutrientes para o seu crescimento, apresenta regiões com alta taxa de angiogênese. No entanto, os vasos são malformados devido ao alinhamento desorganizado das células endoteliais e altamente permeáveis, com fenestrações maiores que 100 nm. Entretanto, essa neovascularização não é uniforme no tecido tumoral, assim como a distribuição dos vasos linfáticos, provocando uma drenagem linfática na massa tumoral heterogênea e ineficiente (BERTRAND *et al.*, 2013; FANG *et al.*, 2011; SVENSON, 2012). Essas características inerentes aos tumores favorecem passivamente o acúmulo das nanopartículas nessa região, efeito que foi descoberto por Hiroshi Maeda e colaboradores (1986) e foi denominado efeito de “aumento da permeabilidade e retenção” ou efeito EPR (do inglês *Enhanced Permeability and Retention*). O aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos à penetração de partículas com até 40 kDa associado ao aumento da retenção pela redução da drenagem linfática é a base para o desenvolvimento de estratégias na terapia anticâncer, incluindo a entrega de fármacos, genes e agentes de imagem (FANG *et al.*, 2011; MAEDA, 2010; TORCHILIN, 2007). A **Figura 4** esquematiza o funcionamento do direcionamento passivo de nanopartículas pelo efeito EPR.

Figura 4 – Efeito EPR e direcionamento passivo.

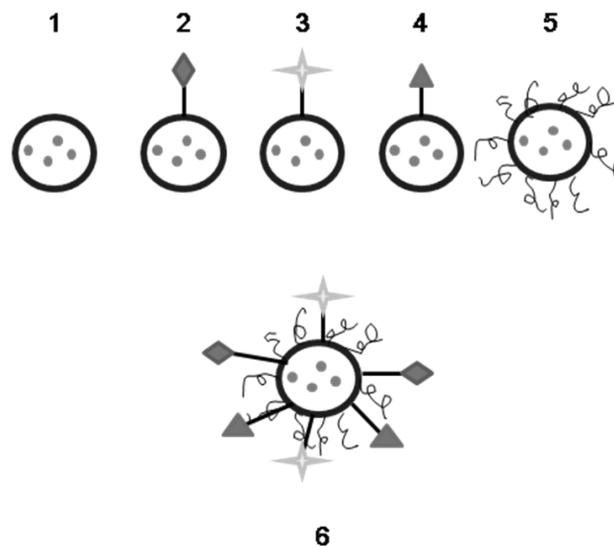


Adaptado de TORCHILIN, 2007 e PEER *et al.*, 2007.

Com o intuito de promover um aumento da eficácia antitumoral, aumento da seletividade e redução de efeitos tóxicos, as formulações nanoestruturadas têm sido delineadas por meio da combinação de diferentes propriedades/funções para a

obtenção de sistemas multifuncionais (**Figura 5**). É possível, por exemplo, (a) prolongar seu tempo de permanência na circulação sanguínea; (b) levar o seu acúmulo no sítio desejado; (c) permitir a entrega eficaz do fármaco às células ou organelas específicas; (d) carrear agentes de contrastes para acompanhamento em tempo real da acumulação no sítio desejado (PEER *et al.*, 2007; SAWANT; TORCHILIN, 2010; TORCHILIN, 2006, 2007).

Figura 5 – Esquema representativo de nanocarreadores funcionalizados.



Adaptado de TORCHILIN, 2007. 1- Nanopartícula carreadora de fármaco simples; 2- Funcionalização com ligante alvo-específico; 3- Funcionalização com agente de imagem; 4- Funcionalização com facilitador de permeação celular; 5- Recobrimento para prolongamento do tempo de circulação, e 6- multifuncionalização da nanopartícula.

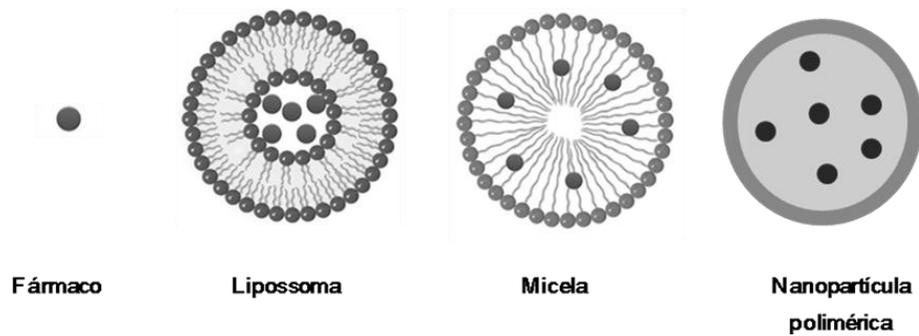
O aumento do tempo de permanência na circulação sanguínea é conseguido mediante recobrimento dessas estruturas com substâncias altamente hidrofílicas como o PEG. As substâncias com função de recobrir a nanopartícula tornam-se importantes no momento em que nanocarreadores convencionais são rapidamente reconhecidos pelas células do SFM, opsonizados e eliminados da circulação sanguínea sem completar sua função. O PEG forma uma camada de solvatação na sua superfície e cria uma barreira estérica contra as opsoninas, prolongando o tempo de circulação do nanocarreador (GAO *et al.*, 2013; KOLATE *et al.*, 2014; TORCHILIN, 2006).

A associação de ligantes alvo-específicos e os facilitadores de permeação celular são estratégias interessantes para reverter mecanismos de resistência a alguns fármacos pelas células tumorais, além de possibilitar um maior acúmulo de agente terapêutico e/ou diagnóstico no sítio de interesse (PEER *et al.*, 2007; TORCHILIN, 2007). Além disso, a aplicação da nanotecnologia na obtenção de imagens diagnósticas tem demonstrado crescentes avanços, uma vez a entrega de agentes de imagem preferencialmente na região de interesse permite melhorar o contraste e aumentar as chances de um diagnóstico antecipado e mais detalhado (DE BARROS *et al.*, 2012; TORCHILIN, 2007).

O emprego de nanocarreadores com função diagnóstica usualmente utiliza duas abordagens, o agente de imagem no interior das estruturas ou localizado na superfície da mesma (TORCHILIN, 2007; XING *et al.*, 2014). A primeira abordagem é menos complexa do ponto de vista químico, entretanto, baseia-se na complexação do radioisótopo com uma molécula, usualmente um agente quelante, e posterior encapsulação na nanoestrutura, resultando em um preparo do radiotraçador mais demorado e laborioso. A segunda abordagem envolve a modificação química da superfície da partícula, tornando-se particularmente interessante, pois o procedimento de radiomarcagem é mais simples e eficiente, permitindo um aumento acentuado de radionuclídeos ligados à estrutura e, portanto, um aumento no sinal da imagem na região tumoral (TORCHILIN, 2007).

Os sistemas nanoestruturados mais utilizados na oncologia são os baseados em polímeros e lípides naturais e sintéticos, uma vez que apresentam características mais favoráveis para veicular fármacos e para a modificação de superfície (PEER, *et al.*, 2007; RAMOS-CABRER; CAMPOS, 2013; SAWANT; TORCHILIN, 2010; SVENSON, 2014; TORCHILIN, 2007). Nesse sentido, a maior parte das nanopartículas carreadoras aprovadas para uso clínico e em fases de estudos clínicos são lipossomas, nanopartículas poliméricas e micelas poliméricas (SVENSON, 2014). A **Figura 6** representa alguns tipos de nanocarreadores utilizados.

Figura 6 – Nanocarreadores mais utilizados.



Adaptado de RAMOS-CABRER; CAMPOS, 2013.

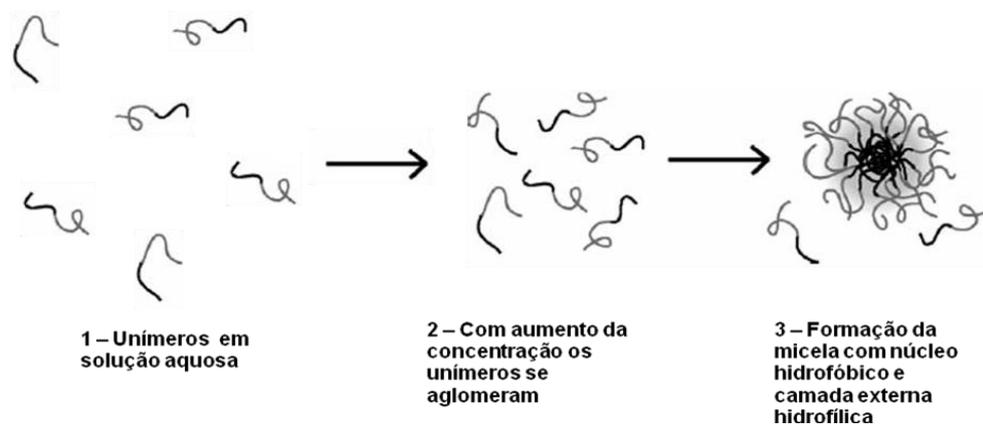
2.7 Micelas

As micelas são partículas coloidais esféricas de tamanho na faixa de 5 a 100 nm, que se formam espontaneamente. São constituídas por moléculas anfifílicas ou surfactantes, as quais possuem duas regiões distintas, uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica. As moléculas anfifílicas em soluções aquosas muito diluídas se encontram na forma de monômeros, no entanto, com o aumento da concentração no meio, alcança-se uma faixa de concentração, conhecida como Concentração Micelar Crítica (CMC), na qual as micelas começam a ser formadas. A partir dessa CMC, ocorre a ação de duas forças, uma de atração, que faz com que os unímeros se agreguem e organizem formando as micelas, de forma a minimizar a exposição termodinamicamente indesejável da parte hidrofóbica das moléculas no meio aquoso, e outra força de repulsão, que impede que as micelas cresçam indefinidamente (**Figura 7**). Em meio aquoso, a porção hidrofóbica da molécula anfifílica forma o núcleo da micela mediante ligações de Van der Waals, permitindo a solubilização de fármacos lipossolúveis (OERLENMANS *et al.*, 2010; TORCHILIN, 2007; TRIVEDI; KOMPELLA, 2011).

A composição da micela é determinante para as suas características físico-químicas, tais como o tamanho, a forma e principalmente a CMC da mesma, determinando, portanto, a estabilidade física do sistema (CROY; KWON, 2006). Sabe-se que quanto menor o peso molecular da substância constituinte da micela, maior é a sua

CMC e, portanto, mais sensível à diluição. Nesse sentido, micelas constituídas por copolímeros anfifílicos, usualmente apresentam uma CMC menor, na ordem de 10^{-6} a 10^{-7} mol/L, enquanto outros surfactantes apresentam uma CMC na ordem de 10^{-3} a 10^{-4} mol/L (OERLENMANS *et al.*, 2010; SAWANT; TORCHILIN, 2010). A obtenção de uma baixa CMC é particularmente interessante, do ponto de vista farmacológico, para sistemas administrados por via intravenosa. Ao atingir a corrente sanguínea, micelas com valores de CMC alto podem se dissociar em monômeros e seu conteúdo pode ser liberado, visto que o volume do meio em que as micelas estão presentes aumenta muito e uma concentração abaixo da CMC é alcançada. Em função disso, micelas baseadas em polímeros, possuem um tempo de circulação sanguínea aumentado quando comparadas à micelas de surfactantes de baixo peso molecular (GRALLERT *et al.*, 2012; OERLENMANS *et al.*, 2010).

Figura 7 – Representação esquemática da formação de uma micela em solução aquosa.



Adaptado de CROY; KWON, 2006. A porção mais escura dos unímeros representa a parte hidrofóbica, e a porção mais clara, a parte hidrofílica.

2.7.1 Micelas poliméricas

Micelas baseadas em polímeros foram originalmente reconhecidas como uma potente plataforma carreadora de fármacos no final dos anos 1980 e início da década de 90, quando o grupo de pesquisa de Kazunori Kataoka e colaboradores, fizeram os primeiros relatos, de micelas de copolímeros de PEG e poli aspartato carreando doxorubicina (MATSUMURA, 2008; YOKOYAMA *et al.*, 1990). Desde então um considerável número de trabalhos relatando o uso micelas poliméricas

como carreadoras de fármacos, ácidos nucleicos, proteínas e agentes de imagem vem sendo publicado (YOKOYAMA, 2014).

Micelas poliméricas são estruturas supramoleculares formadas por copolímeros de bloco ou de enxerto, com uma composição bifásica, consistindo em um núcleo hidrofóbico interior e uma “casca” hidrofílica exterior, ou estrutura “*core-shell*” (TORCHILIN, 2006; KATAOKA *et al.*, 1993; YOKOYAMA, 2014). As propriedades inerentes à composição micelar são responsáveis por controlar importantes características biológicas do nanocarreador, como perfil farmacocinético, perfil de biodistribuição, adsorção de macromoléculas na sua superfície, adesão a biosuperfícies e capacidade de modificação para um direcionamento passivo (TORCHILIN, 2006). A “casca” hidrofílica da micela é responsável por uma efetiva proteção estérica e é determinante em algumas características como hidrofília, carga, tamanho, densidade de superfície e possibilidade de modificação da superfície por meio de grupos reativos. O núcleo hidrofóbico determinará a capacidade de armazenamento, perfil de liberação do fármaco e compatibilidade com fármaco encapsulado (OERLENMANS *et al.*, 2010; TORCHILIN, 2006). Portanto, geralmente as micelas permitem a encapsulação de grande quantidade de fármacos hidrofóbicos incluindo agentes antineoplásicos como o PTX.

Estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado que esse sistema reduz os efeitos tóxicos e aumenta a efetividade em vários tipos de tumor, inclusive em tumores considerados intratáveis (AHN *et al.*, 2014; KAIDA *et al.*, 2010; KATRAGADDA *et al.*, 2013; MATSUMURA, 2008).

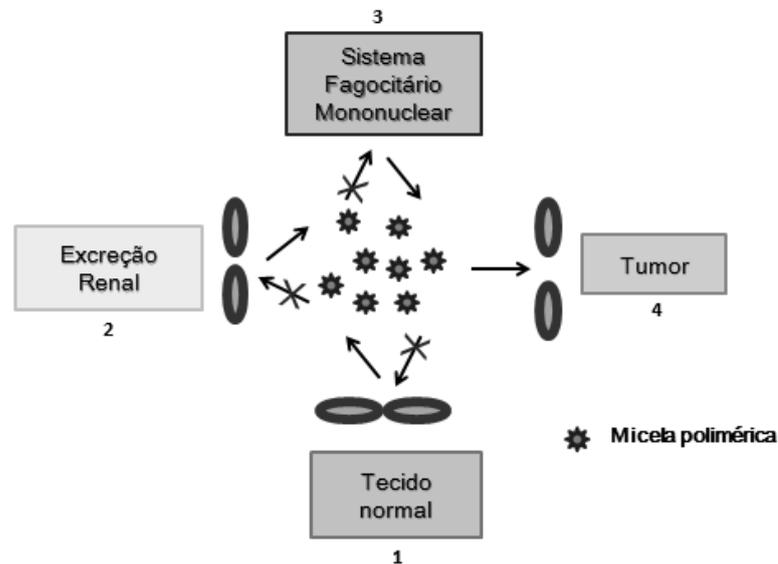
O grande interesse por sistemas micelares no tratamento do câncer se deve, principalmente, às suas características estruturais, uma vez que essas resultam em importantes vantagens biológicas, relacionadas à farmacodinâmica e farmacocinética, quando comparado a outros tipos de nanocarreadores (CROY; KWON, 2006; GRALLERT *et al.*, 2012; YOKOYAMA, 2014).

Uma propriedade vantajosa das micelas poliméricas é a liberação sustentada de fármacos. Isso ocorre porque as micelas são estruturas que se formam e se desmancham espontaneamente de acordo com a diluição, sendo assim, o fármaco é

liberado aos poucos, conforme as nanoestruturas são desfeitas. Como mencionado anteriormente, o fator determinante para a formação das micelas é atingir a CMC e como a CMC dessas estruturas é muito baixa, isso resulta em um tempo de circulação sanguínea aumentado. Portanto, à medida que as micelas poliméricas são depuradas da circulação elas são, gradualmente, diluídas no meio fisiológico, se desfazem e liberam o seu conteúdo de forma gradativa e sustentada (CROY; KWON, 2006; TRIVEDI; KOMPELLA, 2011).

Outra característica particular das micelas poliméricas é o tamanho reduzido, o qual confere importantes vantagens, principalmente quando comparado aos outros sistemas carreadores amplamente empregados (lipossomas e nanopartículas poliméricas). Segundo a literatura, o diâmetro médio de micelas poliméricas para aplicações farmacêuticas se encontra na faixa de 10 a 100 nm (CROY; KWON, 2006; TORCHILIN, 2006; YOKOYAMA, 2014). Essa faixa é ideal para escapar dos mecanismos fisiológicos de eliminação do organismo e contribuir para o aumento do seu tempo de circulação, pois, sabe-se que partículas com tamanho inferior a 5 – 10 nm são rapidamente eliminadas via renal e partículas maiores são rapidamente reconhecidas pelo SFM e eliminadas por essa via. Além disso, estruturas com tamanho inferior a 100 nm são preferencialmente acumuladas no interstício da região tumoral via efeito EPR. Portanto, as micelas apresentam todas as características favoráveis para levar a um direcionamento passivo do fármaco à região tumoral (**Figura 8**) (CROY; KWON, 2006; JONES; LEROUX, 1999; MOHAMED *et al.*, 2014; TORCHILIN, 2006; YOKOYAMA, 2014). Além das vantagens biológicas inerentes ao tamanho das micelas, essa propriedade físico-química é fácil e precisamente controlável mediante escolha adequada da composição da nanoestrutura.

Figura 8 – Mecanismo de direcionamento passivo de micelas poliméricas em tumores sólidos.



Adaptado de JONES; LEROUX, 1999. A faixa de tamanho das micelas poliméricas evita que o fármaco permeie tecidos normais (1); sofra uma rápida depuração renal (2), e seja rapidamente reconhecido e eliminado pelo SFM (3), entretanto, consegue permeiar tecidos com vasculatura fenestrada, como o tumor (4), caracterizando o direcionamento passivo.

Com relação à composição, é de extrema importância que os polímeros sejam biocompatíveis e biodegradáveis, para conferir uma menor toxicidade sistêmica do fármaco quimioterápico em seu interior (TORCHILIN, 2006). Nesse sentido, entre os polímeros hidrofílicos para compor a porção externa, o PEG com peso molecular de 1 a 15 kDa é o mais utilizado (CROY; KWON, 2006; LUKYANOV; TOCHILIN, 2004; MOHAMED *et al.*, 2014; SAWANT; TORCHILIN, 2010). Outros polímeros hidrofílicos estudados quando se deseja obter sistemas controláveis por temperatura ou pH são a poli N-isopropilacrilamida (WEI *et al.*, 2009) e o poli metacrilato (GIACOMELLI *et al.*; 2011), respectivamente (CROY; KWON, 2006; SAWANT; TORCHILIN, 2010).

O PEG é um polímero altamente hidratável, atóxico, não antigênico e biocompatível, aprovado por agências regulatórias, incluindo a FDA, para o uso interno em humanos (CHENG *et al.*, 2012; CROY; KWON, 2006; KWON; KATAOKA, 2012). Com inúmeras características vantajosas, é, portanto, largamente utilizado para aplicações médicas e farmacêuticas incluindo o recobrimento de diversos tipos de estruturas, como lipossomas, nanopartículas e proteínas, conferindo características como segurança e eficácia, estabilidade e aumento da biodisponibilidade a diversos

agentes terapêuticos (CROY; KWON, 2006; CHENG *et al.*, 2012; KOLATE *et al.*, 2014). Uma importante propriedade do PEG é a sua eficiente capacidade de estabilizar estericamente superfícies em meio aquoso. Isso ocorre porque a presença das cadeias de PEG na superfície de estruturas como as micelas, forma uma densa “cabeleira” ou “escova” altamente hidratadas que se movem rapidamente, varrendo o volume ao seu redor, formando uma grande camada de solvatação em torno no núcleo hidrofóbico (CROY; KWON, 2006; KWON; KATAOKA, 2012). Essa característica é particularmente interessante porque previne a adsorção de proteínas, como imunoglobulinas, as quais identificam as nanoestruturas como um material estranho e previnem a adesão de células fagocitárias, mecanismos que levariam à eliminação da partícula do organismo (CROY; KWON, 2006; KOLATE *et al.*, 2014; KWON; KATAOKA, 2012).

O material constituinte do núcleo da micela depende da natureza do fármaco a ser encapsulado, e geralmente consiste em polímeros biodegradáveis como o poli ácido D,L-lático (PDLLA), poli ácido L-aspártico e poli ϵ -caprolactona (PCL), entretanto, em alguns casos, resíduos fosfolipídicos podem ser utilizados (KOLATE *et al.*, 2014; SAWANT; TORCHILIN, 2010).

O uso de uma porção lipídica como bloco hidrofóbico da composição de micelas, como a fosfatidiletanolamina (PE), fornece vantagens adicionais para a estabilidade da nanoestrutura, quando comparado às micelas poliméricas convencionais, pois a presença de duas cadeias de ácidos graxos pode contribuir para as interações hidrofóbicas no núcleo entre as unidades constituintes da micela polimérica (SAWANT; TORCHILIN, 2010).

O emprego de conjugados de fosfolípidos ligados ao PEG em formulações micelares se deu a partir da constatação que eles apresentavam as mesmas características de polímeros anfifílicos, com a diferença de que a parte hidrofóbica era mais curta, no entanto, formavam micelas com características físico-químicas semelhantes às micelas poliméricas convencionais (TORCHILIN, 2006). O preparo de micelas contendo uma porção lipídica é tão simples quanto o preparo de micelas poliméricas convencionais, uma vez que elas também se formam espontaneamente (TORCHILIN, 2006). O diâmetro desse tipo de micela varia de 7 a 35 nm,

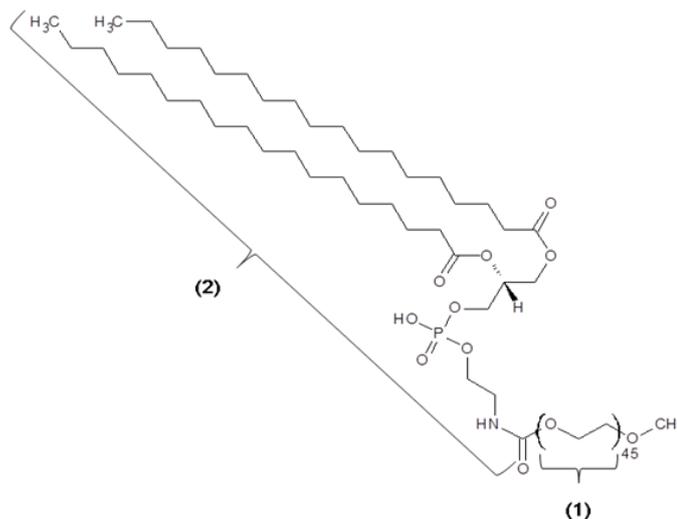
dependendo do comprimento da cadeia de PEG, e os valores de CMC também são baixos, na ordem de 10^{-5} a 10^{-6} mol/L. A **Tabela 2** apresenta os valores de diâmetro e CMC para diferentes composições de micelas poliméricas de núcleo lipídico. Vários estudos têm demonstrado sucesso ao utilizar micelas de DSPE-PEG (**Figura 9**) para solubilizar fármacos fracamente solúveis, bem como boa estabilidade, tempo de circulação prolongada e capacidade de acumular em tecidos via efeito EPR (SARISOZEN *et al.*, 2012; GILL *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2013).

Tabela 2 – CMC e diâmetro de micelas de lipídico-poliméricas de diferentes composições.

Composição	CMC (mol/L)	Diâmetro (nm)
DSPE-PEG ₇₅₀	$1,0 \times 10^{-5}$	7 – 15
DSPE-PEG ₂₀₀₀	$1,1 \times 10^{-5}$	7 – 20
DSPE -PEG ₅₀₀₀	$6,2 \times 10^{-6}$	10 – 40
DOPE-PEG ₂₀₀₀	$8,7 \times 10^{-6}$	7 – 20
DOPE- PEG ₅₀₀₀	$7,3 \times 10^{-6}$	10 – 35

Adaptado de LUKYANOV *et al.*, 2002.

Figura 9 – Estrutura química do DSPE-PEG.



(1) PEG; (2) DSPE

O emprego de micelas poliméricas carreadoras de PTX utilizando diferentes componentes tem sido extensamente estudado, visto que esse tipo de nanoestrutura demonstra grande potencial para aumentar a captação do fármaco na região de tumoral. A **Tabela 3** exemplifica alguns estudos que mostraram sucesso no acúmulo do PTX em tumores sólidos.

2.8 Micelas de DSPE-PEG como uma plataforma teranóstica

Além das propriedades de solubilizar fármacos hidrofóbicos, as micelas DSPE-PEG permitem a modificação da sua superfície com agentes de imagem, o que é particularmente vantajoso, pois pode combinar a entrega de um agente terapêutico juntamente com um agente de diagnóstico (TOCHILIN, 2006). Considerando que uma grande preocupação quanto ao uso de nanopartículas, é a sua utilização em quantidades excessivamente elevadas o que pode levar à toxicidade inerente ao metabolismo e eliminação insuficiente do carreador, o uso de um mesmo sistema com multifunções é de grande interesse (ALLEN; CULLIS, 2004).

A essa combinação de terapia e diagnóstico, dá-se o nome de teranóstico (MUTHU *et al.*, 2014). O uso de micelas com função teranóstica permite a visualização da distribuição das micelas no interior do corpo e no tumor em tempo real possibilitando a otimização do protocolo de tratamento de acordo com as características particulares dos tumores de cada paciente. Diante do exposto, o desenvolvimento de sistemas teranósticos é promissor do ponto de vista do desenvolvimento de uma medicina personalizada, que busca tratar o paciente na sua individualidade para obter um resultado final mais satisfatório (KAIDA *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2012).

Como descrito anteriormente, a incorporação de agentes quimioterápicos como o PTX em nanocarreadores micelares possui diversas vantagens em relação à quimioterapia sistêmica e permite uma encapsulação e entrega eficiente do fármaco em tumores, como o câncer de mama. Combinando-se em um sistema multifuncional, à incorporação de um agente diagnóstico, como um radioisótopo, como o ^{99m}Tc , obtém-se um sistema com propriedades adequadamente viável para tratar e diagnosticar simultaneamente tumores sólidos.

Tabela 3 – Propriedades físico-químicas e biológicas de micelas carreadoras de PTX.

Composição	Características físico-químicas			Estudos de biodistribuição (técnica utilizada)	Referência
	Diâmetro (nm)	Potencial Zeta (mV)	CMC (mol/L)		
PEG ₅₀₀₀ , ácido cólico e lisina (Telodendrímico)	20-60	-1,62 ±1,46	ND	Captação inicialmente elevada no coração, fígado e pulmão; após 48h apresenta acúmulo favorecido no tumor. (microSPECT/CT)	XIAO <i>et al.</i> , 2009; XIAO <i>et al.</i> , 2012
PEG ₅₀₀₀ -Ebelin	20-30	ND	0,35x10 ⁻⁶	Imagens mostraram reduzida captação no fígado e baço e acentuada no tumor, com aumento do sinal até 24h após injeção. (NIRF)	LU <i>et al.</i> , 2013
DSPE- PEG ₂₀₀₀ /TPGS	~11	ND	ND	Acúmulo de 3,5 vezes superior no tumor comparado com o fármaco livre (CLAE e NIRF)	KATRAGADDA <i>et al.</i> , 2013.
PEG ₅₀₀₀ -Fmoc	25-30	1,07 ± 0,28	0,996x10 ⁻⁶	Moderada captação no fígado e pulmão e elevada captação na região tumoral. (NIRF)	ZHANG <i>et al.</i> , 2014.
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -	~20	ND	ND	Imunomicelas acumularam no tumor	TORCHILIN <i>et al.</i> ,

2C5 (Imunomicelas)				mais que as micelas normais e que o fármaco livre. (contador gama e CLAE)	2003.
Pluronic® P105	22,3 ± 0,3	-1,5 ± 0,2	ND	O PTX veiculado nas micelas apresentou acúmulo preferencial na região tumoral, quando comparado com os fármacos livres. (CLAE)	CHEN <i>et al.</i> , 2015.

Abreviaturas: SPECT/CT – do inglês, *Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography*; NIRF – do inglês, *Near Infrared Fluorescence*; CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; PEG₅₀₀₀Fmoc - PEG₅₀₀₀-lisil-(α -Fmoc- ϵ -t-Boc-lisina)₂; TPGS – succinato de α -tocoferil-poli(etilenoglicol)1000. ND = não determinado

O uso de micelas carreadoras de PTX como uma plataforma teranóstica foi relatado previamente, mostrando características físico-químicas e biológicas favoráveis para a finalidade proposta. Katragadda e colaboradores (2013) descreveram uma ferramenta teranóstica de micelas de contendo DSPE-PEG e PTX na composição, marcadas com indocianina verde (ICG, do inglês *Indocyanine Green*) para o uso na técnica de diagnóstico por imagem infravermelha. A entrega de PTX em um sistema micelar para diagnóstico e tratamento simultâneo também foi relatada por Xiao e colaboradores (2012), onde o sistema foi marcado com ^{125}I (Iodo-125) para obtenção de imagens em SPECT/CT. Micelas de DSPE-PEG marcadas com um radionuclídeo foram relatadas por Lukyanov e colaboradores (2002), entretanto o sistema relatado utiliza na sua composição uma proporção de fosfolípide diretamente modificado com DTPA e marcado com ^{111}In para estudos de biodistribuição e farmacocinética da nanoestrutura.

No presente estudo, propõe-se a radiomarcagem de micelas de DSPE-PEG com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ diretamente na porção terminal do PEG, para o uso em técnicas de imagem por cintilação gama, de forma que a estrutura anfifílica da micela se mantenha mais fidedigna possível, sem possibilidades de interferir na solubilização do PTX no núcleo micelar, possibilitando não somente a avaliação biológica, mas também a sua futura aplicação clínica como uma plataforma teranóstica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma formulação de micelas poliméricas carreadoras de paclitaxel baseadas em fosfolípide e radiomarcadas ^{99m}Tc , e avaliar seu potencial como uma plataforma teranóstica para tumores sólidos.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar um método de preparo de micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀ contendo ou não PTX e otimizar a encapsulação do PTX na formulação.
- Realizar a caracterização físico-química das formulações preparadas quanto ao diâmetro médio, potencial zeta e teor de encapsulação.
- Avaliar a estabilidade físico-química de 7 dias da formulação, em termos de diâmetro médio e teor de encapsulação.
- Sintetizar o polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA.
- Caracterizar o produto da síntese por meio das técnicas de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) e espectroscopia de massas.
- Realizar a radiomarcção de uma formulação DSPE-PEG₂₀₀₀/DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA com ^{99m}Tc e determinar a pureza radioquímica da marcação.
- Avaliar a estabilidade *in vitro* da radiomarcção das micelas em salina e plasma.
- Avaliar a taxa de depuração sanguínea das micelas DSPE-PEG₂₀₀₀/DSPE-PEG₂₀₀₀- ^{99m}Tc -DTPA em camundongos saudáveis.

- Realizar estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas das micelas DSPE-PEG₂₀₀₀/DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA em camundongos sadios e acometidos com tumor de mama da linhagem 4T1.

**CAPÍTULO 1 – DESENVOLVIMENTO
FARMACOTÉCNICO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA DE MICELAS DE DSPE-PEG₂₀₀₀
CONTENDO PACLITAXEL**

1 INTRODUÇÃO

Dentre as diferentes nanoestruturas utilizadas para carrear agentes antineoplásicos fracamente solúveis e como uma plataforma promissora para a entrega direcionada de fármacos e agentes de imagem para diferentes tipos de câncer, as micelas poliméricas preparadas a partir de copolímeros anfifílicos estão entre as mais estudadas (CHEN *et al.*, 2015; LUKYANOV; TORCHILIN, 2004; SAWANT; TORCHILIN, 2010).

O PTX é um agente antineoplásico altamente hidrofóbico, cujo mecanismo de ação principal envolve a estabilização dos microtúbulos, o que leva ao bloqueio da fase mitótica da divisão celular e, posteriormente, à apoptose (WANG *et al.*, 2015). Esse fármaco tem sido amplamente utilizado no tratamento de variados tipos de tumores como mama, pulmão, ovário, cólon, cabeça e pescoço e sarcoma de Kaposi (ZHANG *et al.*, 2013). Em função de sua baixa solubilidade aquosa, o desenvolvimento de formulações para a administração endovenosa é bastante limitado e micelas poliméricas apresentam um sistema potencial para carrear o PTX.

Micelas poliméricas são partículas coloidais de tamanho nanométrico, compreendendo a faixa de 5 a 100 nm, constituídas de monômeros de unidades copoliméricas anfifílicas, que se formam espontaneamente a partir de CMC (MOHAMED *et al.*, 2014; OERLEMANS *et al.*, 2010). Sabe-se que a presença de radicais lipídicos constituindo a porção hidrofóbica do monômero, como o DSPE, proporciona vantagens quando comparados com as micelas poliméricas convencionais. A presença das duas cadeias de ácido graxo do DSPE aumenta as interações hidrofóbicas, o que pode contribuir para a estabilidade do sistema (SAWANT; TORCHILIN, 2010). O PEG é o polímero mais comumente utilizado para compor a parte hidrofílica de uma micela, devido a sua alta solubilidade em água, sua biocompatibilidade e baixa toxicidade. Além disso, sua capacidade de proporcionar uma eficiente proteção estérica minimiza interações com células, enzimas e proteínas, incluindo as opsoninas responsáveis por ativar o SFM (OERLEMANS *et al.*, 2010). Nesse sentido, com o presente capítulo teve-se por

objetivo desenvolver e caracterizar do ponto de vista físico-químico uma formulação micelar composta de DSPE-PEG₂₀₀₀ como um sistema carreador de PTX.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O DSPE-mPEG₂₀₀₀ foi adquirido da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O PTX foi fornecido pela Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Brasil) com pureza maior que 97%. Cloreto de sódio P.A. foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha) e clorofórmio P.A. foi adquirido da Synth (São Paulo, Brasil). Pireno puríssimo P.A. (pureza $\geq 99,0\%$) foi obtido da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Acetonitrila e álcool isopropílico grau HPLC foram obtidos da Tedia Company (Ohio, EUA). A água utilizada foi purificada utilizando o equipamento de destilação e deionização Milli-Q[®] (Millipore, USA).

2.2 Métodos

2.2.1 Determinação da CMC

A CMC do DSPE-PEG₂₀₀₀ foi determinada, a 25 °C, por um método espectrofluorimétrico utilizando pireno puríssimo P.A. como sonda fluorescente.

Uma alíquota de 10 mL de uma solução clorofórmica de DSPE-PEG₂₀₀₀, a $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L, foi colocada em um balão de fundo redondo e evaporada em um rotaevaporador até a formação de um filme fino. Esse foi hidratado com 10 mL água purificada e a solução formada foi utilizada como solução-mãe para as diluições.

Separadamente, em tubos de ensaio de vidro, com o auxílio de pipetador automático, foi adicionado o equivalente a 1 mg de pireno, partindo de uma solução de pireno (50 mg/mL) em clorofórmio. O clorofórmio foi evaporado à temperatura ambiente em capela de exaustão, e logo após, alíquotas crescentes da solução-mãe de DSPE-PEG₂₀₀₀ foram transferidas para os tubos e o volume foi completado para 3,0 mL com água purificada, conforme descrito na **Tabela 1.1**.

Os tubos foram deixados à temperatura ambiente *overnight* sob agitação. Em seguida, as amostras foram filtradas em filtros de 0,22 µm para a retirada do pireno insolúvel. A intensidade de fluorescência das amostras foi avaliada nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 339 e 390 nm, respectivamente, utilizando um espectrômetro de fluorescência Cary eclipse (Varian, Inc. EUA).

Tabela 1.1 – Diluições necessárias para determinação da CMC.

Amostra	Concentração de DSPE-PEG ₂₀₀₀ (mol/L)	Volume da solução-mãe (µL)	Volume de água (µL)
1	0	0	3000
2	1,0 x 10 ⁻⁶	30	2970
3	2,5 x 10 ⁻⁶	75	2925
4	5,0 x 10 ⁻⁶	150	2850
5	7,5 x 10 ⁻⁶	225	2775
6	1,0 x 10 ⁻⁵	300	2700
7	2,5 x 10 ⁻⁵	750	2250
8	5,0 x 10 ⁻⁵	1500	1500
9	7,5x10 ⁻⁵	2250	750
10	1,0x10 ⁻⁴	3000	0

2.2.2 Padronização do método de preparo das micelas poliméricas

Foram preparadas micelas contendo ou não PTX (micelas brancas) pelo método de evaporação do solvente (SAWANT; TORCHILIN, 2010; WANG *et al.*, 2010).

Para o preparo das micelas brancas, primeiramente, uma solução clorofórmica de DSPE-PEG₂₀₀₀ foi transferida para um balão de fundo redondo e o solvente foi evaporado em um rotaevaporador Buchi Labortechnik AG CH-9233, modelo R-210,

acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça). Os parâmetros utilizados para evaporação foram: rotação de 130 rpm, com a finalidade de formar um filme uniforme; banho-maria a 30°C e pressão de 131 mbar aproximadamente, para acelerar a evaporação. O processo de evaporação rotativo permitiu a formação de um filme fino e uniforme na parede do balão e o mesmo foi hidratado com solução salina 0,9% (p/v) pH 7,4. Para auxiliar o processo de hidratação e formação espontânea das micelas, o balão foi colocado em banho-maria a 40 °C por 5 minutos e, em seguida, submetido a agitação com auxílio de um vórtex a 1000 rpm por 3 minutos.

Para o preparo das micelas contendo PTX, uma solução clorofórmica de PTX foi transferida para o balão de fundo redondo, juntamente com o DSPE-PEG₂₀₀₀. As etapas posteriores foram procedidas como no preparo das micelas brancas. Por fim, foi realizada uma etapa de purificação, para remoção do PTX não encapsulado. As formulações de micelas contendo PTX foram filtradas em filtro de seringa hidrofílico de porosidade 0,22 µm (Millipore, EUA).

2.2.2.1 Otimização do processo de calibração do diâmetro das nanopartículas

Com a finalidade de padronizar o diâmetro das nanoestruturas, as formulações foram submetidas à calibração utilizando um processador ultrassônico de alta intensidade (Cole-Parmer Instrument Company, EUA). As micelas foram expostas a sonda de titânio em amplitude de 21%. Diferentes tempos de exposição foram avaliados (5, 7 e 10 minutos), além de micelas sem exposição ao ultrassom, consideradas tempo igual a 0. Os parâmetros avaliados foram o diâmetro e a possível perda de PTX encapsulado.

2.2.3 Avaliação do diâmetro

2.2.3.1 Espalhamento dinâmico da luz

O diâmetro médio (DM) das nanoestruturas foi obtido pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS do inglês *Dynamic Light Scattering*), a 25 °C, a um ângulo de 90°. Para os testes de padronização do método utilizou-se o equipamento Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Inglaterra). Para as medidas, as amostras foram diluídas 10 vezes em solução salina 0,9% (p/v) previamente filtrada em filtro de 0,45 µm. Para os demais testes utilizou-se o equipamento Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra), sem necessidade de diluição prévia da amostra.

O diâmetro das nanoestruturas foi avaliado segundo a distribuição por volume ou número de partículas equivalentes. A partir do resultado de distribuição do diâmetro das partículas, foram obtidos os valores de diâmetro inferior ($D_{N\%}$) a 100%, 90%, 50% e 10% ($D_{100\%}$, $D_{90\%}$, $D_{50\%}$ e $D_{10\%}$, respectivamente), os quais significam que no valor em porcentagem de “N%” de partículas, o diâmetro é igual ou inferior ao valor de “D” (LOVELYN; ATTAMA, 2011).

2.2.3.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

A análise de DM também foi realizada pela técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS, do inglês *Small Angle X-ray Scattering*). A análise foi executada utilizando um colimador de feixe, de comprimento de onda fixo igual a 1,55 Å (8 keV), e um detector 2D Pilatus 300K, posicionado a uma distância de 0,5 m da amostra. O intervalo de q analisado situou-se entre $0,05 \text{ nm}^{-1}$ e 2 nm^{-1} . Este estudo foi realizado na linha de luz SAXS-1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, São Paulo). Todas as amostras foram analisadas à temperatura ambiente (25 °C).

As amostras líquidas (micela branca e micela com PTX) foram injetadas diretamente em uma célula com temperatura controlada e vácuo, constituída de duas janelas de mica separadas por 1 mm e logo em seguida foram analisadas. As imagens 2D

obtidas no detector, foram normalizadas e convertidas em perfis de I(q) por q utilizando o software OriginPro 8.

2.2.4 Avaliação do teor de PTX

O teor de PTX encapsulado na formulação foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e as condições cromatográficas foram: sistema eluente constituído de acetonitrila:água, na proporção de 55:45 (v/v); coluna de fase reversa Lichrospher[®], C18, 5 µm, 4 mm x 25 cm (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha); fluxo de 1,2 mL/min; temperatura de 25 °C; volume de injeção igual a 10 µL. O equipamento utilizado consistiu em um módulo de bomba isocrática Waters 515 (Milford, EUA); injetor automático Waters 717 Plus (Milford, EUA) e detector UV-Vis Waters (Milford, EUA).

Para o preparo das amostras para CLAE, foi utilizado álcool isopropílico na proporção de 4:1 (v/v) em relação ao volume de amostra. Esse procedimento foi realizado com a finalidade de solubilizar os componentes da formulação e abrir as nanoestruturas para liberar o PTX a ser quantificado. Em seguida, a preparação foi diluída com o sistema eluente, filtrada em filtro de seringa hidrofílico de porosidade 0,45 µm (Millipore, EUA) e injetada no cromatógrafo.

A partir da área sob a curva (ASC) obtida, foi calculada a concentração de PTX (µg/mL) utilizando a equação da reta (equação 1.1) relatada abaixo. O método de doseamento foi validado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (BARBOSA *et al.*, 2015).

$$\text{Equação (1.1)} \quad y = 19495x - 8052$$

Onde y é a ASC obtida e x é a concentração de PTX.

Em seguida, determinou-se a porcentagem de fármaco encapsulado utilizando a equação 1.2. Para o cálculo, obteve-se o teor de fármaco nas micelas sem purificar (PTX Total) e o teor de PTX nas micelas purificadas (PTX encapsulado).

Equação (1.2)

$$TE (\%) = \frac{\text{PTX encapsulado}}{\text{PTX total}} \times 100$$

Onde, TE (%) representa o teor de PTX encapsulado.

2.2.5 Avaliação do Potencial zeta

O potencial zeta das partículas foi determinado pela técnica de DLS associado à mobilidade eletroforética, à temperatura de 25°C, pH 7,0 e ângulo de incidência do laser de 90°, utilizando o equipamento Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra). As amostras foram diluídas 10 vezes em solução salina 0,9% (p/v) previamente filtrada em filtro de 0,45 µm.

2.2.6 Otimização da encapsulação do PTX

Durante a padronização do método de preparo, baseado em dados da literatura (WANG *et al.*,2010), foi utilizada uma concentração teórica de PTX igual a 0,5 mg/mL. Com o intuito de encapsular quantidades maiores de fármaco, foram avaliadas as concentrações teóricas de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 1,5 mg/mL de PTX.

As formulações micelares foram preparadas conforme descrito anteriormente e caracterizadas quanto ao DM, o TE e a concentração de PTX encapsulada.

2.2.7 Avaliação de estabilidade

A fim de se avaliar a permanência do fármaco no interior das nanoestruturas, as amostras contendo as diferentes concentrações de PTX, foram armazenadas a 4°C, e foram avaliadas segundo os mesmos parâmetros relatados anteriormente, após 1, 2 e 7 dias do preparo.

Para a avaliação do TE, a cada dia avaliado, os lotes de formulações foram novamente purificados em filtro de 0,22 µm e dosados por CLAE, conforme descrito no item 2.2.4.

2.2.8 Análise estatística

Todos os dados foram expressos com média ± desvio padrão. Para a verificação da normalidade da variância utilizou-se o teste de D'agostino e Pearson. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas, quando adequadas, pela equação: $y = \log \text{variável}$. Os dados foram testados por ANOVA seguida de um pós-teste de Tukey. Para todas as análises foi utilizado o programa *GraphPadPrism 5.0*. Adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da concentração de DSPE-PEG₂₀₀₀ a ser utilizada no preparo das formulações

Sabe-se que micelas são formadas apenas quando a concentração das suas unidades anfifílicas atinge um limiar de concentração, ou seja, a sua CMC (MOHAMED *et al.*, 2014). Nesse sentido, para se definir a concentração de DSPE-PEG₂₀₀₀ a ser utilizada na composição das micelas, primeiramente foi necessário estabelecer a CMC do mesmo.

A técnica escolhida para determinar a CMC no presente estudo foi o método de fluorescência utilizando o pireno como sonda. Nesse método, o pireno migra a partir do meio aquoso polar para os núcleos micelares apolares durante a micelização, sendo assim, o aumento na intensidade de emissão da fluorescência versus a concentração polimérica, indica a mudança de unímeros para uma estrutura micelar (LUKYANOV; TORCHILIN, 2004; WU *et al.*, 2013).

Para a determinação da CMC do DSPE-PEG₂₀₀₀, foram avaliadas as intensidades de fluorescência em dez concentrações do mesmo em meio aquoso. As intensidades de fluorescência correspondente a cada concentração estão apresentadas na **Tabela 1.2**.

Tabela 1.2 – Determinação das intensidades de fluorescência de diferentes concentrações de DSPE-PEG₂₀₀₀.

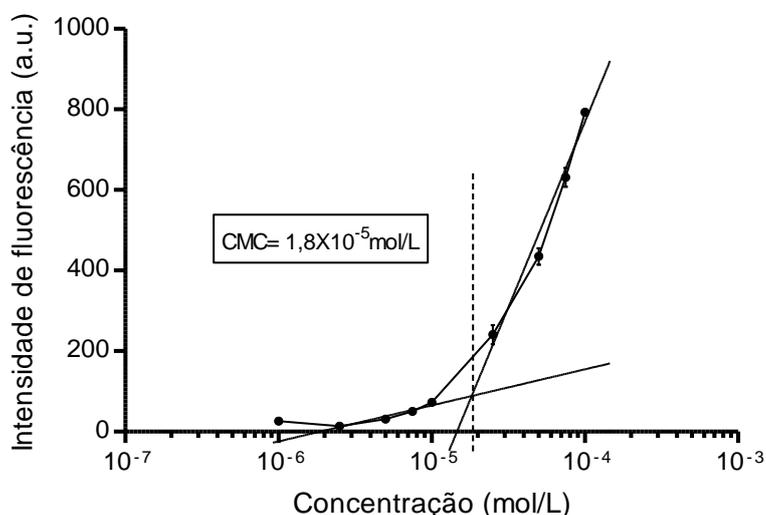
Concentração (mol/L)	Intensidade de fluorescência
0	19,5 ± 1,4
1,0 x 10 ⁻⁶	26,1 ± 6,5
2,5 x 10 ⁻⁶	13,4 ± 4,5
5,0 x 10 ⁻⁶	31,3 ± 2,2
7,5 x 10 ⁻⁶	50,7 ± 9,0
1,0 x 10 ⁻⁵	73,1 ± 8,5
2,5 x 10 ⁻⁵	240,9 ± 23,9
5,0 x 10 ⁻⁵	435,2 ± 20,3
7,5 x 10 ⁻⁵	630,9 ± 23,4
1,0 x 10 ⁻⁴	793,1 ± 4,7

Dados expressos como média ± DP; n=3

O valor da CMC é determinado na concentração em que o primeiro platô (**Figura 1.1**) da intensidade fluorescência termina e que o segundo inicia. Portanto, o valor encontrado para a CMC foi igual a $1,8 \times 10^{-5}$ mol/L. Dados na literatura relatam valores de CMC iguais a $1,1$ e $1,6 \times 10^{-5}$ mol/L, nesse sentido, o valor encontrado condiz com o descrito anteriormente na literatura (LUKYANOV; TORCHILIN, 2004; SAWANT *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010).

A determinação da CMC é particularmente importante para avaliar sua potencial aplicação biológica, uma vez que após diluição com grande volume de sangue, as micelas obtidas a partir de copolímeros com altos valores de CMC podem se dissociar e liberar o conteúdo encapsulado (GRALLERT *et al.*, 2102; SHUAI *et al.*, 2004). Nesse sentido, levando em consideração que a volemia de um ser humano é igual a 75 mL/kg, optou-se por preparar uma formulação micelar em uma concentração passível de sofrer essa diluição sem atingir valores inferiores a CMC. Sendo assim, decidiu-se preparar as micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀ na concentração 10 mmol/L, uma concentração cerca de 500 vezes o valor da CMC e portanto, passível de sofrer diluição ao ser administrado na corrente sanguínea, sem necessidade de administração de um volume muito elevado.

Figura 1.1 – Intensidade de fluorescência do pireno em função da concentração de DSPE-PEG₂₀₀₀ para determinação da CMC.



3.2 Caracterização físico-química de micelas brancas de DSPE-PEG₂₀₀₀

A princípio testou-se o preparo das micelas brancas de DSPE-PEG₂₀₀₀ pelo método de evaporação do solvente, um método simples e rápido, para verificar se o mesmo seria apropriado. A escolha do método de preparo depende basicamente da solubilidade do copolímero a ser utilizado e sendo o DSPE-PEG₂₀₀₀ facilmente solúvel em solventes voláteis como o clorofórmio, o método de evaporação é adequado e frequentemente utilizado para esse fim (SAWANT *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010; SAWANT; TORCHILIN, 2010).

A concentração lipídico-polimérica utilizada foi a determinada a partir da CMC (10 mmol/L). A preparação foi avaliada pela determinação do DM e do potencial zeta.

A partir dos valores referentes às distribuições pelo volume das partículas equivalentes, foi calculada a frequência acumulada (%) dos diâmetros cujos dados estão apresentados na **Figura 1.2**. Baseado nos resultados obtidos dos D_{N%} pode-se inferir que as micelas brancas de DSPE-PEG₂₀₀₀ apresentam uma distribuição uniforme, contendo 90% das partículas com diâmetro inferior a 13,4 nm e 10% com diâmetro inferior a 7,4 nm e um diâmetro mediano igual a 9,8 nm. A **Figura 1.3**, extraída do Zetasizer software (Malvern Instruments, Inglaterra), representa o

percentual de micelas brancas obtidas por análise de volume em função do diâmetro das partículas. Pode-se observar que a formulação apresenta distribuição unimodal caracterizando uma população homogênea de partículas.

Figura 1.3 – Distribuição do diâmetro de micelas brancas.

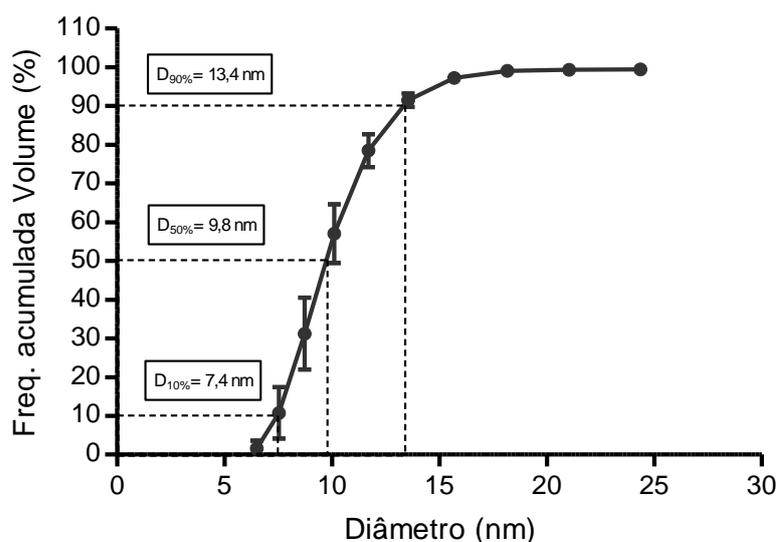
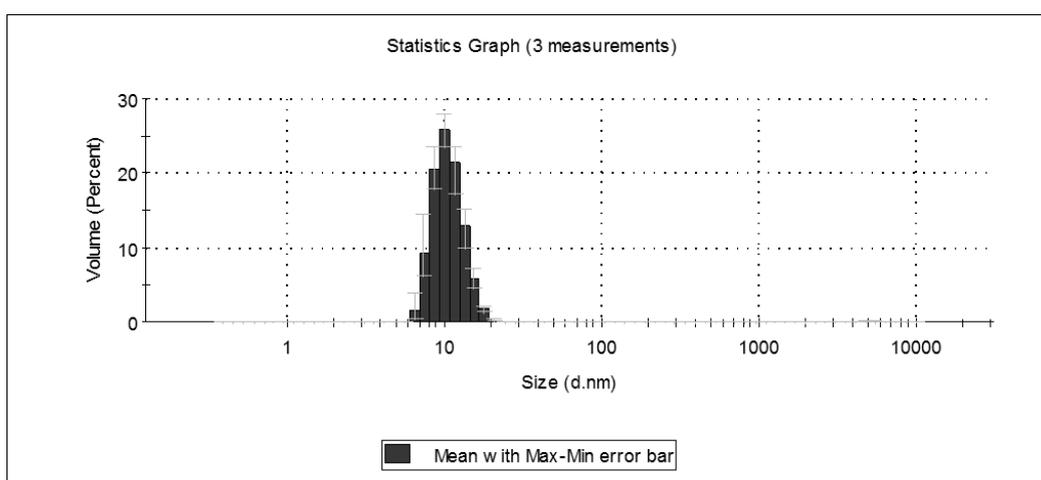


Figura 1.2 – Percentual de micelas brancas em volume em função do diâmetro.



Lukyanov e Torchilin (2004) reportaram em um artigo de revisão bibliográfica, que micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀ possuem DM entre 7 e 20 nm. Gill e colaboradores (2012) em um estudo com micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀, encontraram DM igual a 12 ± 5 nm; nesse sentido, pode-se afirmar que o DM encontrado está de acordo com o descrito na literatura para esse tipo de nanoestrutura.

Quanto ao potencial zeta, foi encontrado um valor igual a $-2,7 \pm 1,1$ mV. O valor de potencial zeta encontrado, próximo da neutralidade sugere que a presença do PEG₂₀₀₀ na superfície das micelas em meio aquoso forma uma camada de solvatação que anularia quaisquer possíveis cargas das nanoestruturas, além de contribuir para a estabilidade das micelas (HU *et al.*, 2007).

3.3 Caracterização físico-química de micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀ contendo PTX

Assim como as micelas brancas, as micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀ contendo PTX foram preparadas pelo método de evaporação do solvente conforme descrito na literatura (WANG *et al.*, 2010). No intuito de otimizar e padronizar o preparo, a homogeneização por processador ultrassônico foi testada como método de calibração do diâmetro das nanoestruturas. As micelas foram submetidas a diferentes tempos de exposição à sonda (0, 5, 7 e 10 minutos) e caracterizadas em termos físico-químicos quanto ao diâmetro, à distribuição do diâmetro e ao TE.

O procedimento de calibração de partículas por processador ultrassônico envolve intensas vibrações mecânicas as quais agitam as partículas no meio líquido e devido às altas forças de cisalhamento empregadas, espera-se que o diâmetro das partículas seja reduzido de maneira homogênea (RICHARDSON *et al.*, 2007). Sendo assim, o diâmetro das micelas expostas ao processador ultrassônico foi avaliado de acordo com a sua distribuição em volume de partículas equivalentes.

A partir das distribuições obtidas pelo percentual em volume das nanoestruturas, foi calculada a frequência acumulada (%) dos diâmetros das micelas expostas ao ultrassom em diferentes tempos. Gráficos correlacionando o diâmetro com a frequência acumulada em volume foram plotados e os valores de $D_{N\%}$ para cada um

dos tempos de exposição foram extraídos (**Tabela 1.3**). O tempo 0 corresponde à formulação sem exposição ao ultrassom.

Tabela 1.3 – Distribuição de diâmetros de partículas das formulações de micelas de PTX submetidas a diferentes tempos exposição ao processador ultrassônico.

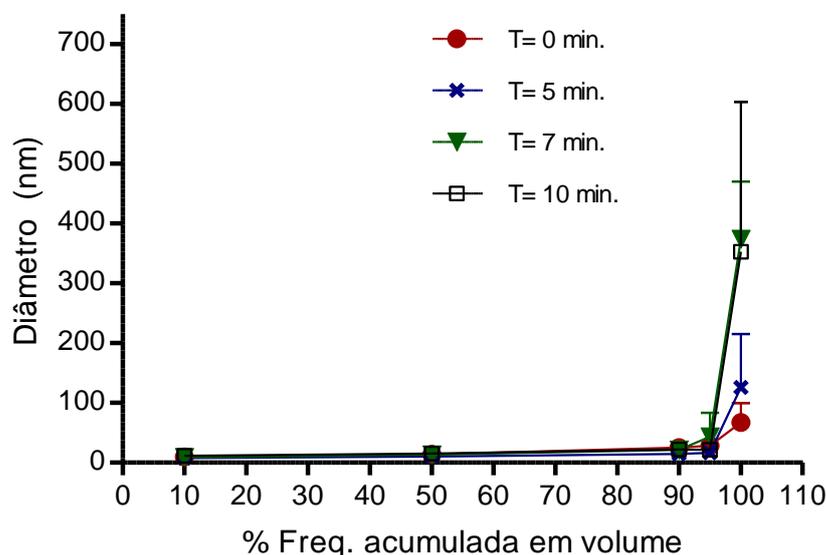
Tempo de exposição (min)	D _{10%} (nm)	D _{50%} (nm)	D _{90%} (nm)
0	9,7 ± 0,8	14,1 ± 2,4	25,5 ± 11,6
5	7,7 ± 0,9	10,6 ± 0,9	14,8 ± 0,6
7	9,3 ± 2,7	13,4 ± 3,0	21,6 ± 5,0
10	11,4 ± 2,6	15,3 ± 0,8	22,0 ± 3,7

Valores expressos como média ± Desvio Padrão (DP); n = 3

Ao analisar a **Tabela 1.3**, pode-se observar que os diâmetros encontrados condizem com o descrito na literatura (na faixa de 7 a 20 nm) para micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀ (DABHOLKAR *et al.*, 2006; LUKYANOV; TORCHILIN, 2004; MUSACCHIO *et al.*; 2009). Além disso, pode-se dizer que encontram na faixa ideal de tamanho para escapar dos mecanismos de eliminação do organismo, contribuindo para um tempo de circulação prolongado, uma vez que partículas com diâmetros inferiores a 5 – 10 nm são rapidamente eliminadas por depuração renal, e partículas muito grandes são facilmente reconhecidas pelo SFM e removidas pelas células fagocitárias (CROY; KWON, 2006; GIACOMELLI *et al.*, 2011).

Nenhuma diferença significativa entre os diâmetros ($p > 0,05$), quando comparado os diferentes tempos de exposição com o tempo 0 foi detectada. Entretanto, apesar de não ocorrerem mudanças nas distribuições dos diâmetros com o aumento do tempo de exposição ao processador ultrassônico, a análise do valor de D_{100%} (**Figura 1.4**), ou seja, a percentagem onde se tem o valor do maior diâmetro, demonstra a presença de partículas maiores quando comparado à formulação sem exposição ao ultrassom (tempo = 0 minutos).

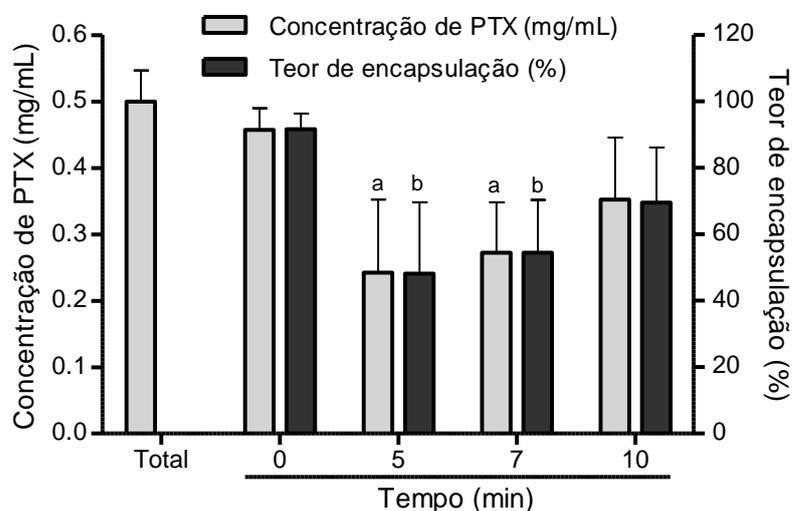
Figura 1.4 – Avaliação da distribuição do diâmetro de micelas contendo PTX após a exposição ao processador ultrassônico.



Outro parâmetro importante a ser avaliado em um carreador de fármacos é o seu TE. A concentração teórica de fármaco utilizada no preparo das micelas para este estudo foi de 0,5 mg/mL de PTX. Para a avaliação do TE, primeiramente determinou-se a concentração de PTX das amostras expostas ao ultrassom nos diferentes tempos e a concentração de fármaco em uma amostra sem passar pelas etapas de calibração e purificação, essa amostra foi denominada “Total”. A partir da concentração do “Total”, obteve-se o TE das micelas nos diferentes tempos de exposição ao ultrassom. Os resultados encontrados estão representados na **Figura 1.5**.

O TE obtido no tempo 0 após purificação do sistema foi de $91,7 \pm 4,7\%$ em relação ao total de fármaco adicionado no preparo da formulação. Ao se avaliar a exposição das micelas ao ultrassom, observou-se uma perda significativa ($p \leq 0,05$) de PTX encapsulado nos tempos 5 e 7 minutos. O aumento do tempo de exposição para 10 minutos resultou em uma redução da perda de PTX não apresentando diferença significativa quando comparado ao tempo 0.

Figura 1.5 - Variação das concentrações de PTX e do TE em micelas expostas ao ultrassom em diferentes tempos.



Valores expressos como média \pm DP (n=3). ^aRepresenta diferença significativa em comparação com o total. ^bRepresenta diferença significativa quando comparado com o tempo 0. O nível de significância foi considerado para valores de $p \leq 0,05$ (teste de Tukey).

Nesse sentido, considerando a ausência de alterações significativas no diâmetro das nanoestruturas quando comparado às micelas sem exposição ao ultrassom e uma perda significativa do fármaco encapsulado provocada pela submissão do sistema ao processo de calibração, concluiu-se que o processo de sonicação se mostrou prejudicial e/ou desnecessário ao preparo das micelas de PTX. Portanto, optou-se por preparar as micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀ contendo PTX sem a etapa de calibração, uma vez que produz nanoestruturas com diâmetro adequado, distribuição uniforme e TE satisfatório.

Vale mencionar que, de forma semelhante ao observado para as micelas brancas, as micelas contendo PTX na concentração de 0,5 mg/mL apresentaram um potencial zeta próximo da neutralidade ($-3,0 \pm 0,34$ mV). Esse fato pode ser explicado pela presença do PEG₂₀₀₀ na parte externa na nanoestrutura (CROY; KWON, 2006) e está de acordo com o encontrado (-4 mV) por Skidan e colaboradores (2009) para micelas de mesma composição.

3.4 Otimização da encapsulação do PTX

Depois de estabelecido um método de preparo para as micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀ contendo PTX, foram preparadas formulações micelares (n = 3) nas concentrações teóricas de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 1,5 mg/mL de PTX com a finalidade de otimizar a quantidade de PTX encapsulado no núcleo das micelas. As formulações foram avaliadas segundo o DM e TE logo após o preparo das mesmas e os resultados estão representados na **Tabela 1.4**.

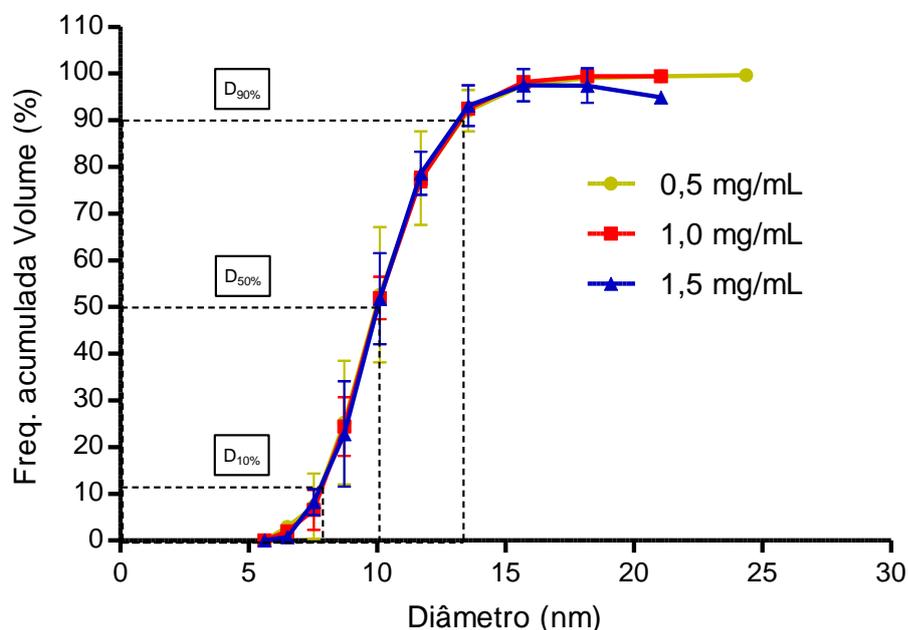
Os valores de DM apresentados na **Tabela 1.4** correspondem à distribuição percentual por número dos diâmetros das amostras analisadas, enquanto os valores de D_{N%}, à distribuição percentual por volume (**Figura 1.6**). Pode-se observar, portanto, que os resultados de DM e de D_{N%} estão em concordância, uma vez que os valores de D_{50%}, os quais representam uma mediana dos diâmetros, são similares aos valores de DM encontrados. Nesse sentido, a partir desse item, os valores referentes ao diâmetro analisados por DLS, serão sempre representados pela avaliação da distribuição percentual por número e estarão sempre referidos por DM.

Tabela 1.4 - Parâmetros físico-químicos obtidos para as formulações de micelas de PTX preparadas a partir de diferentes concentrações do fármaco.

Concentração Teórica de PTX	DM (nm)	D _{90%} , D _{50%} e D _{10%}	Concentração de PTX (mg/mL)	TE (%)
0,5 mg/mL	10,2 ± 0,9	13,3; 9,8; 7,8	0,41 ± 0,06 ^a	91,3 ± 5,8
1,0 mg/mL	10,2 ± 0,4	13,1; 10,4; 7,8	0,89 ± 0,06 ^a	96,3 ± 2,1
1,5 mg/mL	10,3 ± 0,7	13,3; 10,0; 7,8	1,32 ± 0,22 ^{a,b}	94,1 ± 2,8

Valores expressos média ± DP (n=3); ^aRepresenta diferença significativa quando comparado com a concentração de 0,5 mg/mL. ^bRepresenta diferença significativa quando comparado com a concentração de 1,0 mg/mL. O nível de significância foi considerado para valores de p ≤ 0,05 (teste de Tukey).

Figura 1.6 – Avaliação da distribuição dos diâmetros de micelas contendo diferentes concentrações de PTX.



Os resultados demonstraram que o aumento da concentração de PTX não induziu variação significativa ($p \geq 0,05$) no DM dos lotes avaliados. No entanto, um aumento significativo na concentração de PTX encapsulado foi observado. Além disso, um elevado TE (maior que 90%) foi obtido independente da concentração de PTX avaliada.

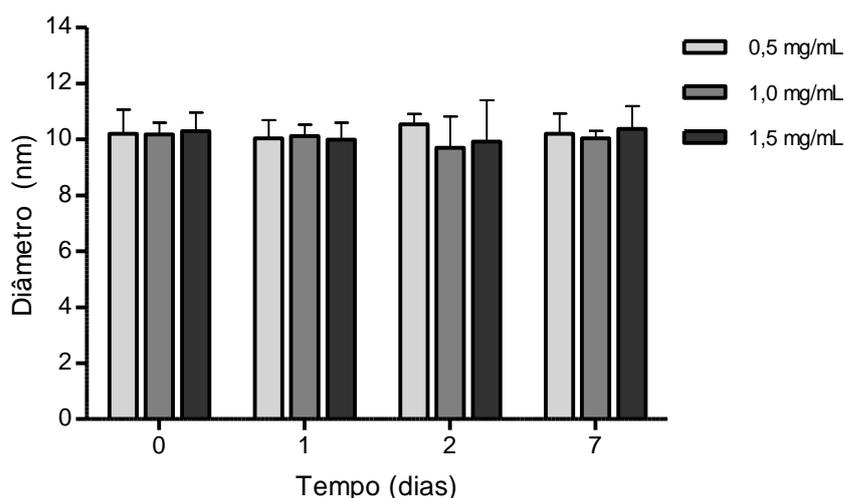
É sabido que quanto maior a quantidade de fármaco encapsulado, maior a potencialidade do sistema (SARISOZEN *et al.*, 2012). No entanto, compreender como o sistema se comporta ao longo do tempo no que diz respeito à alteração no diâmetro bem como à capacidade de retenção do fármaco são fatores importantes para avaliar a estabilidade do mesmo. Diante disso, um estudo de estabilidade por um curto período de tempo foi conduzido.

3.5 Avaliação da estabilidade do sistema micelar

Quanto ao DM, não foram observadas alterações significativas nesse parâmetro. No decorrer dos 7 dias, as formulações se mantiveram estáveis, com DM cerca de

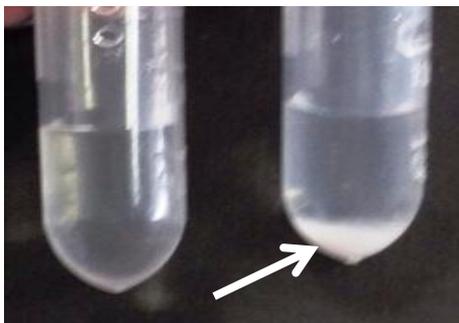
10 nm (**Figura 1.7**), o que indica a ausência de agregados e que o sistema não se desfez no tempo avaliado.

Figura 1.7 – Variação do DM das micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀ preparadas com diferentes concentrações de PTX avaliado ao longo de 7 dias.



Valores expressos como a média \pm DP (n=3).

A ocorrência da perda de PTX nas micelas preparadas, quando houve, foi visível e nitidamente aparente, principalmente nas amostras de maior concentração, a **Figura 1.8** mostra a aparência das micelas antes (à esquerda da figura) e após (à direita da figura) a perda aparente de fármaco, sob forma de precipitado no fundo do eppendorf. Sendo assim, todas as amostras foram novamente purificadas e quantificadas por CLAE. Analisando as **Figuras 1.9 e 1.10**, pode-se observar que ocorre uma liberação significativa ($p \leq 0,05$) de fármaco ao longo dos dias avaliados nas formulações de 1,0 e 1,5 mg/mL, quando comparado com o dia 0 (dia do preparo). Nota-se que após 1 dia a formulação de 1,5 mg/mL já havia perdido cerca de 80% (**Figura 1.9**) do total de fármaco encapsulado. Por outro lado, a formulação contendo PTX na concentração de 0,5 mg/mL, a liberação do fármaco ao longo dos dias foi significativamente menor e os valores de concentração de PTX obtidos durante os 7 dias de avaliação não apresentaram diferença significativa ($p \geq 0,05$) (**Figura 1.10**).

Figura 1.8 – Micelas antes e após perda de PTX.

Na esquerda: micelas sem perda aparente de PTX; na direita: perda de fármaco evidente pela formação do precipitado indicado pela seta branca.

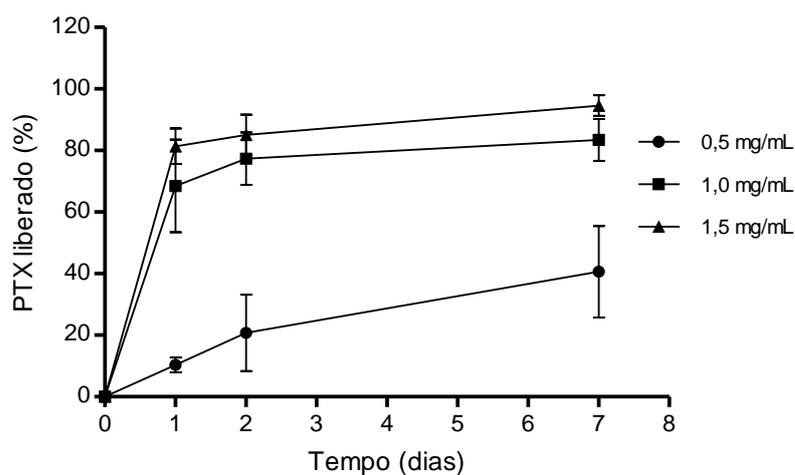
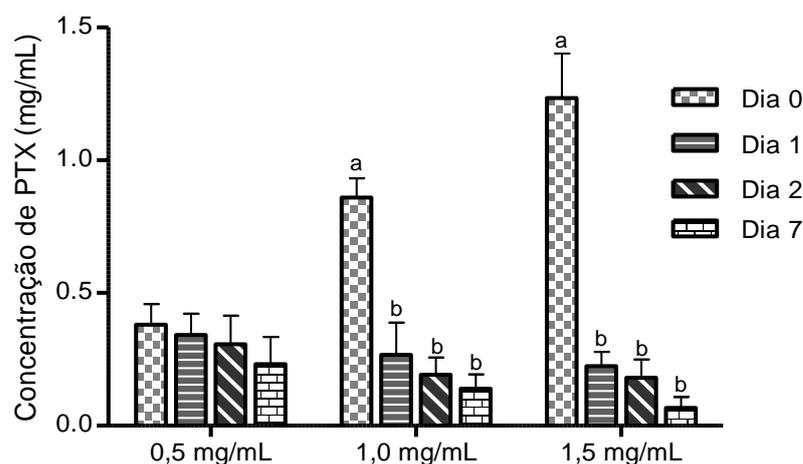
Figura 1.9 – Avaliação da estabilidade do PTX no interior das micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀ em formulações preparadas em diferentes concentrações.

Figura 1.10 – Comparação da concentração de PTX encapsulada em micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀ no dia do preparo e após 1, 2 e 7 dias.



Valores expressos como média \pm DP (n=3); ^aRepresenta diferença significativa comparado com a formulação contendo PTX na concentração de 0,5 mg/mL, considerando o mesmo dia de análise; ^bRepresenta diferença significativa quando comparado à mesma formulação no dia 0.

Observou-se ainda que independente da concentração inicial encapsulada a concentração de PTX no interior das micelas foi semelhante a partir do dia 1 de armazenamento. Embora tenha sido observado um aumento da encapsulação de PTX à medida que concentrações mais altas do fármaco foram utilizadas, essa encapsulação não foi estável, uma vez que não houve diferenças significativas entre as concentrações retidas no interior das micelas nas diferentes formulações, nos dias 1, 2 e 7 avaliados.

Nesse sentido, considerando a melhor estabilidade apresentada pela formulação composta por DSPE-PEG₂₀₀₀ na concentração de PTX igual a 0,5 mg/mL além das características físico-químicas adequadas, essa formulação foi escolhida para todos os estudos subsequentes.

3.6 Avaliação do DM por SAXS

A técnica de SAXS é uma excelente ferramenta para avaliar a estrutura de nanoestruturas, permitindo a obtenção de informações, principalmente, sobre o tamanho, forma e organização interna da estrutura “core-shell” das micelas (GIACOMELLI *et al.*, 2011; SANADA *et al.*, 2013; SATO *et al.*, 2007). Nesse sentido, utilizou-se também essa técnica para a determinação do DM das nanoestruturas.

A **Figura 1.11** representa os difratogramas, no intervalo de q entre 0,05 e 2,0 nm⁻¹, das duas formulações micelares (com e sem fármaco). O vetor de espalhamento “ q ”, correspondente à posição de q -menor na intensidade “ $I(q)$ ”, provê uma estimativa semiquantitativa da distância média intermicelar. Diante disso, o valor da distância do centro de uma micela até o centro da outra pode ser correlacionado ao diâmetro (D) da nanoestrutura. Nesse sentido, o valor de D foi estimado pela equação 1.3 (SATO *et al.*, 2006). Após um total de 20 medidas de cada amostra, obteve-se um valor de D das micelas igual a $10,0 \pm 0,2$ e $9,7 \pm 0,2$ nm, para as micelas brancas e contendo PTX, respectivamente.

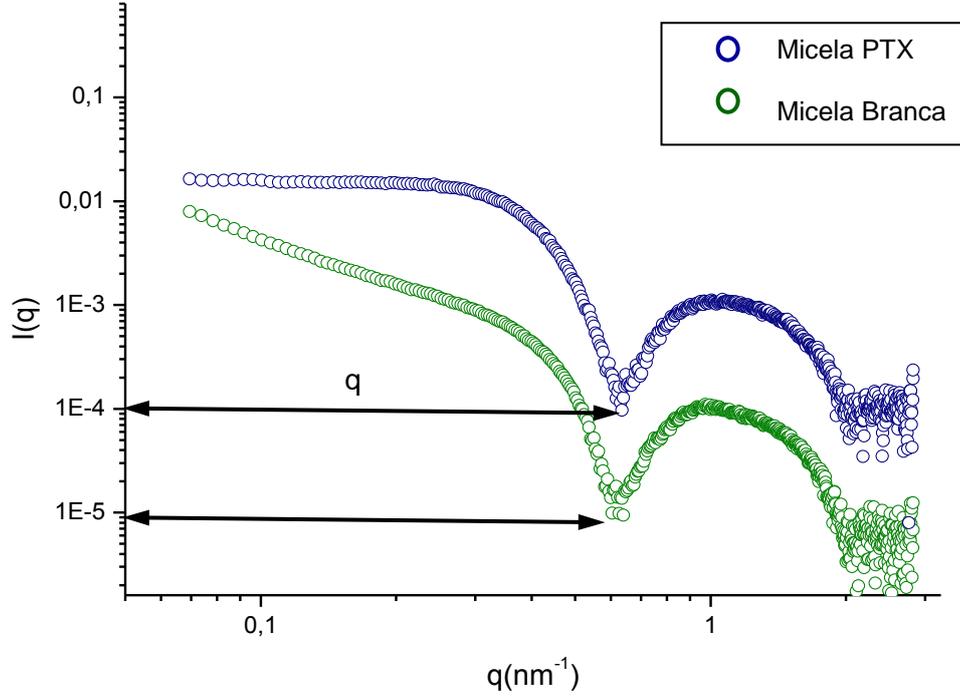
Equação (1.3)

$$D = \frac{2\pi}{Q}$$

Os resultados obtidos por SAXS estão em concordância com os valores encontrados pela técnica de DLS, confirmando, portanto que as micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀ preparadas possuem o diâmetro por volta de 10 nm.

No difratograma das micelas, é possível observar, ainda, a presença de características típicas de estruturas globulares, entretanto, a obtenção de maiores informações a respeito da estrutura das micelas por essa técnica só é permitida após o ajuste de um modelo de análise quantitativa das funções de espalhamento (SATO *et al.*, 2006). Portanto, estudos posteriores serão conduzidos no intuito de determinar a estrutura e a forma das nanopartículas desenvolvidas.

Figura 1.11 – Difratomogramas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo de micelas contendo ou não PTX.



4 CONCLUSÃO

Micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀, brancas e contendo PTX, foram obtidas por um método simples e rápido. Como é conhecido, micelas poliméricas representam um eficiente sistema carreador de fármacos hidrofóbicos, e, no presente estudo, uma formulação micelar contendo PTX foi otimizada. A formulação com composição teórica de 10 mmol/L de complexo fosfolípide-polímero e 0,5 mg/mL de fármaco, apresentou uma alta capacidade de incorporar o PTX, com um elevado teor de encapsulação. Além disso, apresentou características promissoras quanto ao tamanho, uma vez que partículas pequenas, sobretudo na faixa de diâmetro das micelas produzidas (10 nm), são preferencialmente acumuladas em tecido tumoral por meio de direcionamento passivo, devido ao efeito EPR. Ainda, segundo os parâmetros avaliados, não há diferenças físico-químicas entre as micelas brancas e de PTX preparadas, sugerindo que a incorporação do fármaco não altera a estrutura micelar, podendo ser esse, portanto, um sistema robusto para carrear o PTX.

**CAPÍTULO 2 – SÍNTESE DO COMPLEXO DSPE-
PEG₂₀₀₀-DTPA E RADIOMARCAÇÃO DE MICELAS
COM ^{99m}Tc**

1 INTRODUÇÃO

A visualização das alterações moleculares de células neoplásicas é de extrema relevância para se alcançar o sucesso no tratamento. Isso pode ser conseguido por meio de técnicas de imagens não-invasivas como as técnicas de imagiologia molecular, as quais permitem a visualização *in vivo*, a caracterização e quantificação a nível molecular e celular de processos biológicos (XING *et al.*, 2014).

Diferentes modalidades de imagem molecular vêm sendo estudadas e aplicadas para o diagnóstico do câncer bem como avaliação e acompanhamento do tratamento. As técnicas mais comumente utilizadas são a ressonância magnética (WU *et al.*, 2009), o ultrassom (ZHANG *et al.*, 2015) e técnicas de imagens cintilográficas (FLECHSIG *et al.*, 2015; MENDLER *et al.*, 2015).

As técnicas baseadas em radionuclídeos apesar de possuírem baixa resolução espacial, são técnicas de obtenção rápida de imagem, altamente sensíveis e quantitativas (XING *et al.*, 2014). Além disso, há uma variedade de isótopos emissores de radiação gama que podem ser empregados nas técnicas cintilográficas, como o ^{99m}Tc, o ¹¹¹In, o ¹³¹I e o ⁶⁷Ga. O ^{99m}Tc tem sido muito utilizado devido às características relacionadas ao seu baixo custo, além de suas propriedades nucleares que incluem: emissão gama de baixa energia (140KeV) e o tempo de meia vida de 6,02 horas, tempo suficientemente longo para permitir uma preparação farmacêutica e a utilização na obtenção de imagens *in vivo* (DE BARROS *et al.*, 2013; VARSHNEY *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2014). Além disso, o ^{99m}Tc pode ser facilmente complexado com agentes quelantes do tipo poli-aminocarboxilatos multidentados, tais como o DTPA, para o uso como um radiofármaco na obtenção de imagens (HAZARI *et al.*, 2010).

O DTPA é um eficiente agente quelante para íons metálicos da série dos lantanídeos, o qual confere alta estabilidade dos radiofármacos *in vivo*. Além disso, o uso de sistemas de quelação de metais radioativos é importante, também, para prevenir a ocorrência de transquelação por proteínas durante a permanência do radiofármaco *in vivo* (HAZARI *et al.*, 2010; VARSHNEY *et al.*, 2012).

As propriedades promissoras de nanoestruturas carreadoras de fármacos para o tratamento de câncer, principalmente a possibilidade de aumento da captação ativa e passiva no tecido alvo, vêm despertando cada vez mais o interesse de aplicar esses sistemas para fins de diagnóstico (LAMMERS *et al.*, 2010). Esses nanossistemas permitem a entrega de agentes de contraste, tais como os radionuclídeos, com um grande potencial para a detecção de doenças como o câncer, além do acompanhamento da evolução da doença no decorrer do tratamento. Além disso, numa entrega associada de fármaco e agente de imagem, é possível acompanhar a entrega do fármaco à região de interesse, o que permite a construção de um tratamento sob medida, baseado nas características individuais de cada paciente. Essa associação de terapia e diagnóstico é chamada de “teranóstico” (LAMMERS *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2012).

Estudos conduzidos em nosso laboratório demonstraram a capacidade dos átomos de ^{99m}Tc em complexar com DTPA immobilizados na superfície de nanopartículas de sílica indicando a capacidade de utilização deste quelante para marcação de outras nanoestruturas como micelas (DE BARROS *et al.*, 2015). Desta maneira, o elemento radioativo encontra-se firmemente ligado às nanopartículas, possibilitando o acompanhamento *in vivo* das mesmas durante a realização dos estudos cintilográficos. No intuito de agregar à formulação descrita no capítulo anterior a propriedade de identificação do tumor, faz-se necessário desenvolver um conjugado formado pelo DSPE-PEG₂₀₀₀ e pelo agente quelante DTPA para posterior preparação das micelas contendo PTX. Nesse sentido, no presente capítulo será descrito o processo de síntese e caracterização do produto DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA. A presença desse complexo na composição da formulação possibilitará a modificação da superfície das micelas poliméricas com ^{99m}Tc permitindo que esse sistema micelar possa ser utilizado como uma ferramenta teranóstica na terapia do câncer.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O 1,2- diesteraroil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-[amino(polietilenoglicol)-2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂) foi adquirido da Avanti Polar Lipids, Inc (Alabama, EUA). O dianidrido do ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA dianidrido) foi obtido da Sigma-Aldrich Co. (Missouri, EUA). Os solventes piridina e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Labsynth (São Paulo, Brasil) e posteriormente foram tratados para remoção de água residual no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG. O acetato de etila foi adquirido da Tedia Company (Ohio, EUA). A membrana de diálise Spectrapore® foi adquirida da Spectrum Laboratories (Califórnia, EUA). O ^{99m}Tc foi obtido de um gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (IPEN - Brasil). Os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-AldrichCo (Missouri, EUA).

2.2 Métodos

2.2.1 Síntese do DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA

O DTPA dianidrido foi ligado covalentemente ao grupamento amino terminal do DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂, por meio de uma reação de abertura do anidrido cíclico. Na **Figura 2.1** está representada uma proposta de mecanismo para a formação do produto DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA . A ligação covalente do DTPA anidrido a um grupamento NH₂ foi descrita anteriormente por Grant e colaboradores (1989) e foi utilizada como referência nesse trabalho.

O processo utilizado para a obtenção do produto está esquematizado na **Figura 2.2**. Para a síntese do DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA foi utilizado um excesso molar de 25 vezes de DTPA dianidrido em relação ao complexo lípide-polímero e ambos foram, respectivamente, solubilizados em DMSO e piridina (7:3 v/v) e em DMSO somente (ambos os solventes em condição anidra), em recipientes separados. O excesso

molar de DTPA dianidrido foi utilizado com a finalidade de favorecer a ligação de apenas uma molécula de DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ em apenas um dos anéis anidrido da molécula de DTPA. O frasco contendo o DTPA foi colocado sob agitação em banho de óleo à temperatura ambiente, e logo em seguida, ligou-se o aquecimento. Após o início do aquecimento, uma parte da solução contendo o DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ foi adicionada a cada aumento de 25 – 30°C na temperatura, de forma que antes de atingir a temperatura final, toda a solução de reagente já havia sido adicionada. A temperatura do banho foi estabilizada a 100°C e o sistema foi mantido sob agitação por 90 minutos. Após esse tempo, adicionou-se água em excesso molar de 150 vezes ao DTPA, para hidrolisar o anidrido residual, e o sistema foi mantido a 100°C por mais 90 minutos.

Figura 2.1 – Representação do provável mecanismo da síntese do DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA.

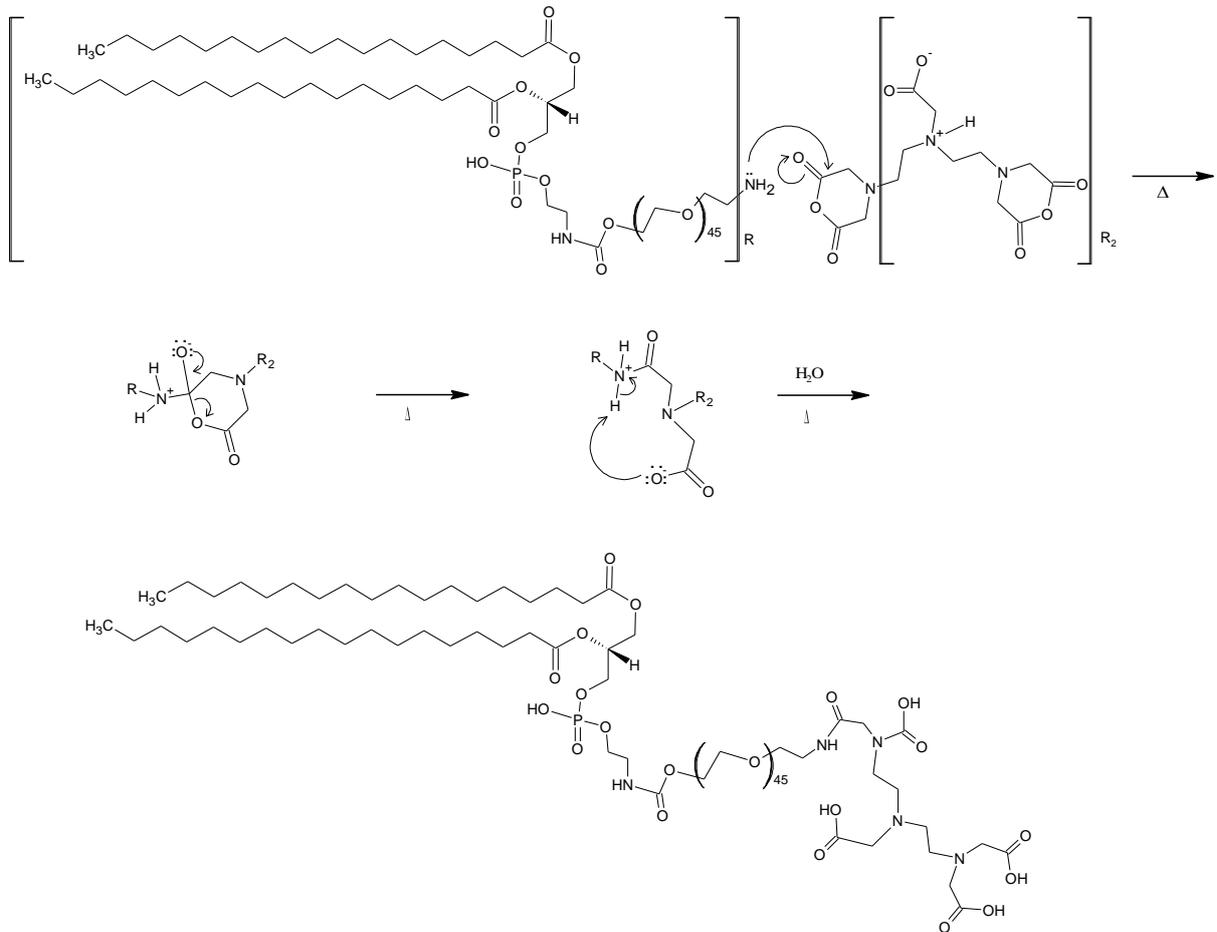
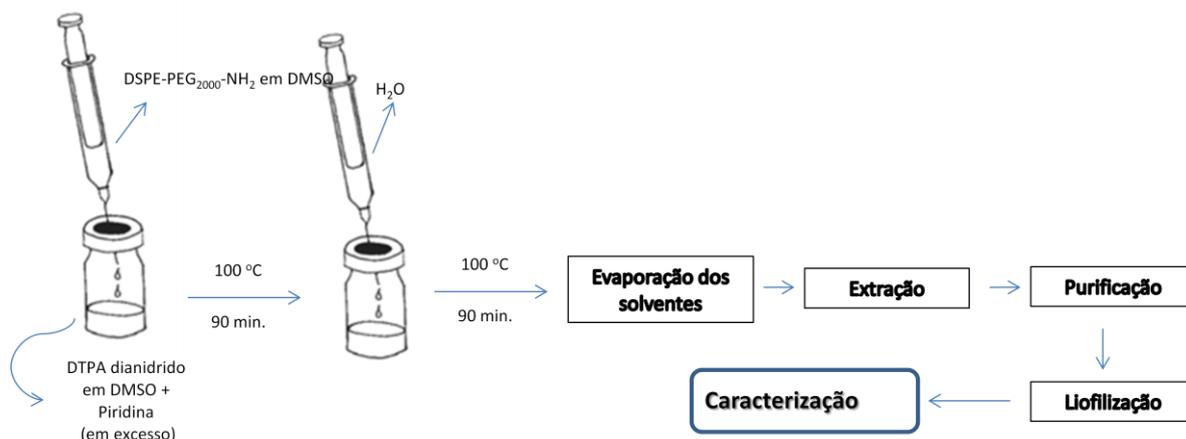


Figura 2.2 – Esquema representativo da processo utilizado para obtenção do produto DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA



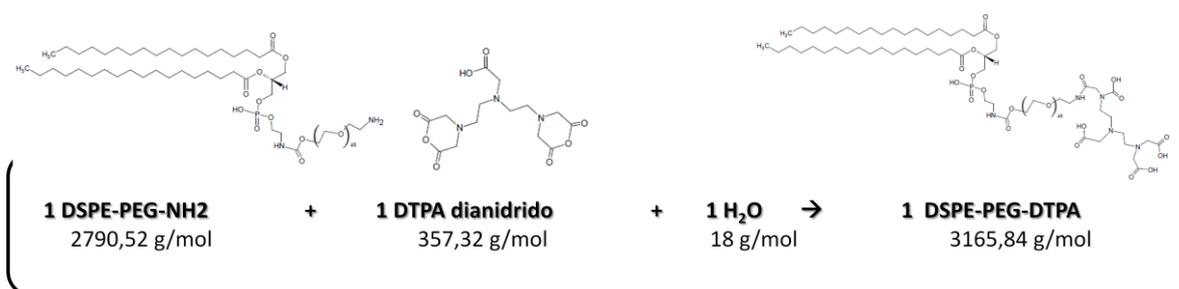
Ao final da reação, o conteúdo foi colocado em fluxo de ar comprimido para a evaporação dos solventes. O resíduo obtido foi extraído sucessivas vezes com acetato de etila, que foi filtrado em papel de filtro e evaporado em rotavapor. O conteúdo foi resuspenso em água purificada e, em seguida, foi feita uma etapa de purificação por diálise em uma membrana Spectrapore® com *cut off* de 1,0 kDa. Para isso, o conteúdo extraído foi colocado em um saco de diálise e mantido sob agitação em água purificada, a temperatura ambiente, por 36 horas e com sucessivas trocas de água. Por fim, o conteúdo do saco foi liofilizado em um ciclo de 24 horas. O frasco de liofilização foi pesado vazio e após a liofilização para a obtenção da massa de produto final liofilizado.

Por fim, foi avaliado um rendimento em relação à massa final obtida, sem considerar a pureza do produto da reação. Para esse cálculo, foi considerado como 100% de rendimento, o somatório entre a massa de DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ inicialmente pesada (M_{real}) e a massa teórica ($M_{\text{teórica}}$) de DTPA em quantidade equimolar ao lípide, e o rendimento real, a massa do conteúdo final liofilizado. Esses cálculos foram realizados a partir da equação 2.1 e com base na equação geral da reação representada na **Figura 2.3**.

Equação (2.1)

$$\text{Rendimento} = \frac{(M_{\text{real}} \text{ DSPE-PEG}_{2000}\text{-NH}_2 - M_{\text{teórica}} \text{ DTPA})}{M \text{ produto liofilizado}} \times 100$$

Figura 2.3 – Equação da reação de síntese do DSPE-PEG-DTPA.



O produto final obtido foi armazenado a -20°C para posterior caracterização.

2.2.2 Caracterização química do DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA

2.2.2.1 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV)

Soluções aquosas recém preparadas do produto e dos reagentes na concentração $2,6 \times 10^{-6}$ mol% ($n=3$) foram analisadas pela técnica de espectroscopia de absorção no UV, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV – 1800, Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão). Para isso, foi utilizada uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm e espectros de varredura foram obtidos nos comprimentos de onda (λ) de 190 a 400 nm. Os resultados foram adquiridos em *software* UV Probe e os espectros UV foram obtidos utilizando o *software* GraphPadPrism 5.0.

2.2.2.2 Espectrofotometria de absorção no IV por transformada de Fourier (FTIR)

A análise foi realizada utilizando um espectrofotômetro de IV modelo Spectrum One FT-IR, Perkin Elmer (Massachusetts, EUA). As amostras sólidas foram depositadas

diretamente sobre um cristal de reflectância total atenuada (ATR, do inglês *Attenuated Total Reflectance*) e analisadas pelo *software* Spectrum versão 5.0.1 (Perkin Elmer), onde os espectros foram obtidos.

2.2.2.3 Espectrometria de massa (MS)

A técnica utilizada consistiu na espectrometria de massa do tipo ionização e dessorção por laser assistida por matriz usando o analisador por tempo de voo (MALDI – TOF, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*). As análises foram realizadas no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em um instrumento Autoflex III, BrukerDaltonics (Massachusetts, EUA), operado pelo *software* FlexControl 3.0 (BrukerDaltonics) no modo positivo/reflector.

As amostras foram misturadas em soluções contendo as matrizes ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (s-DHB) diretamente sobre uma placa de metal MTP AnchorChip-400/384 (BrukerDaltonics) e mantidas à temperatura ambiente até secagem. Os resultados foram adquiridos pelo *software* FlexAnalysis 3.0 (BrukerDaltonics) e os espectros de massas foram posteriormente obtidos em *software* GraphPad Prism 5.0.

2.2.3 Marcação radioquímica de micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀:DTPA

Para confirmação da obtenção do produto DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA e da sua funcionalização, foram preparadas micelas compostas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA, em uma razão de 95:5 (p/p). As micelas foram produzidas conforme descrito no Capítulo 1, item 2.2.2.

As micelas preparadas foram submetidas ao método de marcação com o isótopo radioativo ^{99m}Tc. Uma amostra de 250 μ L de micelas foi adicionada a um frasco no qual foram adicionados 100 μ L de uma solução de cloreto estânico (SnCl₂) 2,0 mg/mL em ácido clorídrico 0,25 mol/L. O pH foi ajustado para 7,0–8,0 com solução

de hidróxido de sódio 0,1 mol/L. O frasco foi lacrado e realizou-se vácuo. Em seguida foram adicionados 37 MBq de pertecnetato de sódio em solução salina 0,9% (p/v). A mistura foi agitada e mantida sob vácuo durante 15 minutos a temperatura ambiente.

2.2.3.1 Avaliação do rendimento de radiomarcção

O rendimento da marcação foi determinado pela quantificação das impurezas radioquímicas ^{99m}TcO₄⁻ e ^{99m}TcO₂. O percentual do primeiro foi determinado por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando acetona como fase móvel. A porcentagem de ^{99m}TcO₂ foi determinada realizando a filtração da mistura em filtro de 0,22 µm e quantificando a radioatividade contida no filtrado e no filtro. O rendimento de marcação foi obtido segundo a fórmula abaixo:

Equação (2.2)

$$\% \text{ marcação} = 100 - (\% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_4^- + \% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_2)$$

2.2.3.2 Estabilidade in vitro da radiomarcção

Os testes de estabilidade de radiomarcção *in vitro* foram realizados em dois meios distintos: solução salina 0,9% (p/v) e plasma de camundongo.

Em solução salina 0,9% (p/v), o frasco contendo as micelas marcadas foi mantido à temperatura ambiente e, nos tempos de 1, 2, 4, 6 e 8 horas, alíquotas foram retiradas para a quantificação da impureza TcO₄⁻ por CCD.

Para mimetizar a estabilidade da marcação das nanoestruturas na corrente sanguínea, foi utilizada uma proporção de cerca de 100 µL de micelas radiomarcadas para cada 1,1 mL de plasma de camundongo. A mistura obtida foi incubada sob agitação a temperatura de 37°C. Nos tempos de 1, 2, 4, 6 e 8 horas, alíquotas foram retiradas e o teor de ^{99m}TcO₄⁻ foi quantificado por CCD.

2.2.4 Avaliação das características físico-químicas das micelas compostas por DSPE-PEG₂₀₀₀: DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA

No intuito de avaliar a influência do DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA nas propriedades físico-químicas das micelas realizou-se a análise de DM e potencial zeta, conforme descrito no capítulo 1.

2.2.5 Análise estatística

Os resultados estão representados por média ± desvio padrão. Para a verificação da normalidade da variância utilizou-se o teste de D'agostino e Pearson. Os dados dos estudos de estabilidade de marcação foram testados por ANOVA seguida do pós-teste Tukey. Para todas as análises foi utilizado o programa *GraphPadPrism 5.0*. Adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese química do DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA

O DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA obtido apresentou coloração branca, com aspecto de um pó fino de baixa densidade (**Figura 2.4**). Após purificação e liofilização, o produto foi obtido com rendimento de 56%.

Figura 2.4 – Produto de síntese após liofilização.



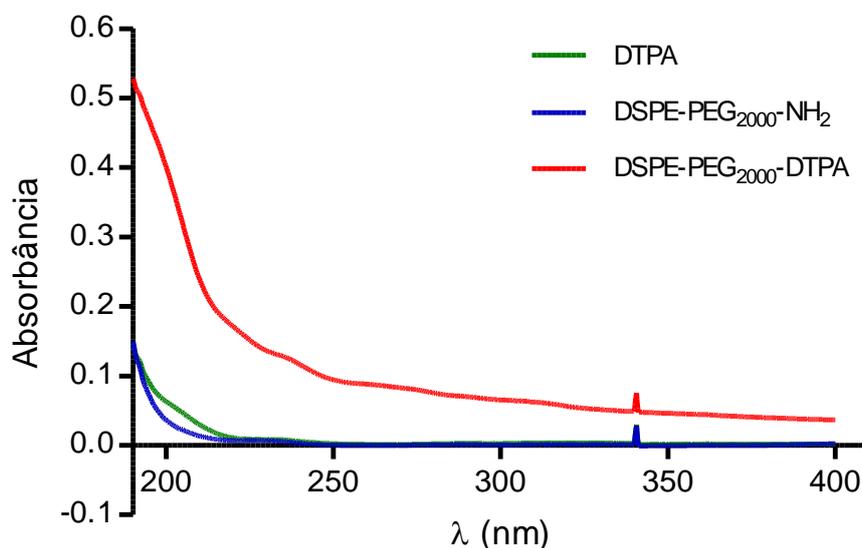
*Ambos os frascos ilustrados na figura contém o produto DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA.

3.2 Caracterização química do DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA

Com base na presença dos grupos carbonila nas moléculas de DTPA e DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂, avaliou-se as absorvâncias das duas substâncias, assim como a do produto, na região do UV. Os espectros de varredura obtidos de 190 a 400 nm (**Figura 2.5**) das soluções de concentrações equimolares dos reagentes e do produto mostraram que as três substâncias absorveram na região de 190 nm. Isso pode ser explicado pela presença das carbonilas, uma vez que compostos carbonílicos possuem uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ em aproximadamente 188 nm (PAVIA *et al.*, 2009).

Pela análise dos espectros observa-se que o produto absorveu com maior intensidade quando comparado com o DTPA e com o DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂, e essa absorção foi superior à soma das absorbâncias dos reagentes. Essas observações sugerem que a ligação do DTPA ao complexo lípide-polímero ocorreu com sucesso, uma vez que o produto deve possuir os grupos cromóforos de ambas as substâncias reagentes e, portanto absorver com maior intensidade, já que trata-se de uma ligação química de um composto ao outro.

Figura 2.5 – Espectros de absorção obtidos na região do UV para os reagentes e o produto da síntese.



No intuito de elucidar a estrutura do produto obtido, foi também utilizada a técnica espectrofotométrica de absorção no IV por transformada de Fourier (FTIR), para avaliar a ligação do DTPA no complexo lípide-polímero.

O espectro de absorção (**Figura 2.6**) na região do IV do DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA demonstrou similaridade ao espectro do DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂, com pequenas diferenças, sobretudo na região de 1700 a 1600 cm⁻¹.

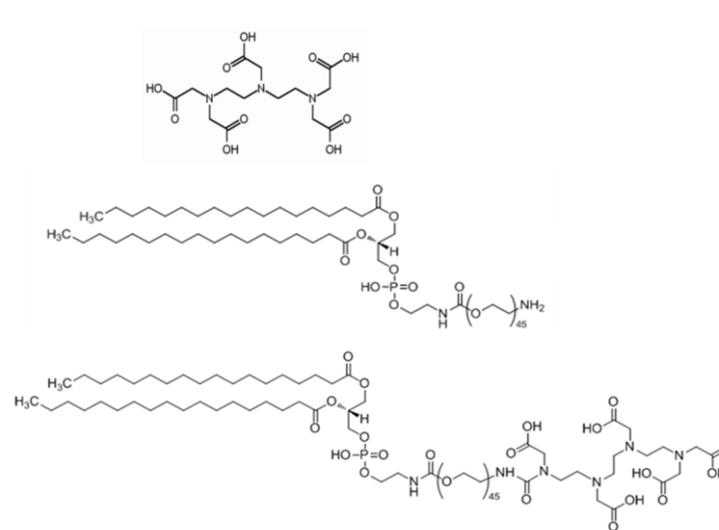
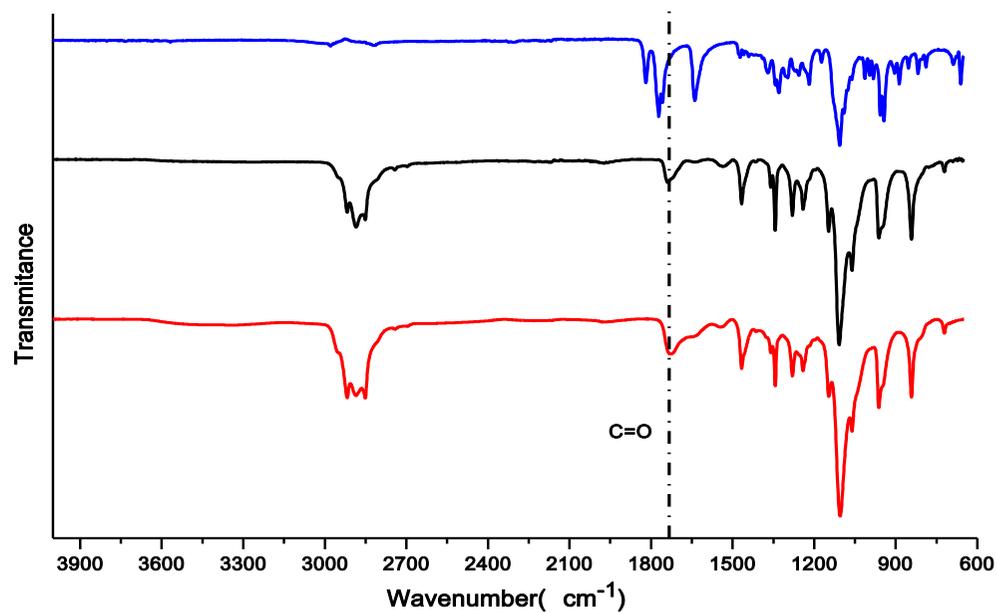
É possível observar a presença de bandas características de vibrações de estiramento de carbonilas nos espectros no IV das três substâncias, sendo em 1731

cm⁻¹ no DTPA; 1738 cm⁻¹ no DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ e em 1728 cm⁻¹ no DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA. Essas bandas correspondem à carbonilas de ácido carboxílicos, com estiramentos compreendidos entre 1730 e 1700 cm⁻¹; e à carbonilas de ésteres, que aparecem entre 1750 e 1735 cm⁻¹ (PAVIA *et al.*, 2009). Essas informações sugerem que ocorreu o aparecimento de carbonilas características de ácidos carboxílicos no espectro do produto da reação, as quais não ocorreram no DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂, mas ocorreram no DTPA. Observa-se ainda, no espectro do produto, um alargamento da banda de carbonila, que pode ser devido ao aumento no número desse grupo funcional na substância em questão.

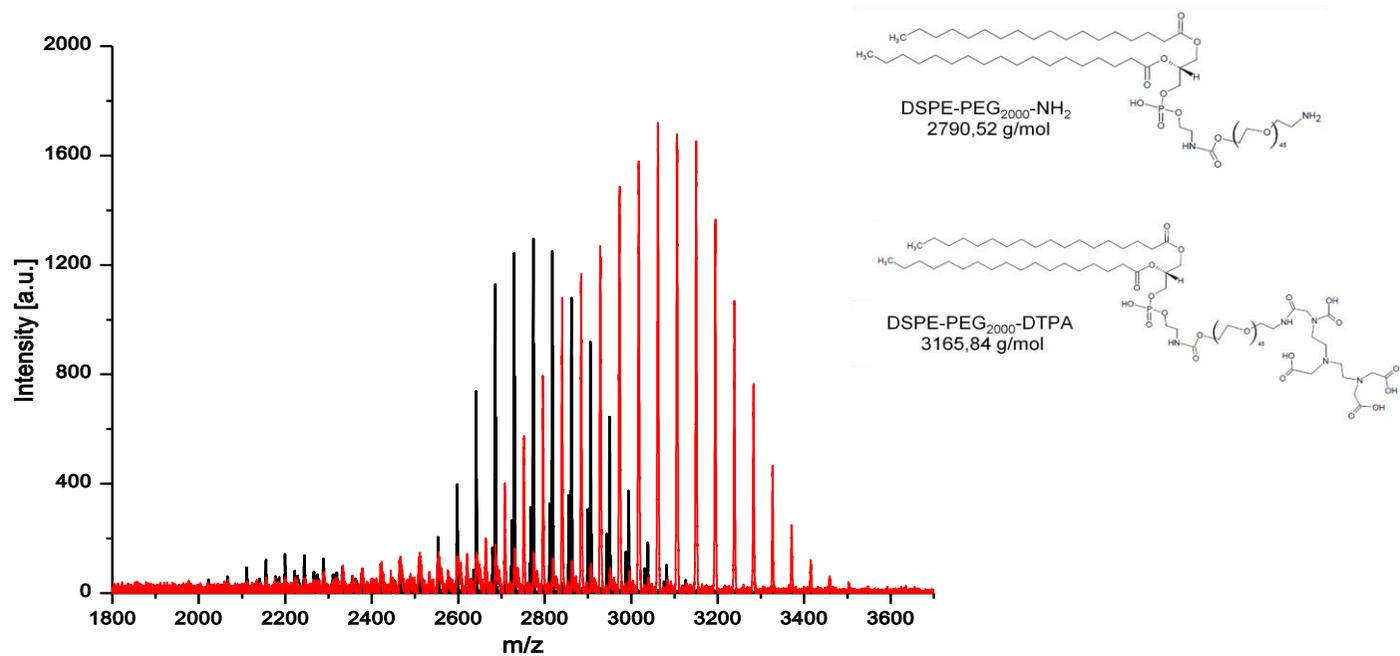
A técnica de espectrometria de massa foi utilizada baseada no fato de que massa do produto final seria a soma das massas dos reagentes mais uma molécula de água, conforme demonstrado na equação 2.1. Portanto, esperava-se encontrar no espectro de massa do produto, um fragmento de íon de razão massa/carga (*m/z*) igual, ou próximo de 3165 Da, correspondente à massa molar do DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA. Na **Figura 2.7** está apresentada a sobreposição dos espectros de massa do DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ (Preto) e do produto da reação (vermelho).

A partir da análise dos espectros de massas dos dois componentes, é possível observar nitidamente o aumento da massa do produto da reação quando comparado com o material de partida. Observa-se a presença de diversos fragmentos de íons em ambas as substâncias, o que é característico de espectro de massas de polímeros, uma vez é comum nessas substâncias a presença de moléculas com diferentes números de polimerização, e para todos os fragmentos observa-se o aumento na *m/z*. Além disso, pode-se visualizar o surgimento de fragmento de íon de *m/z* próximo à massa do DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA com considerável intensidade, o qual não está presente no DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂.

Figura 2.6 – Espectros de absorção no IV do DTPA, DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ e DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA



*Azul: DTPA; Preto: DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂; Vermelho: Produto da reação.

Figura 2.7 – Sobreposição dos espectros de massa do DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ e do produto da reação.

*Vermelho: Produto; Preto: DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂

3.3 Marcação radioquímica de micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA

Os resultados obtidos pelas técnicas espectrométricas indicam que a síntese do DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA foi efetuada com sucesso. Entretanto, para confirmação da obtenção da substância, testou-se a utilização do produto da síntese no preparo das micelas e sua posterior marcação com ^{99m}Tc.

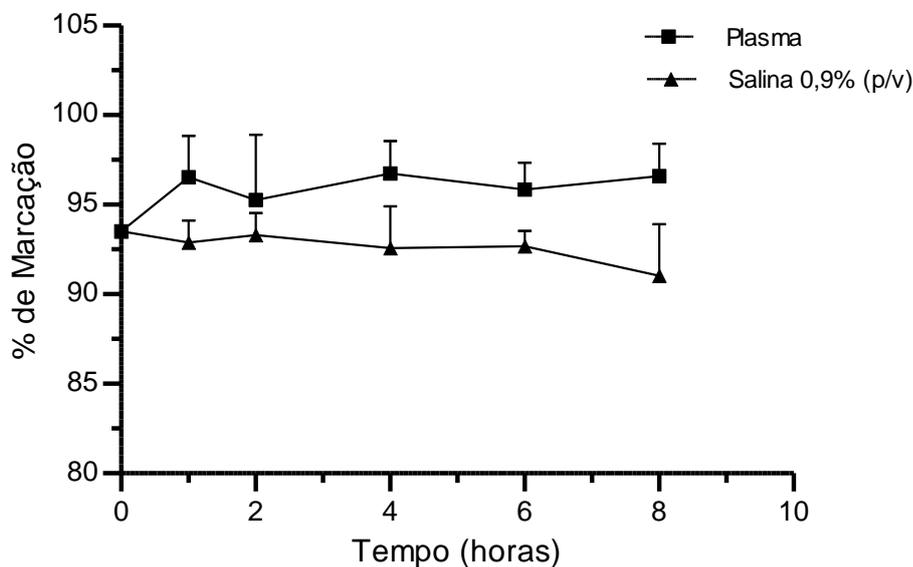
Os resultados demonstraram um rendimento de marcação de $93,8 \pm 2,1\%$ (n=5) e um teor de impurezas igual a $2,0 \pm 1,5\%$ de ^{99m}TcO₄⁻ e $4,3 \pm 0,7\%$ de ^{99m}TcO₂. Entretanto, essa última é eliminada pelo processo de filtração em filtro de 0,22 µm, restando somente a impureza de ^{99m}TcO₄⁻.

É sabido que a presença de elevado teor de impurezas radioquímicas resulta em imagens de baixa qualidade devido à alta radiação de fundo ao redor dos tecidos e no sangue, além de expor o paciente a uma dose desnecessária de radiação (THEOBALD, 1990). Diante disso, é preconizado que o rendimento de marcação de um produto para estudos de biodistribuição seja superior a 90% (SAHA, 2010; TRHALL; ZIESSMAN, 2003). Assim, o composto testado apresentou resultados satisfatórios, mostrando que a formulação pode ser utilizada em estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas.

3.3.1 Estabilidade *in vitro* da radiomarcção

A estabilidade dos sistemas radiomarcados é de extrema importância para a sua utilização nos estudos *in vivo*. Como mencionado anteriormente, valores de impurezas superiores a 10% prejudicam a obtenção de imagens cintilográficas de qualidade o que pode comprometer a condução dos experimentos em animais (SAHA, 2010; ZHU *et al.*, 2014). Sabe-se que o DTPA provê uma elevada estabilidade a radiofármacos (VARSHNEY *et al.*, 2012). Sendo assim, foi realizado um estudo de estabilidade *in vitro* de radiomarcção das micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA com ^{99m}Tc. A **Figura 2.8** representa os estudos de estabilidade realizados em solução salina 0,9% (p/v) e em plasma de camundongo.

Figura 2.8 – Estudos de estabilidade de marcação de micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀: DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA em solução salina 0,9% (p/v) e em plasma de camundongo.



A avaliação dos resultados apresentados na figura acima mostra que a marcação foi estável nas 8 horas avaliadas, uma vez que não houve diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nas porcentagens de marcação no decorrer dos tempos avaliados.

A avaliação da estabilidade de marcação é uma das maiores preocupações em processos de radiomarcção, uma vez que radiofármacos instáveis resultam em biodistribuição indesejável da radioatividade, tanto pela quebra da ligação com o complexo, levando à formação das impurezas radioquímicas, quanto pela transquelação com proteínas presentes no plasma sanguíneo (SAHA, 2010; ZHU *et al.*, 2014). Isso é importante, pois, a instabilidade impossibilitaria, no caso em questão, a associação da distribuição da radiação detectada com a distribuição da nanoestrutura e, portanto, a avaliação e o uso biológico do nanossistema seria prejudicado. Sendo assim, as micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA se mostraram estáveis quanto à degradação radioquímica e à transquelação com proteínas e, portanto, viáveis para o uso *in vivo*.

3.3.2 Avaliação das características físico-químicas das micelas compostas por DSPE-PEG₂₀₀₀: DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA

As micelas preparadas com o produto da síntese em sua composição apresentaram um DM igual a $10,3 \pm 0,6$ nm (n=4) e um potencial zeta igual $-3,5 \pm 0,8$ (n=2). O que sugere que a modificação da superfície da micela com o DTPA não alterou as propriedades físico-químicas avaliadas anteriormente do sistema.

4 CONCLUSÃO

Os estudos utilizados para avaliar a síntese do DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA mostraram que o complexo foi obtido com êxito. Além disso, ele se mostrou eficaz para a finalidade pela qual foi desenvolvido, uma vez que ele promoveu uma eficiente radiomarcção de micelas compostas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA (95:5 p/p) e essa marcação se mostrou estável por 8 horas. Portanto, foi sintetizado um produto que possibilitou a modificação da superfície de micelas poliméricas com ^{99m}Tc, levando à construção de um sistema promissor para o diagnóstico do câncer. Esse sistema, anteriormente, já havia mostrado características promissoras como carreador do quimioterápico PTX, nesse sentido, embora estudos de atividade *in vivo* sejam necessários, esses dados sugerem que o sistema desenvolvido como uma potencial ferramenta teranóstica na terapia do câncer.

**CAPÍTULO 3 – ESTUDOS *IN VIVO*: DEPURAÇÃO
SANGUÍNEA; BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS
CINTILOGRÁFICAS EM CAMUNDONGOS Balb/c.**

1 INTRODUÇÃO

A aplicação de nanoestruturas, tais como as micelas poliméricas, no diagnóstico do câncer, vem sendo estudada e tem mostrando resultados promissores (KAO *et al.*, 2013; XING *et al.*, 2014). Sabe-se que, nanopartículas aplicadas por via intravenosa, dependendo das suas características físico-químicas, como tamanho e carga de superfície, são capazes de mudar o perfil de biodistribuição de fármacos, reduzindo efeitos secundários e aumentando a atividade antitumoral desses fármacos (GONG *et al.*, 2014; KAO *et al.*, 2013; XIAO *et al.*, 2012). Isso se dá pelo fato de que nanopartículas tendem a ter sua distribuição limitada aos vasos sanguíneos e a órgãos com um endotélio fenestrado, como o fígado e o baço (KIESSLING *et al.*, 2014). A presença de fenestrações vasculares também é observada em tumores e locais de inflamação, os quais possuem caracteristicamente um tecido vascular com permeação aumentada (SHARMA *et al.*, 2013). A obtenção de informações sobre a cinética de depuração e biodistribuição de micelas, possibilita a avaliação das mesmas como uma ferramenta adequada para alcançar o perfil farmacocinético desejado conforme a finalidade proposta, uma vez que, entender o perfil de biodistribuição permite avaliar a afinidade de determinadas moléculas para órgãos e regiões específicos (DE BARROS *et al.*, 2013; WOODS *et al.*, 2015).

O ^{99m}Tc tem sido amplamente aplicado em preparações farmacêuticas devido às suas características relacionadas ao seu relativo baixo custo e propriedades nucleares favoráveis para a obtenção de imagens *in vivo* (DE BARROS *et al.*, 2010, 2013; VARSHNEY *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2014).

Nesse sentido, os estudos de depuração sanguínea, biodistribuição e imagens cintilográficas do sistema micelar composto de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀- ^{99m}Tc -DTPA conduzidos em animais saudáveis e animais acometidos com tumor de mama da linhagem 4T1 foram realizados e os resultados serão apresentados no presente capítulo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e cultura de células

Os camundongos Balb/c foram adquiridos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e foram mantidos sem restrição de água e ração, na sala de Experimentação Animal do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG, cujo ambiente possui controle de luz e temperatura. Todos os experimentos realizados em animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFMG, pelo protocolo número 205/2013 .

As células de câncer mamário murino da linhagem 4T1 foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC) (Virgínia, EUA) e cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) pH 7,4, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v/v) de antibióticos (estreptomicina 0,1 mg/mL e penicilina 100 UI/mL).

2.2 Métodos

2.2.1 Estudos com animais sadios

2.2.1.1 Depuração sanguínea

Para esse estudo foram utilizados cinco camundongos Balb/c machos, pesando 18 – 22 g, com 6 – 8 semanas de idade. Os animais receberam por via endovenosa, 0,1 mL de solução de micelas DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA. Amostras de sangue foram coletadas, em tubos previamente pesados, nos tempos de 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360 e 480 minutos após a injeção do radiofármaco. Ao final, os tubos contendo sangue foram pesados e tiveram a radiação determinada em contador gama. Os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama (%ID/g) de sangue.

2.2.1.2 Biodistribuição em animais sadios

Foram utilizados 20 camundongos Balb/c fêmeas com 6 - 8 semanas de idade, pesando 18 – 22 g. Esses animais foram divididos aleatoriamente em três grupos. Cada animal recebeu 3,7 MBq de solução contendo micelas DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA. Após 1 (n=6), 4 (n=7) e 8 horas (n=7), os animais foram anestesiados com solução de ketamina (80 mg/Kg) e xylazina (15 mg/Kg) e, em seguida, submetidos a eutanásia por deslocamento cervical. Os seguintes órgãos e tecidos foram retirados, pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade: coração, sangue, rins, estômago, baço, fígado, tireoide, pulmão e músculo. Os resultados foram expressos em %ID/g.

2.2.1.3 Imagens cintilográficas em animais sadios

Seis camundongos Balb/c fêmeas (18 – 22 g), com 6 - 8 semanas de idade, receberam por via endovenosa, na veia caudal, 37 MBq da solução micelar DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA. Após 1, 4 e 8 horas da administração das nanopartículas radiomarcadas, os animais foram anestesiados e mantidos em posição de decúbito ventral sob uma gama câmara Nuclide™ TH 22, Mediso (Budapeste, Hungria) para aquisição das imagens. Foi utilizada uma janela de 20% simétrica, para um pico de energia de 140 KeV. As imagens (300.000 contagens) foram obtidas e armazenadas em uma matriz 256 x 256.

2.2.2 Estudos com animais acometidos com tumor de mama da linhagem 4T1

Os estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas também foram realizados em camundongos Balb/c fêmeas com 6 - 8 semanas de idade, pesando 18 – 22 g acometidos com tumor de mama da linhagem 4T1. Para o implante do tumor, 2,5 x 10⁶ células 4T1 suspensas em 0,1 mL de meio de cultura DMEM foram implantadas via subcutânea no flanco direito de cada animal. Os animais foram mantidos em estantes ventiladas com controle de luz e temperatura, sob observação, até que tivessem um tumor palpável não superior a 1,0 cm de diâmetro (1 – 2 semanas). Após esse período, os estudos de biodistribuição (n = 22 animais) e as imagens

cintilográficas (n = 6 animais) foram conduzidos de maneira semelhante ao descrito no item anterior para os animais sadios. Vale ressaltar que no estudo de biodistribuição, além dos órgãos mencionados anteriormente, o tumor também foi removido, pesado e a radioatividade foi determinada em contador gama.

2.2.3 Análise estatística

Todos os dados foram expressos com média \pm desvio padrão. Para a verificação da normalidade da variância e homocedasticidade utilizou-se o teste de D'agostino e Pearson e o teste de Bartlett, respectivamente. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas, quando adequadas, pela equação: $y = \log$ variável + 1. Os dados foram testados por ANOVA seguida de um pós-teste de Tukey, utilizando o programa *GraphPadPrism 5.0*. Adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

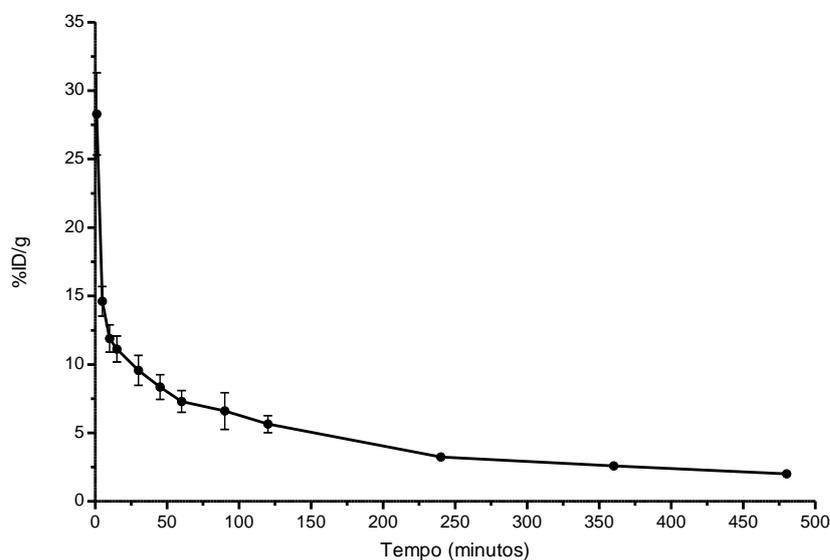
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Animais saudáveis

3.1.1 Depuração Sanguínea

A curva de depuração sanguínea das micelas DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA está representada na **Figura 3.1**. O maior percentual da dose injetada ($28,3 \pm 3,0\%$) foi observado 1 minuto após injeção das micelas radiomarcadas. Foi determinado um tempo de meia-vida α na circulação ($T_{1/2}$) de 1,6 minutos e um tempo de meia-vida β de 71,4 minutos (aproximadamente 1,2 horas), a partir de um modelo de decaimento bifásico, com uma ASC igual a 2170. Segundo Lukyanov e Torchilin (2004), micelas de DSPE-PEG com $T_{1/2}$ entre 1,2 e 2,0 horas são consideradas de circulação prolongada quando comparadas a nanossistemas não peguados, no entanto, quando comparado com sistemas peguados o tempo de circulação é mais curto. Isso pode ser explicado pelo tamanho reduzido das micelas, que leva a um rápido extravasamento do sistema vascular e também pela possível dissociação das micelas em unímeros devido à diluição e consequente depuração.

Figura 3.1 – Curva de depuração sanguínea das micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA avaliado em camundongos Balb/c saudáveis (n = 5).



3.1.2 Biodistribuição e imagens cintilográficas

Nos estudos de biodistribuição (**Figura 3.2**) e nas imagens cintilográficas (**Figura 3.3**) realizados em camundongos Balb/c sadios foi possível observar que as micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA apresentaram acentuada captação no fígado e no baço nos três tempos avaliados. Além disso, não houve diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre a captação da dose injetada (%ID) no tempo de 1 hora e de 8 horas tanto no fígado, quanto no baço, sugerindo uma retenção das partículas nesses órgãos. Essa captação e retenção aumentadas podem ser explicadas pelo tecido endotelial fenestrado presente nesses órgãos e pela ação do SFM que é característico para nanopartículas como as micelas (KIESSLING *et al.*, 2014; KOLATE *et al.*, 2014).

Quanto aos demais órgãos avaliados, todos apresentaram redução significativa entre os tempos de 1 e 8 horas ($p \leq 0,05$), o que demonstra a depuração das micelas da circulação sanguínea. A eliminação gradativa pode ser percebida, também, pela captação nos rins no tempo de 8 horas, a qual é significativamente menor que no tempo de 1 hora.

Outra observação relevante é a captação reduzida no estômago e na tireoide, o que sugere que o teor de impureza ^{99m}TcO₄⁻ está dentro dos limites preconizados e que a marcação do sistema é estável, pois sabe-se que quando esse está presente na circulação é preferencialmente captado por esses órgãos (THRALL; ZIESSMAN, 2003).

Figura 3.2 – Perfil de biodistribuição das micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA em animais Balb/c sadios.

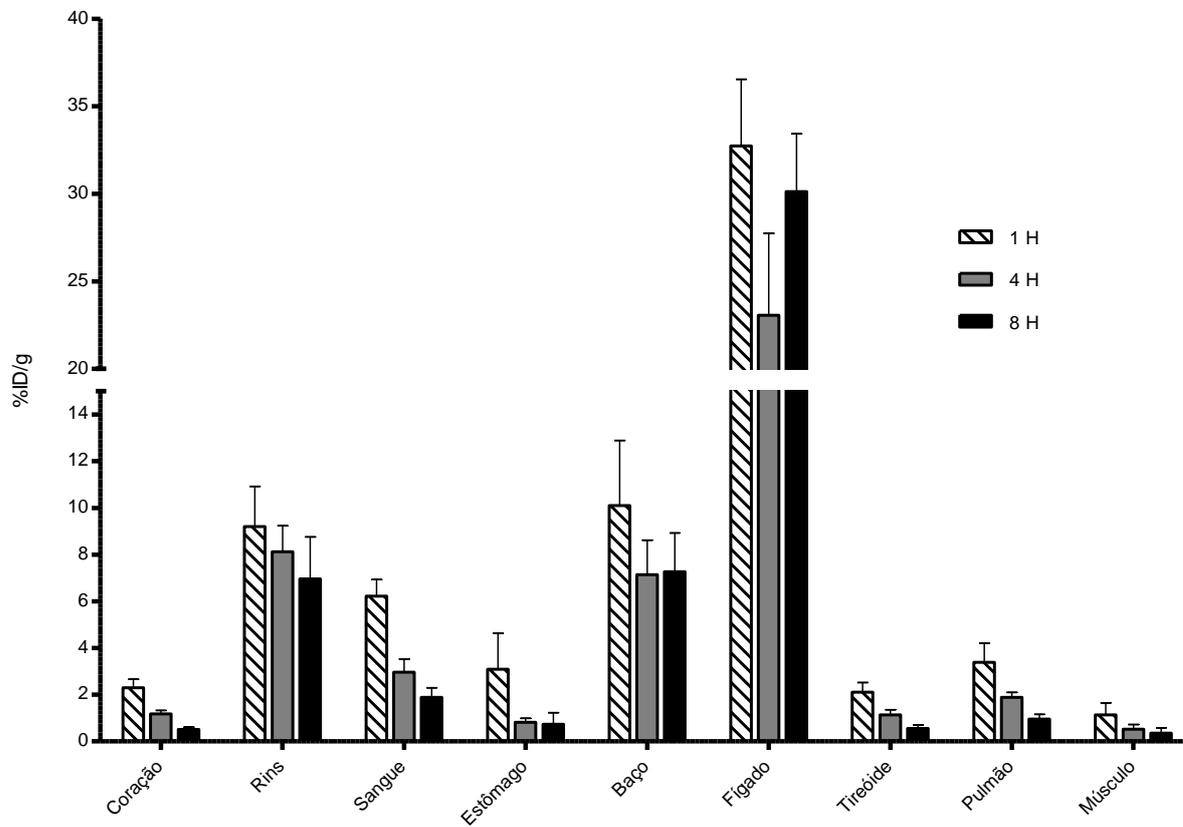
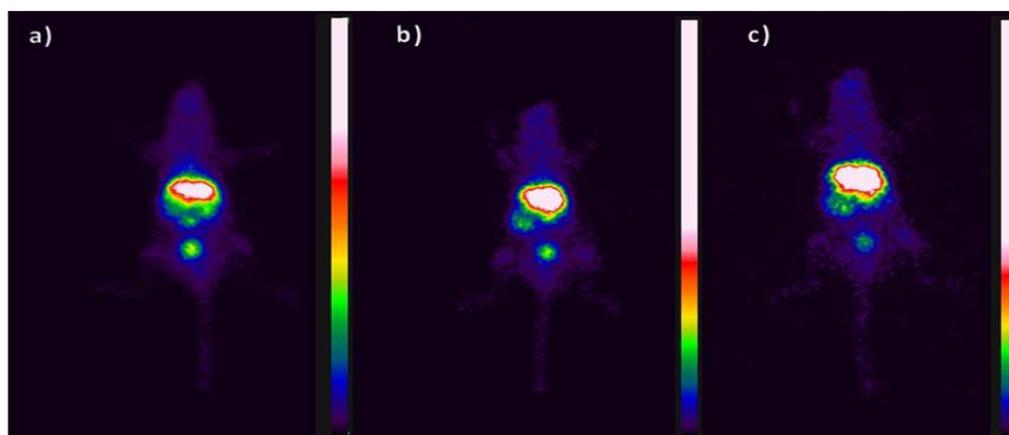


Figura 3.3 – Imagens cintilográficas de camundongos Balb/c sadios após administração de micelas DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA-^{99m}Tc.



Imagens obtidas 1 hora (a), 4 horas (b) e 8 horas (c) após administração das micelas radiomarcadas.

3.2 Animais acometidos com tumor de mama da linhagem 4T1

3.2.1 Biodistribuição e imagens cintilográficas

O perfil de biodistribuição (**Figura 3.4**) e as imagens cintilográficas (**Figura 3.6**) obtidos em camundongos Balb/c acometidos com tumor de mama 4T1 apresentaram semelhantes ao observado nos animais sadios. Alta captação no fígado e baço característico das nanopartículas e baixa captação no estômago e tireóide. Para os demais órgãos avaliados, uma redução significativa na captação entre os tempos de 1 e 8 horas foi detectada. Ao avaliar o tumor, localizado na coxa da perna direita do animal, observou-se uma captação significativamente maior ($p \leq 0,05$) comparado ao músculo da coxa da perna esquerda, nos três diferentes tempos avaliados, o que pode ser nitidamente visualizado nas imagens cintilográficas.

Além disso, foi calculada a relação alvo/não alvo (**Tabela 3.1**), entre a região do tumor e do músculo contralateral esquerdo (controle). A relação alvo/não alvo foi determinada de duas maneiras, a primeira, foi por meio de uma análise semi-quantitativa a partir da região de interesse (ROI, do inglês *Region of Interest*) (**Figura 3.5**), a qual é uma área com uma média de contagem de pixels nas imagens cintilográficas. A segunda foi feita por meio da %ID/g obtida nos estudos de biodistribuição. Foi observada uma relação maior que 1,5 em todos os tempos avaliados, tanto pela ROI, quanto pela %ID/g, demonstrando uma captação na região do tumor maior que 50% quando comparado com o músculo do animal. Relatos na literatura consideram que radiotraçadores com a relação alvo/não alvo maior que 1,5 possuem grande potencial como agentes diagnósticos (DE BARROS *et al.*, 2010; PHILLIPS, 1999).

Observa-se, pela ROI das imagens, que após 8 horas da administração da dispersão micelar radiomarcada, houve um aumento significativo da relação alvo/não alvo na região do tumor quando comparado com a relação em 1 hora. Esse dado sugere um acúmulo das partículas radiomarcadas nessa região devido ao efeito EPR no tumor, o que pode ser explicado pelo tamanho reduzido e superfície pegulada das micelas (LUKYANOV *et al.*, 2002).

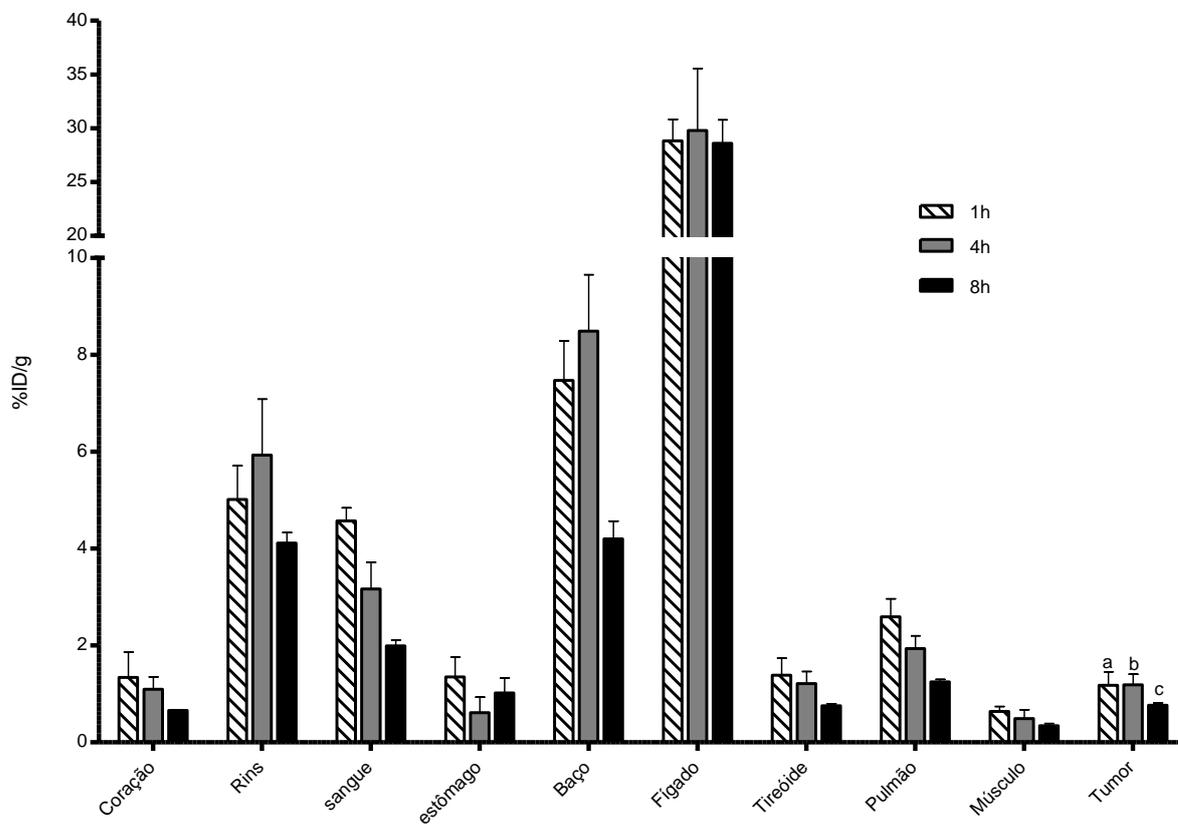
Entretanto, quando a relação alvo/não alvo é avaliada pela %ID/g, observa-se um aumento significativo ($p \leq 0,05$) entre o tempo de 1 e 4 horas, no entanto, não foi observada diferença significativa no tempo de 8 horas. Essa diferença entre as duas avaliações da relação alvo/não alvo pode ser explicada pelas técnicas utilizadas, uma vez que no equipamento utilizado para a obtenção das imagens, não é possível corrigir a ROI pela massa do órgão ou tecido analisado, enquanto que nos estudos de biodistribuição é feita a correção. Além disso, é sabido que o tumor 4T1, caracteristicamente, desenvolve rapidamente grande área de necrose (TAO *et al.*, 2008), a qual não é irrigada e, no entanto, é considerada no cálculo da correlação da dose pelo peso do órgão, o que pode interferir na porcentagem real captada pelo tumor.

Tabela 3.1 – Relação alvo/não-alvo entre tumor e músculo de camundongos Balb/c a partir da ROI e da %ID/g.

	1 hora	4 horas	8 horas
ROI	2,4 ± 0,2	2,8 ± 0,3	3,3 ± 0,4 ^a
%ID/g	1,8 ± 0,2	2,6 ± 0,5 ^a	2,1 ± 0,4

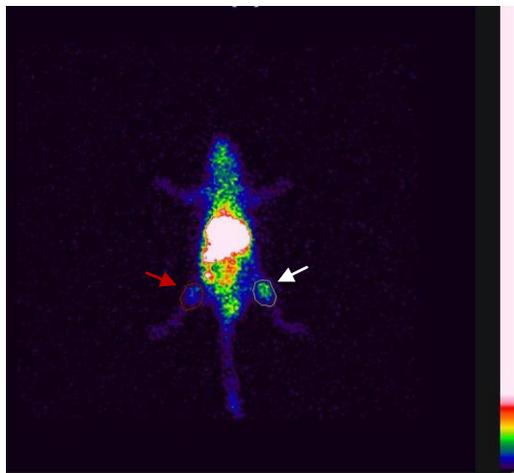
* Valores expressos em média ± DP, n=6. ^arepresenta diferença significativa quando comparado com a relação alvo/não-alvo no tempo de 1 hora.

Figura 3.4 – Perfil de biodistribuição das micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA em animais Balb/c acometidos com tumor de mama 4T1.



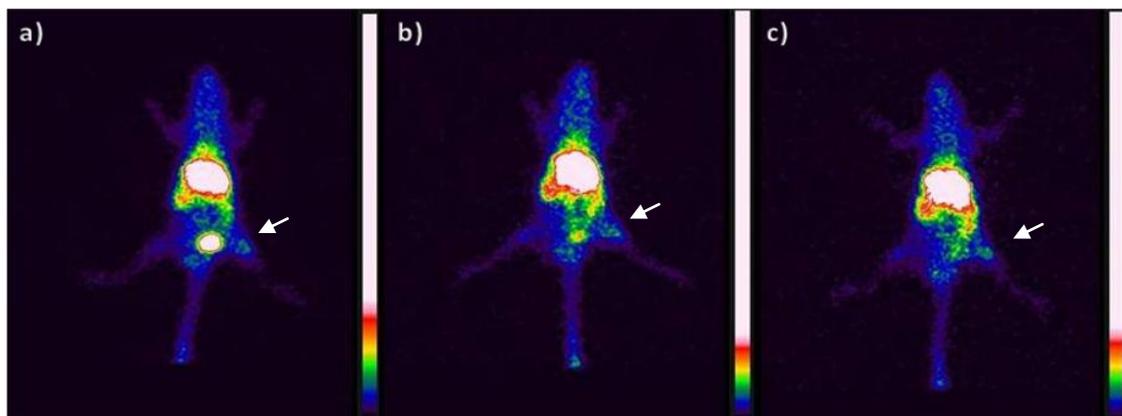
^{a,b,c} Apresentam diferença significativa quando comparados com o músculo na respectiva hora.

Figura 3.5 – Relação alvo/não-alvo obtida após 8 horas de administração da dose de micelas radiomarcadas.



Região alvo (tumor) selecionada em branco, e em vermelho, o músculo controle.

Figura 3.6 – Imagens cintilográficas de camundongos Balb/c com tumor implantado após administração de micelas DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-^{99m}Tc-DTPA.



Imagens obtidas 1 hora (a), 4 horas (b) e 8 horas (c) após administração das micelas radiomarcadas.

4 CONCLUSÃO

Os estudos *in vivo* realizados em camundongos Balb/c sadios mostraram que o sistema desenvolvido apresentou uma biodistribuição característica para nanoestruturas, com acúmulo em órgãos do SFM, com endotélio fenestrado e sem sinais significativos de impureza radioquímica $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Além disso, as micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀- ^{99m}Tc -DTPA apresentaram um tempo de circulação prolongado, com um $T_{1/2}$ de aproximadamente 1,2 horas. Quando o sistema foi injetado em animais acometidos com tumor de mama 4T1, foi observada uma captação significativamente superior no tumor quando comparado com o músculo controle nos três diferentes tempos avaliados, e com indícios de que ocorreu um acúmulo das micelas na região tumoral. A relação entre captação do tumor e do músculo, relação alvo/não alvo, foi superior a 1,5 sugerindo que esse sistema é um potencial agente de diagnóstico. Os estudos *in vivo* realizados sugerem que o sistema desenvolvido tem grande potencial para uma plataforma teranóstica, embora sejam necessários outros estudos para confirmar o acúmulo do sistema na região do tumor bem como a atividade antitumoral desse nanosistema.

3 CONCLUSÃO GERAL

Micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀, brancas e contendo PTX, foram obtidas por um método simples e rápido de preparo.

A formulação, de composição teórica de 10 mmol/L de complexo fosfolípide-polímero e 0,5 mg/mL de fármaco, apresentou uma alta capacidade de carrear o PTX, com um elevado teor de encapsulação e com características físico-químicas promissoras para a administração intravenosa e direcionamento passivo, via efeito EPR, na região tumoral.

A síntese do complexo DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA foi obtida com êxito, segundo as técnicas utilizadas para avaliá-la.

A radiomarcagem de micelas compostas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA (95:5 p/p) se mostrou eficiente e estável por 8 horas, em solução salina 0,9% (p/v) e plasma murino.

Os estudos *in vivo* realizados em camundongos Balb/c sadios mostraram que o sistema desenvolvido apresentou uma biodistribuição característica para nanoestruturas, com tempo de circulação relativamente prolongada.

Os estudos *in vivo* realizados em camundongos Balb/c acometidos com tumor mamário 4T1, mostraram que as micelas desenvolvidas apresentam aptidão para acumular na região tumoral.

Portanto, segundo os parâmetros avaliados, a formulação micelar desenvolvida apresenta propriedades promissoras para o uso no diagnóstico e tratamento de tumores sólidos.

4 PERSPECTIVAS

Os resultados relatados no presente estudo indicaram um potencial para o uso das micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA-^{99m}Tc como uma plataforma inovadora anticâncer, entretanto, mais estudos devem ser conduzidos para a avaliação dessa ferramenta. Nesse sentido, pode-se propor algumas perspectivas para a condução do estudo:

- Avaliação da morfologia do sistema micelar, por técnicas de microscopia e de SAXS.
- Determinação da concentração de fosfolípides presentes nas micelas, a fim de se conhecer a real eficiência de encapsulação do sistema.
- Avaliação da estabilidade físico-química do sistema, a curto e longo prazo.
- Avaliação físico-química das micelas contendo PTX, após o procedimento de radiomarcagem.
- Estudo do perfil de liberação *in vitro* do PTX a partir das micelas.
- Avaliação da atividade antitumoral das micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-DTPA-^{99m}Tc contendo PTX em modelo de câncer animal experimental;
- Avaliação da toxicidade *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, H. K.; JUNG, M.; SYM, S. J.; SHIN, D. B.; KANG, S. M.; KYUNG, S. Y.; PARK, J-W.; JEONG, S. H.; CHO, E. K. A phase II trial of Cremophor EL-free paclitaxel (Genexol-PM) and gemtubicine in patients with advanced non-small cell lung cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. v.74, p. 277-282, 2014.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science Magazine**. v.303, p. 1818-1822
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**. v.28, p. 118-129, 2005.
- BAEK, S. J.; CHO, C. W. Controlled release and reversal of multidrug resistance by co-encapsulation of paclitaxel and verapamil in solid lipid nanoparticles. **International journal of Pharmaceutis**. v.478(2), p. 617-624, 2015.
- BARBOSA, M. V., MONTEIRO, L. O. F.; MALAGUTTI, A. R.; OLIVEIRA, M. C.; CARVALHO-JUNIOR, A. D; LEITE, E. A. Comparative study of first-derivative spectrometry and high performance liquid chromatography methods for quantification of paclitaxel in liposomal formulation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. DOI: 10.5935/0103-5053.20150100, 2015.
- BELOTTI, D.; VERGANI, V.; DRUDIS, T.; BORSOTTI, P.; PITELLI, M.L.; VIALE, G.; GIAVAZZI, R.; TARABOLETTI, G. The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity. **Clinical Cancer Research**. v.2, p. 1843-1849, 1996.
- BERTRAND, N.; WU, J.; XU, X.; KAMALY, N.; FAROKHZAD, O. C. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced Drug Delivey Reviews**. v.66, p. 2-25, 2013.
- BINDER, S. Evolution of Taxanes in the Treatment of Metastatic Breast Cancer. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 17 (1), p. 9-14, 2013.
- BLANCO, E.; KESSINGER, C.W.; SUMER, B.D.; GAO, J. Multifunctional micellar nanomedicine for cancer therapy. **Experimental Biology and Medical** . v.234, p. 123 -131, 2009.
- BRASIL, Ministério da Saúde/ Secretaria de Atenção à Saúde. **ONCOLOGIA: manual de bases técnicas**. 12. ed. Brasília, DF, novembro de 2010.
- BRASILEIRO-FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. **Bogliolo Patologia**. In: Brasileiro-Filho, G. Distúrbios do Crescimento e da Diferenciação Celular. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 219-276.
- BOCCI, G.; DI PAOLO, A. DANESI, R. The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel. **Angiogenesis**. v. 16, p. 481-492, 2013.

CHABNER, B. A.; ROBERTS JR, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews: Cancer**, v. 5, p. 65-72, 2005.

CHEN, Y.; ZHANG, W.; HUANG, Y.; GAO, F.; SHA, X.; FANG, X. Pluronic-based functional polymeric mixed micelles for co-delivery of doxorubicin and paclitaxel to multidrug resistant tumor. **International Journal of Pharmaceutics**. v.488, p. 44 - 58, 2015.

CHENG, T-L.; CHUANG, K-H.; CHEN, B-M.; ROFFLER, S. R. Analytical measurement of PEGylated molecules. **Bioconjugate Chemistry**. v.23(5), p. 881-899, 2012.

CHIRIO, D.; GALLARATE, M.; PEIRA, E.; BATTAGLIA, L.; MUNTONI, E.; RIGANTI, C.; BIASIBETTI, E.; CAPUCCHIO, M. T.; VALAZZA, A.; PANCIANI, P.; LANOTTE, M.; ANNOVAZZI, L.; CALDERA, V.; MELLAI, M.; FILICE, G.; CORONA, S.; SCHIFFER, D. Positive-charged solid lipid nanoparticles as paclitaxel drug delivery system in glioblastoma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.88(3), p. 746-758, 2014.

CHO, K.; WANG, X.; NIE, S.; CHEN, Z.; SHIN, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clinical Cancer Research**. v.14(5), p. 1310-1316, 2008.

CROY, S. R.; KWON, G. S. Polymeric micelles for drug delivery. **Current Pharmaceutical Design**. v.12, p. 4669-4684, 2006.

DABHOLKAR, R. D.; SAWANT, R. M.; MONGAYT, D. A.; DEVARAJAN, P. V.; TORCHILIN, V. P. Polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine conjugate (PEG-PE)-based mixed micelles: some properties, loading with paclitaxel, and modulation of P-glycoprotein-mediated efflux. **Pharmaceutical Nanotechnology**. v.315, p. 148-157, 2006.

DE BARROS, A. L. B.; ANDRADE, S. F.; FILHO, J. D. S.; CARDOSO, V. N.; ALVES, R. J. Radiolabeling of low molecular weight D-galactose-based glycodendrimer with technetium-99m and biodistribution studies. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**. v.298, p. 605-609, 2013.

DE BARROS, A. L. B.; CARDOSO, V. N.; MOTA, L. G.; ALVES, R. J. Synthesis and biodistribution studies of carbohydrate derivatives radiolabeled with technetium-99m. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. v.20, p. 315-517, 2010.

DE BARROS, A. L. B.; FERRAZ, K. S. O.; DANTAS, T. C. S.; ANDRADE, G. F.; CARDOSO, V. N.; DE SOUSA, E. M. B. Synthesis, characterization, and biodistribution studies of ^{99m}Tc-labeled SBA-16 mesoporous silica nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**. v.56, p. 181-188, 2015.

DE BARROS, A. L. B.; TSOURKAS, A.; SABOURY, B.; CARDOSO, V.N.; ALAVI, A. Emerging role of radiolabeled nanoparticles as an effective diagnostic technique. **EJNMMI Research**. v.2:39, p. 1 -15, 2012.

DEWANJEE, M. K. The chemistry of ^{99m}Tc-labeled radiopharmaceuticals. **Seminars in Nuclear Medicine**. v. 20, n.1, p. 5-27, 1990.

EMAMI, J.; REZAZADEH, M.; HASANZADEH, F.; SADEGHI, H.; MOSTAFAVI, A.; MINAIYAN, M.; ROSTAMI, M.; DAVIES, N. Development and *in vitro/in vivo* evaluation of a novel targeted polymeric micelle for delivery of paclitaxel. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.80, p. 29-40, 2015.

FAN, Z.; CHEN, C.; PANG, X.; YU, Z.; QI, Y.; CHEN, X.; LIANG, H.; FANG, X.; SHA, X. Adding vitamin E-TPGS to the formulation of Genexol-PM: Specially mixed micelles improve drug-loading ability and cytotoxicity against multidrug-resistant tumors significantly. **PLoS ONE**. v.10(4), p. 1-17, 2015.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations of the effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.63, p. 136-151, 2011.

FLECHSIG, P.; ZECHMANN, C. M.; SHREIWEIS, J.; KRATOCHWIL, C.; RATH, D.; SCHWARTZ, L. H.; SCHLEMMER, H-P.; KAUCZOR, H-U.; HABERKORN, U.; GIESEL, F. L. Qualitative and quantitative image analysis of CT and MR in patients with neuroendocrine liver metastases en comparision to ⁶⁸Ga-DOTATOC PET. **European Journal of Radiology**. doi: 10.1016/j.ejrad.2015.04.009, 2015

GAO, H.; LIU, J.; YANG, C.; CHENG, T.; CHU, L.; XU, H.; MENG, A.; FAN, S.; SHI, L.; LIU, J. The impact of PEGylation patterns on the *in vivo* biodistribution of mixed micelles. **International Journal of Nanomedicine**. v.8, p. 4229-4246, 2013.

GAO, X.; WANG, B.L.; WEI, X.W.; RAO, W.; AI, F.; ZHAO, F.; MEN, K.; YANG, B.; LIU, X.; HUANG, M.; GOU, M.; QIAN, Z.Y.; HUANG, N.; WEI, Y. Preparation, characterization and application of star-shaped PCL/PEG micelles for the delivery of doxorubicin in the treatment of colon cancer. **International Journal of Nanomedicine**. v.8, p. 971-982, 2013.

GIACOMELLI, F. C.; STEPANEK, P.; GIACOMELLI, C.; SCHMIDT, V.; JAGER, E.; JAGER, A.; ULBRICH, K. pH-triggered block copolymer micelles based on a pH-responsive PDPA (poly-[2-(diisopropylamino) ethyl methacrylate]) inner core and a PEO (poly(ethylene oxide)) outer shell as a potential tool for the cancer therapy. **Soft Matter**. v.7, p. 9316-9325, 2011.

GILL, K. K.; KADDOUMI, A.; NAZZAL, S. Mixed micelles of PEG2000-DSPE and vitamin-E TPGS for concurrent delivery of paclitaxel and parthenolide: Enhanced chemosensitization and antitumor efficacy against non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.46, p. 64-71, 2012.

GONG, Y.; WANG, Z.; DONG, G.; SUN, Y.; WANG, X.; RONG, Y.; LI, M.; WANG, D.; RAN, H. Low-intensity focused ultrasound mediated localized drug delivery for liver tumors in rabbits. **Drug Delivery**. v.4, p. 1-10, 2014.

GRANT, C. W. M.; KARLIK, S.; FLORIO, E. A liposomal MRI contrast agent: Phosphatidylethanolamine-DTPA. **Magnetic Resonance in Medicine**. v.11, p. 236-243, 1989.

GRALLERT, S. R. M.; RANGEL-YANGUI, C. O.; PASQUALOTO, K. F. M.; TAVARES, L. C. Polymeric micelles and molecular modeling applied to the development of radiopharmaceuticals. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.48, n.1, p. 1-16, 2012.

GREGORY, A. E.; TITBALL, R.; WILLIAMSON, D. Vaccine delivery using nanoparticles. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v.3(13), p. 1-13, 2013.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. Ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2005. 1619 p.

HAZARI, P. P.; SHUKLA, G.; GOEL, V.; CHUTTANI, K.; KUMAR, N.; SHARMA, R.; MISHRA, A. K. Synthesis of specific SPECT-radiopharmaceutical for tumor imaging based on methionine: ^{99m}Tc -DTPA-bis(methionine). **Bioconjugate Chemistry**. v.21, p. 229-239, 2010.

HENNENFENT, K. L.; GOVINDAN, R. Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle? **Annals of Oncology**. v.17, p. 735-749, 2006.

HONG, H.; ZHANG, Y.; SUN, J.; CAI, W. Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. **Nano Today**. v. 4, n. 5, p. 399-413, 2009.

HU, Y.; XIE, J.; TONG, W. Y.; WANG, C. Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells. **Journal of Controlled Release**. v. 118, p. 7-17, 2007.

HUH, K. M.; MIN, H. S.; LEE, S. C.; LEE, H. J.; KIM, S.; PARK, K. A new hydrotropic block copolymer micelle system for aqueous solubilization of paclitaxel. **Journal of Controlled Release**. v.126(2), p. 122-129, 2008.

INCAa - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva – Ministério da Saúde. Câncer: o que é. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em 25 de junho de 2015.

INCAb - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva – Ministério da Saúde. Câncer: Sistematização do diagnóstico. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=47>. Acesso em 25 de junho de 2015.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. v. 61, p. 69 – 90, 2011.

JONES, A. G. Technetium in nuclear medicine. **Radiochimica Acta**. v.70/71, p. 289-297, 1995.

JONES, M-C.; LEROUX, J-C. Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.48, p. 101-111, 1999.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**. v. 4, p.253-265, 2004.

KAIDA, S.; CABRAL, H.; KUMAGAI, M.; KISHIMURA, A.; TERADA, Y.; SEKINO, M.; AOKI, I.; NISHIYAMA, N.; TANI, T.; KATAOKA, K. Visible drug delivery by supramolecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model. **Cancer Research**. v.70, p. 7031-7041, 2010.

KAN, P.; TSAO, C. W.; WANG, A. J.; SU, W. C.; LIANG, H. F. A liposomal formulation able to incorporate a high content of paclitaxel and exert promising anticancer effect. **Journal of Drug Delivery**. v.2011, p. 1-9, 2011.

KAO, H-W.; CHAN, C-J.; CHANG, Y-C.; HSU, Y-H.; LU, M.; WANG, J. S-J.; LIN, Y-Y.; WANG, S-J.; WANG, H-E. A pharmacokinetics study of radiolabeled micelles of a poly(ethylene glycol)-block-poly(caprolactone) copolymer in a colon carcinoma-bearing mouse model. **Applied Radiation and Isotopes**. v.80, p. 88-94, 2013.

KATRAGADDA, U.; FAN, W.; WANG, Y.; TENG, Q.; TAN, C. Combined delivery of paclitaxel and tanespimycin via micellar nanocarriers: pharmacokinetics, efficacy and metabolomic analysis. **PLoS ONE**. v.8(3), p. 1-13, 2013.

KIESSLING, F.; MERTENS, M. R.; GRIMM, J.; LAMMERS, T. Nanoparticles for imaging: Top or flop? **Radiology**. v.273(1), p. 10-28, 2014.

KIM, J. H.; KIM, Y.; BAE, K. H.; PARK, T. G.; LEE, J. H.; PARK, K. Tumor-targeted delivery of paclitaxel using low density lipoprotein-mimetic solid lipid nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**. v. 12(4), p. 1230-1241, 2015.

KOLATE, A.; BARADIA, D.; PATIL, S.; VHORA, I.; KORE, G.; MISRA, A. PEG – A versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**. v.192, p. 67-81, 2014.

KWON, G. S.. KATAOKA, K. Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.64, p. 237-245, 2012.

KUMAR, R.; KULKARNI, A.; NAGESKA, D. K.; SRIDHAR, S. In vitro evaluation of theranostic polymeric micelles for imaging and drug delivery in cancer. **Theranostics**. v.2(7), p. 714-722, 2012.

LAMMERS, T.; KIESSLING, F.; HENNINK, W. E.; STORM, G. Nanotheranostics and image-guided drug delivery: current concepts and future directions. **Molecular Pharmaceutics**. v.7(6), 1899-1912, 2010.

LEITE, A. E.; SOUZA, C. M.; CARVALHO-JÚNIOR, A. D.; COELHO, L. G. V.; LANA, A. M. Q.; CASSALI, G. D.; OLIVEIRA, M. C. Encapsulation of cisplatin in long-

circulating and pH-sensitive liposomes improves its antitumor effect and reduces acute toxicity. **International Journal of Nanomedicine**. v.7, p. 5259 -5269, 2012.

LOVELYN, A.; ATTAMA, A. A. Current of nanoemulsions in drug delivery. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**. v.2, p. 626-639, 2011.

LU, J.; HUANG, Y.; ZHAO, W.; MARQUEZ, R. T.; MENG, X.; LI, J.; GAO, X.; VENKATARAMANAN, R.; WANG, Z.; LI, S. PEG-Derivatized embelin as nanmicellar carrier for delivery of paclitaxel to breast and prostate cancers. **Biomaterials**. v.34(5), p.1591-1600, 2013.

LU, R-M.; CHEN, M-S.; CHANG, D-K.; CHIU, C-Y.; LIN W-C.; YAN, S-L.; WANG, Y-P.; KUO, Y-S.; YEH, C-Y.; LO, A.; WU, H-C. Targeted drug delivery systems mediated by a novel peptide in breast cancer therapy and imaging. **PLoS ONE**. v.8(6), p. 1-13, 2013.

LUKYANOV, A. N.; TORCHILIN, V. P. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. **Advancer Drug Delivery Reviews**. v.56, p. 1273-1289, 2004.

LUKYANOV, A. N.; GAO, Z.; MAZZOLA, L.; TORCHILIN, V. P. Polyethylene glycol-diacyllipid micelles demonstrate increased accumulation in subcutaneous tumors in mice. **Pharmaceutical Research**. v.19, p. 1424-1429, 2002.

MAEDA, H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via EPR effect: background and future prospects. **Bioconjugate Chemistry**. v.21, p. 797-802, 2010.

MATSUMURA, Y. Polymeric micellar delivery systems in oncology. **Japanese Journal of Clinical Oncology**. v.38(12), p. 793-802, 2008.

MENDLER, C. T.; GEHRING T.; WESTER, H-J.; SCHWAIGER, M.; SKERRA, A. ⁸⁹Zr-*versus* ¹²⁴I-labeled αHER2 Fab with optimized plasma-half life for high contrast tumor imaging in vivo. **Journal of Nuclear Medicine**. v.56(7), p. 1112-1118, 2015.

MOHAMED, S.; PARAYATH, N. N.; TAURIN, S.; GREISH, K. Polymeric nanomicelles: versatile platform for targeted delivery in cancer. **Therapeutic Delivery**. v.5, p. 1101-1121, 2014.

MUSACCHIO, T.; LAQUINTANA, V.; LATROFA, A.; TRAPANI, G.; TORCHILIN, V. P. PEG-PE micelles loaded with paclitaxel and surface-modified by a PBR-ligand: synergistic anticancer effect. **Molecular Pharmaceutics**. v.6(2), p. 468-479, 2009.

MUTHU, M. S.; LEONG, D. T.; MEI, L.; FENG, S-S. Nanotheranostics – Application and further development of nanomedicine strategies for advanced theranostics. **Theranostics**. v.4(6), p. 660-677, 2014.

OERLEMANS, C.; BULT, W.; BOS, M.; STORM, G.; NIJSEN, J.F.W.; HENNINK, W. E. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. **Pharmaceutical Research**. v.27, p. 2569-2589, 2010.

OOSTENDORP, R.L.; BUCKLE, T.; LAMBERT, G.; GARRIGUE, J.S.; BEIJNEN, T.H.; SCHELLENS, J.H.M.; TELLINGEN, O.V. Paclitaxel in self-micro emulsifying formulations: oral bioavailability study in mice. **Investigational New Drugs**. v.29, p. 768-776, 2011.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to spectroscopy**. 4. ed. Belmont, EUA: Brooks/cole, Cengage Learning, 2009, 752 p.

PEER, D.; KARP, J. M.; HONG, S.; FAROKHZAD, O. C.; MARGALIT, R.; LANGER, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**. v.2; p. 751-760, 2007.

PHILLIPS, W.T. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.37, p. 13-32, 1999.

PILLAI, G. Nanomedicines for cancer therapy: na update of FDA approved and those under various stages of development. **SOJ Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v.1, p. 1-13, 2014.

RAMOS-CABRER, P.; CAMPOS, F. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets. **International Journal of Nanomedicine**. v.8, p. 951-960, 2013.

RICHARDSON, E. S.; PITT, W. G.; WOODBURY, D. J. The role of cavitation in liposome formation. **Biophysical Journal**. v.93, p. 4100-4107, 2007.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Robbins e Cotran Patologia: Bases patológicas das doenças**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458p.

RYVOLOVA, M.; CHOMOUCKA, J.; DRBOHLAVOVA, J. KOPEL, P.; BABULA, P.; HYNEK, D.; ADAM, V.; ECKSCHLAGER, T.; HUBALEK, J.; STIBOROVA, M.; KAISER, J.; KIZEK, R. Modern micro and nanoparticle-based imaging techniques. **Sensors**. v.12, p. 14792-14820, 2012.

SAHA, G. B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. 6.ed. New York, EUA: Springer, 2010. 427 p.

SANADA, Y.; AKIBA, I.; SAKURAI, K.; SHIRAISHI, K. YOKOYAMA, M.; MYLONAS, E.; OHTA, N.; YAGI, N.; SHINOHARA, Y.; AMEMIYA, Y. Hydrophobic molecules infiltrating into the poly(ethylene glycol) domain of the core/shell interface of a polymeric micelles: evidence obtained with anomalous Small-Angle X-ray Scattering. **Journal of the American Chemical Society**. v.135, p. 2574-2582, 2013.

SATO, T.; SAKAI, H.; SOU, K.; BUCHNER, R.; TSUCHIDA, E. Poly(ethylene glycol)-conjugated phospholipids in aqueous micellar solutions: hydration, static structure, and interparticle interactions. **The Journal of Physical Chemistry**. v.111, p. 1393-1401, 2007.

SARISOZEN, C.; VURAL, I.; LEVCHENKO, T.; HINCAL, A. A.; TORCHILIN, V. P. PEG-PE-based micelles co-loaded with paclitaxel and cyclosporine A or loaded with

paclitaxel and targeted by anticancer antibody overcome drug resistance in cancer cells. **Drug Deliv**. v.19, p. 169-176, 2012.

SAWANT, R. R.; TORCHILIN, V. P. Multifunctionality of lipid-core micelles for drug delivery and tumour targeting. **Molecular Membrane Biology**. v.27, p. 232-246, 2010.

SAWANT, R. R.; SAWANT, R. M.; TORCHILIN, V. P. Mixed PEG-PE/vitamin E tumor-targeted immunomicelles as carriers for poorly soluble anti-cancer drugs: improved drug solubilization and enhanced *in vitro* cytotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.70, p. 51-57, 2008.

SCHWOCHAU, K. **Technetium: chemistry and radiopharmaceutical applications**. Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH, 2000. 460 p.

SHARMA, A.; JAIN, N.; SAREEN, R. Nanocarriers for diagnosis and targeting of breast cancer. **BioMed Research International**. v.2013, p. 1-10, 2013.

SHUAI, X.; AI, H.; NASONGKLA, N.; KIM, S.; GAO, J. Micellar carriers based on block copolymers of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery. **Journal of Controlled Release**. v.98, p. 415-426, 2004.

SKIDAN, I.; MIAO, B.; THEKKEDATH, R. V.; DHOLAKIA, P.; DEGTEREV, A.; TORCHILIN, V. In vitro cytotoxicity of novel pro-apoptotic agent DM-PIT-1 in PEG-PE-based micelles alone and in combination with TRAIL. **Drug Delivery**. v.16, p. 45-51, 2009.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate do câncer. **Quimica Nova**. v.27, n.2 p. 308-312, 2004.

STACY, M.R.; MAXFIEL, M.W.; SINUSAS, A.J. Targeted molecular imaging of angiogenesis in PET and SPECT: A review. **Yale Journal of Biology and Medicine**. v.85, p. 75-86, 2012

STIRLAND, D. L.; NICHOLS, J. W.; MIURA, S.; BAE, Y. H. Mind the gap: a survey of how cancer drug carriers are susceptible to the gap between research and practice. **Journal of Controlled Release**. v.172(3), p1045-1064, 2013.

SURAPANENI, M.S.; DAS, S.K.; DAS, N.G. Designing paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: current status and challenges. **International Scholarly Research Network**. v.2012, p. 1-15, 2012.

SVENSON, S. What nanomedicine in the clinic right now really forms nanoparticles? **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**. v.6, p. 125-135, 2014.

SVENSON, S. Clinical translations of nanomedicines. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**. v.16(6), p. 287-294, 2012.

TAO, K.; FANG, M.; ALROY, J.; SAHAGIAN, G. G. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. **BMC Cancer**. v.8(228), p. 1-19, 2008.

THEOBALD, A. E. **Physico-chemical concepts in the preparation of technetium radiopharmaceuticals**. In: SAMPSON, C. B. Textbook of radiopharmacy theory and practice. v.3. Gordon and Breach Science Publishers S.A., 1990. Cap. 7, p. 115-148.

THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. **Medicina Nuclear**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 426 p.

TORCHILIN, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **The AAPS Journal**. v.9, p, 129-147, 2007.

TORCHILIN, V. P. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. **Pharmaceutical Research**. v.24, p. 1-16, 2006.

TORCHILIN, V. P.; LUKYANOV, A. N.; GAO, Z.; PAPAHAADJOPOULOS-STERNBERG, B. Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. **PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.100(10), p. 6039-6044, 2003.

TRIVEDI, R.; KOMPELLA, U.B. Nanomicellar formulations for sustained drug delivery: strategies and underlying principles. **Nanomedicine (Lond)**. v. 5(3), p. 485-505, 2010.

VARSHNEY, R.; SETHI, S. K.; HAZARI, P. P.; CHUTTANI, K.; SONI, S.; MILTON, M. D.; MISHRA, A. K. Synthesis of [DTPA-bis(D-ser)] chelate (DBDSC): An approach for the design of SPECT radiopharmaceuticals based on technetium. **Current Radiopharmaceuticals**. v.5, p. 348-355, 2012.

WAN, C. P. L.; LETCHFORD, K.; JACKSON, J. K.; BURT, H. M. The combined use of paclitaxel-loaded nanoparticles with a low-molecular-weight copolymer inhibitor of P-glycoprotein to overcome drug resistance. **International Journal of Nanomedicine**. v.8, p. 379-391, 2013.

WANG, J.; MONGAYT, D.; TORCHILIN, V. P. Polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs: preparation and anticancer activity *in vitro* of paclitaxel incorporated into mixed micelles based on poly(ethylene glycol)-lipid conjugate and positively charged lipids. **Journal of Drug Targeting**. v,13(1), p. 73-80, 2005.

WANG, S.; QIU, Q.; SHI, Z.; WANG, Y.; CHEN, M. Nanoscale drug delivery for taxanes based on the mechanism of multidrug resistance of cancer. **Biotechnology advances**. v.33, p 224-241, 2015.

WANG, T.; PETRENKO, V. A.; TORCHILIN, V. P. Paclitaxel-loaded polymeric micelles modified with MCF-7 cell-specific phage protein: enhanced binding to target cancer cells and increased cytotoxicity. **Molecular Pharmaceutics**. v.7, p. 1007-1014, 2010.

WANG, T.; YANG, S.; MEI, L.A.; PAMAR, C. K.; GILLESPIE, J.W.; PRAVEEN, K. P.; PETRENKO, V. A.; TORCHILIN, V. P. Paclitaxel-loaded PEG-PE-based micellas nanopreparations targeted with tumor-specific landscape phage fusion protein enhance apoptosis and efficiently reduce tumors. **Molecular Cancer Therapeutics**. v.13(12), p. 2864-2875, 2014.

WEI, H.; CHENG, S-H.; ZHANG, X-Z.; ZHUO, R-X. Thermo-sensitive polymeric micelles based on poly(*N*-isopropylacrylamide) as drug carriers. **Progress in Polymer Science**. v.34, p. 893-910, 2009.

WHO – World Health Organization. Health topics: Cancer, 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/topics/cancer/en/>> Acesso em: 25 de junho de 2015.

WHO – World Health Organization. Globocan, 2012. Disponível em: < http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx > Acesso em: 25 de junho de 2015.

WHO – World Health Organization. The international pharmacopoeia: Fourth edition 2014. Disponível em: < <http://apps.who.int/phint/en/p/about/> > Acesso em: 26 de junho de 2015.

WOODS, A.; PATEL, A.; SPINA, D.; RIFFO-VASQUEZ, Y.; BABIN-MORGAN, A.; DE RESALES, R. T. M.; SUNASSEE, K.; CLARK, S.; COLLINS, H.; BRUCE, K.; DAILEY, L. A.; FORBES, B. *In vivo* biocompatibility, clearance, and biodistribution of albumin vehicles for pulmonary drug delivery. **Journal of Controlled Release**. v.210, p. 1-9, 2015.

WU, H.; ZHU, L.; TORCHILIN, V. P. pH-sensitive poly(histidine)-PEG/DSPE-PEG copolymer micelles for cytosolic drug delivery. **Biomaterials**. v.34, p. 1213-1222, 2013.

WU, X.; JEONG, E-K.; EMERSON, L.; HOFFMAN, H.; PARKER, D.L.; LU, Z-R. Noninvasive evaluation of antiangiogenic effect in a mouse tumor model by DCE-MRI with Gd-DTPA cystamine copolymers. **Molecular Pharmaceutics**. v. 7(1), p. 41-48, 2010.

XIAO, K.; LUO, J.; FOWLER, W.; LI, Y.; LEE, J.; WANG, L.; LAM, K.S. A self-assembling nanoparticle for paclitaxel delivery in ovarian cancer. **Biomaterials**. v.30(30), p. 6006-6016, 2009.

XIAO, W.; LUO, J.; JAIN, T.; RIGGS, J. W.; TSENG, H. P.; HENDERSON, P. T.; CHERRY, S. R.; ROWLAND, D.; LAM, K.S. Biodistribution and pharmacokinetics of a telodendrimer micellar paclitaxel nanoformulation in a mouse xenograft model of ovarian cancer. **International Journal of Nanomedicine**. v.7, p. 1587-1597, 2012.

XING, Y.; ZHAO, J.; CONTI, P. S.; CHEN, K. Radiolabeled nanoparticles for multimodality tumor imaging. **Theranostics**. v.4, p. 290-306, 2014.

XU, X.; WANG, L.; XU, H. Q.; HUANG, X. E.; QIAN, Y. D.; XIANG, J. Clinical comparison between paclitaxel liposome (Lipusu®) and paclitaxel for treatment of

patients with metastatic gastric cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v.14(4), p. 2591-2594, 2013.

YAMAMOTO, Y.; KAWANO, I.; IWASE, H. Nab-paclitaxel for the treatment of breast cancer: efficacy, safety and approval. **OncoTargets and Therapy**. v.4, p. 123-136, 2011.

YOKOYAMA, M. Polymeric micelles as drug carriers: their lights and shadows. **Journal of Drug Targeting**. v.22(7), p. 576-583, 2014.

YOU, J.; ZHOU, J.; ZHOU, M.; LIU, Y.; ROBERTSON, J. D.; LIANG, D.; PELT, C. V.; LI, C. Pharmacokinetics, clearance, and biosafety of polyethylene glycol-coated hollow gold nanospheres. **Particle and Fibre Toxicology**. v.11(26), p. 1-14, 2014.

ZHANG, D.; YANG, R.; WANG, S.; DONG, Z. Paclitaxel: new uses for an old drug. **Drug Design, Development and Therapy**. v.8, p. 279-284, 2014.

ZHANG, H.; TAM, S.; INGHAM, E. S.; MAHAKIAN, L. M.; LAI, C.-Y.; TUMBALE, S. K.; TEESALU, T.; HUBBARD, N. E.; BOROWSKY, A. D.; FERRARA, K. W. Ultrasound molecular imaging of tumor angiogenesis with a neuropilin-1-targeted microbubble. **Biomaterials**. v.56, p. 104-113, 2015.

ZHANG, L., WANG, Y.; YANG, Y.; LIU, Y.; RUAN, S.; ZHANG, Q.; TAI, X.; CHEN, J.; XIA, T.; QIU, Y.; GAO, H.; HE, Q.. High tumor penetration of paclitaxel loaded pH sensitive cleavable liposomes by depletion of tumor collagen I in breast cancer. **Applied Materials and Interfaces**. v.7(18), p. 9691-9701, 2015.

ZHANG, P.; HUANG, Y.; LIU, H.; MARQUEZ, R. T.; LU, J.; ZHAO, W.; ZHANG, X.; GAO, X.; LI, J.; VENKATARAMANAN, R.; XU, L.; LI, S. A PEG-Fmoc conjugate as a nanocarrier for paclitaxel. **Biomaterials**. v.35, p.7146-7156, 2014.

ZHANG, Z.; MEI, L.; FENG S. Paclitaxel drug delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**. v.10, p. 325-340, 2013.

ZHOU, J.; ZHAO, W. Y.; MA, X.; JU, R. J.; LI, X. Y.; LI, N.; SUN, M. G.; SHI, J. F.; ZHANG, C. X.; LU, W. L. The anticancer efficacy of paclitaxel liposomes modified with mitochondrial targeting conjugate in resistant lung cancer. **Biomaterials**. v.34, p. 3626-3638, 2013.

ZHU, X.; LI, J.; HONG, Y.; KIMURA, R. H.; MA, X.; LIU, H.; QIN, C.; HU, X.; HAYES, T. R.; BENNY, P.; GAMBHIR, S. S.; CHENG, Z. ^{99m}Tc-labeled cystine knot peptide targeting integrin $\alpha_v\beta_6$ for tumor SPECT imaging. **Molecular Pharmaceutics**. v.11, p. 1208-1217, 2014.

ZUYLAN, L. V.; VERWEIJ, J.; SPARREBOOM, A. Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. **Investigational New Drugs**. v.19, p. 125-141, 2001.