

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

LIZIANE OLIVEIRA FONSECA MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E
ESTRUTURAIS DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS RECOBERTOS
COM POLIETILENOGLICOL CARREADORES DE PACLITAXEL**

**Belo Horizonte - MG
2015**

LIZIANE OLIVEIRA FONSECA MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E
ESTRUTURAIS DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS RECOBERTOS
COM POLIETILENOGLICOL CARREADORES DE PACLITAXEL**

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-Orientadora: Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira

Colaboradores: Prof. Dr. Ângelo Malaquias

Prof. Dr. Rogério Magalhães Paniago

**Belo Horizonte - MG
2015**

Folha de Aprovação

Dedico este trabalho àqueles a quem amo tanto e sempre estiveram comigo: meus pais Tânia e Alan, meu irmão Lucas e meu marido Ricardo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos e graças, e por conceder força e persistência para concretizar esse trabalho.

Aos meus pais, Tânia e Alan, pelo exemplo maior e amor incondicional. Agradeço por todos os esforços em me conceder a melhor educação possível e pelo incentivo em todos os objetivos que desejo conquistar. Seu apoio e orações foram indispensáveis a conclusão desse trabalho. É maravilhoso ter vocês comigo.

Ao Lucas, pelo companheirismo e carinho, mostrando a cada dia como é bom ter um irmão para amar!

Ao meu marido Ricardo, por toda dedicação em me fazer feliz! Por me fazer entender que a vida pode ser muito mais leve. Você foi essencial nessa conquista! Obrigada por cuidar de mim, me amar e estar sempre comigo em TODOS os momentos.

Aos meus avós, por todas as orações e carinho.

À Professora Elaine, por me receber com muito carinho e de braços abertos, confiando em mim para execução desse trabalho. Agradeço por toda orientação, ensinamentos, disponibilidade e amizade oferecida nesses dois anos! Obrigada por todas as conversas, pelas palavras de incentivo e carinho, pela paciência em ajudar sempre e por retornar a bancada sempre que precisei! Você é um exemplo de dedicação, profissionalismo e competência.

À Professora Mônica, por ter me recebido com carinho em sua equipe, por compartilhar seu conhecimento, pela confiança transmitida e pelas palavras de conforto quando mais precisamos.

Ao Professor André, pela ajuda indispensável com os experimentos, pela eterna disponibilidade e pela amizade.

Aos Professores Ângelo Malaquias e Rogério Magalhães Paniago, Departamento de Física – UFMG, pela disponibilidade e disposição em ajudar nas análises dos estudos de SAXS.

Ao Professor Lucas, pelo incentivo e amizade.

Aos professores do LTF, Martinha, Gisele, Gilson e Armando pelo apoio.

Ao Marcos, pela disposição em ajudar e por compartilhar de todos os detalhes desse trabalho comigo! Agradeço por toda amizade, carinho e pelas boas risadas!

À Nicolý, pela disponibilidade e ajuda no laboratório.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pelo apoio financeiro e por disponibilizar os equipamentos essenciais para a conclusão desse trabalho.

Ao Dr. Mateus Borba Cardoso, pelo auxílio durante os experimentos no LNLS.

Ao Jamil, pela disposição e boa vontade em auxiliar com a ultracentrífuga, sempre me socorrendo quando precisei.

À Dra. Cláudia e ao Leonardo Fuscaldi por toda ajuda e disponibilidade.

Ao José Batista e Adelaide, pela simpatia e disponibilidade.

Aos amigos do LTF: Diêgo, Sávia, Flávia, Fernanda, Marina, Juliana, Talita, Mariana, Délia, Val, Daniel, Linna, Elton, Ana Luiza, Carol, Michelle, Dani, Gabi, Lorena, Marcela, Mayara, Nayara, Aina, Míriam, Renata, Shirleide. Agradeço pela convivência diária, almoços, risadas e apoio dentro e fora do laboratório.

À Ana e Val por toda amizade e pelas longas conversas!

À Carol, pela disponibilidade, carinho e amizade!!! Você é a melhor “irmã” de bancada!

À Sávia, pelas conversas, desabafos e amizade. Por dividir seu conhecimento e estar SEMPRE disponível.

À Marina, por todo carinho, amizade e pela ajuda com os experimentos.

Aos meus familiares, por todas as orações.

Aos amigos, pelos bons momentos compartilhados.

À FAPEMIG, CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

RESUMO

O paclitaxel (PTX) é um fármaco com amplo espectro de atividade antitumoral. Contudo, sua baixa solubilidade em água limita o desenvolvimento de formulações de uso parenteral. A formulação comercialmente disponível, o Taxol[®], apresenta efeitos tóxicos consideráveis restringindo seu uso. Diante disso, o uso de lipossomas pH-sensíveis recobertos com polietilenoglicol constitui uma alternativa potencial para veicular o PTX (LpHS-PTX). Assim, teve-se como objetivo do estudo avaliar as propriedades físico-químicas e a organização estrutural de LpHS-PTX. Inicialmente foi validado um método analítico para quantificação do PTX em lipossomas por cromatografia líquida de alta eficiência. O método mostrou-se adequado para a quantificação específica e precisa do PTX. LpHS-PTX apresentaram propriedades físico-químicas adequadas, com diâmetro médio de 189 ± 3 nm, índice de polidispersão de 0,2, potencial zeta cerca de +1,40 mV e teor de encapsulação de $87 \pm 0,6$ %. Os estudos de calorimetria exploratória diferencial e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) dos componentes da formulação, em condições de baixa hidratação, evidenciaram a ocorrência de transição de fases do lípide estrutural, a dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), mostrando que a inclusão do PTX na bicamada não prejudicou a pH-sensibilidade do sistema. Estudos de SAXS em condições de maior hidratação evidenciaram a manutenção da pH-sensibilidade dos LpHS-PTX frente a redução de pH. Na presença do soro fetal bovino, a interação dos LpHS-PTX com as proteínas séricas levou a formação de estruturas menos ordenadas, sugestivas de modificações supramoleculares. No estudo comparativo do efeito da composição lipídica na pH-sensibilidade observou-se que a redução da razão molar da DOPE nas formulações ocasionou uma redução da resposta dos LpHS-PTX frente à redução do pH. A ausência de transição de fases do LpHS-PTX frente a alterações de temperatura, evidenciou uma adequada estabilidade do sistema. Resultados obtido no presente trabalho confirmam a pH-sensibilidade do sistema desenvolvido, apresentando os LpHS-PTX como alternativa promissora para o uso intravenoso de PTX no tratamento do câncer.

Palavras-chave: câncer, paclitaxel, lipossomas, dioleoilfosfatidiletanolamina, pH sensibilidade, calorimetria exploratória diferencial, espalhamento de raios-X a baixo ângulo.

ABSTRACT

Paclitaxel (PTX) is a chemotherapeutic agent that has been shown significant antitumor activity for the treatment of a variety of cancers. However, the low solubility of PTX in aqueous medium represents a barrier to the development of formulations for intravenous administration. The commercially available formulation, Taxol[®], has considerable side effects restricting its use. Thereby, the use of pH-sensitive liposomes covered by polyethyleneglycol is a potential alternative to carrier PTX (LpHS-PTX). Thus, the aims of this work were physicochemical characterization and evaluation of the structural organization of LpHS-PTX. Firstly, an analytical method for PTX quantification by high performance liquid chromatography was validated. The method was specific and accurate for the PTX quantification. LpHS-PTX presented adequate physicochemical properties including a mean diameter of 189 ± 3 nm, polydispersity index of 0.2, zeta potential of +1.40 mV and entrapment efficiency of 87 ± 0.6 %. Studies of Differential Scanning Calorimetry and Small Angle X-ray Scattering (SAXS) of formulation compounds, under low hydration conditions, revealed the phase transitions of the structural lipid, dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), and showed that the inclusion of PTX in the bilayer did not compromise the pH-sensitivity system. SAXS studies under higher hydration conditions, revealed the pH-sensibility of LpHS-PTX over pH reduction. In the presence of fetal bovine serum, the interaction between LpHS-PTX and serum proteins, led to a formation of less ordered structures suggestive of supramolecular modifications. A comparative study of the effect of lipid composition on the pH-sensitivity showed that reducing the molar ratio of DOPE in the formulation resulted in a reduction of the pH-sensitive liposomes response. At different conditions of temperature, the absence of phase transition in the LpHS-PTX evidenced the stability of the system. Results confirm pH-sensitivity of the developed system, presenting LpHS-PTX as a promising alternative for intravenous administration of PTX in cancer treatment.

Key-words: cancer, paclitaxel, liposomes, dioleoylphosphatidylethanolamine, pH sensitivity, differential scanning calorimetry, small angle x-ray scattering.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura Química do PTX.....	26
FIGURA 2 - Representação esquemática dos heterodímeros de α/β tubulina e da estrutura dos microtúbulos.....	27
FIGURA 3 - 3 - Mecanismo de ação do PTX – O fármaco se liga à subunidade β-tubulina no lúmen dos microtúbulos provocando distúrbio em sua formação e impedindo a proliferação das células neoplásicas.....	28
FIGURA 4 - Representação esquemática do lipossoma demonstrando a cavidade aquosa interna envolvida por uma bicamada lipídica (A). Bicamada lipídica, visualizada em maior aumento, mostrando a cabeça polar (região hidrofílica) e a cauda apolar (região hidrofóbica) dos lípides (B).....	33
FIGURA 5 - Representação esquemática dos lipossomas. Classificação quanto ao tamanho e número de bicamadas lipídicas. Vesículas multilamelares (A), vesículas unilamelares grandes (B) e vesículas unilamelares pequenas (C).....	34
FIGURA 6 – Efeito EPR. Vasculatura em tecido normal com células endoteliais justapostas permite a passagem da droga livre (A), vasculatura do tecido tumoral com fenestrações, permitindo o extravasamento dos lipossomas nessa região (B).....	35
FIGURA 7 - Estrutura química da distearoilfosfatidiletanolamina acoplada ao polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG⁻²⁰⁰⁰).....	36
FIGURA 8 - Estruturas químicas do hemisuccinato de colesterila (A) e da dioleilfosfatidiletanolamina (B).....	37
FIGURA 9 - Representação esquemática da organização estrutural de derivados da PE na ausência (A) e na presença (B) de CHEMS.....	38
FIGURA 10 - Fases de agregação dos fosfolípides em meio aquoso.....	43
FIGURA 11 - Organização estrutural dos fosfolípide na fase lamelar (A), cúbica (B) e hexagonal (C).....	45
FIGURA 12: Esquema de diluição para preparo das soluções de PTX em acetonitrila (ACN) nas diferentes concentrações propostas para a determinação da curva padrão de PTX.....	57
FIGURA 13 - Sobreposição dos perfis cromatográficos obtidos para solução de PTX (linha contínua) e formulação lipossomal branca (LpHS, linha tracejada).....	60
FIGURA 14 – Representação gráfica da curva analítica para doseamento do PTX obtida pelo método de CLAE.....	62
FIGURA 15 - Processo de preparo das amostras de LpHS e LpHS-PTX utilizadas nas análises de SAXS.....	74
FIGURA 16 - Curva de DSC da amostra DOPE + NaCl.....	76

FIGURA 17 - Difractogramas da amostra DOPE:NaCl. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho representam a as moléculas da DOPE em organização lamelar e os índices sem azul correspondem a fase hexagonal (H _{II}).....	77
FIGURA 18 - Curva de DSC da amostra de CHEMS puro.....	78
FIGURA 19 - Curva de DSC da amostra DOPE:CHEMS:NaCl.....	79
FIGURA 20 - Difractogramas da amostra DOPE:CHEMS:NaCl. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho e azul representam a moléculas da DOPE em organização lamelara. Os índices em verde e rosa correspondem à fase não lamelar do sistema.....	80
FIGURA 21 - Curva de DSC da amostra de DSPE-PEG ₂₀₀₀ puro.....	81
FIGURA 22 - Curva de DSC da amostra de DOPE:CHEMS:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :NaCl.....	82
FIGURA 23 - Difractogramas da amostra DOPE:CHEMS:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :NaCl. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho, azul e preto indicam moléculas de DOPE organizadas em fase lamelar. Os índices em verde correspondem a moléculas de DOPE em fase não lamelar.....	84
FIGURA 24 - Curva de DSC da DOPE:CHEMS:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :NaCl:PTX.....	85
FIGURA 25 - Difractogramas da amostra DOPE:CHEMS:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :NaCl:PTX. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho, azul e preto indicam moléculas de DOPE organizadas em fase lamelar. Os índices em verde correspondem a moléculas de DOPE organizadas em fase não lamelar.....	86
FIGURA 26 - Difractogramas dos LpHS-PTX preparados em NaCl 0,9% (p/v) pH 7,4; 6,8 e 5,0 obtidos na temperatura de 25 °C. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho e azul são referentes à fase lamelar das moléculas da DOPE e o índice em verde correspondem à organização em fase cúbica das moléculas da DOPE.....	95
FIGURA 27 - Difractogramas dos LpHSPC-PTX preparados em NaCl 0,9% (p/v) pH 7,4 e 5,0 obtidos na temperatura de 25 °C. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em azul são referentes a organização lamelar das moléculas de DOPE. Os índices em vermelho correspondem à organização não lamelar das moléculas de DOPE.....	98
FIGURA 28 - Difractogramas dos LpHS-PTX preparados em NaCl 0,9% (p/v), meio de cultura (MC) e meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (MCS) em pH 7,4 e temperatura de 25 °C. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em azul e vermelho são referentes à organização lamelar da DOPE. Os índices representados em verde correspondem à fase não lamelar.....	99
FIGURA 29 - Difractogramas dos LpHS preparados em meio de cultura (MC) pH 7,4; 6,8 e 5,0 obtidos na temperatura de 25 °C. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho são referentes à organização não lamelar das moléculas de DOPE.....	102

FIGURA 30 - Difractogramas dos LpHS-PTX preparados em meio de cultura (MC) pH 7,4; 6,8 e 5,0 obtidos na temperatura de 25 °C. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho são referentes à organização das moléculas da DOPE em fase lamelar. Os índices em azul correspondem à organização das moléculas da DOPE em fase não lamelar.....	103
FIGURA 31 - Difractogramas dos LpHS-PTX preparados em meio de cultura (MC) pH 7,4; 6,8 e 5,0 obtidos na temperatura de 37 °C. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho são referentes à organização das moléculas da DOPE em fase lamelar. Os índices em azul correspondem à organização das moléculas da DOPE em fase não lamelar.....	105
FIGURA 32 - Difractogramas dos LpHS preparados em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10% (MCS) pH 7,4; 6,8 e 5,0 obtidos na temperatura de 25 °C.....	106
FIGURA 33 - Difractogramas dos LpHS-PTX preparados em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10% (MCs) pH 7,4; 6,8 e 5,0 obtidos na temperatura de 25 °C.....	107
FIGURA 34 - Difractogramas dos LpHS-PTX preparados em meio de cultura (MC) pH 7,4; 6,8 e 5,0 obtidos na temperatura de 37 °C.....	108
FIGURA 35 - Difractogramas dos LpHS-PTX preparados em NaCl 0,9%(p/v) obtidos mediante taxa de aquecimento de 5°C/min. Faixa de temperatura: 0°C a 50°C. Análise das transições de fase da DOPE em função da temperatura.....	110
FIGURA 36 - Estudo da transição de fases da DOPE presente nos LpHS-PTX preparados em NaCl 0,9%(p/v) em pH 7,4 frente a alterações de temperatura.....	111

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Estudos de estabilidade e caracterização físico-química de sistemas lipossomais carreadores de PTX.....	40
TABELA 2 - Razões de Reflexão de Bragg para diferentes espaçamentos de rede.....	47
TABELA 3 – Resultados obtidos para análise da regressão linear, testes de premissas e ajuste ao modelo linear para o método de quantificação do PTX por CLAE.....	62
TABELA 4 – Determinação da precisão intra-dia e inter-dias para o método de doseamento do PTX por CLAE.....	63
TABELA 5 – Determinação da exatidão do método de doseamento do PTX por CLAE.....	64
TABELA 6 - Determinação da robustez do método de doseamento do PTX por CLAE.....	65
TABELA 7 - Caracterização do diâmetro médio, índice de polidispersão e distribuição acumulada do tamanho das partículas expressa em termos de volume para as formulações LpHS e LpHS-PTX.....	90
TABELA 8 - Caracterização do potencial zeta das vesículas dos LpHS e LpHS-PTX..	91
TABELA 9 - Determinação do teor de encapsulação do PTX em LpHS.....	93
TABELA 10 - Temperaturas utilizadas no estudo de estabilidade acelerada dos LpHS-PTX em NaCl 0,9%(p/v).....	109

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

10-DABIII	10-desacetilbacatina III
AFM	Microscopia de Força Atômica
Am- β -CD+/pAct	Complexo 6-monodesoxi-6-monoamino- β -ciclodextrina com plasmídeo contendo o gene que codifica a proteína activina
AO	Ácido Oleico
AU	Ácido Ursólico
CHEMS	Hemisuccinato de Colesterila
Chol	Colesterol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMD	Concentrações Médias Determinadas
D	Distância interplanar
DEPC	Dielaidoilfosfatidilcolina
DLS	Dynamic Light Scattering
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DMPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DOPC	Dioleoilfosfatidilcolina
DOPE	Dioleoifosfatidiletanolamina
DOTAP	1,2-dioleiltrimetilamôniopropano
DP	Desvio Padrão
DP_a	Desvio padrão médio do intercepto com o eixo y
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPE-PEG	Dipalmitoilfosfatidiletanolamina associada ao polietilenoglicol
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	Differential Calorimetry Scanning/Calorimetria Diferencial Exploratória
DSPC	Diesteroilfosfatidilcolina
DSPE-PEG ₂₀₀₀	Diestearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol 2000
DSPE-PEG ₂₀₀₀ folato	Diestearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol e folato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDXD	Difração de Raio-x Dispersiva em Energia
EPC	Fosfatidilcolina de ovo
EPR	<i>Enhanced Permeability Retention</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
H _{II}	Hexagonal Invertida
HEPC	Fosfatidilcolina de ovo hidrogenada
IC	Inclinação da Curva de Calibração
L α	Lamelar fluida
L β	Lamelar gel
LC	Lamelar cristalina
LD	Limite de Detecção
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
LpHS	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada

LpHS-PTX	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo paclitaxel
LpHSPC-PTX	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo fosfatidilcolina de soja carreadores de paclitaxel
LQ	Limite de Quantificação
LUV	Vesículas Unilamelares Grandes
MC	Meio de cultura RPMI 1640
MCS	Meio de cultura RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino 10% (v/v)
MEC	Microscopia Eletrônica de Criofratura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MLV	Vesículas Multilamelares
MPEG	Diesteroilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol 2000 metoxilado;
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ODN	Oligonucleotídeo 15-mer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> /Tampão Salina-fosfato
PC	Fosfatidilcolina
PCS	<i>Photon Correlation Spectroscopy</i> /Espectroscopia de Correlação de Fótons
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenoglicol
PG	Fosfatidilglicerol
PTX	Paclitaxel
Q	Vetor de espalhamento
Q _{II}	Cúbica Invertida
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonucleico
SAXS	<i>Small Angle X-ray Scattering</i> /Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
SCPC	Esteraoilcaprioilfosfatidilcolina
SFB	Soro fetal bovino
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SMF	Sistema Mononuclear Fagocitário
SPC	Fosfatidilcolina de soja
SpHL-CDDP	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina
SpHL-AU	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo ácido ursólico
SUV	Vesículas Unilamelares Pequenas
TE	Teor de Encapsulação
T _m	Temperatura de Transição de fases

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
REVISÃO DE LITERATURA.....	22
1.1 Câncer.....	22
1.2 Tratamento do Câncer.....	24
1.3 Paclitaxel.....	25
1.4 Lipossomas.....	32
1.5 PTX em sistemas lipossomais.....	39
1.6 Análise da transição de fases dos lípides.....	42
1.6.1 <u>Calorimetria Diferencial Exploratória</u>	45
1.6.2 <u>Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)</u>	46
1.7 Caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados.....	49
OBJETIVOS.....	52
Objetivo Geral.....	52
Objetivos Específicos.....	52
Capítulo 1 – Validação do Método Analítico para doseamento do PTX em formulações lipossomais.....	53
1 INTRODUÇÃO.....	54
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1 Material.....	55
2.1.1 <u>Reagentes</u>	55
2.1.2 <u>Equipamentos e Condições de Análise</u>	55
2.2 Métodos.....	55
2.2.1 <u>Especificidade</u>	56
2.2.2 <u>Linearidade</u>	56
2.2.3 <u>Precisão</u>	57
2.2.4 <u>Exatidão</u>	58
2.2.5 <u>Robustez</u>	58
2.2.6 <u>Limites de Detecção e Quantificação</u>	58

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.1 Especificidade.....	60
3.2 Linearidade.....	61
3.3 Precisão.....	62
3.4 Exatidão.....	63
3.5 Robustez.....	64
3.6 Limites de Detecção e Quantificação.....	65
4 CONCLUSÃO.....	66

Capítulo 2 – Preparo e caracterização físico-química das formulações lipossomais.....

1 INTRODUÇÃO.....	68
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1 Material.....	69
2.2 Estudo das interações entre os componentes dos LpHS-PTX sob condições de baixa hidratação.....	69
2.2.1 <u>Preparo das amostras</u>	69
2.2.2 <u>Análises Calorimétricas</u>	70
2.2.3 <u>Espalhamento de raios-X a baixo ângulo</u>	70
2.3 Caracterização físico-química e estrutural das formulações lipossomais hidratadas.....	71
2.3.1 <u>Preparo dos LpHS-PTX</u>	71
2.3.2 <u>Determinação do teor de encapsulação do PTX em LpHSFT-PTX....</u>	72
2.3.3 <u>Avaliação do diâmetro e índice de polidispersão</u>	73
2.3.4 <u>Análise do Potencial Zeta</u>	73
2.3.5 <u>Preparo dos <i>Pellets</i> de lipossomas para análise por SAXS</u>	73
2.4 Análise estatística.....	74
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
3.1 Estudo das interações entre os componentes dos LpHS-PTX sob condições de baixa hidratação.....	75
3.1.1 <u>DOPE:NaCl</u>	75
3.1.2 <u>DOPE:CHEMS:NaCl</u>	77
3.1.3 <u>DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀:NaCl</u>	81

3.1.4 DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀:PTX:NaCl.....	85
3.2 Caracterização físico-química e estrutural das formulações lipossomais hidratadas.....	89
3.2.1 <u>Determinação do diâmetro e índice de polidispersão</u>.....	89
3.2.2 <u>Determinação do potencial zeta</u>.....	91
3.2.3 <u>Determinação do teor de encapsulação do PTX nos LpHS</u>.....	92
3.3 Estudo do efeito do pH do meio sobre a organização supramolecular dos LpHS-PTX.....	93
3.4 Estudo do efeito dos constituintes do meio de cultura sobre a organização supramolecular dos LpHS-PTX.....	99
3.5 Avaliação do comportamento de fase da DOPE na presença dos constituintes do meio de cultura (MC) frente à redução do pH.....	101
3.6 Avaliação do comportamento de fase da DOPE na presença dos constituintes do meio de cultura suplementado com SFB frente à redução do pH.....	105
3.7 Estudo do efeito da temperatura na estabilidade de armazenamento dos LpHS-PTX.....	108
4 CONCLUSÃO.....	113
PERSPECTIVAS.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O câncer é um evidente problema para a saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que no ano de 2030 ocorrerão cerca de 27 milhões de novos casos de câncer que levarão, anualmente, a morte de cerca de 17 milhões de pacientes, principalmente em países de baixa e média renda. As estimativas para o ano de 2015 no Brasil apontam a ocorrência de aproximadamente 576.000 novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a gravidade do problema no país (INCA, 2013).

Existem três principais abordagens para o tratamento do câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia, que podem ser usados isoladamente ou em combinação, de acordo com o tipo e a gravidade da doença (SPITZNER et al., 2014). A quimioterapia figura entre as principais alternativas terapêuticas na oncologia sendo utilizada no tratamento primário, terapia adjuvante e paliativa do câncer, com benefício particular na doença metastática que exige uma abordagem sistêmica de tratamento. O principal objetivo da quimioterapia é a destruição das células neoplásicas, preservando as células normais. Contudo, na maior parte das vezes os agentes quimioterápicos atuam de forma não-específica, lesando também células normais (BRANDÃO et al., 2010; VANNEMAN e DRANOFF, 2012). Desta forma, o grande desafio no desenvolvimento de fármacos antitumorais é a identificação de agentes eficazes, específicos e seguros (ALMEIDA et al., 2005).

O paclitaxel (PTX) é um quimioterápico com atividade antitumoral comprovada contra vários tumores sólidos, figurando como um dos agentes antitumorais mais importantes na clínica (LIU et al., 2011; ZHANG, et al., 2014). A formulação comercial disponível, o Taxol[®], apresenta uma série de problemas de estabilidade e efeitos adversos associados ao seu uso terapêutico como reações de hipersensibilidade, neuropatia periférica mielossupressão alterações cardíacas, mucosite, estomatite, alterações gastrointestinais, náuseas e alopecia (HOYER, 2000; DONYAI e SEWELL, 2006; SURAPANENI et al., 2012). O Abraxane[®], nanopartículas de albumina ligada ao PTX, revelou melhores taxas de resposta e melhoria no tempo de progressão da doença, comparada ao Taxol[®], no entanto, alguns estudos relatam que essa formulação é mais neurotóxica que o Taxol[®] (YAMASHITA et al., 2011; FENG e MUMPER, 2013).

No intuito de aumentar a segurança da utilização do PTX e contornar os inconvenientes previamente relatados, várias abordagens farmacotécnicas utilizando sistemas de liberação de fármacos têm sido adotadas. Embora a maioria dos estudos relate redução da toxicidade, a baixa estabilidade dos sistemas estudados ainda é um problema evidente. Nesse contexto, uma formulação lipossomal pH-sensível de circulação prolongada carreando o PTX (LpHS-PTX) composta por dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), hemisuccinato de colestera (CHEMS) e diestearoilfosfatidiletanolamina acoplada ao polietilenoglicol (DSPE-PEG) foi desenvolvida por nosso grupo de pesquisa e avaliada quanto suas características físico-químicas e citotoxicidade. Os resultados mostraram ganhos importantes em termos de estabilidade e citotoxicidade *in vitro* em linhagens celulares de câncer de mama (BARBOSA, 2014).

É bem documentado na literatura que o comportamento de fase do lípide estrutural, a DOPE, revela a presença de fases essenciais para a formação e desestabilização dos lipossomas. Além disso, existem relatos de que fatores como o grau de hidratação, a temperatura, o pH e a concentração de sais podem induzir transições de fases das moléculas de DOPE (SEDDON, 1990). Portanto, elucidar o comportamento termodinâmico das moléculas de DOPE é essencial para entender os aspectos relacionados à estabilidade do sistema bem como sua eficiência *in vivo*, uma vez que estão diretamente relacionados à transição de uma fase lamelar (bicamada estável) para fases não-lamelares. Nesse sentido, no presente estudo, a caracterização físico química e a avaliação da organização estrutural dos LpHS-PTX foram conduzidas, visando elucidar a organização supramolecular, as transições de fases do lípide estrutural, a estabilidade frente a alterações de temperatura e a pH-sensibilidade do sistema em diferentes condições de análises.

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Câncer

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento e proliferação descontrolada de células transformadas devido alterações de seu DNA. Entre os principais fatores de risco relacionados à doença, os fatores ambientais e hereditários são os mais prevalentes. Cerca de 80% dos casos estão relacionados ao meio ambiente, ocupacional, social, cultural e de consumo. Os principais agentes indutores de neoplasias são os carcinógenos químicos, energia radioativa, vírus, bactérias e parasitas. Em geral, agentes cancerígenos provocam o desaparecimento das funções celulares específicas e o desenvolvimento de funções diferenciadas, além de alterações na morfologia celular. Dessa forma, os hábitos e o estilo de vida determinam o aparecimento de diferentes tipos de câncer (ALMEIDA et al., 2005; BRANDÃO et al., 2010; JENA, 2012; SAFARZADEH et al., 2014; INCA, 2015).

O crescimento e diferenciação celular são processos essenciais, responsáveis pela formação e recomposição dos tecidos que desempenham diversas funções específicas e vitais para os seres vivos. O processo de proliferação celular consiste em uma série complexa de eventos altamente regulados que culminam com a duplicação do DNA e divisão da célula. Todas as células eucarióticas têm um ciclo celular dividido em quatro fases (G₁, S, G₂ e M), além de uma fase final, G₀, período onde não ocorre proliferação celular e a célula está condicionada a se dividir apenas após estímulo externo. A passagem de G₀ para G₁ está condicionada à presença de fatores de crescimento e sinais internos. Na fase G₁ a célula está se preparando para a duplicação do material genético, o citoplasma encontra-se aumentando, com intensa síntese de RNA e proteínas. A fase S, é a etapa onde ocorre a duplicação do DNA. Em G₂ a célula se prepara para iniciar a mitose (M) por meio da síntese de RNA e proteínas essenciais para essa fase. Na mitose, primeiramente, acontece a cariocinese (prófase, metáfase, anáfase e telófase), seguida da citocinese que consiste no estrangulamento e divisão do citoplasma no final do processo (ROBBINS e COTRAN, 2005; BRASILEIRO-FILHO et al., 2011). Os principais pontos de regulação acontecem na transição da fase G₁/S e G₂/M, onde ocorrem pausas no processo para a verificação e, se necessário, ativação de mecanismos de reparo do

DNA. No entanto, com frequência, células normais perdem o controle desses mecanismos regulatórios e, uma das consequências é o surgimento do câncer (KENNY et al., 2003; BRASILEIRO-FILHO et al., 2011; PFLAUM et al., 2014).

Sabe-se que a transformação de células normais em malignas é resultado de passos bem definidos, os quais incluem: iniciação, onde ocorre dano ao DNA; promoção, onde mudanças genéticas e epigenéticas adicionais aumentam o dano genômico; e progressão para uma doença localmente invasiva ou metastática (HLATKY E HAHNFELDT, 2014).

Um fator fundamental na proliferação e proteção do tumor da destruição imune é o estabelecimento do processo angiogênico, o qual é essencial para a nutrição do tumor e funciona como rota para que as células neoplásicas entrem na circulação e atinjam outros tecidos distantes. Estudos apontam uma participação importante das metaloproteinases no processo de crescimento e invasão tumoral, uma vez que são responsáveis pela degradação dos constituintes da matriz extracelular, pré-requisito para a formação de novos vasos. Assim, no momento em que as células tumorais encontram-se em situação de hipóxia ocorre um aumento da expressão de fator de crescimento estimulador da angiogênese, ativando a produção de novos vasos para suprir as necessidades do tecido tumoral (JOBIM, 2008; GRIFFIOEN, 2014).

Outro aspecto importante consiste no fato do pH extracelular do tecido tumoral ser mais ácido do que em tecidos normais. Como a vascularização da região tumoral é heterogênea, a acidez observada nesse local é decorrente do clearance ineficiente dos metabólitos ácidos resultantes da glicólise aeróbica intensa que ocorre nas células tumorais. Sabe-se que o pH da região tumoral permanece próximo de 6,5; enquanto nos tecidos normais e sangue, o pH extracelular encontra-se em torno de 7,4 (STUBBS,1999; FERREIRA et al., 2013; GOUBRAN, 2014). O pH intracelular de ambos os tecidos é relativamente similar devido à necessidade de se manter um ambiente favorável às várias atividades citoplasmáticas.

1.2 Tratamento do Câncer

Existem três principais abordagens para o tratamento do câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia, que podem ser usadas isoladamente ou em combinação, de acordo com o tipo e a gravidade da doença. O procedimento cirúrgico é bastante eficaz para a remoção de tumores sólidos, caso não exista metástase. A radioterapia isoladamente é capaz de controlar e diminuir a taxa de crescimento dos tumores, reduzindo a recorrência e o aparecimento de metástases. De modo geral, a radioterapia é realizada em conjunto com a intervenção cirúrgica, aumentando, assim, a eficácia do tratamento e a sobrevida do paciente (ALMEIDA et al., 2005; SPITZNER et al., 2014).

A quimioterapia figura como a principal alternativa terapêutica na oncologia sendo utilizada no tratamento primário, terapia adjuvante e paliativa do câncer, com benefício particular na doença metastática. O principal objetivo da quimioterapia é a destruição das células neoplásicas, preservando as células normais. A maioria dos fármacos antitumorais tem a capacidade de destruir rapidamente as células cancerosas *in vitro*. Contudo, a administração *in vivo* desses agentes quimioterápicos resulta em uma ação não-específica, lesando também as células normais, em especial às células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, as capilares e as do sistema imunológico (BRANDÃO et al., 2010; VANNEMAN e DRANOFF, 2012).

Um agente antineoplásico adequado deve possuir meia-vida longa, baixa taxa de metabolismo enzimático, deve ser bem absorvido por via oral ou, no caso de uso por via intravenosa possuir boa solubilidade e um perfil farmacocinético adequado. Além disso, deve apresentar um perfil de toxicidade favorável em doses biologicamente efetivas. Contudo, os quimioterápicos atuais possuem elevada toxicidade, são susceptíveis à resistência, além de serem pouco específicos (CHABNER e ROBERTS, 2005; IWAMOTO, 2013; ZHAO e RODRIGUEZ, 2013).

Ao longo dos anos, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de desenvolver agentes quimioterápicos mais eficazes e específicos para o tratamento de tumores. No entanto, o grande desafio no desenvolvimento de fármacos antitumorais não é a

identificação de agentes capazes de destruir células cancerosas, mas sim encontrar fármacos com elevada especificidade e segurança (ALMEIDA et al., 2005).

Dentre os diversos alvos para os quimioterápicos destacam-se os microtúbulos. Essas estruturas são essenciais para a formação do citoesqueleto celular, conferindo forma estrutural e determinando a posição das organelas. Além disso, são fundamentais no processo de divisão celular, uma vez que suas propriedades sinalizadoras permitem a transmissão de sinais celulares que modulam a reorganização das organelas, a mobilidade celular, os processos de secreção, comunicação neuronal, entre outros (JORDAN e WILSON, 2004). As principais classes de agentes antineoplásicos cujo mecanismo de ação envolve a estabilização dos microtúbulos são os alcalóides da vinca (vincristina, vimblastina, vinorelbina) e os taxanos (PTX e docetaxel) (BRANDÃO et al., 2010; MOUDI et al., 2013).

1.3 Paclitaxel

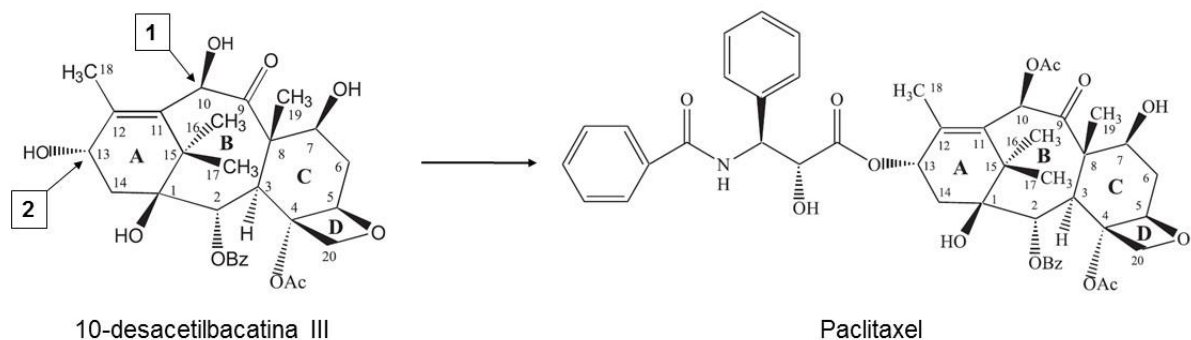
O PTX é uma molécula de origem natural amplamente utilizada como antineoplásico. Essa substância foi isolada pela primeira vez em 1971, por Wall & Wani, no Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, a partir do extrato das cascas da *Taxus brevifolia*, conhecida comumente como Teixo do Pacífico (GUCHELAAR et al., 1994; ZHANG, et al., 2014). No ano de 1979, Horwitz e colaboradores demonstraram que o PTX era capaz de estabilizar os microtúbulos, impedindo sua despolimerização, processo fundamental à replicação celular. Essa substância foi o primeiro produto capaz de inibir a divisão celular mediante despolarização de microtúbulos, um mecanismo celular até então desconhecido (SOUZA, 2004).

A casca da *Taxus brevifolia* contém pequenas quantidades de PTX (0,01-0,03%), tornando-se necessário a utilização de um elevado número de árvores para obter quantidades consideráveis do antitumoral para suprir o mercado farmacêutico. Devido à eficácia terapêutica apresentada pelo fármaco, iniciaram-se pesquisas para o desenvolvimento de processos de obtenção do PTX a partir de fontes mais sustentáveis. Visando garantir um fornecimento contínuo, desenvolveu-se um processo de obtenção semi-sintética do PTX, recorrendo a um precursor, o 10-desacetilbacatina III (10-DABIII), isolado a partir das folhas das árvores da *Taxus*

baccata (Teixo europeu). O 10-DABIII apresenta o esqueleto básico e as funcionalidades do PTX. O fármaco é obtido pela acetilação da posição 10 da 10-DABIII e pela introdução da cadeia lateral na posição C-13 (FIGURA 1). Portanto, esse método figura como fonte renovável para obtenção do PTX, uma vez que dispensa a destruição das árvores, figurando como fonte renovável da droga (SOUZA, 2004; BRANDÃO et al., 2010).

O PTX é um alcaloide diterpeno quimicamente conhecido como (2 α , 5 β , 7 β , 10 β , 13 α)-4,10-Diaceoxi-13-[[2R,3S]-3-(benzoil-amino)-2-hidroxi-3-fenilpropanoil]oxi}-1,7-dihidroxi-9-oxo-5,20-epoxi-tax-11-em-2-ilo, com fórmula molecular C₄₇H₅₁NO₁₄. Sua estrutura consiste em um núcleo rígido e complexo formado por quatro anéis fundidos e por quatro cadeias laterais hidrofóbicas, o que torna a molécula altamente lipofílica (log P próximo de 4,0) e praticamente insolúvel em água (0,3 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$). Além disso, possui alta taxa de ligação a proteínas plasmática, fato que contribui para a redução da sua biodisponibilidade *in vivo* (LIU et al., 2011; SURAPANENI et al., 2012; ZHANG, et al., 2014).

FIGURA 1 – Semi-síntese do PTX a partir da 10-desacetilbacatina III. O PTX é obtido pela acetilação da posição 10 (indicada em 1) e pela introdução da cadeia lateral na posição C-13 (indicada em 2) da 10-DABIII.



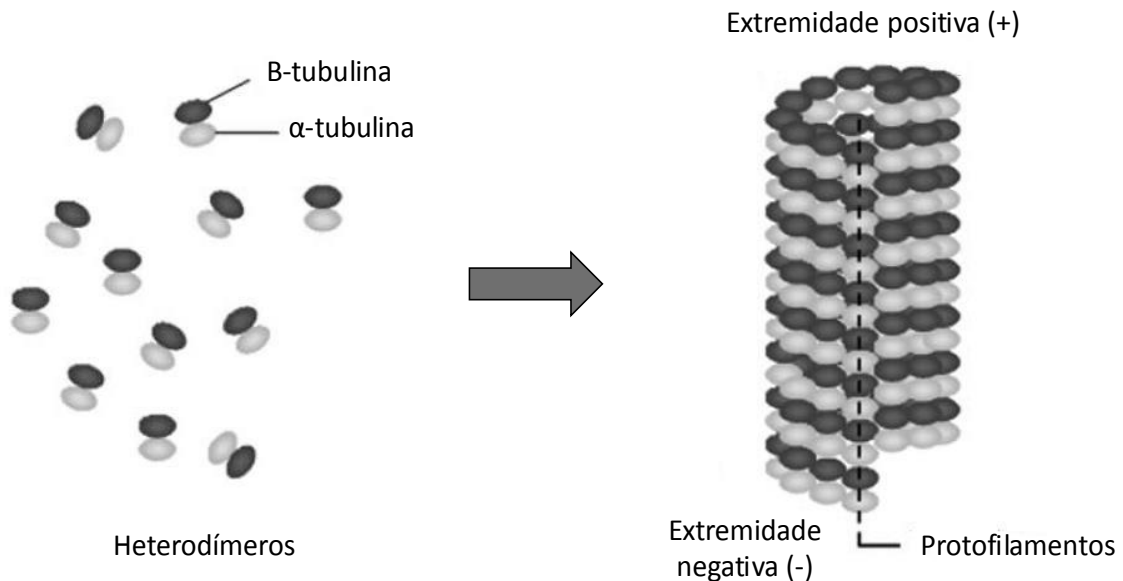
Adaptado de SOUZA, 2004.

O mecanismo de ação do PTX está relacionado com a estabilização irreversível dos microtúbulos mediante ligação a subunidade β da tubulina. Nesse processo ocorre a perda da funcionalidade dos microtúbulos e a inibição da mitose das células em divisão na fase G₂, impedindo a proliferação das células neoplásicas (SCHIFF et al., 1979; GUCHELAAR et al., 1994; ALTMANN e GERTSH, 2007; SURAPANENI et al.,

2012). Os microtúbulos constituem um dos principais componentes do citoesqueleto das células eucarióticas onde desempenham várias funções celulares importantes, tais como a formação do fuso mitótico durante a divisão celular, que garante a separação dos cromossomas duplicados em dois conjuntos idênticos antes da clivagem da célula (JORDAN e WILSON, 2004).

Estruturalmente, os microtúbulos são constituídos por treze protofilamentos alinhados longitudinalmente em forma de tubo. Cada protofilamento linear é constituído por vários heterodímeros de α e β tubulina. Os microtúbulos apresentam duas extremidades distintas: uma positiva finalizada com uma subunidade de β -tubulina e outra negativa que termina com uma subunidade α -tubulina (**FIGURA 2**) (SCHIFF et al., 1979; ALTMANN e GERTSH, 2007).

FIGURA 2 - Representação esquemática dos heterodímeros de a α/β tubulina e da estrutura dos microtúbulos

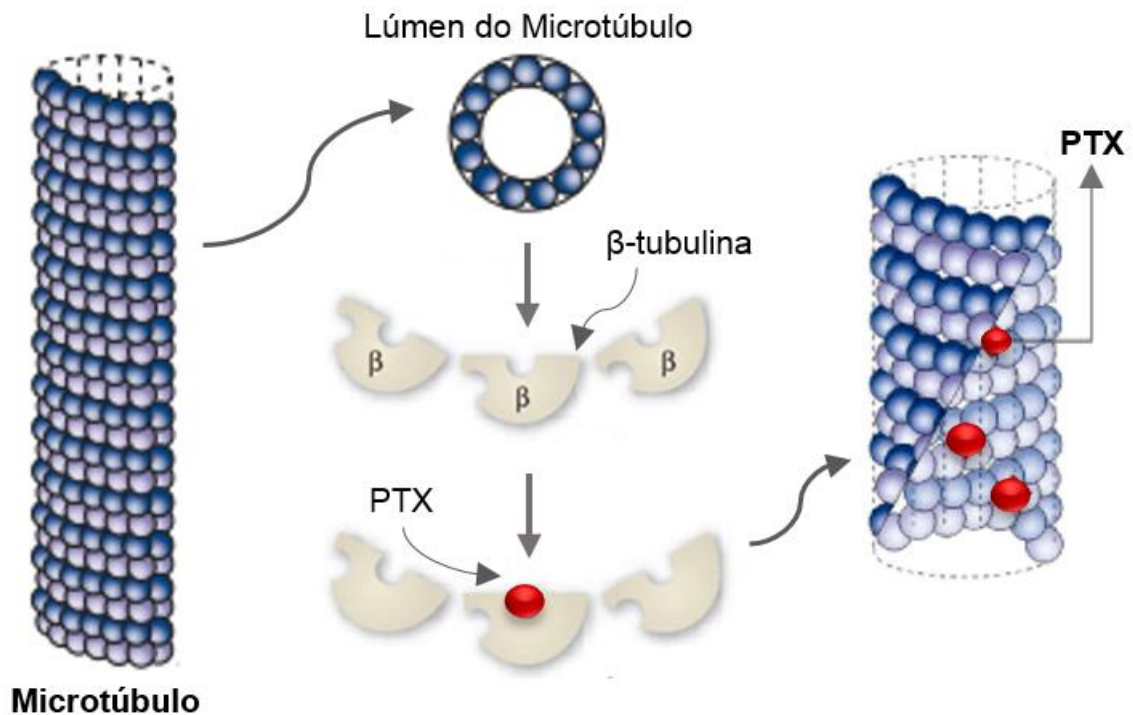


Adaptado de ALTMANN e GERTSH, 2007

Os microtúbulos são estruturas altamente dinâmicas com capacidade de encurtar e alongar por meio da adição ou perda de heterodímeros de tubulina α/β nas suas extremidades. A regulação dinâmica dos microtúbulos efetuada pelas células envolve várias proteínas endógenas e trifosfato de guanosina uma vez que as duas

extremidades apresentam dinamismo muito diferente, sendo a extremidade positiva mais dinâmica que a negativa. Assim, a ligação do PTX à subunidade β -tubulina no lúmen dos microtúbulos polimerizados provoca um distúrbio na formação dessas estruturas que passam a apresentar doze protofilamentos, se tornando resistentes à despolimerização. Esse processo ocasiona a supressão da dinâmica microtubular interrompendo a mitose e a proliferação celular (**FIGURA 3**) (GUCHELAAR et al., 1994; JORDAN e WILSON, 2004).

FIGURA 3 - Mecanismo de ação do PTX. O fármaco se liga à subunidade β -tubulina no lúmen dos microtúbulos provocando distúrbio em sua formação e impedindo a proliferação das células neoplásicas



Adaptado de JORDAN e WILSON, 2004; SNYDER, 2007.

A aprovação do uso do PTX pelo *Food and Drug Administration* (FDA) no início da década de 90 proporcionou um avanço significativo no tratamento de neoplasias. Atualmente, o fármaco figura entre os agentes antitumorais mais importantes na clínica para o tratamento de diferentes tipos de tumores sólidos como mama, ovário, próstata, pulmão, colón, sarcoma de Kaposi relacionado à síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), cabeça e pescoço (GUCHELAAR et al., 1994; LIU et al., 2011; ZHANG, et al., 2014).

A comercialização do fármaco foi realizada, primeiramente, pela companhia norte-americana Bristol-Myers Squibb sob o nome comercial de Taxol® e atualmente está disponível como medicamento em mais de 60 países. Esse medicamento consiste em uma dispersão micelar do PTX em etanol desidratado e Cremofor® EL, um derivado polietoxilado do óleo de rícino, na proporção 1:1 (v/v). A formulação deve ser diluída em dextrose 5% ou NaCl 0,9% (p/v) antes de sua administração intravenosa (BOOKMAN et al., 1997; PANCHAGNULA, 1998; SOUZA, 2004; ALTMANN & GERTSH, 2007; KOUDELKA e TURANÉK, 2012). A administração do PTX, geralmente, segue um esquema terapêutico de doses entre 135 e 175 mg/m² (de acordo com o tipo de tumor) em infusão de 3 ou 24 horas, a cada três semanas (ROWINSKY e DONEHOWER, 1995; PANCHAGNULA, 1998; KODAMA et al., 2010; BINDER, 2013). Contudo, a estabilidade da formulação após a diluição é uma questão relevante, uma vez que a reconstituição resulta em uma solução com concentração consideravelmente superior a solubilidade aquosa do PTX (0,3 -1,2 mg/mL), podendo ocasionar problemas de precipitação do fármaco após a diluição (DONYAI e SEWELL, 2006; SURAPANENI et al., 2012).

Além disso, sua aplicação terapêutica tem gerado vários problemas de toxicidade e efeitos adversos, principalmente devido a presença do Cremophor® EL. Esse excipiente é utilizado para solubilizar uma ampla variedade de fármacos hidrofóbicos, incluindo anestésicos, sedativos, imunossupressores e antineoplásicos. Contudo, o Cremophor® EL está associado a alguns efeitos adversos e a quantidade requerida na formulação do Taxol®, cerca de 26,0 mL é bastante elevada (GELDERBLOM et al., 2001).

Dentre as reações adversas associadas ao Taxol®, as reações de hipersensibilidade aguda ocupam um lugar de destaque. A maioria dos estudos indica que quantidades elevadas de Cremophor® EL induzem o aumento da liberação de histamina que está associada à ocorrência de reações de hipersensibilidade aguda caracterizada por dispneia com broncoespasmo, urticária e hipotensão. Diante disso, recomenda-se a administração da formulação de forma lenta e o uso prévio de anti-histamínicos e corticosteroides para minimizar a intensidade e a frequência da ocorrência das reações de hipersensibilidade (ROWINSKY e DONEHOWER, 1995; MARKMAN, 2003; SURAPANENI et al., 2012).

A neuropatia periférica sensorial é a manifestação neurotóxica mais evidente devido ao uso do Taxol[®]. Geralmente, os sintomas se iniciam nos pés, mas podem aparecer, simultaneamente, nos pés e mãos. A ocorrência desse efeito é dependente da dose utilizada, da duração da infusão e do uso concomitante de outros antitumorais, como por exemplo, a cisplatina (POLOMANO et al., 2001). Existem duas possíveis explicações para a ocorrência da neuropatia periférica. A primeira está ligada a capacidade do PTX em estabilizar os microtúbulos ocasionando a perda de função dessas estruturas, que desempenham papel essencial no desenvolvimento e funções das células neuronais periféricas. Outra possibilidade está relacionada à presença de ácidos graxos insaturados residuais e derivados etoxilados presentes no Cremophor[®] EL os quais podem afetar diretamente os neurônios. Assim, o Taxol[®] pode causar danos aos neurônios periféricos levando ao processo de perda de mielina, degeneração celular e prejuízos à capacidade regenerativa. Entre os sintomas causados pode-se citar a neuropatia motora, com paralisação e dormência dos membros, hipotensão ortostática e perda sensorial periférica (GELDERBLOM et al., 2001; MIELKE et al., 2006).

Além disso, o tratamento com o Taxol[®] pode ocasionar a ocorrência de mielossupressão, sob a forma de neutropenia grave (MARKMAN, 2003). As alterações cardíacas relacionadas ao PTX manifestam-se, principalmente, sob a forma de bradicardia e hipotensão, que ocorrem nas primeiras horas após o início do tratamento (ROWINSKY e DONEHOWER, 1995). Outros efeitos comumente relatados após a administração do fármaco são mucosite, estomatite, alterações gastrointestinais, náuseas e alopecia (HOYER, 2000).

Para aumentar a segurança da utilização do PTX novas abordagens farmacotécnicas utilizando sistemas de liberação de fármacos tais como ciclodextrinas (HAMADA, et al., 2006; BOUQUET et al., 2007; YU et al., 2013), micelas (MUSACCHIO, et al., 2009; SAWANT e TORCHILIN, 2009; DANHIER et al., 2015), nanopartículas (ZUBRIS et al., 2013; TANG et al., 2013; KIM et al., 2014) e lipossomas (ZHANG et al., 2005; RANE e PRABHAKAR, 2009; MENG et al., 2010; CAI et al., 2012) tem sido frequentemente avaliada.

Embora vários estudos têm demonstrado que a encapsulação do PTX nesses diferentes sistemas resulta em redução da toxicidade do fármaco, as únicas formulações usadas na clínica são o Abraxane[®], o Lipusu[®] e o Genoxol[®]. A comercialização do Abraxane[®] foi aprovada em 2005 pelo FDA nos Estados Unidos para o tratamento de câncer de mama metastático. A formulação consiste em nanopartículas de albumina ligada ao PTX. A aprovação do medicamento baseou-se em resultados de um estudo comparativo aleatório com o Taxol[®] conduzido em pacientes com câncer de mama metastático. O Abraxane[®] revelou melhores taxas de resposta (33% contra 19% para o Taxol[®]) e melhoria no tempo de progressão da doença (23 semanas contra 16,9 semanas para o Taxol[®]). Além disso, os estudos clínicos mostraram menor toxicidade do Abraxane[®] e aumento da dose máxima tolerada (YARED e TKACZUK, 2012). A dose recomendada na clínica é de 260 mg/m², a cada três semanas, sendo o tempo de administração por via intravenosa de 30 minutos, bastante inferior ao tempo de administração recomendado para o Taxol[®]. Embora a utilização do Abraxane[®] dispense a administração prévia de corticosteroides e anti-histamínicos, alguns estudos têm relatado que essa formulação é mais neurotóxica que o Taxol[®] (HENNENFENT e GOVINDAN, 2006; FADER e ROSE, 2009; PAIK et al., 2011; YAMASHITA et al., 2011; FENG e MUMPER, 2013).

Em 2006, o Lipusu[®], uma formulação lipossomal contendo PTX, composta por fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilglicerol (PG) (razão molar 9:1), teve sua utilização aprovada na China (XU et al., 2013). Yang e colaboradores (2006) demonstraram que essa formulação possui atividade antitumoral livre *in vitro* e *in vivo* semelhante ao fármaco livre. Chen e colaboradores (2003) compararam o tratamento com Lipusu[®] e o PTX convencional em pacientes portadoras de tumor de mama e também concluíram que ambas formulações possuem eficácia similar. A toxicidade foi consideravelmente menor que a relacionada a uma mesma dosagem do Taxol[®]. Entretanto, estudos farmacocinéticos e de biodistribuição realizados por Wang e colaboradores (2013) demonstraram que o Lipusu[®] foi extensivamente distribuído em diversos tecidos, especialmente fígado e baço, indicando extensa ação das células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) e uma baixa seletividade da formulação pelo tecido tumoral.

O Genexol-PM[®] é constituído por micelas poliméricas carreadoras de PTX formadas por dois co-polímeros em bloco: polietilenoglicol (PEG) e o núcleo poli-(D,L-lactido). A formulação mostrou menor toxicidade que o Taxol[®] e uma dose máxima tolerada três vezes maior. Em relação à atividade terapêutica, a citotoxicidade *in vitro* foi semelhante ao Taxol[®], entretanto, a eficácia *in vivo* mostrou-se três vezes superior à formulação comercial. Assim, seu uso clínico foi aprovado na Coreia do Sul para o tratamento do câncer de mama e pulmão (WERNER et al., 2013). Contudo, alguns estudos relatam a ocorrência de efeitos adversos, como reações de hipersensibilidade, neuropatia e neutropenia, decorrentes do uso do Genexol-PM[®] (HENNENFENT e GOVINDAN, 2006; LIM et al., 2010; YARED e TKACZUK, 2012).

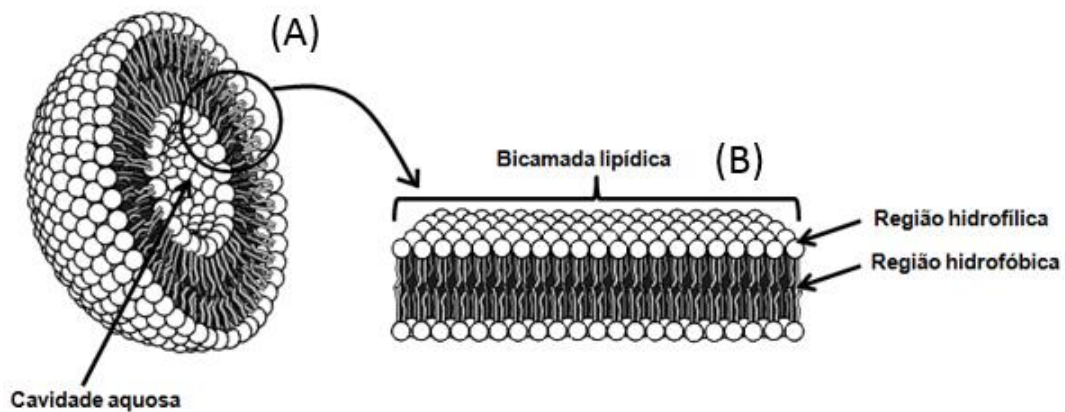
1.4 Lipossomas

Dentre os sistemas nanométricos de transporte e liberação de fármacos, os lipossomas ocupam um lugar de destaque uma vez que são constituídos por moléculas com elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade. Além disso, figuram como estruturas versáteis, pois suas características como tamanho, lamelaridade, superfície, fluidez e composição podem ser modificadas de acordo com os requisitos farmacotécnicos e farmacológicos necessários para veicular a substância de interesse (FRÉZARD et al., 2005; BATISTA et al., 2007).

Em 1965, Alec Bangham descreveu pela primeira vez os lipossomas, a partir de um estudo de investigação da difusão de íons através de membranas lipídicas artificiais. Bangham observou que alguns lípides, em meio aquoso, se organizavam espontaneamente em bicamadas, formando vesículas esféricas, os lipossomas. A partir deste momento, essas estruturas lipídicas impuseram-se como um sistema modelo simples de membrana biológica. Posteriormente, o sucesso na incorporação de enzimas em lipossomas despertou o interesse científico para a aplicação farmacológica do sistema. Em 1971, Gregory Gregoriadis propôs a utilização dos lipossomas como sistemas transportadores de fármacos. A capacidade singular desses sistemas em transportar substâncias hidrofílicas, hidrofóbicas e anfifílicas tornou-o extremamente atrativo para o setor farmacêutico, possibilitando carrear fármacos, biomoléculas ou agentes diagnósticos (LASIC, 1998; SANTOS e CASTANHO, 2002; FRÉZARD et al., 2005; LAOUINI et al., 2012).

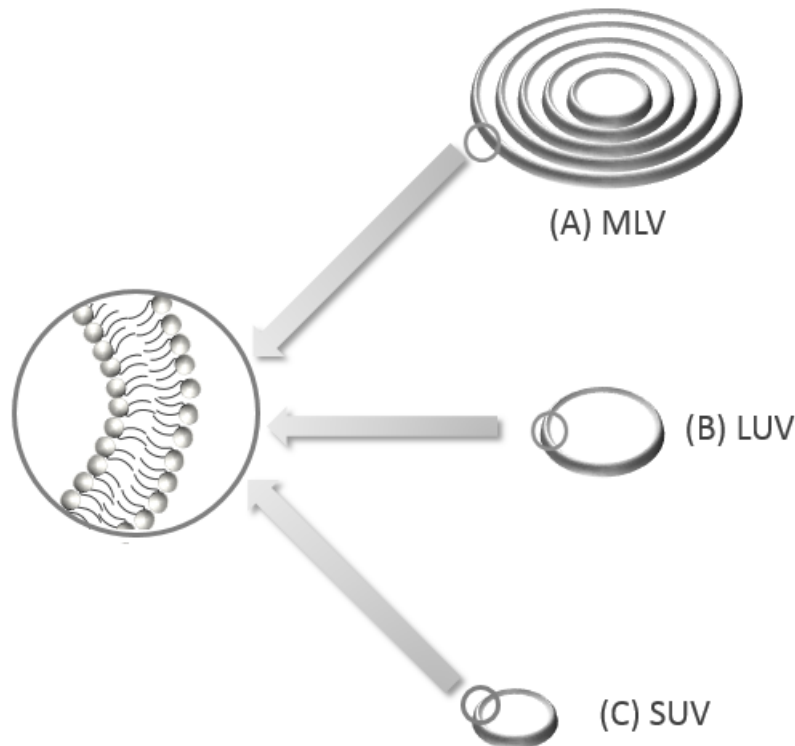
Os lipossomas são constituídos basicamente por fosfolípides, os quais, expostos ao meio aquoso, se organizam em bicamadas formando espontaneamente vesículas esféricas. Nessas, as cadeias hidrofóbicas dos fosfolípides estão em contato íntimo formando a bicamada lipídica e os grupos polares da molécula estão orientados para o compartimento aquoso e para a superfície externa da vesícula (**FIGURA 4**) (SHAILESH et al., 2009; LOPES et al., 2013a).

FIGURA 4 - Representação esquemática do lipossoma demonstrando a cavidade aquosa interna envolvida por uma bicamada lipídica (A). Bicamada lipídica, visualizada em maior aumento, mostrando a cabeça polar (região hidrofílica) e a cauda apolar (região hidrofóbica) dos lípidos (B)



Os fosfolípides que compõem os lipossomas podem se organizar em uma única bicamada lipídica (unilamelar) ou em bicamadas múltiplas (multilamelar) em torno do compartimento aquoso interno. Assim, os lipossomas são classificados de acordo com seu diâmetro e número de bicamadas em vesículas unilamelares pequenas (SUV), com diâmetro entre 25-100 nm; vesículas unilamelares grandes (LUV), com diâmetro médio maior que 100nm e vesículas multilamelares (MLV) com diâmetro superior a 1000nm (**FIGURA 5**) (VEMURI e RHODES, 1995; LASIC, 1998).

FIGURA 5 - Representação esquemática dos lipossomas. Classificação quanto ao tamanho e número de bicamadas lipídicas. Vesículas multilamelares (A), vesículas unilamelares grandes (B) e vesículas unilamelares pequenas (C)

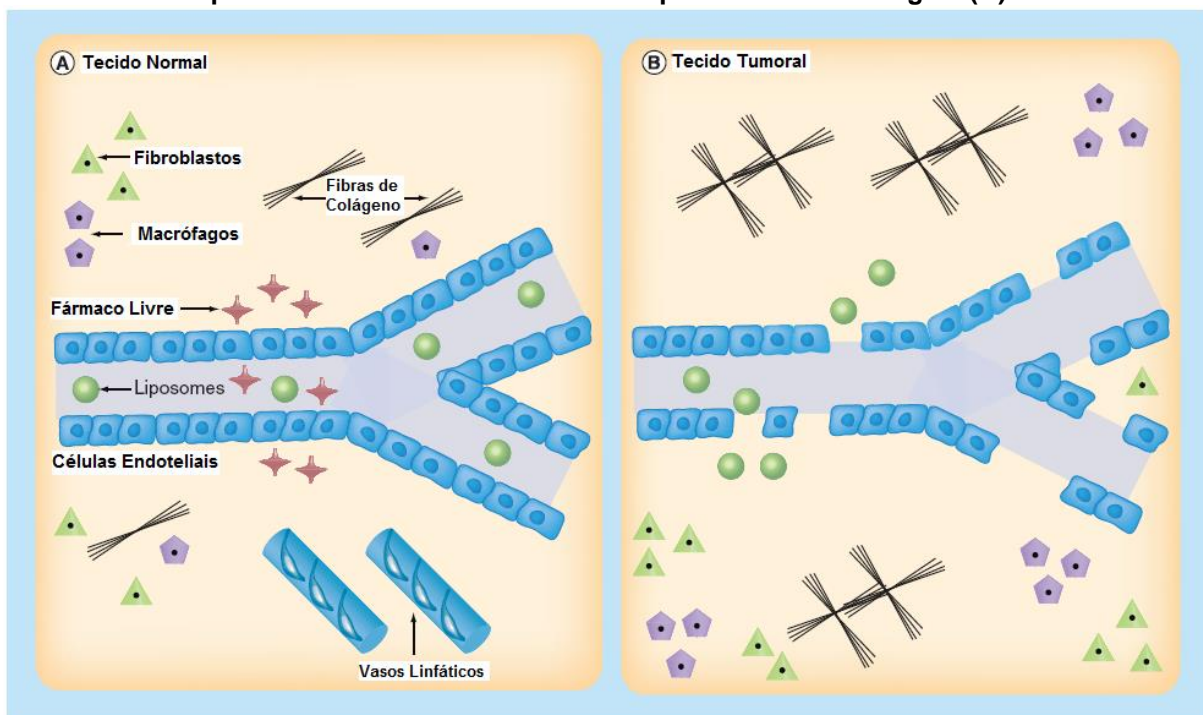


Durante a evolução de seu emprego como nanocarreadores, os lipossomas sofreram algumas alterações possibilitando uma maior eficiência e melhor aplicabilidade terapêutica. Um dos principais focos da produção de lipossomas modificados incluiu o aumento da atividade terapêutica aliada à diminuição da toxicidade da substância veiculada. Portanto, a associação de um fármaco já em uso em um sistema transportador, como os lipossomas, mostra-se uma estratégia capaz de melhorar as características farmacocinéticas, farmacotécnicas e terapêuticas da formulação, elevando a segurança da sua utilização (FRÉZARD et al., 2005; BATISTA et al., 2007).

Sabe-se que o revestimento endotelial da parede do vaso sanguíneo no tecido tumoral é mais permeável se comparado ao tecido normal, possuindo fenestrações com até 800 nm que permitem a passagem e acúmulo de grandes moléculas e partículas de tamanho variando entre 10 e 400 nm (**FIGURA 6**). Além disso, nessa região há um aumento da pressão intersticial e retardo do extravasamento das macromoléculas acumuladas, devido à ausência de drenagem por um sistema linfático adequado. Esse mecanismo que favorece o acúmulo e a retenção das nanopartículas na região

tumoral é conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (*Enhanced Permeability Retention- EPR*). Assim, lipossomas com diâmetro até 400 nm apresentam *target* passivo à região tumoral acumulando e liberando seu conteúdo preferencialmente nesse local. Baseado nisso, diversos estudos têm demonstrado o potencial dos lipossomas como sistemas carreadores de fármacos antitumorais (MAEDA et al., 2000; SAWANT e TORCHILIN, 2012; FERREIRA et al., 2013).

FIGURA 6 – Efeito EPR. Vasculatura em tecido normal com células endoteliais justapostas permite a passagem da droga livre (A), vasculatura do tecido tumoral com fenestrações, permitindo o extravasamento dos lipossomas nessa região (B)



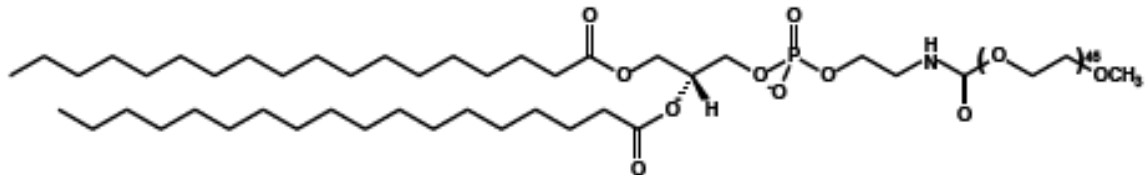
Adaptado de FERREIRA et al., 2013

O maior obstáculo relativo aos lipossomas convencionais é sua rápida captura *in vivo* por células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) reduzindo o seu tempo de circulação *in vivo* (VEMURI e RHODES, 1995). Muitas estratégias foram desenvolvidas na tentativa de contornar esse problema. Nesse contexto, estudos mostraram que a incorporação de um polímero hidrofílico inerte na bicamada lipídica aumentou significativamente o tempo de circulação dos lipossomas (KLIBANOV et al., 1990). Existem diferentes métodos para a obtenção dos lipossomas de circulação prolongada, com destaque para o revestimento de sua superfície com componentes hidrofílicos como o PEG (TORCHILIN, 2005). A presença dessas moléculas na superfície lipossomal ocasiona a formação de barreira estérica, constituída pelos

grupos volumosos hidrofílicos do PEG, que impede as interações hidrofóbicas entre as proteínas plasmáticas opsoninas e a superfície lipossomal, minimizando a captação das vesículas pelas células SMF (GABIZON et al., 1997; FERREIRA et al., 2013). De modo geral, concentrações de 5-10% de PEG com massa molecular variando de 1000-2000 Da são suficientes para reduzir a opsonização e conferir maior estabilidade às formulações (ULRICH, 2002).

O DSPE-PEG-2000, **FIGURA 7**, vem sendo muito utilizada em formulações lipossomais com esse propósito (TORCHILIN et al., 1994).

FIGURA 7 - Estrutura química da distearoilfosfatidiletanolamina acoplada ao polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀)



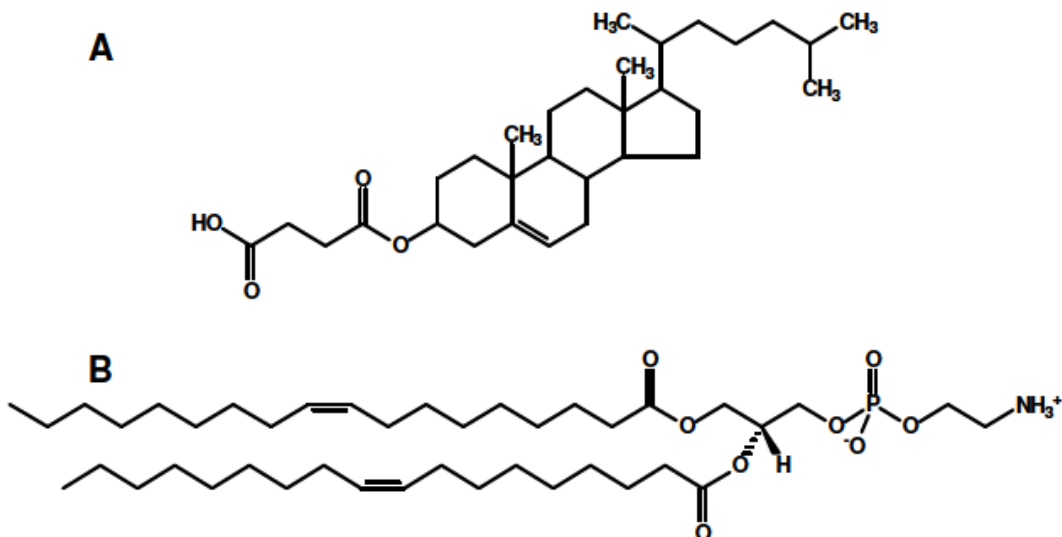
Embora ganhos consideráveis tenham sido obtidos com a estratégia de aumentar o tempo de circulação sanguínea das vesículas lipossomais, em geral, esses sistemas apresentam uma lenta liberação do material encapsulado bem como ausência de atividade fusogênica após internalização no compartimento endossomal. Nesse contexto, lipossomas pH-sensíveis, constituídos por lípides com propriedade fusogênica, têm sido extensivamente estudados como alternativa para o acúmulo de quimioterápicos em tecidos tumorais (FERREIRA et al., 2013). O emprego desse tipo de carreador foi relatado inicialmente a partir da observação de que os tecidos tumorais apresentavam um pH extracelular menor que os tecidos normais (STUBBS et al., 1999). Sabe-se que essas formulações são estáveis em pH fisiológico, porém, em pH ácido, como no interior do endossoma e no tecido tumoral, sofrem transição de fase, que conduz à desestabilização da bicamada e, conseqüentemente, à liberação do material encapsulado (FATTAL et al., 2004).

A hipótese mais aceita em relação ao potencial dos lipossomas pH-sensíveis consiste em sua capacidade de desestabilizar na fase endossomal tardia cujo pH é cerca de 5,0. Essa desestabilização permite a interação com a membrana endossomal,

liberando o conteúdo diretamente no citoplasma celular (TORCHILIN et al., 1993; BATISTA et al., 2007; FERREIRA et al., 2013).

Para o preparo dos lipossomas pH-sensíveis, derivados da fosfatidiletanolamina (PE), por exemplo a DOPE constitui o principal componente das formulações. Esse lípide encontra-se associado à moléculas anfifílicas contendo um grupo ácido protonável, como por exemplo, o CHEMS (**FIGURA 8**) (FERREIRA et al., 2013).

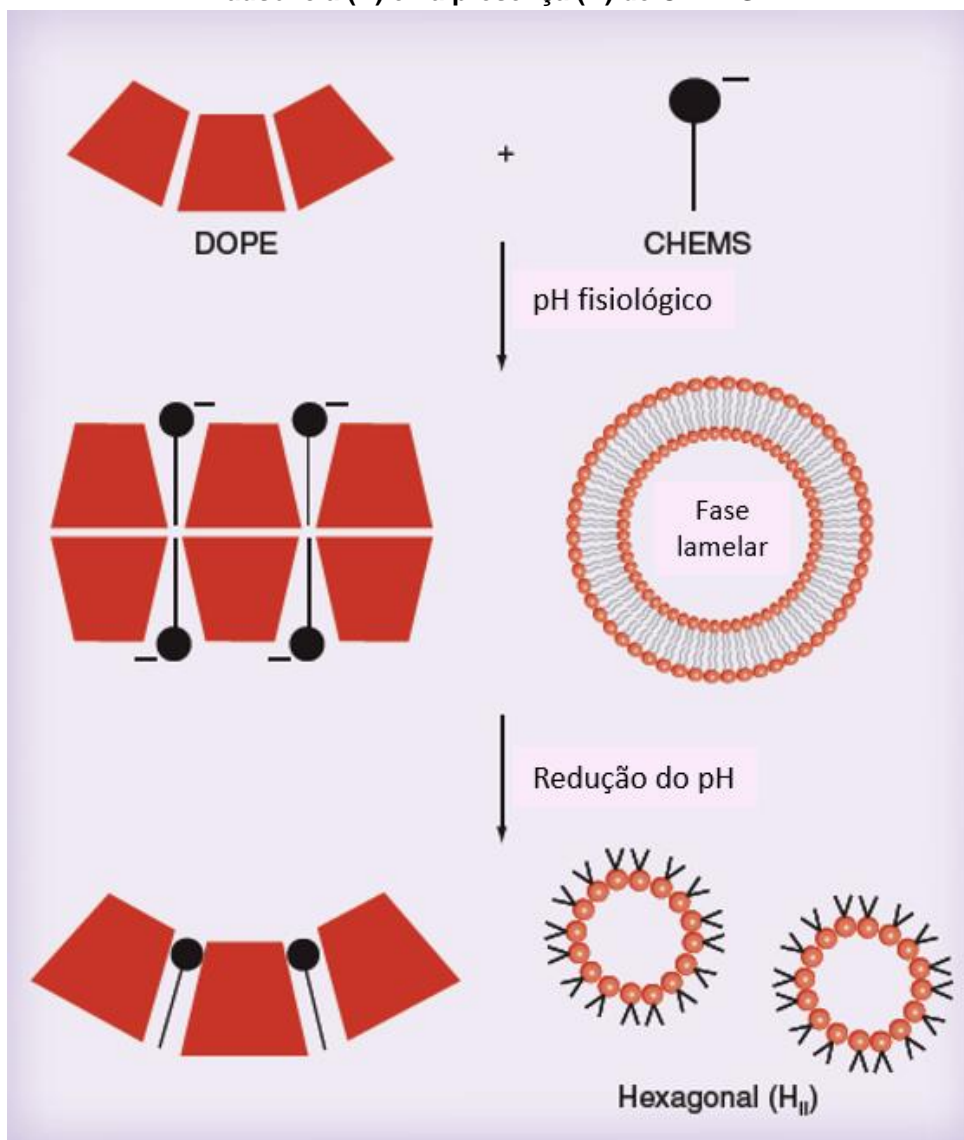
FIGURA 8 - Estruturas químicas do hemisuccinato de colesterila (A) e da dioleilfosfatidiletanolamina (B)



Em meio aquoso e temperatura ambiente, as moléculas da DOPE se organizam sob a forma hexagonal invertida (H_{II}) não sendo capazes de se organizar em bicamadas (SIEGEL, 1986). Diferentemente da maioria dos fosfolípides, a DOPE possui uma cabeça polar pequena e pouco hidratada que ocupa um pequeno volume, quando comparado com o das respectivas cadeias de hidrocarbonetos, resultando em geometria molecular do tipo cone. Este formato favorece o estabelecimento de fortes interações intermoleculares entre os grupos amino e fosfato da sua cabeça polar, explicando a tendência dessas moléculas a adquirirem a forma H_{II} . A formação das vesículas lipossomais com esse fosfolípide requer a adição de agentes estabilizantes, normalmente lípides carboxilados, como CHEMS, que em pH fisiológico se encontra sob a forma ionizada (negativamente carregado). Como observado na **FIGURA 9**, as moléculas de estabilizantes se inserem entre os fosfolípides, provocando repulsão

eletrostática entre seus grupamentos carboxila e fosfato, favorecendo a organização lamelar do sistema. Enquanto em pH fisiológico os lipossomas permanecem estáveis, a exposição dessas vesículas a um meio ácido resulta na protonação dos grupos carboxílicos das moléculas de CHEMS causando o retorno das moléculas da DOPE para a fase H_{II} , com conseqüente desestabilização das vesículas e liberação do conteúdo lipossomal (DE OLIVEIRA et al., 1998; SIMÕES et al., 2004).

FIGURA 9 - Representação esquemática da organização estrutural de derivados da PE na ausência (A) e na presença (B) de CHEMS



Adaptado de FERREIRA et al., 2013.

Estudos prévios conduzidos por nosso grupo de pesquisa têm demonstrado o potencial dessa formulação lipossomal pH-sensível na veiculação de agentes

quimioterápicos. Uma formulação contendo cisplatina (SpHL-CDDP) foi desenvolvida e avaliada quanto a sua eficácia antitumoral e toxicidade em modelo experimental de camundongos acometidos pelo tumor sólido de Ehrlich (CARVALHO-JÚNIOR, 2008; LEITE et al., 2012a,b). Os resultados demonstraram que a encapsulação de cisplatina em lipossomas ocasionou uma redução da toxicidade em comparação com sua forma livre, mostrando-se mais segura no que se refere a mielotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Além disso, os SpHL-CDDP permitiram administrar doses maiores do fármaco, melhorando significativamente a atividade antitumoral em modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich. Esse sistema apresentou estabilidade adequada durante 135 dias de armazenamento (GIUBERTI et al., 2011)

Lopes e colaboradores (2013b) associaram o ácido ursólico (AU) a essa mesma formulação lipossomal pH-sensível. A avaliação da citotoxicidade do sistema na linhagem tumoral de carcinoma mamário, MDA-MB-231, demonstrou inibição significativa da proliferação celular em comparação ao AU livre. O sistema mostrou-se estável por 60 dias de armazenamento a 4 °C.

1.5 PTX em sistemas lipossomais

No intuito de contornar à baixa solubilidade do PTX em água (0,3 a 1,0 µg/mL), aumentar a eficácia terapêutica e reduzir os principais efeitos adversos associados ao uso do Taxol®, diferentes tipos de lipossomas vêm sendo desenvolvidos com objetivo de se obter formulações com maior estabilidade e eficácia terapêutica, reduzindo os principais efeitos adversos associados ao uso da formulação comercial (KOUDELKA e TURÁNEK, 2012). Na **TABELA 1** é possível visualizar diversas formulações lipossomais com composição lipídica variada propostas para a veiculação do PTX. As técnicas de caracterização físico-química e a estabilidade dos sistemas também estão relacionadas.

TABELA 1 – Estudos de estabilidade e caracterização físico-química e morfológica de sistemas lipossomais carreadores de PTX

Composição Lipídica (Razão Molar)	Estabilidade do Sistema	Parâmetros avaliados (técnica utilizada)	Referência
PC:PG (9:1) DPPE-PEG:PG (9:1)	4 °C: > 60 dias, 20°C: > 30 dias 4 °C: 2 dias	Teor de encapsulação (CLAE)	SHARMA et al., 1993.
PC DEPC:DMPC:SCPC (1:1:0,9)	4 °C: >4 dias 4 °C: >4 dias	Teor de encapsulação (CLAE)	SHARMA et al., 1997.
PC PC:PG (9:1) PC:PG:Chol (9:1:5) DPPC:PG (9:1) DPPC:PG:Chol (9:1:5) EPC:PG:DPPE-PEG:Chol (9:1:0,7:2) EPC:PG:DPPE-PEG:Chol (9:1:0,7:5)	4 °C: 2 meses 4 °C: 1 semana 4 °C: 1 semana 4 °C: <1 semana 4 °C: <1semana 4 °C: <1semana 4 °C: 1 dia	Diâmetro médio (DLS), teor de encapsulação (CLAE)	CROSSACO et al., 2000.
DOPC:Chol:Cardiolipin (90:5:5)	2-8 °C: 72 horas 25 °C – 48 horas	Diâmetro médio (DLS), morfologia (MET, MEC), teor de encapsulação (CLAE).	ZHANG et al., 2005.
DPPC:DMPG:DSPE-PEG:DSPE-PEG _{folato} (85,5:9,5:4,5:0,5) DPPC:DMPG:DSPE-PEG (85,5:9,5:5,0)	4 °C: < 72 horas 4 °C: < 72 horas	Diâmetro médio (DLS), teor de encapsulação (CLAE)	WU et al., 2006.
PC:Chol (9:1)	4 °C: < 10 semanas	Diâmetro médio (DLS), potencial zeta, teor de encapsulação (CLAE).	YANG et al., 2007b.

Continuação da TABELA 1 – Estudos de estabilidade e caracterização físico-química de sistemas lipossomais carreadores

DMPC:DMPG (9:1)	4 °C: 4 dias	Diâmetro médio (DLS), teor de encapsulação (CLAE)	HENEY et al., 2010.
DPPC:DMPG (9:1)	4 °C: 4 dias		
DSPC:DMPG (9:1)	4 °C: 4 dias		
EPC:Chol:MPEG (20:8:1)	4 °C: 30 dias	Diâmetro médio (DLS), teor de encapsulação (CLAE), DSC.	KAN et al., 2011
HEPC:Chol:MPEG (20:8:1)	4 °C: 30 dias		
EPC:HEPC:Chol:MPEG (15:5:2:1)	4 °C: 6 meses		
EPC:Chol:Chol-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG ₂₀₀₀ (60:30:5:3)	4 °C: 7 dias	Diâmetro médio (DLS), potencial zeta, morfologia (AFM), teor de encapsulação (CLAE).	CAI et al., 2012.
EPC:Chol (60:30)	4 °C: 7 dias		

PC: Fosfatidilcolina; **PG:** Fosfatidilglicerol; **DPPE-PEG:** Dipalmitoilfosfatidiletanolamina associada ao polietilenoglicol; **DEPC:** Dielaidoilfosfatidilcolina; **DMPC:** Dimiristoil fosfatidilcolina; **SCPC:** Esteraoilcaprioilfosfatidilcolina; **Chol:** colesterol; **DPPC:** Dipalmitoil fosfatidilcolina; **EPC:** Fosfatidilcolina de ovo; **DOPC:** Dioleoilfosfatidilcolina; **MET:** Microscopia Eletrônica de Transmissão; **MEC:** Microscopia Eletrônica de Criofatura; **DPPC:** Dipalmitoilfosfatidilcolina; **DMPG:** Dimiristoilfosfatidilglicerol; **DSPE-PEG_{folato}:** distearoilfosfatidiletanolamina acoplada ao polietilenoglicol e ao folato; **DSPC:** Diesteroilfosfatidilcolina; **HEPC:** Fosfatidilcolina de ovo hidrogenada; **MPEG:** Diesteroilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol 2000 metoxilado; **AFM:** Microscopia de força atômica; **CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; **DLS:** *Dynamic Light Scattering*; **DSC:** Calorimetria Diferencial Exploratória.

Com base nos dados apresentados na **TABELA 1** é possível observar que a estabilidade dos sistemas é relativamente baixa. Por outro lado, vários estudos relatam aumento da concentração do fármaco na região tumoral, no entanto, a resposta terapêutica tem se mostrado semelhante ao fármaco livre. Nesse sentido, Barbosa (2014) desenvolveu uma formulação lipossomal pH-sensível de circulação prolongada composta por DOPE:CHEMS:DPSE-PEG:DSPE-PEG-folato (5,7:3,8;0,45:0,05, respectivamente) para o carreamento do PTX. Nesse estudo, a estabilidade da formulação foi avaliada durante 150 dias de armazenamento a 4 °C. Os resultados apresentados mostraram estabilidade adequada até o centésimo dia de avaliação. Nenhuma alteração significativa nos parâmetros estudados (diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, teor de encapsulação e pH) foi observada. A formulação composta por DOPE:CHEMS:DPSE-PEG também apresentou propriedades físico-químicas adequadas para a administração do PTX. Além disso, o estudo de citotoxicidade mostrou elevada atividade citotóxica das formulações pH-sensíveis contra linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e reduzida toxicidade para a linhagem de células normais (L929) comparada ao PTX livre. Esses resultados demonstraram o potencial dessa formulação para estudos futuros. Portanto, considerando os fatores acima mencionados, tornou-se necessário elucidar as interações entre o PTX e os lípidos constituintes dos lipossomas com o intuito de se obter maior detalhamento sobre sua organização estrutural e, conseqüentemente, a influência dessa na estabilidade e eficácia *in vivo* do sistema.

1.6 Análise da transição de fases dos lípidos

As membranas lipídicas são invariavelmente polimórficas podendo se organizar em diferentes tipos de estruturas, principalmente quando em situações de elevado grau de hidratação. Essa heterogeneidade não depende apenas da estrutura da molécula lipídica e de seu grau de hidratação, mas de outros fatores como temperatura e pH. A alteração desses parâmetros em um sistema pode ocasionar transição entre as fases de organização das bicamadas (SEDDON, 1990; TENCHOV e KOYNOVA, 2012; LEWIS e McELHANEY, 2013).

A dispersão dos fosfolípides em meio aquoso pode resultar na formação de estruturas lamelares e/ou não lamelares. Os lípides monocatenários, como os lisolípidos, apresentam geometria em cone invertido e organizam-se em fase hexagonal (H_I) uma vez que, estruturalmente, são caracterizados por uma cabeça polar com volume maior que a cadeia hidrocarbônica. Por outro lado, lípides bicatenários, como a fosfatidilcolina, nos quais a porção polar e a cadeia hidrofóbica possuem volume semelhante, apresentam uma organização em geometria cilíndrica e a formação de uma fase lamelar. As moléculas de DOPE, quando dispersas em água, organizam-se preferencialmente em fase invertida (H_{II}), devido a sua geometria molecular que mostra uma menor área superficial da porção polar em relação à porção apolar, resultando numa forma do tipo cone (**FIGURA 10**) (GUNER et al, 1985; SIMÕES et al., 2004; FERREIRA et al., 2013).

FIGURA 10 - Fases de agregação dos fosfolípides em meio aquoso

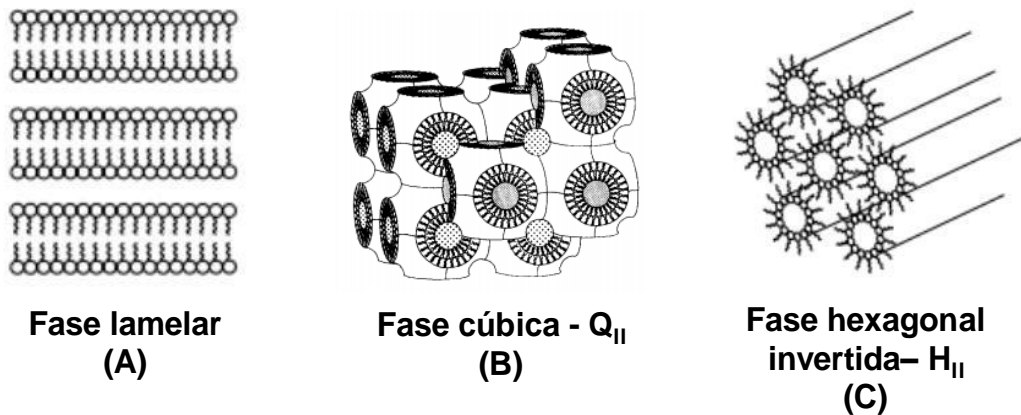


As organizações lamelares, nas quais os fosfolípidos, geralmente, se encontram podem ser classificadas em lamelar cristalina (L_c), lamelar gel (L_β) e lamelar fluida (L_α). Em temperaturas mais baixas, a maior parte dos fosfolípidos se encontra organizada em fase lamelar cristalina (L_c) ou lamelar gel (L_β). A transição de fase de L_β para L_α figura como a mais importante, uma vez que as moléculas dos fosfolípidos que se encontram ordenadas, formando uma estrutura rígida, com o aumento da temperatura, passam a se organizar em membranas mais fluidas e menos espessas, com maior grau de liberdade para as cadeias hidrocarbônicas (TENCHOV e KOYNOVA, 2012; LEWIS e McELHANEY, 2013).

Membranas lipossomais podem exibir diferentes níveis de fluidez de acordo com a composição e organização de seus fosfolípidos. A fluidez da membrana lipossomal é dependente da temperatura de transição de fases (T_m), característica de cada lípido. Quando a temperatura do sistema se iguala a T_m do lípido ocorre a transição da fase L_β para L_α . Na organização de fase L_α , a membrana lipossomal se encontra mais fluida e as moléculas possuem maior liberdade de movimento, caracterizando um sistema com maior taxa de permeabilidade e mais favorável a incorporação de substâncias (FRÉZARD, 1999; LEWIS e McELHANEY, 2013).

Com o aumento da temperatura, a capacidade de diversos fosfolípidos em assumir configurações não lamelares a partir da organização L_α é bem descrita na literatura. Geralmente, ocorre primeiro uma transição para uma fase cúbica Q_{II} que se caracteriza pela separação das regiões aquosas por uma única bicamada lipídica contínua. E por fim, pode ocorrer a transição para uma fase hexagonal invertida H_{II} , onde longos núcleos cilíndricos de água estão revestidos pelas cabeças polares dos lípidos e o restante da matriz, disposta em forma hexagonal, está preenchida pelas cadeias hidrocarbônicas. Entretanto, a organização de um fosfolípido em todas as transições de fases descritas pode não acontecer (**FIGURA 11**) (ALLEN, 1990, TATE et al., 1991).

FIGURA 11 - Organização estrutural dos fosfolípide na fase lamelar (A), cúbica (B) e hexagonal (C)



Adaptado de TATE et al., 1991; LASIC, 1998.

Diversos são os métodos empregados na investigação das transições de fase dos fosfolípidos. Dentre eles a calorimetria exploratória diferencial (DSC), para o estudo da termodinâmica e das temperaturas de transição de fase associada à difração de raios-X para a avaliação das mudanças estruturais nas membranas lipídicas têm sido frequentemente utilizados (ALLEN et al., 1990; LOPES et al., 2014).

1.6.1 Calorimetria Exploratória Diferencial

A técnica de DSC é uma ferramenta utilizada para fornecer informações específicas sobre as mudanças das propriedades físicas dos materiais associadas a alterações de temperatura. A técnica baseia-se na medida da quantidade de energia absorvida ou liberada pela amostra em função da temperatura, permitindo determinar a temperatura precisa da ocorrência de eventos térmicos que caracterizam alterações físicas nas propriedades no sistema em estudo (GILL et al., 2010)

A aplicabilidade dessa técnica se estende à caracterização de sistemas nanoestruturados, permitindo verificar como a composição lipídica pode influenciar a estabilidade e as temperaturas de transições de fases das membranas fosfolipídicas frente a alterações térmicas. Além disso, o método permite avaliar os efeitos termodinâmicos e físicos provocados pela inclusão de substâncias na bicamada lipídica. Conhecer as temperaturas de transição de fases dos lípidos é fundamental

para avaliar a estabilidade dos sistemas. Durante a transição, a temperatura permanece constante e a energia é absorvida ou liberada de acordo com o evento térmico ocorrido. A técnica de DSC mede o calor de entalpia e as temperaturas de transição permitindo uma caracterização detalhada do sistema, complementando a análise estrutural obtida por meios das outras técnicas. Desta forma, a associação da DSC à difração de raio-X, mais especificamente a técnicas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) torna possível investigar as interações existentes entre o fármaco e as membranas lipídicas e avaliar os tipos de transições de fase que ocorrem no sistema lipossomal (DEMETZOS, 2008).

1.6.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

SAXS figura como método de escolha para caracterização de materiais com tamanho nanométrico, sendo aplicado no estudo da transição de fases e caracterização de membranas lipossomais. A técnica permite avaliar a estabilidade do sistema mediante a análise do comportamento dos fosfolípides estruturais frente a condições diversas de hidratação, pH e temperatura (SEDDON, 1990; CAVALCANTI et al., 2007).

O feixe de fótons utilizado da linha SAXS é proveniente de fontes de luz síncrotron. A radiação síncrotron é emitida por elétrons ou pósitrons em velocidade próxima à da luz armazenados em um anel circular. Os elétrons, quando são acelerados radialmente na sua passagem por campos magnéticos gerado por eletroímãs localizados ao longo da trajetória do anel, emitem radiação síncrotron, que é direcionada a diversas linhas e utilizada para diversos fins, em especial para estudar a natureza dos materiais em escala molecular ou atômica. Com o fluxo de aproximadamente 10^{12} fótons/s, a radiação síncrotron permite a obtenção de padrões de difração com elevado grau de informação. (CRAIEVICH, 2002; DONG e BOYD, 2011)

O espalhamento de raios-X a baixo ângulo ocorre quando o feixe de raio-x atravessa a amostra e interage com os elétrons do material. A radiação emitida pelos elétrons de cada átomo é espalhada e o ângulo gerado do espalhamento resulta em uma curva de difração. Assim, a intensidade do espalhamento de raios-X produzida por uma determinada amostra é uma função do ângulo de espalhamento. O baixo ângulo de

espalhamento é utilizado para detectar espalhamento em ângulos $< 10^\circ$, correspondendo a distâncias interplanares com dimensões nanométricas. Nessa faixa angular é possível obter informações sobre parâmetros como periodicidade e espessura da estrutura da bicamada lipossomal, espaçamento de rede do material estudado, presença de estruturas lamelares e não lamelares (CAVALCANTI, 2001).

Para determinar as distâncias de repetição da estrutura lamelar e a organização estrutural das vesículas lipossomais, a partir das medidas de difração de raios-X, é necessário analisar as distâncias intermoleculares relacionada ao ângulo de espalhamento empregando a expressão descrita pela Lei de Bragg:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta$$

onde n é um número inteiro de ordem de difração, λ é o comprimento de onda do feixe de raios-X incidente, d é a distância interplanar entre os planos cristalinos e θ é o ângulo de incidência (CRAIEVICH, 2002). Assim, mediante análise das posições dos picos, bem como, dos deslocamentos e variações das distâncias existentes entre os picos difratograma, torna-se possível elucidar a organização estrutural da amostra e detectar o momento em que as transições de fase ocorrem (CAVALCANTI, 2001; CRAIEVICH, 2002). A caracterização das fases lipídicas por SAXS fundamenta-se no ordenamento de longa extensão dos agregados lípide/água, numa rede de uma, duas ou três dimensões, que fornece uma periodicidade de reflexão de Bragg apresentando razões características para os diferentes espaçamentos de rede como observado na **TABELA 2** (SEDDON, 1990).

TABELA 2 - Razões de Reflexão de Bragg para diferentes espaçamentos de rede

Empacotamento das moléculas	Razões de Reflexão de Bragg
Lamelar	1, 2, 3, 4...
Hexagonal	1, $\sqrt{3}$, 2, $\sqrt{7}$, 3, $\sqrt{12}$, $\sqrt{13}$
Cúbica (Pn3m)	1, $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$, 2, $\sqrt{6}$, $\sqrt{8}$, 3, $\sqrt{10}$, $\sqrt{11}$
Cúbica (Pm3n)	1, $\sqrt{2}$, 2, $\sqrt{6}$, $\sqrt{8}$, $\sqrt{10}$, $\sqrt{12}$, $\sqrt{14}$
Cúbica (Im3m)	1, $\sqrt{2}$, 2, $\sqrt{5}$, $\sqrt{6}$, $\sqrt{8}$

Adaptado de LINDBLOM e RILFORS, 1989.

De Oliveira e colaboradores (1998, 2000) avaliaram a influência da presença de oligonucleotídeos 15-mer (ODN) sobre o comportamento de fases das moléculas da DOPE em lipossomas constituídos por DOPE, ácido oleico (AO) e colesterol (Chol) pela técnica de SAXS. Os resultados demonstraram que as fortes interações eletrostáticas entre os grupos amino das moléculas da DOPE e os fosfatos das moléculas de ODN conduziram à separação das moléculas da DOPE e AO nas fases hexagonal e lamelar.

Silva e colaboradores (2011) investigaram o efeito da interação entre o complexo formado pela 6-monodesoxi-6-monoamino- β -ciclodextrina e o plasmídeo contendo o gene que codifica a proteína activina (Am- β -CD+/pAct) com lipossomas pH-sensíveis constituídos por DOPE:CHEMS utilizando a técnica de difração de raios X dispersiva em energia (EDXD) frente a redução do pH e componentes do meio de cultura, em condições de alta hidratação. Os resultados obtidos demonstraram que o complexo Am- β -CD+/pAct interage com a membrana lipídica dos lipossomas resultando na presença das fases lamelar e hexagonal em pH fisiológico. Além disso, a ocorrência de transição de fases das moléculas de DOPE de lamelar para hexagonal, em pH 5,0, foi observada. A exposição da formulação às proteínas do soro alterou o arranjo supramolecular das moléculas de DOPE levando a formação de estruturas menos ordenadas, contudo observou-se que a pH-sensibilidade do sistema não foi abolida.

A formulação SpHL-AU desenvolvida por Lopes e colaboradores (2013) foi avaliada em condições de baixa hidratação mediante associação das técnicas de DSC e SAXS com intuito de verificar a organização supramolecular das moléculas do lípide estrutural, a DOPE. Os resultados demonstraram a ocorrência de interação entre o AU e a membrana lipídica sem comprometimento das principais transições de fase da DOPE, processo indispensável para a desestabilização do sistema lipossomal e liberação do material encapsulado (LOPES et al., 2014). O mesmo sistema, SpHL-AU, foi avaliado em condições de maior hidratação pela técnica de SAXS. Os resultados mostraram que a interação entre o AU e a bicamada lipídica resultou em maior estabilização da bicamada dificultando a ocorrência de transição de fases das moléculas da DOPE à fases não lamelares, frente a redução do pH (LOPES, 2014).

CAVALCANTI e colaboradores (2007) investigaram a incorporação do PTX em três formulações lipossomais diferentes utilizando a técnica de EDXD. Os sistemas lipossomais preparados foram constituídos por 1,2-dioleiltrimetilamôniopropano (DOTAP), DOPC e DOTAP/DOPC e foram analisados na presença e ausência de diferentes concentrações de PTX. Os resultados confirmaram a ocorrência de interação entre o PTX e a bicamada lipídica dos sistemas preparados, uma vez que a presença do fármaco na bicamada ocasionou modificações na organização da membrana lipídica proporcionais a concentração de PTX.

1.7 Caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados

A determinação dos aspectos físico-químicos relativos a formulação assume papel fundamental na investigação do comportamento *in vivo* do sistema lipossomal e na determinação da estabilidade da amostra, uma vez que permite conhecer melhor a interação existente entre o fármaco em estudo e as membranas lipídicas (CAVALCANTI et al., 2007). Dentre os diversos parâmetros utilizados para caracterizar sistemas lipossomais pode-se destacar: diâmetro das vesículas, potencial zeta, determinação da concentração do fármaco associado às nanoestruturas, análise morfológica e avaliação da transição de fases dos lípidos (TORCHILIN, 2005; LIU e YEO, 2014).

A determinação do diâmetro médio e da distribuição das partículas assume um papel fundamental na caracterização dos nanossistemas, pois está diretamente relacionada a estabilidade da formulação e ao comportamento farmacocinético. Sabe-se que o aumento do diâmetro das vesículas pode acarretar processos de fusão/agregação reduzindo a estabilidade do sistema, além de dificultar seu extravasamento para o tecido tumoral. Outra questão importante está ligada a segurança do uso injetável do sistema, pois partículas com diâmetro elevado podem ocasionar oclusão da microvasculatura e, até mesmo, embolia pulmonar (LASIC, 1998; HEURTAULT et al., 2003; DRISCOLL, 2006).

Dentre as técnicas mais utilizadas para análise do diâmetro e distribuição de partículas, a espectroscopia de correlação de fótons (*Photon Correlation Spectroscopy* – PCS) tem sido a mais utilizada. O método é baseado no movimento

browniano, que refere-se ao intenso movimento das partículas devido à colisão aleatória entre essas e as moléculas do líquido que a rodeia. Sabe-se que partículas pequenas se movem de forma mais rápida que as partículas grandes, que se movimentam mais lentamente. Durante a análise um feixe de laser incidente atravessa a amostra e as partículas dispersas no meio provocam um espalhamento de luz baseado em seu movimento browniano, formando um padrão de movimento. O movimento rápido das partículas pequenas provoca rápidas modificações no espalhamento da luz. Por outro lado, as partículas maiores possuem menor coeficiente de difusão, que resulta em menores flutuações na intensidade do espalhamento de luz (HASKELL et al., 1998; MALVERN INSTRUMENTS, 2004).

Além do diâmetro, as técnicas de MET (YANG et al., 2007; LI et al., 2011, LOPES et al., 2013) e AFM (SOARES et al., 2011; CHEN et al., 2013) possibilitam avaliar a morfologia do sistema. A primeira técnica permite a caracterização das vesículas quanto ao diâmetro, forma e lamelaridade, além de permitir a visualização de fusão de membranas e formação de agregados. Contudo, devido a condição de alto vácuo produzida pela técnica e a necessidade de coloração das amostras, os lipossomas podem sofrer perturbações na sua estrutura e consequente desestabilização (BIBI et al., 2011). A microscopia de força atômica dispensa procedimentos sofisticados de preparo de amostras, portanto as análises podem ser realizadas com os lipossomas em seu estado natural. Entretanto, durante o processo de adsorção da amostra no substrato deformações da membrana lipídica podem acontecer devido a fluidez da amostra (KANNO et al., 2002; SITTERBERG et al., 2010).

Conhecer o potencial zeta de um sistema coloidal é essencial, uma vez que este parâmetro está diretamente relacionado a estabilidade da formulação lipossomal em questão, pois a presença de partículas carregadas gera uma repulsão entre as vesículas, prevenindo a ocorrência do processo de fusão/agregação, prolongando a estabilidade do sistema (LAOUINI et al., 2012). O método utilizado na determinação do potencial zeta consiste na incidência de um feixe de luz e aplicação de um campo elétrico com força conhecida através da amostra provocando um deslocamento das partículas carregadas em velocidades distintas. Este processo induz deslocamento da frequência do feixe de luz incidente, gerando um espectro de frequências utilizadas

para o cálculo de velocidade, posteriormente convertido em mobilidade eletroforética e por fim em valores de potencial zeta (MALVERN INSTRUMENTS, 1996).

A determinação da quantidade de fármaco associada a formulação lipossomal é de fundamental importância visto que a eficiência terapêutica do sistema está relacionada a concentração do fármaco disponível. Além disso, o teor de encapsulação é um parâmetro amplamente utilizado para avaliar a estabilidade das nanoestruturas. Diversas são as técnicas disponíveis para determinar a porcentagem de encapsulação de fármacos em formulações lipossomais. Dentre elas pode-se destacar a CLAE por representar um método com elevada sensibilidade para determinações quantitativas (ZHANG et al., 2005; MUSTEATA e PAWLISZYN, 2006; YANG et al., 2007; MENG et al., 2010).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Com o presente estudo tem-se por objetivo caracterizar do ponto de vista físico-químico uma formulação de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo PTX.

Objetivos Específicos

- Validar um método analítico utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o doseamento do PTX em formulações lipossomais.
- Preparar lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo PTX.
- Caracterizar as formulações lipossomais quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de encapsulação do PTX.
- Avaliar as transições de fases dos lípides constituintes dos LpHS-PTX mediante associação das técnicas de DSC e SAXS.
- Avaliar o efeito da variação do pH e dos constituintes do meio de cultura sobre a organização supramolecular dos LpHS-PTX e LpHS utilizando a técnica de SAXS.
- Avaliar a estabilidade da formulação de LpHS-PTX frente a variações na temperatura empregando-se a técnica de SAXS.

**Capítulo 1 – Validação do Método Analítico para
doseamento do PTX em formulações
lipossomais**

1 INTRODUÇÃO

O objetivo de uma validação é demonstrar que, mediante realização de estudos experimentais, determinado método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, quantificação de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos, assegurando a confiabilidade dos resultados obtidos (BRASIL, 2003).

Um método analítico deve ser exato; preciso, mostrando repetibilidade entre os resultados das análises individuais; seletivo, para que interferentes potenciais não alterem sua exatidão; sensível, demonstrando sua capacidade em determinar concentrações extremamente baixas e linear ao longo de ampla faixa de concentração. Desta forma, os parâmetros fundamentais avaliados na validação de um método analítico são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Dentre as técnicas de separação e quantificação, a CLAE é o método analítico preconizado para o doseamento no PTX devido sua elevada sensibilidade para determinações quantitativas, sendo amplamente utilizada para doseamento do fármaco em plasma, amostras biológicas, matéria-prima e produtos acabados (USP 34, 2010; WANG et al., 2003; MUSTEATA e PAWLISZYN, 2006; MITTALL et al., 2007; MILANE et al., 2011). Assim, o objetivo deste capítulo foi validar um método para quantificação do PTX por CLAE conforme as diretrizes estabelecidas pela RDC nº 899 da ANVISA (BRASIL, 2003).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Reagentes

O PTX foi fornecido pela Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Brasil) com pureza maior que 97%. A acetonitrila foi obtida da Fischer Scientific (New Jersey, EUA). O álcool isopropílico foi adquirido da Tedia Company (Ohio, EUA). A água foi purificada utilizando o equipamento de destilação e deionização Milli-Q® (Millipore, MA, USA). As demais substâncias utilizadas foram de grau reagente, sem purificação adicional.

2.1.2 Equipamentos e Condições de Análise

O aparato cromatográfico consistiu de uma bomba isocrática Waters 515 (Milford, EUA); um injetor automático Waters 717 Plus (Milford, EUA) e um detector UV-Vis Waters (Milford, EUA) monitorados por um computador utilizando o software Millennium®. As condições cromatográficas utilizadas no presente estudo consistiram em: coluna de fase reversa Lichrospher®, C18, 5µm, 4 mm x 25 cm (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), fluxo 1,2 mL/min, temperatura a 25° C e volume de injeção igual a 10 µL. O sistema eluente foi constituído pela mistura de acetonitrila/água na proporção de 55:45 (v/v), respectivamente. O material eluído foi detectado em comprimento de onda igual a 227 nm.

2.2 Métodos

O método analítico foi validado empregando a CLAE, de acordo com as especificações definidas na Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação.

2.2.1 Especificidade

Para a determinação da possível interferência dos componentes lipídicos na quantificação do PTX, foi realizada uma comparação entre os cromatogramas obtidos para uma solução de fármaco e para a formulação lipossomal branca (na ausência de PTX). A especificidade do método foi determinada por meio da sobreposição e análise dos cromatogramas obtidos.

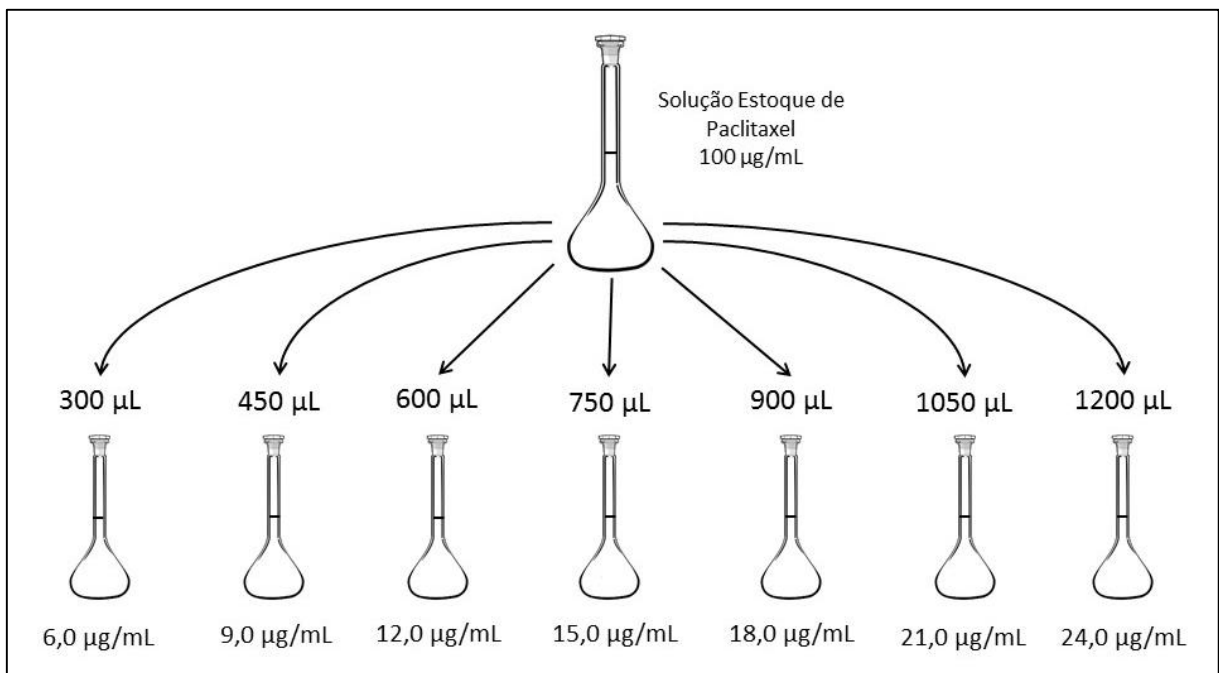
Para esta avaliação uma solução de PTX em acetonitrila foi preparada na concentração usual de trabalho (15,0 µg/mL). Os lipossomas brancos compostos por DOPE/CHEMS/DSPE-PEG (razão molar 5,7:3,8:0,5, respectivamente) foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico (descrito no capítulo 2). Em seguida, esses foram solubilizados em álcool isopropílico, na proporção de 1:9, respectivamente, para o completo rompimento da membrana lipídica e, posteriormente, a preparação foi diluída 3,3 vezes em sistema eluente. Ambas as soluções foram filtradas em filtros descartáveis com poro de 0,45 µm de diâmetro (Millex HV, JBR610222, Millipore, EUA) e posteriormente injetadas no cromatógrafo.

2.2.2 Linearidade

Para a determinação da linearidade foi construída uma curva padrão composta de sete pontos referente às diferentes concentrações da solução de PTX em acetonitrila. Foram preparadas três soluções estoque de PTX 100 µg/mL, solubilizando-se 2,5 mg de PTX em 25 mL de acetonitrila. A partir dessas soluções, foram realizadas diluições adequadas a fim de se obter soluções de trabalho em concentrações correspondentes a 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 µg/mL de PTX, permitindo uma variação da concentração de fármaco de 40 a 160% (**FIGURA 12**). Todas as soluções foram filtradas em filtros com poro de 0,45 µm de diâmetro e, em seguida, essas soluções foram analisadas por CLAE. As áreas dos picos foram registradas e utilizadas para a construção da curva analítica. Os valores dispersos (*outliers*) foram identificados previamente à análise de regressão pelo teste do resíduo padronizado de Jackknife. A equação da reta foi determinada por meio do estudo de regressão linear utilizando ajuste de dados pelo método dos mínimos quadrados com prévia verificação das premissas de normalidade (Teste de Ryan-Joiner), homocedasticidade (Teste de Levene) e

independência de resíduos (Teste de Durbin-Watson). Os testes foram realizados no programa computacional Microsoft Excel® 2003. Para avaliação da linearidade do método analítico, ou seja, a proporcionalidade entre a concentração e a resposta, o coeficiente de correlação (r), o coeficiente angular (b), o coeficiente linear (a) e o desvio padrão relativo (DPR) referente à média dos valores do fator de resposta calculado em cada concentração foram estimados (CAUSON, 1997; BRASIL, 2003).

FIGURA 12: Esquema de diluição para preparo das soluções de PTX em acetonitrila (ACN) nas diferentes concentrações propostas para a determinação da curva padrão de PTX



2.2.3 Precisão

A precisão foi avaliada pelos estudos de repetibilidade (precisão intra-corrída) verificada em um mesmo dia e de precisão intermediária (precisão inter-corrídas) avaliada em dias diferentes. A partir de uma solução estoque de PTX 100 µg/mL, foram preparadas seis soluções de PTX 15,0 µg/mL (correspondente a 100% da concentração do teste) para avaliação da precisão intra-dias. Para determinação da precisão inter-dias o mesmo procedimento descrito anteriormente foi adotado, realizando-se análises em dois dias consecutivos. A precisão do método analítico foi expressa como DPR% das concentrações médias determinadas, dado pela fórmula:

$$\text{DPR} = \text{DP}/\text{CMD} \times 100$$

onde, DP é o desvio padrão das concentrações médias determinadas (CMD). A precisão do método foi demonstrada pela obtenção de valores de DPR inferiores a 5% (BRASIL, 2003).

2.2.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada mediante a recuperação do analito adicionado em concentrações conhecidas às formulações lipossomais brancas. Foram usados três níveis de concentração: 6 µg/mL (concentração baixa), 15 µg/mL (concentração média) e 24 µg/mL (concentração alta). Todas as amostras foram preparadas em triplicata a partir de uma solução estoque de PTX 100 µg/mL. A exatidão foi expressa em porcentagem de recuperação do fármaco adicionado à formulação lipossomal, obtido pela razão entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente em valores percentuais (%). A faixa aceitável adotada foi entre 98% a 102% (GREEN, 1996).

2.2.5 Robustez

A avaliação da robustez do método foi realizada alterando o fluxo da fase móvel para 1,3 mL/min e a composição da fase móvel utilizada para acetonitrila/água, 57:43 (v/v). Para a determinação da robustez, foram preparadas soluções de PTX 15,0 µg/mL, a partir de uma solução estoque de PTX 100 µg/mL, que foram posteriormente analisadas alterando os parâmetros cromatográficos propostos neste item. Os resultados foram expressos como a média da concentração do analito e o DPR. Os teores obtidos nas condições nominais e nas condições variadas foram comparados pelo teste de t de *Student*.

2.2.6 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) foram determinados por meio de cálculos matemáticos utilizando os parâmetros obtidos na avaliação da linearidade e o emprego das seguintes equações, respectivamente:

$$LD = 3,3 DP_a / IC$$

e

$$LQ = 10 DP_a / IC$$

onde, LD é o limite de detecção estimado ($\mu\text{g/mL}$), LQ é o limite de quantificação estimado ($\mu\text{g/mL}$), DP_a é o desvio padrão médio do intercepto com o eixo y e IC é a inclinação da curva de calibração.

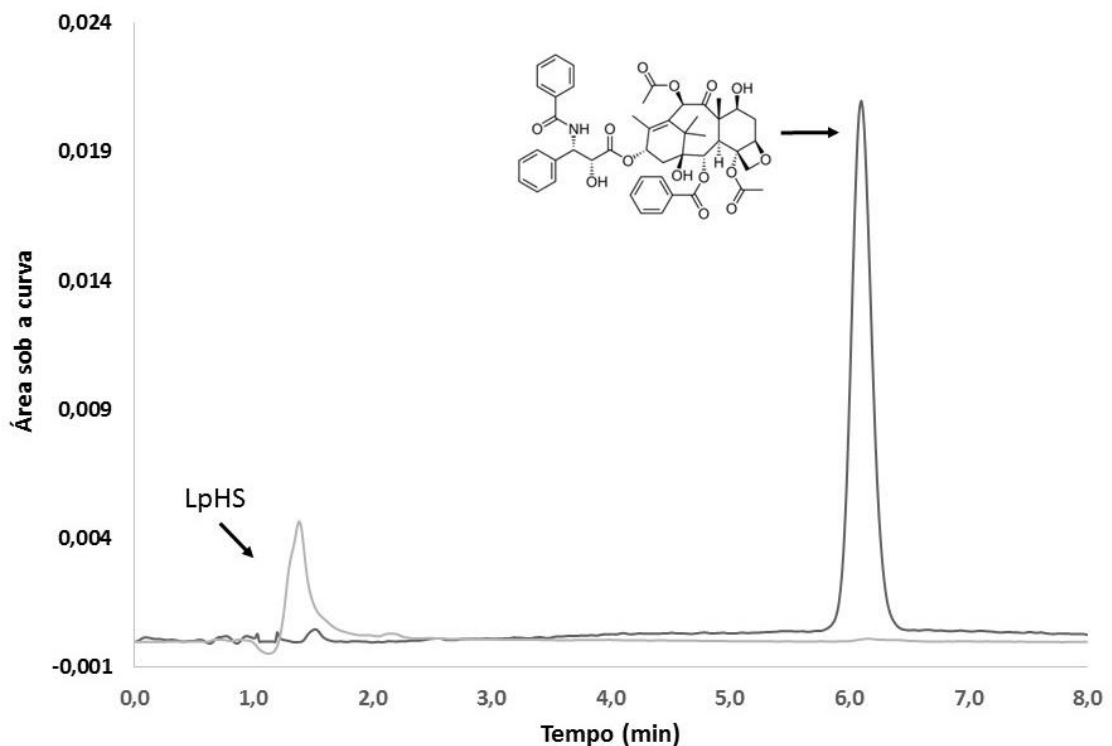
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Especificidade

A especificidade é definida como a capacidade do método em medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

Para a determinação da especificidade frente aos componentes da formulação foram analisadas uma solução de PTX (15,0 µg/mL) e uma solução de lipossomas brancos. A análise da sobreposição dos cromatogramas demonstrou que os componentes da formulação lipossomal não interferiram na determinação do PTX. Pela análise do cromatograma obtido para a formulação branca pode-se observar que não existem picos interferentes no tempo de retenção do PTX, nas condições empregadas, como pode-se visualizar na **FIGURA 13**. Assim, de acordo com a RDC 899 (BRASIL, 2003) a especificidade do método para a determinação do PTX na presença dos componentes lipídicos foi confirmada.

FIGURA 13 - Sobreposição dos perfis cromatográficos obtidos para solução de PTX (linha preta) e formulação lipossomal branca (LpHS, linha cinza)



3.2 Linearidade

A linearidade é definida como a capacidade do método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico (BRASIL, 2003).

Para a determinação da linearidade do método foram preparadas, em triplicata, soluções correspondentes 40%, 60%, 80%, 100%, 120%, 140% e 160% da concentração de trabalho (15,0 µg/mL). A curva analítica construída a partir desses dados e os resultados da análise de regressão linear estão apresentados na **FIGURA 14** e **TABELA 3**, respectivamente. O modelo de regressão linear obtido pelo método dos mínimos quadrados é o método estatístico mais aplicado para avaliar procedimentos analíticos. Esse método requer o tratamento de *outliers* bem como a avaliação da normalidade, homocedasticidade e independência de resíduos. O método demonstrou adequada normalidade e homocedasticidade para valor de $p < 0,05$. Regressão linear altamente significativa e ausência de desvio da linearidade foram observadas. Não houve diferença significativa na inclinação das curvas preparadas nos três dias diferentes ($p = 0,10$) e a equação da reta obtida foi $y = 19495x - 8051,9$. O coeficiente de correlação linear obtido foi considerado satisfatório ($r = 0,9997$), indicando que dentro da faixa de concentração avaliada, as concentrações de PTX foram diretamente proporcionais às respostas do método. O valor do coeficiente de correlação linear encontrado está de acordo com as especificações exigidas pela RDC 899 (BRASIL, 2003) mostrando, assim, que o método segue a linearidade no intervalo proposto.

FIGURA 14 – Representação gráfica da curva analítica para doseamento do PTX obtida pelo método de CLAE

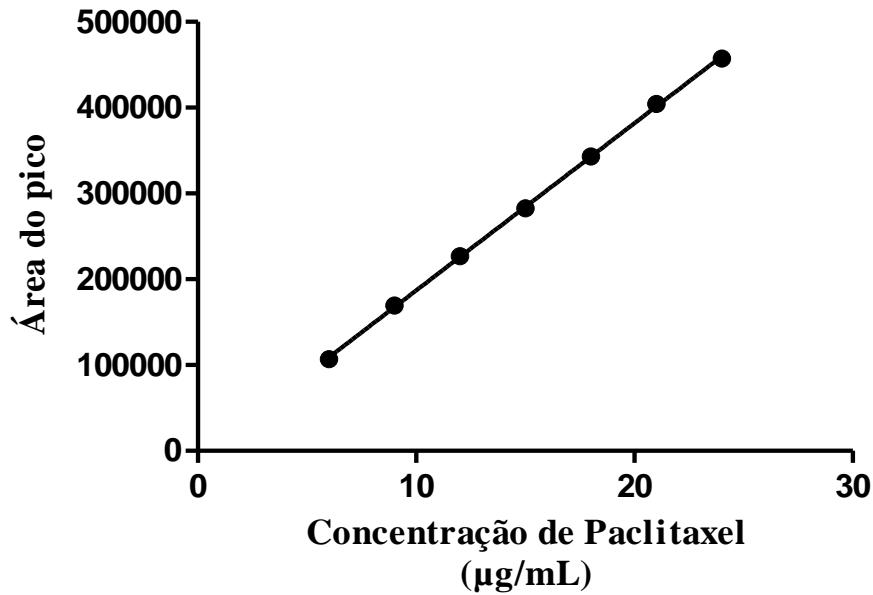


TABELA 3 – Resultados obtidos para análise da regressão linear, testes de premissas e ajuste ao modelo linear para o método de quantificação do PTX por CLAE

Parâmetros da regressão linear	
Inclinação ± desvio padrão	19495 ± 255
Intercepto ± desvio padrão	-8052 ± 4116
Coeficiente de Correlação (r)	0,9997
Faixa de Concentração (µg/mL)	6 – 24
Normalidade (R crítico) ^a	0,9835 (0,9437)
Homocedasticidade (T crítico) ^b	0,5707 (0,5720)
Independência de resíduos ^c	1,92 (1,39 - 2,61)
Regressão (F crítico) ^d	23368,69 (4,54)
Linearidade (F crítico) ^d	0,3185 (3,3567)

^a Teste de Ryan-Joiner (R calculado \geq R crítico); ^b Teste de Levene (T calculado \leq T crítico); ^c Durbin-Watson ($d_u < d$ calculado $< 4-d_u$); ^d Teste de Fisher (F calculado $>$ F crítico).

3.3 Precisão

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Para a validação do método foram avaliadas a repetibilidade (precisão intra-corrída) e a precisão intermediária (precisão inter-corrídas). A repetibilidade avalia a concordância entre os resultados em um curto período de tempo. A precisão intermediária (precisão inter-corrídas) indica a

concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003).

Na **TABELA 4** estão apresentados os valores de DPR determinado em um mesmo dia (n=6) e em dias diferentes (n=12). Os valores de DPR encontrados para a precisão intra-dia e inter-dia foram inferiores a 5,0%, como preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2003), indicando que o método analítico é preciso para o doseamento do PTX.

TABELA 4 – Determinação da precisão intra-dia e inter-dias para o método de doseamento do PTX por CLAE

Concentração Nominal (µg/mL)	Dia	Área do pico	Concentração Calculada (µg/mL)	DPR ^a	
				Intra-dia	Inter-dias
15	1	285866	15,08	0,48	
		285469	15,06		
		286191	15,09		
		287873	15,18		
		287970	15,18		
		289002	15,24		
	2	287631	15,17	1,18	1,15
		288362	15,20		
		288456	15,21		
		294990	15,54		
		293947	15,49		
		294759	15,53		

^a Desvio Padrão Relativo.

3.4 Exatidão

A exatidão é o parâmetro que verifica a proximidade dos resultados obtidos em confronto com o valor verídico (BRASIL, 2003).

Para verificação da exatidão do método foram adicionadas quantidades conhecidas de PTX, correspondentes a 40%, 100% e 160% da concentração de trabalho, em LpSH. Os resultados obtidos estão expressos na **TABELA 5**. O método apresentou uma exatidão adequada, uma vez que a taxa de recuperação do PTX para cada nível de concentração avaliado permaneceu na faixa de 98% a 102% e os DPR foram inferiores a 2,0% (GREEN, 1996).

TABELA 5 – Determinação da exatidão do método de doseamento do PTX por CLAE

Nível (%)	Área do pico	Concentração Calculada (µg/mL)	CMD ^a ± DP ^b (µg/mL)	Recuperação Média (%)	DPR ^c
40	109519	6,03	6,03 ± 0,03	100,57	0,44
	110140	6,06			
	109108	6,01			
100	289176	15,25	15,28 ± 0,3	101,83	0,17
	289854	15,28			
	290181	15,30			
140	461092	24,06	24,1 ± 0,06	100,46	0,23
	463222	24,17			
	461672	24,09			

^a Concentração Média Determinada. ^b Desvio Padrão. ^c Desvio Padrão Relativo.

3.5 Robustez

A robustez é definida como a capacidade de um método analítico em resistir a pequenas alterações das condições cromatográficas ou parâmetros analíticos (BRASIL, 2003).

Na **TABELA 6** estão apresentados os resultados obtidos após a alteração dos dois parâmetros analíticos: fluxo de fase móvel e proporção de solventes do sistema eluente. Em ambos os casos, a influência dessas alterações foi analisada no nível de concentração igual a 100%. A recuperação média do analito enquadrou-se dentro dos valores estabelecidos pela RDC 899 da ANVISA (BRASIL, 2003) que considera o método robusto quando a faixa de recuperação média do analito fica compreendida entre 95 e 105%. Além disso, os valores de DPR inferiores a 5% também corroboram com os determinados pela ANVISA.

TABELA 6 - Determinação da robustez do método de doseamento do PTX por CLAE

	ACN:Água 55:45 Fluxo 1,2mL/min		ACN:Água 55:45 Fluxo 1,3mL/min		ACN:Água 57:43 Fluxo 1,2mL/min	
	Área do pico	Concentração (µg/mL)	Área do pico	Concentração (µg/mL)	Área do pico	Concentração (µg/mL)
1	285866	15,08	272479	14,39	297919	15,69
2	285469	15,06	272057	14,37	297636	15,68
3	286191	15,09	272755	14,40	297569	15,68
4	287873	15,18	278779	14,71	293385	15,46
5	287970	15,18	279064	14,73	290784	15,33
6	289002	15,24	278560	14,70	291633	15,37
CMD^a± DP^b (µg/mL)		15,13 ± 0,07		14,55 ± 0,18		15,53 ± 0,17
Recuperação Média (%)		100,9		98,0		103,6
DPR^c (%)		0,48		1,23		1,08

^a Concentração Média Determinada. ^b Desvio Padrão. ^c Desvio Padrão Relativo.

3.6 Limites de Detecção e Quantificação

O LD é o menor valor de concentração da substância em análise possível de ser detectada, porém, não quantificada de forma precisa e exata. A menor concentração da substância em análise que possa ser medida precisa e exatamente, é determinada LQ. Os valores de LD e LQ estimados a partir das equações que levam em consideração os parâmetros da curva analítica foram, respectivamente, 0,63 µg/mL e 2,11 µg/mL. Os valores encontrados mostram a boa sensibilidade do método na determinação do PTX.

4 CONCLUSÃO

O método analítico foi adequadamente validado para o doseamento do PTX nas formulações lipossomais, conforme as diretrizes estabelecidas pela RDC 899 da ANVISA (BRASIL, 2003), apresentando especificidade frente aos componentes da formulação lipossomal, precisão, exatidão, robustez e linearidade em uma ampla faixa de concentração.

Capítulo 2 – Preparo e caracterização físico-química das formulações lipossomais

1 INTRODUÇÃO

Como relatado anteriormente, a formulação lipossomal pH-sensível contendo PTX desenvolvida por Barbosa (2014) demonstrou elevada estabilidade e citotoxicidade contra linhagens celulares de tumor de mama, tornando-se uma alternativa potencial para veiculação do PTX e aplicação terapêutica no tratamento do câncer de mama. Sabe-se que a determinação dos aspectos físico-químicos relativos à formulação assume papel fundamental na investigação do comportamento *in vivo* do sistema lipossomal e na determinação da estabilidade da amostra, uma vez que permite conhecer melhor a interação existente entre o fármaco em estudo e as membranas lipídicas (CAVALCANTI et al., 2007). Por outro lado, entender o comportamento do fosfolípide estrutural dos lipossomas pH-sensíveis (DOPE) também é de extrema importância para avaliar sua estabilidade bem como garantir adequada eficácia terapêutica. As transições de fase das moléculas da DOPE da fase lamelar para fases não lamelares estão envolvidas nos processos de desestabilização e/ou fusão de membranas, garantindo a liberação do material encapsulado no citoplasma a partir dos lipossomas. Portanto, nessa etapa do estudo foram conduzidas a avaliação dos parâmetros físico-químicos bem como a investigação criteriosa da organização supramolecular dos constituintes dos LpHS-PTX.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Os lípidos DOPE e DSPE-PEG-2000 foram adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha) e o CHEMS foi comprado da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O PTX foi fornecido pela Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Brasil) com pureza maior que 97%. O hidróxido de sódio foi adquirido da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil) e o cloreto de sódio P.A. foi proveniente da Merck (Darmstadt, Alemanha). O clorofórmio P.A. foi adquirido da Synth (São Paulo, Brasil). A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada e destilada. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. O meio de cultura Roswell Park Memorial Institute médium 1640 (RPMI) e o soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da Gibco® (Grand Island, NE, EUA).

2.2 Estudo das interações entre os componentes dos LpHS-PTX sob condições de baixa hidratação

2.2.1 Preparo das amostras

Para o preparo das amostras DOPE, CHEMS e DSPE-PEG₂₀₀₀ foram dissolvidos em clorofórmio para a obtenção de soluções nas concentrações de 250, 250 e 50 mM, respectivamente. Uma solução de PTX, em clorofórmio, com concentração igual a 20,0mg/mL também foi utilizada para o preparo das amostras. Em seguida, alíquotas das soluções clorofórmicas foram transferidas para cadinhos de alumínio, previamente pesados e a mesma proporção utilizada no preparo dos lipossomas foi mantida. As seguintes amostras foram preparadas:

- DOPE (22,8 µL de uma solução clorofórmica a 250 mM), NaCl (9,0 mg).
- CHEMS (15,2 µL de uma solução clorofórmica a 250 mM).
- DOPE (22,8 µL de uma solução clorofórmica a 250 mM), CHEMS (15,2 µL de uma solução clorofórmica a 250 mM), NaCl (9,0 mg).
- DSPE-PEG₂₀₀₀ (20,0 µL de uma solução clorofórmica a 50 mM).

- DOPE (22,8 μL de uma solução clorofórmica a 250 mM), CHEMS (15,2 μL de uma solução clorofórmica a 250 mM), DSPE-PEG₂₀₀₀ (20,0 μL de uma solução clorofórmica a 50 mM), NaCl (9,0 mg).
- DOPE (22,8 μL de uma solução clorofórmica a 250 mM), CHEMS (15,2 μL de uma solução clorofórmica a 250 mM), DSPE-PEG₂₀₀₀ (20,0 μL de uma solução clorofórmica a 50 mM), PTX (25 μL de uma solução clorofórmica a 20,0 mg/mL), NaCl (9,0 mg).

Os solventes orgânicos foram evaporados, sob ligeiro aquecimento, até a formação de um filme. Em seguida, as amostras foram armazenadas em uma cuba de hidratação com umidade relativa igual a 34,6% (4°C) contendo solução saturada de $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Após a estabilização do peso dos cadinhos, avaliou-se a fração de água absorvida por estas amostras que variou de 0,3 e 1,4 %. Por fim, os cadinhos foram pesados e seu conteúdo foi analisado por DSC e SAXS.

2.2.2 Análises Calorimétricas

O instrumento DSC 2910 Modulated TA Instruments (New Castle, EUA) foi utilizado para realização das análises calorimétricas. O intervalo de temperatura utilizado no estudo foi de -50 °C a 80 °C, com uma taxa de aquecimento de 5 °C/min. Para calibração do equipamento em relação a temperatura e entalpia utilizou-se o índio. Durante as análises as amostras foram submetidas a três corridas consecutivas visando uma maior homogeneização do conteúdo dos cadinhos. Os dados obtidos foram analisados pelo software de isotermas do próprio equipamento. As temperaturas de transição foram definidas pela posição dos picos observados nas curvas de DSC.

2.2.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

Após as análises de DSC, os mesmos cadinhos foram abertos, seu conteúdo retirado e depositado em um suporte de metal, o qual foi selado com um filme de poliimida (Kapton[®]) e analisado pela técnica de SAXS. As análises de SAXS foram feitas na linha D1B-SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, São Paulo). Para a realização das medidas utilizou-se um comprimento de onda fixo ($\lambda =$

1,488 nm). O detector Pilatus 300k foi posicionado a 1,0 m da amostra e a região de espaço recíproco variou de $q_{\min} = 0,15\text{nm}^{-1}$ até $q_{\max} = 4,0\text{nm}^{-1}$. As amostras foram depositadas em anéis de metal, os quais foram vedados por um filme de poliimida (Kapton®) e acoplados a um porta amostras com sistema de aquecimento DSC-Linkam.

Antes da análise das amostras, o substrato foi avaliado quanto a sua interferência nas medidas a serem realizadas e constatou-se que ele não contribuiu com nenhum pico de difração nas condições analisadas. Para o cálculo das distâncias intermoleculares, a fórmula utilizada foi: $d=2\pi/q$.

2.3 Caracterização físico-química e estrutural das formulações lipossomais hidratadas

2.3.1 Preparo dos LpHS-PTX

As formulações utilizadas nesse estudo foram preparadas pelo método de hidratação do filme lipídico (BARBOSA, 2014). Para o preparo dos lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada (LpHS), alíquotas dos lípidos DOPE, CHEMS e DSPE-PEG₂₀₀₀ foram dissolvidos em clorofórmio na concentração lipídica de 10 mM (razão molar igual a 5,7:3,8:0,5, respectivamente) e transferidas para um balão de fundo redondo. Para o preparo de LpHS-PTX, uma solução de PTX em clorofórmio correspondente a 0,05% (p/v) foi adicionada nessa etapa.

Na etapa seguinte, o solvente foi submetido à completa evaporação com auxílio de um rotavapor Buchi Labortechnik AG CH-9233, modelo R-210, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça), sob pressão reduzida, até a formação do filme lipídico nas paredes do balão. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) em quantidade equimolar ao CHEMS, com intuito de ionizar esse componente. Após esse procedimento, uma solução de NaCl 0,9% (p/v) foi adicionada e o sistema foi submetido a agitação vigorosa, em vórtex (mini-shaker Ika, modelo MS1, Wilmington, EUA), até obtenção de uma dispersão homogênea de lipossomas multilamelares.

Posteriormente, os lipossomas foram calibrados em relação ao diâmetro mediante processo de sonicação usando sonda de titânio (CPX 500, Cole-Palmer Instruments, Vernon Hills, EUA), durante 5 minutos e em banho de gelo. A fração de PTX não encapsulada, insolúvel no meio, e possíveis resíduos de titânio da sonda, foram removidos por centrifugação (Heraeus Multifuge X1R Centrifuge, Alemanha) a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C (WU et al.; 2006). Por fim, a formulação lipossomal preparada foi armazenada em geladeira a 4 °C.

Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo fosfatidilcolina de soja (SPC) carreadores de PTX (LpHSPC-PTX) foram utilizados no presente estudo como controle da pH-sensibilidade, para verificar a influência da redução da concentração da DOPE na pH-sensibilidade do sistema. A formulação composta por SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀ na razão molar igual a 2,0:4,5:3,0:0,5, concentração lipídica igual a 10 mM, contendo 0,005% (p/v) de PTX foi preparada pelo mesmo método descrito anteriormente.

2.3.2 Determinação do teor de encapsulação do PTX em LpHS-PTX

A determinação da porcentagem de PTX encapsulado em LpHS-PTX foi realizada por CLAE, empregando as condições descritas no capítulo anterior. Inicialmente, a membrana lipídica dos lipossomas foi aberta com álcool isopropílico na proporção 1:9, respectivamente, e em seguida, a preparação foi diluída com o sistema eluente (acetonitrila:água 55:45) e injetada no cromatógrafo. O teor de PTX foi determinado nos lipossomas antes (PTX total) e após a centrifugação (PTX encapsulado) e calculado pela seguinte fórmula:

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

As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

2.3.3 Avaliação do diâmetro e índice de polidispersão

O diâmetro e o índice de polidispersão das vesículas foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS) utilizando o equipamento Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Inglaterra). As análises foram realizadas à temperatura ambiente, 25 °C, com ângulo de incidência do laser de 90 °. Para a realização das medidas de diâmetro, 100,0 µL de lipossomas foram previamente diluídos em cerca de 3,0 mL de água destilada filtrada em 0,45 µm. As medidas foram realizadas em triplicata e o diâmetro médio baseado no volume foi utilizado como parâmetro para avaliar a frequência de tamanho correspondentes a 10%, 50% e 90% das partículas.

2.3.4 Análise do Potencial Zeta

O potencial zeta das dispersões coloidais foi determinado pela técnica de DLS associado a mobilidade eletroforética utilizando o equipamento Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Inglaterra). As análises foram realizadas à temperatura ambiente, 25 °C, com ângulo de incidência do laser de 90°.

Para essas medidas, 100,0 µL de lipossomas foram diluídos em cerca de 10,0 mL de solução de NaCl 1mM filtrada em 0,45 µm. As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média ± desvio padrão.

2.3.5 Preparo dos *Pellets* de lipossomas para análise por SAXS

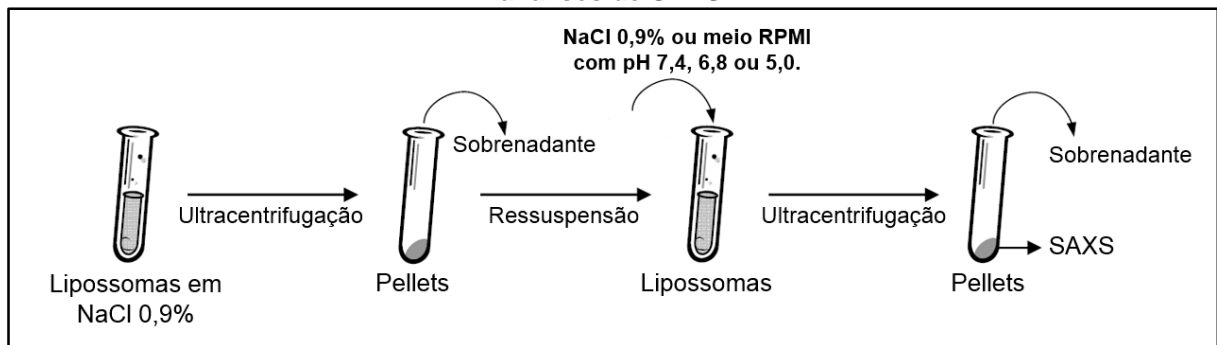
Primeiramente, as formulações LpHS e LpHS-PTX foram submetidas a ultracentrifugação a 150.000 x g por 90 min. a 4° C (OPTIMA™ L-80XP, Beckman Coulter – Fullerton, CA, EUA). Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e um volume de solução, igual ao sobrenadante, foi adicionado aos *pellets*. As soluções utilizadas foram: NaCl 0,9% (p/v), meio de cultura RPMI 1640 (MC) e meio de cultura RPMI 1640 suplementado com SFB 10% (v/v) (MCS) preparados em três condições de pH diferentes: 7,4; 6,8 e 5,0. Os *pellets*, contendo as soluções descritas, foram agitados em vórtex para a ressuspensão dos lipossomas. As amostras obtidas foram, novamente, submetidas a ultracentrifugação nas mesmas condições anteriores.

Finalmente, os sobrenadantes foram descartados obtendo-se os *pellets* finais das amostras (**FIGURA 15**).

Os LpHSPC-PTX foram preparados nas mesmas condições dos LpHS-PTX, no entanto, os *pellets* foram resuspendidos apenas em NaCl 0,9% (p/v) preparado em pH 7,4 e 5,0.

Os *pellets* obtidos foram então colocados em suportes de metal, selados com filme de poliimida (Kapton[®]) e analisados pela técnica de SAXS na linha D1B-SAXS1 do LNLS (Campinas, São Paulo), nas mesmas condições detalhadas no item 1.2.3 deste capítulo.

FIGURA 15 - Processo de preparo das amostras de LpHS e LpHS-PTX utilizadas nas análises de SAXS



Adaptado de SILVA, 2011.

2.4 Análise estatística

Os dados da caracterização físico-química foram testados por teste *t de Student*, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas para valor de p menor ou igual a 0,05.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo das interações entre os componentes dos LpHS-PTX sob condições de baixa hidratação

Com o objetivo de investigar as modificações no padrão de organização supramolecular das moléculas do lípide estrutural da formulação composta por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀:PTX, duas técnicas de caracterização de nanoestruturas foram associadas. As amostras para essas análises foram preparadas em condições de baixa hidratação, e analisadas, primeiramente, pela técnica de DSC e, posteriormente, verificadas pela técnica de SAXS.

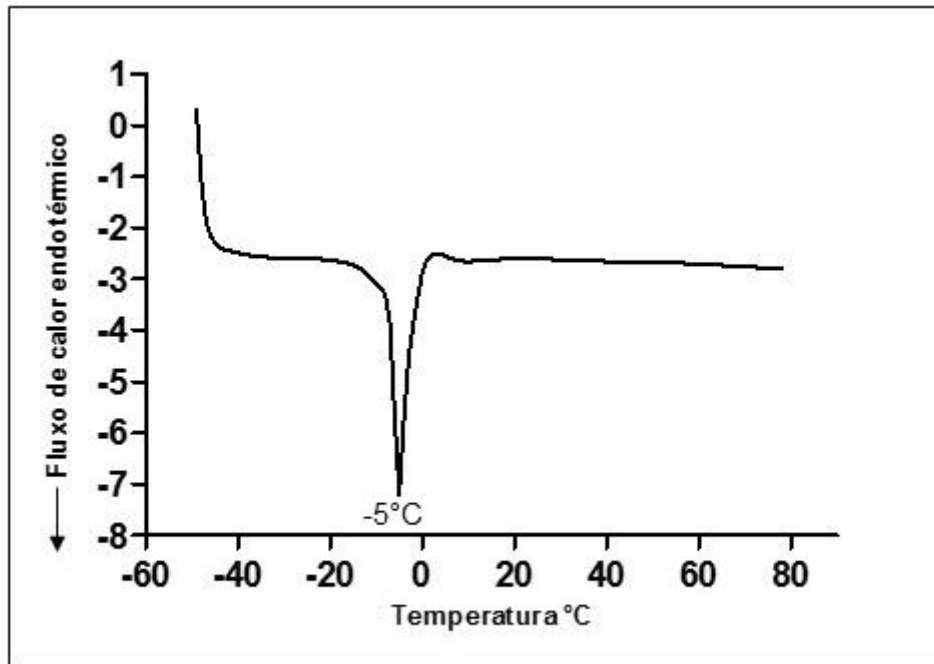
A ocorrência de transição de fase lamelar para uma organização não lamelar do lípide estrutural em um sistema lipossomal pH-sensível é essencial, pois ocasiona a desestabilização da bicamada lipídica e a liberação do material encapsulado, processo indispensável para garantir a eficácia terapêutica da formulação desenvolvida (DE OLIVEIRA et al., 1998).

A associação da técnica de DSC ao SAXS possibilita investigar as interações existentes entre o fármaco e as membranas lipídicas e avaliar os tipos de transições de fase que ocorrem no sistema lipossomal (ALLEN, 1990). O emprego da técnica de DSC permite determinar as temperaturas de transição entre as fases (DEMETZOS, 2008) enquanto a técnica de SAXS possibilita identificar a transição de fase específica bem como caracterizar a membrana lipídica frente a condições ambientais diversas (SEDDON, 1990; CAVALCANTI *et al.*, 2007).

3.1.1 DOPE:NaCl

Na curva de DSC da amostra DOPE:NaCl, representada na **FIGURA 16**, observa-se um intenso pico endotérmico na temperatura de -5 °C, o qual está associado a fusão das moléculas de água presentes no sistema. Resultados similares foram previamente descritos por De Oliveira e colaboradores (2000) assim como por Lopes e colaboradores (2014).

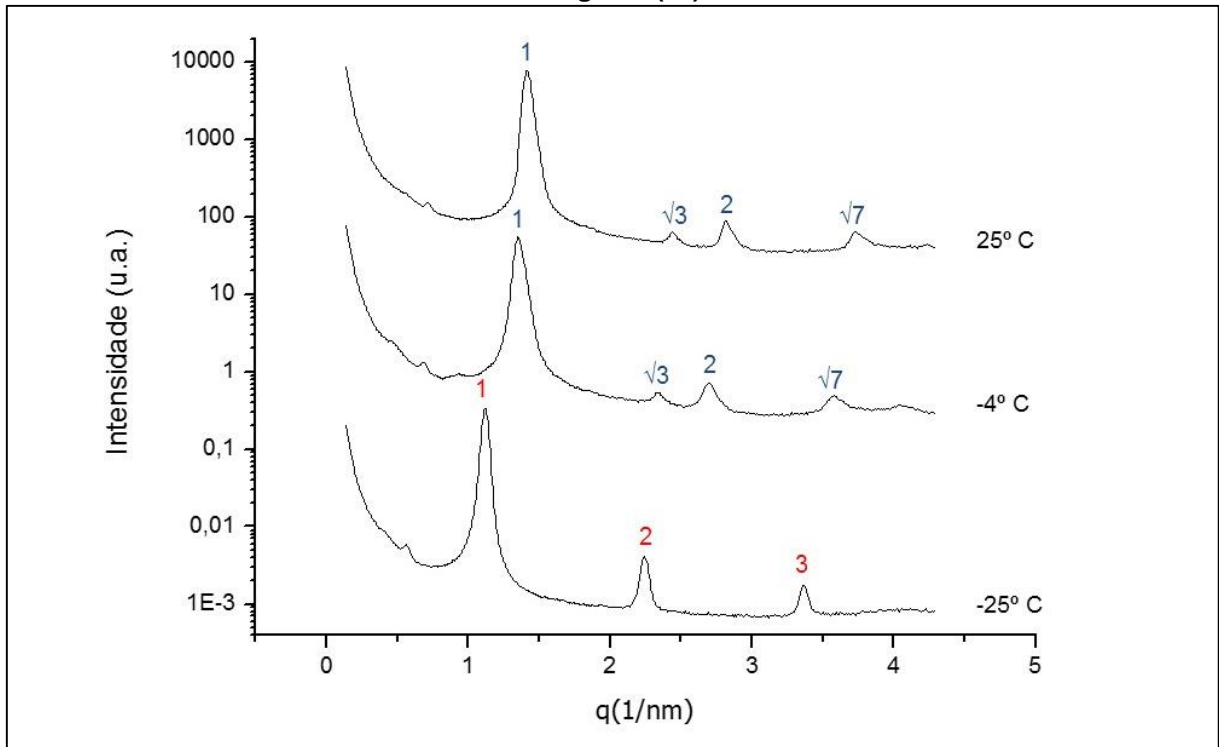
FIGURA 16 - Curva de DSC da amostra DOPE + NaCl



Nas análises da amostra por SAXS, os difratogramas de DOPE:NaCl (**FIGURA 17**) foram obtidos nas seguintes temperaturas: -25 °C, -4 °C e 25 °C. No difratograma obtido na temperatura de -25 °C, observa-se picos com valores de q iguais a 1,12; 2,26 e 3,38 nm^{-1} , que correspondem a razões de reflexão de Bragg iguais a 1, 2 e 3. A relação entre os picos indica uma organização lamelar das moléculas de DOPE, com espessura (d) igual a 5,61 nm.

Na temperatura de -4 °C, observa-se o desaparecimento dos sinais correspondentes a fase lamelar. Os picos do difratograma apresentam valores de q iguais a 1,35; 2,34; 2,70 e 3,58 nm^{-1} correspondentes a razões de reflexão de Bragg iguais a 1, $\sqrt{3}$, 2 e $\sqrt{7}$, caracterizando um domínio em fase hexagonal com distância interplanar (d) igual a 4,65 nm. O difratograma obtido a 25 °C apresenta uma sequência de picos com valores de q iguais a 1,41; 2,44; 2,82 e 3,73 nm^{-1} , que correspondem a razões de reflexão de Bragg iguais a 1, $\sqrt{3}$, 2 e $\sqrt{7}$ e valor de d igual 4,46 nm. A diminuição no valor de d indica uma maior aproximação das moléculas da DOPE. Desta forma, pode-se sugerir a ocorrência da transição de fase lamelar para a fase hexagonal (H_{II}) da DOPE devido ao aquecimento da amostra de -25 °C a -4 °C.

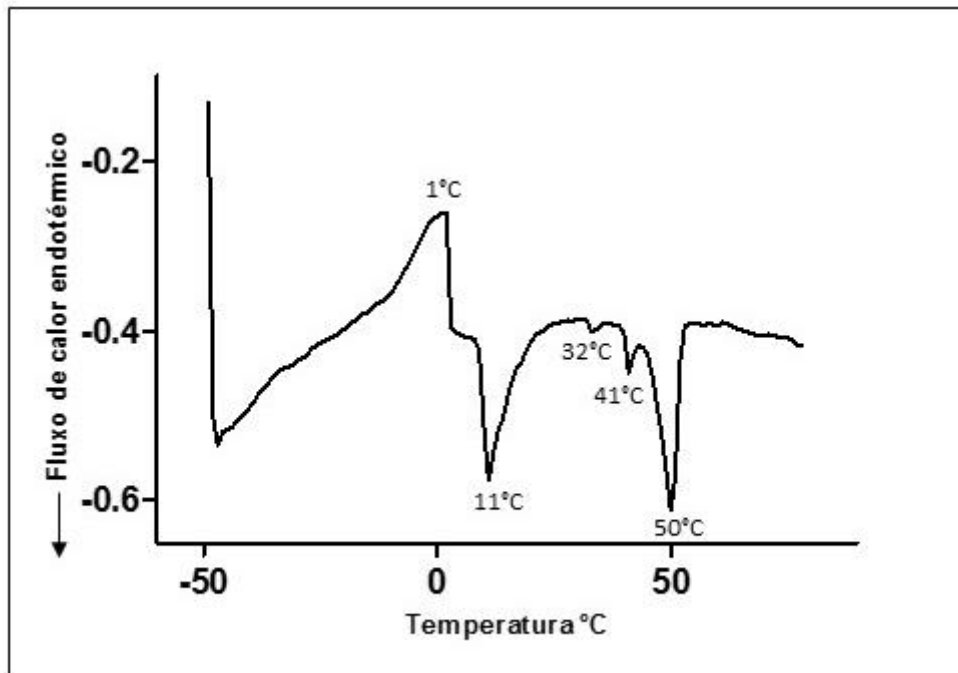
FIGURA 17 - Difratomogramas da amostra DOPE:NaCl. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho representam a as moléculas da DOPE em organização lamelar e os índices em azul correspondem a fase hexagonal (H_{II})



3.1.2 DOPE:CHEMS:NaCl

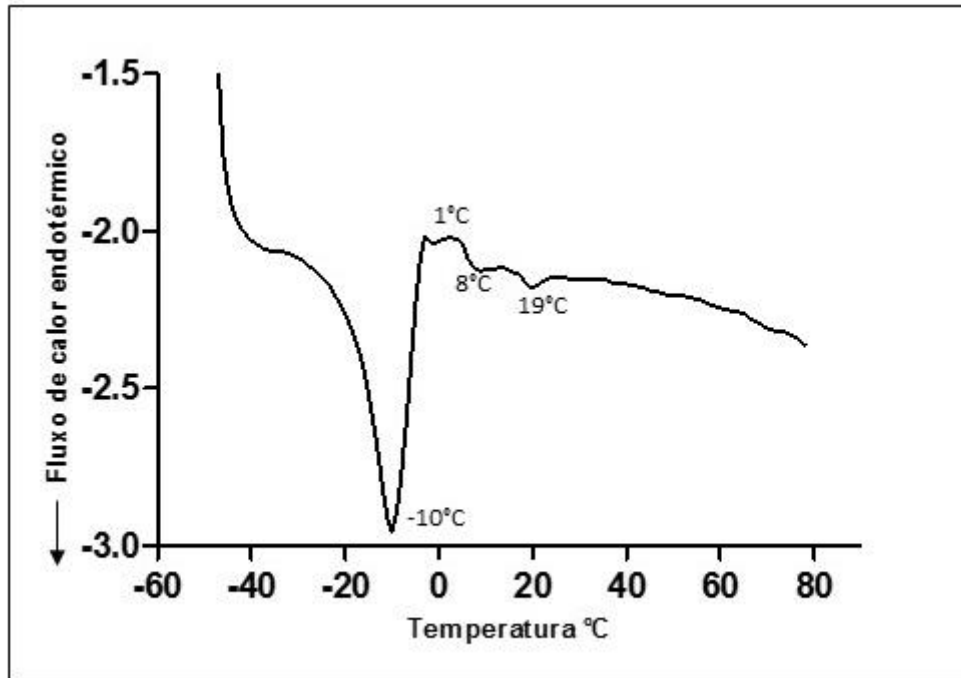
Na **FIGURA 18** é possível visualizar a curva de DSC para o CHEMS puro. Como descrito por Lopes e colaboradores (2014), observa-se a existência de um pico exotérmico a -1°C possivelmente relacionado ao processo de cristalização das moléculas de CHEMS. Foram detectados quatro picos endotérmicos centrados a 11°C , 32°C , 41°C e 50°C , que podem indicar o processo de fusão dos cristais de CHEMS. A dissociação do pico em quatro sinais pode estar relacionada ao polimorfismo dos cristais de CHEMS presentes.

FIGURA 18 - Curva de DSC da amostra de CHEMS puro



Na curva de DSC da mistura física DOPE:CHEMS:NaCl (**FIGURA 19**), pode-se observar um pico exotérmico centrado em 1 °C, que se refere, provavelmente, ao processo de cristalização das moléculas de CHEMS, também observado na **FIGURA 18**. O pico endotérmico intenso centrado a -10 °C pode estar associado ao processo de fusão das moléculas de água presentes na amostra. O deslocamento e redução da intensidade desse pico, em relação à amostra DOPE:NaCl, pode ser explicado pela adição de outros componentes ao sistema. Os dois picos endotérmicos centrados a 8 °C e 19 °C provavelmente estão relacionados ao processo de fusão das moléculas de CHEMS. O aumento da temperatura de cristalização do CHEMS, se comparada com a curva obtida para o CHEMS puro (**FIGURA 18**) pode ser resultante da presença dos demais componentes no sistema, DOPE e NaCl.

FIGURA 19 - Curva de DSC da amostra DOPE:CHEMS:NaCl

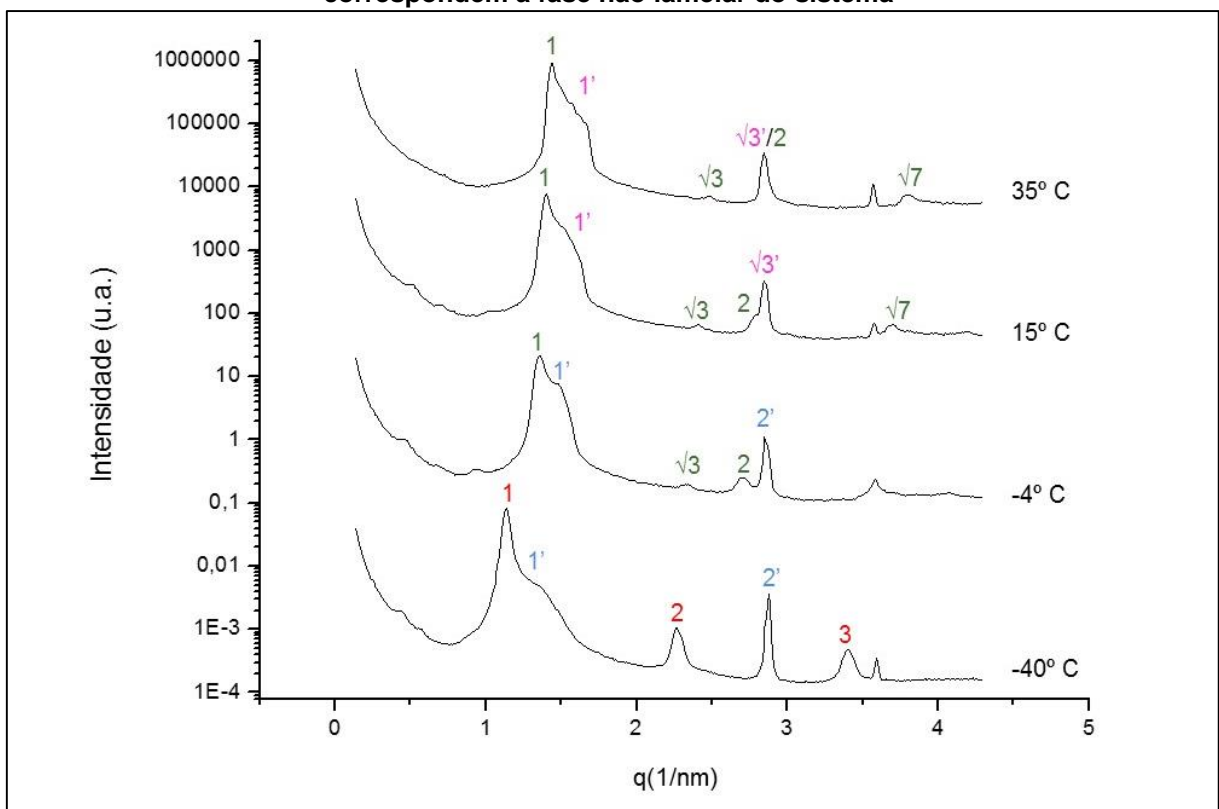


Os difratogramas da mistura DOPE:CHEMS:NaCl foram obtidos nas temperaturas de -40 °C, -4 °C, 15 °C e 35 °C (**FIGURA 20**). Na temperatura de -40 °C, observa-se a coexistência de dois domínios. O primeiro domínio com organização lamelar (representado pelos índices na cor vermelha) apresenta valores de q iguais a 1,14; 2,27 e 3,40 nm^{-1} , correspondentes a razões de reflexão de Bragg iguais a 1, 2 e 3 e espessura da bicamada lipídica igual a 5,51 nm. O segundo domínio (representado pelos índices na cor azul) apresenta uma sequência de picos com valores de q iguais a 1,42 e 2,87 nm^{-1} , reflexões de Bragg próximas a 1' e 2', sugerindo, também, a organização das moléculas da DOPE em fase lamelar. O valor de d encontrado para esse domínio foi igual a 4,49 nm.

Na temperatura de -4 °C também foi possível constatar a presença de dois domínios. O primeiro domínio (representado pelos índices na cor verde) apresenta valores de q iguais a 1,35; 2,32 e 2,70 nm^{-1} , correspondentes a razões de reflexão de Bragg iguais a 1, $\sqrt{3}$ e 2, correspondentes a uma organização não lamelar (hexagonal), com distância interplanar igual a 4,65 nm. O segundo domínio existente (representados pelos índices em azul) apresenta picos com valores de q iguais a 1,46 e 2,84 nm^{-1} , que indicam razões de reflexão de Bragg iguais a 1' e 2', característico de fase lamelar, com valor de d igual a 4,30 nm. De acordo com esses resultados, pode ser constatada

a ocorrência de transição da fase lamelar das moléculas da DOPE para uma fase não lamelar nessa temperatura. A distribuição heterogênea das moléculas de CHEMS entre as moléculas da DOPE na bicamada lipídica pode explicar a coexistência de dois domínios no sistema, uma vez que a ausência de moléculas de CHEMS em certas regiões favorece as interações entre as moléculas da DOPE resultando na formação da fase não lamelar (SILVA et al., 2011; LOPES et al., 2014). Sugere-se também que a desestruturação da bicamada lipídica ocasiona a aproximação das moléculas de CHEMS que se cristalizam, aproximadamente, na temperatura de 1 °C, como observado na curva de DSC (FIGURA 18 e 19).

FIGURA 20 - Difratomogramas da amostra DOPE:CHEMS:NaCl. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho e azul representam a moléculas da DOPE em organização lamelar. Os índices em verde e rosa correspondem à fase não lamelar do sistema



No difratograma relacionado a temperatura de 15 °C verifica-se a presença de dois domínios não lamelares. O primeiro domínio não lamelar, representado pelos índices na cor verde, apresenta valores de q iguais a 1,40; 2,41; 2,79 e 3,57 nm^{-1} , indicativos de razões de reflexão de Bragg iguais a 1, $\sqrt{3}$, 2 e $\sqrt{7}$ sugestivas de uma fase hexagonal, com valor de d igual a 4,49 nm. O segundo domínio não lamelar com valores de q iguais a 1,54 e 2,84 nm^{-1} , que correspondem a padrões de reflexão de

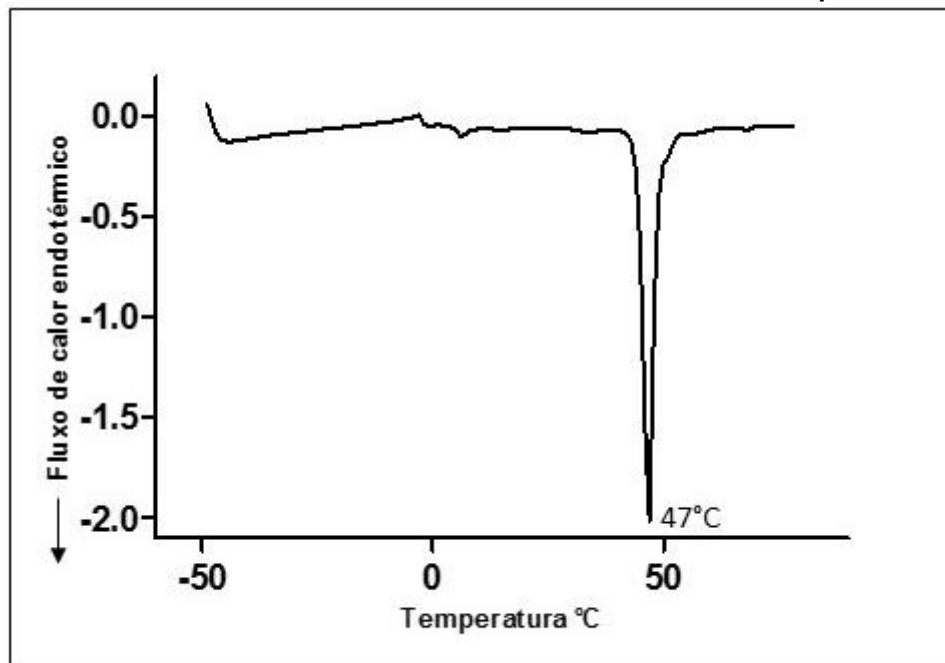
Bragg iguais a $1'$ e $\sqrt{3}'$ e distância interplanar igual a 4,22 nm, indica transição de fase lamelar para não lamelar nesse domínio.

Na temperatura de 35 °C o difratograma apresenta um padrão de espalhamento semelhante, sendo observadas as mesmas razões de reflexão de Bragg observadas na temperatura de 15 °C. Possivelmente, nessa temperatura, os picos correspondentes a $\sqrt{3}'$ (cor rosa) e 2 (cor verde) estão sobrepostos, mantendo-se o sistema com dois domínios não lamelares. Não foi possível atribuir razões de reflexão de Bragg para os picos com valor de $q \approx 3,56 \text{ nm}^{-1}$ nos difratogramas da **FIGURA 20**.

3.1.3 DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀:NaCl

Na **FIGURA 21** está representada a curva de DSC do DSPE-PEG₂₀₀₀ puro. É possível visualizar um intenso pico endotérmico centrado a 47 °C indicativo da fusão do lípide em questão. Esses resultados estão de acordo com os dados previamente reportados (LOPES et al., 2014).

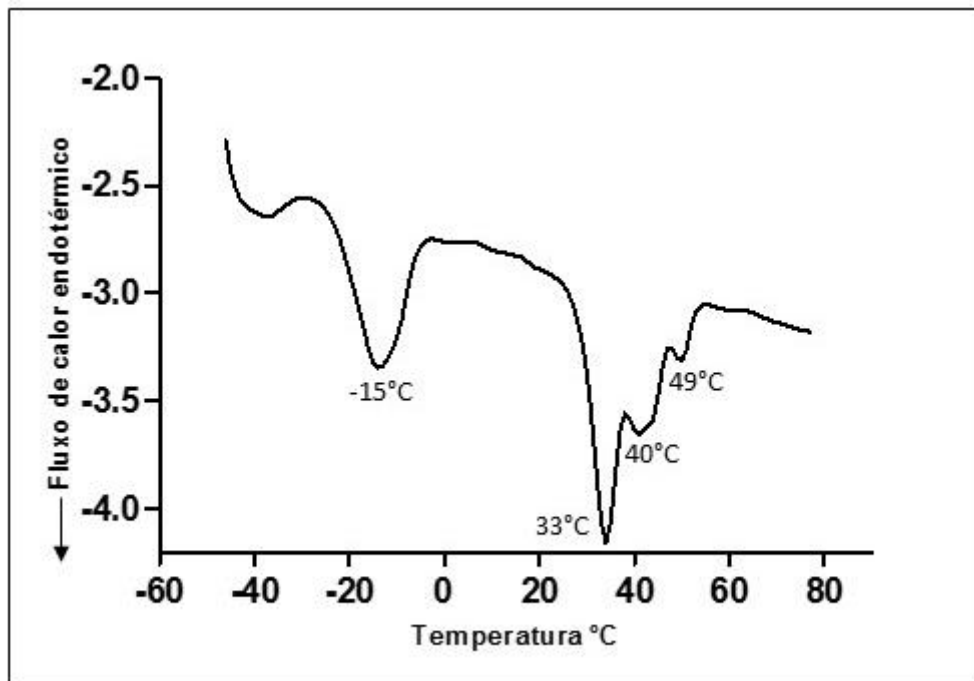
FIGURA 21 - Curva de DSC da amostra de DSPE-PEG₂₀₀₀ puro



Na curva de DSC da mistura física DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀:NaCl, representada na **FIGURA 22**, pode-se observar picos endotérmicos centrados nas temperaturas de -15 °C, 33 °C, 40 °C e 49 °C. O pico observado à temperatura de -15 °C pode estar

relacionado ao processo de fusão das moléculas de água presente no sistema e o pico presente na temperatura de 33 °C, provavelmente, refere-se ao processo de fusão das moléculas do CHEMS, conforme anteriormente relatado. Como se pode observar na **FIGURA 21**, existe um evento térmico a 47 °C anteriormente relatado como fusão das moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀. Portanto, diante desse resultado, pode-se sugerir que os picos endotérmicos centrados em 40 °C e 49 °C são relativos ao mesmo processo. O desdobramento do pico endotérmico relativo ao processo de fusão das cadeias do DSPE-PEG₂₀₀₀ na curva de DSC da mistura física, pode estar relacionado a uma heterogeneidade da distribuição dos diversos componentes da amostra em questão (LOPES et al., 2014).

FIGURA 22 - Curva de DSC da amostra de DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀:NaCl



Os difratogramas obtidos para a mistura DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀:NaCl nas temperaturas de -25 °C, 22 °C, 35 °C e 52 °C estão representados na **FIGURA 23**. Na temperatura de -25 °C pode-se verificar uma sequência de picos com valores de q iguais a 1,17; 2,28 e 3,47 nm⁻¹ que correspondem a razões de reflexão de Bragg iguais a 1, 2 e 3 característicos de uma organização lamelar do sistema com espessura da bicamada lipídica igual a 5,37 nm. Em valores de q iguais a 1,41 e 2,87 nm⁻¹, correspondentes a razões de reflexão de Bragg iguais a 1° e 2°, pode-se sugerir a existência de um segundo sistema lamelar com distância interplanar igual a 4,46 nm.

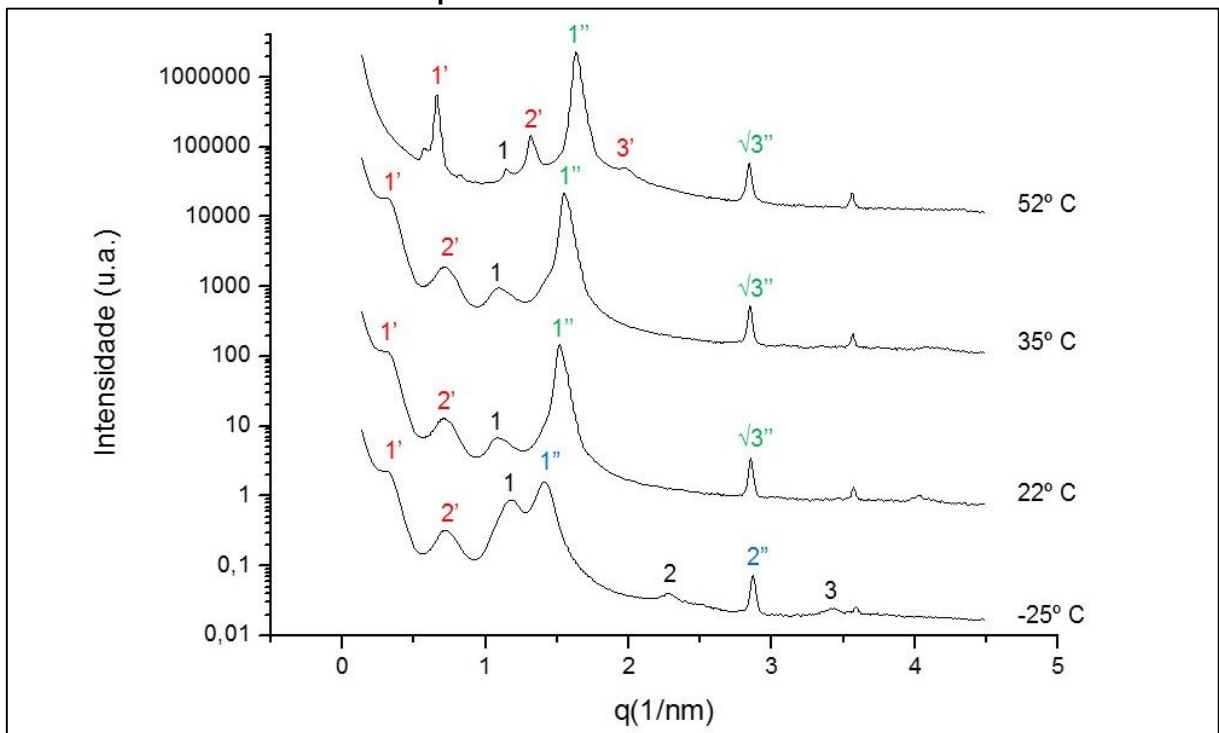
Observa-se também a presença de um terceiro sistema lamelar, com valores de q iguais a 0,32 e 0,71 nm^{-1} (razões de reflexão de Bragg iguais a 1' e 2') e espessura de bicamada de 19,64 nm. Com base em estudos da literatura, os resultados obtidos apresentam fortes indícios que esse terceiro domínio lamelar, não detectado nas amostras anteriores, possivelmente está relacionado a adição de moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀ ao sistema. Estudos prévios realizados por Lopes e colaboradores (2014) demonstraram valores de d semelhantes para esse domínio contendo DSPE-PEG₂₀₀₀. Sabe-se que a presença dos volumosos grupos hidrofílicos do PEG na superfície lipossomal podem provocar um aumento da espessura da bicamada lipídica, como foi observado no presente estudo (GARBUZENKO et al., 2005; ANGELOV et al., 2009). Assim, a coexistência de três domínios lamelares diferentes no sistema pode estar relacionada a distribuição heterogênea das moléculas de DOPE e DSPE-PEG₂₀₀₀ ao longo da bicamada lipídica (LOPES et al., 2014; SILVA et al., 2011). Entretanto, devido às características apresentadas pelos picos desse domínio com razões de reflexão de Bragg iguais a 1' e 2', não se pode descartar a influência de um fator forma. Portanto, estudos posteriores serão conduzidos para melhor elucidar a atribuição desses picos em baixos valores de q .

No difratograma correspondente a temperatura de 22 °C pode-se observar um pico com valor de q igual a 1,17 nm^{-1} e valor de d igual a 5,37 nm (representado pelo índice na cor preta) o qual não foi possível atribuir razões de reflexões de Bragg. Sugere-se, que esse domínio corresponde a uma fase lamelar com uma pequena concentração de moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀. Nessa mesma temperatura, pode-se novamente observar a presença de um segundo domínio lamelar apresentando picos com valor de q iguais a 0,32 e 0,70 nm^{-1} , correspondentes a uma reflexão de Bragg igual a 1' e 2' com espessura de 19,64 nm, mostrando-se um domínio rico em moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀. De maneira semelhante ao observado na temperatura de -40 °C, em função das características dos picos, não é possível descartar a influência do fator forma neste domínio, tornando-se necessária maiores análises para determinar a organização dessa região. A existência de um terceiro domínio com picos em valores q iguais a 1,51 e 2,85 nm^{-1} também foi observado. Esses valores são indicativos de razões de reflexão de Bragg iguais a 1 e $\sqrt{3}$ e distância interplanar de 4,16 nm. Desta forma, pode-se constatar a ocorrência de uma transição da fase lamelar das

moléculas de DOPE presentes na bicamada lipídica para uma organização não lamelar.

Na temperatura de 35 °C o difratograma apresenta um padrão de espalhamento com valores de q semelhantes ao verificado a 22 °C, sendo observadas as mesmas razões de reflexão de Bragg que sugerem a presença de dois domínios lamelares e um terceiro domínio não lamelar.

FIGURA 23 - Difratogramas da amostra DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀:NaCl. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho, azul e preto indicam moléculas de DOPE organizadas em fase lamelar. Os índices em verde correspondem a moléculas de DOPE em fase não lamelar



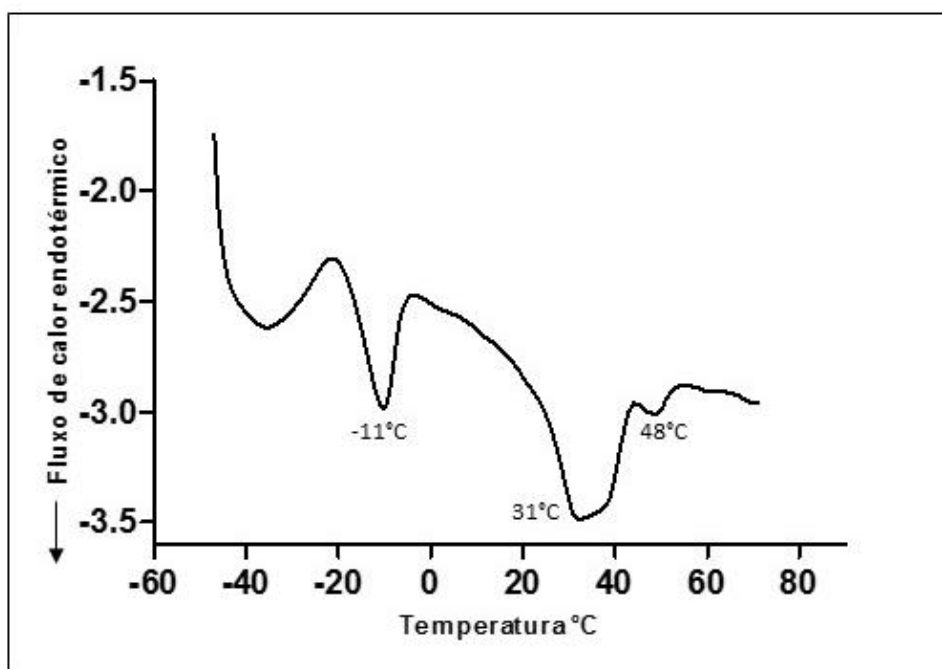
No difratograma obtido na temperatura de 52 °C observa-se a existência de um pico com valor de q igual a $1,15 \text{ nm}^{-1}$ e valor de d igual a $5,46 \text{ nm}$ (representado pelo índice na cor preta) o qual não foi possível atribuir razões de reflexões de Bragg. Contudo, ocorre uma redução na intensidade do pico de primeira ordem que sugere uma alteração na organização desse domínio no sistema. Verifica-se também um segundo domínio com padrão de organização não lamelar (razões de reflexão de Bragg iguais a 1 e $\sqrt{3}$) com valores de q iguais a $1,63$ e $2,84 \text{ nm}^{-1}$ e distância interplanar de $3,85 \text{ nm}$. A alteração mais marcante nessa temperatura está relacionada ao domínio lamelar (representado pelos índices em vermelho) rico em moléculas de DSPE-

PEG₂₀₀₀. Observa-se um deslocamento dos picos para valores de q maiores iguais a 0,66; 1,32 e 1,97 nm⁻¹, com razões de reflexão de Bragg iguais a 1', 2', 3' e distância interplanar igual a 9,52 nm. Estudos descritos por Lopes e colaboradores (2014) mostraram distância interplanar semelhante (9,1 nm) para esse domínio à temperatura de 60 °C. Atribui-se essa redução na espessura da bicamada lipídica à fusão das moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀ existentes no sistema tornando a bicamada lipídica mais fluida. Esses resultados corroboram com as curvas de DSC das **FIGURAS 21 e 22**, nas quais pode-se observar o evento térmico relativo à fusão das moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀. Não foi possível atribuir razões de reflexão de Bragg para os picos com valor de $q \approx 3,56$ nm⁻¹ nos difratogramas da **FIGURA 23**.

3.1.4 DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀:PTX:NaCl

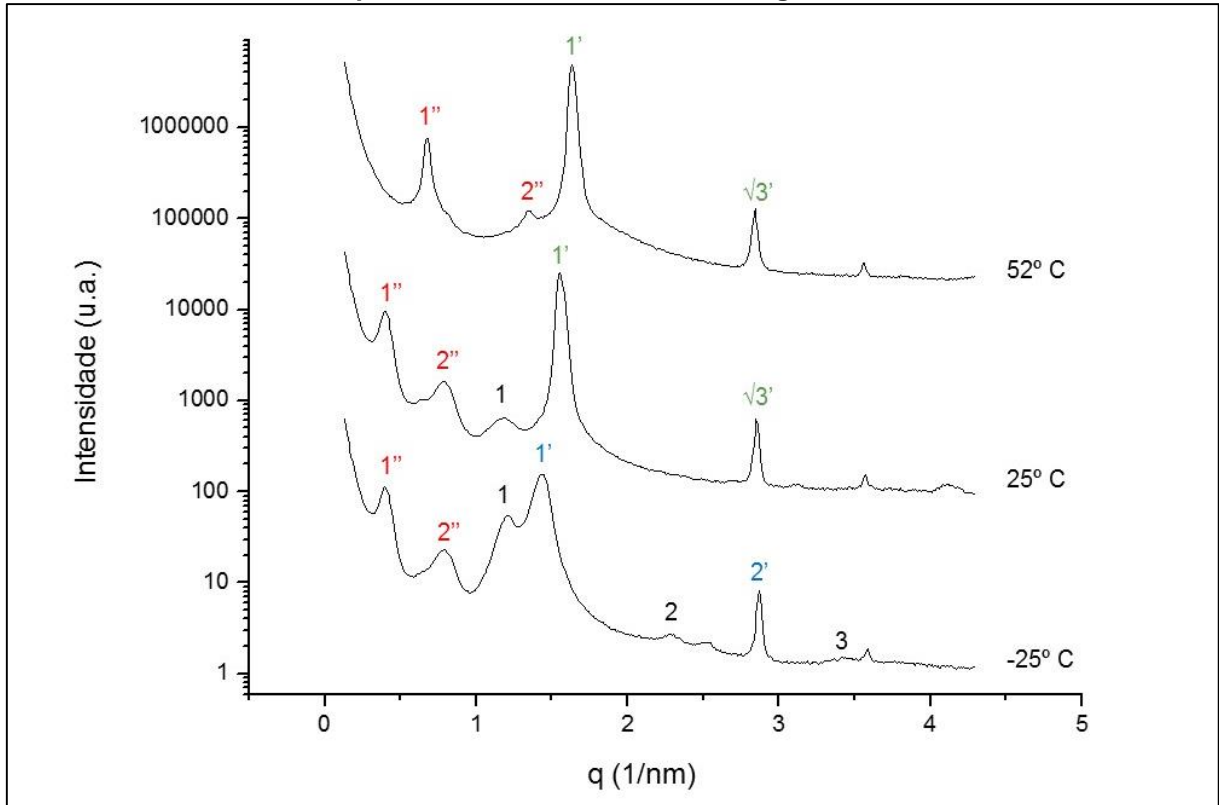
A curva de DSC da mistura DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀:PTX:NaCl apresenta três picos centrados nas temperaturas de -11 °C, 31 °C e 48 °C (**FIGURA 24**). Como relatado anteriormente, o pico endotérmico em -11 °C pode ser atribuído ao processo de fusão das moléculas de água presentes no sistema; o pico a 31 °C refere-se, provavelmente, ao processo de fusão das moléculas do CHEMS; e o pico endotérmico centrado em 48 °C resulta do processo de fusão das moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀.

FIGURA 24 - Curva de DSC da DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀:NaCl:PTX



Os difratogramas dessa amostra foram adquiridos nas temperaturas de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ e estão representados na **FIGURA 25**.

FIGURA 25 - Difratogramas da amostra DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀:NaCl:PTX. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho, azul e preto indicam moléculas de DOPE organizadas em fase lamelar. Os índices em verde correspondem a moléculas de DOPE organizadas em fase não lamelar



É possível visualizar a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ um sistema com três domínios lamelares. O primeiro domínio (representado pelos índices em vermelho) em organização lamelar apresentando valores de q iguais a $0,39$ e $0,79\text{ nm}^{-1}$, que correspondem a razões de reflexão de Bragg iguais a $1''$ e $2''$. A distância interplanar igual a $16,11\text{ nm}$ desta região sugere a ocorrência de um domínio enriquecido em moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀, uma vez que a presença do polímero ocasiona um aumento da espessura da bicamada lipídica, como relatado anteriormente. O segundo domínio apresenta razões de reflexão de Bragg iguais a 1 , 2 e 3 (representado em preto) com valores de q da sequência de picos igual a $1,20$; $2,28$ e $3,59\text{ nm}^{-1}$ e distância interplanar de $5,24\text{ nm}$. O terceiro domínio lamelar presente apresenta picos com valores de q iguais a $1,44$ e $2,87\text{ nm}^{-1}$ (razões de reflexão de Bragg iguais a $1'$ e $2'$) e d igual a $4,36\text{ nm}$. Sugere-se, pelo valor do espaçamento de rede apresentado, que as duas regiões anteriores são representativas de domínios com menor concentração de moléculas

de DSPE-PEG₂₀₀₀. Como mencionado anteriormente, a coexistência de três domínios lamelares nessa temperatura pode ser explicada por uma distribuição heterogênea das moléculas de DOPE e DSPE-PEG₂₀₀₀ ao longo da amostra.

Na temperatura de 25 °C foi possível detectar a presença de dois domínios. O primeiro domínio, em organização lamelar com maior número de moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀ (representado em vermelho) com valores de q iguais a 0,39 e 0,79 nm⁻¹ e d igual a 16,11 nm, indicativos de razões de reflexão de Bragg iguais a 1^o e 2^o. O segundo domínio (representado pelo índice com cor preta) apresenta um pico com valor de q igual a 1,19 nm⁻¹ e distância interplanar igual a 5,28 nm. Não foi possível atribuir razões de reflexão de Bragg detectadas para essa região. Além disso, pode-se verificar a ocorrência de um domínio em organização não lamelar (representado pelos índices na cor verde). Os picos observados apresentam valores de q iguais a 1,57 e 2,85 nm⁻¹, que correspondem a razões de reflexão de Bragg iguais a 1 e $\sqrt{3}$, e distância interplanar de 4,00 nm. De acordo com esses resultados, é possível sugerir a ocorrência de uma transição da fase lamelar das moléculas de DOPE para uma organização não lamelar, quando comparada a temperatura de -25 °C.

A análise do difratograma obtido a 52 °C demonstrou novamente o padrão de picos característicos de regiões de bicamadas enriquecidas com moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀. Contudo, observa-se o deslocamento dos picos para um valor de q maior, 0,68 e 1,35 nm⁻¹, e conseqüentemente, uma redução da espessura da bicamada para 9,24 nm, o que pode ser explicado pela ocorrência da fusão das moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀ presentes nesse domínio. Observa-se ainda o desaparecimento do sinal relativo ao pico de primeira de ordem ($q=1,19$) anteriormente presente na temperatura de 25°C (representado em preto), o que indica a ocorrência de uma alteração na organização das moléculas da DOPE nesse domínio. Além disso, pode-se verificar, novamente, a ocorrência de um domínio em organização não lamelar (representado pelos índices na cor verde). Os picos observados apresentam valores de q iguais a 1,60 e 2,84 nm⁻¹ e distância interplanar de 3,93 nm, correspondentes a razões de reflexão de Bragg iguais a 1 e $\sqrt{3}$ nm. Não foi possível atribuir razões de reflexão de Bragg para os picos com valor de $q \approx 3,56$ nm⁻¹ nos difratogramas da **FIGURA 25**.

Comparando-se os difratogramas das amostras com PTX (**FIGURA 25**) e em ausência desse (**FIGURA 23**), observa-se que a inserção do fármaco não provocou alterações significativas nos padrões de espalhamento da amostra. Assim, é possível inferir que não ocorreram alterações marcantes na organização supramolecular do lípide estrutural com a introdução das moléculas do PTX no sistema. Contudo, houve alteração na posição dos picos nos difratogramas apresentados para amostras na presença PTX levando a redução na espessura da bicamada lipídica com a introdução do fármaco no sistema. Resultados semelhantes foram apresentados por Cavalcanti e colaboradores (2007), nos quais lipossomas brancos compostos por DOPC apresentaram distâncias interplanares maiores que lipossomas de DOPC contendo PTX. Nesse estudo, os autores sugerem que, a interação do PTX com a bicamada abrange toda a membrana lipídica, afetando o empacotamento da cadeia hidrocarbônica, resultando em mudanças na espessura da bicamada. Considerando as características lipofílicas do PTX, possivelmente ocorre interação entre suas estruturas hidrofóbicas e as cadeias hidrocarbônicas dos lípidos. Sabe-se que estas interações são muito importantes para determinar o comportamento dos lípidos na bicamada, uma vez que a organização lamelar é sensível a mudanças nas condições físico-químicas do sistema como hidratação, pH e temperatura. Desta forma, para este sistema são necessários estudos posteriores para elucidar a interação entre o PTX e a bicamada lipídica em condições que se assemelham à formulação em seu estado hidratado e ao meio biológico, pois conhecer as interações existentes entre o fármaco e a bicamada lipídica são pré-requisitos para elucidar a entrega sítio-específica e a atividade das formulações lipossomais (SEDDON, 1990; CAVALCANTI et al., 2007).

Contudo, observa-se que a introdução do fármaco no sistema não trouxe prejuízos a ocorrência da transição de uma fase lamelar para uma fase não lamelar da DOPE. A tendência das membranas lipídicas em formar fases não lamelares está diretamente envolvida nos processos de desestabilização dos sistemas lipossomais no interior do endossoma. Sabe-se que em meio aquoso, a DOPE não é capaz de formar espontaneamente uma bicamada, uma vez que seu formato cônico favorece sua organização em fase hexagonal invertida (H_{II}). Para o preparo dos lipossomas pH-sensíveis a partir deste lípide, deve-se adicionar ao sistema o CHEMS, que gera uma repulsão eletrostática entre os seus grupos carboxilato negativamente carregados e

os grupos fosfato dos fosfolípidos permitindo a formação da bicamada em pH fisiológico. Em ambiente ácido, como no interior dos endossomas, o CHEMS é protonado, levando a desestabilização do sistema e liberação do material encapsulado no citoplasma da célula tumoral (FERREIRA et al., 2013).

3.2 Caracterização físico-química e estrutural das formulações lipossomais hidratadas

No interior dos endossomas, os LpHS-PTX estarão em contato com um elevado número de moléculas de água. Desta forma, a análise do sistema em condições de maior hidratação torna-se importante para avaliar o comportamento da formulação em condições que se assemelham ao meio biológico. Assim, foram realizados estudos no intuito de verificar o comportamento dessa amostra em situações com maior grau de hidratação. Nesse contexto, os parâmetros físico-químicos da amostra como diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de encapsulação foram analisados. Além disso, foram avaliadas a influência do pH, dos constituintes do meio de cultura e da temperatura sobre a organização supramolecular dos LpHS-PTX.

3.2.1 Determinação do diâmetro e índice de polidispersão

Determinar o diâmetro médio e a distribuição das vesículas de um sistema lipossomal é essencial, uma vez que esses parâmetros estão ligados à estabilidade e ao acúmulo do sistema nos tecidos tumorais.

Os resultados de diâmetro e índice de polidispersão de LpHS e LpHS-PTX estão apresentados na **TABELA 7**. LpHS apresentaram um diâmetro médio igual a 131 nm. Pode-se observar que a inclusão do PTX na bicamada lipídica ocasionou um aumento significativo ($p < 0,05$) no diâmetro médio das partículas. No entanto, ambas as formulações apresentam-se monodispersas com um índice de polidispersão próximo de 0,2. Uma análise mais detalhada da distribuição de tamanho demonstrou claramente a influência da adição do PTX no aumento do diâmetro das partículas nas três faixas avaliadas. Pode-se um aumento de aproximadamente 2,4 vezes na mediana após a adição de PTX. Em relação ao percentil 90%, os resultados mostraram um aumento de 2,6 vezes variando de 170 a 450 nm, na ausência e

presença de PTX, respectivamente. Resultados similares foram descritos anteriormente por Barbosa (2014).

TABELA 7 - Caracterização do diâmetro médio, índice de polidispersão e distribuição acumulada do tamanho das partículas expressa em termos de volume para as formulações LpHS e LpHS-PTX

Formulação	Diâmetro (nm)	IP	Distribuição Acumulada (nm)		
			D10	D50	D90
LpHS	134,6	0,241	28	64	136
	127,8	0,250	36	68	204
	132,2	0,260	40	72	172
Média ± DP	131,53 ± 3,45	0,25 ± 0,01	-	-	-
LpHS-PTX	192,1	0,202	111	154	496
	188,5	0,227	96	175	397
	185,4	0,216	97	169	455
Média ± DP	188,67 ± 3,35	0,22 ± 0,01	-	-	-

A via parenteral é a via de escolha para a administração da maioria dos agentes antineoplásicos utilizados no tratamento de tumores. A Farmacopeia Americana determina um diâmetro médio vesicular menor ou igual a 500 nm para garantia de estabilidade de uma formulação lipídica injetável. Além disso, a concentração percentual (p/v) de vesículas maiores que 5 µm deve ser menor que 0,05% do total da fase dispersa, para prevenir a ocorrência de embolia pulmonar e a oclusão da microvasculatura, uma vez que os capilares sanguíneos possuem diâmetro interno com cerca de 5 µm (DRISCOLL, 2006; HIPPALGAONKAR et al., 2010).

O tamanho reduzido das partículas (≤ 500 nm) está relacionado também ao efeito EPR anteriormente relatado. Sabe-se que a vasculatura da região tumoral apresenta poros com diâmetro entre 200 e 800 nm, permitindo o extravasamento de macromoléculas e o acúmulo de nanoestruturas com diâmetro inferior a 500 nm. Portanto, lipossomas com tamanho reduzido possuem maior capacidade de ocasionar um aumento da concentração do fármaco no tecido neoplásico e, conseqüentemente, reduzir os efeitos adversos (MAEDA et al., 2000; MENG et al., 2010; SAWANT e TORCHILIN, 2012; FERREIRA et al, 2013).

Assim, considerando as exigências preconizadas pelos órgãos regulatórios para garantir a segurança e a eficiência terapêutica bem como as características inerentes ao tecido tumoral, o ideal é que as preparações lipossomais empregadas no tratamento do câncer apresentem diâmetro de vesículas inferior a 500 nm (TORCHILIN, 2005).

Por outro lado, a obtenção de lipossomas com tamanho reduzido e com distribuição homogênea das vesículas é importante para garantir a estabilidade da forma farmacêutica. A alteração do tamanho das partículas e a distribuição das partículas, devido a ocorrência do fenômeno de agregação e a fusão das vesículas, são os aspectos mais importantes relacionados a instabilidade de um sistema lipossomal (ULRICH, 2002). Geralmente, o aumento do diâmetro médio das partículas ocasiona uma maior captação dessas pelas células do SMF após a administração sistêmica da formulação, promovendo uma eliminação mais rápida dos lipossomas (VEMURI e RODES, 1995; YANG et al., 2007).

3.2.2 Determinação do potencial zeta

Processos de agregação e fusão das vesículas são a principal fonte de redução da estabilidade física das formulações lipossomais. Agregação de lipossomas neutros é um fenômeno natural e inevitável. Assim, a determinação do potencial zeta nas amostras permite avaliar a estabilidade físico-química e o processo de distribuição das vesículas na circulação sanguínea, uma vez que os agregados tendem a sofrer um *clearance* mais rápido mediante ação do SMF (ULRICH, 2002). Os valores de potencial zeta obtidos para os LpHS e LpHS-PTX podem ser visualizados na **TABELA 8**.

TABELA 8 - Caracterização do potencial zeta das vesículas dos LpHS e LpHS-PTX

Formulação	LpHS	LpHS-PTX
ζ (mV)	+2,1	-1,8
	+5,1	+2,3
	+5,6	+3,7
Média \pm DP	+4,3 \pm 1,9	+1,4 \pm 2,9

Valores de potencial zeta próximo da neutralidade em formulações contendo DSPE-PEG₂₀₀₀ em sua composição lipídica, já foram anteriormente relatados (LEITE et al., 2012; LOPES et al., 2013). Estes resultados podem ser atribuídos a presença das cadeias de PEG nos fosfolípidos formadores da bicamada lipídica que podem reduzir a mobilidade eletroforética dos lipossomas (WOODLE et al., 1992).

A forma mais simples de contornar processos de agregação e fusão das vesículas é o uso de lípidos carregados na formulação, gerando uma estabilidade eletrostática por repulsão das partículas (ULRICH, 2002). Sabe-se que sistemas com potencial zeta superior a +30 mV e abaixo de -30 mV contribuem para uma maior estabilidade da formulação, uma vez que há menor tendência de agregação das partículas devido à ocorrência de forças elétricas de repulsão (MORA-HUERTAS et al., 2010). Embora os resultados de potencial zeta dos LpHS e LpHS-PTX apresentem valores próximos da neutralidade, a presença do PEG na superfície lipossomal caracteriza a formação de uma barreira estérica que desfavorece aproximação das vesículas e os fenômenos de agregação das partículas, conferindo maior estabilidade ao sistema (WOODLE et al., 1992; DOS SANTOS et al., 2007; LOPES et al., 2013). Além disso, a carga próxima da neutralidade apresentada pelos lipossomas, em virtude dos volumosos grupos hidrofílicos na superfície das vesículas, reduz a ligação desses às proteínas plasmáticas, prevenindo a sua captação pelas células SMF e conferindo maior tempo de circulação ao sistema (FERREIRA et al., 2013; WOLFRAM et al., 2014).

3.2.3 Determinação do teor de encapsulação do PTX nos LpHS

O teor e a eficiência de encapsulação de uma substância em sistemas lipossomais podem ser otimizados mediante escolha do método de preparo da formulação. A obtenção de altas taxas de encapsulação é importante, particularmente, quando o uso do fármaco está relacionado a necessidade de administração de doses elevadas e na redução da quantidade de lípidos administrada ao paciente, minimizando, assim, possíveis efeitos colaterais associados aos mesmos (FRÉZARD et al., 2005).

Os dados de teor de encapsulação do PTX nos LpHS estão apresentados na **TABELA 9**. A formulação apresentou um teor de encapsulação próximo de 87%. Estudos prévios mostraram taxas igualmente elevadas para lipossomas com composição

lipídica diversa contendo PTX (ZHANG et al, 2005; KOUDELKA et al, 2009; MENG et al, 2010).

TABELA 9 - Determinação do teor de encapsulação do PTX em LpHS

Formulação	LpHS-PTX
	86,88
TE(%)	87,26
	86,10
Média ± DP	86,75 ± 0,59

De acordo com Frézard e colaboradores (2005) taxas de encapsulação próximas de 100% podem ser obtidas para substâncias lipofílicas uma vez que estas permanecem incorporadas a bicamada lipídica lipossomal. Contudo, esses valores podem variar de acordo com a composição lipídica e o método de preparo escolhido para a formulação. Sugere-se assim que a elevada lipofilicidade do PTX possibilita uma forte interação entre o fármaco e os fosfolípides presentes na bicamada lipídica ocasionando uma alta taxa de incorporação do PTX no sistema.

3.3 Estudo do efeito do pH do meio sobre a organização supramolecular dos LpHS-PTX

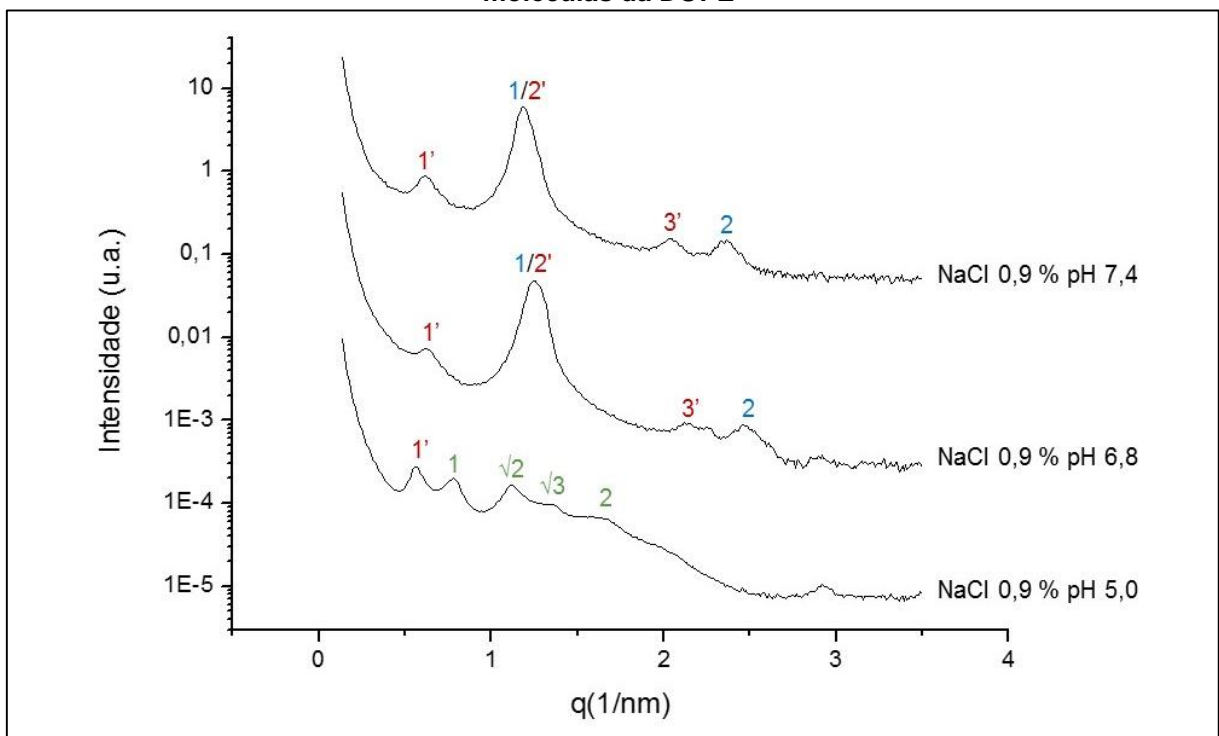
Com objetivo de avaliar o efeito do pH no comportamento de fase das moléculas de DOPE, conduziu-se a análise de SAXS, na temperatura de 25 °C, dos LpHS e LpHS-PTX preparados em NaCl 0,9% (p/v) nos valores de pH 7,4; 6,8 e 5,0. A condição mais ácida das amostras, pH 5,0, visou avaliar a organização estrutural do sistema frente ao pH tardio dos endossomas, anteriormente descrito (FERREIRA et al, 2013). A escolha do pH 6,8 foi baseada em estudos prévios de avaliação da pH-sensibilidade para LpHS-PTX realizados por Barbosa (2014), os quais demonstraram início de liberação do fármaco a partir dos lipossomas nesse pH. Além disso, dados da literatura mostram que o pH extracelular da região tumoral situa-se próximo de 6,5 (STUBBS et al., 1999; FERREIRA et al., 2013; GOUBRAN et al., 2014), portanto, avaliar a ocorrência de modificação estrutural desse sistema em pH ligeiramente ácido torna-se interessante para elucidar seu comportamento no espaço extracelular.

Os difratogramas obtidos por Lopes (2014) para lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada, compostos por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG, preparados em tampão PBS e analisados na temperatura de 25 °C evidenciaram a ocorrência de transição de fases nesse sistema. Observou-se em pH 7,4 a presença de um pico localizado em q igual a $1,45 \text{ nm}^{-1}$ e distância interplanar igual a 4,33 nm. Valores semelhantes foram relatados por De Oliveira e colaboradores (2000) em lipossomas constituídos por DOPE:Chol:AO e por Silva e colaboradores (2011) e em formulações lipossomais constituídas por DOPE:CHEMS. Nesse estudo, a redução do pH para 5,0, ocasionou a transição de fase das moléculas da DOPE para uma organização cúbica, indicando a desestabilização da bicamada lipossomal. A ocorrência de transição de uma fase lamelar para uma fase não lamelar do lípide estrutural DOPE em pH reduzido foi demonstrada anteriormente para lipossomas com composição DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀ (LOPES, 2014); DOPE:CHEMS (SILVA et al., 2011) e DOPE:Chol:AO (DE OLIVEIRA et al., 2000). O processo de desestabilização dos lipossomas pH-sensíveis no compartimento endossomal está relacionado a ocorrência de protonação das moléculas de CHEMS presentes no sistema em virtude do pH ácido, permitindo a observação das moléculas do lípide estrutural, DOPE, em organização não lamelar e liberação do material encapsulado (FERREIRA et al, 2013).

O efeito da presença do PTX nos LpHS pode ser observado na **FIGURA 26**, onde estão apresentados os difratogramas dos LpHS-PTX preparados em NaCl 0,9% (p/v) nas diferentes condições de pH. No pH 7,4 foi possível constatar a existência de dois domínios. O primeiro, considerando a sequência de picos com valor de q iguais a 0,63; 1,18 e $2,00 \text{ nm}^{-1}$, para o qual foram identificadas razões de reflexão de Bragg próximas de 1', 2' e 3', indicando organização das moléculas de DOPE em uma fase lamelar. No segundo domínio, os picos presentes apresentam valores de q iguais a 1,18 e $2,36 \text{ nm}^{-1}$ (razões de reflexão de Bragg iguais a 1 e 2) que indicam, também, uma organização das moléculas da DOPE em fase lamelar. A espessura da bicamada lipídica obtida no primeiro e segundo domínio foi igual a 9,97 e 5,32 nm, respectivamente. Essa diferença de espessura sugere uma distribuição heterogênea das moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀ na bicamada lipídica. O maior valor de d resulta de regiões com maior concentração de moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀. Possivelmente, os picos relacionados a 1, na cor azul, está sobreposto ao 2', na cor vermelha, que possui menor intensidade.

No difratograma relativo à amostra preparada em pH 6,8 um padrão de espalhamento semelhante ao pH 7,4 foi observado. Entretanto, ocorreu um deslocamento nas sequências de picos dos dois domínios presentes para valores de q maiores. O primeiro domínio apresentou valores de q iguais a 0,62; 1,25 e 2,10 nm^{-1} , correspondentes a razões de reflexão de Bragg próximas a 1', 2' e 3', com espessura de bicamada igual a 10,13 nm. O segundo domínio apresenta valores de q iguais a 1,25 e 2,46 nm^{-1} , com periodicidade das reflexões de Bragg iguais a 1 e 2, indicando organização das moléculas de DOPE em fase lamelar. O valor encontrado para o espaçamento de rede foi igual a 5,03 nm.

FIGURA 26 - Difratogramas dos LpHS-PTX preparados em NaCl 0,9% (p/v) pH 7,4; 6,8 e 5,0 obtidos na temperatura de 25 °C. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho e azul são referentes à fase lamelar das moléculas da DOPE e o índice em verde correspondem à organização em fase cúbica das moléculas da DOPE



Em pH 5,0 observa-se um pico com valor de q igual a 0,56 nm^{-1} (representado pelo índice 1' em vermelho) para o qual não foi possível atribuir razões de reflexão de Bragg. A espessura da bicamada lipídica apresentada nesse domínio foi igual a 11,22 nm, sugere a ocorrência de uma região enriquecida em moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀. Estudos prévios de Angelov e colaboradores (2009) mostraram formação de estruturas não lamelares em vesículas constituídas por monooleato de glicerol

associado ao polímero PEG. Os autores definiram um espaçamento de rede apresentado pela região que continha o PEG igual a 11,39 nm, valor semelhante ao encontrado para domínios DSPE-PEG₂₀₀₀ da amostra LpHS-PTX em NaCl 0,9% (p/v) pH 5,0. Pode-se observar uma sequência de picos, para o segundo domínio, com valores de q iguais a 0,78; 1,11; 1,35 e 1,64 nm⁻¹, correspondentes a razões de reflexão de Bragg próximas de 1', $\sqrt{2}$ ', $\sqrt{3}$ ' e 2', com espessura de bicamada igual a 8,05, que sugerem a ocorrência de transição para uma fase cúbica no domínio com poucas moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀ presentes.

A comparação entre os difratogramas obtidos dos LpHS e LpHS-PTX em NaCl 0,9% (p/v) em pH 6,8 mostrou que na ausência do PTX o sistema já se encontrava em organização não lamelar. Desta forma, sugere-se que houve interação entre o PTX e a membrana lipossomal e que a presença do fármaco aumentou a estabilidade da bicamada lipídica frente a redução do pH. Contudo, a pH-sensibilidade dos LpHS-PTX não foi prejudicada, uma vez que em pH 5,0, as moléculas de DOPE presentes se encontram em organização não lamelar, sugerindo a desestabilização do sistema. Assim, a partir dos difratogramas analisados sugere-se que a inclusão do PTX na bicamada lipídica não prejudicou a pH-sensibilidade do sistema, uma vez que a transição de uma fase lamelar para não lamelar da DOPE pode ser observada (**FIGURA 26**). Esses resultados corroboram com estudos prévios obtidos por Barbosa (2014) nos quais a desestabilização dos LpHS-PTX preparados em NaCl 0,9% (p/v) em função do pH foi verificada. Nesse estudo, observou-se que à medida que o pH foi gradativamente diminuído, o PTX foi liberado das vesículas. Os resultados demonstraram que cerca de 30% do material encapsulado foi liberado em pH 6,8 e em pH 5,0 essa liberação foi próxima de 75% em comparação com o pH 7,4. Portanto, os dados obtidos por SAXS confirmam a hipótese de que em pH 5,0 a desestabilização da bicamada lipídica é completa levando a liberação de maior concentração do fármaco.

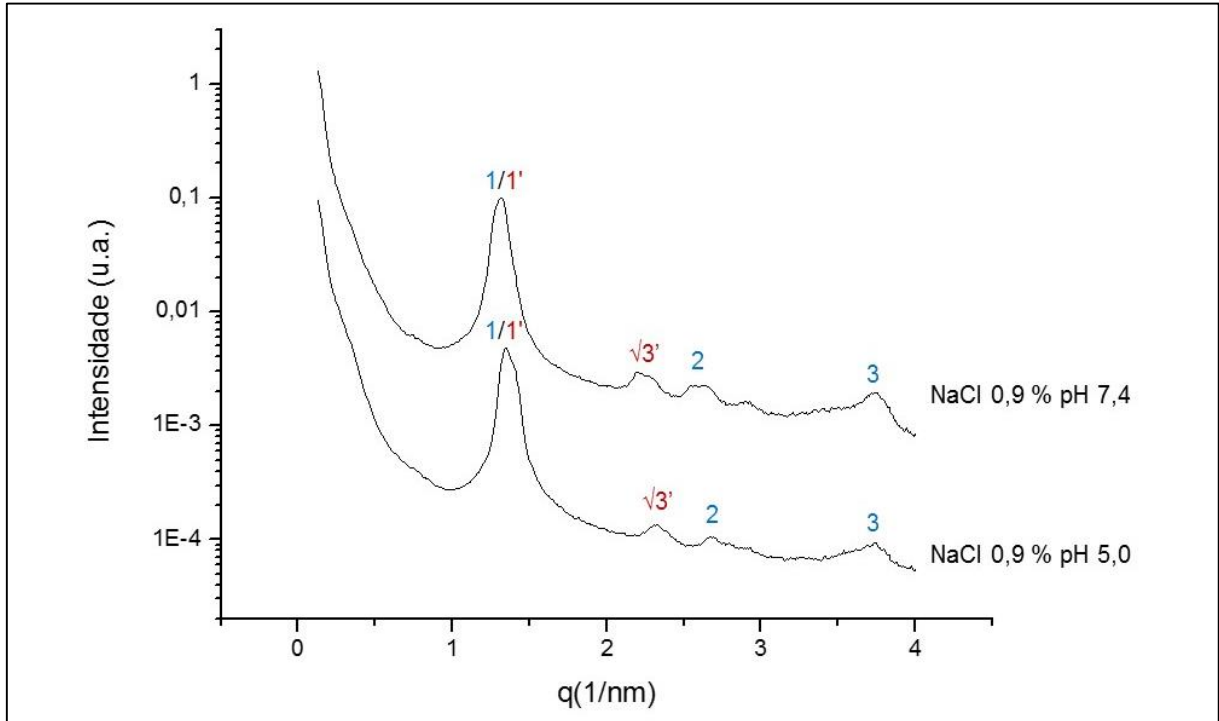
Barbosa (2014) desenvolveu outra formulação lipossomal pH-sensível composta por SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀ com razão molar igual a 2,0:4,5:3,0:0,5, respectivamente. Sabe-se que derivados da fosfatidilcolina apresentam baixa temperatura de transição de fases (T_m) proporcionando um aumento da fluidez da bicamada permitindo melhor acomodação do PTX e conseqüentemente aumento do

teor de encapsulação (KOUDELKA e TURÁNEK, 2012). Entretanto, o estudo de pH-sensibilidade demonstrou que a inclusão do SPC na bicamada lipídica provocou uma redução da liberação do material encapsulado frente a redução do pH. Em pH igual a 5,0, a liberação do PTX a partir dos LpHSPC-PTX foi próxima de 30%, valor significativamente menor do que o apresentado pela formulação LpHS-PTX (75%) no mesmo pH.

Diante disso, essa formulação composta por SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀ (2,0:4,5:3,0:0,5) com concentração lipídica igual a 10mM contendo 0,5 mg/mL de PTX foi utilizada no presente estudo como controle da pH-sensibilidade. As propriedades físico-químicas apresentadas por esse sistema foram semelhantes às obtidas para LpHS-PTX. O diâmetro médio foi igual a 187 ± 6 nm, índice de polidispersão de 0,3 e 90% das partículas apresentaram diâmetro inferior a 420 nm. Os valores de potencial zeta e teor de encapsulação foram iguais a $+ 3,5 \pm 1,2$ mV e $96 \pm 1\%$, respectivamente. As amostras de lipossomas SPC:DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀ foram preparadas em NaCl 0,9% (p/v), em pH 7,4 e 5,0 e analisadas pela técnica de SAXS na temperatura de 25°C.

Os difratogramas obtidos para os LpHSPC-PTX estão apresentados na **FIGURA 27**. Em pH 7,4 é possível visualizar a ocorrência de um primeiro domínio com sequência de picos com valores de q iguais a 1,32 e $2,19 \text{ nm}^{-1}$, indicativos de razões de reflexão de Bragg próximas a $1'$ e $\sqrt{3}'$, que correspondem a organização não lamelar do domínio, com espaçamento de rede igual a 4,76 nm. Uma segunda sequência de picos com valores de q iguais a 1,32; 2,64 e $3,76 \text{ nm}^{-1}$, com periodicidade de reflexão de Bragg próximas de 1, 2 e 3 e distância interplanar igual a 4,76 nm também pode ser visualizada, sugerindo uma organização das moléculas da DOPE em fase lamelar. Espessuras semelhantes das bicamadas ocorrem devido a sobreposição dos picos 1 e $1'$. Com a redução do pH para 5,0 observou-se um padrão de espalhamento semelhante ao obtido em pH 7,4.

FIGURA 27 - Difratomogramas dos LpHSPC-PTX preparados em NaCl 0,9% (p/v) pH 7,4 e 5,0 obtidos na temperatura de 25 °C. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em azul são referentes a organização lamelar das moléculas de DOPE. Os índices em vermelho correspondem à organização não lamelar das moléculas de DOPE



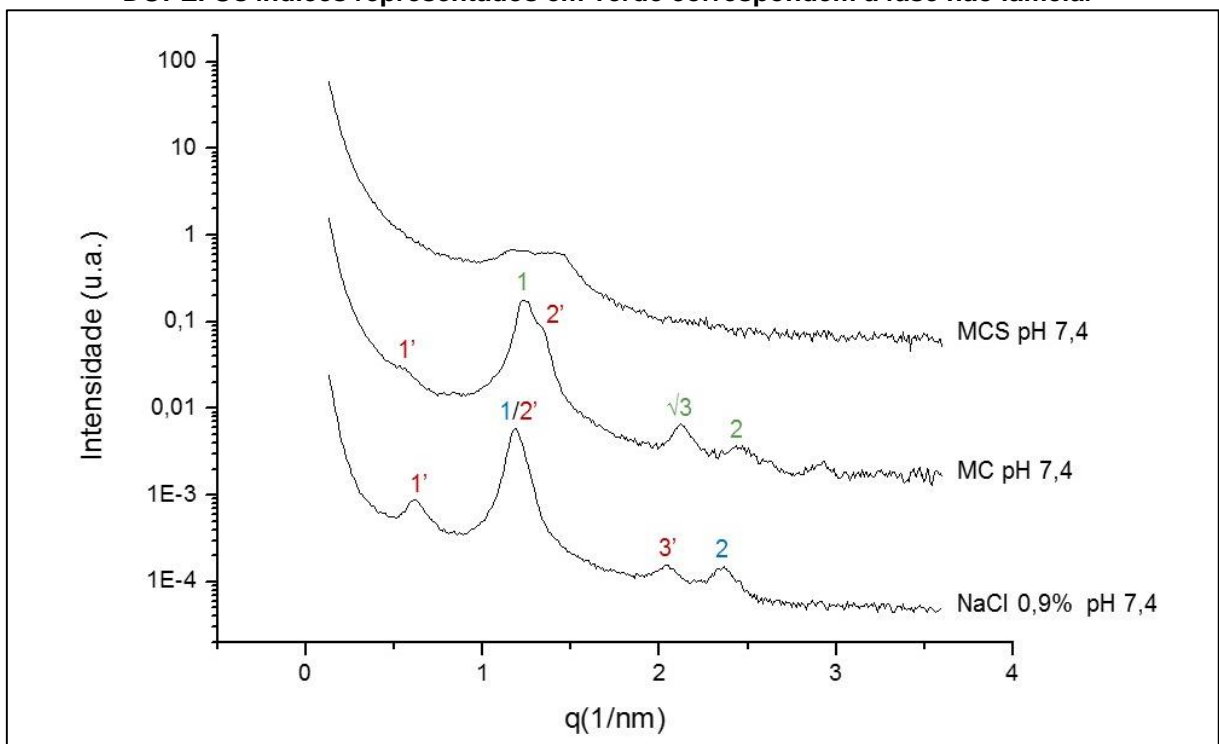
Esses resultados demonstraram que as modificações estruturais das moléculas da DOPE não foram tão evidentes quanto o efeito apresentado pelos LpHS-PTX nas mesmas condições de pH. Para os lipossomas contendo SPC em sua composição não foram visualizadas alterações significativas no padrão de espalhamento em pH 5,0 sugestivas de transição de fases, processo diretamente ligado a desestabilização do sistema e liberação do material encapsulado. Observando-se o difratograma apresentado na **FIGURA 26**, relacionada aos lipossomas preparados na ausência do lípido SPC, em pH 5,0 observa-se a presença de moléculas de DOPE em fase cúbica definida, indicando que a desestabilização da bicamada lipídica em decorrência da redução do pH. Resultados prévios de Ishida e colaboradores (2006) mostraram que uma formulação com composição lipídica HSPC:DOPE:CHEMS:CHOL (3:3:2:2) apresentou menor liberação de doxorrubicina encapsulada em condições ácidas, quando comparada a formulação DOPE:CHEMS:CHOL (6:2:2), sugerindo que o aumento da razão molar da DOPE nas formulações ocasionou uma melhora na reposta pH-sensível dos lipossomas.

Assim, esses resultados confirmam os estudos realizados por Barbosa (2014) em que a avaliação da pH sensibilidade dos dois sistemas demonstrou a ocorrência de uma bicamada lipídica mais estável em condições ácidas em lipossomas pH-sensíveis que possuem SPC em sua composição.

3.4 Estudo do efeito dos constituintes do meio de cultura sobre a organização supramolecular dos LpHS-PTX

Para avaliar o efeito dos constituintes do meio de cultura na estabilidade dos LpHS-PTX as amostras foram preparadas em NaCl 0,9% (p/v), MC e MCS. Os difratogramas foram obtidos na temperatura de 25 °C em pH 7,4 e estão apresentados na **FIGURA 28**.

FIGURA 28 - Difratogramas dos LpHS-PTX preparados em NaCl 0,9% (p/v), meio de cultura (MC) e meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (MCS) em pH 7,4 e temperatura de 25 °C. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em azul e vermelho são referentes à organização lamelar da DOPE. Os índices representados em verde correspondem à fase não lamelar



No difratograma obtido para os LpHS-PTX preparados em NaCl 0,9% (p/v), conforme discutido anteriormente, é possível observar a existência de dois domínios. O primeiro domínio apresenta valores de q próximos a 0,63; 1,18 e 2,00 nm⁻¹, correspondentes a

razões de reflexão de Bragg 1', 2' e 3', o que sugere uma organização das moléculas de DOPE em uma fase lamelar. O valor encontrado para a espessura da bicamada lipídica foi igual a 9,97 nm. Analisando o padrão de espalhamento do segundo domínio é possível observar uma sequência de picos com valor de q próximos a 1,18 e 2,36 nm^{-1} que correspondem a razões de reflexão de Bragg 1 e 2, sugerindo uma organização lamelar das moléculas de DOPE com valor de d igual a 5,32 nm.

A substituição de NaCl 0,9% (p/v) por MC parece promover uma desestruturação da bicamada lipídica, promovendo a coexistência de fases lamelares e não lamelares. Essa ocorrência indica uma distribuição heterogênea dos componentes da formulação na bicamada lipídica devido interação entre os constituintes do MC e os componentes da formulação. É possível perceber uma sequência de picos com valor de q próximos a 0,61 e 1,30 nm^{-1} e valor de d igual a 10,30 nm, para os quais foram atribuídas razões de reflexão de Bragg iguais a 1 e 2, que sugerem uma organização em fase lamelar das moléculas de DOPE do domínio, provavelmente, com maior número de moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀. O domínio com sequência de picos com valores de q iguais a 1,23; 2,13 e 2,47 nm^{-1} (representado pelos índices em verde) com periodicidade de reflexões de Bragg iguais a 1, $\sqrt{3}$ e 2, indicam a presença de moléculas de DOPE em organização não lamelar, provavelmente em fase hexagonal, com distância interplanar igual a 5,11 nm. Nos estudos de SAXS realizados por Lopes (2014) com lipossomas constituídos por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀ preparados em MC na ausência de fármaco, não foi possível determinar a organização das moléculas de DOPE visto que razões de reflexão de Bragg não foram definidas. Portanto, sugeriu-se a ocorrência de interação entre os lípidos da formulação e os constituintes do meio de cultura, o que conduziu à formação de estruturas menos ordenadas. Resultado semelhante foi observado por Silva e colaboradores (2011) para lipossomas constituídos por DOPE:CHEMS. No presente estudo, a detecção de periodicidade de reflexão de Bragg característica de organização das moléculas da DOPE em fase lamelar, sugere que a introdução do PTX na bicamada lipídica conduziu a formação de estruturas mais ordenadas no sistema, aumentando a estabilidade da formulação frente aos componentes do meio biológico.

Como é possível observar na **FIGURA 28**, o difratograma da amostra de LpHS-PTX preparada em MCS apresenta um pico largo e pouco intenso, com valor de $q \approx 1,30$

nm^{-1} e distância interplanar igual a 4,83 nm. Não foi possível a determinação de razões de reflexão de Bragg, e conseqüentemente, não conseguiu-se demonstrar a organização de fase das moléculas de DOPE. No entanto, essa modificação do padrão de espalhamento sugere a presença de interação entre o sistema e as proteínas séricas presente no SFB. Resultados semelhantes foram obtidos para lipossomas preparados em MCS constituídos de DOPE:CHEMS:DSPE-PEG₂₀₀₀ e DOPE:CHEMS (LOPES, 2014; SILVA et al., 2011). Diversos estudos sugerem a ocorrência de alterações na fluidez da membrana, redução da estabilidade e alteração na farmacocinética das vesículas devido a interação dessas com as proteínas séricas, levando a formação de estruturas menos ordenadas que comprometem a determinação da organização de fase das moléculas de DOPE. Esse processo de desestabilização lipossomal pode levar a perda do material encapsulado e redução da biodisponibilidade do fármaco nos sítios específicos, como o tecido tumoral (RICHARDS, et al., 1977; DIAKOWSKI, et al., 2005; DATTA et al., 2008; THAKUR et al., 2014).

3.5 Avaliação do comportamento de fase da DOPE na presença dos constituintes do meio de cultura frente à redução do pH

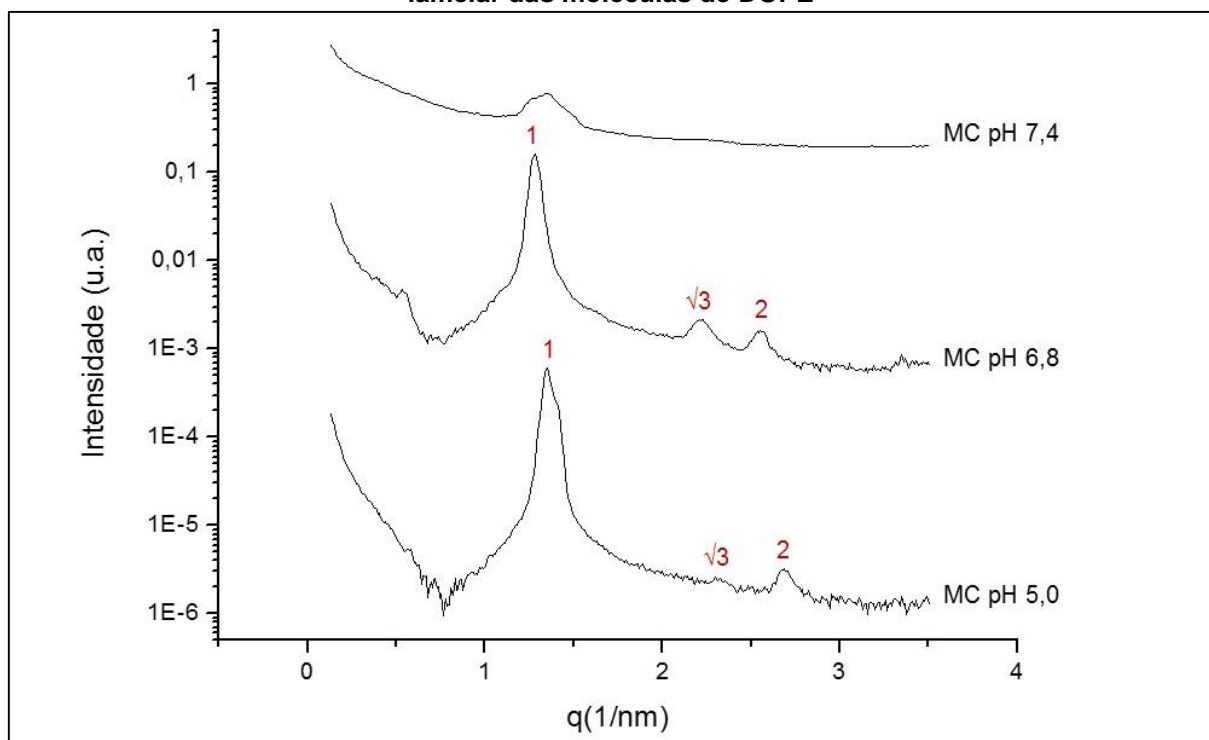
Nessa etapa do estudo as amostras de LpHS-PTX foram preparadas em meio de cultura RPMI 1640 em diferentes valores de pH: 7,4; 6,8 e 5,0. Os difratogramas foram adquiridos na temperatura de 25 °C. O objetivo desta investigação foi verificar o efeito dos constituintes do meio de cultura na resposta dos LpHS e LpHS-PTX frente à redução do pH.

Na **FIGURA 29** estão representados os difratogramas dos LpHS preparados em MC em pH 7,4; 6,8 e 5,0. No difratograma da amostra pH 7,4 foi possível observar um pico largo e com baixa intensidade, com valor de q igual a $1,35 \text{ nm}^{-1}$ e distância interplanar igual a 4,65 nm. Não conseguiu-se determinar o comportamento de fase das moléculas de DOPE, uma vez que não foi possível atribuir razões de reflexão de Bragg para esse sistema, sugerindo, assim, a existência de interação entre os constituintes do meio de cultura com os lípidos da formulação. Em pH 6,8 observou-se a presença de uma seqüência de picos com valores de q iguais a 1,28; 2,21 e $2,55 \text{ nm}^{-1}$ que caracterizam uma organização das moléculas de DOPE em fase hexagonal, com

razões de reflexão de Bragg iguais a 1, $\sqrt{3}$, 2 e d igual a 4,91 nm. No difratograma relativo ao pH 5,0 o padrão de espalhamento apresentou-se semelhante ao obtido em pH 6,8, indicando a presença de uma organização em fase hexagonal das moléculas da DOPE. Resultados semelhantes foram encontrados por Lopes (2014) e Silva e colaboradores (2011).

Assim, apesar da possível interação dos LpHS com os constituintes do meio de cultura, pôde ser observado que a pH sensibilidade do sistema não foi prejudicada, uma vez que em pH reduzido as moléculas de DOPE se encontram em uma organização hexagonal.

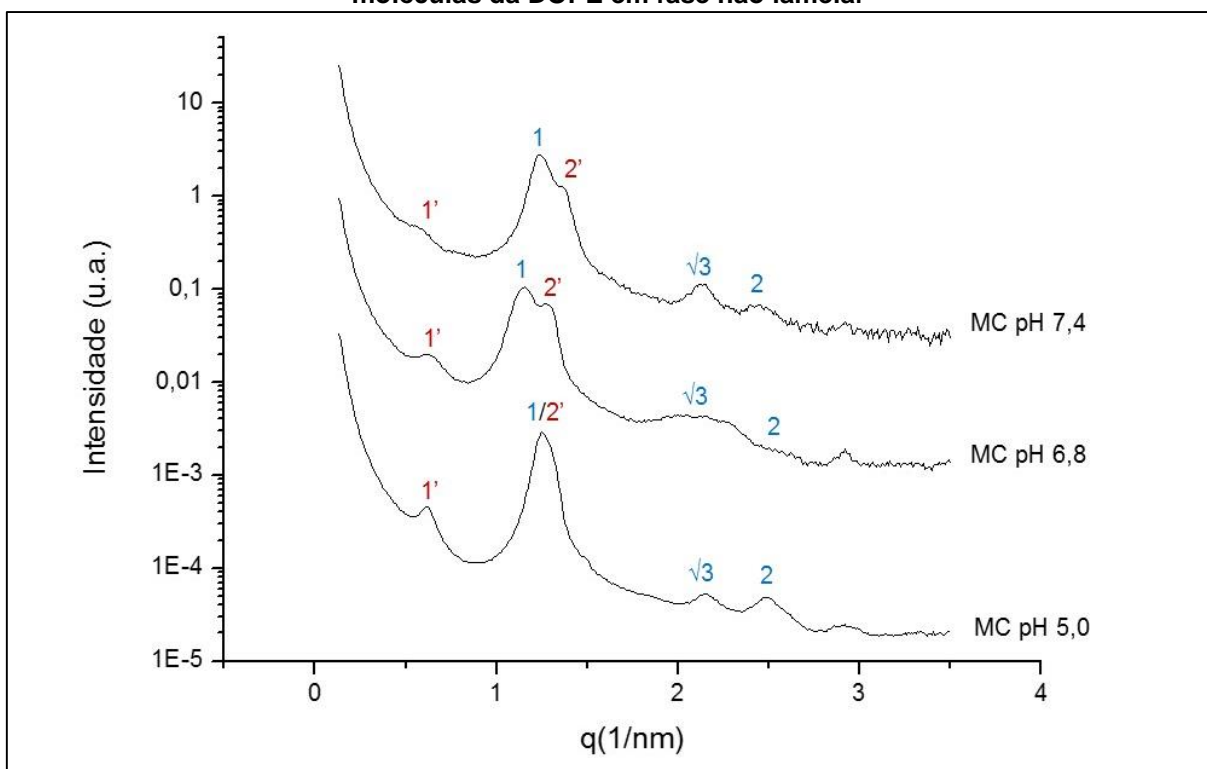
FIGURA 29 - Difratogramas dos LpHS preparados em meio de cultura (MC) pH 7,4; 6,8 e 5,0 obtidos na temperatura de 25 °C. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho são referentes à organização não lamelar das moléculas de DOPE



Na **FIGURA 30** estão representados os difratogramas dos LpHS-PTX preparados MC. Para as amostras preparadas em pH 7,4, como mencionado anteriormente, foi possível verificar uma coexistência de fases lamelares e não lamelares neste sistema. Pode-se detectar um domínio compreendendo os picos localizados em q igual a 0,61 e $1,30 \text{ nm}^{-1}$, correspondentes a razões de reflexão de Bragg $1'$ e $2'$, e distância interplanar de 10,30 nm, que sugerem uma organização em fase lamelar das

moléculas de DOPE. Um segundo domínio com picos com valores de q iguais 1,23; 2,13 e 2,47 nm^{-1} que correspondem a razões de reflexão de Bragg de 1, $\sqrt{3}$ e 2 e espaçamento de rede igual a 5,11 nm, caracterizando moléculas de DOPE em organização não lamelar (hexagonal). A diferença entre os valores de d obtido nos diferentes domínios pode estar relacionada à distribuição heterogênea dos componentes da formulação ao longo da bicamada lipídica, onde regiões com elevado valor de d representam locais com maior concentração de DSPE-PEG₂₀₀₀.

FIGURA 30 - Difratomogramas dos LpHS-PTX preparados em meio de cultura (MC) pH 7,4; 6,8 e 5,0 obtidos na temperatura de 25 °C. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho são referentes à organização das moléculas da DOPE em fase lamelar. Os índices em azul correspondem à organização das moléculas da DOPE em fase não lamelar



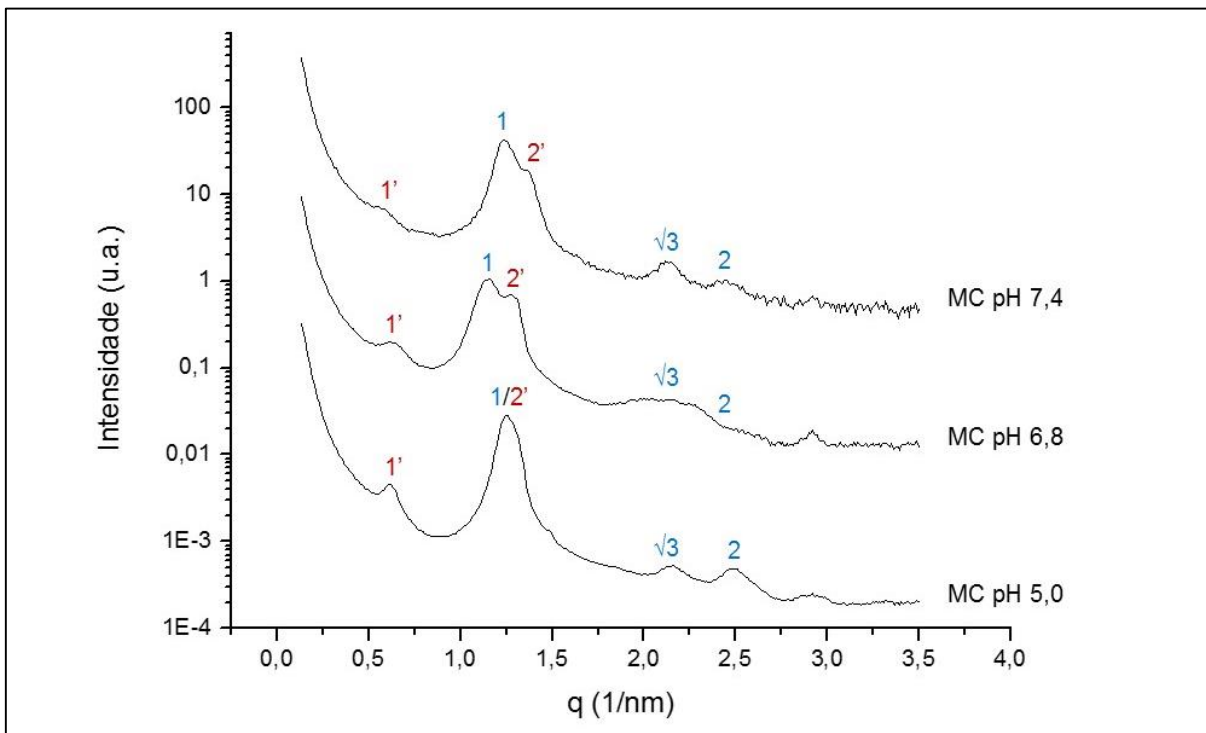
Em pH 6,8 e 5,0, as mesmas razões de reflexão de Bragg foram encontradas. Contudo foi possível observar mudanças no padrão de espalhamento da amostra em relação ao difratograma analisado anteriormente, sugerindo alteração do empacotamento das moléculas da DOPE.

Comparando-se o difratograma em MC em pH 6,8 e em pH 5,0 obtidos para os LpHS e LpHS-PTX foi possível visualizar que na ausência do fármaco todas as moléculas da DOPE já se encontravam em organização não lamelar, em ambos valores de pH

analisados. Assim, pode-se inferir que houve interação entre o PTX e a bicamada lipídica e, que a presença do fármaco aumentou a estabilidade da formulação frente a redução do pH. Contudo, observa-se que as moléculas de DOPE presente nos LpHS-PTX apresentam uma organização de fase não lamelar, mostrando desestabilização do sistema, relacionada a interação entre os constituintes do MC e os componentes lipossomais. Conforme anteriormente detalhado, em pH reduzido, ocorre protonação das moléculas de CHEMS e desestabilização da bicamada lipídica. Com a DOPE em organização não lamelar o conteúdo lipossomal é liberado no ambiente tumoral (FERREIRA et al., 2013). Portanto, a partir destes dados obtidos no meio avaliado conclui-se que a introdução do PTX na bicamada lipídica não aboliu completamente a pH- sensibilidade do sistema em estudo.

Com o intuito de avaliar o comportamento do sistema em uma condição mais próxima do meio biológico, as amostras de LpHS-PTX preparadas em MC pH 7,4; 6,8 e 5,0 foram submetidas ao aquecimento à temperatura equivalente à corporal, 37 °C (**FIGURA 31**). Os difratogramas obtidos apresentaram padrão de espalhamento semelhante aos apresentados na **FIGURA 30**, com as mesmas periodicidades de reflexão de Bragg, sugerindo que o aumento da temperatura não alterou o padrão de interação e a resposta ao pH dos lipossomas no meio avaliado.

FIGURA 31 - Difratomogramas dos LpHS-PTX preparados em meio de cultura (MC) pH 7,4; 6,8 e 5,0 obtidos na temperatura de 37 °C. Os índices representados acima dos picos correspondem aos padrões de reflexão de Bragg. Os índices em vermelho são referentes à organização das moléculas da DOPE em fase lamelar. Os índices em azul correspondem à organização das moléculas da DOPE em fase não lamelar



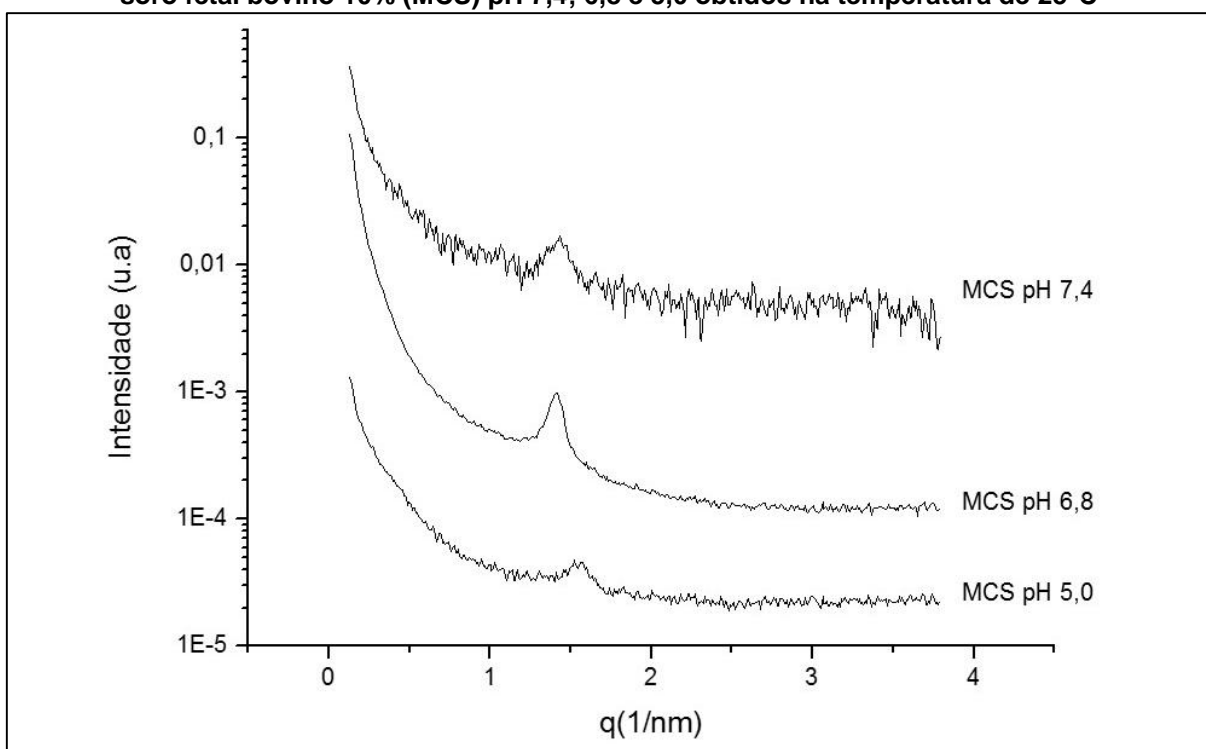
3.6 Avaliação do comportamento de fase da DOPE na presença dos constituintes do meio de cultura suplementado com SFB frente à redução do pH

Nas **FIGURAS 32 e 33**, estão apresentados os difratogramas das amostras de LpHS e LpHS-PTX resuspendidas em MCS e analisadas nas três diferentes condições de pH previamente reportadas (7,4; 6,8 e 5,0).

Inicialmente, foi investigado o efeito do pH sobre a organização supramolecular das moléculas de DOPE em LpHS. Nas três condições de pH analisadas foi possível detectar a presença de somente um pico em cada um dos difratogramas. Em pH 7,4 e pH 6,8 o valor de q encontrado foi próximo de $1,44 \text{ nm}^{-1}$. Em pH 5,0 pode-se observar um alargamento e deslocamento do pico principal para valor de q próximo de $1,52 \text{ nm}^{-1}$. Não foi possível atribuir razões de reflexão de Bragg para este sistema nas diferentes condições analisadas e, conseqüentemente, não foi possível determinar o comportamento de fase das moléculas de DOPE. Esses dados sugerem a existência de interação entre as proteínas provenientes do SFB com os lípidos da formulação,

levando a formação de estruturas menos ordenadas, quando comparadas as estruturas formadas em presença do meio de cultura e ausência de proteínas do SFB (**FIGURA 29**). Entretanto, os dados sugerem que, apesar da ocorrência da interação entre as proteínas do SFB e os lípides da formulação, a transição de fase associada às moléculas da DOPE presentes nos LpHS frente a redução do pH pode não ter sido totalmente abolida. Resultados similares foram obtidos por Lopes e colaboradores (2014).

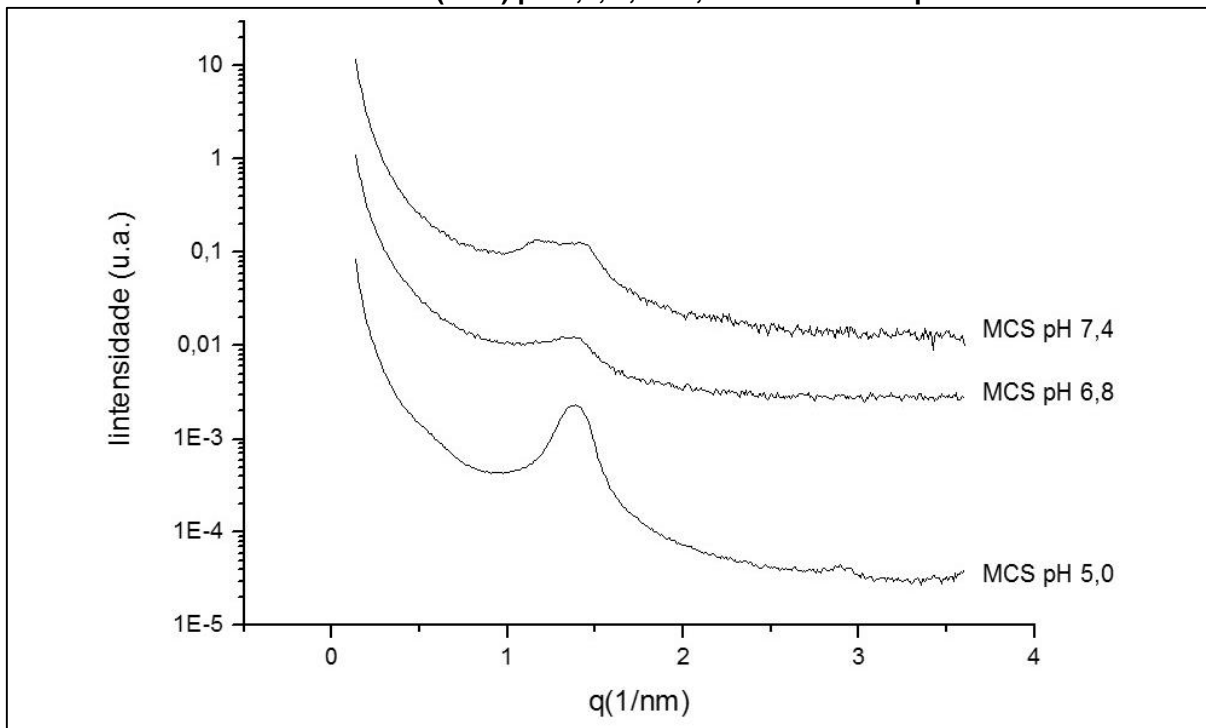
FIGURA 32 - Difratomogramas dos LpHS preparados em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10% (MCS) pH 7,4; 6,8 e 5,0 obtidos na temperatura de 25°C



O efeito da encapsulação do PTX em LpHS pode ser observado na **FIGURA 33**. Nas condições de pH estudadas, também não foi possível determinar o comportamento de fases das moléculas da DOPE presentes na amostra de LpHS-PTX, uma vez que não foram encontradas razões de reflexão de Bragg correspondentes aos picos presente em cada um dos três difratogramas. Em pH 7,4 sugere-se a presença de dois picos sobrepostos com valores de q iguais a 1,17 e 1,41 nm^{-1} , indicando a existência de dois domínios nesse sistema. Em pH 6,8 e 5,0, visualiza-se a ocorrência de apenas um pico com valores de q próximos de 1,34 e a 1,38 nm^{-1} , respectivamente. Desta forma, observa-se que a redução do pH novamente ocasionou uma alteração no padrão de espalhamento dos difratogramas, uma vez que a presença de dois domínios

observada em pH 7,4 não é mais observada em valores de pH mais baixos. Essa mudança de comportamento do sistema sugere uma alteração na organização estrutural da amostra, indicando que a adição do PTX ao sistema não aboliu a pH-sensibilidade da formulação.

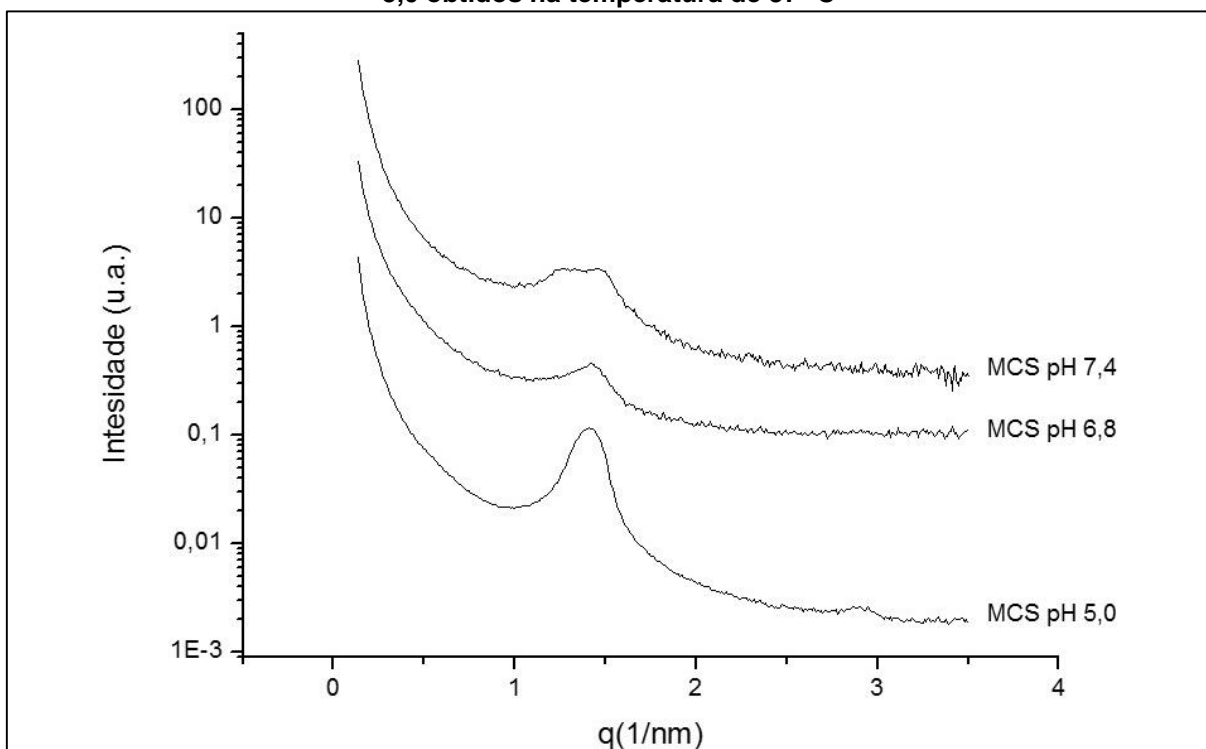
FIGURA 33 - Difratomogramas dos LpHS-PTX preparados em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10% (MCS) pH 7,4; 6,8 e 5,0 obtidos na temperatura de 25°C



Comparando-se os difratogramas das **FIGURAS 32** e **33**, observa-se que a incorporação do PTX na bicamada lipídica ocasionou uma modificação no padrão de espalhamento das moléculas de DOPE, sugerindo, novamente, a ocorrência de interação entre o PTX e os lípidos constituintes da bicamada lipídica.

Análises das amostras de LpHS-PTX preparadas em MCS no pH 7,4; 6,8 e 5,0 à temperatura equivalente à corporal, 37 °C (**FIGURA 34**), mostraram difratogramas com padrão de espalhamento semelhante aos apresentados na (**FIGURA 21**). Esses resultados sugerem que o aumento da temperatura não alterou o padrão de interação e a resposta ao pH dos lipossomas no meio avaliado.

FIGURA 34 - Difratoogramas dos LpHS-PTX preparados em meio de cultura (MC) pH 7,4; 6,8 e 5,0 obtidos na temperatura de 37 °C



3.7 Estudo do efeito da temperatura na estabilidade dos LpHS-PTX

A estabilidade físico-química dos nanosistemas é um requisito fundamental para garantir o acúmulo do fármaco na região tumoral, uma vez que alterações no tamanho, potencial zeta, organização lipídica da bicamada e teor de encapsulação podem acarretar mudanças importantes nas características farmacocinéticas do sistema. Assim, a avaliação da estabilidade do sistema assume caráter essencial no processo de desenvolvimento de nanocarreadores (TORCHILIN, 2005; LIU e YEO, 2014).

No estudo de estabilidade preliminar dessa formulação lipossomal, realizado por Barbosa (2014), aliou-se o diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de encapsulação dos LpHS-PTX. As amostras foram armazenadas na temperatura de 4 °C e caracterizadas nos períodos de tempo iguais a 0, 7, 15, 30, 60, 100 e 150 dias. Os resultados mostraram que a formulação permaneceu estável nos 100 primeiros dias de avaliação, uma vez que nenhuma alteração significativa, em relação ao tempo 0, nos parâmetros físico-químicos analisados foi observada.

A estabilidade das formulações está diretamente relacionada às características físico-químicas do produto farmacêutico acabado e da exposição desse a fatores ambientais diversos, como temperatura, umidade e luz. A Resolução nº1 de 29 de julho de 2005 publicada pela ANVISA dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade em formas farmacêuticas diversas. Os testes de estabilidade do produto farmacêutico têm como objetivo definir o prazo de validade e o período de utilização de um produto, desde que mantido em corretas condições de armazenamento (BRASIL, 2005). Dentre os diversos procedimentos descritos para avaliar a estabilidade de um produto farmacêutico, pode-se destacar o estudo de estabilidade acelerado. O teste consiste em submeter a amostra a condições forçadas provocando, assim, uma aceleração da degradação química e/ou mudanças físico-químicas dos componentes da formulação. Os dados obtidos nesse estudo associados a outros testes permitem avaliar o impacto da exposição do produto a condições diferentes da estabelecida para seu transporte e armazenamento (BRASIL, 2005).

Na **TABELA 10** estão apresentados os dados da temperatura recomendada para os testes de estabilidade de longa duração e acelerada para formas farmacêuticas líquidas armazenadas entre 15 °C e 30 °C e 2 °C e 8 °C. Dessa forma, conduziu-se um estudo por SAXS da formulação LpHS-PTX preparada em NaCl 0,9% (p/v) pH 7,4 nas mesmas temperaturas preconizadas para o estudo de estabilidade, com o intuito de avaliar a estabilidade do sistema frente a variação de temperatura.

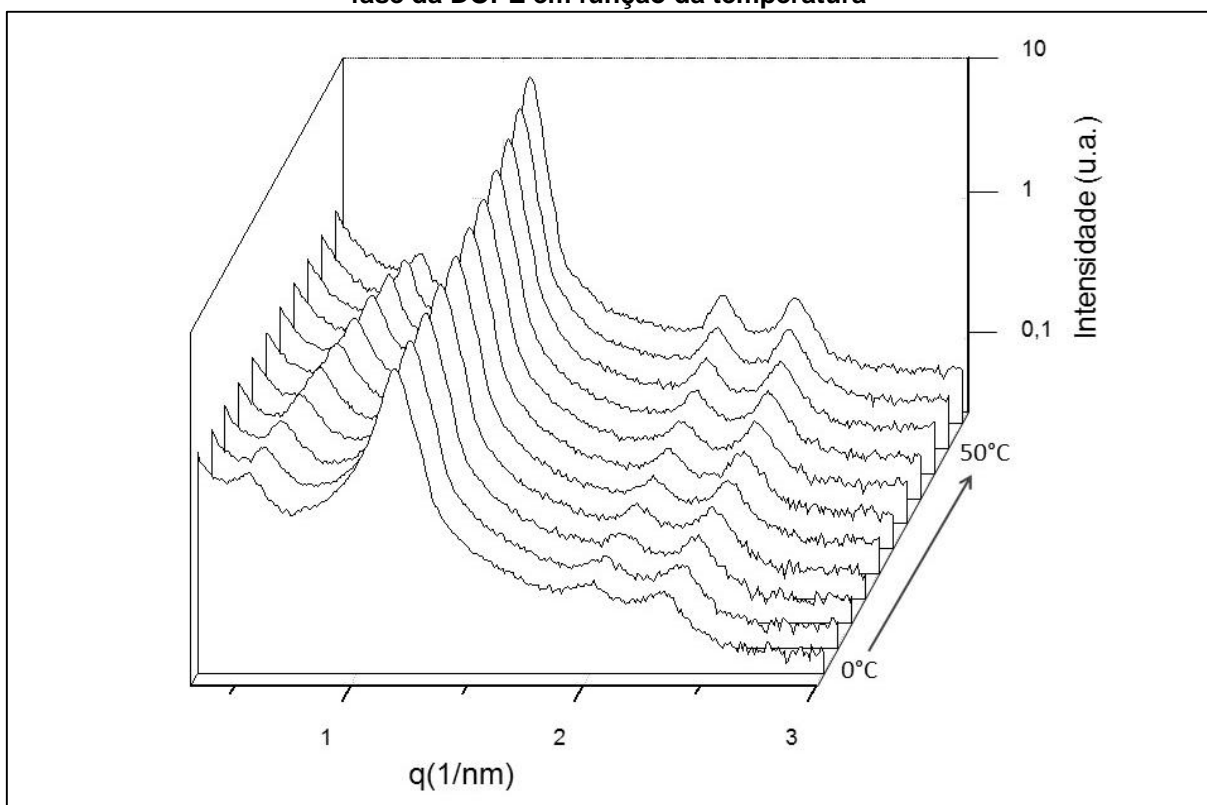
TABELA 10 - Temperaturas utilizadas no estudo de estabilidade acelerada dos LpHS-PTX em NaCl 0,9%(p/v)

Temperatura	Condições
5 °C	Temperatura preconizada para estudo de estabilidade de longa duração de formulações armazenadas entre 2°C e 8°C
15 °C	Temperatura mínima para o armazenamento de formas farmacêuticas líquidas
25 °C	Temperatura preconizada para estudo de estabilidade acelerada de formulações armazenadas entre 2°C e 8°C
30 °C	Temperatura máxima para o armazenamento de formas farmacêuticas líquidas e preconizada para estudo de estabilidade de longa duração
40 °C	Temperatura preconizada para estudo de estabilidade acelerada de formas farmacêuticas líquidas

*Dados extraídos da RE nº1 de 2005 da ANVISA.

Inicialmente realizou-se um estudo para analisar possíveis alterações nas transições de fases das moléculas da DOPE em função da temperatura. Os dados foram obtidos na faixa de temperatura de 0 °C a 50 °C mediante aquecimento do sistema com o uso de rampas de 5 °C/min. Na **FIGURA 35** observa-se o comportamento da DOPE nas bicamadas lipídicas dos LpHS-PTX no que diz respeito a transição de fases frente aumento da temperatura. Durante o processo de aquecimento do sistema não foram observadas transições de fases do lípide estrutural uma vez que diferenças significativas no padrão de espalhamento da amostra não foram detectadas, sugerindo que a bicamada lipídica permanece estável nas condições analisadas.

FIGURA 35 - Difratomogramas dos LpHS-PTX preparados em NaCl 0,9%(p/v) obtidos mediante taxa de aquecimento de 5 °C/min. Faixa de temperatura: 0 °C a 50 °C. Análise das transições de fase da DOPE em função da temperatura

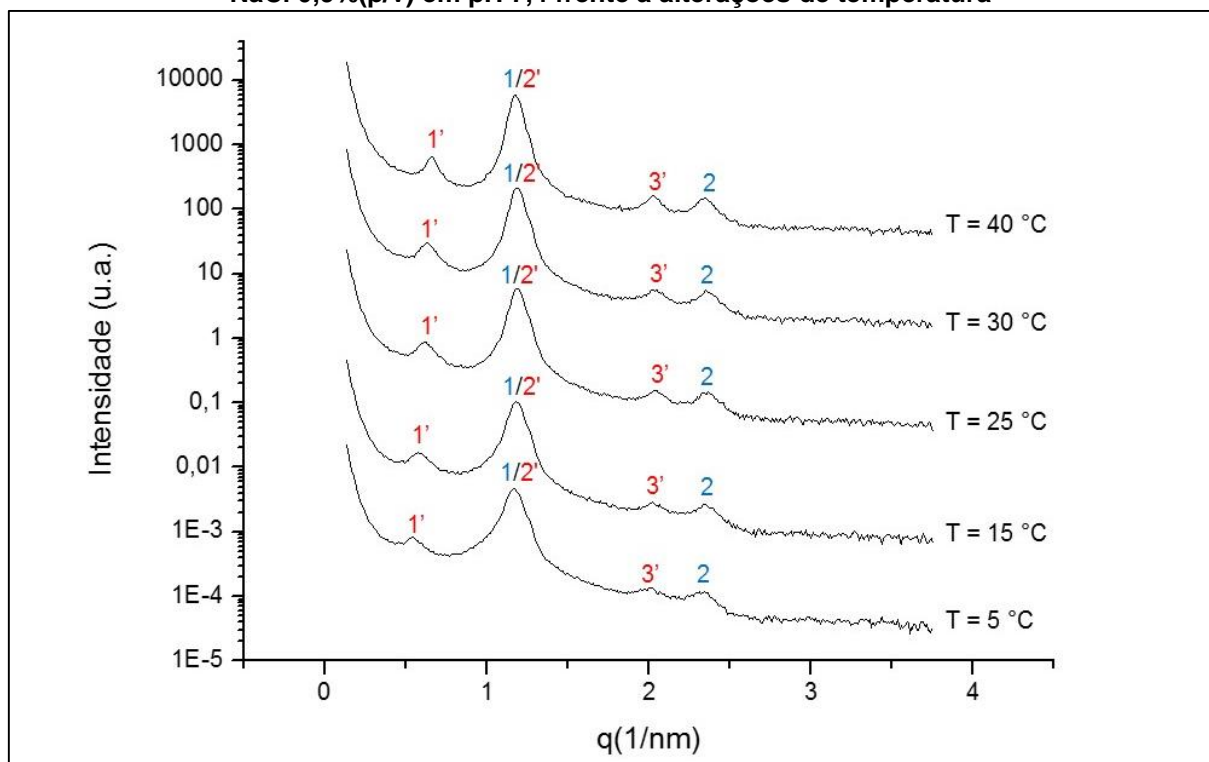


Com intuito de analisar o padrão de espalhamento dos LpHS-PTX preparados em NaCl 0,9% (p/V) em pH 7,4 nas temperaturas recomendadas para a realização dos testes de estabilidade de longa duração e acelerada para formas farmacêuticas líquidas, os difratogramas do sistema nas temperaturas pontuais sugeridas na **TABELA 10** foram plotados na **FIGURA 36**.

Na temperatura mais baixa, 5 °C, observa-se a coexistência de dois domínios. O primeiro compreende os picos com valor de q igual a 0,56; 1,16 e 1,90 nm^{-1} , correspondentes a razões de reflexão de Bragg próximas a 1', 2' e 3' (representado pelos índices em vermelho), que indicam uma organização lamelar das moléculas de DOPE presentes no sistema. A espessura de bicamada igual a 11,22 nm indica possivelmente uma região rica em moléculas de DSPE-PEG₂₀₀₀. O segundo domínio com picos com valores de q iguais a 1,16 e 2,33 nm^{-1} indicativos de razões de reflexão de Bragg de 1 e 2 (representado pelos índices em azul) e espaçamento de rede igual a 5,41 nm, caracteriza moléculas de DOPE em organização lamelar, provavelmente, em regiões com baixa concentração de PEG.

Nas temperaturas de 15 °C, 25 °C, 35 °C e 40 °C os difratogramas apresentam um padrão de espalhamento com valores de q semelhantes ao verificado a 5 °C, sendo observadas as mesmas razões de reflexão de Bragg que sugerem a presença de dois domínios lamelares no sistema.

FIGURA 36 - Estudo da transição de fases da DOPE presente nos LpHS-PTX preparados em NaCl 0,9%(p/v) em pH 7,4 frente a alterações de temperatura



Durante a estocagem, os lipossomas podem sofrer tanto alterações físicas quanto químicas. Sabe-se que a transição de uma fase lamelar para uma fase não lamelar do lípide estrutural leva a desestabilização da vesícula lipossomal e, conseqüentemente, a perda do material encapsulado. A presença de PTX livre na formulação, pode ocasionar alterações no perfil farmacocinético da formulação, de forma que o direcionamento específico do fármaco para a região tumoral, proporcionado pelo nanossistema, não ocorrerá, influenciando na performance *in vivo* da formulação (TORCHILIN, 2005). A ausência de transição de fases da DOPE visualizada nas **FIGURAS 35 e 36** durante o aquecimento da amostra mostra que o sistema não se desestabiliza nessas condições, sugerindo a estabilidade da formulação frente às alterações de temperaturas propostas nos estudos de estabilidade de longa duração e acelerada. Esses dados corroboram os dados prévios apresentados por Barbosa (2014) que demonstraram a elevada estabilidade do sistema e reforçando-o como potencial estratégia para a veiculação do PTX no tratamento de tumores sólidos.

4 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que os LpHS-PTX apresentam adequados parâmetros físico-químicos em termos de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de encapsulação, mostrando o potencial para uso intravenoso no tratamento dos tumores.

Os estudos de DSC associados ao SAXS dos componentes da formulação, em condições de baixa hidratação, mostraram que a inclusão do PTX na bicamada não prejudicou a pH-sensibilidade do sistema, caracterizada pela ocorrência de transição de fases do lípide estrutural que permite modificação da organização supramolecular da DOPE, desestabilização da bicamada lipídica e liberação do material encapsulado.

Nas condições de maior hidratação, os estudos de SAXS evidenciaram a ocorrência da pH-sensibilidade dos LpHS-PTX frente a redução de pH, em NaCl 0,9% e MC. Observou-se no estudo comparativo do efeito da composição lipídica na pH-sensibilidade que a redução da razão molar da DOPE nas formulações ocasionou uma diminuição na resposta pH-sensível dos lipossomas. Na presença do MCS, a interação dos LpHS-PTX com as proteínas séricas, levou a formação de estruturas menos ordenadas, sugestivas de modificações supramoleculares. Apesar da impossibilidade em determinar a organização de fase das moléculas da DOPE nessa amostra, as alterações nos padrões de espalhamento sugerem que a pH-sensibilidade do sistema não foi abolida.

O estudo de estabilidade dos LpHS-PTX frente a alterações de temperatura revelou ausência de transição de fases das moléculas da DOPE, sugerindo a adequada estabilidade do sistema nas condições propostas.

A partir de resultados obtidos no presente trabalho pôde-se confirmar a pH-sensibilidade do sistema desenvolvido, apresentando os LpHS-PTX como alternativa promissora para o uso intravenoso de PTX no tratamento do câncer.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

O desenvolvimento de novos medicamentos mais eficazes e com menor toxicidade para a saúde humana é de grande interesse para a saúde pública mundial. Dessa forma, a obtenção de nanossistemas terapêuticos inovadores de circulação prolongada passíveis de carrear o PTX, figura com formulação inovadora para o tratamento de uma doença com grande impacto sócio-econômico. Assim, com base nos resultados do presente trabalho, pode-se então propor algumas perspectivas, a saber:

- Estudo para determinação da pH-sensibilidade dos LpHS-PTX, por meio de titulação, onde a variação do diâmetro e do potencial zeta da formulação, em função do pH pode ser avaliada.
- Determinação da concentração de fosfolípides presente nos LpHS-PTX
- Avaliação da morfologia das partículas lipossomais pela técnica de MET.
- Estudo do perfil de liberação dos LpHS-PTX *in vitro*.
- Avaliação da atividade antitumoral dos LpHS-PTX em modelo experimental tumoral.
- Avaliação da toxicidade *in vivo*.
- Avaliação da biodistribuição e da farmacocinética dos LpHS-PTX.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, T. M.; HONG, K.; PAPAHADJOPOULOS, D. Membrane contact, an hexagonal (H_{II}) transitions in phosphatidylethanolamine liposomes. *Biochemistry*, v. 29, p. 2976-2985, 1990.

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 específico e ciclo-celular não específico que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALTMANN, K. H., GERTSH, J. Anticancer drugs from nature- natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. *The Royal Society of Chemistry*, v. 24, p. 327-357, 2007.

ANGELOV, B.; ANGELOVA, A.; VAINIO, U.; GARAMUS, V. M.; LESIEUR, S.; WILLUMEIT, R.; COUVREUR, P. Long-living intermediates during a lamellar to a diamond-cubic lipid phase transition: a small-angle X-ray scattering investigation. *Langmuir*, v. 25, p. 3734-3742, 2009.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para a realização de estudos de estabilidade. RE n° 1, de 29 de julho de 2005. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/01_05_re_comentada.pdf. Acesso em 09 de janeiro de 2015.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para validação de métodos analíticos. Resolução n° 899 de 20 de maio de 2003. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em 29 de março de 2013.

BARBOSA, M. V. Desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis contendo paclitaxel: aspectos farmacotécnicos e avaliação da atividade citotóxica in vitro. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2014.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, p. 167-178, 2007.

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

BINDER, S. Evolution of Taxanes in the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, v. 17 (1), p. 9-14, 2013.

BOOKMAN, M. A.; KLOTH, D. D.; KOVER, P. E.; SMOLINSKI, S.; OZOLS, R. F. Short-course intravenous prophylaxis for paclitaxel-related hypersensitivity reactions. *Annals of Oncology*, v. 8, p. 611-614, 1997.

BOUQUET, W. CELEN, W.; FRITZINGER, B.; PATTYN, P.; PEETERS, M.; REMON, J. P.; VERVAET, C. Paclitaxel/ β -cyclodextrin complexes for hyperthermic peritoneal perfusion – formulation and stability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 66, p. 391–397, 2007.

BRANDÃO, H. N. DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia dos quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BRASILEIRO-FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do Crescimento e da Diferenciação Celular. In: Brasileiro-Filho, G. *Bogliolo Patologia*. 8. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 219-276.

CAI, L.; WANG, X.; WANG, W.; QIU, N.; WEN, J.; DUAN, X.; LI, X.; CHEN, X.; YANG, L.; QIAN, Z.; WEI, Y.; CHEN, L. Peptide ligand and PEG-mediated long-circulating liposome targeted to FGFR overexpressing tumor in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, P. 4499-4510, 2012.

CARVALHO-JÚNIOR, A. D. Avaliação pré-clínica de lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo cisplatina. 2008. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis; viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B*, v. 689, p.175-180, 1997.

CAVALCANTI, L. P. Estudo estrutural de membranas modelo utilizando radiação síncrotron. 2001. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

CAVALCANTI, L. P.; KONOVALOV, O.; HAAS, H. X-ray diffraction from paclitaxel-loaded zwitterionic and cationic model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 150, p. 58-95, 2007.

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

CHEN, Q.; ZHANG, Q. Z.; LIU, J.; LI, L. Q.; ZHAO, W. H.; WANG, Y. J.; ZHOU, Q. H.; LI, L. Multi-center prospective randomized trial of paclitaxel liposome and traditional taxol in the treatment of breast cancer and non-small-cell lung. *Chinese Journal of Oncology*, v. 25; p. 190-192, 2003.

CHEN, Y.; SUN, J.; LU, Y.; TAO, C.; HUANG, J.; ZHANG, H.; YU, Y., ZOU, H., GAO, J.; ZHONG, Y. Complexes containing cationic and anionic pH-sensitive liposomes: comparative study of factors influencing plasmid DNA gene delivery to tumors. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 1573–1593, 2013.

CRAIEVICH, A. F. Synchrotron SAXS Studies of Nanostructured Materials and Colloidal Solutions. *Materials Research*, v. 5, p. 1-11, 2002.

CROSASSO, P.; CERUTI, M.; BRUSA, P.; ARPICCO, S.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. *Journal of Controlled Release*, v. 63, p. 19-30, 2000.

DANHIER, F.; DANHIER, P.; SAEDELEER, C. J.; FRUYTIER, A. C.; SCHLEICH, N.; RIEUX, A.; SONVEAUX, P.; GALLEZ, B.; PRÉAT, V. Paclitaxel-loaded micelles enhance transvascular permeability and retention of nanomedicines in tumors. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 479, p. 399-407, 2015.

DATTA, P.; CHAKRABARTY, S.; CHAKRABARTY, A.; CHAKRABARTY, A. Membrane interactions of hemoglobin variants, HbA, HbE, HbF and globin subunits of HbA: Effects of aminophospholipids and cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1778, p. 1-9, 2008.

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

DE OLIVEIRA, M. C.; ROSILIO, V.; LESIEUR, P.; BOURGAUX, C.; COUVREUR, P.; OLLIVON, M.; DUBERNET, C. pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotide in excess water. *Biophysical Chemistry*, v. 87, n. 2, p. 127-137, 2000.

DEMETZOS, C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability. *Journal of Liposome Research*, v. 18, p. 159-173, 2008.

DIAKOWSKI, W.; OZIMEK, L.; BIELSKA, E.; BEM, S.; LANGNER, M.; SIKORSKI, A. F. Cholesterol affects spectrin-phospholipid interactions in a manner different from changes resulting from alterations in membrane fluidity due to fatty acyl chain composition. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1758, p. 4-12, 2006.

DONG, Y. D; BOYD, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. *International Journal of Pharmaceutics*, v.417, p. 211-222, 2011.

DONYAI, P.; SEWELL, G. J. Physical and chemical stability of paclitaxel infusions in different container types. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, v. 12, p. 211-222, 2006.

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

DRISCOLL, D. F. Lipid injectable emulsions: Pharmacopeial and safety issues. *Pharmaceutical Research*, v. 23; n. 9, p.1959-1969, 2006.

FADER, A. N.; ROSE, P. G. Abraxane for the treatment of gynecologic cancer patients with severe hypersensitivity reactions to paclitaxel. *International Journal of Gynecological Cancer*, v. 19 (7), p. 1281-1283, 2009.

FATTAL, E.; COUVREUR, P.; DUBERNET, C. "Smart"delivery of antisense oligonucleotides by anionic pH-sensitive liposomes. *Advance Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 931-946, 2004.

FENG, L. MUMPER, R. J. A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery. *Cancer Letters*, v. 334, p. 157-175, 2013.

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

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

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

GABIZON, A.; GOREN, D.; HOROWITZ, A. T.; TZEMACH, D.; LOSSOS, A.; SIEGAL, T. Long-circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy: a review of biodistribution studies in tumor-bearing animals. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 24; p. 337-344, 1997.

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

GELDERBLOM, H.; VERWEIJ, J.; NOOTER, K.; SPARREBOOM, A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European Journal of Cancer*, v. 37, p. 1590-1598, 2001.

GILL, P. MOGHADAM, T. T., RANJBAR, B. Differential Scanning Calorimetry Techniques: *Applications in Biology and Nanoscience*. *Journal of Biomolecular Techniques*, v.21, p. 167-193, 2010.

GIUBERTI, C. S.; REIS, E. C. O.; ROCHA, T. G. R.; LEITE, E. A.; LACERDA, R. G.; RAMALDES, G. A.; DE OLIVEIRA, M. C. Study of the pilot production process of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin. *Journal of Liposome Research*, v. 21, p. 60-69, 2011.

GOUBRAN, H. A.; KOTB, R. R.; STAKIW, J. EMARA, M. E.; BURNOUF, T. Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment. *Cancer Growth and Metastasis*, v. 7, p. 9-18, 2014.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, v. 68, p. 305-309, 1996.

GRIFFIOEN, A. W.; THIJSSSEN, V. L. Galectins in tumor angiogenesis. *Annals of Translational Medicine*, v. 2(9), p. 1-8, 2014.

GUCHELAAR, H, J.; TEN NAPEL, C. H. H., VRIES, E. G. E.; MULDER, N. H. Clinical, toxicological and pharmaceutical aspects of the antineoplastic drug taxol: a review. *Clinical Oncology*, v. 4, p. 40-48, 1994.

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

HAMADA, H. ISHIHARA, K.; MASUOKA, N.; MIKUNI, K.; NAKAJIMA, N. Enhancement of water-solubility and bioactivity of paclitaxel using modified cyclodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 102, p. 369-371, 2006.

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

HLATKY, L.; HAHNFELDT, P. Beyond the cancer cell: progression-level determinants highlight the multiscale nature of carcinogenesis risk. *Cancer Research*, v. 74(3), p. 659-664, 2014.

HENEY, M. ALIPOUR, M.; VERGIDIS, D.; OMRI, A.; MUGABE, C.; TH'HG, J.; SUNTRES, Z. Effectiveness of liposomal paclitaxel against MCF-7 breast cancer cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 88, p. 1172-1180, 2010.

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

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

HIPPALGAONKAR, K.; MAJUMDAR, S.; KANSARA, V. Injectable Lipid Emulsions-Advancements Opportunities and Challenges. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, v. 11, p. 1526-1540, 2010.

HOYER, K. Paclitaxel, *Clinical Journal of Oncology Nursing*, v. 4, p. 51-52, 2000.

ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. *Validation of analytical procedures: methodology*. Geneva: ICH Secretariat, 2005, p. 1-13.

INCA - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva – Ministério da Saúde. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/in>

ca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014>. Acesso em 17 de dezembro de 2013.

INCA - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva – Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322> Acesso: 30/01/2015.

ISHIDA, T.; OKADA, Y.; KOBAYASHI, T.; KIWADA, H. Development of pH-sensitive liposomes that efficiently retain encapsulating doxorubicin (DXR) in blood. *International Journal of Pharmaceutical*, v. 309, p. 94-100, 2006.

IWAMOTO, T. Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 36(5), p. 715-718, 2013.

JENA, J. A Study on Natural Anticancer Plants. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, v. 1(1), p. 365-368, 2012.

JOBIM, F. C.; SCHWARTSMANN, G.; XAVIER, N. L.; UCHOA, D. M.; SACILOTO, M.; CHEMELLO, N. Expressão da MMP-9 e do VEGF no câncer de mama: correlação com outros indicadores de prognóstico. *Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia*, v. 30(6), p. 287-93, 2008.

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

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

KANNO, T; YAMADA, T. IWABUKI, H; TANAKA, H.; KURODA, S.; TANIZAWA, K.; KAWAI, T. Size distribution measurement of vesicles by atomic force microscopy. *Analytical Biochemistry*, v. 309, p.196-199, 2002.

KENNY, L. M.; ABOAGYE, E. O.; PRICE, P. M. Positron emission tomography imaging of cell proliferation in oncology. *Clinical Oncology*, v. 16, p. 176-185, 2004.

KIM, H. Y.; RYU, J. H.; CHU, C. W.; SON, G. M.; JEONG, Y.; KWAK, T.; KIM, D. H.; CHUNG, C.; RHEE, Y. H.; KANG, D. H.; KIM, H. W. Paclitaxel-incorporated nanoparticles using block copolymers composed of poly(ethylene glycol)/poly(3-hydroxyoctanoate). *Nanoscale Research Letters*, v. 9, p. 1-10, 2014.

KLIBANOV, A. L.; MARUYAMA, K. TORCHILIN, V. P.; HUANG, L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *Federation of European Biochemical Societies*, v. 268, p. 235-237, 1990.

KODAMA, J.; SASAKI, A.; MASAHIRO, S.; SEKI, N.; KUSUMOTO, T.; NAKAMURA, K.; IRAMATSU, Y. Pharmacokinetics of combination chemotherapy with paclitaxel and carboplatin in a patient with advanced epithelial ovarian cancer undergoing hemodialysis. *Oncology Letters*, v. 1(3), p. 511–513, 2010.

KOUDELKA, S.; TURÁNEK, J. Liposomal paclitaxel formulations. *Journal of Controlled Release*, v. 163, p. 322-334, 2012.

KOUDELKA, S.; TURÁNEK, P.; MASEK, J.; KORVASOVÁ, Z.; SKRBALOVÁ, M.; PLOCKOVÁ, J.; BARTHELDYOVÁ, E.; TURÁNEK, J. Liposomes with high encapsulation capacity for paclitaxel: preparation, characterization and in vivo anticancer effect. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, n. 5, p. 2309-2319, 2009.

LAOUINI, A.; JAAFAR-MAALEJ, C.; LIMAYEM-BLOUZA, I.; SFAR, S.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Preparation, Characterization and applications of liposomes: state of the art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, v. 1, p. 147-168, 2012.

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

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

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, 2012b.

LEWIS, R. N. A. H.; McELHANEY, R. N. Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1828, p. 2347-2358, 2013.

LI, X.; TIAN, X.; ZHANG, J.; ZHAO, X.; CHEN, X.; JIANG, Y.; WANG, D.; PAN, W. In vitro and in vivo evaluation of folate receptor-targeting amphiphilic copolymer-modified liposomes loaded with docetaxel. *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, p. 1167-1184, 2011.

LIM, W. T.; TAN, E. H.; TOH, C. K.; HEE, S. W.; LEONG, S. S.; ANG, P. C. S. WONG, N. S.; CHOWBAY, B. Phase I pharmacokinetic study of a weekly liposomal paclitaxel formulation (Genexol-PM) in patients with solid tumors. *Annals of Oncology*, v. 21, p. 382-388, 2010.

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

LIU, K. C.; YEO, Y. Extracellular stability of nanoparticulate drug carrier. *Archives of pharmaceutical research*, v. 37(1), p. 16-23, 2014.

LIU, Y.; ZHANG, B.; YAN, B. Enabling anticancer therapeutics by nanoparticle carriers: the delivery of paclitaxel. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, p. 4395-4413, 2011.

LOPES, S. C. A. Lipossomas contendo ácido ursólico: desenvolvimento, caracterização química e físico-química e avaliação da citotoxicidade. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

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

LOPES, S. C. A.; NOVAIS, M. V. M.; FERREIRA, D. S.; BRAGA, F. C.; MAGALHÃES-PANIAGO, R.; MALACHIAS, A.; OLIVEIRA, M. C. Ursolic Acid Incorporation Does Not Prevent the Formation of a Non-lamellar Phase in pH-Sensitive and Long-Circulating Liposomes. *Langmuir*, v. 30 (50), p 15083 –15090, 2014.

LOPES, S. C. A.; NOVAIS, M. V. M.; TEIXEIRA, C. S.; HONORATO-SAMPAIO, K; PEREIRA, M. T.; FERREIRA, L. A. M.; BRAGA, F. C.; OLIVEIRA, M. C. Preparation, physicochemical characterization and cell viability evaluation of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing ursolic acid. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-7, 2013b.

LOVELYN, C.; ATTAMA, A. A. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. *Journal of biomaterials and nanobiotechnology*, v. 2, p. 626-639, 2011.

MAEDA, H.; EU, J.; SAWA, T.; MATSUMURA, Y.; HORI, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*, v. 65, p. 271-284, 2000.

MALVERN INSTRUMENTS. Size theory. In: Zetasizer Nano Series User Manual. Inglaterra, 2004, p. 13.1-13.2.

MALVERN INSTRUMENTS. Zeta potencial: Theory of operation. In: Zetasizer theory manual. Inglaterra, 1996, p. 2.1-2.6.

MARKMAN, M. Managing taxane toxicities. *Support Care Cancer*, v. 11, p. 144-147, 2003.

MENG, S.; SU, B.; LI, W.; DING, Y.; TANG, L.; ZHOU, W.; SONG, Y.; LI, H.; ZHOU, C. Enhanced antitumor effect of novel dual-targeted paclitaxel liposomes. *Nanotechnology*, v. 21, p. 415103, 2010.

MIELKE, S.; SPARREBOOM, A.; MROSS, K. Peripheral neuropathy: A persisting challenge in paclitaxel-based regimens. *European Journal of Cancer*, v. 42, p. 24-30, 2006.

MILANE, L.; DUAN, Z.; AMIJI, M. Biodistribution and pharmacokinetic analysis of combination lonidamine and paclitaxel delivery in an orthotopic animal model of multi-drug resistant breast cancer using EGFR targeted polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, v. 7(4), p. 435–444, 2011.

- MITTAL, A.; CHITKARA, D.; KUMAR, N. HPLC method for the determination of carboplatin and paclitaxel with cremophorEL in an amphiphilic polymer matrix. *Journal of Chromatography B*, v. 855, p. 211-219, 2007.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, p. 113-142, 2010.
- MOUDI, M. GO, R.; YIEN, C. Y. S. NAZRE, M. Vinca Alkaloids. *International Journal of Preventive Medicine*, v. 4, p. 1231-1235, 2013.
- MUSTEATA, F. M.; PAWLISZYN, J. Determination of free concentration of paclitaxel in liposome formulations. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v. 9 (2), p. 231-237, 2006.
- PAIK, P.; JAMES, L. P.; RIELY, G. J.; AZZOLI, C. G.; MILLER, V. A.; KENNETH, K.; SIMA, C. S.; HEELAN, R. T. KRIS, M. G. MOORE, E. RIZVI, N. A. A phase 2 study of weekly albumin-bound paclitaxel (Abraxane[®]) given as a two-hour infusion. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 68(5), p. 1331-1337, 2011.
- PANCHAGNULA, R. Pharmaceutical aspects of paclitaxel. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, v. 172, p. 1-15, 1998.
- POLOMANO, R. C. MANNES, A. J. CLARK, U. S. BENNETT, G. J. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain*, v. 94, p. 293-304, 2001.
- RANE, S.; PRABHAKAR, B. Influence of liposome composition on paclitaxel entrapment and pH sensitivity of liposomes. *Internacional Journal of PharmTech Research*, v. 1, n. 3, p. 914-917, 2009.
- RICHARDS, R. L.; GEWURZ, H.; OSMAND, A. P.; ALVING, C. R. Interactions of C-reactive protein and complement with liposomes. *Immunology*, v. 74, p. 5672-5676, 1977.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. *Patologia: Bases patológicas das doenças*, 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2005.
- ROWINSKY, E. K.; DONEHOWER, M. D. Paclitaxel (Taxol). *The New England Journal of Medicine*, v. 332, p. 1004-1014, 1995.
- SAFARZADEH, E.; SANDOGHCHIAN, S. S.; BARADARAN, B. Herbal Medicine as Inducers of Apoptosis in Cancer Treatment. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 4, p. 421-427, 2014.
- SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? *Química Nova*, v. 25, p. 1181-1185, 2002.
- SAWANT, R. R.; TORCHILIN, V. P. Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, v. 14, p. 303-315, 2012.

SAWANT, R. R.; TORCHILIN, V. P. Enhanced cytotoxicity of TATp-bearing paclitaxel-loaded micelles in vitro and in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 374, p. 114-118, 2009.

SCHIFF, P. B. FANT, J. HORWITZ, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, v. 277, p. 665-667, 1979.

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

SHAILESH. S.; NEELAM, S.; SANDEEO, K.; GUPTA, G. D. Liposomes: a review. *Journal of Pharmacy Research*, v. 2, p. 1163-1167, 2009.

SHARMA, A.; MAYHEW, E.; BOLCSAK, L.; CAVANAUGH, C.; JANOFF, A.; BERNACKI, R. J. Activity of paclitaxel liposome formulations against human ovarian tumor xenografts. *International Journal of Cancer*, v. 71, p. 103-107, 1997.

SHARMA, A.; MAYHEW, E.; STRAUBINGER, R. M. Antitumor effect of taxol-containing liposomes in a taxol-resistant murine tumor model. *Cancer Research*, v. 53, p. 5877-5881, 1993.

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

SILVA, S. M. L. Lipossomas pH-sensíveis contendo complexo de ciclodextrina catiônica/DNA plasmidial: otimização do método de preparo, caracterização físico-química e estudo de transfecção. 2011. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

SILVA, B. F. B.; MAJZOUB, R. N.; CHAN, C.; LI, Y.; OLSSON, U. SAFINYA, C. R. PEGlated cationic liposome-DNA complexation in brine is pathway dependent. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1838, p. 398-412, 2014.

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

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

SITTERBERG, J. OZCETIN, A. EHRHARDT, C.; BAKOWSKY, U. Utilising atomic force microscopy for the characterization of nanoscale drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 74, p. 2-13, 2010.

SNYDER, J. P. The microtubule-pore gatekeeper. *Nature Chemical Biology*, v. 3 (2), p. 81-82, 2007.

SOARES, D. C. F.; DE OLIVEIRA, M. C.; DOS SANTOS, R. G.; ANDRADE, M. S.; VILELA, J. M.; CARDOSO, V. N.; RAMALDES, G. A. Liposomes radiolabelled with ^{159}Gd -DTPA-BMA: preparation, physicochemical characterization, release profile and in vitro cytotoxic evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, p. 462-469, 2011

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

SPITZNER, M.; EBNER, R.; WOLFF, H. A.; GHADIMI, M.; WIENANDS, J.; GRADE, M. STAT3: A novel molecular mediator of resistance to chemoradiotherapy. *Cancers*, v. 6, p. 1986-2011, 2014.

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

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.

TANG, X.; CAI, S.; ZHANG, R.; LIU, P.; CHEN, H.; ZHENG, Y.; SUN, L. Paclitaxel-loaded nanoparticles of star-shaped cholic acid-core PLA-TPGS copolymer for breast cancer treatment. *Nanoscale Research Letters*, v. 8, p. 1-12, 2013.

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

TENCHOV, B.; KOYNOVA, R. Cubic phases in membrane lipids. *European Biophysical Journal*, v. 41, p. 841-850, 2012.

THAKUR, R.; DAS, A. CHAKRABORTY, A. The fate of anticancer drug, ellipticine in DPP and DMPC liposomes upon interaction with HSA: a photophysical approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, v. 130, p. 122-13, 2014. B.

TORCHILIN, V. P.; OMELIANENKO, V. G.; PAPISOV, M. I.; BOGDANOV, A. A.; TRUBETSKOY, V. S.; HERRON, J. N.; GENTRY, C. A. Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1195, n. 1, p. 11–20, 1994.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 145-160, 2005.

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

USP 34. United States Pharmacopeia 34th. *The United States Pharmacopeia Convention*, 2011, USA.

VANNEMAN M.; DRANOFF, G. Combining immunotherapy and target therapies in cancer treatment. *Nature Reviews*, v. 12, p. 237-251, 2012.

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

WANG, L. Z.; HO, P. C.; LEE, H. S.; VADDI, H. K.; CHAN, Y. W.; YUNG, C. S. Quantification of paclitaxel in micro-sample rat plasma by a sensitive reversed-phase HPLC assay. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 31, p. 283-289, 2003.

WANG, X.; SONG, L.; LI, N.; QIU, Z.; ZHOU, S.; LI, C.; ZHAO, J.; SONG, H.; CHEN, X. Pharmacokinetics and biodistribution study of paclitaxel liposome in sprague-dawley rats and beagle dogs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Research*, v. 63, p. 603–606, 2013.

WERNER, M. E.; CUMMINGS, N. D.; SETHI, M.; WANG, E. C.; SUKUMAR, R.; MOORE, D. T.; WANG, A. Z. Preclinical evaluation of Genexol-PM, a nanoparticle formulation of paclitaxel, as a novel radiosensitizer for the treatment of non-small cell lung cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, v. 83 (3), p. 463–468, 2013.

WOLFRAM, J.; SURI, J.; YANG, Y.; SHEN, J.; CELIA, C.; FRESTA, M.; FERRARI, M. Shrinkage of pegylated and non-pegylated liposomes in serum. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, v. 114, p. 1-15, 2014.

WOODLE, M. C.; COLLINS, L. R.; SPONSLER, E.; KOSSOVSKY, N.; PAPAHDJOPOULOS, D.; MARTIN, F. J. Sterically stabilized liposomes: reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential. *Biophysical Journal*, v. 61, p. 902-910, 1992.

WU, J.; LIU, Q.; LEE, R. J. A folate receptor-targeted liposomal formulation for paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 316, p. 148-153, 2006.

XU, X.; WANG, L.; XU, H.; HUANG, X.; QIAN, Y.; 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, p. 2591-2594, 2013.

YAMASHITA, Y.; EGASHIRA, N.; MASUGUSHI, K.; USHIO, S. KAWASHIRI, T.; OISHI, R. Comparison of peripheral neuropathy induced by standard and nanoparticle albumin-bound paclitaxel in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 117, p. 116-120, 2011.

YANG, A.; LI, J.; XU, H. A study on antitumor effect of liposome encapsulated paclitaxel in vivo and in vitro. *Bulletin of Chinese Cancer*, v. 15, p. 862-864, 2006.

YANG, T.; CUI, F.; CHOI, M.; LIN, H.; CHUNG, S.; SHIM, C.; KIM, D. Liposome formulation of paclitaxel with enhanced solubility and stability. *Drug Delivery*, v. 14, p. 301-308, 2007.

YARED, J. A. TKACZUK, K. H. Update on taxane development: new analogs and new formulations. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 6, p. 371-384, 2012.

YU, S.; ZHANG, Y.; WANG, X.; ZHEN, X.; ZHANG, Z.; WU, W.; JIANG, X. Synthesis of paclitaxel-conjugated β -cyclodextrin polyrotaxane and its antitumor activity. *Polyrotaxanes*, v. 52, p. 7272-7277, 2013.

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

ZHANG, J. A.; ANYRAMBHATLA, G.; MA, L.; UGWU, S.; XUAN, T.; SARDONE, T.; AHMAD, I. Development and characterization of a novel Cremophor [®] EL free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 59, p. 177-187, 2005.

ZHAO, G.; RODRIGUEZ, B. L. Molecular targeting of liposomal nanoparticles to tumor microenvironment. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 61–71, 2013.

ZUBRIS, K. A. V.; LIU, R.; COLBY, A.; SCHULZ, M. D.; COLSON, Y. L.; GRINSTAFF, M. W. In Vitro Activity of Paclitaxel-Loaded Polymeric Expansile Nanoparticles in Breast Cancer Cells. *Biomacromolecules*, v. 14, p. 2074-2082, 2013.