UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Dendrímeros: uma estratégia para a veiculação de um fármaco
anticâncer

José Fernando Topan

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Dendrímeros: uma estratégia para a veiculação de um fármaco
anticâncer

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção
do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado: José Fernando Topan

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Maldonado Marchetti.

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Topan, José Fernando

Dendrímeros: uma estratégia para a veiculação de um fármaco anticâncer. Ribeirão Preto, 2016.

84 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Marchetti, Juliana Maldonado.

1. Câncer de mama. 2. Sistemas de liberação. 3.Dendrímeros. 4. Paclitaxel.

FOLHA DE APROVAÇÃO

José Fernando Topan

Dendrímeros: uma estratégia para a veiculação de um fármaco anticâncer

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Maldonado
Marchetti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus pais,
José Aparecido Topan e Sônia Maria
Gênova Topan, pelo amor, apoio e
incentivo para alcançar meus
objetivos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela presença constante.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela valiosa oportunidade de aprimoramento profissional.

À Profa. Dra. Juliana Maldonado Marchetti, pelo carinho e acolhimento em seu laboratório, pela amizade, orientação, dedicação, confiança e contribuição científica para realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Roberto S. Santana, da FCFRP-USP, por disponibilizar o espectrofotômetro infravermelho. Ao técnico de laboratório Clóvis R. Silva Jr. pela execução das análises.

Ao Prof. Dr. Luciano Neder Serafim e a Técnica Deise L. Chesca, da FMRP-USP, pelo auxílio nos experimentos de imunohistoquímica.

Aos funcionários do Laboratório Tecnologia Farmacêutica, Fábíola Praça, Henrique Diniz e José Orestes, pela contribuição e auxílio nos experimentos.

Aos amigos e colegas do Laboratório Tecnologia Farmacêutica, Danielle Mano, Giovanni Raspantini, Larissa Bueno, Lívia Borgheti, Lívia Depieri, Marcela Tavares, Marcelo Kravicz, Margarete Moreno, Mayara Trevisani e Thais Abelha pela amizade, incentivo e respeito. Em especial aos doutorandos: Josimar Eloy, Juliana Barcelos e Patrícia Mazureki Campos pela amizade, contribuição científica e colaboração na execução de experimentos.

Às minhas amigas e companheiras de Faculdade: Erika Vargas de Oliveira e Gisely Spósito Vieira, pela amizade, paciência, apoio, incentivo, dedicação.

À minha família, pelo amor incondicional, apoio, incentivo e por tudo que proporcionaram na minha vida, em especial aos meus pais, José Aparecido Topan e Sônia Maria Gênova Topan, e minha irmã, Keli Cristiane Topan.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas	viii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. Câncer de mama	2
1.2. Paclitaxel	4
1.3. Nanotecnologia em sistemas de liberação aplicados ao tratamento do câncer de mama	7
1.4. Dendrímeros.....	10
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Substâncias químicas	18
3.2. Linhagem celular	18
3.3. Equipamentos e acessórios	18
3.4 desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de paclitaxel por espectrofotometria UV-Vis e validação de um método utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	19
3.4.1. Desenvolvimento do método analítico.....	20
3.4.1.1.seletividade	20
3.4.1.2. Linearidade.....	20
3.4.1.3. Precisão	21
3.4.1.4. Exatidão	22
3.4.1.5. Robustez	23
3.4.1.6. Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)	23
3.5. Obtenção do complexo sólido dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Placitaxel.....	24
3.6. Quantificação da complexação PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel por estequiometria	24
3.7. Análise do tamanho de partícula e potencial zeta	24

3.8. Medida de tamanho e concentração de partículas por ml por técnica de análise de rastreamento (NTA).....	25
3.9. Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FT-IR).....	25
3.10. Espectroscopia por ressonância magnética nuclear de ^1H -RMN E ^{13}C -RMN ..	26
3.11. Estudo de solubilidade	26
3.12. Estudo <i>in vitro</i> do perfil de liberação do paclitaxel a partir do complexo PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel	26
3.13. Experimentos em cultura celular	27
3.13.1. Avaliação de citotoxicidade na linhagem celular 4T1	27
3.14. Estudos <i>in vivo</i>	28
3.14.1. Animais.....	28
3.14.2. Estudo de eficácia anti-tumoral da solução de paclitaxel e complexo dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel	28
3.14.3. Análises estatísticas	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Desenvolvimento e validação do método analítico por espectrofotometria uv-vis	30
4.1.1. Seletividade e especificidade	30
4.1.2. Linearidade.....	31
4.1.3. Precisão	32
4.1.4. Exatidão	33
4.1.5. Robustez	34
4.1.6. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	34
4.2. Validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	35
4.2.1. Seletividade.....	35
4.2.2. Linearidade.....	36
4.2.3. Precisão	38
4.2.4. Exatidão	39
4.3. Quantificação da complexação PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel por estequiometria	39
4.4. Análise do tamanho de partícula e medida do potencial zeta	43
4.5. Medida de tamanho e concentração de partículas por ml por técnica de análise de rastreamento (NTA).....	45

4.6. Espectroscopia do infravermelho com transformada de fourier (FT-IR)	47
4.7. Espectroscopia por ressonância magnética nuclear de ^1H -RMN e ^{13}C -RM.	49
4.7.1. Paclitaxel	49
4.7.2. Dendrímero PAMAM- G_4 - NH_2	51
4.7.3. Tampão HEPES	56
4.7.4. Complexo PAMAM- G_4 - NH_2 -Paclitaxel obtido com tampão HEPES	58
4.7.5. Complexo PAMAM- G_4 - NH_2 -Paclitaxel obtido em água	60
4.8. Estudos de solubilidade do paclitaxel.....	62
4.9. Estudos <i>in vitro</i> de liberação de paclitaxel.....	63
4.10. Avaliação da citotoxicidade em célula 4T1	64
4.11. Avaliação antitumoral do complexo PAMAM- G_4 - NH_2 -Paclitaxel <i>in vivo</i> : curva de crescimento tumoral, imunohistoquímica dos tumores, registro de peso e sobrevivência dos animais.	65
 5. CONCLUSÕES	 72
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 74
 Anexo	 85
Certificado de aprovação da comissão de ética no uso de animais	86

RESUMO

TOPAN, J.F. **Dendrímeros: uma estratégia para a veiculação de um fármaco antitumoral**. 2016. 84f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O câncer de mama constitui o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, devido ao seu alto grau de malignidade. A quimioterapia é utilizada no tratamento de câncer de mama com presença de metástase, dentre os fármacos mais utilizados está o paclitaxel, que atua na desestabilização dos microtúbulos na divisão celular, levando a célula neoplásica a apoptose, porém, o paclitaxel é uma molécula extremamente lipofílica, solubilizada em Cremophor® EL, um tensoativo altamente tóxico utilizado na formulação comercial. O objetivo deste trabalho foi desenvolver complexos dendriméricos com paclitaxel para a otimização da terapia do câncer de mama. Para a quantificação do paclitaxel nos sistemas de liberação desenvolvidos foram validados métodos analíticos por espectrofotometria UV-Vis e por cromatografia líquida de alta eficiência. Os métodos foram seletivos, linear, precisos e exatos. Para a obtenção de uma formulação concentrada os complexos foram liofilizados. O complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel foi obtido em diversos meios reacionais, com diferentes faixas de pH, sendo o tampão Hepes, pH 7,4, e água; os meios que obtiveram melhores resultados de complexação, posteriormente foram analisados por DLS e NTA, com diâmetro médio de partícula em 160 nm e potencial zeta catiônico. A caracterização do complexo obtido foi realizada por análises de espectrofotometria no infravermelho e ressonância magnética nuclear. O estudo *in vitro* de liberação do paclitaxel a partir dos complexos dendriméricos foi realizado utilizando membrana de acetato de celulose e quantificação por CLAE. O perfil de liberação demonstrou que após 156 horas, no máximo 35% do fármaco foi liberado. A liberação lenta representa uma vantagem para o tratamento de tumores sólidos, pois idealmente o sistema de liberação deve manter o fármaco encapsulado durante a circulação sanguínea e liberá-lo uma vez acumulado passivamente no sítio tumoral. A citotoxicidade foi avaliada na linhagem tumoral 4T1, através do ensaio do MTT. O complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel apresentou citotoxicidade 5 vezes maior que a formulação comercial. Na avaliação antitumoral *in vivo* do complexo, foram avaliados a curva do crescimento tumoral, o registro de peso, a sobrevivência dos animais e a proliferação celular com o anticorpo ki 67. O complexo dendrimérico teve efeito estatisticamente significativo na redução do volume tumoral e, através da análise de imunohistoquímica foi confirmada a redução da proliferação celular. Portanto, o complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel pode representar uma estratégia promissora para o tratamento de câncer de mama e posteriormente deverá ser avaliada por meio de estudos clínicos.

Palavras-chave: câncer de mama, sistemas de liberação, dendrímeros, paclitaxel.

ABSTRACT

TOPAN, J.F. **Dendrimers: a strategy for an anticancer drug delivery**. 2016. 84f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Breast cancer is the second most common type of cancer worldwide and the most common among women, due to its high degree of malignancy. Chemotherapy is used to treat breast cancer metastasis, among the most widely used drugs are paclitaxel, which operates in the microtubules destabilization in cell division, resulting in neoplastic cell apoptosis, however, paclitaxel is a highly lipophilic molecule which is solubilized in Cremophor® EL, a highly toxic surfactant used in the commercial formulation. The aim of this study was to develop dendrimeric complex with paclitaxel for the optimization of breast cancer therapy. To quantify the paclitaxel in the developed delivery systems, the analytical method was validated by UV-Vis spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. The methods were selective, linear, accurate and precise. To obtain a concentrated formulation, the complexes were lyophilized. The PAMAM-G₄-NH₂-paclitaxel complex was obtained in various reaction media with different pH ranges, with the HEPES buffer, pH 7.4, and water. The media with obtained the best complexation were subsequently analyzed by DLS and NTA, and the mean particle diameter was 160 nm with a cationic zeta potential. The characterization of the obtained complex was performed by infrared and nuclear magnetic resonance spectrophotometric analysis. The in vitro release study of paclitaxel from the dendrimeric complex was evaluated using membranes of cellulose acetate and quantified by HPLC. The release profile showed that after 156 hours at most 35% of the drug was released. The extended release is an advantage for the solid tumors treatment, because ideally the release system should keep the drug encapsulated during blood circulation and release it over time passively accumulated in the tumor site. Cytotoxicity was assessed in tumor cell line 4T1, using the MTT assay, the PAMAM-G₄-NH₂ paclitaxel complex showed cytotoxicity 5 times greater than the commercial formulation. In in vivo antitumor evaluation of the complex were evaluated curve of tumor growth, the weight record, the animal survival and cell proliferation with the antibody ki 67. Dendrimer complex had statistically significant effect in reducing tumor volume and through the immunohistochemical analysis the results were confirmed the reduction of cell proliferation. Therefore, the PAMAM-G₄-NH₂-paclitaxel complex can represent a promising strategy for the breast cancer treatment and should be further evaluated by means of clinical studies.

Keywords: breast cancer, delivery systems, dendrimers, paclitaxel

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2016.	3
Figura 2. Estrutura química do Paclitaxel	5
Figura 3. Formação, estrutura e estabilização dos microtúbulos pelo paclitaxel. Fonte: SOUZA, 2004	5
Figura 4. Mecanismo de ação do paclitaxel na divisão celular. Fonte: SOUZA, 2004.	6
Figura 5: Estratégias potenciais para interações entre dendrímeros e moléculas de fármacos: (A) interações eletrostáticas ou conjugados covalentes, e (B) encapsulação simples. Fonte: CHENG <i>et al.</i> , 2008	11
Figura 6: Dois principais métodos de síntese de dendrímeros: (A) Método divergente; e (B) método convergente. Adaptado de CHENG <i>et al.</i> , 2008.	12
Figura 7. Espectro de varredura do dendrímero PAMAM-G4-NH ₂ e do paclitaxel ...	30
Figura 8. Curva analítica do paclitaxel em solução metanólica (concentrações de 50 a 500µg mL ⁻¹), obtida para estudo de linearidade do método para quantificação da complexação do paclitaxel por espectrofotometria UV-Vis.	31
Figura 9. Representação esquemática do cromatograma do paclitaxel analisado por CLAE utilizando coluna C-18, fase móvel composta por acetonitrila:água (1:1, v/v), vazão de 1,0 mL min ⁻¹ , em 227 nm.	36
Figura 10. Curva analítica do paclitaxel em solução (concentrações de 0,5 a 15 µg mL ⁻¹), obtida para estudo de linearidade do método para a quantificação da liberação do paclitaxel utilizando CLAE	37
Figura 11. Resultado da complexação PAMAM-G4-NH ₂ -paclitaxel em diferentes meios tamponados e em água	40
Figura 12. Alterações causadas na estrutura do dendrímero PAMAM conforme aumento do pH. (A) Estrutura tridimensional, (B) Estrutura Bidimensional. Adaptado de Boas (2004)	41

Figura 13. Protonação do dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂ versus valores de pH. Adaptado de Diallo e Goddard III (2004).....	42
Figura 14. Representação gráfica da distribuição de tamanho de partículas do complexo dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel, obtido em tampão Hepes, pH 7,4	44
Figura 15. Representação gráfica da distribuição de tamanho de partículas do complexo dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel, obtido em tampão borato, pH 9,0	44
Figura 16. Representação gráfica da distribuição de tamanho de partículas do complexo dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel, obtido em água.....	44
Figura 17. Representação gráfica da distribuição de tamanho de partículas do complexo dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel, obtido em tampão Hepes, pH 7,4, por NTA.....	46
Figura 18. Representação gráfica da distribuição de tamanho de partículas do complexo dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel, obtido com água, por NTA	46
Figura 19. Espectro de infravermelho do Dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂ , Paclitaxel, Tampão Hepes e dos complexos obtidos PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel.....	48
Figura 20. Espectro de RMN- ¹ H do paclitaxel	49
Figura 21. Espectro de RMN- ¹³ C do paclitaxel	50
Figura 22. Espectro RMN- ¹³ C DEPT do paclitaxel	50
Figura 23. Divisão da estrutura do dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂	52
Figura 24. Espectro de RMN- ¹ H do dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂	53
Figura 25. Representação química dos grupamentos terciário (rosa), secundário (azul) e primário (verde) do dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂	54
Figura 26. Espectro de RMN- ¹³ C do dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂	54
Figura 27. Espectro RMN- ¹³ C DEPT do dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂	55
Figura 28. Espectro de RMN- ¹ H do tampão HEPES	56
Figura 29. Espectro de RMN- ¹³ C do tampão HEPES.....	57

Figura 30. Espectro RMN- ¹³ C DEPT do tampão HEPES	57
Figura 31. Espectro de RMN- ¹ H do complexo PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel obtido com tampão HEPES	58
Figura 32. Espectro de RMN- ¹³ C do complexo PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel obtido com tampão HEPES	59
Figura 33. Espectro RMN- ¹³ C DEPT do complexo PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel obtido com tampão HEPES.	59
Figura 34. Espectro de RMN- ¹ H do complexo PAMAM-G ₂ -NH ₂ -Paclitaxel obtido com água	60
Figura 35. Espectro de RMN- ¹³ C do complexo PAMAM-G ₂ -NH ₂ -Paclitaxel obtido com água	61
Figura 36. Espectro RMN- ¹³ C DEPT do complexo PAMAM-G ₂ -NH ₂ -Paclitaxel obtido com água.....	61
Figura 37. Solubilidade de paclitaxel em meios contendo tensoativos, Tween 80® ou lauril sulfato de sódio (LSNa), em diferentes concentrações (0,1; 0,5 ou 1%, p/v), a 37°C sob agitação (300 rpm) após 24 h.	62
Figura 38. Perfis <i>in vitro</i> de liberação do paclitaxel a partir dos complexos PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel I e II obtidos através do método de diálise em membrana de acetato de celulose (12,5 kDa), em 50mL de tampão fosfato, pH 7,4, contendo 1,0 % (p/v) de lauril sulfato de sódio, sob agitação de 150 rpm, a 37°C.....	64
Figura 39. Curvas de citotoxicidade em células de câncer de mama 4T1 empregando o método do MTT	65
Figura 40. Tumores de mama desenvolvidos após 14 dias de inoculação das células 4T1 em Camundongo BALB-C.....	67
Figura 41. Avaliação da eficácia terapêutica de grupos solução paclitaxel, controle negativo e Complexo PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel em camundongos BALB/C com tumores de mama desenvolvidos com a célula 4T1. O gráfico representa o acompanhamento do volume tumoral percentual (volume tumoral no momento da medida em relação ao volume tumoral inicial). As doses de paclitaxel de 5 mg/kg administradas duas vezes por semana, totalizado 5 administrações no total. * (p<0,1)	68

Figura 42. Fotografia dos tumores extraídos na biópsia após a realização do estudo *in vivo*. (A) grupo controle negativo; (B) grupo solução de paclitaxel; (C) grupo complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel 69

Figura 43. Ensaio imunohistoquímico com tumores de mama, realizado com teste do anticorpo Ki-67. (A) grupo controle negativo; (B) grupo solução de paclitaxel; (C) grupo complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel 70

Figura 44. Curva de sobrevivência dos animais ao longo do estudo *in vivo* (Os grupos controle negativo e solução paclitaxel ficaram sobrepostos). 71

Figura 45. Registro da massa corporal dos animais ao longo do estudo *in vivo*. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores obtidos para a curva analítica do padrão de paclitaxel.	32
Tabela 2. Resultados obtidos dos estudos de precisão do método para quantificação da complexação do paclitaxel por espectrofotometria UV-Vis.....	32
Tabela 3. Resultados obtidos dos estudos de precisão intermediária do método para quantificação da complexação do paclitaxel por espectrofotometria UV-ViS	33
Tabela 4. Resultados obtidos nos estudos de exatidão do método para quantificação da complexação do paclitaxel por espectrofotometria UV-Vis.....	33
Tabela 5. Resultado da quantificação do paclitaxel com diferentes fornecedores de solventes em temperatura à 4 e 25°C	34
Tabela 6. Valores obtidos para a curva analítica do padrão de paclitaxel.	37
Tabela 7. Resultados obtidos dos estudos de precisão do método para quantificação do paclitaxel liberado por CLAE.	38
Tabela 8. Resultados obtidos dos estudos de precisão intermediária do método para quantificação do paclitaxel liberado por CLAE.	38
Tabela 9. Resultados obtidos nos estudos de exatidão do método para quantificação do paclitaxel liberado por CLAE.	39
Tabela 10. Resultados do potencial zeta e tamanho de partícula, determinados por DLS	43
Tabela 11. Resultados do diâmetro médio e concentração dos complexos obtidos por NTA	47
Tabela 12. Hidrogênios do dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂ e seus respectivos deslocamentos químicos.....	53
Tabela 13. Carbonos do dendrímero PAMAM-G ₄ -NH ₂ e seus respectivos deslocamentos químicos.....	55
Tabela 14. Valores de IC ₅₀ determinados pelo método do MTT	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Cm	Concentração média
C-RMN	Ressônancia magnética nuclear de carbono
ct	Concentração teórica
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
E	Exatidão
FDA	Food and Drug Administration
H-RMN	Ressônancia magnética de hidrogênio
ICH	International Conference on Harmonization
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
RMN	Ressônancia magnética nuclear
SD	Desvio Padrão
UV-Vis	Ultravioleta visível
λ	Comprimento de onda

INTRODUÇÃO

E

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. CÂNCER DE MAMA

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2016). Atualmente, o câncer tornou-se um grande desafio para a medicina, responsável por mais de 13% de ocorrência de morte a cada ano em todo o mundo. Entre eles o câncer de mama é um dos tipos de câncer mais comum, respondendo por cerca de 460 milhões de mortes a cada ano (PRAMANIK et al., 2016). Estima-se que em 2016, o Brasil deve registrar 596.070 novos casos de câncer, entre os homens, são esperados 295.200 novos casos, e entre as mulheres, 300.870 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2016).

Dentre vários tipos de câncer, o de mama representa um grave problema de saúde pública, uma vez que, após o câncer pulmonar, constitui o tipo de câncer mais comum em mulheres nos Estados Unidos. Neste país, em 2007, 202.964 mulheres foram diagnosticadas com esta doença, das quais 40.598 foram à óbito (CENTER FOR CONTROL DISEASE AND PREVENTION, 2012). Mundialmente, a relevância desta doença não é diferente, representando uma das principais causas de morte em países em desenvolvimento, superando doenças como a tuberculose e AIDS (ANDERSON; CHU, 2007).

De acordo aos dados do INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), estima-se que em 2016 serão diagnosticados 67.960 novos casos no Brasil (**Figura 1**), com risco estimado de 56,2 casos para cada 100 mil mulheres, correspondendo a cerca de 28% dos novos casos a cada ano. O câncer de mama também acomete homens, porém é raro, representando apenas 1% do total de casos da doença. Relativamente raro antes dos 35 anos e, acima desta idade, sua incidência cresce progressivamente, especialmente após os 50 anos. Estatísticas indicam aumento da sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Em 2013 o câncer de mama levou à óbito 14.388 pessoas, sendo 181 homens e 14.206 mulheres. A maioria das mortes ocasionadas por esta patologia deve-se ao surgimento de metástases, em virtude do alto grau de malignidade que estes tumores costumam apresentar (CHANG et al., 2007).

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 1. Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2016.

A sobrevida em cinco anos está aumentando na maioria dos países desenvolvidos, aproximadamente 85% durante o período de 2005 a 2009. Por outro lado, a sobrevida em cinco anos é menos de 70% em países como Malásia (68%), Índia (60%), Mongólia (57%) e África do Sul (53%). Na América do Sul, particularmente no Brasil, a sobrevida em cinco anos aumentou entre os períodos de 1995 a 1999 e 2005 a 2009 (de 78% para 87%) (INCA, 2016). A situação enfrentada pelos países em desenvolvimento tem o agravante do menor acesso da população ao sistema de saúde e também às estratégias de prevenção (ANDERSON *et al.*, 2007).

O desenvolvimento do câncer de mama não tem uma causa única. Diversos fatores estão relacionados ao aumento do risco de desenvolver a doença, tais como: idade, fatores endócrinos/história reprodutiva, fatores comportamentais/ambientais e fatores genéticos/hereditários (ADAMI, 2005). Mulheres mais velhas, a partir dos 50 anos de idade, têm maior risco de desenvolver o tumor, devido ao acúmulo de exposições ao longo da vida e as próprias alterações metabólicas, como o envelhecimento (SILVA, 2005, INUMARU *et al.*, 2011). Fatores hormonais principalmente o estímulo do estrógeno, como história de menarca precoce, menopausa tardia, gravidez após 30 anos de idade, contraceptivos. Os fatores comportamentais/ambientais, como ingestão de bebida alcoólica, sobrepeso e obesidade pós menopausa, podem favorecer o desenvolvimento do câncer de mama. (WORLD CANCER RESEARCH FUND; AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 2011).

O tratamento para câncer varia de acordo com o tipo e a gravidade da doença. Estes tumores podem ser tratados com cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou, ainda,

com a combinação dessas técnicas. A quimioterapia, diferente da cirurgia e da radioterapia, é utilizada em tratamento sistêmico, ou seja, que atua em todo corpo, à base de fármacos que impedem a reprodução celular e, conseqüentemente, levam as células malignas à morte. Estes fármacos podem ser ministrados isoladamente (monoquimioterapia) ou combinados (poliquimioterapia), sendo que a última apresenta resultados mais eficazes, pois consegue maior resposta a cada aplicação, diminuindo o risco de resistência aos fármacos e conseguindo atingir as células em diferentes fases do seu ciclo. (SOUZA, 2004). Dentre os agentes utilizados no tratamento do câncer de mama, destacam-se, a epirrubina, a doxorubicina, o tamoxifeno, o docetaxel e paclitaxel.

1.2. PACLITAXEL

O paclitaxel (**Figura 2**), um triterpeno poliidroxilado extraído de *Taxus brevifolia*, uma árvore do Pacífico, foi isolado pela primeira vez em 1971, por WALL e colaboradores, nos EUA. O problema na extração do paclitaxel reside no fato de que a espécie *Taxus brevifolia* demora cerca de 100 a 200 anos para atingir a maturidade e encontra-se em extinção. Para a obtenção de 1 kg do paclitaxel são necessários aproximadamente 10.000 kg da casca da *Taxus brevifolia*, sendo necessário abater cerca de 3.000 árvores. A solução para este problema foi encontrada nas folhas da árvore *Taxus baccata*, da qual se pode extrair a molécula 10-desacetilbacatina-III que apresenta o esqueleto básico e as funcionalidades do paclitaxel. Pode-se obter, via semisíntese e em poucas etapas, o paclitaxel pela acetilação da posição 10 da 10-desacetilbacatina-III e pela introdução da cadeia lateral em posição C-13. Uma vantagem deste método para a obtenção do paclitaxel é que não é necessário se abater as árvores, sendo uma fonte renovável (SOUZA, 2004)

Figura 2. Estrutura química do Paclitaxel

O mecanismo de ação do paclitaxel é através da estabilização dos microtúbulos, impedindo a sua despolimerização necessária à replicação celular, bloqueando, assim, o processo de divisão celular. Os microtúbulos (**Figura 3**) são absolutamente necessários ao processo de divisão celular, sendo usados pelas células para formar uma estrutura estática chamada de citoesqueleto, o qual dá forma à célula e determina a posição das organelas. Devido à sua versatilidade, uso e importância no crescimento celular, os microtúbulos têm sido comumente considerados importantes alvos subcelulares para a atuação de agentes quimioterápicos (SOUZA, 2003).

Figura 3. Formação, estrutura e estabilização dos microtúbulos pelo paclitaxel.
Fonte: SOUZA, 2004

No ciclo de divisão celular, o alvo dos fármacos capazes de atuarem na estabilização dos microtúbulos é a metáfase, impedindo a fase G₂-M na anáfase

(**Figura 4**), podendo ocorrer a morte celular ou a resistência das células aos fármacos utilizados, levando à sobrevivência e multiplicação das mesmas (CARVALHO, 2003).

Figura 4. Mecanismo de ação do paclitaxel na divisão celular. Fonte: SOUZA, 2004.

O paclitaxel é um fármaco citotóxico altamente eficaz, aprovado desde 1992 para o tratamento do câncer. Atualmente, é um dos fármacos de primeira escolha para o tratamento de carcinomas mamários metastáticos e carcinomas ovarianos em estágio avançado (ALLOUACHE et al., 2005). Porém, o mesmo é altamente lipofílico e apresenta baixo índice terapêutico. A preparação comercial injetável disponível no mercado, Taxol® (*Bristol-Myers Squibb*), é uma solução estéril de paclitaxel em Cremophor EL® (óleo de mamona polietoxilado) que possui em cada mL de solução: 6 mg de Paclitaxel, 527mg de Cremophor® EL e 49,7% (v/v) de álcool desidratado. No entanto, foi relatado que o Cremophor EL® é responsável por desencadear uma série de reações, como: dispnéia, vermelhidão, erupções cutâneas, dor no peito, taquicardia, hipotensão, angioedema e urticária generalizada, para evitar essa série de reações faz-se pré-medicação com corticoides e antialérgicos. Desde então, muitos pesquisadores têm buscado novas alternativas para esta formulação (CLINE et al., 2013; FU et al. 2016).

Recentemente, formulações alternativas ao Taxol® têm sido estudadas e desenvolvidas, por exemplo: o Nanotax® (CitiTech, Inc., Lawrence, KS), composta por nanopartícula de paclitaxel estéril em pó (suspensão extemporâneas) com diâmetro médio de 600 nm, Ensaios clínicos de fase I foram realizados recentemente

e demonstraram que a administração das partículas Nanotax[®] proporcionou níveis mais elevados de paclitaxel e prolongado com a exposição sistêmica mínima e uma toxicidade reduzida em comparação com a formulação convencional (FU et al. 2016). Outro exemplo é o Abraxane[®], (Abraxis Bioscience), composto por nanopartículas de albumina com paclitaxel, com diâmetro médio de 130 nm (VISHNU; ROY, 2011).

Os medicamentos quimioterápicos disponíveis atualmente são muito caros, abrigam uma série de efeitos colaterais, incluindo danos às células saudáveis. Há uma grande demanda para desenvolver novos medicamentos antineoplásicos que sejam específicos para cada tipo de câncer (PRAMANIK *et al.*, 2016).

1.3. NANOTECNOLOGIA EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO APLICADOS AO TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

A maioria dos agentes antitumorais utilizados na atualidade apresenta limitações devido ao seu alto nível de efeitos colaterais. Duas estratégias podem ser utilizadas para melhorar a eficiência dos tratamentos quimioterápicos e reduzir seus efeitos colaterais. A primeira delas é o desenvolvimento de novas moléculas de fármacos, capazes de atuar especificamente sobre o processo tumoral, tais como mesilato de imatinibe e trastuzumabe. Entretanto, o desenvolvimento de novos fármacos é um processo lento e que demanda altos investimentos financeiros. A segunda estratégia é o desenvolvimento de nanocarreadores capazes de aumentar o tempo de circulação sanguínea e facilitar o acúmulo do fármaco no sítio tumoral, em detrimento a outros tecidos e órgãos (SOUZA, 2013).

A nanotecnologia tem sido apontada como uma das mais promissoras estratégias para solucionar os problemas relacionados à perda de especificidade de agentes quimioterápicos convencionais, por meio do emprego de nanocarreadores com diâmetro médio entre 10 a 200 nm, face à sua capacidade de penetração intracelular, à grande capacidade de encapsulamento de fármacos e à especificidade por mecanismos passivos e/ou ativos pelas células tumorais (MARTINEZ *et al.*, 2012). Esta é uma alternativa que vem sendo amplamente explorada, em virtude do menor custo e tempo reduzido (em relação ao desenvolvimento de uma nova molécula) para seu desenvolvimento.

Sistemas de liberação nano-estruturados possuem a capacidade de proteger fármacos, através da encapsulação, acomodando o fármaco no interior da estrutura e protegendo-o das degradações enzimáticas e hidrolíticas no trato gastrointestinal, liberando no local alvo uma grande variedade de fármacos para diversas áreas do corpo podendo atuar de forma sustentada, através da via parenteral (NIMESH *et al.*, 2006).

Grandes esforços têm sido feitos na busca de sistemas de liberação “ideais”. Um sistema de liberação deve apresentar as seguintes características: (I) propiciar a liberação do fármaco exclusivamente no seu sítio de ação biológica, minimizando deste modo a quantidade necessária para a obtenção do efeito terapêutico desejado e evitando os efeitos tóxicos, (II) ser capaz de modular o intervalo de administração, a velocidade da liberação e a duração do efeito, de acordo com os diferentes estágios da patologia. Além disso, esses sistemas de liberação idealmente devem melhorar certas características indesejáveis do fármaco como a baixa solubilidade, a baixa biodisponibilidade e a instabilidade (COUTO, 2010).

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas que permitam concentrar os agentes antineoplásicos no sítio tumoral é de suma importância para aumentar o índice terapêutico e melhorar o balanço entre eficácia e toxicidade destes fármacos (TANAKA *et al.*, 2009). Os sistemas de liberação de dimensões nanométricas tornam-se cada vez mais importantes no tratamento e diagnóstico do câncer. Os nanocarreadores são excelentes sistemas para a veiculação de fármacos quimioterápicos uma vez que podem possibilitar o acúmulo do fármaco no sítio tumoral. A inclusão de um fármaco no interior de um sistema nanoestruturado pode levar ainda à redução do *clearance* renal e hepático, além de reduzir o reconhecimento pelo sistema imune alterando, as propriedades farmacocinéticas e a biodistribuição do fármaco (SOUZA, 2013).

Vários sistemas de liberação têm sido empregados com intuito de aumentar a biodisponibilidade de fármacos. Esses sistemas podem ser classificados em diferentes categorias, dentre eles os sistemas lipídicos e poliméricos. Os sistemas lipídicos correspondem as microemulsões, nanoemulsões, lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas. Os sistemas poliméricos abrangem os hidrogéis, nanopartículas poliméricas e dendrímeros (SOUZA *et al.*, 2013), sendo que uma série deles se encontra atualmente nos diversos estágios de estudos clínicos e alguns já são produzidos comercialmente, dentre eles, o Doxil® (lipossomas de doxorrubicina)

foi o primeiro a obter a aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*) para o uso clínico. O Myocet® (complexo de doxorrubicina-citrato encapsulado em lipossomas) e o Caelyx® (Cloridrato de doxorrubicina em lipossoma peguilhado) também foram aprovados pela FDA. Outro sistema relevante foi aprovado na Coreia do Sul é composto de nanopartículas de ácido poli-L-lático peguilhado para a liberação do paclitaxel, o Genexol®-PM, Samyang, está em estudo clínico fase II (SWAMI et al, 2012). Estes sistemas vêm apresentando uma série de vantagens sobre as formulações convencionais, tais como: redução de efeitos adversos, aumento do índice terapêutico, facilidade de administração do medicamento e consequentemente aumento da adesão dos pacientes ao tratamento (LI, WALLACE, 2008).

As pesquisas tecnológicas vêm buscando novas formas de administração e melhoria da absorção com maior tempo de ação do fármaco no organismo. Conforme já mencionado, a mais recente ferramenta para estas pesquisas é a nanotecnologia, que vêm demonstrando grande impacto para a veiculação de fármacos. A expectativa mundial é que a nanotecnologia represente um poderoso instrumento na pesquisa e desenvolvimento em várias áreas, sendo esperado também uma grande revolução no mercado farmacêutico mundial. Graças a novas ferramentas de pesquisa e a desenvolvimentos experimentais e teóricos o domínio científico e tecnológico da escala nanométrica está passando por um surto de crescimento, resultando em novos produtos e processos industriais em um ritmo acelerado. Esta nova situação parece indicar um novo salto da inovação tecnológica, porque oferece oportunidades científicas e industriais que eram impensáveis, até agora (COUTO, 2010).

A nanotecnologia pode ser aplicada para veicular fármacos existentes melhorando o desempenho, a aceitabilidade, pelo aumento da efetividade, a segurança e aderência do paciente e redução dos custos com a saúde (HUGHES, 2005). Dentre os sistemas nano-estruturados na área da tecnologia farmacêutica os dendrímeros vêm se destacando nos últimos anos como estruturas promissoras para a veiculação de diversos tipos de moléculas.

1.4. DENDRÍMEROS

Recentemente uma nova classe estrutural de macromoléculas poliméricas tem atraído a atenção da comunidade científica, que são os compostos poliméricos. Os

dendrímeros, membros desta classe, são estruturas quase esféricas, de dimensão nanométrica, com grande número de subgrupos funcionais reativos e espaços interiores protegidos. Esta combinação única de propriedades torna-os perfeitos para aplicações em diferentes áreas da química e da medicina. A palavra dendrímero origina do grego, onde *dendron* significa árvore, galho e *meros* significa parte, segmento. Os dendrímeros são altamente ramificados, monodispersos, tridimensionais e assemelham-se a estrutura de uma árvore (SAMAD *et al.*, 2009), têm escala nanométrica (2-6 nm), arquitetura globular e massa molecular bem definida, o que os torna potenciais candidatos a sistemas de liberação de fármacos. Estas moléculas foram descobertas no início de 1980 pela equipe de Donald Tomalia (PIASECKA; OLASIK, 2016).

O uso de dendrímeros como sistemas carreadores de fármacos, principalmente para fármacos lipossolúveis, pode aumentar a solubilidade do fármaco por meio de sua encapsulação no interior da estrutura do dendrímero devido ao efeito hidrofóbico, já que o dendrímero apresenta cavidades hidrofóbicas no interior de sua estrutura (KOLHE *et al.*, 2003). A interação entre o dendrímero e o fármaco também pode ocorrer pela formação de pontes de hidrogênio entre grupos polares da molécula do fármaco e aminas presentes no interior e na superfície dos dendrímeros. Para fármacos que apresentam carga positiva ou negativa, pode haver interações eletrostáticas com os grupos de superfície dos dendrímeros (D'EMANUELE *et al.*, 2004).

Outras vantagens dos dendrímeros sobre outros sistemas de liberação de fármacos são: os dendrímeros são capazes de encapsular ou ligar fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos; possuem muitos grupos funcionais na periferia, o que permite várias aplicações biomédicas como a terapia direcionada ao câncer, a imagem de resposta magnética, a terapia fotodinâmica, a terapia de captura de nêutrons; liberação de fármacos programada, o que diminui a toxicidade, aumenta a biodisponibilidade, e torna o tratamento simplificado (CHENG; XU, 2008; SADJADI, 2016).

Dentre as vantagens de se encapsular fármacos em dendrímeros, podemos citar o aumento da solubilidade em água e da estabilidade do fármaco, promoção de uma liberação programada a partir da matriz, resultando em um melhor comportamento farmacocinético e farmacodinâmico. A liberação do fármaco a partir do “esqueleto” do dendrímero pode ser modulada mediante a utilização de diferentes

ligantes (“linkers”) e permitindo o acúmulo específico à partir de modificações dessas estruturas com grupos para *targeting*. (CHENG, XU, 2008). Outra característica importante dos dendrímeros é sua alta solubilidade em um grande número de solventes orgânicos, oferecendo melhores características de processamento e rápida dissolução. (AULENTA *et al.*, 2003). Como estratégias potenciais para interações entre dendrímeros e fármacos temos: (A) Interações eletrostáticas ou conjugados covalentes, e (B) encapsulação. Na estratégia (A), podemos usar fármacos hidrofílicos, e na (B), hidrofóbicos (**Figura 5**) (CHENG *et al.*, 2008).

Figura 5. Estratégias potenciais para interações entre dendrímeros e moléculas de fármacos: (A) interações eletrostáticas ou conjugados covalentes, e (B) encapsulação simples. Fonte: CHENG *et al.*, 2008.

Em geral, dendrímeros de baixa geração possuem uma estrutura aberta. Conforme a geração aumenta, a estrutura se torna mais globular e densa. Os dendrímeros são similares, em tamanho, à um grande número de estruturas biológicas, como por exemplo: os dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) de quinta geração possuem aproximadamente o mesmo tamanho e formato que a hemoglobina (5,5 nm de diâmetro) (ESFAND, TOMALIA, 2001).

Diversos tipos de interação têm sido exploradas. Estas envolvem basicamente o aprisionamento de fármacos no centro da arquitetura dendrítica (envolvendo interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio) e a interação entre o fármaco com a superfície do dendrímero (interações eletrostáticas e covalentes). As aplicações deste tipo de sistema resultam em aumento da solubilidade e da biodisponibilidade do fármaco, atuando como modificadores de liberação e no direcionamento da ação de fármacos (D'EMANUELLE, ATTWOOD, 2005).

Quanto à produção de dendrímeros, destacam-se dois métodos: (A) método convergente, que usa uma estratégia *top-down* e começa a partir da periferia do dendrímero; e (B) método divergente, que começa a partir de um núcleo e se estende para a superfície (**Figura 6**) (CHENG *et al.*, 2008; SADJADI, 2016).

Figura 6. Dois principais métodos de síntese de dendrímeros: (A) Método divergente; e (B) método convergente. Adaptado de CHENG *et al.*, 2008.

Os dendrímeros de poliamidoamina (PAMAMs) têm sido amplamente estudados como sistemas de liberação de fármacos. Os PAMAMs, principalmente os de baixa geração, possuem métodos bem estabelecidos de síntese, estabilidade, disponibilidade e baixa citotoxicidade (KOLHE *et al.*, 2003). A maioria deles apresenta sob a forma líquida viscosa, monodispersa e ramificados. Podem apresentar diferentes grupos funcionais de superfície, como aminas, carboxilas ou hidroxilas. O aumento no número de geração (G0, G1, G2, G3, G4...) dos PAMAMS resulta em um aumento no tamanho de sua estrutura, peso molecular e também no número de grupamentos de superfície (VANDAMME *et al.*, 2005; BUCZKIWSKI *et al.*, 2016).

Atualmente, não existe no mercado nenhum medicamento/cosmético contendo dendrímeros, no entanto, existem vários estudos pré-clínicos, um estudo clínico de Fase I, e algumas patentes que utilizam dendrímeros, o que demonstra a importância desses sistemas. Dentre os estudos pré-clínicos, destacam-se os estudos de associação de dendrímeros com tamsulosin: *in vitro*; indometacina: *in vitro* e *in vivo*; cetoprofeno e diflunisal: *in vitro*; gene delivery: *in vivo* (CHENG *et al.*, 2009). Existe

um estudo clínico de fase I muito interessante, onde o nome da formulação é Viva-Gel®, da empresa Star Pharma. Trata-se de um gel virucida vaginal que previne infecção por HIV e outras DSTs (SAMAD *et al.*, 2009; PIASECKA, OLASIK, 2016).

Na oncologia existem estudos sobre a veiculação de fármacos utilizando estruturas dendriméricas (poliamidopoliaminas) com grupos funcionais que possam se ligar a agentes antineoplásicos (agentes antitumorais), resultando na melhoria da eficácia do medicamento, na redução da toxicidade do fármaco, na melhoria da solubilidade em água e em excelente atividade antitumoral *in vivo* (PIASECKA, OLASIK, 2016). Dendrímeros podem facilmente levar a uma liberação direcionada de medicamentos por segmentação passiva, bem como ativa, o que é conseguido através das unidades de ramificação e grupos de superfície dos dendrímeros. Esta abordagem é particularmente eficaz no tratamento de doenças como o câncer e doenças parasitárias, melhorando o índice terapêutico do fármaco, aumentando a sua eficácia e diminuindo os seus efeitos adversos (KESHARWANI *et al.*, 2014).

A capacidade de solubilização de fármacos antitumorais hidrofóbicos, doxorrubicina e metotrexato, por dendrímeros (G3 e G4) ligados a cadeias de polietilenoglicol (PEG) de massa molecular 550 e 2000 foram comparadas e todos apresentaram um bom desempenho em relação ao número de moléculas complexadas com os dendrímeros e em relação ao perfil de liberação. (KOJIMA *et al.*, 2000).

O dendrímero PAMAM (G4) peguilado, em relação ao dendrímero PAMAM (G4) não-peguilado, demonstrou maior capacidade de ligação à molécula do 5-Fluorouracil, taxa de liberação do fármaco mais lenta e menor toxicidade. (BHADRA *et al.*, 2003). Dendrímeros de poliglicerol foram capazes de aumentar a solubilidade do paclitaxel em quatro ordens de grandeza. (OOYA *et al.*, 2003). A conjugação do fármaco cisplatina com dendrímero PAMAM (G3,5) levou a formação de um complexo com alta solubilidade em água e liberação lenta da platina *in vivo*. (MALIK *et al.*, 1999).

Dentre as patentes, destacam-se as patentes da Unilever, solicitando o uso de dendrímeros para *hair-styling spray*, gel, ou *mousse*; e da L'Oreal para produtos dermatológicos: pele, fibras queratinócitas, unhas e mucosas (TOLIA, CHOI, 2008). Face às propriedades únicas e ao controle preciso que podemos ter sobre a estrutura dos dendrímeros podemos presumir que estas moléculas têm grande potencial para aplicação terapêutica.

OBJETIVOS

2. OBJETIVO

Obter sistemas dendriméricos contendo paclitaxel e avaliar a potencialidade destes como sistemas de liberação para utilização na terapia do câncer.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolvimento e validação do método analítico por espectrofotometria UV-Vis para quantificação do paclitaxel e validação de um método utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para os estudos *in vitro* do perfil de liberação de paclitaxel;
- ✓ Desenvolvimento do método para complexação de PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel;
- ✓ Quantificação do complexo obtido PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel por estequiometria;
- ✓ Caracterização físico-química dos sistemas obtidos utilizando técnicas de DLS, NTA, potencial zeta, espectrometria do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear.
- ✓ Estudos *in vitro* do perfil de liberação do paclitaxel;
- ✓ Estudos de *in vitro* de citotoxicidade pelo método do MTT;
- ✓ Avaliação *in vivo* da eficácia antitumoral do complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel.

MATERIAL

E

MÉTODOS

3.1. SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

- ✓ Acetonitrila, grau HPLC – J.T.Baker;
- ✓ Ácido clorídrico P.A. – Synth;
- ✓ Água ultra purificada pelo sistema Milli-Q (filtro Gradient – Millipore);
- ✓ Brometo de (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) – Sigma;
- ✓ Dendrimero PAMAM G₄-NH₂ – Sigma;
- ✓ Fosfato de potássio monobásico anidro P.A. – Synth;
- ✓ Fosfato de sódio bifásico heptahidratado P.A. – Synth;
- ✓ HEPES, minimum 99,5% titration – Sigma;
- ✓ Hidróxido de sódio P.A. – Synth;
- ✓ Lauril sulfato de sódio (LSNa) – Henrifarma;
- ✓ Metanol, grau HPLC – J.T.Baker;
- ✓ Metanol, grau HPLC – Synth;
- ✓ Paclitaxel - APIchem;
- ✓ Paclitaxel P.A – Sigma;
- ✓ RPMI 1640 – Gibco;
- ✓ Solução de antibiótico/antimicótico – Gibco;
- ✓ Soro bovino fetal – Gibco;
- ✓ Tripsina - Gibco

3.2. LINHAGEM CELULAR

- ✓ 4T1 (ATCC®CRL-2539TM) – ATCC

3.3 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- ✓ Agitador de tubos – MS1 minishaker, IKA;
- ✓ Agitador magnético – MAG MULTI, Marte;
- ✓ Agitador ultraturrax – IKA;
- ✓ Balança analítica – Adventurer™, Ohaus;
- ✓ Balança semi-analítica – AS 2000C, Marte;
- ✓ Banho ultrassônico – Quimis;

- ✓ Banho-Maria – Q 335D, Quimis;
- ✓ Centrífuga – Eppendorf;
- ✓ Cromatógrafo a líquido constituído por uma bomba modelo LC-10AD, detector UV-VIS modelo SPD-10AVP injetor Rheodyne e integrador
- ✓ Dissolutor – SR8 Plus, Hanson Corporation;
- ✓ Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) IRPrestige-21 – Shimadzu;
- ✓ Espectrofotômetro de UV-VIS UV160U – Shimadzu;
- ✓ Estufa de cultivo celular – Thermo;
- ✓ Leitor de placa de Elisa – Thermo;
- ✓ Leitor de tamanho de partícula e potencial zeta Zetasizer 3000 HSA - Malvern Instruments;
- ✓ Medidor de pH – DM 20, Digimed;
- ✓ Micropipetas automáticas ajustáveis de 20 a 200 µL, 100 a 1000 µL e 1 a 5 mL – Finnpiquette;
- ✓ Microscópio invertido - Leica;

3.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE PACLITAXEL POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para validação dos métodos foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Os parâmetros utilizados basearam-se nas normas e especificações da diretriz da ANVISA (Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 – “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” e recomendações do ICH -Harmonised Tripartite Guideline.

3.4.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

A solução padrão estoque foi preparada pesando-se exatamente 10 mg de paclitaxel que foi dissolvido em metanol e seu volume completado para 10 mL em um balão volumétrico. O fármaco foi solubilizado com o auxílio do banho de ultrassom e a concentração final de paclitaxel foi de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Diluições apropriadas desta em metanol foram realizadas para o procedimento da validação em espectrofotometria UV-Vis. Para validação do método foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação.

Para os estudos de liberação *in vitro* do paclitaxel, foi empregado o método por CLAE descrito por YANG et al., 2007. A análise foi realizada com coluna de fase reversa C₁₈ (4,6 x 250 mm, 5 μm), com fase móvel composta por acetonitrila e água (50:50, v/v), vazão de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 μL , temperatura de 25°C e detecção no UV (comprimento de onda de 227 nm). Para validação do método foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão.

3.4.1.1. SELETIVIDADE

Para a validação em espectrofotometria UV-Vis avaliou-se a especificidade pela comparação da varredura no UV de amostras do dendrímero PAMAM-G4-NH₂ em metanol e do paclitaxel em metanol. Foi utilizado metanol como branco no espectrofotômetro e as varreduras comparadas para a escolha do comprimento de onda ideal para a quantificação do paclitaxel no complexo obtido. Para a validação em cromatografia líquida de alta eficiência a seletividade pela comparação dos resultados obtidos de amostras de paclitaxel contaminadas com dendrímero PAMAM-G4-NH₂ e meio de dissolução.

3.4.1.2. LINEARIDADE

A avaliação da linearidade de um método analítico tem por objetivo verificar a proporcionalidade entre a concentração do analito e a resposta obtida. A linearidade foi determinada a partir da média de cinco curvas analíticas preparadas com seis

diferentes concentrações da solução padrão de paclitaxel: 50, 100, 150, 250, 400 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para validação em espectrofotometria UV-Vis. Para a linearidade em CLAE foi determinada a partir da média de cinco curvas analíticas preparadas com cinco diferentes concentrações da solução padrão de paclitaxel: 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para validação em espectrofotometria UV-Vis. O gráfico correlacionando as concentrações do fármaco e as áreas de seus respectivos picos foi construído conforme descrito anteriormente. A equação da reta, que expressa a curva analítica, ou seja, estabelece uma relação entre a resposta medida e a concentração do analito, sendo utilizada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra.

$$y = ax + b$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância ou área do pico)

x= concentração do analito

a = coeficiente angular (inclinação da curva)

b= coeficiente linear (intersecção da curva com o eixo y)

A determinação da linearidade foi realizada por meio do coeficiente de correlação linear (r), obtido a partir da regressão linear da curva analítica. Com $r > 0,99$ como aceitável.

3.4.1.3. PRECISÃO

A determinação da precisão do método foi realizada por meio de estudos intraensaios (repetibilidade) e intrensaios (precisão intermediária). Os parâmetros foram avaliados em espectrofotometria UV-Vis. Foram utilizadas soluções de padrão de paclitaxel (50, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e para CLAE (0,5, 5,0 e 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para a determinação da repetibilidade as análises de 10 replicatas foram realizadas em um mesmo dia, já precisão intermediária foi avaliada em triplicata, por cinco dias consecutivos. Os resultados da precisão do método foram apresentados através do

desvio padrão relativo (DPR), calculado pela razão do desvio padrão com a média dos valores obtidos.

Os resultados da precisão do método foram apresentados através do desvio padrão relativo (DPR).

$$DPR\% = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Onde:

DP = desvio padrão

CMD = Concentração média determinada

Considerou-se como aceitável: $DPR < 5,0\%$.

3.4.1.4. EXATIDÃO

A exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A determinação da exatidão foi feita pelo método da recuperação do analito. Foram utilizadas três concentrações obtidas através da diluição da solução padrão de paclitaxel para validação em espectrofotometria UV-Vis (50, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e para CLAE (0,5, 5,0 e 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O teste foi realizado em quintuplicata e o resultado da exatidão foi expresso em porcentagem.

$$Exatidão = \frac{CME}{CT} \times 100$$

Onde:

CME = Concentração média experimental

CT = Concentração teórica

3.4.1.5. ROBUSTEZ

A robustez foi avaliada em dois parâmetros distintos: temperatura e fabricante do solvente. No caso da temperatura, foram realizadas análises a 4°C e 25°C. Para o solvente, duas marcas de fabricantes (Synth® e J.T. Backer®) de metanol foram testadas. Em cada um desses parâmetros foram realizadas leituras de três amostras na concentração de 250 µg mL⁻¹.

3.4.1.6. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

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

O limite de detecção e quantificação foram determinados matematicamente através das Equações.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Onde:

DPa = desvio padrão médio do intercepto com o eixo y de no mínimo 3 curvas padrão

IC = inclinação da curva de calibração

3.5. OBTENÇÃO DO COMPLEXO SÓLIDO DENDRÍMERO PAMAM-G₄-NH₂-PLACITAXEL

Em um erlenmeyer foram adicionados 100 mg de paclitaxel e dissolvido em 50 mL de metanol, após solubilização foi acrescentado 1,0 mL do dendrímero PAMAM-G₄-NH₂. Essa mistura reacional foi agitada a 300 rpm por 24 horas ao abrigo da luz e em seguida o solvente foi totalmente evaporado com o auxílio de ar comprimido. Após secagem, no mesmo erlenmeyer, o complexo foi resuspendido com 50 mL de água purificada ou 50 mL de tampão HEPES, pH 7,4 ou 50 mL de tampão borato, pH 9,0. Essa mistura foi novamente agitada por 24 horas ou 48 horas sob abrigo da luz. Após esse período a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 300 rpm (956 g), em seguida o sobrenadante foi filtrado à vácuo em membrana PVDF 0,45 µm. As soluções aquosas obtidas do complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel foram congeladas em refrigerador -11°C e liofilizada, obtendo um complexo em forma de pó de coloração branca.

3.6. QUANTIFICAÇÃO DA COMPLEXAÇÃO PAMAM-G₄-NH₂-PACLITAXEL POR ESTEQUIOMETRIA

Aproximadamente 3 mg do complexo foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e seu volume foi completado com metanol. Após solubilização do complexo foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 270 nm. A quantificação foi expressa em número de mols.

3.7. ANÁLISE DO TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA

As análises de diâmetro médio, distribuição do tamanho das partículas e potencial zeta foram realizadas por espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering*), utilizando o equipamento Zetasizer 300 HSA, utilizando o laser de HeNe com comprimento de onda de 633 nm, ângulo de detecção de 173° e volume de

amostra de 1 mL (Malvern Instruments, UK). As amostras foram diluídas (1:100) e suspensas em água Mili-Q® para realização das análises.

3.8. MEDIDA DE TAMANHO E CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS POR mL POR TÉCNICA DE ANÁLISE DE RASTREAMENTO (NTA)

A medida de tamanho das nanopartículas e concentração de partículas em suspensão do complexo PAMAM-G4-NH₂-Paclitaxel obtidos com tampão HEPES e água ultra purificada obtida por sistema Mili-Q® foi realizada pela técnica de análise de rastreamento de nanopartículas em aparelho NanoSight (NS 300, Reino Unido) com software NTA 3.1 Analytical (NanoSight, UK). Esta técnica é baseada no espalhamento dinâmico de luz laser provocado pelas partículas. Esse equipamento é acoplado a um microscópio com câmera que produz vídeos do constante movimento browniano das partículas.

Os complexos foram diluídos na proporção de 1:1000 (v/v) em água ultra purificada obtida por sistema Mili-Q® e carregadas com auxílio de uma seringa estéril na câmara do porta-amostra, com ausência de bolhas de ar. As amostras foram medidas com feixe de laser vermelho de $\lambda = 638$ nm a 25° C. Foram feitos os ajustes necessários nos parâmetros específicos do equipamento de acordo com a amostra. Os resultados obtidos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão para as medições realizadas para cada amostra ($n = 4$).

3.9. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Os experimentos foram realizados com o uso do equipamento Shimadzu IRPrestige-21. As amostras foram previamente homogeneizadas e compactadas com brometo de potássio em prensa hidráulica. As análises foram realizadas com resolução de 2 cm⁻¹, de 5000 a 500 cm⁻¹.

3.10. ESPECTROSCOPIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H -RMN E ^{13}C -RMN

As análises de RMN de ^{13}C 125 MHz, ^1H 500 MHz foram realizadas em um espectrômetro Bruker avance DRS – 500 MHz. Cada uma das amostras de aproximadamente 5 mg foi dissolvida em metanol deuterado, filtrada e acondicionada em tubo de quartzo de 5 mm de diâmetro externo. As leituras foram realizadas e os deslocamentos comparados entre cada componente da formulação e os complexos.

3.11. ESTUDO DE SOLUBILIDADE

Os estudos de solubilidade do paclitaxel foram realizados previamente aos estudos *in vitro* de liberação pela adição de excesso de fármaco (1mg/mL) em 5 mL de meio tampão fosfato pH 7,4, acrescido ou não de Tween 80® ou lauril sulfato de sódio 0,1, 0,5 ou 1% (p/v), a 37°C, submetido à agitação de 600 rpm. Após 24 h, as amostras foram filtradas (0,45 μm), diluídas com acetonitrila e analisadas por CLAE.

3.12. ESTUDO *in vitro* DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DO PACLITAXEL A PARTIR DO COMPLEXO PAMAM-G₄-NH₂-PACLITAXEL

O estudo *in vitro* do perfil de liberação, visando avaliar a quantidade dos fármacos liberados por unidade de tempo, foi desenvolvido com modificações a partir do estudo de KOZIARA *et al.*, 2004, e foram realizados em dissolutor (n = 3) na temperatura de $37 \pm 0,5$ °C em meio de dissolução tampão fosfato, pH 7,4, acrescido de 1,0 % (v/v) de lauril sulfato de sódio (LSNa) para manter as *sink conditions* com agitação de 150 rpm. Neste estudo, foi utilizado um aparato adaptado baseado no trabalho de Praça e colaboradores (2008), visando avaliar e minimizar os efeitos do mesmo no perfil de liberação do paclitaxel. O aparato foi composto por um cilindro de PVC envolto por uma membrana de diálise de acetato de celulose em uma das extremidades contendo a formulação fixado em haste do aparato cesta pela outra extremidade e submerso no meio de dissolução. Amostras de 1,0 mL foram coletadas da cuba nos tempos 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120,

132 e 156 (h), filtradas com filtro de 45 μm e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.13. EXPERIMENTOS EM CULTURA CELULAR

3.13.1. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE NA LINHAGEM CELULAR 4T1

A linhagem 4T1 foi cultivada em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de FBS e 1% de solução de antibiótico/antimicótico. As células 4T1 foram cultivadas, respectivamente, a 37°C e incubadas em estufa sem e com 5% de CO₂ de acordo a recomendações da ATCC. Após atingir a confluência de 90%, células foram tripsinizadas e transferidas para placas de fundo chato de 96 poços (10.000 células por poço) e incubadas por 24h a 37°C. Após a remoção do meio de cultura completo, os poços foram lavados com PBS, pH 7,4, e os grupos experimentais diluídos em meio incompleto (sem FBS) foram aplicados nas placas e foram incubadas novamente a 37°C por 72h. Após incubação, os poços foram lavados com PBS e aplicou-se o meio incompleto com solução de MTT (2,5 mg mL⁻¹), incubados por 4 horas 37°C. Subsequentemente, o meio contendo MTT foi descartado e DMSO foi adicionado para dissolver os cristais de formazan. A absorbância foi lida a 570 nm. A concentração resultante em 50% de morte celular (IC₅₀) foi calculada pelas curvas de concentração-efeito.

3.14. ESTUDOS *IN VIVO*

3.14.1. ANIMAIS

Para os experimentos *in vivo* foram empregados camundongos fêmeas BALB-C com idade aproximada de 6-8 semanas. Os animais foram separados em grupo (n = 5) por caixa, com temperatura controlada de 25°C com ciclos de 12h de claro e escuro, e alimentação e água foram fornecidos *ad libitum*. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos aprovados pela Universidade de São Paulo. O estudo foi realizado no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de

Ribeirão Preto. O estudo foi previamente submetido à aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - protocolo número 15.1.806.60.5.

3.14.2. ESTUDO DE EFICÁCIA ANTI-TUMORAL DA SOLUÇÃO DE PACLITAXEL E COMPLEXO DENDRÍMERO PAMAM-G₄-NH₂-PACLITAXEL

Para comprovar a ação terapêutica do complexo desenvolvido, foram desenvolvidos tumores intramamários em camundongo fêmeas BALB-C através da inoculação de células de câncer de mama (4T1), na quantidade de $(1 \times 10^5 \text{ células. mL}^{-1})$, em ambas as mamas. O tratamento foi iniciado após duas semanas, tempo necessário para o aparecimento dos tumores (MERAZ *et al.*, 2014). Foi administrada duas vezes por semana a dose de paclitaxel foi 5 mg. kg^{-1} , totalizando 5 administrações (BLANCO *et al.*, 2014). O tratamento intraperitoneal foi realizado de acordo com os grupos: (I) salina (controle negativo); (II) Paclitaxel solução; (III) Complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel. O volume tumoral e o peso corporal dos animais foram monitorados ao longo estudo, quando os animais foram sacrificados por meio da aplicação de sobredose anestésica. As medições do comprimento e a largura dos tumores foram realizadas com a periodicidade de duas vezes por semana, para o cálculo do volume tumoral pela equação (MAEDA *et al.*, 2004; PHOENIX, VUMBACA, CLAFFEY, 2009):

$$\text{Volume tumoral} = (\text{comprimento tumoral} \times \text{largura tumoral}^2)/2$$

Concluído estudo, os tumores foram removidos, fotografados e submetidos a avaliação imunohistoquímica utilizando o anticorpo Ki67.

3.14.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para o experimento *in vivo* os resultados obtidos foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (SD). O teste t de *student* foi empregado e a significância estatística foi estabelecida como $p < 0,1$ (*).

RESULTADOS

E

DISCUSSÃO

4.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis

4.1.1. SELETIVIDADE E ESPECIFICIDADE

A seletividade avalia o grau de interferência de outros componentes da formulação, como excipientes, ativos, impurezas e produtos de degradação que possam estar presentes, garantindo que esses componentes não interfiram na quantificação do fármaco. O dendrímero PAMAM-G4-NH₂ absorve no comprimento de onda de aproximadamente 250 nm e o Paclitaxel absorve aproximadamente em 290 nm (**Figura 7**). Assim, o comprimento de escolhido para a validação e quantificação do método foi o de 270 nm, região em que o dendrímero não absorve, sendo quantificado apenas o paclitaxel.

Figura 7. Espectro de varredura do dendrímero PAMAM-G₄-NH₂ e do paclitaxel.

4.1.2. LINEARIDADE

O método desenvolvido apresentou linearidade na faixa de, 50 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Através do ajuste dos dados de regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados foi possível determinar a equação da curva analítica, sendo: $y = 0,0019x - 0,0382$, onde x representa a concentração do fármaco em $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o y absorvância da amostra, representado na **figura 8**.

Figura 8. Curva analítica do paclitaxel em solução metanólica (concentrações de 50 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), obtida para estudo de linearidade do método para quantificação da complexação do paclitaxel por espectrofotometria UV-Vis.

O coeficiente de determinação obtido foi $R^2=0,9999$. Os valores de concentrações média (C_m) calculadas pela equação da regressão, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Valores obtidos para a curva analítica do padrão de paclitaxel.

Ct	Cm (n=5)	DP	DPR(%)
500	501,22	0,755	0,150
400	401,70	1,072	0,267
250	251,89	0,730	0,289
150	151,82	1,327	0,874
100	99,83	0,265	0,265
50	50,86	0,512	1,007

Ct: Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

Cm: Concentração média calculada de cinco determinações ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

DP: Desvio padrão;

DPR: Desvio padrão relativo.

4.1.3. PRECISÃO

Precisão é a avaliação da proximidade entre os resultados obtidos em um série de medidade de uma mesma amostra, ou seja, avalia a dispersão dos resultados oriundos de ensaios independentes de uma amostra, sendo determinada através do desvio padrão relativo. O estudo da repetibilidade realizado revelou que o desvio padrão relativo máximo foi 1,854 (**Tabela 2**), valor este inferior ao preconizado pela ANVISA de 5%. A precisão intermediária foi avaliada em cinco dias consecutivos por três níveis de concentração apresentou um desvio padrão relativo máximo de 1,783 (**Tabela 3**) demonstrando que o método é preciso.

Tabela 2. Resultados obtidos dos estudos de precisão do método para quantificação da complexação do paclitaxel por espectrofotometria UV-Vis.

Ct	Cm (n=10)	DP	DPR%
500	499,71	3,17	0,634
250	248,94	1,778	0,714
50	51,97	0,964	1,854

Ct: Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

Cm: Concentração média calculada de dez determinações ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

DP: Desvio padrão;

DPR: Desvio padrão relativo.

Tabela 3. Resultados obtidos dos estudos de precisão intermediária do método para quantificação da complexação do paclitaxel por espectrofotometria UV-Vis.

Ct	Cm (n=5)	DP	DPR (%)
500	500,62	4,444	0,887
250	251,88	4,388	1,742
50	49,46	0,882	1,783

Ct: Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

Cm: Concentração média calculada em cinco diferentes dias ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

DP: Desvio padrão;

DPR: Desvio padrão relativo.

4.1.4. EXATIDÃO

O termo exatidão refere-se ao grau de concordância entre o valor médio obtido e o valor de referência, considerado como verdadeiro, sendo expressa em porcentagem (ANVISA, 2003). A **Tabela 4** demonstra que nos três níveis de concentração avaliados houve boa recuperação do analito cujo intervalo de exatidão está compreendido entre 98,30 e 101,09%. O desvio padrão relativo dessas amostras apresentou o valor de 1,75%. Esses resultados demonstram que o paclitaxel pode ser corretamente identificado por espectrofotometria no UV.

Tabela 4. Resultados obtidos nos estudos de exatidão do método para quantificação da complexação do paclitaxel por espectrofotometria UV-Vis.

Concentração teórica	Cm (n=5)	Dp	DPR(%)	E(%)
50 μg	49,152	0,862	1,754	98,304
250 μg	252,73	1,343	0,531	101,092
500 μg	502,41	1,473	0,293	100,482

Ct: Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

Cm: Concentração média calculada ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

DP: Desvio padrão;

DPR: Desvio padrão relativo;

E: Exatidão.

4.1.5. ROBUSTEZ

A robustez de um método é definida como a sua capacidade de resistir a pequenas variações nos parâmetros analíticos, sem que haja prejuízo nos resultados obtidos, servindo, desta maneira, como indicador de confiabilidade no uso corrente. Durante o desenvolvimento de um método analítico, é fundamental que seja efetuado o estudo de robustez, pois, caso seja detectada alguma susceptibilidade do mesmo frente a alguma variação analítica, a mesma deve ser controlada rigorosamente e precauções devem ser incluídas no procedimento operacional (ANVISA, 2003).

Foram testados solventes de duas marcas diferentes Synth e JT Backer e em diferentes temperaturas para quantificar a concentração de 250 µg mL⁻¹. Tanto a avaliação da mudança de temperatura como a de fabricante de solvente não apresentaram alterações na quantificação do paclitaxel por espectrofotometria. Em todas as análises o valor máximo de desvio padrão relativo não ultrapassou 0,730% (**Tabela 5**).

Tabela 5. Resultado da quantificação do paclitaxel com diferentes fornecedores de solventes em temperatura à 4 e 25°C.

Concentração teórica	Cm (n=3)	DP	DPR (%)	Exatidão
250µg - Synth 4°C	251,60	0,710	0,282	100,64
250µg - JT Baker 4°C	252,50	1,844	0,730	101,00
250µg - Synth 25°C	251,83	0,658	0,261	100,73
250µg - JT Baker 25°C	251,50	1,750	0,695	100,60

Cm: Concentração média calculada (µg mL⁻¹);

DP: Desvio padrão;

DPR: Desvio padrão relativo.

4.1.6. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de detecção correspondente à menor concentração do analito que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada. No caso de métodos instrumentais, como espectrofotometria UV-Vis, o mesmo pode ser determinado por meio de uma relação estabelecida entre o desvio padrão do intercepto com o eixo das

ordenas e a inclinação da curva (ANVISA, 2003). Através do cálculo do limite de detecção mostrou que o método é capaz de detectar concentrações de até $6,018 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O limite de quantificação corresponde à menor concentração do analito em que são atendidos os requisitos de precisão e exatidão aceitáveis, empregando-se as condições analíticas previamente estipuladas (ANVISA, 2003). Assim sendo, o limite de quantificação para o método em questão foi de $20,05 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os resultados apresentados nos testes de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação mostraram que o método desenvolvido é adequado para quantificar o paclitaxel complexado no dendrímero.

4.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

4.2.1. SELETIVIDADE

A avaliação da seletividade utilizada neste estudo, foi feita através da comparação da formulação que não contém de paclitaxel e a formulação com paclitaxel (padrão analítico), o mesmo foi feito com o meio de dissolução, tampão fosfato, pH 7,4, acrescido de 1% de laurel sulfato de sódio. Os componentes testados não devem eluir no mesmo tempo de retenção do paclitaxel. Para isso utilizamos a mesmas condições empregada no método cromatográfico descrito por YANG e colaboradores (2007), que possibilitou a análise do fármaco com tempo de retenção equivalente a 10 minutos (**Figura 9**).

Figura 9. Representação esquemática do cromatograma do paclitaxel analisado por CLAE utilizando coluna C-18, fase móvel composta por acetonitrila:água (1:1, v/v), vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, em 227 nm.

Os resultados obtidos pela análise das soluções de paclitaxel em acetonitrila contaminados com dendrímero PAMAM-G4-NH₂ e meio de dissolução mostraram que estes compostos não afetaram a quantificação do fármaco, porque não exibiram picos cromatográficos coincidentes com tempo de retenção característico do paclitaxel.

4.2.2. LINEARIDADE

O método desenvolvido por CLAE apresentou linearidade na faixa de, 0,50 a $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após o ajuste dos dados por regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados, os valores das áreas obtidas mostraram ser diretamente proporcionais à concentração de fármaco, no intervalo avaliado, cuja equação da curva analítica equivale a $y=112811x - 30350$, onde x = representa a concentração de fármaco em $\mu\text{g mL}^{-1}$ e y = área da amostra (**Figura 10**).

Figura 10. Curva analítica do paclitaxel em solução (concentrações de 0,5 a 15 µg mL⁻¹), obtida para estudo de linearidade do método para a quantificação da liberação do paclitaxel utilizando CLAE.

O coeficiente de determinação obtido foi $R^2=0,9994$. Os valores de de concentrações média (C_m) calculadas pela equação da regressão, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Valores obtidos para a curva analítica do padrão de paclitaxel

Concentração teórica (µg mL ⁻¹)	C_m (n=5)	DP	DPR (%)
0,5	0,522	0,0248	4,75
1,0	0,98	0,0291	2,96
5,0	5,132	0,1380	2,68
10,0	10,098	0,2393	2,36
15,0	15,166	0,2079	1,36

C_m : Concentração média calculada (µg mL⁻¹);

DP: Desvio padrão;

DPR: Desvio padrão relativo.

4.2.3. PRECISÃO

O estudo da repetibilidade realizado apresentou desvio padrão relativo máximo de 4,163% (**Tabela 7**), valor este inferior ao preconizado pela ANVISA de 5%. A precisão intermediária foi avaliada em cinco dias consecutivos por três níveis de concentração apresentou um desvio padrão relativo máximo de 4,41% (**Tabela 8**) demonstrando que o método é preciso.

Tabela 7. Resultados obtidos dos estudos de precisão do método para quantificação do paclitaxel liberado por CLAE.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cm (n=10)	DP	DPR (%)
0,5	0,526	0,0219	4,163
5,0	5,148	0,1533	2,97
15,0	15,234	0,2779	1,84

Cm: Concentração média calculada ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

DP: Desvio padrão;

DPR: Desvio padrão relativo.

Tabela 8. Resultados obtidos dos estudos de precisão intermediária do método para quantificação do paclitaxel liberado por CLAE.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cm (n=3)	DP	DPR (%)
0,5	0,53	0,0234	4,41
5,0	5,192	0,1473	2,83
15,0	15,16	0,3116	2,05

Cm: Concentração média calculada ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

DP: Desvio padrão;

DPR: Desvio padrão relativo.

4.2.4. EXATIDÃO

A **Tabela 9** mostra que nos três níveis de concentração avaliados houve a recuperação do analito cujo intervalo de exatidão está compreendido entre 101,10 e 104,80%. O desvio padrão relativo dessas amostras apresentou o valor de 4,96%. Esses resultados demonstram que o paclitaxel pode ser corretamente quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 9. Resultados obtidos nos estudos de exatidão do método para quantificação do paclitaxel liberado por CLAE.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cm (n=5)	DP	DPR (%)	Exatidão (%)
0,5	0,524	0,0260	4,96	104,80
5,0	5,23	0,1736	3,31	104,60
15,0	15,166	0,3750	2,47	101,10

Cm: Concentração média calculada ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

DP: Desvio padrão;

DPR: Desvio padrão relativo.

Os resultados apresentados nos testes de seletividade, linearidade, precisão e exatidão mostraram que o método de YANG e colaboradores (2007) e adaptado, mostrou-se adequado para quantificar a liberação do paclitaxel no presente estudo.

4.3. QUANTIFICAÇÃO DA COMPLEXAÇÃO PAMAM-G₄-NH₂-PACLITAXEL POR ESTEQUIOMETRIA

O resultado da complexação do PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel utilizando soluções tamponadas e água está apresentado na **Figura 11**. Observamos que a diferença de tempo de complexação não influenciou a complexação do fármaco ao dendrímero. Já os sistemas tamponados influenciaram. O tampão HEPES, pH 7,4, apresentou maior eficiência de complexação paclitaxel-dendrímero. De acordo com Devarakonda *et al.* (2007), o pH do meio influencia no processo de complexação, determinadas faixas de pH são capazes de promover a ionização do dendrímero, podendo aumentar ou diminuir a interação entre dendrímero-fármaco.

Figura 11. Resultado da complexação PAMAM-G₄-NH₂-paclitaxel em diferentes meios tamponados e em água.

Dentre todos os fármacos utilizados no tratamento do câncer de mama, por exemplo, doxorrubicina, ciclofosfamida e 5-flouracil são ionizáveis, com exceção do paclitaxel, que é uma base forte (MAHONEY, 2003). Sendo assim, os diferentes meios reacionais utilizados na complexação alteraram a conformação e a protonação do dendrímero. Os complexos obtidos com tampão borato, pH 9,0, o dendrímero PAMAM G4 NH₂ está totalmente desprotonado não favorecendo a complexação Dendrímero-Paclitaxel. Segundo Liu *et al.* (2009) o aumento do pH promove a diminuição da estrutura do dendrímero devido à redução do seu grau de ionização de seus radicais amino. Em pH próximo de 10 a estrutura do dendrímero está totalmente desprotonada prevalecendo interações como as ligações de hidrogênio e outras do tipo dipolo-dipolo.

Estudos de dinâmica molecular realizados por diferentes grupos de pesquisa mostraram que os dendrímeros, podem se adaptar ao meio “diminuindo” ou “estendendo” sua conformação dependendo da polaridade, força iônica e pH. As aminas primárias (terminais) do dendrímero PAMAM apresentam uma configuração estendida em pH baixo devido a repulsão eletrostática entre as aminas terciárias protonadas do seu interior e as aminas primárias da superfície (**Figura 12**) (BOAS, 2004).

Figura 12. Alterações causadas na estrutura do dendrímero PAMAM conforme aumento do pH. (A) Estrutura tridimensional, (B) Estrutura Bidimensional. Adaptado de Boas (2004).

As amins primárias presentes na superfície dos dendrímeros PAMAM-G4 possuem um pK_a de aproximadamente 9,0, já as amins terciárias presentes no interior possuem um pK_a de 5,8 e o grupo terciário central possui um pK_a de 3,5. Assim os dendrímeros podem acumular cargas positivas pelas protonação das amins primárias superficiais e das amins terciárias presentes no seu interior. Então, suas cargas são pH dependente, e estas cargas são positivas em pH baixo e neutras em pH alto (SHCHARBIN *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2015).

O dendrímero PAMAM-G4-NH₂ é composto por 64 amins terciárias. Em pH em torno de 7,0 as amins externas estão protonadas (LIU *et al.*, 2009) o que pode ter favorecido melhor complexação em tampão HEPES, pH 7,4. Podemos supor que houve interação íon-dipolo dos grupamentos protonados com as carboxilas presentes na molécula do paclitaxel. Também deve ser levado em consideração a presença de íons na solução, provenientes do tampão, que podem promover alterações no ambiente de solvatação de sua estrutura e, conseqüentemente, influenciar a forma como ocorrem as interações entre o dendrímero e a molécula hóspede (LEE; LARSON, 2009).

O complexo obtido em água ultrapura obtida pelo sistema mili-Q[®] apresentou resultados interessantes, 16 mols de paclitaxel para 2,5 mols de dendrímero PAMAM-G4-NH₂, proporção 8:1, na água não há presença de contra-íons competindo com o paclitaxel, favorecendo assim a formação do complexo. O pH do meio reacional para obtenção do complexo em água ficou em torno de 8,0, nessa faixa pH as amins primárias do dendrímero estão protonadas (**Figura 13**) aumentando a interação dendrímero PAMAM-G4-NH₂ com o Paclitaxel. Dendrímeros PAMAM-G4 podem acumular carga positivas pela protonação das amins primárias, portanto, suas cargas são pH dependente, com cargas positivas em pH ácido e neutras em pH alcalino (DIALO *et al.*, 2004; BUCZKIWSKI *et al.*, 2016).

Figura 13. Protonação do dendrímero PAMAM-G₄-NH₂ versus valores de pH. Adaptado de Diallo e Goddard III (2004).

4.4. ANÁLISE DO TAMANHO DE PARTÍCULA E MEDIDA DO POTENCIAL ZETA

A **Tabela 10** apresenta os resultados do potencial zeta e tamanho de partícula do complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel sólido obtidos em diferentes meios tamponados e em água. Como o tempo de complexação não influenciou na formação do complexo, utilizaremos para nossas análises os complexos obtidos em 24 horas.

Tabela 10. Resultados do potencial zeta e tamanho de partícula, determinados por DLS.

PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel	Potencial Zeta (mV)	Tamanho de Partícula (nm)
Tampão HEPES - pH 7,4	+13,2	231,6
Tampão Borato - pH 9,0	+1,19	205,2
Água purificada	+13,9	198,3 (93,6%) 5,8 (6,4%)

A distribuição de tamanho de partícula dos complexos PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel, obtidas com tampão HEPES, pH 7,4, e tampão borato, pH 9,0, de acordo com a **Tabela 10** e **Figuras 14** e **15**, mostrou que o complexo é monodisperso e monomodal, com tamanho médio de partícula 231,6 nm e 205,2 nm respectivamente. No complexo obtido com água mili-Q, demonstrou ser polidisperso e multimodal (**Figura 16**), apresentando duas populações de partículas, com tamanho médio de partícula 198,3 nm (93,6%) e 5,8nm (6,4%). Sugere-se que a de menor intensidade deve-se a PAMAM-G₄-NH₂ não complexado. De acordo com Svenson e Tomalia (2005) os dendrímeros puros apresentam o tamanho de partícula em torno de 5 nm. A diferença significativa nos complexos em relação aos dendrímeros pode estar relacionada à conformação do dendrímero após a complexação. Outro fator que pode ser levado em consideração é que os complexos sólidos com dendrímeros são muito higroscópicos, o que pode favorecer também na formação de agregados e influenciar no tamanho de partícula.

Figura 14. Representação gráfica da distribuição de tamanho de partículas do complexo dendrímero PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel, obtido em tampão Hepes, pH 7,4.

Figura 15. Representação gráfica da distribuição de tamanho de partículas do complexo dendrímero PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel, obtido em tampão borato, pH 9,0.

Figura 16. Representação gráfica da distribuição de tamanho de partículas do complexo dendrímero PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel, obtido em água.

A medida do potencial zeta reflete o potencial elétrico das superfícies das partículas, o qual é influenciado pela carga de seus componentes, como polímero e fármaco. As análises de potencial zeta são realizadas através da mobilidade eletroforética, que é a técnica utilizada para medir e avaliar a mobilidade eletroforética das partículas em dispersão ou moléculas em solução. MA e colaboradores (2015) realizaram a conjugação do dendrímero PAMAM-G4-NH₂ com Paclitaxel e observaram grupamentos com cargas catiônicas, $7,35 \pm 2.1$ mV. Outro grupo de pesquisadores (DOBROVOLSKAIA *et al.*, 2012) comparou 4 gerações de dendrímeros e 3 grupos terminais e observaram um valor de potencial zeta em torno de 30 mV. Portanto, os resultados obtidos estão de acordo com os trabalhos da literatura, os quais o complexo PAMAM-G4-NH₂-paclitaxel apresenta cargas positivas.

4.5. MEDIDA DE TAMANHO E CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS POR mL POR TÉCNICA DE ANÁLISE DE RASTREAMENTO (NTA)

A técnica de NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) baseia-se no movimento Browniano e estabelece uma correlação entre este movimento e o raio hidrodinâmico para que o tamanho das nanopartículas seja estimado. As **Figuras 17 e 18** expressam a concentração para cada diâmetro de partículas presente em 1 mL da dispersão analisada. Essa concentração de partículas por mL é importante para calcular a dose em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Figura 17. Representação gráfica da distribuição de tamanho de partículas do complexo dendrímero PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel, obtido em tampão Hepes, pH 7,4, por NTA.

Figura 18. Representação gráfica da distribuição de tamanho de partículas do complexo dendrímero PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel, obtido com água, por NTA.

O emprego do NTA para a análise das dispersões dos complexos obtidos dendrímero PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel, possibilitou a visualização dinâmica das partículas individuais. O diâmetro médio foi de 197,4 nm do complexo obtido em tampão HEPES e de 197,4 nm para o complexo obtido em água, conforme descrito na **Tabela 11**. Os valores foram menores do que os obtidos por DLS (**Tabela 10**). As técnicas de medida do tamanho de partículas por DLS e NTA são diferentes, porém,

eles se complementam para a caracterização de sistemas de liberação nanoestruturados, como dendrímeros PAMAM.

Tabela 11. Resultados do diâmetro médio e concentração dos complexos obtidos por NTA

Complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel	Diâmetro médio (nm)	Número de nanopartículas por mL
Tampão HEPES	197,4 ± 6,8	3,64 x 10 ⁸
Água	144,6 ± 10,8	7,45 x 10 ⁷

4.6. ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

A análise do espectro na região do infravermelho é empregada na caracterização da complexação PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel porque permite a identificação das moléculas presente no sistema e também possibilita a identificação de possíveis interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, que por ventura possam ocorrer entre as moléculas do fármaco e carreadores. Tais interações podem resultar em um alargamento dos picos de absorção das funções químicas participantes da interação, como a hidroxila ou carbonila, bem como mudança na posição destes picos no espectro (KERSHARWANI *et al.*, 2014).

Na **Figura 19** estão apresentados os espectros dos componente da complexação separadamente e por último o espectro da complexação. Podemos observar que o paclitaxel apresenta duas bandas estreitas uma localizada aproximadamente em 1700 cm⁻¹, correspondente a vibração de deformação axial de ligação dupla do grupamento carbonila presente na estrutura do fármaco, a banda presente na região de 3400 cm⁻¹ é relativa ao estiramento da hidroxila do paclitaxel.

Figura 19. Espectro de infravermelho do Dendrímtero PAMAM-G₄-NH₂, Paclitaxel, Tampão HEPES e dos complexos obtidos PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel.

O dendrímtero PAMAM-G₄-NH₂ apresentam bandas características, na região de 1500 cm⁻¹ apresentam uma deformação angular da amida N-H, bem como da deformação axial de C=O, na região de 3400 corresponde a deformação axial N-H (corresponde ao grupo terminal do dendrímtero NH₂), por ser uma banda larga pode apresentar uma mistura de sinais dos grupamentos carboxila da região periférica com as amidas presentes no interior do dendrímtero.

No espectro dos complexos PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel (obtidos com tampão HEPES e água), observamos uma sobreposição do espectro do Dendrímtero PAMAM com o fármaco paclitaxel, o que já era esperado para a mistura física das duas substâncias. Na região 1700 cm⁻¹ observamos uma redução da banda, pode ser um indício do desaparecimento das pontes de hidrogênio formadas intermolecularmente nos dendrímeros PAMAM, que desaparecem quando complexado com o paclitaxel, indicando que ela possa estar interagindo com os grupamentos amida presentes na região externa do dendrímtero PAMAM-G₄-NH₂.

4.7. ESPECTROSCOPIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H -RMN E ^{13}C -RMN

4.7.1. PACLITAXEL

Os espectros de RMN de hidrogênio (RMN- ^1H), carbono (RMN- ^{13}C) e carbono por intensificação da distorção por transferência de polarização a 135° (RMN- ^{13}C DEPT 135) do paclitaxel livre utilizado estão apresentados nas **Figuras 20, 21 e 22** respectivamente.

Figura 20. Espectro de RMN- ^1H do paclitaxel.

Figura 21. Espectro de RMN- ^{13}C do paclitaxel.

Figura 22. Espectro RMN- ^{13}C DEPT do paclitaxel

Conforme esperado, os deslocamentos químicos e sinais integrados mostraram alta correlação com o observado na literatura e predito por modelos computacionais (CHENG *et al.*, 2005). Não houve sinais não identificados, o que explicita a alta pureza do fármaco utilizado nos experimentos subsequentes.

4.7.2. DENDRÍMERO PAMAM-G₄-NH₂

Por ser uma estrutura simétrica ramificada de alto peso molecular, o dendrímero PAMAM-G₄-NH₂ possui carbonos química e magneticamente equivalentes, conforme mostrado na **Figura 23** e **Tabelas 12** e **13**. Com base nestes dados, é possível interpretar de forma adequada os espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C e RMN-¹³C DEPT 135, apresentados nas **Figuras 24, 25, 26** e **27** respectivamente.

Figura 23. Divisão da estrutura do dendrímero PAMAM-G₄-NH₂.

Figura 24. Espectro de RMN- ^1H do dendrímero PAMAM- $\text{G}_4\text{-NH}_2$.

Conforme esperado pela estrutura da molécula e confirmado pelo espectro, foi possível identificar seis átomos de hidrogênio (H_A , H_B , H_C , H_D , H_E e H_F) (**Figura 25**), com sinais entre 2,3 e 3,3 ppm (**Figura 24**). A **Tabela 12** apresenta os hidrogênios e seus respectivos deslocamentos.

Tabela 12. Hidrogênios do dendrímero PAMAM- $\text{G}_4\text{-NH}_2$ e seus respectivos deslocamentos químicos.

Identificação	Região (ppm)
H_A	2,78
H_B	2,38
H_C	3,22
H_D	2,58
H_E	3,25
H_F	2,72

Figura 25. Representação química dos grupamentos terciário (rosa), secundário (azul) e primário (verde) do dendrímero PAMAM-G₄-NH₂.

Figura 26. Espectro de RMN-¹³C do dendrímero PAMAM-G₄-NH₂.

Figura 27. Espectro RMN- ^{13}C DEPT do dendrímero PAMAM-G₄-NH₂.

Os seis átomos de carbono (C_A , C_B , C_C , C_D , C_E e C_F) (**Figura 25**) magneticamente diferentes e com sinais entre 32 e 52 ppm foram detectados, enquanto a carbonila pôde ser identificada em 175 ppm. A **Tabela 13** apresenta os carbonos e seus respectivos deslocamentos.

Tabela 13. Carbonos do dendrímero PAMAM-G₄-NH₂ e seus respectivos deslocamentos químicos.

Identificação	Região (ppm)
C_A	33
C_B	32,7
C_C	41,1
C_D	52,3
C_E	36,7
C_F	39,7

4.7.3. TAMPÃO HEPES

Os espectros de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C e RMN- ^{13}C DEPT 135 do tampão HEPES também corresponderam ao relatado em literatura e disponibilizado pelo fabricante. Foi possível identificar com resolução apropriada cada um de seus 6 carbonos magneticamente equivalentes no RMN- ^{13}C DEPT 135 e RMN- ^{13}C , bem como os hidrogênios no espectro de RMN- ^1H , apresentados nas **Figuras 28, 29 e 30**, respectivamente.

Figura 28. Espectro de RMN- ^1H do tampão HEPES.

Figura 29. Espectro de RMN- ^{13}C do tampão HEPES.

Figura 30. Espectro RMN- ^{13}C DEPT do tampão HEPES.

4.7.4. COMPLEXO PAMAM-G₄-NH₂-PACLITAXEL OBTIDO COM TAMPÃO HEPES

Nos espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C e RMN-¹³C DEPT 135 do Complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel obtido com tampão HEPES (**Figuras 31, 32 e 33**) é possível identificar sinais em deslocamentos químicos presentes tanto no fármaco nos espectros do paclitaxel quanto do dendrímero isoladamente, indicando a presença dos dois componentes no complexo, porém, como a quantidade do tampão HEPES na formulação é superior ao dendrímero e o paclitaxel propriamente dito, a intensidade dos sinais do complexo foi reduzida, os mesmos foram melhor avaliados nos complexos obtidos em água.

Figura 31. Espectro de RMN-¹H do complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel obtido com tampão HEPES.

Figura 32. Espectro de RMN- ^{13}C do complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel obtido com tampão HEPES.

Figura 33. Espectro RMN- ^{13}C DEPT do complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel obtido com tampão HEPES.

4.7.5. COMPLEXO PAMAM-G4-NH₂-PACLITAXEL OBTIDO COM ÁGUA

Nos espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C e RMN-¹³C DEPT 135 do Complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel obtido com água (**Figuras 34, 35 e 36**) foi possível identificar sinais em deslocamentos químicos presentes tanto no fármaco nos espectros do paclitaxel quanto do dendrímero isoladamente, indicando a presença dos dois componentes na mistura. Dada a resolução insuficiente do equipamento em que os testes foram conduzidos em contraste com a complexidade de ambas estruturas, não foi possível identificar em que sítio do sistema de liberação o fármaco encontra-se ligado. Embora a integração da área dos sinais do paclitaxel seja consideravelmente inferior aos sinais encontrados nas regiões de deslocamento químico do PAMAM-G₄-NH₂, isto se justifica pela alta massa molecular e abundância deste na formulação.

Figura 34. Espectro de RMN-¹H do complexo PAMAM-G₂-NH₂-Paclitaxel obtido com água.

Figura 35. Espectro de RMN- ^{13}C do complexo PAMAM-G₂-NH₂-Paclitaxel obtido com água.

Figura 36. Espectro RMN- ^{13}C DEPT do complexo PAMAM-G₂-NH₂-Paclitaxel obtido com água.

4.8. ESTUDOS DE SOLUBILIDADE DO PACLITAXEL

Foram realizados estudos de solubilidade do fármaco em meios contendo um tensoativo não iônico, Tween 80®, ou um tensoativo aniônico, lauril sulfato de sódio, em diferentes concentrações, para a determinação do meio de dissolução que favoreça a solubilização do paclitaxel. Esta etapa prévia aos ensaios de perfil *in vitro* de liberação é essencial para que se possa determinar a concentração de fármaco no meio de dissolução, de maneira que ele esteja em *sink conditions*. Conforme discutido no trabalho de PHILLIPS *et al.* (2012), os tensoativos, moléculas anfifílicas, quando dissolvidas em meio aquoso, tendem a auto organizar-se em micelas, envolvendo o fármaco em seu interior hidrofóbico e protegendo-o do contato com o meio aquoso hidrofílico, um mecanismo conhecido como solubilização micelar.

Os resultados apresentados na **Figura 37** revelam que se logrou aumentar consideravelmente a solubilidade do paclitaxel com o uso do tensoativo lauril sulfato de sódio, especialmente na concentração mais alta testada (1%). O lauril sulfato de sódio já foi empregado previamente como tensoativo em estudos de liberação *in vitro* de paclitaxel, para uma formulação do tipo hidrogel (LIU *et al.*, 2011). Com o Tween 80®, que já foi empregado no trabalho de KOZIARA e colaboradores (2004), por outro lado, não se obtiveram resultados satisfatórios de solubilidade.

Figura 37. Solubilidade de paclitaxel em meios contendo tensoativos, Tween 80® ou lauril sulfato de sódio (LSNa), em diferentes concentrações (0,1; 0,5 ou 1%, p/v), a 37°C sob agitação (300 rpm) após 24 h.

4.9. ESTUDOS *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO DE PACLITAXEL

O perfil de liberação visa verificar a quantidade de fármaco liberado da forma farmacêutica desenvolvida em um determinado tempo. Os resultados permitem corrigir desvios na formulação e fazer adaptações necessárias para etapas futuras como os estudos *in vivo* em modelo animal e estudos pré-clínicos e clínicos. Muitos métodos têm sido descritos para avaliação do perfil de liberação *in vitro* de fármacos a partir de sistemas de liberação nanoparticulados. Entretanto, os principais provenientes do tamanho reduzido destes carreadores que dificultam a separação entre fármaco liberados e as nanopartículas. Dentre os métodos experimentais disponíveis, a utilização de membranas de diálise mostra-se adequada para separar os nanocarreadores do meio de liberação (LEO *et al.*, 2004).

Os resultados apresentados na **Figura 38** mostram que os complexos PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel obtidos em tampão HEPES, pH 7,4, e em água, começaram a liberar simultaneamente, com aproximadamente 6 horas de experimento. Ao final de 156 horas o complexo I liberou 34% do paclitaxel e o complexo II liberou 38%. A liberação lenta do paclitaxel dos complexos obtidos pode ser vantajosa para o tratamento de tumores sólidos, pois em teoria o sistema de liberação deve manter o fármaco encapsulado durante a circulação sanguínea e liberá-lo uma vez acumulado passivamente no tumor (SONG, *et al.*, 2006).

Figura 38. Perfis *in vitro* de liberação do paclitaxel a partir dos complexos PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel I e II obtidos através do método de diálise em membrana de acetato de celulose (12,5 kDa), em 50mL de tampão fosfato, pH 7,4, contendo 1,0 % (p/v) de lauril sulfato de sódio, sob agitação de 150 rpm, a 37°C.

4.10. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULA 4T1

O teste de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células tumorais tem se tornado importante para a avaliação de agentes anticâncer, sendo também muito utilizado como método alternativo aos testes farmacológicos em órgãos isolados, e tem, pelo menos durante a fase de *screening* para avaliação de agentes anticâncer, reduzido a experimentação *in vivo* em animais (HOUGHTON *et al.*, 2007). A avaliação da citotoxicidade do complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel foi através do ensaio do MTT, em linhagem celular 4T1.

Figura 39. Curvas de citotoxicidade em células de câncer de mama 4T1 empregando o método do MTT.

Os resultados apresentados na **Figura 39** e **Tabela 14** mostraram que o Complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel diminuiu a viabilidade das células 4T1, sendo mais citotóxico do que a solução de paclitaxel em DMSO e o Taxol® – medicamento de referência no tratamento do câncer de mama no Brasil, considerando que o IC₅₀ diminuiu de 184,18 nM (Solução de Paclitaxel) para 102,29 nM (Taxol®) para 19,05 nM (Complexo). Em estudos de citotoxicidade de Eloy e colaboradores (2016) com lipossomas contendo paclitaxel avaliados em células 4T1 obtiveram IC₅₀ de 46,48 nM e ao comparar com os resultados de citotoxicidade obtidos neste trabalho obtivemos citotoxicidade 2,5 vezes maior, sugerindo que o sistema de liberação polimérico disponibiliza de maneira mais eficaz o paclitaxel do que o sistema de liberação lipídico.

Tabela 14. Valores de IC₅₀ determinados pelo método do MTT.

Grupo	IC ₅₀ (nm)
Solução de Paclitaxel em DMSO	184,18
Taxol®	102,29
PAMAM-G ₄ -NH ₂ -Paclitaxel	19,05

Devarakond et al. (2003) investigou a influência do dendrímero PAMAM-G₃ e G₅ complexado com paclitaxel para tratamento do câncer de próstata, e verificou que o complexo obtido com o PAMAM G₅ melhorou significativamente a solubilidade do

paclitaxel e aumentou em 10 vezes a citotoxicidade na linhagem de câncer de próstata. O complexo obtido PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel apresentou uma citotoxicidade 5 vezes maior que o Taxol®. A conjugação de um fármaco insolúvel em água com polímeros altamente solúveis, como dendrímeros, aumenta a solubilidade e conseqüentemente melhora a biodisponibilidade do fármaco, na qual resulta em uma maior atividade antitumoral e/ou citotóxica (JEVPRASESPHANT et al., 2003). Portanto, no presente trabalho o complexo obtido PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel aumentou a solubilidade do fármaco antitumoral e, conseqüentemente, a citotoxicidade na linhagem tumoral 4T1.

4.11. AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DO COMPLEXO PAMAM-G₄-NH₂-PACLITAXEL *IN VIVO*: CURVA DE CRESCIMENTO TUMORAL, IMUNOHISTOQUÍMICA DOS TUMORES, REGISTRO DE PESO E SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS.

Foram utilizadas células do carcinoma 4T1 para o desenvolvimento do tumor no estudo *in vivo*. Essas células são altamente invasivas e podem espontaneamente causar metástase, atingindo outros órgãos, como por exemplo fígado, pulmão e baço. Os tumores de mama desenvolvidos com essa linhagem celular desenvolvem rapidamente (**Figura 40**) tornando o modelo adequado para avaliação de sistemas de liberação baseados em nanopartículas (LUO *et al.*, 2010; MERAZ *et al.*, 2014).

Figura 40. Tumores de mama desenvolvidos após 14 dias de inoculação das células 4T1 em Camundongo BALB-C.

Para determinar o efeito da complexação do paclitaxel com dendrímero PAMAM-G₄-NH₂ no efeito terapêutico em carcinoma de mama *in vivo*, foram avaliados os seguintes grupos: soluções de paclitaxel, complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel e salina como controle negativo. Os resultados apresentados na **Figura 41** mostraram que o complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel apresentou maior efeito na redução do volume tumoral, sendo estatisticamente significativo com comparado ao grupo controle negativo, diferentemente da solução de paclitaxel, que não apresentou diferença estatística. LUO e colaboradores (2010) também obtiveram resultados semelhantes aos nossos, ao comparar a solução de paclitaxel com o controle negativo.

Figura 41. Avaliação da eficácia terapêutica de grupos solução paclitaxel, controle negativo e Complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel em camundongos BALB/C com tumores de mama desenvolvidos com a célula 4T1. O gráfico representa o acompanhamento do volume tumoral percentual (volume tumoral no momento da medida em relação ao volume tumoral inicial). As doses de paclitaxel de 5 mg/kg administradas duas vezes por semana, totalizado 5 administrações no total. * (p<0,1).

O complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel apresentou maior eficiência na redução do volume tumoral em relação fármaco em solução, o que pode resultar da liberação sustentada do paclitaxel. Ao final do experimento, o tumor aumentou em 307% para o grupo onde solução de Paclitaxel foi administrada, comparado a um aumento de 245,4%, respectivamente para o grupo Complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel.

Para POONDRU e colaboradores (2002), o ambiente *in vivo* é mais complexo do que o ambiente celular, o que pode dificultar a correlação *in vitro* - *in vivo* de fármacos antitumorais, pois envolve a barreira de permeabilidade de células tumorais, pressão intersticial, barreira enzimática, que envolvem a degradação metabólica. De acordo com Eloy (2016), a encapsulação do paclitaxel em sistemas nanoestruturados pode melhorar a farmacocinética, consequentemente melhora da eficácia terapêutica.

A partir das **Figuras 41 e 42**, confirmando os resultados do estudo *in vitro*, evidenciamos que o complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel foi mais eficiente do que a solução de paclitaxel.

Figura 42. Fotografia dos tumores extraídos na biópsia após a realização do estudo *in vivo*. (A) grupo controle negativo; (B) grupo solução de Paclitaxel; (C) grupo complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel

Adicionalmente, os resultados da imunohistoquímica utilizando o anticorpo monoclonal Ki-67 (**Figura 43**) demonstraram a diminuição da proliferação tumoral para o grupo de solução de Paclitaxel (B), porém o grupo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel (C) apresentou maior redução da proliferação celular, comparado ao controle negativo (A), evidenciado através da coloração em marrom de áreas em proliferação celular avaliadas pelo anticorpo Ki67. O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear utilizada como marcador celular para a proliferação. O marcador ki-67 está presente em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) ausente apenas quando a célula está em repouso. Na análise imunohistopatológica, o ki-67 é um sinalizador de proliferação celular, utilizado principalmente para marcação de células neoplásicas (RIBEIRO *et al*, 2004).

Figura 43. Ensaio imunohistoquímico com tumores de mama, realizado com teste do anticorpo Ki-67. (A) grupo controle negativo; (B) grupo solução de paclitaxel; (C) grupo complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel.

As fotomicrografias da imunohistoquímica utilizando o marcador monoclonal ki-67, corroboram com os resultados obtidos na redução do volume tumoral, como podemos observar na **Figura 43**, as áreas em marrom evidenciam a proliferação celular, o grupo controle negativo (A) apresenta maior proliferação celular, o grupo (B) tratado com solução de paclitaxel, apresenta regiões com proliferação celular intermediária, já o complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel, diminuiu consideravelmente a proliferação celular, em acordo com os resultados obtidos na **Figura 41**.

É importante salientar que através dos estudos de citotoxicidade em células 4T1, a complexação do paclitaxel com o dendrímero PAMAM-G₄-NH₂ apresentou maior toxicidade em relação à solução de paclitaxel, assim como os resultados obtidos *in vivo*, apresentando uma maior redução do volume tumoral e proliferação celular. Por outro lado, a citotoxicidade elevada do complexo PAMAM-G₄-NH₂-Paclitaxel pode ter refletido na sobrevivência dos animais ao longo do experimento, conforme demonstrado na **Figura 44**. Com relação à massa corporal dos animais no decorrer

do experimento. Os resultados mostrados na **Figura 45** não evidenciaram alterações significativas na massa corporal dos animais. Portanto, dendrímeros como sistema de liberação de fármacos, podem ser aplicados para o tratamento de diversas patologias, principalmente para o câncer de mama.

Figura 44. Curva de sobrevivência dos animais ao longo do estudo *in vivo* (Os grupos controle negativo e solução paclitaxel ficaram sobrepostos).

Figura 45. Registro da massa corporal dos animais ao longo do estudo *in vivo*.

CONCLUSÕES

Com base nas técnicas selecionadas e nos resultados obtidos na presente pesquisa concluímos que, os sistemas dendriméricos contendo paclitaxel foram obtidos com sucesso e apresentam características adequadas para a aplicação pretendida. Todos os complexos apresentaram tamanho de partícula nanométrico com carga positiva. As análises por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear confirmaram a interação das moléculas do paclitaxel com os grupamentos NH_2 do dendrímero PAMAM. Os estudos *in vitro* de liberação do paclitaxel a partir do complexo obtido mostraram uma liberação sustentada do fármaco podendo possibilitar a acumulação passiva deste no sítio tumoral. Os ensaios de citotoxicidade (MTT) em linhagem de câncer de mama evidenciaram que o paclitaxel apresentou maior citotoxicidade quando complexado nos dendrímeros. Por último, os estudos *in vivo* realizados em modelo animal demonstraram que o paclitaxel complexado em dendrímeros, apresentou melhor biodisponibilidade, comprovados pela avaliação do volume tumoral seguido pela imunohistoquímica, que mostrou a redução da proliferação celular. Portanto, o complexo PAMAM- G_4 - NH_2 -Paclitaxel pode representar uma estratégia promissora para o tratamento de câncer de mama e posteriormente deverá ser avaliado por meio de estudos clínicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMI, H.; HUNTER, D.; TRICHOPOULOS, D. (Ed.). **Textbook of Cancer Epidemiology**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2008.

AHN, J.; SCHATZKIN, A.; LACEY, J.V.; ALBANES, D.; BALLARD, R.; ADAMS, K.F.; MOUW, T.; HOLLENBECK, A.R.; LEITZMANN, M.F. Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk. **Archives of Internal Medicine**, v. 167, p. 2091-2102, 2007.

ALJADA, A., MOUSA, S.A. Metformin and neoplasia: Implications and indications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 133, p. 108-115, 2012.

ALLAN, A.L. *et al.* Tumor dormancy and cancer stem cells: implications for the biology and treatment of breast cancer metastasis. **Breast Disease**, v. 26, p. 87-98, 2008.

ALLOUACHE, D.; GAWANDE, S.R.; HULIN, M.T.; MATHHIEU, N.T.; NEUMANN, S.P.; MEFTI, F.; BOZEC, L.; CENOT J.Y. First-line therapy with gemcitabine and paxlitaxel in locally, recurrente or metastatic breast cancer: A phase II study. **BMC Cancer**, p. 151, 2005.

ANDERSON, G.F., CHU, E. Expanding priorities-confronting chronic disease in countries with low income. **New England journal of medicine**, v. 356, p. 209 – 211, 2007.

AULENTA, F.; HAYES, W.; RANNARD, S. Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices. **European Polymer Journal**, v.39, p.1741-1771, 2003.

BHADRA, D.; BHADRA, S.; JAIN, S.; JAIN, N. K. A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil. **International Journal of Pharmaceutics**, v.257, p.111 –124, 2003.

BOAS, U.; HEEGAARD, P.M. Dendrimers in Drug Research. **Chemical Society Reviews**, v.33, p. 43 – 63, 2004.

BRADBURY, J. Beyond pills and jabs. **Lancet**, v. 362, p. 1984-1985, 2003.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução nº RE 899, de 29 de maio de 2003.

BRAY, F., McCARRON, P., PARKIN, D.M. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. **Breast cancer research**, v. 6, p. 229 – 239, 2004.

BUGZKOWSKIA, A.; WALISZEWSKIA, D.; URBANIAKB, P.; PALECZA, B. Study of the interactions of PAMAM G3-NH₂ and G3-OH dendrimers with 5-fluorouracil in aqueous. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 505 p. 1–13, 2016.

CAKARA, D.; KLEIMANN, J.; BORKOVEC, M. Microscopic portonation equilibrian of poly(amidoamine) dendrimers from macroscopic titrations. **Macromolecules**, v. 36, p. 4201, 2003.

CANTRELL, L.A.; ZHOU, C.; MENDIVIL, A.; MALLOY, K.M. BAE-JUMP, V.L. Metformin is a potent inhibitor of endometrial câncer cell proliferation – implications for a novel treatment strategy. **Gynecology Oncology**, v. 116, p. 92-98, 2010.

CARVALHO, P.; TIRNAUER, J. S.; PELLMAN, D.; **Trends in Cell Biology**, v.5, p.229, 2003.

CASTRO, F. Pesquisa- Atualidades- Revista Química e Derivados- Disponível em <http://www.quimica.com.br/revista/qd431/atualidades3.htm>- acesso em 16 de maio de 2012.

CHANG, X.Z. *et al.* Identification of the functional role of peroxiredoxin 6 in the progression of the breast cancer. **Breast cancer research**, v. 9, R76, 2007.

CHEN, J.Z.; RANADE, S.V. XIE, X.Q. NMR characterization of paclitaxel/poly (styrene-isobutylene-styrene) formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 305, p. 129-144, 2005.

CHENG, Y.Y.; XU, T.W. The effect of dendrimers on the pharmacodynamic and pharmacokinetic behaviors of non-covalently or covalently attached drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 43, p. 2291-2297, 2008.

CHENG, Y.Y.; XU, Z.H., MA, M.L., XU, T.W. Dendrimers as drug carriers: Applications in different routes of drug administration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p.123-143, 2008.

COUTO, W. F. Complexos de dendrímeros e ciclodextrinas com aplicação farmacêutica: Síntese e caracterização. 2010. 88f. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

D'EMANUELE, A.; JEVPRASESPHANT, R.; PENNY, J.; ATTWOOD, D. The use of a dendrimer-propanolol prodrug to bypass efflux transports and enhance oral bioavailability. **Journal of Control Release**, v. 95, p. 447-453, 2004.

D'EMANUELLE, A.; ATTWOOD, A. Dendrimer-drug interactions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57. p.2147-2162, 2005.

DASS, C. R, SU T. Particle-mediated intravascular delivery of oligonucleotides to tumors: associated biology and lessons from gene therapy. **Drug Delivery**, v.8, p. 191-213, 2001.

DEVARAKONDA, B; HILL, R.A.; LIEBENBERG, W.; BRITS, M.; DE VILLIERS, M. M. Comparison of the aqueous solubilization of practically insoluble niclosamide by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v.304, p.193-209, 2005.

DEVARANKONDA, B.; JUDEDEID, A.; CHIGURUPATI, S.; THOMAS, S.; SHAH, G.V.; OTTO, D.P. VILLIERS, M.M. Effect of polyamidoamine dendrimers on the in vitro cytotoxicity of paclitaxel in cultured prostate cancer (PC-3m) cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, p. 384-393, 2007.

DIALLO, M.; CHRISTIE, S.; SWAMINATHAN. P.; BALOGH, L.; SHI, X.; UM, W.; PAPELIS, C.; GODDARD III, W.A.; JOHNSON, J.H. Dendritic Chelating Agents. 1. Cu(II) Binding to Ethylene Diamine Core Poly(amidoamine) Dendrimers in Aqueous Solutions. **Langmuir**, v. 20, p. 2640-2651, 2004.

DIALLO, S.M.; GODDARD III, W.A. Characterization of Co(II) Binding to PAMAM G4-NH₂ Dendrimer in Aqueous Solutions Using UV and EPR Spectroscopy. **Materials and Process Simulation Center Beckman**, Institute California Institute of Technology, Research Science Institute. 2006. Disponível em: http://web.mit.edu/rsi/compendium/edit2004/Final/al_rabe-khaled-caltech-oral.pdf Acesso em 28 de junho de 2016.

DIMASI, J. A. *et al.* The price of innovation: new estimates of drug development costs. **Journal of Health Economics**, v. 22, p. 151- 185, 2003.

DOBROVOLSKAIA, M.A.; PATRI, A.K.; SIMAK, J.; HALL, J.B.; SEMBEROVA, J.; LACERDA, S.H.; MCNEIL, S.C. Nanoparticle size and surface charge determine effects of PAMAM dendrimers on human platelets in vitro. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, p. 382 – 393, 2012.

DUBIN, C. H. Special delivery: pharmaceutical companies aim to target their drugs with nanoprecision. **Nanotechnology and Mechanical Engineering**, v. 126 (suppl), p. 10-12, 2004.

ELOY, J.O.; PETRILLI, R.; TOPAN, J.F.; ANTONIO, H.M.R.; BARCELLOS, J.P.A.; CHESCA, D.L.; SERAFIN, L.N.; TIEZZI, D.; LEE, R.J. MARCHETTI, J.M. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 74-82, 2016.

ESFAND, R.; TOMALIA, D.A. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. **Drug Discovery Today**, v.6, n.8, p.427-436, 2001.

FREITAS, R. A. What is nanomedicine?. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 1. p. 2- 9, 2005.

GHERSI, D. *et al.* Taxane containing regimens for metastatic breast cancer. **Cochrane database of systematic reviews**, v. 3, 2003.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C.C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42: 377-387, 2007.

HUGHES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, p. 22- 30, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Estimativa 2016, Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro: INCA 2015. Disponível em: http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/edicao/Estimativa_2016.pdf. Acesso em 05 de julho de 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro: INCA 2007. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=1793. Acesso em 25 de maio de 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro: INCA 2009. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/c1755a004eb694838c939ef11fae00ee/encarte_especial.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em 25 de maio de 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Tipo de câncer: mama, Rio de Janeiro: INCA 2016. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama. Acesso em 04 de julho de 2016.

INUMARU, L. E.; SILVEIRA, E. A.; NAVES, M. M. V. Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 7, p. 1259-1270, 2011.

JANSEN, J.F.G.A.; DE BRABANDER-VAN DEN BERG, E.M.M.; MEIJER, E.W.. Encapsulation of Guest Molecules into a Dendritic Box. **Science**, v.266, n.5188, p. 1226-1229, 1994.

JEVPRASESPHANT, R.; PENNY, J.; ATTWOOD, D.; MCKEOWN, N.B.; D'EMANUELE, A. Engineering of dendrimer surfaces to enhance transepithelial transport and reduce cytotoxicity. **Pharmaceutical Research**, Vol. 20, No. 10, October 2003.

KEFALIDES, P. T. New methods for drug delivery. **Annals of Internal Medicine**, v. 128, p. 1053-1055, 1998.

KESHARWANI, P.; JAIN, K. JAIN, N.K. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 39, p. 268 – 307, 2014.

KESHARWANI, P.; JAIN, K.; JAIN, N.K. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. **Progress in polymer Science**, v. 39, p. 268-307, 2014.

KOJIMA, C.; KONO, K.; MARUYAMA, K.; TAKAGISHI, T.. Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly(ethylene glycol) grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs. **Bioconjugate Chemistry**, v.11, p.910– 917, 2000.

KOLHE, P.; MISRA, E.; KANNAN, R.M.; KANNAN, S.; LIEH-LAI, M. Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.259, p.143-160, 2003.

KOUDELKA, S. et al. Liposomes with high encapsulation capacity for paclitaxel: preparation, characterization and in vivo anticancer effect. **Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 2309-2319, 2010.

KOZIANA, J.M. et al. Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumor. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 259-269, 2004.

LEE, H.; LARSON, R.G. Multiscale modeling of dendrimers and their interactions with bilayers and polyelectrolytes. **Molecules**, v. 14, p. 423-438, 2009.

LI, C.; WALLACE, S. Polymer-drug conjugates: recent development in clinical oncology. **Advanced Drug Reviews**, v. 60, p. 886 – 898, 2008.

LIU, Y.; BRYANTSEV, V.S.; DIALLO, M.S.; GODDARD, W.A. PAMAM dendrimers undergo pH responsive conformational without swelling. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, p 2799, 2009.

LUO, T.; WANG, Y.; HUA, J.; JING, X., LI, M.; ZHANG, Y.; JIANG, Y. Epigallocatechin gallate sensitizes breast cancer cells to paclitaxel in a murine model of breast carcinoma. **Breast Cancer Research**, 2010.

MAEDA, N. et al. Anti-neovascular therapy by use of tumor neovasculature-targeted longcirculating liposome. **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 41-52, 2004.

MAHONEY, B.P.; RAGHUNAND, N.; BAGGETT, B.; GILLIES, R.J. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. **Biochemical Pharmacology**, V. 66, p. 1207–1218, 2003.

MALIK, N.; EVAGOROU, E.G.; DUNCAN, R. Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy, **Anti-Cancer Drugs**, v.10, p.767– 776, 1999.

MARSDEN, C.G. et al. A novel in vivo model for the study of human breast cancer metastasis using primary breast tumor-initiating cells from patient biopsies. **BMC Cancer**, v. 12, 2012.

MIGNANI, S.; KAZZOULI, S.D.; BOUSMINA, M.; MAJORAL, J.P. Dendrimer space concept for innovative nanomedicine: A futuristic vision for medicinal chemistry, **Progress in Polymer Science**, v.38, p. 993-1008, 2013.

NAVES, M.M.V., QUINTANILHA, M.I.G.D., INUMARU, L.E. Nutrição e prevenção de câncer: evidências, metas de Saúde Pública e recomendações individuais. **Nutrição em Pauta**, v. 16, p. 40-45, 2008.

NIMESH, S.; MANCHANDA, R.; KUMAR, R.; SAXENA, A.; CHAUDHARY, P.; YADAV, V.; MOZUMDAR, S.; CHANDRA, R. Preparation, characterization and in vitro drug release studies of novel polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutical Science**. v.323, p. 146-152, 2006.

OOYA, T.; LEEB, J.; PARK, K. Effects of ethylene glycol-based graft, star-shaped, and dendritic polymers on solubilization and controlled release of paclitaxel. **Journal of Controlled Release**. V. 93, p. 121 – 127, 2003.

ORIVE, G.; HERNANDEZ, R.M.; GASCON, A.R.; PEDRAZ, J.L. Micro and nano drug delivery systems in cancer therapy. **Cancer Therapy**, v. 3, p. 131 – 138, 2005.

PALMA, G.; CONTE, C.; BARBIERI, A.; BIMONTE, A, LUCIANO, A.; REA, D.; UNGARO, F.; TIRINO, P.; QUAGLIA, F.; ARRA, C. Antitumor activity of PEGylated biodegradable nanoparticles for sustained release of docetaxel in triple-negative breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, p. 55-63, 2014.

PARK, K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery? **Journal Controlled Release**, v. 120, p. 1-3, 2007.

PHOENIX, K.N., VUMBACA, F., CLAFFEI, K.P. Therapeutic Metformin/AMPK Activation Promotes the Angiogenic Phenotype in the ER α Negative MDA-MB-435 Breast Cancer Model. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 113, p. 101-111, 2009.

PIASECKA, M.M; OLASIK, E.M. Dendrimers in drug delivery. In: GRUMEZESCU, A.M. **Nanobiomaterials in Drug Delivery: Applications of Nanobiomaterials**. ISBN: 978-0-323-42866-8, 2016.

POONDRU, S.; PARCHEMENT, R.E.; PUROHIT, V.; LORUSSO, P.; HORWITZ, J.P.; HAZELDINE, S.T.; POLIN, L.; CORBETT, T.; JASTI, B.R. Lack of in vitro-in vivo correlation of a novel investigational anticancer agent, SH30. **Investigational New Drugs**. V. 20, p. 23–33, 2002.

PORTER, P. “Westernizing” women’s risk? Breast cancer in lower-income countries. **New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 213-216, 2008.

PRAÇA, et al. Validation of alternative apparatus for in vitro dissolution test of semisolid dosage forms. In: **3º Simpósio Internacional de Pós-Graduação e Pesquisa (SINPOSPQ)**, 2008.

PRAMANIK, A.; LAHA, D.; DASH, S.K.; CHATTOPADHYAY, S.; ROY, S.; KUMAR, D.; PRAMANICK, P.; KARMAKAR, A. An in-vivo study for targeted delivery of copper-organic complex to breast cancer using chitosan polymer nanoparticles. **Materials Science and Engineering**. v. 68, p. 327–337, 2016.

RIBEIRO, F.A.Q.; PEREIRA, C.S.B.; ALMEIDA, R. Estudo comparativo de aspectos histológicos e imunohistoquímicos entre o colesteatoma espontâneo do meato acústico externo e o colesteatoma adquirido da orelha média. **Rev Bras Otorrinolaringol**. V.70, n.5, 602-607, 2004.

SADJADI, S. Dendrimers as Nanoreactors. **Organic Nanoreactors**, chapter 6, p. 159-201, 2016.

SAMAD, A.; ALAM, M.I.; SAXENA, K. Dendrimers. A Class of Polymers in the Nanotechnology for the Delivery of Active Pharmaceuticals. **Current Pharmaceutical Design**, v.15, p. 2958-2969, 2009.

SHCHARBIN, D.; KLAJNERT, B.; BRYSEWSKA, M. Effect of PAMAM dendrimers on human and bovine serum albumin at different pH and NaCl concentrations. **Journal Biomater Sci Polym**, v. 16, p 1081, 2005.

SILVA, M. M.; SILVA, V. H. Envelhecimento: importante fator de risco para o câncer. **Arquivos médicos do ABC**, Santo André, v. 30, n. 1, p. 11-18, 2005.

SOUZA, J.G.; DIAS, K.; PEREIRA, T.A.; BERNARDI, D.S.; LOPEZ, R.F.V. Topical delivery of ocular therapeutics: carrier systems and physical methods. **Journal Pharmacy and Pharmacological**, v. 66, p. 507-530, 2013.

SOUZA, J.G.; DIAS, K.; SILVA, S.A.M.; REZENDE, L.C.D.; ROCHA, E.M.; EMERY, F.S.; LOPEZ, R.F.V. Transcorneal iontophoresis of dendrimers: PAMAM corneal penetration and dexamethasone delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 200 p. 115–124, 2015.

SOUZA, M.C. **Micelas de longo tempo de circulação como sistemas nanocarreador para otimização da terapia do câncer de mama**. 2013. 124f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

SOUZA, M.V.N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtubulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, 308-312, 2004.

SWAMI, A.; Nanoparticles for targeted and temporally controlled drug delivery. In SEVENON, S. PRUDHOMME, R.K. **Multifunctional nanoparticles for drug delivery applications**. Imaging, Targeting, and Delivery. 2012.

TANAKA, T. *et al.* Nanotechnology for breast cancer therapy. **Biomedical microdevices**, v. 11, p. 49 – 63, 2009.

TERRY, M.B., *et al.* Alcohol metabolism, alcohol intake, and breast cancer risk: a sister-set analysis using the Breast Cancer Family Registry. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 106, p. 281-288, 2007.

TOLIA, G.T., CHOI, H.H. The Role of Dendrimers in Topical Drug Delivery. **Pharmaceutical Technology**, vol. 32, n. 11, p. 88–98, 2008.

VANDAMME, T.H.F.; BROBECK, L. Poly(amidoamine) dendrimers as ophthalmic vehicles for ocular delivery pilocarpine nitrate and tropicamide. **Journal Control Release**. V. 102, p. 23-38, 2005.

VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A. Ocular drug delivery: nanomedicine applications. **Nanomedicine**, v. 2, p. 11 – 27, 2007.

VISHNU, P., ROY, V. Safety and Efficacy of *nab*-Paclitaxel in the Treatment of Patients with Breast Cancer. **Breast Cancer**, v. 5, p. 53-65, 2011.

World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: **American Institute for Cancer Research**; 2007.

WORLD CANCER RESEARCH FUND; AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. **Continuous update project report**: food, nutrition, physical activity, and the prevention of breast cancer. Washington, DC: AICR, 2010.

YANG, Y. et al. Imaging of HER2/neu-positive BT-474 human breast cancer xenografts in athymic mice using ¹¹¹In-trastuzumab (Herceptin) Fab fragments. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 32, p. 51-58, 2005.

YIH, T. C; WEI, C. Nanomedicine in câncer treatment. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 1, p. 191- 192, 2005.

ZHANG, J. A., *et al.* 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.

ZHANG, P.M.X; NI, L.; LI, J.; ZHANG, F.; WANG, Z.; LIAN, S.; SUN, K. Targeted delivery of polyamidoamine-paclitaxel conjugate functionalized with anti-human epidermal growth factor receptor 2 trastuzumab. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 2173–2190, 2015.

Anexo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Obtenção de complexos dendrímero-paclitaxel para otimização da terapia de câncer de mama”, protocolo nº 15.1.806.60.5, sob a responsabilidade de José Fernando Topan e Juliana Maldonado Marchetti que envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) na reunião de 26/10/2015.

Vigência do Projeto	01/11/2015 a 30/03/2016
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico Balb c
Nº de animais	20
Peso	20 – 25g
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério da FCFRP

Ribeirão Preto, 28 de outubro de 2015.

Prof. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Presidente da CEUA-FCFRP