

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SARA PACELLI DE SOUSA MARCIAL

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO
PACLITAXEL**

Diamantina – MG

2016

SARA PACELLI DE SOUSA MARCIAL

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO
PACLITAXEL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Amaral Leite

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Carneiro

DIAMANTINA - MG

2016

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa CRB-6/2972

M319d Marcial, Sara Pacelli de Sousa.
2016 Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas contendo paclitaxel
/ Sara Pacelli de Sousa Marcial. – Diamantina : UFVJM, 2016.
90 p. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Amaral Leite
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Carneiro

Dissertação (mestrado) –Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, 2016.

1. Paclitaxel. 2. Nanocarreadores lipídicos. 3. Câncer. I. Leite,
Elaine Amaral. II. Carneiro, Guilherme. III. Título.

CDD 615.3

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

SARA PACELLI DE SOUSA MARCIAL

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO
PACLITAXEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri –UFVJM, como pré-requisito para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Dra. Elaine Amaral Leite – UFMG - Orientadora

Prof. Dr. Guilherme Carneiro – UFVJM – Coorientador

Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly – UFVJM - Titular

Prof. Dr. Álvaro Dutra de Carvalho Junior – UFVJM – Titular

Este trabalho contou com a colaboração de:

Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira

Departamento de Produtos Farmacêuticos, UFMG

Prof^a Dr^a Mônica Cristina de Oliveira

Departamento de Produtos Farmacêuticos, UFMG

Prof^a. Dr^a. Helen Rodrigues Martins

Departamento de Farmácia, UFVJM

Prof. Dr Juan Pedro Bretas Roa

Departamento de Farmácia, UFVJM

Dedico este trabalho a todos aqueles que foram essenciais para sua conclusão. A Deus, por toda luz e bênçãos que tenho em minha vida.

A minha família, meus pais Eugênio e Maria Amália, meus irmãos Maxwell e Paula, e ao meu grande companheiro Saulo, por sempre me apoiar.

AGRADECIMENTOS

Aprendi com a caminhada até chegar aqui que nessa vida nada somos sem as pessoas que encontramos ao longo do percurso, aprendi mais ainda que sem Deus não conseguimos distinguir o quanto cada pessoa deve estar presente no caminho e que cada um tem um tijolinho, de alguma forma, para acrescentar na estrada da vida que construímos. Agradeço a Deus por hoje estar aqui, por ter colocado tantas pessoas que de alguma maneira a presença delas me ajudou a construir a estrada da minha vida em direção a Diamantina, em direção a universidade, em direção ao mestrado. Agradeço a Deus pela minha vida, por sempre, até mesmo nos momentos mais difíceis sentir no Seu amor a força para erguer a cabeça e continuar a luta. Agradeço a Deus por ter tantas pessoas especiais em minha vida.

Dentre todas as pessoas tão importantes em minha vida quero agradecer primeiramente aquelas que me deram a vida, ao meus pais, Eugenio e Maria Amália, por serem meus pais e amigos, estando sempre ao meu ao meu lado, para me apoiar ou puxar a orelha quando preciso, sendo exemplos de caráter e amor.

Aos meus irmãos, Paula e Maxwell, por sermos mais que irmãos, por sermos amigos e companheiros de todos os momentos. A minha mais nova irmã, minha cunhada/comadre Marrone, por ter gerado meu grande amor que é meu afilhado Arthur, que todos os dias alegra nossas vidas.

Ao meu namorado, amigo e companheiro de todos os momentos, Saulo, pelo seu amor, paciência e alegria, por aguentar minhas crises de desespero e comemorar comigo cada vitória, por sonharmos e lutarmos juntos, por ser a tampa da minha panela. Sem você minha vida não seria tão feliz e completa. Te amo!

A minha “mãe” professora Elaine, pela oportunidade de ter a sua orientação ao longo deste trabalho, por ser um exemplo de profissional e competência, que mesmo distante esteve presente com seus ensinamentos que levarei por toda minha vida. Obrigada por tudo Elaine!

Ao meu “pai” professor Guilherme, por me receber em seu laboratório, por toda paciência e dedicação, por ter sido mais que professor, foi amigo, apoiando e corrigindo quando foi necessário. Sou eternamente grata por todos seus ensinamentos. Obrigada Guilherme!

A Leticia, por ter sido muito mais que uma colega de mestrado, por termos construído uma grande amizade ao longo desses anos que levarei por toda vida. Obrigada Lê pela companhia nos dias e noites solitárias do laboratório, por todas as vezes que quebramos a cabeça juntas, e principalmente pela sua ajuda fundamental com os estudos *in vitro*.

A toda minha família Marcial, ao meu avô Ninico e minha avó Ana que estão na companhia dos anjos, que sempre foram exemplos de Fé e amor, e deixaram saudades eternas. A todos os meus tios e tias, primas e primos, por cada um que de alguma forma, seja com um conselho, uma palavra amiga ou com momentos felizes contribuíram para que a minha caminhada fosse

mais feliz. Em especial a madrinha Matilde, por todo amor, apoio e orações que foram essenciais para que alcançar tantas conquistas em minha vida.

A tia Marta e tia Eliane, Cynthinha, Nice e Bruninha, por todas as vezes que me receberam em suas casas com todo o carinho e boa vontade do mundo.

A toda minha família Marçal, ao meu avô Joaquim e avó Luzia, que sempre levarei no coração com amor, em especial a todas minhas amadas tias e madrinhas, Rosângela, Elenice e Eliane, ao meu novo amigo e tio Lucas, e aos meus primos Bruno e Bruna, que mesmo longe estão sempre presentes, apoiando e compartilhando todos os momentos.

A minha família do coração José Antônio, Dona Ruth, Charles, Anderson, Márcia, Luciana, Lilia, Caio, Lara, Lucca, Vitor e Sofia, por me acolher como filha, irmã, por me acolher com tanto amor e carinho.

Aos irmãos que a vida me deu, meus amados amigos da irmandade Fitas, Júnior, Bella, Pots, Juleska, Alisson, Arthur, Paulinha, Seve, Amandinha e Dan, pela nossa amizade ser muito mais que apenas os momentos felizes, por todo apoio e compreensão nas fases difíceis e por saber que em vocês posso confiar e contar sempre.

Aos amigos que Diamantina me deu, principalmente aqueles que tem um lugar especial em meu coração e levarei sempre comigo, Vivi, Lu, Rebecca, Henrique e Débora, obrigada por tantos momentos especiais.

Aos colegas do laboratório, que foram companhia e grandes parceiros do dia-a-dia, Flávia, Marina, Gaby, Dan, Roberto, Osmar, André, Diego e Guizan.

Aos meus queridos colegas do mestrado, a todos que de alguma forma contribuíram na realização deste projeto, Bruno, Dalila, Isabela, Fabrício, Cláudio, Philipe, Karen e Irma, em especial a Lays pelo apoio fundamental na realização das microscopias.

A todos os professores do departamento de farmácia, por todo ensinamento, em especial ao professor Álvaro Dutra, o professor Wallans Torres, professora Valéria Macedo e o professor Gustavo Bahia que colaboraram em muitas etapas do desenvolvimento do projeto.

A professora Helen por disponibilizar seu laboratório para a realização dos estudos *in vitro*.

Ao professor Juan pelo apoio essencial na realização das microscopias.

Aos técnicos dos laboratórios, pela disponibilidade e auxílio durante a realização dos experimentos, em especial a Kelly, Mércia, Telles, Ricardo e Viviane.

Ao Tiago pelo apoio e disponibilidade para me ensinar a manipular o HPLC.

A todos os funcionários, as faxineiras pelos papos descontraídos, aos porteiros, em especial ao Carlos e Vandeir, pela alegria que sempre trouxeram até mesmo quando acordávamos de madrugada e chegávamos antes de todo mundo no laboratório. As secretárias, em especial a Valéria que sempre nos socorre quando mais precisamos.

A todos os alunos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFMG que me receberam tão bem e muito me ajudaram, principalmente a Liziane, Carol, Sália e Flávia.

Ao professor Lucas Antônio pela disponibilidade de seu laboratório.

A Fapemig pelo financiamento da minha bolsa de estudo.

“Enfim, depois de tanto erro passado
Tantas retaliações, tanto perigo
Eis que ressurgiu noutro o velho amigo
Nunca perdido, sempre reencontrado.

É bom sentá-lo novamente ao lado
Com olhos que contêm o olhar antigo
Sempre comigo um pouco atribulado
E como sempre singular comigo.

Um bicho igual a mim, simples e humano
Sabendo se mover e comover
E a disfarçar com o meu próprio engano.

O amigo: um ser que a vida não explica
Que só se vai ao ver outro nascer
E o espelho de minha alma multiplica...”

Vinicius de Moraes

Muito obrigada a cada um que fez parte da minha caminhada e que contribuiu para que este trabalho pudesse ser realizado.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

O paclitaxel (PTX) é um agente quimioterápico que tem uma importante função no tratamento de vários tipos de câncer, especialmente o câncer de mama. No entanto, a baixa solubilidade do PTX em meio aquoso (coeficiente de partição $\log = 3,96$) representa uma limitação para a administração intravenosa. A formulação convencional do PTX contém uma alta concentração de Cremofor-EL® (derivado polietoxilado do óleo de rícino), o qual induz significativa toxicidade, restringindo sua utilização clínica. A encapsulação do PTX em sistema de liberação de fármacos pode melhorar a absorção e aumentar a sua eficácia terapêutica. Neste estudo, três diferentes nanossistemas lipídicos contendo PTX, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), nanoemulsão (NE) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram preparados e as propriedades físico-químicas e a atividade citotoxicidade *in vitro* foram avaliadas. Em relação ao diâmetro médio, o CLN branco mostrou valor de diâmetro aproximadamente 2 e 1,7 vezes menor que os obtidos para NLS e NE, respectivamente. A presença de PTX levou a um aumento significativo no diâmetro das partículas em todos os sistemas avaliados, exceto no NE. Além disso, o aumento da concentração do fármaco (0,01% para 0,025%) produziu um aumento do diâmetro para a preparação de CLN. Todas as formulações com PTX mostraram índice de polidispersão superior a 0,3, exceto para NE-PTX na concentração do fármaco igual a 0,01% (p/v). Valores negativos de potencial zeta foram observados para todas as formulações avaliadas. CLN-PTX foi o sistema mais estável após armazenado por 30 dias a 4 °C. O estudo de citotoxicidade nas linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) demonstrou atividade citotóxica mais pronunciada para CLN-PTX do que para o PTX livre em ambos as linhagens celulares do tumor. Baseado nesses resultados, CLN-PTX parece ser uma ferramenta potencial para o tratamento do câncer de mama.

Palavras-chave: Paclitaxel, nanocarreadores lipídicos, câncer, nanoemulsão, nanopartícula lipídica sólida, carreador lipídico nanoestruturado.

ABSTRACT

Paclitaxel (PTX) is a chemotherapeutic agent that plays an important role in the treatment of several types of human cancer, especially breast cancer. However, the low solubility of PTX in aqueous medium (partition coefficient log of 3.96) represents a barrier for intravenous administration. The conventional PTX formulation contains a high concentration of Cremophor-EL® (polyethoxylated castor oil), which is associated with significant toxicities restricting its clinical use. The encapsulation of the PTX in drug delivery systems could improve the uptake and increase its therapeutic efficacy. In this study, three different lipid nanosystems containing PTX, solid lipid nanoparticle (SLN), nanoemulsion (NE), and nanostructured lipid carrier (NLC) were prepared, and the physicochemical properties and in vitro cytotoxic activity were evaluated. Concerning the mean diameter, NLC blank showed diameter values approximately 2 and 1.7-fold lower than those obtained for SLN and NE, respectively. The presence of PTX leads to a significant increase in the particle diameter in all systems evaluated, except NE. In addition, increases in drug concentration (0.01% to 0.025%) produced an enhanced diameter for NLC preparation. All formulations containing PTX showed PI higher than 0.3, except for NE-PTX at drug concentration equal to 0.01% (w/v). Negative zeta potential values were observed in all formulations evaluated. NLC-PTX was the system more stable after storage for 30 days at 4 °C. The cytotoxicity studies on breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7) demonstrated cytotoxic activity more pronounced for NCL-PTX than for free PTX for both tumor cell lines. Thus, the results showed that NCL-PTX seems to be a potential tool for the treatment of breast cancer.

Keywords: Paclitaxel, lipid nanosystems, cancer, nanoemulsion, solid lipid nanoparticle, nanostructured lipid carrier.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação diagramática do sistema vascular da angiogênese tumoral.	27
Figura 2 - Estrutura química do paclitaxel.	34
Figura 3 - Esquema representativo da formação e estabilização dos microtúbulos.	35
Figura 4 - Triglicerídeos formados a partir dos ácidos graxos Capríco (C6:0), Caprílico (C8:0) e Cáprico (C10:0).	40
Figura 5 - Representação esquemática da estrutura de: A - monobehanato; B – dibehenato; e C tribehanato de glicerol.	41
Figura 6 - Diferentes tipos de CLN de acordo com a composição lipídica e sua comparação com a matriz cristalina altamente ordenada das NLS.	44
Figura 7 - Representação esquemática das etapas de preparo das formulações de NE, NLS e CLN.	49
Figura 8 - Representação esquemática das etapas de preparo da formulação para determinação da concentração total do PTX.	52
Figura 9 - Representação esquemática das etapas de preparo da amostra para determinação da concentração do PTX encapsulado.	52
Figura 10 - Sobreposição dos perfis cromatográficos obtidos para solução de PTX e as formulações lipídicas brancas.	58
Figura 11 - Representação gráfica da curva analítica para doseamento do PTX e equação da reta obtida pelo método de CLAE.	59
Figura 12 - Representação esquemática do impedimento estérico causado pelo Tween 80 nas nanopartículas.	64
Figura 13 - Representação gráfica do teor de encapsulação (A) e da concentração do PTX (B) nos nanocarreadores lipídicos (NE, NLS e CLN) utilizando concentrações do fármaco equivalentes a 0,01% (barras brancas) e 0,025% (barras pretas) de PTX.	65
Figura 14 - Representação da eficiência de encapsulação das nanopartículas lipídicas contendo PTX na concentração de 0,01 % (p/v) analisadas por CLAE em tempo zero e imagens de Microscopia de Luz Polarizada.	67
Figura 15 - Análise de potencial zeta da NE-PTX (preto), NLS-PTX (vermelho) e CLN-PTX (azul) ao longo de 30 dias de armazenamento a 4°C.	69
Figura 16 - Diâmetro de partícula e IP da NE-PTX (A), NLS-PTX (B) e CLN-PTX (C) ao longo de 30 dias de armazenamento a 4°C.	70

Figura 17 - Análises de pH da NE-PTX (preto), NLS-PTX (vermelho) e CLN (azul) contendo PTX na concentração de 0,01% (p/v) ao longo de 30 dias de armazenamento a 4°C. O tempo 0 representa o pH logo após o preparo das formulações.....	71
Figura 18 - Análise da taxa de liberação do PTX a partir da NE-PTX (preto), NLS-PTX (vermelho) e CLN-PTX (azul) ao longo de 30 dias de armazenamento à 4°C. O tempo 0 representa o TE logo após o preparo das formulações.....	72
Figura 19 - Curvas de DSC dos compostos puros (A) e das formulações (B). Os picos endotérmicos, discutidos no texto, são rotulados em ambas as figuras.	75
Figura 20 - Fotomicrografias do CLN. A – CLN-Branco no aumento de 50µm; B – CLN-PTX no aumento de 2µm; C – CLN--PTX no aumento de 500 nm.	77
Figura 21 - Viabilidade celular avaliada pelo ensaio do MTT para PTX livre, CLN-branco e CLN-PTX em células da linhagem MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) e L929 (C) após 48 horas de tratamento.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais fármacos antineoplásicos utilizados na terapia clínica.....	31
Tabela 2 - Estudos empregando nanossistemas lipídicos como sistemas carreadores do PTX.	42
Tabela 3 - Composição das formulações NE, NLS e CLN.	48
Tabela 4 - Determinação da precisão do método de doseamento do PTX por CLAE.	60
Tabela 5 - Caracterização físico-química de nanocarreadores lipídicos contendo ou não paclitaxel.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência nacional de vigilância sanitária

ATP - Trifosfato de adenosina

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CLN - Carreador lipídico nanoestruturado

CK - Citoqueratina

CMD - Concentração média determinada

CrEL - Cremophor EL®

DEHP - Di (2-etilhexil) ftalato

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP - Desvio padrão

DPR - Desvio padrão relativo

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

EPR - Efeito de permeação e retenção

FDA - *Food and Drug Administration*

FM - Fase móvel

GDP - Guanosina difosfato

GTP - Guanosina trifosfato

HER-2 - Fator de crescimento epidérmico humano tipo 2

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

ICH - Conferência Internacional de Padronização de Requerimentos Técnicos para Registro de
Produtos Farmacêuticos de Uso Humano

INCA - Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva

IP - Índice de Polidispersão

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MSA's - *Microtubule-Stabilizing Agents*

MTT - Brometo de 3-(4,3-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

NE - Nanoemulsão

NLS - Nanopartícula lipídica sólida

OMS - Organização Mundial da Saúde

PARP - Polimerase

PVC - Cloreto de polivinila

PEG - Polietilenoglicol

PTX - Paclitaxel

RNA - Ácido ribonucleico

RE - Receptor de estrógeno

RP - Receptor de progesterona

SFB - Soro fetal bovino

SFM - Sistema fagocitário mononuclear

TCM - Triglicerídeo de cadeia média

TE - Teor de encapsulação

THF - Tetrahidrofurano

TTN - Tumor triplo negativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1	Câncer	25
2.1.1	Câncer de Mama.....	26
2.2	Quimioterapia.....	30
2.3	Paclitaxel	33
2.4	Nanossistemas Lipídicos	38
2.4.1	Nanoemulsões	39
2.4.2	Nanopartículas Lipídicas Sólidas	40
2.4.3	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados	41
3	OBJETIVOS.....	45
3.1	Objetivo geral	45
3.2	Objetivos específicos	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	Materiais	47
4.2	Métodos	47
4.2.1	Desenvolvimento das formulações.....	47
4.2.2	Validação do método de doseamento.....	49
4.2.2.1	Linearidade.....	50
4.2.2.2	Especificidade	50
4.2.2.3	Precisão	50
4.2.3	Caracterização físico-química dos nanocarreadores	51
4.2.3.1	Diâmetro da partícula, Índice de Polidispersão.....	51
4.2.3.2	Potencial zeta.....	51
4.2.3.3	Teor de Encapsulação.....	51

4.2.3.4	Microscopia de Luz Polarizada.....	53
4.2.4	Estudo de Estabilidade.....	53
4.2.5	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	53
4.2.6	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	54
4.2.7	Estudo de Citotoxicidade.....	54
4.2.7.1	Cultivo das Linhagens Celulares.....	54
4.2.7.2	Avaliação da Viabilidade Celular pelo Ensaio de Metabolização do Metiltiazoltetrazólico (MTT).	54
4.2.8	Análise Estatística.....	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1	Validação do método analítico.....	57
5.2	Caracterização físico-química dos nanocarreadores lipídicos.....	60
5.3	Estudo de Estabilidade.....	68
5.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	74
5.5	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	75
5.6	Análise de Citotoxicidade.....	77
6	CONCLUSÃO.....	81
7	PERSPECTIVAS.....	83
8	REFERÊNCIAS.....	85