

U. PORTO



**FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

**DESENVOLVIMENTO DE PROLIPOSSOMAS COM
PACLITAXEL: UMA NOVA ABORDAGEM NA TERAPIA
DO CANCRO**

Gabriela de Lurdes Vasconcelos Silva Moreira

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Tecnologia Farmacêutica

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor Domingos de Carvalho Ferreira e Doutora Susana Amélia Marques Martins

Setembro de 2015

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO, APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

*“So never mind the darkness
We still can find a way
'Cause nothin' lasts forever
Even cold November rain”*

Guns n' Roses

AGRADECIMENTOS

Quando olho para estas páginas, tão perfeitamente preenchidas por textos, figuras, gráficos e esquemas, vejo o culminar de todo o trabalho por mim desenvolvido ao longo deste ano, o qual permitiu a concretização deste projeto. Foi um longo caminho onde dedicação, empenho, trabalho e aprendizagem caminharam de mãos dadas, na busca das metodologias mais corretas para o alcance dos melhores resultados. Sinto um orgulho imenso por tudo o que desenvolvi, pelas mil e uma coisas que aprendi, por todos os erros que cometi e me fizeram crescer, não só do ponto de vista científico e acadêmico, como também a nível pessoal. Mas mais do que orgulho e felicidade, sou invadida por uma onda de gratidão. Ao longo desta minha caminhada conheci pessoas incríveis que me presentearam com ajuda, dedicação, alegria, encorajamento e sabedoria, sem as quais não teria sido bem sucedida nesta jornada. Por outro lado, todos aqueles que já há muito caminham a meu lado, nesta magnificente aventura que é a vida, mostraram mais uma vez estar à altura da confiança que sempre depus em neles, tendo sido autênticos portos seguros nas alturas em que a minha força começou a escassear e o desânimo me assombrou. Por estar consciente do valor de cada um destes seres humanos maravilhosos e da importância que as suas palavras e gestos tiveram em mim, neste percurso que se revelou penoso em vários momentos, sinto que não posso fazer menos do que tecer a todos eles algumas palavras de gratidão e apreço profundo.

O meu primeiro agradecimento é dedicado ao meu orientador Professor Doutor Domingos de Carvalho Ferreira. Ao longo do meu trabalho mostrou uma disponibilidade imensa e uma preocupação constante. Mais importante que isso, transmitiu-me confiança e fez-me perceber, em inúmeras ocasiões, o verdadeiro valor do esforço e empenho, independentemente dos resultados alcançados. Acreditou acima de tudo no potencial do meu trabalho, quando ainda nem eu própria tinha fé no mesmo. A sua personalidade carismática e alegria contagiante valeram-me muitas gargalhadas e encheram o laboratório de boa disposição. Agradeço todos os ensinamentos e sabedoria que comigo partilhou, todos os problemas que tão profissionalmente resolveu e a oportunidade que me concedeu ao trabalhar neste projeto tão ambicioso, que tanto me fez aprender. Sentir-me-ei sempre grata por com quem ele ter trabalhado.

Para o professor Paulo Jorge Cardoso da Costa não são suficientes as palavras de apreço que seguidamente lhe vou dirigir. Foi ele que se disponibilizou e ensinou a trabalhar com todos os equipamentos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, sem os quais não teria feito o meu trabalho. Foi a ele que recorri sempre que algum problema ocorria. Demonstrou ter uma paciência incrível e uma dedicação aos alunos incomparável, dignificando ao mais alto nível a palavra professor. Agradeço todos os seus ensinamentos,

todas as vezes que me encheu de confiança ao valorizar o meu projeto, todas as ocasiões em que deixou o seu trabalho pendente para me vir auxiliar no meu. A ele dirijo-lhe o meu mais sincero e profundo obrigado, pois não sei o que teria feito sem a sua ajuda.

Agradeço à minha coorientadora, Doutora Susana Martins, por toda a ajuda prestada e conhecimentos partilhados.

Em quarto lugar, mas não menos importante, agradeço carinhosamente à “MINHA Rita”. Tantas foram as vezes em que me senti perdida, como que no meio de uma equação com inúmeras incógnitas, sem esperança de vislumbrar uma solução. Foi tão mais fácil ter desenvolvido parte do trabalho com ela, tão melhor tê-la do meu lado e partilharmos juntas os desafios e dificuldades que marcaram este percurso. Foi com ela que aprendi a desenvolver e aumentar o meu ritmo de trabalho, a pensar nele e a planeá-lo de forma mais organizada, a pensar sempre no próximo passo e no máximo possível a fazer. Foram ensinamentos importantes que levarei na minha bagagem e certamente ser-me-ão úteis no meu percurso profissional. Mais do que uma colega de trabalho, foi uma verdadeira companheira para mim.

Ao Professor Doutor José Manuel Correia Neves de Sousa Lobo, Diretor da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, responsável pelo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e antigo Diretor do Mestrado em Tecnologia Farmacêutica, sou grata pela oportunidade que me concedeu ao aceitar a minha candidatura ao referido mestrado e permitir o desenvolvimento do meu projeto no seu laboratório.

Para mim, enquanto bioquímica de formação, foi desafiante enveredar no mundo das ciências farmacêuticas. Agradeço a todos os professores do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica que tão bem me ensinaram ao partilhar os seus muitos conhecimentos sobre a área. Todos contribuíram grandiosamente para o meu crescimento científico.

A todos os meus colegas de mestrado, Jaime, Marilene, Stephanie, Rui, Sérgio, Ana Maria, Joana Gonçalves, Filipa, Marlene, Joana Vaz e Inês, agradeço por todos os excelentes momentos partilhados ao longo deste mestrado, bem como pelo companheirismo, espírito de entreatajuda, troca de conhecimentos e alegria que fizeram sempre parte do nosso dia a dia enquanto colegas de curso.

Agradeço à Doutora Cláudia Marques, por toda a ajuda, incentivo e conhecimentos partilhados.

Às lindas, maravilhosas e incríveis melhores companheiras de laboratório de sempre, agradeço do fundo do coração tudo aquilo que partilhámos ao longo destes meses de trabalho: alegrias, frustrações, gargalhadas, lamentos sinceros, palavras de apoio, sorrisos de conforto, brincadeiras, ajuda mútua, amizade e companheirismo. Juntas aprendemos que tão importante como a excelência do nosso trabalho profissional é o altruísmo, a confiança, a cooperação e a empatia com que somos capazes de presentear

os nossos colegas de trabalho. Todas elas foram personagens inspiradoras para mim: a Bárbara, com a sua sabedoria característica de alguém que já viveu e lutou bem mais do que eu; a Isabel com a sua capacidade incrível de ser uma máquina produtiva de trabalho e saber tudo e mais alguma coisa a respeito do que quer que seja; a Rita Azevedo com a sua garra e determinação desmedidas; a Verónica com a sua energia contagiante e força capaz de superar todas as adversidades; a Ana Cláudia com o seu coração bondoso e dedicação sem fim; a Rachel com a sua boa disposição inesgotável; a Rita Moreira por ser a “MINHA Rita” com quem tanto aprendi; a Marlene com a sua coragem e capacidade de luta como nunca conheci em ninguém. A todas agradeço e desejo o maior dos sucessos no futuro.

A Marlene merece, da minha parte, um especial destaque. Por ter sido a única verdadeira amiga que os tempos de faculdade me ofereceram. Por ser para mim uma inspiração com o seu exemplo de força, luta, fé e superação. Por toda a ajuda e companheirismo com que me presenteou, neste ano de tese, nos momentos em que mais precisei. Por ter começado por ser uma colega de curso e se ter transformado, ao longo do tempo, numa das amigas que mais prezo.

Parte do desenvolvimento do meu trabalho esteve dependente do uso de alguns aparelhos do Laboratório de Química Aplicada. Por esse motivo, sou grata à Professora Doutora Salette Reis que sempre se mostrou disponível para me permitir usar todos os recursos de que necessitei. Agradeço à Catarina, à Luísa, ao Alexandre, à Luise e à Ana Rute por toda a ajuda que me prestaram. Muitas foram as vezes em que o Alexandre me deixou usar o DLS nas suas marcações, mostrando-se sempre prestável, com interesse em saber qual o estado do meu trabalho e disponibilizando-se para auxiliar em tudo. Sou-lhe grata por toda a atenção demonstrada e pela sua boa disposição, tão característica do povo brasileiro. Tenho também um agradecimento especial para a Lizzie, por todas as conversas que tivemos e ajudaram a desenvolver o meu domínio da língua inglesa.

À Professora Doutora Madalena Pinto, responsável pelo Laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica, agradeço pela amabilidade ao me ter permitido usar o HPLC do seu laboratório. Em especial, agradeço à Doutora Sara por me ter auxiliado com o uso do mesmo e por toda a dedicação que demonstrou ao ter ficado comigo todo o tempo de realização do ensaio, mesmo já tendo a sua hora de expediente terminado.

Ao Rui Rocha e à Daniela Silva do Laboratório de Microscopia Eletrónica de Varrimento e Microanálise por Raios X do CEMUP agradeço pelo excelente trabalho que desenvolveram durante a análise das minhas amostras através da microscopia electrónica de varrimento.

Devo igualmente um reconhecimento à empresa Lipoid que prontamente disponibilizou, de forma gratuita, as amostras de lípidos com as quais trabalhei.

Ao pessoal técnico do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Daniel e D. Conceição, agradeço por todo o apoio técnico e logístico prestado e por, dentro das suas possibilidades, se terem esforçado por me auxiliar e me fornecer os recursos disponíveis para a realização do meu trabalho diário. À D. Conceição agradeço o seu jeito peculiar, que tantas gargalhadas me fez soltar. Por sua vez, ao Daniel agradeço por todas as boleias para a estação que me deu e por toda a simpatia e disponibilidade que sempre me ofereceu.

À Cátia, minha melhor amiga, minha confidente e companheira de vida, obrigado por estes 18 anos de amizade, de carinho, alegria, companheirismo, conforto, ajuda e euforia que temos vindo a partilhar. Agradeço-lhe por ter sempre uma palavra de incentivo e força que me fazem sair do desânimo e encorajam a acreditar no meu valor e potencial. Aos restantes membros do Quinteto Maravilha, Tina, Kata e Tiago, agradeço por serem os meus pilares, meus companheiros, meus amigos do coração, com quem espero passar o resto da minha vida.

Ao Nuno, o meu obrigado por toda a amizade e carinho, todo o apoio e risadas, todo o zelo e ajuda preciosa que só ele me sabe proporcionar quanto aos problemas informáticos que teimam em surgir nas alturas mais inoportunas.

Ao Luís, agradeço pela amizade que nos une, por nunca se cansar de me lembrar do meu potencial, pela sua sinceridade e frontalidade e pela loucura genuína que partilhamos.

Ao Álvaro devo um profundo reconhecimento, por ter sido alguém que verdadeiramente me fez rir ao longo destes árduos meses de trabalho.

Agradeço às minhas companheiras de apartamento da Residência Universitária do Campo Alegre, por todas as peripécias e convívio que juntas partilhámos. Um obrigado muito especial à Liliana, que revelou ser um verdadeiro anjo e a rapariga com o maior sentido de humor que existe à face da Terra e que tão boas gargalhadas me proporcionou.

Aos meus colegas do Grupo de Ação Social da Universidade do Porto, com quem partilhei ao longo deste ano a magia e alegria de servir ao próximo através do voluntariado, agradeço todo o amor partilhado. Aos meninos do Clube da Porta Aberta, do Bairro do Cerco, onde fui voluntária, agradeço por terem enchido o meu coração de ternura e paz sempre que os visitei.

Um agradecimento especial tenho também de dirigir à Alice e à Maria João, do Serviço de Apoio ao Estudante com Deficiência da U.P., onde tive a honra de ser voluntária, que me apresentaram com exemplos de coragem, força e superação.

À Nanda e a todos os meus meninos do grupo de catequese agradeço por serem sempre uma fonte de inspiração para mim e constituírem um dos meus mais maravilhosos projetos.

Aos meus familiares, em especial ao Rafa, à Clara, aos meus irmãos, Gabriel e Zé Maria, e aos meus pais, agradeço por serem a minha base, o meu abrigo, a sede do meu amor. Aos meus pais, Álvaro e Palmira, em especial, devo um agradecimento incomensurável por todo o amor, apoio, ensinamentos e demais bênçãos com que me presenteiam diariamente. Obrigado a eles por acreditarem em mim, no meu valor e potencial, mais do que eu própria, e por terem lutado com garra e determinação pelo seu sonho de me verem a frequentar a faculdade, mesmo com todos os esforços árduos que isso acarretou para eles. Assim, esta dissertação é especialmente dedicada a eles.

Por último, a Ti, por toda a força, paz e amor que brotam diariamente do meu coração e me ajudaram a suportar esta jornada. Por tudo aquilo que me preenche a alma e não pode vir de mais ninguém, a não ser de Ti.

RESUMO

O cancro constitui uma das principais causas de mortalidade no mundo, sendo um problema incomensuravelmente grave. O tratamento do cancro consiste na cirurgia seguida de radioterapia e/ou quimioterapia. Contudo esta terapêutica apresenta limitações. Assim, a investigação tem-se dirigido para a descoberta de alternativas de forma a melhorar a terapêutica.

O paclitaxel é um dos fármacos anticancerígenos correntemente usado na terapia de vários cancros. Apesar da sua eficácia, apresenta efeitos secundários graves, nomeadamente sob a formulação de Taxol, devido à toxicidade do Chremophor EL. Assim, é de extrema importância ultrapassar as limitações deste fármaco utilizando para isso, sistemas alternativos para administração do mesmo.

Os lipossomas constituem um dos tipos de vetores de fármacos mais usados, devido, principalmente, à sua biocompatibilidade. No entanto, apresentam uma grande limitação devido à sua instabilidade. Os prolipossomas são partículas sólidas formadas por lípidos que ao serem hidratadas dão origem a lipossomas. Assim, apresentam as vantagens destes sistemas aliadas a uma forma farmacêutica sólida, o que ultrapassa a questão da instabilidade.

Assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de prolipossomas contendo paclitaxel, como uma alternativa terapêutica para o cancro.

Foram usadas três processos diferentes: secagem por atomização, liofilização e o método *film deposition on carrier*. Os lipossomas obtidos, após a hidratação dos prolipossomas, foram caracterizados, quanto ao seu tamanho, potencial zeta, morfologia e eficácia de encapsulação do fármaco.

Os resultados mostram que a encapsulação do paclitaxel foi obtida em grande percentagem, sendo que não afetou o tamanho e potencial zeta dos lipossomas obtidos. Os prolipossomas produzidos pelo método de secagem por atomização originou lipossomas com um diâmetro médio menor (estatisticamente significativo) do que os obtidos pelos restantes métodos.

Em conclusão, o método de secagem por atomização merece ser explorado futuramente devido aos resultados promissores face aos restantes métodos.

Palavras - chave: Cancro, paclitaxel, lipossomas, prolipossomas.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of mortality in the world, being a serious problem. The cancer treatment consists of surgery followed by radiation therapy and/or chemotherapy. However this therapy presents limitations. As well, research has been directed towards the discovery of alternatives to improve therapy.

The paclitaxel is one of anti-carcinogenic recurring therapeutic enough for various cancers. This despite its effectiveness presents serious side effects, particularly in the formulation of Taxol, due to the toxicity of Chremophor EL. Thus, it is very important to overcome the limitations of this drug, using alternative systems for drug administration. The liposomes constitute a type of vectors commonly used, due to its biocompatibility. However, feature a large limitation due to its instability. The proliposomes are solid particles formed by lipids, which to be hydrated giving rise to liposomes. So, present the advantages of these systems combined with a solid pharmaceutical form, which exceeds the question of liposome instability.

Thus, the objective of this work was the development of proliposomes containing paclitaxel, as an alternative cancer therapy. Three different methods were used, spray drying, freeze drying and film deposition on carrier. The liposomes obtained after hydration of proliposomes have been characterized, taking into account the size, zeta potential, morphology and drug encapsulation efficiency.

The results show that the encapsulation of paclitaxel was obtained in a great percentage and did not affect the average diameter and zeta potential of the liposomes. The proliposomes obtained by spray drying, after hydration, originated liposomes with a smaller mean diameter (statistically significant) than those obtained by other methods. In conclusion, the method of spray drying deserves to be explored in the future due to the promising results compared to other methods.

Keywords: Cancer, paclitaxel, liposome, proliposome

LISTA DE ABREVIATURAS

10-DABIII - 10-desacetilbacatina III

CH - colesterol

CrEL - Cremophor EL

D - coeficiente de difusão

DLS- *dynamic light scattering*

DSC - calorimetria diferencial de varrimento

EPR - (*enhanced permeability and retention*)

FD - *freeze drying*- liofilização

FDA - *Food and Drug Administration*

FDC - *film deposition on carrier*

GDP - guanosina difosfato

GTP - Guanosina trifosfato

GUV - *giant unilamellar vesicles* - vesículas unilamelares gigantes

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

k' - fator de retenção

LUV - *large unilamellar vesicles* - vesículas unilamelares grandes

MLV - *multilamellar vesicles* - vesículas multilamelares

MVL - *multivesicular liposomes* – Lipossomas multivesiculares

NCI - *National Intistute of Cancer* – Instituto Nacional de Cancro

OLV - *oligolamellar vesicles* - vesículas oligolamelares

PC - fosfatidilcolina

PTX - Paclitaxel

R² - Coeficiente de determinação

SD - *spray drying* - secagem por atomização

SUV - *small unilamellar vesicles* - vesículas unilamelares pequenas

Tc - transição de fase

TSP-1 - trombospondina-1

VEGF - fator de crescimento do endotélio vascular

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CANCRO.....	1
1.1.1. TERAPÊUTICA	3
1.2. LIPOSSOMAS.....	16
1.2.1. CONSTITUIÇÃO E ESTRUTURA.....	16
1.2.2. CLASSIFICAÇÃO	19
1.2.3. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO	20
1.2.4. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	21
1.2.5. APLICAÇÕES DOS LIPOSSOMAS: VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS	21
1.2.6. INSTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES LIPOSSÓMICAS.....	24
1.3. PROLIPOSSOMAS	24
1.3.1. MÉTODOS DE PRODUÇÃO	25
1.3.2. APLICAÇÕES DOS PROLIPOSSOMAS.....	26
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. MATERIAIS.....	32
3.2. MÉTODOS	32
3.2.1. DOSEAMENTO DO PACLITAXEL.....	33
3.2.2. PREPARAÇÃO DOS PROLIPOSSOMAS.....	34
3.2.3. HIDRATAÇÃO DOS PROLIPOSSOMAS	43
3.2.4. CARACTERIZAÇÃO	43
3.2.4.1. DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO E POLIDISPERSÃO	43
3.2.4.2. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA	45
3.2.4.3. EFICÁCIA DE ENCAPSULAÇÃO	45
3.2.4.4. Cryo-SEM	46
3.2.4.5. DSC	46
3.2.4.6. SEM.....	47
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. DOSEAMENTO DO PACLITAXEL	48
4.2. SELEÇÃO DE MATERIAIS	52
4.3. SELEÇÃO DOS MÉTODOS DE PRODUÇÃO DOS PROLIPOSSOMAS	53
4.4. DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO	54

4.5. DESENVOLVIMENTO DE PROLIPOSSOMAS COM PTX - CARACTERIZAÇÃO.....	61
4.6. MORFOLOGIA	69
5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do paclitaxel [18].	6
Figura 2: Formação dos microtúbulos e sua estrutura [45].....	7
Figura 3: Estrutura do fuso mitótico e sua evolução ao longo das várias fases da mitose [47].	8
Figura 4: Transporte de fármacos anticancerígenos para o tumor, através de vetorização ativa e passiva. A vetorização passiva faz uso da permeabilidade aumentada dos vasos sanguíneos tumorais, permitindo a libertação do fármaco na proximidade do tumor. A vetorização ativa é conseguida através da funcionalização da superfície do vetor com moléculas que reconhecem recetores ou antigénios sobre-expressos nas células cancerígenas. Uma vez chegado à vizinhança do tumor, o vetor pode libertar o seu conteúdo próximo da célula (I); ligar-se ao recetor na membrana da célula e libertar o fármaco (II); ser internalizado na célula (III). São vários os tipos de vetores adequados para o transporte de fármacos. Adaptado de [102].	15
Figura 5: Representação da estrutura da bicamada fosfolipídica e de um lipossoma [117].....	17
Figura 6: Estrutura geral de um glicerofosfolípido. X representa a molécula orgânica ligada ao grupo fosfato, a qual pode ser variável [119].....	17
Figura 7: Estrutura química do colesterol [123].	19
Figura 8: Representação esquemática dos vários tipos de lipossomas, classificados segundo o seu diâmetro e número de bicamadas lipídicas [127].	20
Figura 9: Representação dos mecanismos de interação entre o lipossoma e a célula. As letras apresentadas representam os seguintes processos: a – adsorção específica; b – adsorção não específica; c – fusão; d – libertação por contacto; e – transferência lipídica; f – endocitose; g – fusão com o lisossoma; h – destabilização do endossoma e consequente libertação do fármaco. [113].....	23
Figura 10: Esquema da montagem para a preparação de prolipossomas segundo o método FDC [167].....	37
Figura 11: Sistema montado para a preparação de prolipossomas segundo o método FDC. A – Vista geral de toda a montagem; B – Ampola de decantação contendo a solução lipídica; C – Balão de fundo redondo, onde se encontra o manitol misturado com solução lipídica.	38
Figura 12: Parte de um diagrama de fases da água, onde é destacado o ponto triplo [169].....	39
Figura 13: Aparelho AdVantage 2.0 Bench Top FreezeDryer, Virtis SP SCIENTIFIC [172].....	40

Figura 14: Representação do funcionamento do Nano Spray Dryer B-90. Adaptado de [177].	41
Figura 15: <i>Nano particle scraper</i> , usado para a recolha das partículas [179].	42
Figura 16: Nano Spray Dryer B-90, Büchi Labortechnik AG [177].	43
Figura 17: O fundamento da técnica de DLS baseia-se nas variações da intensidade da luz dispersa pelas partículas, as quais se relacionam com o tamanho das mesmas: partículas menores correspondem a maiores velocidades na flutuação da intensidade luminosa [181].	44
Figura 18: Representação gráfica do fator de retenção em função da percentagem de metanol da fase móvel.	49
Figura 19: Espectro de absorção do paclitaxel entre os 200 e 400 nm.	50
Figura 20: Cromatograma do PTX e espectros de absorção em cada ponto escolhido.	50
Figura 21: Curva de calibração do paclitaxel. Equação da reta: $y = 0,9146x - 0,2393$.	52
Figura 22: Caixa de bigodes do diâmetro médio dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método FDC (film deposition on carrier) com as razões molares de CH:PC de 1:3 e 1:4 ($p > 0,05$).	58
Figura 23: Caixa de bigodes do diâmetro médio dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método FD (<i>freeze drying</i>) com as razões mássicas de lípidos manitol de 1:1; 1:2,5; 1:5; 1:10 ($p > 0,05$).	59
Figura 24: Termograma dos prolipossomas produzidos pelo método FD (<i>freeze drying</i>) com as razões mássicas de lípidos:manitol de 1:1; 1:2,5; 1:5; 1:10.	60
Figura 25: Caixa de bigodes do diâmetro médio dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método FDC com PTX 1% e sem fármaco ($p > 0,05$).	62
Figura 26: Caixa de bigodes do potencial zeta dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método FDC com PTX 1% e sem fármaco ($p > 0,05$).	62
Figura 27: Caixa de bigodes do diâmetro médio dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método FD com PTX 1% e sem fármaco ($p > 0,05$).	63
Figura 28: Caixa de bigodes do potencial zeta dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método FD com PTX 1% e sem fármaco ($p > 0,05$).	64

Figura 29: Caixa de bigodes do diâmetro médio dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método FD com PTX 1% e sem fármaco ($p>0,05$). 65

Figura 30: Caixa de bigodes do potencial zeta dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método SD com PTX 1% e sem fármaco ($p>0,05$).. 65

Figura 31: Caixa de bigodes do diâmetro médio dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelos três métodos com PTX 1%. 66

Figura 32: Caixa de bigodes do potencial zeta dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelos três métodos com PTX 1% ($p>0,05$). 67

Figura 33: Imagens de cryoSEM obtidas com o Microscópio Eletrônico de Varrimento de alta resolução, com Microanálise por Raios X e sistema para observação de amostras a baixa temperatura (JEOL JSM 6301F/ Oxford INCA Energy 350/ Gatan Alto 2500, referentes aos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos com a técnica de SD. A – manitol hidratado, ampliação x2500; B – SD sem fármaco x2500; C, D e E – SD sem fármaco x2500; F – SD com PTX x 2500; G, H e I – SD com PTX x 25000. 69

Figura 34: Imagens de cryoSEM obtidas com o Microscópio Eletrônico de Varrimento de alta resolução, com Microanálise por Raios X e sistema para observação de amostras a baixa temperatura (JEOL JSM 6301F/ Oxford INCA Energy 350/ Gatan Alto 2500, referentes aos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos com a técnica de FD. A – manitol hidratado, ampliação x2500; B – FD sem fármaco x2500; C, D e E – FD sem fármaco x2500; F – FD com PTX x 2500; G, H e I – FD com PTX x 25000. 70

Figura 35: Imagens de cryoSEM obtidas com o Microscópio Eletrônico de Varrimento de alta resolução, com Microanálise por Raios X e sistema para observação de amostras a baixa temperatura (JEOL JSM 6301F/ Oxford INCA Energy 350/ Gatan Alto 2500, referentes aos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos com a técnica de FDC. A – manitol hidratado, ampliação x2500; B – FDC sem fármaco x2500; C, D e E – FDC sem fármaco x25000; F – FDC com PTX x 2500; G, H e I – FDC com PTX x 25000. 71

Figura 36: Imagens de SEM obtidas com o Microscópio Eletrônico de Varrimento ambiental, de alta resolução (Schottky) Quanta 400FEG ESEM / EDAX Genesis X4M referentes aos prolipossomas obtidos com a técnica FDC e manitol usado. A – manitol x500; B – manitol x2500; C – manitol x10000; D – prolipossomas FDC s/ fármaco x500; E – prolipossomas FDC s/ fármaco x2500; F – prolipossomas FDC s/ fármaco x10000; G –

prolipossomas FDC com PTX x500; E – prolipossomas FDC com PTX x2500; F – prolipossomas FDC com PTX x10000..... 72

Figura 37: Imagens de SEM obtidas com o Microscópio Eletrónico de Varrimento ambiental, de alta resolução (Schottky) Quanta 400FEG ESEM / EDAX Genesis X4M referentes aos prolipossomas obtidos com a técnica FD e manitol usado. A – manitol liofilizado x500; B – manitol liofilizado x2500; C – manitol liofilizado x10000; D – prolipossomas FD s/ fármaco x500; E – prolipossomas FD s/ fármaco x2500; F – prolipossomas FD s/ fármaco x10000; G – prolipossomas FD com PTX x500; E – prolipossomas FD com PTX x2500; F – prolipossomas FD com PTX x10000..... 73

Figura 38:Imagens de SEM obtidas com o Microscópio Eletrónico de Varrimento ambiental, de alta resolução (Schottky) Quanta 400FEG ESEM / EDAX Genesis X4M referentes aos prolipossomas obtidos com a técnica SD e manitol usado. A – manitol SD x500; B – manitol SD x2500; C – manitol SD x10000; D – prolipossomas SD s/ fármaco x500; E – prolipossomas SD s/ fármaco x2500; F – prolipossomas SD s/ fármaco x10000; G – prolipossomas SD com PTX x500; E – prolipossomas SD com PTX x2500; F – prolipossomas SD com PTX x10000. 74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais grupos de quimioterápicos e respectivo mecanismo de acção [15].....	4
Tabela 2: Principais reacções adversas associadas ao uso do PTX.....	11
Tabela 3: Exemplos dos glicerofosfolípidos mais comuns, nome e fórmula das respectivas moléculas orgânicas (X) que constituem os seus grupos polares e carga do lípido a pH neutro [119].....	18
Tabela 4: Métodos de produção de liposomas e respectivo tipo de vesículas formado [118, 122].....	20
Tabela 5: Métodos de caracterização dos lipossomas [128, 129].	21
Tabela 6: Métodos de produção dos prolipossomas.	25
Tabela 7: Materiais usados no trabalho experimental.	32
Tabela 8: Constituição das formulações usadas na preparação dos prolipossomas.	34
Tabela 9: Constituição das formulações usadas na preparação dos prolipossomas para testar diferentes razões molares de PC:CH.	35
Tabela 10: Constituição das formulações usadas na preparação dos prolipossomas para testar diferentes razões mássicas de lípidos:manitol.	36
Tabela 11: Média e coeficiente de variação (c.v.) do tempo de retenção - t_r , área, altura, pratos teóricos e simetria, determinados para os volumes de injeção de 10, 20, 30 e 40 μL	48
Tabela 12: Valores das áreas dos picos do PTX de três amostras, analisadas no mesmo dia.....	51
Tabela 13: Resultados do diâmetro médio (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) para as diferentes formulações preparadas com o método FDC, usando diferentes razões molares de PC:CH e uma razão mássica lípidos:manitol de 1:5.	55
Tabela 14: Resultados do diâmetro médio (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) para formulações preparadas com o método FDC, usando diferentes razões molares de PC:CH (3:1 e 4:1) e uma razão mássica lípidos:manitol de 1:5.	57
Tabela 15: Resultados do diâmetro médio (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) para formulações preparadas com o método FD, usando diferentes razões mássicas de lípidos:manitol e uma razão molar PC:CH de 3:1.	59
Tabela 16: Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e eficácia de encapsulação dos lipossomas.	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. CANCRO

O corpo de um ser humano adulto é composto por, aproximadamente, 10^{15} células. A manutenção da integridade do organismo é conseguida graças à presença das células-tronco, estruturas que detêm a capacidade de se dividir e diferenciar, a fim de repovoarem órgãos e tecidos que dependem da renovação celular. Estima-se que, por dia, estas células estejam envolvidas em aproximadamente 10^{12} divisões celulares [1]. Apesar da multiplicidade de novas células, existe uma complexa rede de mecanismos moleculares que regem a proliferação e apoptose celulares, garantido assim um controlo sobre o seu número. Qualquer fator que perturbe o equilíbrio entre o nascimento e a morte celulares potencia o aumento da totalidade de células de um órgão ou tecidos específicos. Como consequência, após muitas gerações celulares, este crescimento celular anormal torna-se clinicamente detetável como uma neoplasia, também denominada tumor [1-3].

Um tumor pode ser classificado como benigno ou maligno. Esta distinção é crucial para prescrever o tratamento mais apropriado ao doente, bem como determinar o seu prognóstico. Um tumor maligno invade e destrói o tecido normal adjacente. Alcançando os canais linfáticos e vasos sanguíneos, pode invadir nódulos linfáticos e outros órgãos, originando metástases. Por sua vez, um tumor benigno não invade o tecido circundante, permanece localizado e não metastiza. O crescimento dos tumores malignos no geral, embora não invariavelmente, é mais rápido do que o dos tumores benignos. As células de um tumor maligno tendem a ser menos bem diferenciadas do que as células normais do tecido de que resultam, enquanto os tumores benignos geralmente se assemelham mais ao tecido normal [3].

O cancro pode então ser definido como um grupo de doenças onde ocorre um crescimento anormal de células devido a alterações na expressão de genes que levam à divisão celular descontrolada ou resistência à apoptose. As células cancerosas podem invadir outros tecidos e órgãos formando metástases, causando significativa morbidade e, se não for tratada, a morte do hospedeiro [1-3].

Talvez a questão mais importante na biologia do cancro é perceber quais as alterações celulares que conduzem à carcinogénese, evento que transforma uma célula normal do organismo numa célula cancerosa. A sua origem deve-se, principalmente, à alteração da expressão de proto-oncogenes, os quais codificam para proteínas envolvidas na indução da proliferação celular e diferenciação, e de genes supressores tumorais, que codificam proteínas que produzem sinais inibitórios do crescimento celular e/ou estimulam a apoptose. Assim, os proto-oncogenes são ativados, quando deveriam estar em modo

inativo, e os genes supressores de tumores ou são expressos incorrectamente ou nem se chegam a expressar [1, 2, 4-7].

São várias as causas apontadas para a alteração da expressão dos referidos genes: danos no DNA, devido a mutações (translocações, amplificações, deleções) ou mecanismos que resultam na sua transcrição ou tradução anormal [3, 5]. A origem das mutações pode ser espontânea, devido a erros de replicação do DNA, desaminação ou depurinação, mas o mais comum é dever-se a agentes carcinogénicos exógenos. Estes podem ser de vários tipos: substâncias químicas (aminas e hidrocarbonetos aromáticos, compostos metálicos, aflatoxinas, componentes do tabaco, etc.), radiação ionizante e ultravioleta, espécies reativas de oxigénio, vírus. Para além de danos diretos na estrutura do DNA (mutações), estes agentes podem modular a expressão de genes de modo indireto através de alterações epigenéticas, como mudanças na metilação do DNA e acetilação das histonas. Uma vez que o material genético da célula é alterado, não sendo capaz de ser reparado pelos mecanismos de reparação de DNA celulares, a célula perpetuará essa alteração genética [1, 5, 6].

Para sumariar, são cinco as principais vias que devem ser activadas na génese de uma célula cancerosa [1, 6, 7]:

- Independência a sinais estimuladores do crescimento externos;
- Desenvolvimento de um estado refractário a sinais inibidores do crescimento;
- Resistência à morte celular programada (apoptose);
- Obtenção de capacidade proliferativa infinita, superando a senescência celular;
- Desenvolvimento da capacidade angiogénica, ou seja, o potencial de formar novos vasos sanguíneos.

A nível epidemiológico, o cancro constitui uma das principais causas de mortalidade no mundo, tendo sido responsável por 8,2 milhões de mortes em 2012. De acordo com as estatísticas apresentadas pela Organização Mundial de Saúde, é esperado que os 14 milhões de novos casos reportados no referido ano aumentem para 22 milhões nas duas próximas décadas [8]. Dados como estes mostram de forma indubitável aquilo que há muito é do conhecimento geral: o cancro é um problema incomensuravelmente grave e à escala global. Além da elevada incidência da doença e das taxas de mortalidade esmagadoras, os efeitos que surgem nos doentes comprometem muito a sua qualidade de vida. De facto, o crescimento de um tumor maligno produz uma série de possíveis efeitos no hospedeiro, como dor, infeções, anemia, perda de peso, fadiga, efeitos neurológicos, acarretando também ao paciente graves consequências a nível psicológico e social [9, 10]. Considerando todos estes factos, é fácil perceber a razão para o tratamento do cancro ser

um dos grandes desafios da medicina moderna e que tem despoletado uma forte onda de investigação e investimento por parte das indústrias farmacêuticas [11].

1.1.1. TERAPÊUTICA

Durante a primeira metade do século XX, cirurgia e radioterapia constituíram os meios efetivos para o tratamento do cancro [12]. Depois da década de 60, com a descoberta do acelerador linear, a terapia por recurso à radiação tornou-se uma ferramenta poderosa [11]. Todavia, o poder terapêutico destes métodos é limitado a cancros locais, não sendo eficazes em situações de cancro metastático [11-13]. Para este último caso, o recurso a agentes quimioterápicos é a estratégia atual, uma vez que são capazes de atingir todos os órgãos do corpo através da corrente sanguínea [11-13].

A quimioterapia é utilizada em quatro situações clínicas principais: tratamento primário para a doença avançada ou para os cancros para os quais não existem outras abordagens eficazes de terapia; tratamento neoadjuvante para os pacientes que apresentam doença localizada e para os quais as formas locais de terapia, tais como a cirurgia e/ou radioterapia, não são suficientes; tratamento adjuvante para métodos de tratamento localizados; perfusão dirigida a locais específicos do corpo diretamente afetados pelo cancro [14].

Os fármacos quimioterápicos baseiam-se em compostos citotóxicos que afetam a divisão celular, inibindo assim a rápida proliferação das células cancerosas. A era da quimioterapia iniciou-se nos anos 40, com o uso de agentes alquilantes derivados do gás mostarda, os quais são capazes de formar ligações covalentes com o DNA, impedindo assim a ocorrência da mitose. Desde então, muitos outros fármacos com mecanismos de ação alternativos foram desenvolvidos [11-13]. Na tabela 1, encontram-se representados alguns dos principais grupos de quimioterápicos, o respectivo mecanismo de ação, bem como exemplos para cada caso.

Tabela 1: Principais grupos de quimioterápicos e respectivo mecanismo de ação [15].

Grupos	Mecanismo de ação	Exemplos
Agentes alquilantes	Danificam o DNA, trabalhando em todas as fases do ciclo celular, impedindo a célula de se reproduzir.	Mecloretamina Melfalano Carmustina Dacarbazina Temozolomida Cisplatina Carboplatina
Antibióticos antitumorais	As antraciclinas interferem com enzimas envolvidas na replicação do DNA.	Daunorrubicina Doxorrubicina Epirubicina Idarrubicina
Antimetabólitos	Inibem a biossíntese do DNA e RNA.	5-Fluorouracilo Capecitabina Citarabina Floxuridina Gencitabina Metrotexato Fludarabina
Corticosteróides	Hormonas naturais e fármacos semelhantes a hormonas que são úteis no tratamento de muitos tipos de cancro, sendo por isso considerados quimioterápicos.	Prednisona Metilprednisolona Dexametasona
Inibidores da topoisomerase	Interferem com as topoisomerasas, enzimas que ajudam a separar as cadeias de DNA para que possam ser copiadas durante a fase S do ciclo celular, impedindo assim a sua replicação.	Inibidores topoisomerase I Topotecano Irinotecano Inibidores topoisomerase II Etoposido Mitoxantrona
Inibidores mitóticos	Impedem a formação do fuso mitótico, parando assim a mitose na metafase.	Paclitaxel Docetaxel Vimblastina Vincristina Estramustina

O paclitaxel é um dos fármacos mais utilizados no tratamento do cancro e tem vindo a ser alvo de um intenso estudo desde a sua descoberta [16]. Ele terá destaque nas próximas páginas, onde será feita uma abordagem das suas principais características.

1.1.1.1. PACLITAXEL

No início da década de 60, o *National Institute of Cancer* (NCI) dos Estados Unidos iniciou um programa para a descoberta de novos compostos com atividade anticancerígena derivados de plantas. Foram analisados extratos da casca do teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*), tendo uma das amostras revelado atividade citotóxica. Procedeu-se ao isolamento da substância ativa responsável por tais propriedades, a qual foi nomeada Taxol [16-19].

Nos anos 80 iniciaram-se os ensaios clínicos, tendo-se verificado a potencialidade do paclitaxel quando num estudo do cancro do ovário se concluiu que 30% dos pacientes obtiveram uma resposta completa ou parcial à terapia com o fármaco [20, 21]. Em 1992 foi aprovado pela FDA para o tratamento do cancro do ovário e, dois anos mais tarde, para o cancro da mama [18, 22]. Atualmente tem sido utilizado na terapia de uma grande variedade de cancros, incluindo o do ovário [18], mama [23], cancro do pulmão de pequenas [24] e não-pequenas células [25], bexiga [26], esófago [27], cancro da cabeça e pescoço [28] e sarcoma de Kaposi [29].

1.1.1.1.1. ESTRUTURA QUÍMICA

O paclitaxel (PTX) é um diterpeno, pertencente à classe dos taxanos, com a fórmula empírica $C_{47}H_{51}NO_{14}$ e uma massa molecular de 853,9 g/mol. É um pentadecano, organizado num sistema de anéis tetracíclico e composto por quatro cadeias laterais localizadas em C2, C4, C10 e C13. Da sua estrutura química (figura 1), publicada em 1971 [30], destacam-se um anel oxetano, nas posições C4 e C5, e uma cadeia lateral ligada ao hidroxilo em C13 como uma ligação éster [16, 22, 31, 32].

Esta molécula tem sido sujeita a uma extensa caracterização química. Estudos nos quais alguns grupos químicos do PTX foram sujeitos a modificações, com o objetivo de determinar a relação estrutura-atividade do composto, mostraram que o anel oxetano, a cadeia lateral na posição C13 e as posições do hemisfério sul (C1, C2 e C4) têm um papel crucial no efeito citotóxico do PTX [16, 22, 32, 33]. Estes estudos revestem-se da maior importância, já que permitem abrir caminho para a produção de novos análogos do PTX, detentores de uma ação farmacológica melhorada [31, 34-36].

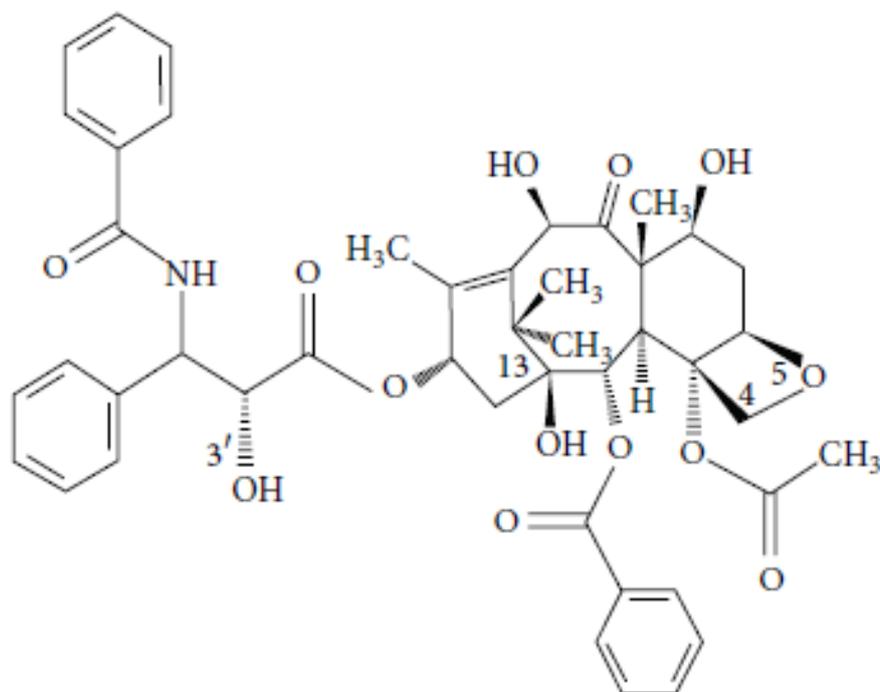


Figura 1: Estrutura química do paclitaxel [18].

1.1.1.1.2. MECANISMO DE AÇÃO

Susan Horwitz, em 1979, identificou o mecanismo molecular responsável pela atuação do paclitaxel na morte das células tumorais [37]. Trata-se de um processo único que envolve o estímulo da polimerização dos microtúbulos e, para melhor o entender, é necessário estudar um pouco esta estrutura, bem como rever alguns conceitos-chave da biologia celular.

Os microtúbulos são estruturas dinâmicas que se formam através da polimerização de heterodímeros de α e β -tubulina. Os dímeros associam-se longitudinalmente para formar protofilamentos (etapa 1 – figura 2). Um conjunto de 13 protofilamentos agrupa-se, formando uma estrutura cilíndrica oca, o microtúbulo (etapa 2 – figura 2). Finalmente, este é alongado através da sucessiva adição de dímeros às suas extremidades. Ao monômero de β -tubulina está ligada uma molécula de guanosina trifosfato (GTP). Após a incorporação de um novo dímero de tubulina no microtúbulo, em algum momento, o GTP é hidrolisado para GDP. Por esse motivo, a maior parte da β -tubulina que compõe a estrutura estará ligada a uma molécula de GDP. Se a taxa de polimerização for mais rápida do que a taxa de hidrólise do GTP, no final da extremidade (+) acumular-se-á tubulina-GTP, o que confere estabilidade ao microtúbulo, permitindo que a polimerização da tubulina continue,

ocorrendo assim o seu crescimento (etapa 3 – figura 2). Por sua vez, se a polimerização começa a ocorrer lentamente, dando tempo às moléculas de GTP da extremidade (+) hidrolisarem, o microtúbulo torna-se instável, havendo a sua rápida despolimerização. Assim, um parâmetro que determina a estabilidade de um microtúbulo é a taxa a que as subunidades de GTP-tubulina são adicionadas [38-44].

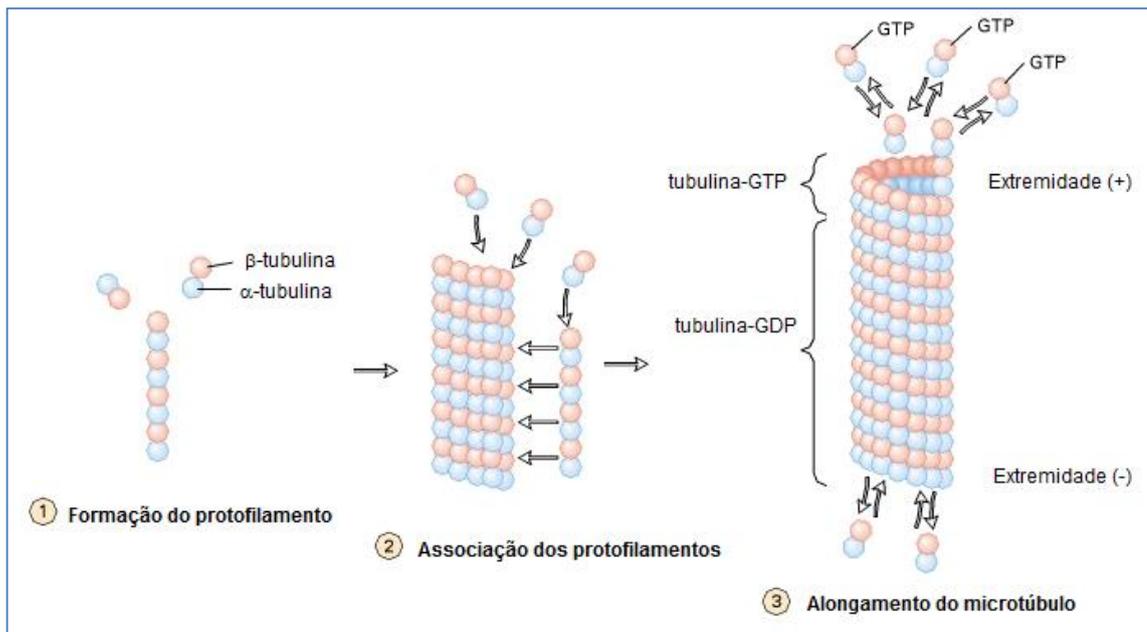


Figura 2: Formação dos microtúbulos e sua estrutura [45].

A extremidade (+), que termina com uma subunidade β , é muito mais dinâmica do que a extremidade (-), que finaliza com a α . Os microtúbulos estão sempre num estado de polimerização ou despolimerização, alternando assim entre períodos de crescimento ou encurtamento, respetivamente, uma propriedade denominada instabilidade dinâmica [38-42]. O balanço entre estes dois estados, e o resultante controlo do comprimento dos microtúbulos, é vital para regular as funções biológicas dos microtúbulos na célula. Indubitavelmente o seu papel mais importante é a formação do fuso mitótico, estrutura intimamente envolvida na divisão celular [39, 46-48].

Durante a divisão celular, a célula deve duplicar os seus componentes internos, incluindo o DNA, de modo a originar duas células-filhas iguais a si, num processo designado mitose. Assim, após ocorrer a replicação do material genético, cada cromossoma é composto por dois cromátídeos idênticos, os quais devem separar-se em extremidades opostas da célula, prontos para fazerem parte do núcleo das duas novas células que se formarão. Para o desenrolar de todo este processo é essencial a atuação dos microtúbulos. A figura 3 ajuda a compreender esta dinâmica. No final da profase, os

microtúbulos começam a formar-se e a crescer em direção aos cromossomas e, após a desintegração do núcleo na etapa seguinte, os microtúbulos ligam-se a eles através do cinetócoro. Em seguida, os cromossomas dispõem-se no plano equatorial do fuso mitótico e a célula entra na anafase. Aqui começa a ocorrer a despolimerização dos microtúbulos, com o seu consequente encurtamento, causando a separação dos dois cromatídeos de cada cromossoma e a sua migração para pólos opostos da célula. Após a formação de um novo núcleo em torno dos dois grupos de cromossomas, a mitose chega ao fim [39, 46-48].

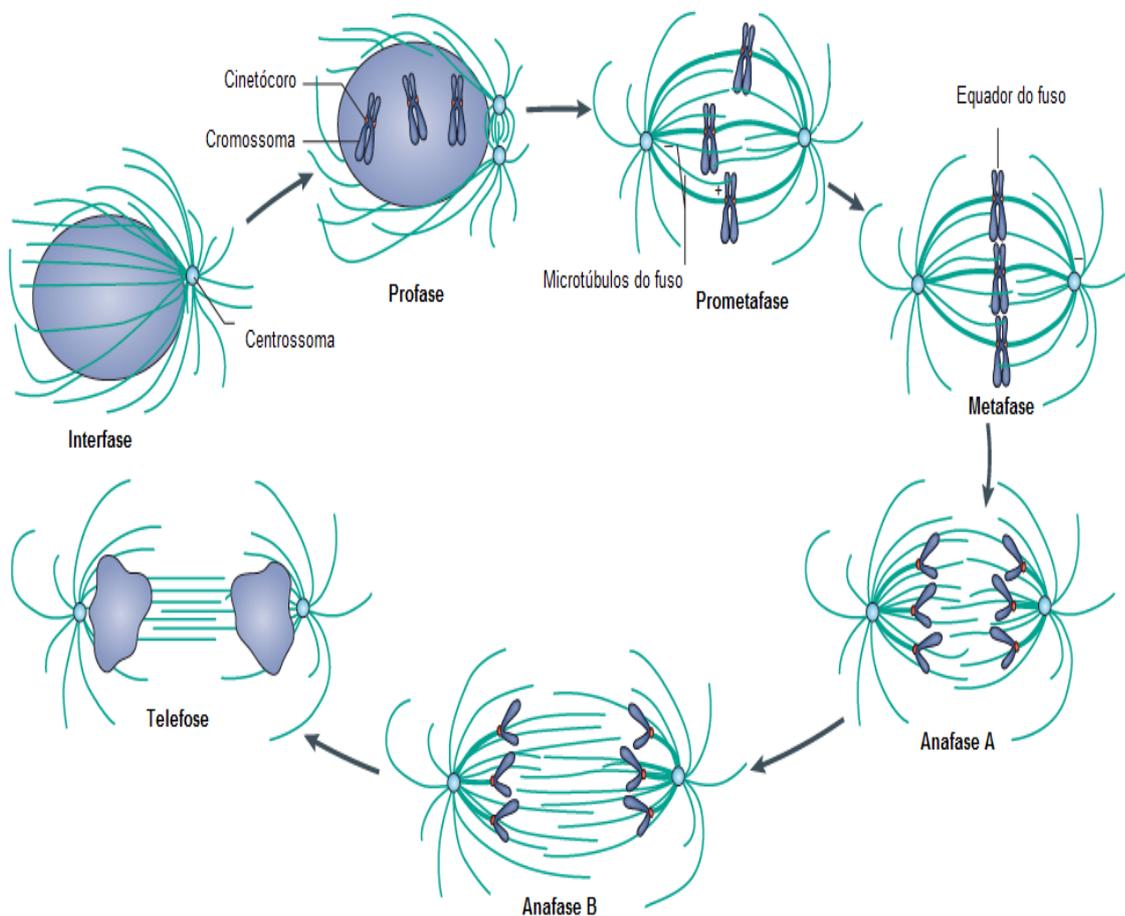


Figura 3: Estrutura do fuso mitótico e sua evolução ao longo das várias fases da mitose [47].

Os microtúbulos estão assim intimamente envolvidos na replicação celular e agentes que interfiram com a dinâmica desta estrutura podem inibir este processo. Pois bem, é aqui que o paclitaxel entra em ação. Esta molécula tem a capacidade de se ligar com grande afinidade à β -tubulina dos heterodímeros que formam os microtúbulos [37-39, 42]. O local específico de ligação, na superfície interior do microtúbulo, é conhecido com precisão devido a estudos de cristalografia eletrónica da tubulina complexada com PTX

[49]. A ligação do fármaco à superfície dos microtúbulos promove a sua estabilidade e polimerização contínua. Assim, ao atuar nas células de um tumor, o PTX suprime a dinâmica dos microtúbulos, impedindo a sua despolimerização e, conseqüentemente, a separação dos cromossomas. A célula é incapaz de prosseguir o ciclo e se reproduzir, levando ao bloqueio da mitose e apoptose. Como consequência da morte celular, o tumor é impossibilitado de crescer [18, 37-39, 50-52].

Em meados de 1990, começou a ser investigada a atividade antiangiogénica do PTX, como um possível mecanismo adicional que contribui para o seu efeito antineoplásico *in vivo*. Foi descoberto que este composto tem a capacidade de regular negativamente o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e a angiopoietina-1 (Ang 1), proteína essencial para a sobrevivência das células endoteliais, ramificação vascular e estabilização dos vasos sanguíneos [53, 54]. Para além disso, mostrou-se que o fármaco causa a sobre-expressão da trombospondina-1 (TSP-1), uma potente inibidora da angiogénese [53, 55]. Dado que o desenvolvimento de um tumor está dependente, entre outros fatores, da sua capacidade de formar novos vasos sanguíneos [1], os dados destes estudos merecem ser explorados de forma a descobrir mais acerca da atividade antiangiogénica do paclitaxel e o seu conseqüente potencial no tratamento do cancro.

1.1.1.1.3. DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO

A escolha de uma formulação farmacêutica apropriada é um passo imprescindível na produção de qualquer medicamento. Assim, de modo a produzir os seus efeitos farmacológicos, o PTX deve ser levado, em concentrações adequadas, até ao seu local de ação. O desenvolvimento de uma formulação contendo este fármaco foi um processo desafiante, devido a questões relacionadas com a sua obtenção e propriedades físico-químicas.

A extração do PTX da casca do teixo do pacífico, a sua fonte natural, apresenta um rendimento muitíssimo baixo, e cedo se percebeu que seria incapaz de suprir a crescente demanda pelo fármaco [56]. Em 1988 uma alternativa foi descoberta, ao ter sido demonstrado que o precursor 10-desacetilbacatina III (10-DABIII), isolado das agulhas do teixo europeu (*Taxus baccata*), podia ser convertido em PTX numa simples reação de semissíntese [57]. A síntese total do PTX, devido à complexidade da molécula, permaneceu durante anos um grande desafio para os químicos orgânicos. Em 1994, Holton e Nicolaou foram bem sucedidos neste campo, porém, os altos custos associados a este processo tornam-no comercialmente inviável [22, 58-60]. Outras reações de síntese química do fármaco foram desenvolvidas desde então [16]. A produção de PTX em culturas celulares de *Taxus* desenvolvidas pela Phyton Biotech têm providenciado à Bristol-Myers

Squibb, companhia farmacêutica responsável pela produção e comercialização do PTX, uma fonte segura e sustentável de fármaco desde 1995 [61]. De facto, as culturas de células de plantas constituem uma potencial fonte de fármaco de alto rendimento e que têm sido alvo de muito estudo [22, 58].

O PTX apresenta-se como um pó branco e altamente hidrofóbico (hidrossolubilidade < 0,3 µg/mL), o que torna necessário o uso de co-solventes [19, 62]. A formulação atualmente disponível para administração intravenosa consiste num veículo composto pela mistura de Cremophor EL, CrEL, (óleo de rícino polietoxilado) e álcool desidratado (1:1, v/v), onde o PTX é solubilizado (6 mg/mL) [19, 63, 64]. No entanto, o uso do CrEL está associado a uma série de reações adversas que incluem hipersensibilidade, neurotoxicidade e hiperlipidemia, bem como alterações na farmacocinética do PTX [19, 63, 65-69].

1.1.1.1.4. FARMACOCINÉTICA

As propriedades farmacocinéticas do PTX têm sido extensivamente estudadas e alguns artigos fornecem uma boa revisão dos principais estudos efetuados neste âmbito [70-72].

Após a administração intravenosa do PTX, mais de 90% do fármaco liga-se às proteínas plasmáticas [72, 73]. Apresenta um grande volume de distribuição, indicando uma extensiva distribuição extravascular, e uma *clearance* plasmática considerada bifásica [72]. Quanto à sua farmacocinética, os resultados de vários estudos apontam para um modelo não linear [71, 74].

O fármaco é submetido a um extenso metabolismo hepático pelas enzimas do citocromo P-450, CYP3A e CYP2C8, sendo uma grande percentagem eliminado nas fezes [71]. Menos de 10% do PTX na sua forma inalterada é eliminado na urina, indicando uma extensa *clearance* não renal [75].

1.1.1.1.5. TOXICIDADE

São várias as reações de toxicidade apontadas ao uso do PTX. Na tabela seguinte, encontram-se descritas as principais reações adversas associadas a este fármaco, acompanhadas de algumas considerações relativas às mesmas.

Tabela 2: Principais reações adversas associadas ao uso do PTX.

Reação adversa	Considerações
Hipersensibilidade	<ul style="list-style-type: none"> • Reações de hipersensibilidade tipo I que incluem hipotensão, dispneia com broncoespasmo, urticária e erupção cutânea [69, 76]. • O veículo CrEL contribui significativamente para estas reações [63]. No entanto, elas são igualmente relatadas em formulações sem CrEL, mostrando que o PTX por si só é capaz de as promover [77]. • Para minimizar o risco associado a estas reações, os pacientes devem ser pré-tratados com corticosteróides e bloqueadores dos recetores de histamina. Mesmo com esses pré-tratamentos elas podem ocorrer [69].
Toxicidade hematológica	<ul style="list-style-type: none"> • A principal reação de toxicidade hematológica associada ao paclitaxel é a neutropenia. Maiores tempos de infusão (24h) aumentam a incidência de neutropenia, comparando com infusões mais curtas (3h) [76]. • Numa infusão de 24h, com doses de 200-250 mg/m², a neutropenia é geralmente grave, com contagem absoluta de neutrófilos < 500/μl [78]. • A administração de PTX induz também anemia [79]. • Os tratamentos combinados com PTX e outros agentes quimioterapêuticos, como a carboplatina, doxorrubicina e ciclofosfamida, parecem aumentar a mielossupressão [76].
Infeções	<ul style="list-style-type: none"> • Apesar das infeções poderem ser atribuídas à imunossupressão causada pela toxicidade hematológica, algumas são comuns em pacientes que receberam PTX. A enterocolite neutropénica foi especificamente associada à terapêutica com este fármaco [80]. • Febre e infeções do trato urinário e respiratório são frequentemente relatadas. Episódios de pneumonia e peritonite também são descritas [78].

Neurotoxicidade

- Os eventos neurotóxicos associados ao uso do CrEL incluem ganglionopatia, axonopatia e desmielinização. Contudo, dados clínicos mostram que o PTX por si mesmo tem efeito no desenvolvimento da neuropatia periférica [81-84].
- A neuropatia periférica é uma das principais toxicidades limitantes de dose do PTX e, infelizmente, ao longo da terapia é encontrada na maioria dos pacientes [85].
- A maioria das opções de tratamento para as reações de neurotoxicidade disponíveis são paliativas, incluindo a redução da dose e o término do tratamento. Antidepressivos e anticonvulsivantes são amplamente usados para o tratamento da dor neuropática [81, 86].

Toxicidade cardíaca

- Os distúrbios cardíacos associados ao PTX incluem, principalmente, hipotensão e bradicardia assintomática (30% pacientes) [76, 87].
- Outros eventos têm sido relatados: Mobitz I, Mobitz II e bloqueio cardíaco de terceiro grau [76, 87].
- Traquicardia ventricular tem sido observada em pacientes tratados com PTX isoladamente ou em combinação com cisplatina [87, 88].
- Quando o PTX é administrado simultaneamente com doxorrubicina, medeia a sua conversão em doxorrubicinol, um álcool responsável por danos irreversíveis no miocárdio [89].

Mialgias

- Mialgias podem aparecer 24-72h após a administração de PTX e o aumento das doses de fármaco está positivamente correlacionado com sua a sua incidência e severidade [90].

As informações anteriormente apresentadas, relativamente à farmacocinética e toxicidade do PTX, mostram que apesar das suas potencialidades terapêuticas, a sua ampla distribuição pelos tecidos corporais e reações de toxicidade são inconvenientes que limitam o seu uso. No entanto, eles não são exclusivos deste fármaco. De facto, são muitas as contrapartidas apresentadas pela quimioterapia convencional [91], como será apresentado em seguida.

1.1.1.2. LIMITAÇÕES DA QUIMIOTERAPIA CONVENCIONAL

Muitos dos fármacos quimioterápicos habitualmente usados, apesar de serem altamente citotóxicos para as células tumorais, não são capazes de fazer jus ao seu potencial terapêutico [92]. A falta de especificidade para os tecidos neoplásicos e o seu elevado volume de distribuição fazem com que eles sejam distribuídos por todo o organismo, atingindo concentrações tóxicas nos tecidos saudáveis. Assim, uma das maiores limitações destes fármacos é o seu baixo índice terapêutico, isto é, a dose necessária para produzir o efeito antitumoral é tóxica para os tecidos normais [91, 92].

A maioria dos quimioterápicos não agem sobre mecanismos intracelulares exclusivos das células tumorais, mas sim em vias comuns partilhadas pelas células neoplásicas e normais. A falta de seletividade no mecanismo de ação constitui outra das limitações à quimioterapia convencional [91].

Outro dos seus fatores limitantes prende-se com a capacidade das células tumorais possuírem mecanismos de resistência aos fármacos, como a sobre-expressão da glicoproteína-P, proteína membrana capaz de bombear os fármacos para fora da célula [93, 94].

Muitos dos medicamentos utilizados na terapia do cancro apresentam fraca solubilidade em água, pelo que a sua formulação por vezes obriga ao uso de veículos que apresentam problemas de toxicidade, como é o caso do Cremophor® EL, usado na formulação comercial do PTX [18].

Perante todos estas limitações, torna-se claro que a solução ideal seria conseguir o direcionamento dos quimioterápicos para o seu local de ação, evitando ao máximo a sua distribuição pelos restantes tecidos. Mas como conseguir tal proeza? A resposta surgiu por meio de Paul Ehrlich, no início do século XX [95].

1.1.1.3. VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS

A vetorização de fármacos (*drug targeting*) é uma área que tem sido objeto de investigação e estudos intensos, caracterizando-se como a capacidade da substância ativa se acumular, de forma seletiva, nos tecidos alvo, independentemente do local e métodos de administração. Assim, idealmente, a concentração do fármaco no local alvo deve ser elevada, enquanto que nos restantes tecidos deve manter-se abaixo do nível que promova quaisquer reações adversas [96]. A aplicação deste conceito acarreta duas importantes vantagens: a quantidade de fármaco necessária para alcançar um efeito terapêutico pode ser reduzida, bem como o custo da terapia; a concentração do fármaco, em caso de necessidade, pode ser acentuadamente aumentada, sem efeitos negativos para os restantes tecidos [96].

Este conceito foi apresentado no início do século XX por Paul Ehrlich quando se referiu ao termo “bala mágica”, um sistema capaz de direcionar o fármaco especificamente para o seu local de ação [95, 97]. Atualmente, a vetorização de fármacos divide-se principalmente em duas vertentes: passiva e ativa.

Vetorização passiva

Esta abordagem envolve o uso de características fisiológicas apresentadas pelos tecidos alvo, das quais se tira partido para a entrega de fármacos [96, 97]. É sabido que, sob certas circunstâncias, o endotélio dos vasos sanguíneos se torna mais permeável, em comparação com o estado normal, o que se verifica em muitos tumores [98]. Como resultado, os vetores com o tamanho adequado podem deixar o espaço vascular e acumular-se no espaço intersticial (figura 4). Este fenómeno é vulgarmente conhecido como efeito EPR (*enhanced permeability and retention*) [91, 97-99]. Uma vez fora da corrente circulatória, o fármaco pode ser libertado para as células tumorais [97].

Vetorização ativa

A vetorização ativa requer a conjugação do transportador com ligandos específicos de recetores celulares do local alvo (figura 4). O sucesso da vetorização irá depender da seleção do ligando, que deverá ter alta afinidade e especificidade para um dado recetor celular e ser adequado para modificações químicas por conjugação com o transportador [100]. São várias as substâncias que podem servir como ligandos: anticorpos, hormonas, moléculas carregadas, polissacarídeos, lipoproteínas [97]. Os anticorpos monoclonais constituem as moléculas mais frequentemente usadas [101]. A possibilidade de conjugação do transportador com vários tipos de ligandos oferece excelentes oportunidades para romper as barreiras fisiológicas e ter acesso a diferentes tecidos, seguindo-se a ligação ao recetor celular e internalização [100].

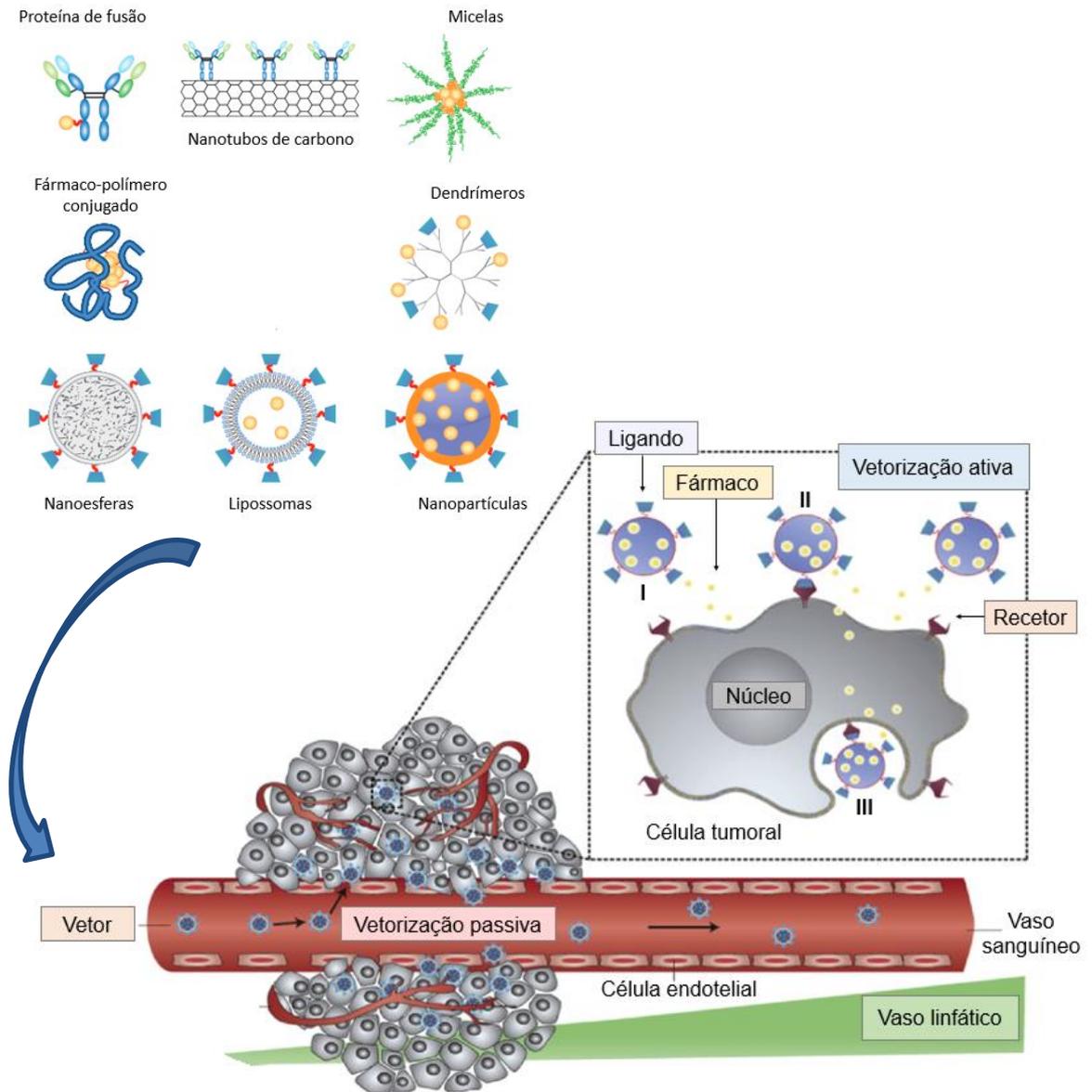


Figura 4: Transporte de fármacos anticancerígenos para o tumor, através de vetorização ativa e passiva. A vetorização passiva faz uso da permeabilidade aumentada dos vasos sanguíneos tumorais, permitindo a libertação do fármaco na proximidade do tumor. A vetorização ativa é conseguida através da funcionalização da superfície do vetor com moléculas que reconhecem recetores ou antígenos sobre-expressos nas células cancerígenas. Uma vez chegado à vizinhança do tumor, o vetor pode libertar o seu conteúdo próximo da célula (I); ligar-se ao recetor na membrana da célula e libertar o fármaco (II); ser internalizado na célula (III). São vários os tipos de vetores adequados para o transporte de fármacos. Adaptado de [102].

Vários sistemas apresentam potencialidades que os tornam adequados para o uso como vetores de fármacos [102-106], sendo alguns exemplos ilustrados na figura 4. De entre todos eles, os lipossomas constituem um dos sistemas de maior importância.

1.2. LIPOSSOMAS

Na década de 60, Alec Bangham e seus colaboradores observaram que fosfolípidos, em contacto com um meio aquoso, davam origem a estruturas em bicamada fechadas [107]. Mais ainda, demonstraram que a difusão de catiões e aniões univalentes através das paredes dessas mesmas estruturas era notavelmente semelhante à difusão ocorrida através das membranas biológicas [108]. Pouco tempo depois, estes sistemas receberam a designação de lipossomas [109]. Após o trabalho de Bangham, passaram a ser usados como modelos para o estudo das membranas celulares [109]. Em 1970, Sessa e Weissmann procederam com sucesso à incorporação de lisozimas no interior de lipossomas [110]. Os resultados de tal experiência foram um prenúncio para o potencial do uso destas estruturas na medicina [111] e assim, em 1971, Gregoriadis propôs a sua utilização como um sistema transportador de fármacos [112]. Desde então, e até aos dias de hoje, os lipossomas e as suas propriedades têm sido alvos de uma intensa investigação, a qual resultou na publicação de milhares de estudos e no desenvolvimento e aprovação de várias formulações de fármacos transportados em lipossomas [113].

1.2.1. CONSTITUIÇÃO E ESTRUTURA

Os lipossomas são vesículas esféricas formadas por lípidos, os quais se organizam em uma ou mais bicamadas lipídicas, envolvendo um compartimento aquoso. Eles são caracterizados pela sua composição lipídica, distribuição do tamanho de partículas e número de lamelas, os quais ditam as suas características de estabilidade e interação [114]. Os lipossomas são compostos principalmente por fosfolípidos, moléculas anfifílicas formadas por uma cabeça hidrofílica e duas cadeias hidrofóbicas. Quando são dispersos em solução aquosa, devido à sua natureza anfipática, eles têm tendência para formar membranas. As regiões polares interagem com o ambiente aquoso, sendo dirigidas para o interior do núcleo e para a fase aquosa externa; por outro lado, as suas longas cadeias apolares ficam voltadas umas para as outras, formando a região interna da bicamada. Em solução aquosa, estas propriedades favorecem a formação de uma dupla camada lipídica (figura 5) [111, 115, 116].

Tabela 3: Exemplos dos glicerofosfolípidos mais comuns, nome e fórmula das respectivas moléculas orgânicas (X) que constituem os seus grupos polares e carga do lípido a pH neutro [119].

Glicerofosfolípido	Nome de X	Fórmula de X	Carga pH neutro
Ácido fosfatídico	-	(-H)	-1
Fosfatidilcolina	Colina	(-CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃)	0
Fosfatidiletanolamina	Etanolamina	(-CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺)	0
Fosfatidilglicerol	Glicerol	(-CH ₂ CHOHCH ₂ OH)	-1
Fosfatidilserina	Serina	(-CH ₂ CHNH ₃ ⁺ COO ⁻)	-1

A variação das moléculas orgânicas que constituem os grupos polares e das cadeias hidrocarbonadas que formam os ácidos gordos leva à existência de uma grande diversidade de fosfolípidos [119, 120]. Estes podem ser obtidos de fontes naturais ou produzidos sinteticamente [120]. A fosfatidilcolina trata-se de um dos lípidos mais abundantes nas membranas biológicas, sendo também um dos mais usados na preparação de lipossomas [117, 120]. É obtida de fontes naturais, mais propriamente da soja ou da gema do ovo [120].

Os fosfolípidos caracterizam-se por uma temperatura de transição de fase (T_c). Quando esta é atingida a membrana passa de uma fase gel-sólido, na qual a cadeia hidrocarbonada do lípido se encontra num estado ordenado, para uma fase de cristal-líquido, onde as moléculas ficam com movimentos mais livres e os radicais hidrofílicos agrupados tornam-se completamente hidratados, tornando a membrana mais fluida e permeável [121]. Vários fatores afetam a T_c: a natureza do grupo polar; o comprimento e grau de saturação das cadeias hidrocarbonadas que formam os ácidos gordos (quanto maiores e saturadas foram as cadeias, maior a T_c); a pureza (quanto menos puro é o lípido, maior é o intervalo da T_c) [120]. Os fosfolípidos naturais são geralmente misturas de componentes com cadeias de hidrocarbonetos de diversos comprimentos [118]. Em tais casos é de esperar que as transições não sejam tão bem definidas, levando a um intervalo de T_c mais amplo, como acontece por exemplo com a fosfatidilcolina do ovo, cuja T_c varia entre -5 e -15 °C [120]. O conhecimento deste parâmetro é de grande importância quando se trata de escolher os lípidos mais adequados para a preparação de lipossomas com as características pretendidas [114]. De facto, o comportamento de uma membrana lipossomal determina algumas das propriedades dos lipossomas tais como a permeabilidade, a fusão e a agregação, o que trará consequências ao nível da sua estabilidade e futuras aplicações [122].

1.2.1.2. COLESTEROL

O colesterol (figura 7) é o mais importante esterol presente nas membranas biológicas [117]. Juntamente com os fosfolípidos, este composto usualmente faz parte das membranas dos lipossomas. De facto, a sua adição à bicamada lipídica diminui a sua permeabilidade e aumenta a sua estabilidade, uma vez que induz o empacotamento dos fosfolípidos. Assim, o colesterol preenche os espaços vazios entre as moléculas fosfolípídicas, ancorando-as mais fortemente na estrutura [115, 123]. Esta influência do colesterol no comportamento das membranas lipossomais tem sido claramente comprovada [124, 125].

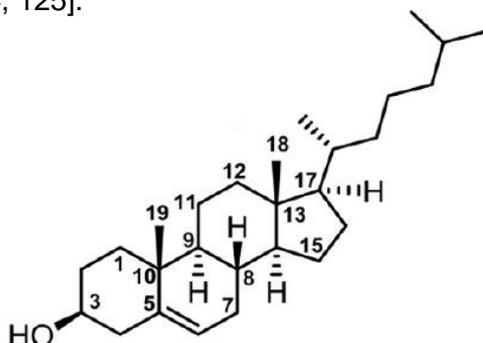


Figura 7: Estrutura química do colesterol [123].

1.2.2. CLASSIFICAÇÃO

Os lipossomas podem ser classificados segundo o seu diâmetro e número de bicamadas lipídicas, os quais vão depender da sua composição e método de preparação [126]. Assim, quanto ao tamanho, as vesículas podem obter as seguintes designações: pequenas, quando apresentam um diâmetro compreendido entre 20 e 100 nm; grandes, se o seu tamanho está entre os 100 e 1000 nm; gigantes, quando o seu diâmetro ultrapassa 1 μm , podendo estender-se até dezenas de μm . Os lipossomas podem ser constituídos por uma única bicamada lipídica – vesículas unilameres – ou por várias bicamadas – vesículas multilamelares. Atendendo então a estas duas propriedades, podem ser considerados vários tipos de lipossomas: vesículas unilamelares pequenas – SUV (*small unilamellar vesicles*), vesículas unilamelares grandes – LUV (*large unilamellar vesicles*), vesículas unilamelares gigantes – GUV (*giant unilamellar vesicles*). De grande importância são as vesículas multilamelares – MLV (*multilamellar vesicles*) – cujo método de preparação é o mais simples e imediato, podendo apresentar um diâmetro de 100 nm até vários μm [126]. Podem ser também distinguidas as vesículas oligolamelares – OLV (*oligolamellar vesicles*) – que apresentam um grande núcleo aquoso central rodeado por um pequeno número de bicamadas e, à semelhança das unilamelares, se subdividem em pequenas (SOV), grandes (LOV) e gigantes (GOV). Quando lipossomas mais pequenos são aprisionados

aleatoriamente em vesículas maiores originam-se os lipossomas multivesiculares – MVL (*multivesicular liposomes*) [116, 126].

Na figura 8 é apresentada uma representação esquemática dos tipos de lipossomas referidos no texto.

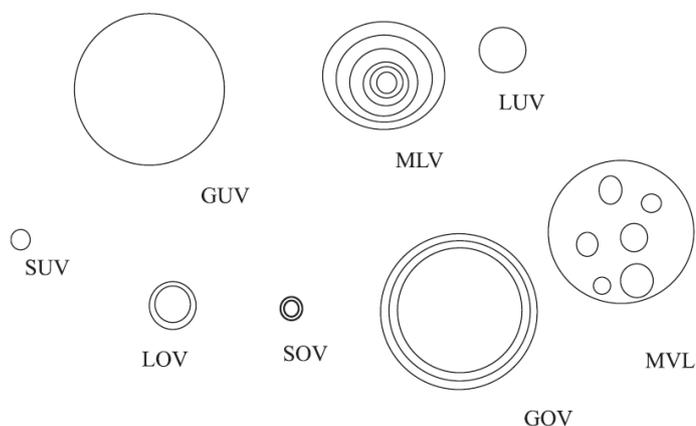


Figura 8: Representação esquemática dos vários tipos de lipossomas, classificados segundo o seu diâmetro e número de bicamadas lipídicas [127].

1.2.3. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO

A tabela 4 faz referência a alguns dos principais métodos usados para a produção de lipossomas.

Tabela 4: Métodos de produção de lipossomas e respetivo tipo de vesículas formado [118, 122].

Formação das vesículas	Tipos de vesículas formados
Hidratação do filme lipídico	MLV
Evaporação em fase reversa	MLV, LUV
Injeção do solvente orgânico	MLV, LUV, SUV
Desidratação-rehidratação	MLV
Redução do tamanho das vesículas	
Extrusão através de filtros de policarbonato	LUV, SUV
Homogeneização a alta pressão	LUV, SUV
Sonicação	Principalmente SUV
Purificação	
Diálise	-
Cromatografia	-
Ultrafiltração	-

1.2.4. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

Após a obtenção dos lipossomas, é imprescindível proceder-se à sua caracterização físico-química, de modo a podermos avaliar a qualidade do produto e tirar conclusões acerca do método de produção usado. São vários os parâmetros passíveis de estudo, sendo que o diâmetro médio da partícula, a carga elétrica de superfície, morfologia e eficácia de encapsulação do fármaco constituem alguns dos mais importantes.

Tabela 5: Métodos de caracterização dos lipossomas [128, 129].

Característica	Método
Tamanho	Microscopia eletrônica, <i>Dynamic light scattering</i> (DLS)
Carga à superfície (Potencial zeta)	<i>Electrophoretic light scattering</i> (ELS)
Lamelaridade	Microscopia eletrônica
Eficácia de encapsulação do fármaco	Cromatografia
Morfologia	Microscopia eletrônica
Análise térmica	Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

1.2.5. APLICAÇÕES DOS LIPOSSOMAS: VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS

1.2.5.1. VANTAGENS

Os lipossomas são dotados de características particulares que lhes conferem um grande potencial como vetores de fármacos. Para começar, estes sistemas têm sido alvo de um intenso estudo, pelo que já se encontram bem caracterizados ao nível das suas propriedades físico-químicas e estruturais, reações de toxicidade e imunogenicidade e possíveis formas de administração *in vivo*. Assim, toda a informação disponível permite a escolha e conceção do sistema mais apropriado para cada finalidade. A sua estrutura dota-os da capacidade de transportar fármacos hidrofílicos, no interior do seu núcleo interno aquoso, e também fármacos lipofílicos, aprisionados no interior da bicamada fosfolipídica [115].

São biocompatíveis, produzidos com lípidos presentes nas membranas biológicas, biodegradáveis e a eles está associada a baixa ocorrência de reações tóxicas e imunológicas [97, 101].

Sob o ponto de vista tecnológico, o seu fabrico utiliza matéria-prima acessível, podendo ser usados inúmeros métodos de preparação [126]. Os lipossomas podem incorporar fármacos com variadíssimas características, estando disponíveis várias estratégias a ser adotadas de acordo com a natureza do material a encapsular [122].

A encapsulação do fármaco no interior do lipossoma protege-o dos fenómenos de degradação enzimática e inativação química e imunológica [116]. Assim, impedem que a substância ativa seja metabolizada antes de atingir o seu local de ação e, em simultâneo, minimizam a exposição das células saudáveis ao fármaco e seus potenciais efeitos tóxicos, o que contribui para aumentar o seu índice terapêutico [115].

Os lipossomas podem sofrer modificações à sua superfície de modo a dotá-los de várias funcionalidades, incluindo o prolongamento na circulação sistémica (recurso à peguilação) o direcionamento para o local-alvo (uso de ligandos à sua superfície) e o aumento da internalização celular [130].

1.2.5.2. INTERAÇÃO LIPOSSOMA-CÉLULA

O sucesso terapêutico de um fármaco transportado em lipossomas dependerá do modo como eles, alcançando o local alvo, irão interagir com as células para proceder à entrega do seu conteúdo. Fundamentalmente, são cinco os mecanismos de que os lipossomas se podem servir para estabelecer o contacto celular e cumprir a sua missão (figura 9).

Adsorção – Os lipossomas podem associar-se à superfície celular, sem ocorrer a sua internalização, sendo a sua bicamada lipídica degradada por enzimas. Isto conduz à libertação do fármaco para o meio extracelular, o qual se pode difundir, graças a um gradiente de concentração, através da membrana rumo ao citoplasma [115]. A adsorção pode ser mediada por forças não específicas (por exemplo, interação eletrostática ou hidrofóbica – figura 9-b) ou por componentes específicos, como recetores da superfície celular que reconheçam e se liguem a moléculas da membrana dos lipossomas ou ligandos neles conjugados (figura 9-a) [131].

Fusão – A membrana lipossómica funde-se com a membrana plasmática da célula-alvo, havendo a libertação do seu conteúdo para o citoplasma (figura 9-c). Eventos secundários podem levar o fármaco a concentrar-se noutros compartimentos intracelulares, como os lisossomas [131, 132].

Libertação por contacto – A membrana do lipossoma, ao contactar com a superfície celular, pode sofrer destabilização com um conseqüente aumento da sua permeabilidade. Como resultado, o seu conteúdo é libertado e pode entrar na célula via micropinocitose (figura 9-d) [113].

Transferência lipídica – Este processo consiste na transferência de moléculas lipídicas entre os lipossomas e a membrana celular, sem o comprometimento da integridade da membrana nem a rutura do lipossoma (figura 9-e) [131].

Endocitose – Outra possibilidade é a internalização dos lipossomas por endocitose (figura 9-f). Seguidamente pode ocorrer uma de duas opções: a fusão com os lisossomas, sendo que baixos valores de pH conduzem à degradação da membrana lipossómica, seguindo-se a libertação do fármaco (figura 9-g); a destabilização do endossoma e conseqüente libertação do fármaco (figura 9-h) [131].

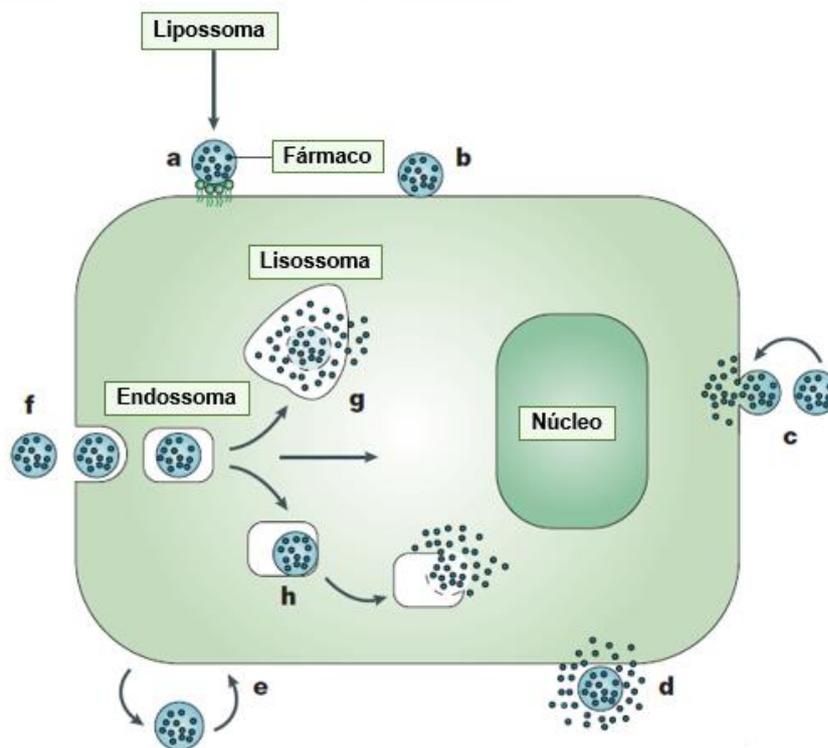


Figura 9: Representação dos mecanismos de interação entre o lipossoma e a célula. As letras apresentadas representam os seguintes processos: a – adsorção específica; b – adsorção não específica; c – fusão; d – libertação por contacto; e – transferência lipídica; f – endocitose; g – fusão com o lisossoma; h – destabilização do endossoma e conseqüente libertação do fármaco. [113]

1.2.6. INSTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES LIPOSSÓMICAS

Um dos problemas principais que limitam o amplo uso é a instabilidade - física e química. Dependendo da sua composição, as formulações de lipossomas podem ter curtos “tempos de prateleira” devido a ela. A instabilidade química pode ser causada por hidrólise da ligação éster e/ou oxidação de cadeias acilo dos lípidos insaturados. A instabilidade física pode ser provocada por saída de fármaco a partir das vesículas e/ou a agregação ou a fusão das vesículas, formando partículas maiores. Ambos os processos influenciam o desempenho *in vivo* da formulação do fármaco, e, portanto, podem afetar o seu índice terapêutico [92]. Este problema associado à instabilidade das formulações lipossômicas parece ter uma solução: prolipossomas.

1.3. PROLIPOSSOMAS

O conceito de prolipossomas foi apresentado pela primeira vez por Nicholas Payne e colaboradores, em 1989, sob um título sugestivo “Proliposomes: A Novel Solution to an Old Problem” [133]. Os prolipossomas foram descritos como um produto granular, seco, de escoamento livre, sendo o pó constituído por lípidos, o fármaco e um material transportador solúvel em água (um açúcar, por exemplo), que ao ser hidratado permite a formação de vesículas lipossômicas multilamelares (MLV) [133, 134]. Na generalidade, as formulações lipossômicas podem sofrer uma variedade de reações adversas à sua estabilidade, incluindo agregação, oxidação e hidrólise dos fosfolípidos, o que limita o seu tempo de vida útil e torna questionável a sua utilidade como um produto comercializável. Neste caso, um sistema capaz de transportar o fármaco, concebido para minimizar potenciais problemas de estabilidade física e química seria ideal [133]. Assim, os autores descrevem os prolipossomas como uma potencial alternativa às formulações lipossômicas convencionais, que permitem evitar muitos dos problemas de instabilidade por elas apresentadas, uma vez que se tratam de partículas sólidas e secas, cujo propósito é serem hidratadas apenas imediatamente antes do uso. A sua administração pode ser feita por via intravenosa, ou por outras vias [133, 134]. O seu estado físico faz com que sejam sistemas versáteis, de fácil medição, distribuição e armazenamento, com possibilidades de fabrico rentável em larga escala e uso com uma vasta gama de substâncias ativas [134, 135]. Os prolipossomas podem também ser administrados no seu estado sólido, sendo que os lipossomas são formados *in vivo*, sob a influência dos fluidos fisiológicos [135].

Os prolipossomas são um sistema ideal para fármacos lipofílicos, sendo que depois da sua hidratação eles se concentram na membrana lipídica dos lipossomas formados [133]. As características dos prolipossomas irão depender da formulação usada para a sua preparação. A seleção de um material transportador adequado é um importante fator a

considerar. Este deve ser escolhido com base na sua porosidade e capacidade de acomodar os lípidos à sua superfície, de modo a que eles fiquem homoganeamente dispersos. Ser solúvel em água, de modo a facilitar a hidratação dos prolipossomas, e adequado para a via de administração que se pretende usar são outros dos requisitos que ele deve cumprir. Os açúcares constituem bons candidatos [133].

Para que os prolipossomas possam atuar como um sistema veiculador de fármacos, é fundamental a escolha de metodologias de produção adequadas. O método clássico desenvolvido por Payne e o a técnica de *spray drying* são das mais utilizadas.

1.3.1. MÉTODOS DE PRODUÇÃO

Alguns dos métodos de produção dos prolipossomas estão indicados na Tabela 6.

Tabela 6: Métodos de produção dos prolipossomas.

Método	Considerações
<i>Film deposition on carrier</i>	<ul style="list-style-type: none"> Método originalmente usado por Nicholas Payne para a produção de prolipossomas [133]; Envolve a preparação de uma solução de fosfolípidos e fármaco num solvente orgânico volátil [133]; O material transportador (<i>carrier</i>) é colocado num evaporador rotativo, sendo que a solução orgânica de lípidos e fármaco vai sendo depositada sobre ele, seguindo-se a evaporação do solvente [133]; Vários autores têm sido bem-sucedidos na preparação de prolipossomas usando este método [136-139].
<i>Spray drying</i>	<ul style="list-style-type: none"> O método de <i>spray drying</i>, ou secagem por atomização, consiste na atomização da solução, formando-se milhares de pequeníssimas gotas que, após evaporação do solvente nelas presente, originam partículas sólidas [140]. Esta metodologia tem sido muito utilizada na produção de prolipossomas, principalmente para a via pulmonar [141, 142].

1.3.3. APLICAÇÕES DOS PROLIPOSSOMAS

Apesar do conceito de prolipossomas ter surgido no final da década de 80, constituem uma matéria ainda pouco estudada. Enquanto possíveis sistemas de entrega de fármacos, oferecem as vantagens das formulações lipossômicas e resolvem os problemas de instabilidade por elas apresentados [133, 134]. Assim, as suas potencialidades merecem ser exploradas.

Uma revisão dos trabalhos científicos publicados nesta área mostra que eles incidem sobretudo em duas vertentes: desenvolvimento de prolipossomas para administração pela via pulmonar e oral.

1.3.3.1. VIA ORAL

A via oral continua a ser uma das escolhas preferidas para a administração de fármacos. Contudo, muitas substâncias ativas sofrem de problemas de biodisponibilidade devido à sua baixa solubilidade e estabilidade nos fluidos gastrointestinais, pobre permeação através desta barreira ou degradação hepática [135]. Várias metodologias têm sido adotadas para superar o desafio que este tipo de fármacos apresenta, sendo que inúmeros estudos mostram que os prolipossomas podem ser uma possível estratégia a considerar. Uma vez que são partículas sólidas, podem ser formulados em formas de dosagem como comprimidos e cápsulas, ocorrendo a posterior formação dos lipossomas *in vivo*, aquando do contacto com os fluidos biológicos [143]. Desta forma, os prolipossomas oferecem uma sinergia única entre a capacidade dos lipossomas encapsularem e protegerem os fármacos e o aumento da estabilidade que é assegurado pelas formas farmacêuticas sólidas [144].

Yanamandra et al. prepararam cápsulas e comprimidos com prolipossomas de lovastatina (usada no tratamento da hipercolesterolemia), o que resultou num aumento da biodisponibilidade do fármaco [145].

Prolipossomas de cetoprofeno (anti-inflamatório) foram produzidos, com vista a aumentar a sua absorção e tolerância gástrica [143]. Os resultados do estudo mostraram a transformação do fármaco do estado cristalino para o amorfo, o que resulta num aumento da taxa de dissolução de moléculas insolúveis em água [143]. Os estudos de absorção *in situ* revelaram um aumento da absorção do cetoprofeno, com reduzida toxicidade gástrica [143].

Vanić et. al usaram a técnica de *spray drying* para a preparação de prolipossomas de metronidazol (antibiótico), que usaram posteriormente para a produção de comprimidos [144].

O antirretroviral tenofovir viu a sua permeabilidade aumentada, em estudos *in vitro*, quando administrado em prolipossomas [146].

Bobbala e Veerareddy usaram o método *film deposition on carrier* para a preparação de prolipossomas de isradipina (anti-hipertensor). A biodisponibilidade do fármaco administrado nestes sistemas foi aumentada em comparação com a suspensão de fármaco puro [137].

Estudos de farmacocinética *in vivo*, efetuados em ratos, mostraram um aumento em três vezes da taxa de absorção do raloxifeno (usada no tratamento da osteoporose), quando administrado em prolipossomas [139].

Estudos semelhantes foram feitos com prolipossomas de zaleplon (fármaco usado no tratamento de insónias), tendo-se demonstrado um aumento da biodisponibilidade da substância ativa [135].

Tantisripreecha et al. empreenderam um estudo para conhecer a potencialidade do uso dos prolipossomas em comprimidos de libertação retardada para administração oral de proteínas. Para tal, foi usada a albumina sérica bovina. Os comprimidos mostraram ser completamente restituídos em lipossomas, com resistência suficiente para o ambiente hostil do trato gastrointestinal [147].

Prolipossomas de metoclopramida (antiemético) mostraram ser adequados para a produção de comprimidos de libertação controlada de moléculas altamente solúveis [148].

Xu et al. desenvolveram prolipossomas de vimpocetina (tratamento e prevenção do AVC e outras doenças cerebrovasculares), o que resultou num aumento significativo da sua biodisponibilidade, em comparação com a suspensão do fármaco [149].

Prolipossomas com o imunossupressor ciclosporina A foram desenvolvidos, com vista a ultrapassar os problemas de baixa solubilidade apresentados pelo fármaco. Os resultados destes estudos permitiram obter uma formulação prolipossomal estável, facilmente hidratável que permitiu aumentar a biodisponibilidade da substância ativa [150].

Potluri e Betageri prepararam prolipossomas de progesterona. A formulação produzida permitiu aumentar a taxa de dissolução e transporte membranar da substância, como revelaram os estudos *in vitro*, onde se verificou um aumento de quatro vezes no seu transporte celular [151].

Os resultados destes estudos apresentados mostraram que os prolipossomas são um potencial sistema para possibilitar a administração oral de fármacos com baixa solubilidade em água.

1.3.3.2. VIA PULMONAR

Os prolipossomas podem proporcionar um sistema de entrega eficiente para o tratamento de doenças pulmonares, oferecendo muitas vantagens como o facto de serem biocompatíveis, biodegradáveis e relativamente não-tóxicos. São compatíveis com o surfactante pulmonar (85% de fosfolípidos), aumentam o índice terapêutico dos fármacos devido à promoção da sua entrega celular e *clearance* lenta, o que minimiza ou elimina efeitos secundários, reduzindo a dose ou a frequência de dosagem, a toxicidade sistémica e os custos da terapia [152, 153].

Elhissi e Taylor usaram o método *film deposition on carrier* para prepararem prolipossomas para serem testados em nebulizadores. Mostraram que de facto estes sistemas oferecem um meio para a produção de formulações lipossómicas para entrega pulmonar de fármacos, através de um nebulizador [138].

Prolipossomas de vários fármacos usados no tratamento da tuberculose (rifapentina, pirazinamida, isoniazida) foram desenvolvidos, usando o método de *spray drying* [141, 154, 155]. Os prolipossomas de isoniazida mostraram ser potenciais candidatos para um tratamento alternativo da tuberculose, já que exibiram uma maior atividade terapêutica, quando comparados com o fármaco livre [141].

Rojanarat et al. desenvolveram prolipossomas de levofloxacina, um fármaco usado no tratamento de segunda linha da tuberculose. Foi usado o método de *spray drying* para a sua produção, tendo-se obtido partículas com uma morfologia esférica quando na formulação a quantidade de manitol, usado como material transportador, excedia os 10%. Estudos de toxicidade *in vivo* efetuados em ratos mostraram a ausência de toxicidade renal e pulmonar associada à administração dos prolipossomas [142].

Os prolipossomas, enquanto sistema de administração de fármacos para a via pulmonar, merecem de facto ser explorados já que oferecem oportunidades únicas na nanomedicina pulmonar, enquanto promovem uma libertação modificada do fármaco e promovem a sua estabilidade [142].

1.3.3.3. OUTRAS VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

Jahn et al. desenvolveram prolipossomas para o tratamento tópico da dermatite atópica. Esta doença foi induzida em ratinhos e, o seu tratamento com a formulação lipossómica, formada após a hidratação dos prolipossomas produzidos, conduziu a um claro melhoramento no seu estado [156].

Ning et al., através do método *film deposition on carrier*, produziram prolipossomas de clotrimazol para o tratamento da candidíase vaginal. Os resultados mostraram que a administração do fármaco nestes sistemas permitiu uma libertação prolongada do mesmo e o aumento da sua retenção na mucosa vaginal [157].

Prolipossomas contendo sulfato de polimixina B, um fármaco hidrofílico, foram produzidos para administração intravenosa. Nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade e irritação local têm sido os maiores fatores limitantes para o uso deste fármaco. Estudos de toxicidade *in vivo*, efetuados em ratinhos, mostraram que a sua encapsulação nos lipossomas causou uma diminuição nos seus efeitos tóxicos [158].

Prolipossomas para a administração transdérmica de levonorgestrel, um fármaco usado como contraceptivo, foram produzidos. Os resultados mostraram o potencial destes sistemas para uma administração transdérmica eficaz de substâncias ativas hidrofóbicas [159].

AmBisome® é um produto comercializado consistindo em anfotericina B lipossômica liofilizada, o qual é dissolvido e posteriormente administrado por via intravenosa. Da sua constituição fazem parte a fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol e a sacarose [160, 161].

1.3.3.4. PROLIPOSSOMAS NO TRATAMENTO DO CANCRO

Alguns estudos envolvendo a preparação de prolipossomas para administração de fármacos quimioterápicos foram desenvolvidos.

Prolipossomas contendo SN-38 foram preparados. Esta molécula constitui um metabolito ativo do irinotecano com potente atividade anticancerígena. É insolúvel em água e muito tóxica, pelo que o seu transporte em lipossomas pareceu ser ideal para resolver estas limitações. Os prolipossomas foram preparados com sucesso e os estudos de farmacocinética sugeriram que os lipossomas formados após a sua hidratação aumentaram o tempo de circulação do fármaco, em comparação com uma solução de fármaco, o que contribui para manter a sua ação terapêutica [162].

Prolipossomas contendo o antineoplásico teniposido foram avaliados, concluindo-se ser um potencial sistema para a administração deste fármaco [163].

Estudos envolvendo a preparação de prolipossomas de doxorubicina foram realizados. Em ambos se verificou que a administração do fármaco nestes sistemas levou a uma diminuição da sua toxicidade aguda, sendo que num deles se demonstrou o aumento do seu efeito terapêutico, quando comparado com o fármaco livre [164, 165].

Prolipossomas de metotrexato foram produzidos e a formulação lipossômica resultante da sua hidratação foi administrada por via intravenosa em ratos. Os resultados dos estudos farmacocinéticos mostraram uma diminuição dos efeitos colaterais nos órgãos, em comparação com a administração do fármaco livre [166].

Todos os estudos apresentados anteriormente são apenas alguns dos exemplos que mostram o potencial dos prolipossomas como sistemas de entrega de fármacos, o qual merece continuar a ser investigado.

2. OBJETIVOS

Atendendo à necessidade de serem criados novos sistemas de transporte de fármacos anticancerígenos, com vista a direcioná-los para as células alvo e causar menor toxicidade nos restantes tecidos, o propósito deste trabalho foi o desenvolvimento e caracterização de prolipossomas com paclitaxel. Neste âmbito, definiram-se os seguintes objetivos:

- Desenvolver prolipossomas, com e sem paclitaxel, seguindo três metodologias: *spray drying*, *freeze drying* e *film deposition on carrier*;
- Testar diferentes formulações variando as razões de lípidos e material transportador;
- Caracterizar os lipossomas formados após a hidratação dos prolipossomas quanto ao seu diâmetro médio, potencial zeta, eficácia de encapsulação do fármaco e morfologia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Tabela 7: Materiais usados no trabalho experimental.

Material	
Fosfatidilcolina de ovo	LIPOID E80 - Cedida pela LIPOID GMBH (para mais informações acerca do produto, consultar a ficha disponibilizada em Anexo I)
Colesterol	Acofarma®
Manitol	D-Mannitol ≥ 98%, SIGMA ALDRICH®
Paclitaxel	MedChem Express (para mais informações acerca do produto, consultar as fichas disponibilizadas em Anexo II e III)
Etanol Absoluto	Panreac, AppliChem GmbH
Metanol	AnalaR NORMAPUR; BDH PROLABO®, VWR CHEMICALS
Metanol (HPLC)	HiPerSolv CHROMANORM; Grau de gradiente para HPLC; BDH PROLABO®, VWR CHEMICALS
Água ultrapura	(Tipo I); 18,2 μΩ.cm a 25 °C; Milli-Q®; Merck Millipore

3.2. MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados todos os procedimentos experimentais usados na preparação dos prolipossomas e na caracterização dos mesmos, bem como dos lipossomas obtidos após a sua hidratação. Uma vez que algumas das metodologias usadas são mais específicas para a área do trabalho que desenvolvi, antes da descrição do seu procedimento experimental será feita uma pequena abordagem teórica das mesmas.

3.2.1. DOSEAMENTO DO PACLITAXEL

O PTX foi doseado usando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa. Utilizou-se o aparelho *Ultimate 3000*, Thermo scientific DIONEX (figura x) e a coluna *Mediterranea sea 18* (diâmetro das partículas internas: 3 µm; dimensões: 10 x 0,46 cm), Teknokroma. Os cromatogramas foram obtidos com recurso ao *software* Chromeleon (versão 6.80). A eluição usada foi isocrática.

O metanol e a água ultra pura foram os eluentes escolhidos e o fluxo de fase móvel usado foi de 1,0 mL/min. A escolha do tipo de coluna e restantes parâmetros referidos anteriormente foi feita com base no que se encontra descrito na literatura.

O comprimento de onda de deteção, a percentagem de eluentes e o volume de injeção foram testados.

Para a determinação do comprimento de onda de deteção do PTX foi preparada uma solução de fármaco em metanol/água (80:20) e traçado um espectro de absorção entre o intervalo de comprimentos de onda de 200 e 400 nm.

Para o teste dos volumes de injeção foi preparada uma solução de PTX com a concentração de 20 µg/mL e testados os volumes 10, 20, 30 e 40 µL.

As percentagens de metanol testadas foram de 75%, 80% e 85%.

Uma vez definidas as melhores condições (comprimento de onda 230 nm, volume de injeção de 30 µL e percentagem de metanol de 80% - ver resultados), elas foram usadas na avaliação de três parâmetros para validar o método de doseamento do PTX: linearidade, especificidade e precisão.

Para a avaliação da linearidade foram preparadas três soluções independentes com uma concentração de 60 µg/mL de fármaco. A partir de cada uma delas foi preparado um conjunto de padrões com as concentrações de 1,2 µg/mL; 1,6 µg/mL; 2,4 µg/mL; 2,7 µg/mL; 3,0 µg/mL; 3,3 µg/mL e 3,6 µg/mL. Procedeu-se à injeção de cada um, por ordem crescente de concentração, quatro vezes. Com os resultados foi efetuada uma regressão linear com base na área do pico do PTX do cromatograma de cada padrão em função da sua concentração. A curva de calibração foi obtida através da média das três curvas padrão. Para a regressão linear foi usado o Método dos Quadrados Mínimos, sendo que a linearidade na amplitude de concentrações testadas foi avaliada através do valor de coeficiente de determinação (R^2) e da soma do quadrado dos desvios.

Para a avaliação da precisão foi testado o parâmetro repetibilidade. Assim, no mesmo dia, foram injetadas três concentrações de PTX (2,7 µg/mL; 3,3 µg/mL e 3,6 µg/mL, três injeções cada).

Finalmente, a especificidade foi avaliada através da análise do pico do PTX, em três pontos distintos no cromatograma, e comparação dos mesmos.

3.2.2. PREPARAÇÃO DOS PROLIPOSSOMAS

3.2.2.1. PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO

Tal como foi exposto na seção 1.3, os prolipossomas consistem em partículas sólidas formadas por lípidos e um material transportador que, ao serem hidratadas, originam uma formulação lipossômica.

As matérias-primas escolhidas para o desenvolvimento dos lipossomas foram a fosfatidilcolina (PC) e o colesterol (CH), que representam a fração lipídica dos prolipossomas, e o manitol, usado como material transportador. Três métodos foram escolhidos para a sua preparação, os quais serão explorados nas próximas páginas: o método clássico de deposição do filme lipídico no transportador - *film deposition on carrier* (FDC), liofilização – *freeze drying* (FD) e secagem por atomização -*spray drying* (SD).

Foram preparadas várias formulações, variando as razões molares de PC e CH, as razões mássicas entre os lípidos e o manitol e a presença ou ausência de fármaco.

Tabela 8: Constituição das formulações usadas na preparação dos prolipossomas.

Formulação	PC:CH Razão molar	Lípidos:Manitol Razão mássica	PTX: Lípidos Razão mássica (%)	Método
1	1:0	1:5	-	FDC
2	1:1	1:5	-	FDC
3	2:1	1:5	-	FDC
4	3:1	1:5	-	FDC
5	4:1	1:5	-	FDC
6	3:1	1:1	-	FD
7	3:1	1:2,5	-	FD
8	3:1	1:5	-	FD
9	3:1	1:10	-	FD
10	3:1	1:10	1	FD
11	3:1	1:10	-	FDC
12	3:1	1:10	1	FDC
13	3:1	1:10	-	SD
14	3:1	1:10	1	SD

Começaram por ser preparadas as formulações de 1 a 5, de forma a avaliar a influência de diferentes razões molares entre os lípidos PC e CH nos prolipossomas, mais propriamente nas características dos lipossomas formados após a sua hidratação que

foram avaliadas. Nestas formulações foi mantida a razão mássica lípidos:manitol de 1:5. Em cada formulação, o número de moles de lípidos total foi de 0,30 mmol. Assim, atendendo à razão molar de lípidos pretendida, foi calculado o número de moles de PC e CH necessários em cada uma delas. Posteriormente, efetuaram-se os cálculos das suas massas. A massa de manitol usada foi cinco vezes a massa total de lípidos.

Tabela 9: Constituição das formulações usadas na preparação dos prolipossomas para testar diferentes razões molares de PC:CH.

Formulação	PC:CH Razão molar	PC (mmol)	CH (mmol)	PC (mg)	CH (mg)	Manitol (mg)
1	1:0	0,30	0,00	228,02	0,00	228,00
2	1:1	0,15	0,15	114,01	58,00	172,01
3	2:1	0,10	0,20	152,02	38,67	190,69
4	3:1	0,225	0,075	171,02	29,00	200,02
5	4:1	0,24	0,06	182,42	23,20	205,62

Os lípidos foram pesados usando uma balança analítica (Mettler Toledo) e posteriormente diluídos em etanol absoluto (10 mL). O manitol foi passado por um tamis de 125 µm, tendo sido usado apenas aquele que passou pela sua malha.

Terminados estes procedimentos, foram preparados prolipossomas usando o método *FDC* segundo o descrito na seção 3.2.2.2.1.

Os resultados da caracterização dos lipossomas formados após a hidratação dos prolipossomas levaram a que a razão molar PC:CH 3:1 fosse a escolhida para continuar a desenvolver o trabalho (ver resultados).

Foram preparadas as formulações de 6 a 9, para serem submetidas ao método FD, com o objetivo de avaliar a influência de diferentes razões mássicas entre os lípidos e o manitol nos parâmetros de caracterização testados. Foram preparadas soluções de 100 ml onde se manteve a razão molar PC:CH de 3:1, sendo o número de moles total de lípidos 0,25 mmol. Por vezes, ao longo do trabalho, foi necessário preparar formulações com um maior volume. Esta concentração molar de lípidos de 2,5 mM foi mantida em todas elas. Os lípidos foram pesados e dissolvidos em etanol absoluto, num volume total de 15%, face ao volume total da solução. O manitol foi pesado, após passagem pelo tamis de 125 µm, adicionado à solução etanólica, perfez-se o volume com água e colocou-se a solução num

aparelho de ultrassons, durante 15 minutos. Terminados estes procedimentos, foram preparados prolipossomas usando o método *FD* segundo o descrito na seção 3.2.2.2.2.

Tabela 10: Constituição das formulações usadas na preparação dos prolipossomas para testar diferentes razões mássicas de lípidos:manitol.

Formulação	PC:CH Razão molar	Lípidos:Manitol Razão mássica	PC (mg)	CH (mg)	Manitol (mg)
6	3:1	1:1	142,52	24,17	166,69
7	3:1	1:2,5	142,52	24,17	416,73
8	3:1	1:5	142,52	24,17	833,45
9	3:1	1:10	142,52	24,17	1666,90

Os resultados da caracterização dos prolipossomas e dos lipossomas formados após a sua hidratação dos levaram a que a razão mássica lípidos:manitol fosse a escolhida para continuar a desenvolver o trabalho (ver resultados).

Finalmente, escolhidas a razão molar PC:CH e a razão mássica lípidos:manitol, foram preparadas as restantes formulações, 10 a 14. Aqui, foram produzidos, segundo os 3 métodos, prolipossomas com e sem PTX, sendo que este apenas foi usado numa razão mássica de 1% em relação aos lípidos.

Para o método de *SD* as soluções foram preparadas como foi anteriormente descrito para o método de *FD*, com uma exceção: o manitol usado, ao invés de ser passado pelo tamis, foi sujeito anteriormente ao processo de *SD*, e só depois usado na solução.

Na preparação das formulações com PTX ele foi dissolvido no etanol absoluto, juntamente com os lípidos.

3.2.2.2. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DOS PROLIPOSSOMAS

3.2.2.2.1. FILM DEPOSITION ON CARRIER

Este constitui o método clássico de produção dos prolipossomas, originalmente usado por Nicholas Payne para a produção dos prolipossomas [133]. Na figura 10 está ilustrada a montagem necessária para pôr em prática esta metodologia. O material transportador (*carrier*) é colocado num balão de fundo redondo, num evaporador rotativo. É feita uma ligação, através da unidade do condensador entre um sistema que permita dispensar a solução lipídica em volumes controlados (uma ampola de decantação, por exemplo) e o balão onde se encontra o *carrier*. Assim, a solução orgânica que contém os lípidos e o fármaco vai caindo sobre o *carrier*, sendo que o solvente orgânico evapora, obtendo-se no final partículas sólidas (prolipossomas). Este processo ocorre sob vácuo, sendo que o banho de água deve estar a uma temperatura adequada, em concordância com as características das matérias-primas que compõem a formulação [133, 167].

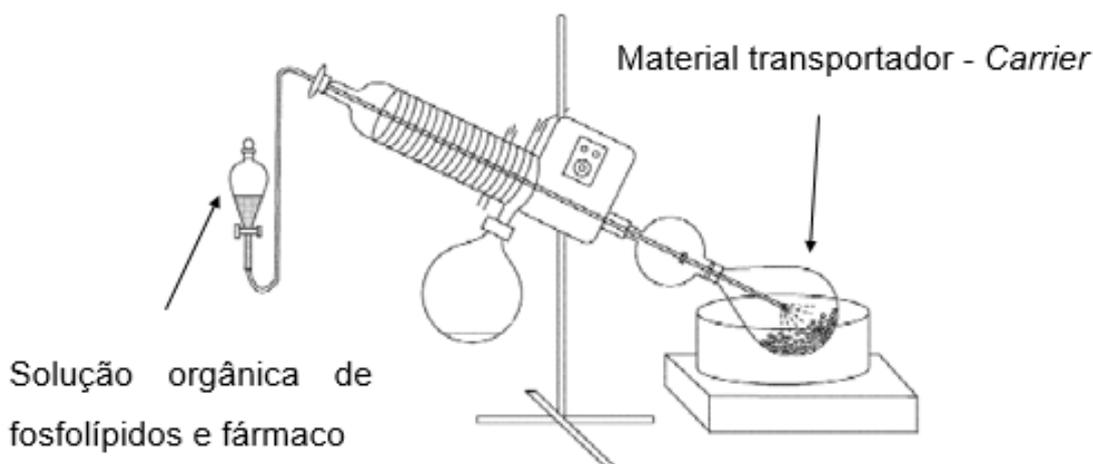


Figura 10: Esquema da montagem para a preparação de prolipossomas segundo o método FDC [167].

Para a preparação dos prolipossomas usando esta metodologia foi montado no laboratório um sistema semelhante ao apresentado na figura 11. O procedimento usado baseou-se no que foi apresentado por Song et al., inspirado no método clássico, com apenas algumas modificações [167]. O manitol foi colocado no balão de fundo redondo e deixado secar, durante 30 minutos, sob vácuo, a uma temperatura de 80°C. Terminado este passo, a solução etanólica de lípidos ou lípidos e PTX contida na ampola de decantação foi sendo lançada sobre o manitol. Depois de toda a solução ter sido

introduzida, verificando-se que todo o material contido no balão estava seco, procedeu-se ao seu armazenamento num frasco de vidro e colocação num exsicador.

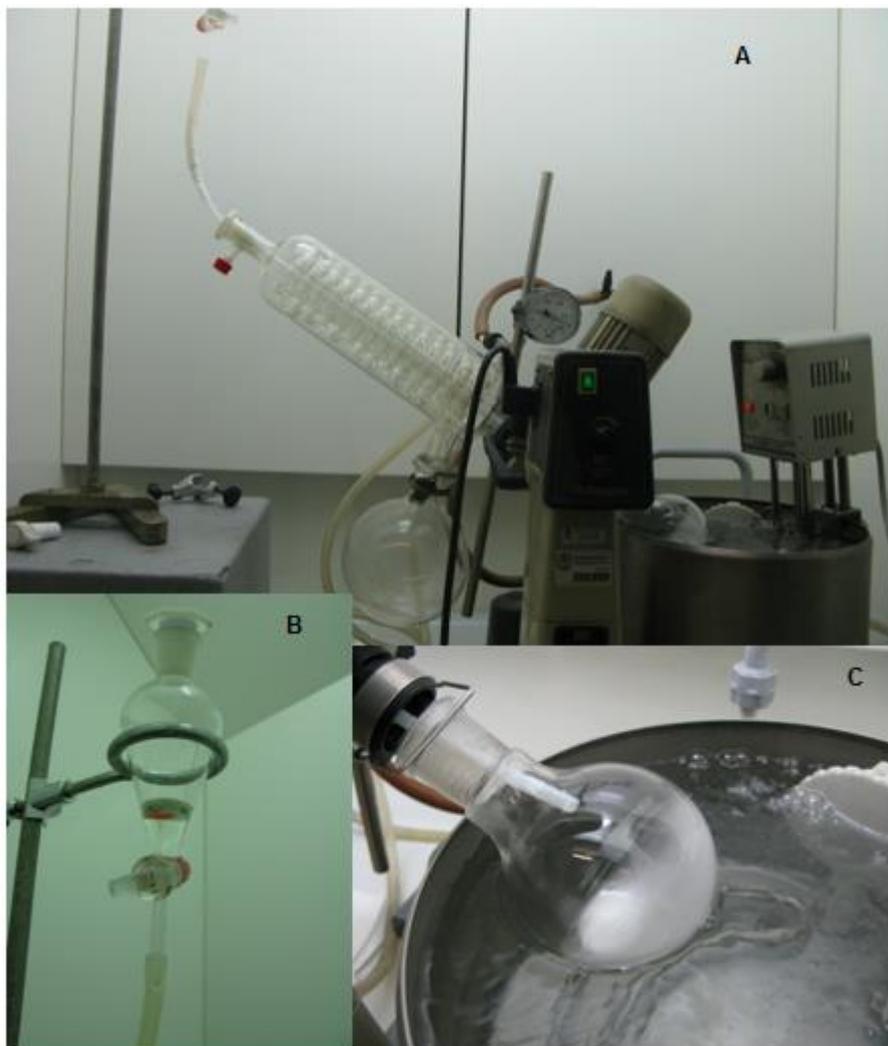


Figura 11: Sistema montado para a preparação de prolipossomas segundo o método FDC. A – Vista geral de toda a montagem; B – Ampola de decantação contendo a solução lipídica; C – Balão de fundo redondo, onde se encontra o manitol misturado com solução lipídica.

3.2.2.2 FREEZE DRYING

O método de *freeze drying* (FD), ou liofilização, é um processo de secagem a baixas temperaturas, baseado nos princípios de transferência de calor e massa, usado para a conversão de soluções em sólidos. Para tal, a amostra é congelada e o solvente, geralmente água, é removido por sublimação e dessorção, geralmente sob pressão reduzida [168]. Os princípios básicos que governam este método focam-se no diagrama de fases da água, mostrado na figura 12. Existe um ponto, denominado ponto triplo (marcado a vermelho), onde a água coexiste nos três estados: sólido, líquido e gasoso. Analisando o diagrama torna-se claro que para todos os pontos da linha abaixo deste ponto

(marcada a azul), a água coexiste nas fases sólida e gasosa. Assim, trabalhando em condições de temperatura e pressão abaixo do ponto triplo, é possível obter a sublimação do gelo [168].

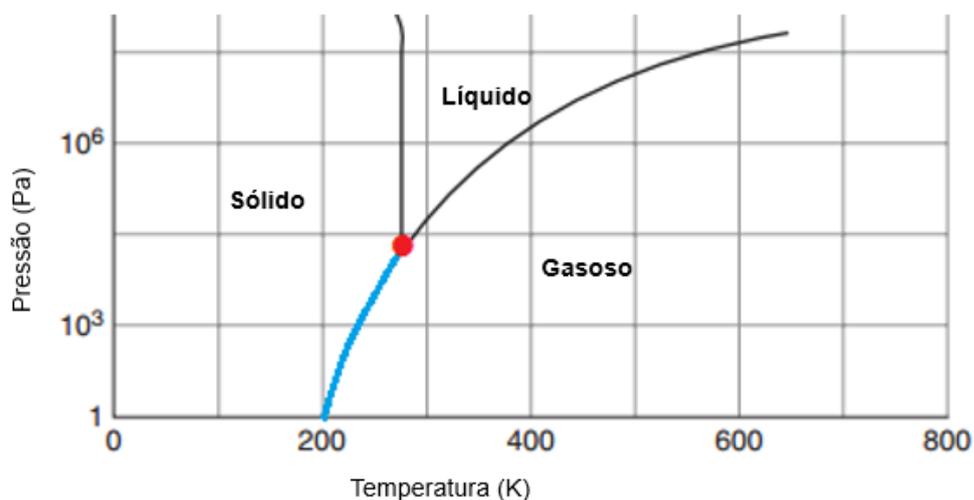


Figura 12: Parte de um diagrama de fases da água, onde é destacado o ponto triplo [169].

O método de FD envolve três etapas principais. A primeira consiste numa fase de congelamento, onde a solução é arrefecida até uma temperatura que permita que todo o material fique num estado congelado. Segue-se uma etapa de secagem primária, onde é fornecido calor ao sistema e os cristais de gelo, formados na fase anterior, são removidos por sublimação sob vácuo. O processo termina com a secagem secundária, onde a água não congelada é removida por dessorção [168].

Um *freeze dryer* ou liofilizador consiste, geralmente, numa câmara de secagem com prateleiras de temperatura controlada, a qual está ligada a um condensador, que por sua vez contacta com uma bomba de vácuo, a qual permite que sejam atingidas as pressões requeridas em todo o sistema, durante a operação [170].

A escolha das condições em que cada etapa ocorre é um parâmetro crítico para o sucesso do processo. É essencial programar o aparelho de forma a assegurar que o ponto final de cada etapa ocorre antes do começo da seguinte, por exemplo, que a secagem primária não começa antes de todo o material ter sido congelado. A otimização do processo reside no conhecimento dos seus parâmetros e nas propriedades da formulação [171].

Para a preparação dos prolipossomas usando esta metodologia foi usado o aparelho apresentado na figura 13. As soluções foram colocadas em frascos de vidro, próprios para o efeito, e os mesmos foram cobertos com parafilme, no qual se aplicaram

pequenos furos. As condições a que ocorreu o processo foram as descritas abaixo. Após o término do processo, os prolipossomas foram guardados em frascos de vidro e colocados no exsiccador.

- **Etapa de congelamento**
 - Temperatura: -30°C
 - Tempo: 120 minutos
 - Temperatura do condensador: -60°C
 - Vácuo: 150 mT
- **Secagem primária**
 - Temperatura: 20°C
 - Tempo: 1200 minutos
 - Vácuo: 150 mT
- **Secagem secundária**
 - Temperatura: 25°C
 - Tempo: 1200 minutos
 - Vácuo: 100 mT



Figura 13: Aparelho AdVantage 2.0 Bench Top FreezeDryer, Virtis SP SCIENTIFIC [172].

3.2.2.2.3. SPRAY DRYING

A secagem por atomização, vulgarmente conhecida pela denominação inglesa *spray drying* (SD), é uma das tecnologias disponíveis para a conversão de um líquido (solução, suspensão ou emulsão) num sólido (pó), caracterizando-se por três etapas principais. O líquido é continuamente dividido em pequeníssimas gotas, um processo designado por atomização, as quais são lançadas no interior de uma câmara de secagem, onde contactam com uma corrente de gás quente. Quando uma massa suficiente de líquido tiver evaporado, o material sólido remanescente forma uma partícula sólida seca, terminando o procedimento com a sua separação e recolha [173].

O processo de SD convencional é limitado no que respeita à produção de partículas com tamanho inferior a 2 μm , devido ao tipo de atomizadores comumente usados e ao ineficiente sistema de recolha para partículas de reduzidas dimensões [174]. As novas tecnologias no sistema de atomização, aquecimento e coletor de partículas do Nano Spray Dryer B-90, a mais recente geração de *spray dryers* à escala laboratorial desenvolvida pela Büchi (figura 14), fez da técnica de SD à escala nanométrica uma realidade [175, 176]. A figura 14 ilustra os princípios funcionais do aparelho, os quais serão discutidos seguidamente.

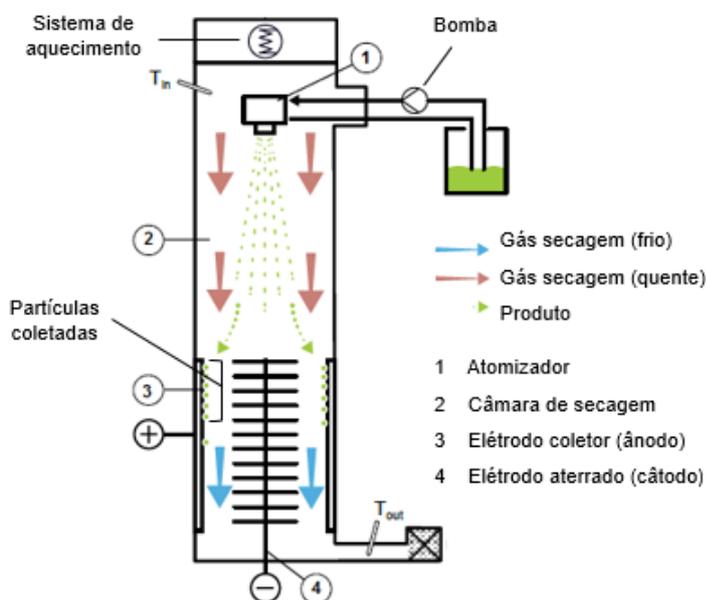


Figura 14: Representação do funcionamento do Nano Spray Dryer B-90. Adaptado de [177]

Este aparelho apresenta um sistema de atomização inovador: um cristal pizoelétrico, quando sujeito a uma frequência ultrasónica, causa a oscilação de uma fina membrana com poros de 4, 5,5 ou 7 μm . Como resultado dessa vibração, à passagem do líquido pela membrana ele é convertido em milhões de gotas, cujo tamanho é correspondente ao dos orifícios da mesma [175]. Finda a atomização, as gotas viajam ao

longo da câmara de secagem, onde entram em contacto com o ar quente. O sistema de aquecimento do Nano Spray Dryer B-90 opera segundo um princípio de fluxo laminar. A configuração vertical da câmara permite um tempo de exposição eficiente para se dar a secagem das gotas e a conseqüente formação das partículas sólidas [175]. A sua separação, por sua vez, envolve o uso de um coletor eletrostático, constituído por um elétrodo aterrado (cátodo) e um elétrodo cilíndrico de recolha (ânodo). A presença de uma alta voltagem em torno do coletor de partículas cria um campo eletrostático que acelera a deposição das partículas, carregadas negativamente, sobre a parede interior cilíndrica do coletor [178].

A preparação de prolipossomas usando o método de SD foi efetuada num aparelho Nano Spray Dryer B-90 (figura 16) e seguiu a metodologia usada por [141], com algumas modificações. Uma solução de manitol com a concentração mássica de 1% foi preparada, procedendo-se em seguida à sua secagem, através da técnica de SD. As condições experimentais usadas foram as seguintes:

Temperatura: 80 °C

Fluxo gás: 90 L/min

Pressão: 30 mbar

Membrana do atomizador: 7 µm

Em seguida, este manitol foi usado na preparação da solução a atomizar. As condições usadas foram as mostradas anteriormente, com exceção para a membrana do atomizador usada, cujo diâmetro dos poros foi de 5,5 µm. Terminado o processo, o aparelho foi desmontado para remoção do cilindro interno, de onde as partículas foram recolhidas com a ajuda de um “raspador” (*Nano particle Scraper*) (figura 15). Na página web da Buchi está disponível um vídeo onde é possível observar todo o processo de funcionamento do aparelho e recolha das partículas formadas [177]. Findo o processo, os prolipossomas foram recolhidos para frascos de vidro e guardados no exsiccador.

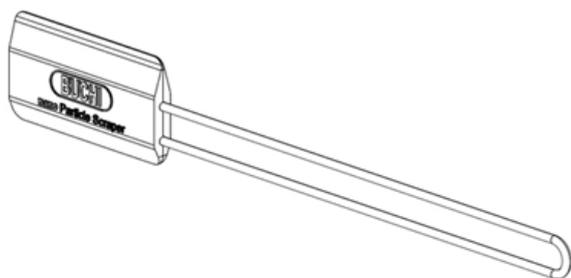


Figura 15: *Nano particle scraper*, usado para a recolha das partículas [179].



Figura 16: Nano Spray Dryer B-90, Büchi Labortechnik AG [177].

3.2.3. HIDRATAÇÃO DOS PROLIPOSSOMAS

Os proliossomas foram hidratados em água ultra pura. Foram pesados 12 mg para um tubo Falcon e hidratados com 2 ml, seguindo-se 1 minuto de agitação manual. Findo este processo, a amostra foi filtrada com um filtro de membrana de nitrocelulose de 5 μm (Minisart®), de forma a destruir possíveis agregados existentes.

3.2.4. CARACTERIZAÇÃO

3.2.4.1. DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO E POLIDISPERSÃO

3.2.4.1.1. DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)

A técnica de *dynamic light scattering* (DLS) é utilizada para a medição do tamanho de partículas, tipicamente na escala nanométrica. Quando as partículas se encontram dispersas num líquido, movimentam-se de forma aleatória, devido aos choques com as moléculas do solvente, o que se designa por movimentos Brownianos. O método de DLS avalia a velocidade à qual elas se difundem no líquido, devido a estes movimentos, velocidade essa que é dependente do seu tamanho. O conceito é simples: uma luz incide sobre a amostra a ser avaliada e é medida a flutuação da intensidade da luz dispersa.

Quanto maiores forem as partículas, mais lentos serão os seus movimentos e, conseqüentemente, mais lentas serão as variações na intensidade da luz ao longo do tempo. Este fenómeno encontra-se ilustrado na figura 17 [180].

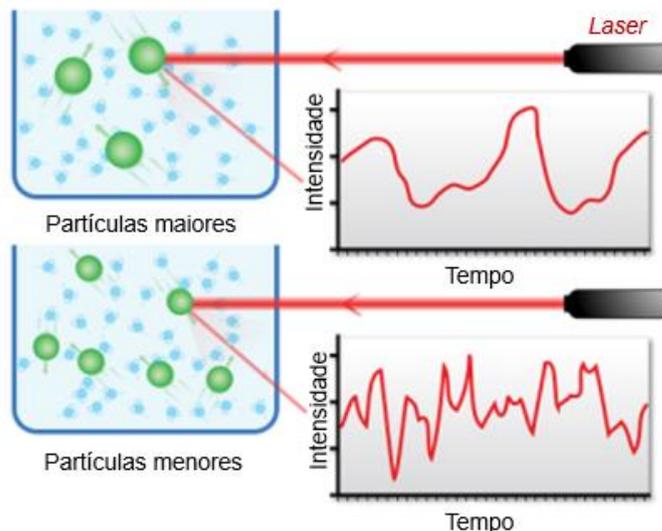


Figura 17: O fundamento da técnica de DLS baseia-se nas variações da intensidade da luz dispersa pelas partículas, as quais se relacionam com o tamanho das mesmas: partículas menores correspondem a maiores velocidades na flutuação da intensidade luminosa [181].

A velocidade dos movimentos Brownianos das partículas é definida pelo seu coeficiente de difusão (D). Assim, o seu tamanho pode ser calculado através deste coeficiente, usando a equação de Stokes-Einstein (equação 2.1). k refere-se à constante de Boltzmann; T e η à temperatura e viscosidade das amostras, respetivamente; D ao coeficiente de difusão, o qual é calculado pelo aparelho de DLS, com base nas variações na intensidade da luz. Conhecidos todos os parâmetros, é obtido o diâmetro hidrodinâmico da partícula $d(H)$.

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (2.1)$$

Um aparelho de DLS típico deve ser provido de um sistema ótico adequado, entre outros componentes. Primeiramente, um laser fornece uma fonte de luz que ilumina a amostra contida numa célula, sendo a luz dispersa pelas partículas medida por um detetor. Um atenuador aumenta ou diminui a intensidade da fonte luminosa, quando a amostra está diluída ou concentrada, respetivamente, de modo a garantir que a luz dispersa está dentro

do intervalo específico que lhe permite ser corretamente medida pelo detetor. Esta medição é passada para o correlador, o qual compara a intensidade da luz em intervalos de tempo sucessivos, para derivar a velocidade a que a intensidade é variável. Um software analisa os dados e deriva as informações referentes ao tamanho das partículas, sendo que os resultados correspondem, tipicamente, ao valor médio da distribuição de tamanhos, conhecido como *z-average*, e ao índice de polidispersão, variável entre 0 e 1, o qual descreve a largura da distribuição, dando-nos portanto indicações da homogeneidade dos tamanhos [180].

Cada amostra foi diluída numa proporção de 1:10 com água ultra pura e colocada numa cuvete para medição. Por cada amostra, o diâmetro médio (*z-average*) e o índice de polidispersão foram medidos 5 vezes, sendo os dados recolhidos pelo programa informático Brookhaven Instruments – Zeta Pals Particle Sizing e expressos em média \pm desvio padrão.

3.2.4.2. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA

O potencial zeta (PZ) é uma propriedade física, presente em qualquer partícula em dispersão e reflete o potencial elétrico da superfície das partículas. O PZ dá uma indicação da estabilidade do sistema coloidal. Quando as partículas em suspensão têm um PZ elevado (negativo ou positivo), há a tendência para prevalecerem forças de repulsão, ou seja, as partículas tendem a repelirem-se. Assim, a tendência para as partículas se aglomerarem é reduzida e a estabilidade da dispersão é elevada [180].

A amostra foi colocada numa cuvete, onde é inserido um eléctrodo e a medição foi feita 6 vezes, pelo mesmo aparelho da DLS, mas com um programa informático diferente, BIC PALS Zeta Potencial Analyzer. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão.

3.2.4.3. EFICÁCIA DE ENCAPSULAÇÃO

220 mg de prolipossomas foram pesados e diluídos em 2 ml de água ultra pura. As amostras diluídas foram filtradas, por um filtro de membrana de nitrocelulose de 5 μm (Minisart[®]) para rejeitar o PTX não incorporado. De seguida procedeu-se à diluição com metanol numa proporção de 1:8 e posterior agitação manual, para que ocorresse a libertação do PTX que se encontrava encapsulado nos lipossomas. A mistura obtida foi centrifugada (5000 rpm durante 15 min) (Thermo SCIENTIFIC HERAEUS) e o sobrenadante filtrado (filtro PTFE de 0,45 μm , OlimPeak[®]) para obtenção de uma solução

de PTX. As amostras obtidas foram diluídas com uma solução de metanol/água (80/20) numa proporção de 1:2 e avaliadas por HPLC, sendo cada amostra injetada três vezes. A análise por HPLC das amostras foi feita nas mesmas condições do doseamento do PTX. Por extrapolação da reta obtida na curva de calibração, obteve-se a concentração de PTX real. A concentração teórica do PTX é calculada tendo em conta a quantidade de PTX colocado aquando da produção dos prolipossomas e as diluições efetuadas ao longo do procedimento para a determinação da eficácia de incorporação. Sendo assim, a eficácia de encapsulação (EE) é calculada através da seguinte fórmula

$$EE(\%) = \frac{\text{conc. de fármaco no filtrado } [\mu\text{g} / \text{ml}]}{\text{conc. de fármaco contida na formulação } [\mu\text{g} / \text{ml}]} \times 100$$

3.2.4.4. CRYO-SEM

A análise foi realizada utilizando o Microscópio Eletrónico de Varrimento de alta resolução, com Microanálise por Raios X e sistema para observação de amostras a baixa temperatura (JEOL JSM 6301F/ Oxford INCA Energy 350/ Gatan Alto 2500), no Laboratório de Microscopia Eletrónica de Varrimento e Microanálise por Raios X do Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP).

As amostras foram rapidamente arrefecidas (mergulhada em azoto líquido) e transferidas, em vácuo, para a câmara de preparação de amostra com a platina arrefecida. Posteriormente, foram fraturadas, sublimadas durante 120 s a -90°C, e revestidas com Au/Pd, por pulverização iónica, durante 35 s e com uma corrente elétrica de 12 mA. As amostras foram depois transferidas para a câmara do SEM e a observação foi feita a uma temperatura de -150°C.

3.2.4.5. DSC

O aparelho utilizado neste trabalho foi o DSC 200 F3 Maia[®], NETZSCH constituído por um duplo forno com duas posições, uma para o cadinho da amostra a analisar e outra para o cadinho de referência, que normalmente se encontra vazio. O resultado da análise traduz-se num termograma. As amostras foram pesadas num cadinho de alumínio, que foi posteriormente fechado e colocado no forno. As amostras foram submetidas a um programa de temperatura entre -40°C a 270°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

3.2.4.6. SEM

O exame SEM / EDS foi realizado utilizando o Microscópio Eletrónico de Varrimento ambiental, de alta resolução (Schottky), com Microanálise por Raios X e Análise de Padrões de Difracção de Electrões Retrodondidos: Quanta 400FEG ESEM / EDAX Genesis X4M no Laboratório de Microscopia Eletrónica de Varrimento e Microanálise por Raios X do Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP).

As amostras foram revestidas com filme fino de Au/Pd, por pulverização catódica (sputtering), utilizando o equipamento SPI Module Sputter Coater.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente recorrendo ao teste paramétrico, t-student ou ANOVA quando se tratava de duas amostras ou mais, respetivamente, após a confirmação de normalidade e homogeneidade da variância com os testes de Shapiro-Wilk e Levene. Diferenças entre mais de dois grupos foram comparadas utilizando um teste post hoc (Tukey HSD). As amostras foram analisadas usando um nível de significância de 95% ($\alpha= 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa informático SPSS (v 21.0; IBM, Armonk).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DOSEAMENTO DO PACLITAXEL

Para determinar o volume de injeção a usar no método cromatográfico de doseamento do PTX foram testados quatro volumes diferentes, como referido no capítulo 2. Na tabela seguinte, encontram-se registados os resultados dos parâmetros cromatográficos: tempo de retenção - t_r , área, altura, pratos teóricos e simetria. A fase móvel usada foi 80/20% (v/v) (metanol/água).

Devido ao baixo coeficiente de variação apresentado pelo volume de 30 μL , na maioria dos parâmetros, este foi o valor escolhido (Tabela 11).

Tabela 11: Média e coeficiente de variação (c.v.) do tempo de retenção - t_r , área, altura, pratos teóricos e simetria, determinados para os volumes de injeção de 10, 20, 30 e 40 μL .

		Volume de injeção (μL)			
		10	20	30	40
t_r	Média	2,61	2,61	2,61	2,61
	c.v.	0,19%	0,07%	0,09%	0%
Área	Média	3,59	7,77	11,75	15,87
	c.v.	4,97%	2,87%	0,86%	1,09%
Altura	Média	27,98	47,06	55,45	58,14
	c.v.	4,06%	1,25%	0,75%	0,33%
Pratos Teóricos	Média	2767,67	1579,33	898,33	512
	c.v.	2,76%	4,43%	0,46%	1,89%
Simetria	Média	1,26	1,26	1,13	0,95
	c.v.	1,21%	0,92%	1,85%	3,20%
k'	Média	1,18	1,18	1,17	1,18
	c.v.	0,49%	0%	0,49%	0%

No que diz respeito ao estudo da percentagem de metanol na fase móvel, foram testadas três percentagens do eluente e avaliado o seu fator de retenção k' . Como é possível observar na figura 18, o valor de k' para a percentagem de metanol de 85% foi inferior a 1. Dado que o valor do fator de retenção deve ser superior a 1, esta condição ficou excluída. Assim, a escolha prendeu-se entre as duas percentagens restantes, 75% e 80%. Uma vez que uma maior percentagem de metanol na fase móvel significa tempos de corrida mais curtos, com a consequente economização de tempo e reagentes, foi escolhida a percentagem de metanol de 80%

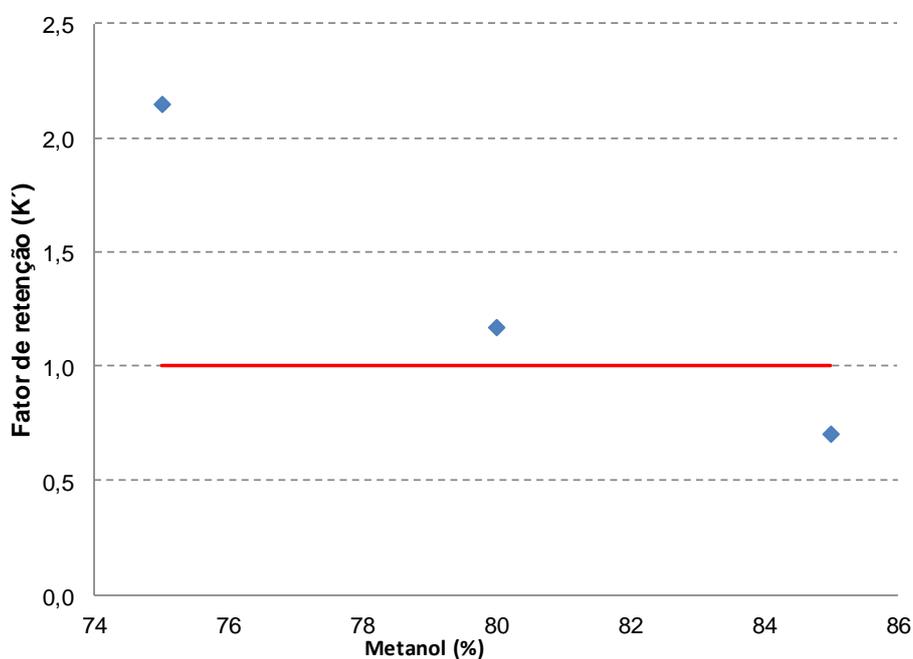


Figura 18: Representação gráfica do fator de retenção em função da percentagem de metanol da fase móvel.

O espectro de absorção do paclitaxel efetuado entre o intervalo de comprimentos de onda de 200 a 400 nm, mostrou um pico próximo dos 230 nm, o que está de acordo com a literatura [182].

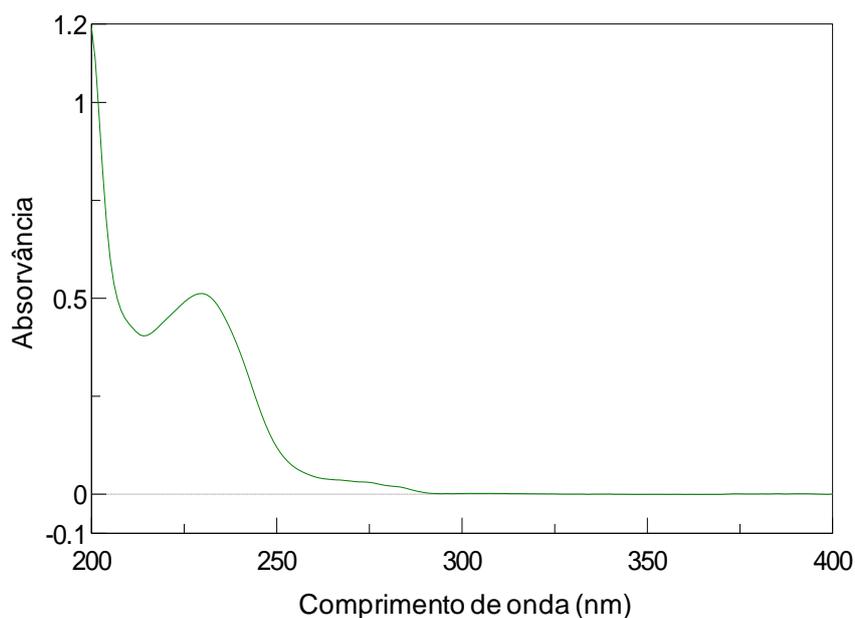


Figura 19: Espectro de absorção do paclitaxel entre os 200 e 400 nm.

O pico do PTX foi analisado em três pontos no cromatograma, de modo a avaliar a especificidade. Verifica-se que os três espectros se sobrepõem, indicação de que não existem interferências de outras substâncias, demonstrando assim a especificidade do método para o doseamento do paclitaxel (figure 20).

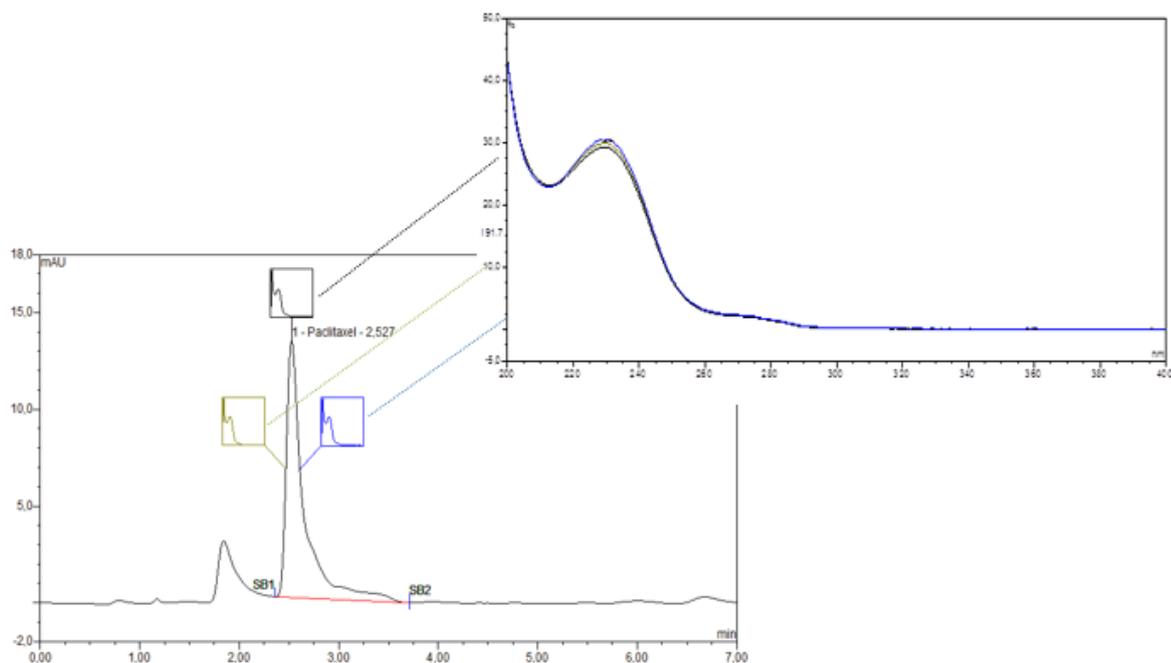


Figura 20: Cromatograma do PTX e espectros de absorção em cada ponto escolhido.

Dentro das mesmas condições analíticas, a medida da proximidade dos valores das determinações efetuadas permite-nos avaliar a precisão do método. A precisão pode ser avaliada pela repetibilidade, precisão intermédia ou reprodutibilidade. Neste caso, foi avaliada a repetibilidade, usando três soluções com diferentes concentrações de PTX, as quais foram injetadas três vezes, sendo que os ensaios foram realizados no mesmo dia e com curtos espaços de tempo. Pela análise dos resultados apresentados na tabela 12 vemos que os coeficientes de variação são bastante baixos, pelo que podemos concluir que o método analítico de doseamento de PTX é preciso.

Tabela 12: Valores das áreas dos picos do PTX de três amostras, analisadas no mesmo dia.

Conc. PTX (µg/mL)	Área (mAU*min)			Média ± C.V.
	Injeção 1	Injeção 2	Injeção 3	
2,7	2,060	2,054	2,061	2,061 ± 0,3%
3,3	2,554	2,535	2,549	2,553 ± 0,7%
3,6	2,785	2,777	2,782	2,781 ± 0,1%

Os resultados da curva de calibração efetuada são apresentados em seguida. O procedimento para a sua obtenção encontra-se descrito no capítulo 2. O coeficiente de determinação (R^2) conseguido foi de 0,9974 e a soma do quadrado dos desvios foi de 0,0044. Este valor é um indicativo da existência de linearidade na amplitude de concentrações testada e portanto da possibilidade de determinar a concentração de PTX numa solução através da equação da reta. Esta foi obtida através da média de três curvas independentes (ver anexos).

$$y = 0,9146 x - 0,2393$$

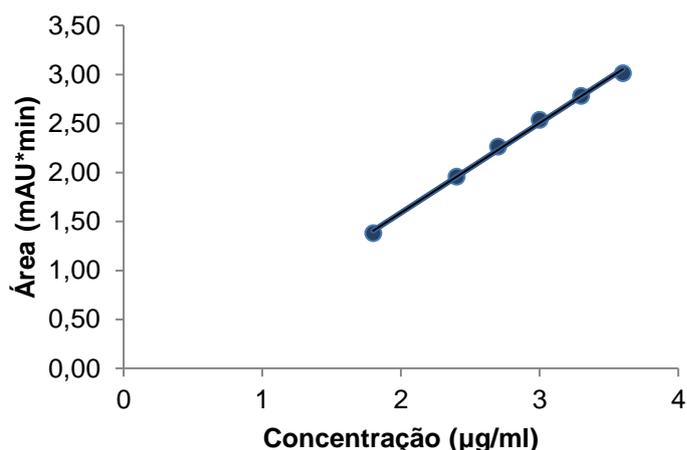


Figura 21: Curva de calibração do paclitaxel. Equação da reta: $y = 0,9146x - 0,2393$.

4.2. SELEÇÃO DE MATERIAIS

O primeiro passo na preparação dos prolipossomas envolveu a seleção das matérias-primas a utilizar. Foram escolhidos os lípidos fosfatidilcolina de ovo e colesterol e, como material transportador (*carrier*) segundo a designação inglesa, foi selecionado o manitol.

A fosfatidilcolina trata-se de um dos lípidos mais abundantes nas membranas biológicas, facto que explica a razão pela qual ela é tão utilizada na preparação de lipossomas [120]. De facto, ela apresenta capacidade de mimetizar o comportamento das membranas, é biocompatível e biodegradável. Tratando-se de um fosfolípido natural, existem vantagens e inconvenientes associados ao seu uso, em comparação com os fosfolípidos sintéticos. As suas principais desvantagens prendem-se com a sua menor pureza e natureza relativamente instável, já que podem ser metabolizados em lisofosfolípidos no processo de uso e armazenamento. No entanto, os fosfolípidos naturais têm uma grande vantagem face aos sintéticos: o seu preço é relativamente baixo [120]. Evidentemente que este foi um aspeto tido em conta. Decidida a opção de usar um fosfolípido natural, havia a possibilidade de escolha entre a fosfatidilcolina de ovo e a de soja. Contudo a opção recaiu sobre a primeira, por várias razões: a fosfatidilcolina de soja apresenta um maior conteúdo de ácidos gordos, pelo que é mais difícil obter lipossomas de qualidade formados por ela [183]. Comparados com outros fosfolípidos, os lipossomas formados com fosfatidilcolina de ovo contribuem para a fusão com a membrana

A presença de colesterol nas membranas dos lipossomas é muito vantajosa, uma vez que permite a sua estabilização, reduzindo a possível fuga do fármaco do seu interior.

De facto, o colesterol aumenta o grau de orientação das caudas hidrofóbicas dos lípidos, o que conduz a um aumento da densidade e menor permeabilidade da membrana. Por esse motivo, ele é frequentemente usado em formulações de lipossomas com o objetivo de diminuir a fluidez da membrana e assim fornecer propriedades favoráveis de retenção do fármaco. A prova disso mesmo são os exemplos de alguns produtos lipossômicos aprovados, principalmente para fármacos anticancerígenos, em que o colesterol é usado na formulação [123]. O empacotamento induzido pela presença do colesterol permite que, *in vivo*, seja inibida a transferência de lípidos dos lipossomas para as lipoproteínas de alta e baixa densidade. Além disso, o colesterol pode ser utilizado para ancorar outras moléculas, tais como o polietilenoglicol, para aumentar o tempo de circulação dos lipossomas, ou outros ligandos com vista a direcioná-los para locais alvo [115].

O manitol é um açúcar bastante usado na preparação de prolipossomas e com um preço acessível, motivos pelos quais foi usado como excipiente [137, 139, 143].

4.3. SELEÇÃO DOS MÉTODOS DE PRODUÇÃO DOS PROLIPOSSOMAS

O método FDC foi usado para a produção dos prolipossomas uma vez que é o método de referência, originalmente descrito por Nicholas Payne e colaboradores, pioneiros no estudo destes sistemas [133]. Estão descritas algumas desvantagens do método, nomeadamente o facto de ser um procedimento moroso. Ainda assim, fez todo o sentido incluí-lo como metodologia neste trabalho.

O método de FD apresenta uma série de vantagens. Em primeiro lugar trata-se de um método já muito bem estabelecido [184], que permite a produção de uma grande quantidade de produto [185]. É adequado para compostos termolábeis e permite obter um produto final com uma taxa de humidade muito baixa [186]. Os produtos liofilizados têm uma estrutura muito porosa, o que contribui para a sua rápida e completa dissolução quando hidratados [185].

O método de SD tem a grande potencialidade de combinar a engenharia de partículas e a secagem num só passo [187], sendo capaz de produzir partículas com uma morfologia esférica [140]. Além disso, o Nano Spray Dryer B-90 foi especialmente concebido para a produção de nanopartículas [176].

4.4. DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO

O método de produção é uma das etapas a ter em conta no desenvolvimento de uma formulação farmacêutica. Os métodos de preparação selecionados foram FDC, FD e SD.

Para o desenvolvimento dos prolipossomas neste trabalho o ideal seria testar, com cada um dos métodos, diferentes formulações com variações na razão molar dos lípidos e na quantidade de manitol usado. Infelizmente, o tempo disponível para a elaboração do trabalho foi reduzido e a disponibilidade dos aparelhos não foi total, o que obrigou a optar por uma outra abordagem: fazer um estudo prévio, com apenas um processo, e escolher a melhor formulação para a continuação dos estudos. Foi selecionado o método FDC para produzir prolipossomas para o estudo das diferentes razões molares de PC:CH. A sua escolha baseou-se no facto de ser considerado o método clássico para a produção de prolipossomas [133]. Foram então preparados prolipossomas com diferentes formulações, mantendo constante a quantidade de manitol e variando as razões molares dos lípidos, como explicado no capítulo 2. Obtidos os prolipossomas, o próximo passo foi proceder à sua hidratação, para formação dos lipossomas e sua posterior caracterização. Pensou-se que a hidratação seria provavelmente um dos fatores que influenciariam as características dos lipossomas, especialmente ao nível do seu tamanho médio. Assim, foram testados três volumes de hidratação diferentes: 15 mg de prolipossomas da mesma formulação foram pesados e hidratados em 1,5 mL de água ultra pura (Hidratação A), 15 mL (Hidratação B) e 0,5 mL (Hidratação C). Determinou-se o diâmetro médio dos lipossomas formados e respetivo potencial zeta. Os resultados apresentam-se na tabela 13, sendo que correspondem apenas a um ensaio.

Tabela 13: Resultados do diâmetro médio (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) para as diferentes formulações preparadas com o método FDC, usando diferentes razões molares de PC:CH e uma razão mássica lípidos:manitol de 1:5.

HIDRATAÇÃO A				
Formulação	Formulação PC:CH	Diâmetro médio (nm)	Polidispersão	Potencial zeta (mV)
1	1:0	737,36 ± 12,76	0,358 ± 0,005	-61,58 ± 6,21
2	1:1	1550,98 ± 196,25	0,336 ± 0,046	-48,52 ± 2,12
3	2:1	1059,66 ± 98,08	0,365 ± 0,029	-69,75 ± 1,33
4	3:1	896,02 ± 75,47	0,288 ± 0,059	-66,31 ± 1,52
5	4:1	925,02 ± 42,98	0,358 ± 0,014	-64,79 ± 2,26
HIDRATAÇÃO B				
	Formulação PC:CH	Diâmetro médio (nm)	Polidispersão	Potencial zeta (mV)
1	1:0	780,60 ± 9,39	0,384 ± 0,011	-65,27 ± 2,28
2	1:1	1197,15 ± 196,25	0,316 ± 0,066	-47,27 ± 2,59
3	2:1	1098,26 ± 90,36	0,357 ± 0,0021	-55,41 ± 1,45
4	3:1	782,18 ± 51,36	0,340 ± 0,014	-54,24 ± 1,46
5	4:1	927,64 ± 28,02	0,368 ± 0,018	-58,38 ± 2,35
HIDRATAÇÃO C				
	Formulação PC:CH	Diâmetro médio (nm)	Polidispersão	Potencial zeta (mV)
1	1:0	514,70 ± 9,02	0,347 ± 0,020	-53,17 ± 3,49
2	1:1	1299,88 ± 31,26	0,300 ± 0,038	-51,21 ± 1,53
3	2:1	802,48 ± 54,63	0,327 ± 0,020	-57,40 ± 2,15
4	3:1	650,44 ± 9,75	0,325 ± 0,059	-62,72 ± 4,00
5	4:1	585,42 ± 19,13	0,358 ± 0,024	-59,64 ± 2,08

Os resultados deste ensaio permitiram tirar algumas conclusões: as formulações com um menor diâmetro médio são a 1,4 e 5. Para estas formulações a hidratação C, 12 mg de pó dissolvidos em 0,5 mL, permitiu a obtenção dos menores valores de tamanho médio. A formulação 1, apesar de apresentar os valores mais reduzidos, não inclui colesterol, o qual traz inúmeras vantagens a uma formulação, como visto em cima. Assim, esta formulação foi excluída da gama de trabalho. Em todos os casos os valores do índice

de polidispersão são elevados, o que indica heterogeneidade nos diâmetros médios das partículas. Atendendo a que os prolipossomas após hidratação formam MLV [133] era de esperar a obtenção de partículas de diferentes tamanhos e portanto um índice de polidispersão significativo.

Os valores de potencial zeta são muito negativos, sendo dados muito positivos acerca da estabilidade do sistema [188].

Terminada a análise dos resultados decidiu proceder-se a nova produção de prolipossomas, mas usando apenas as formulações 4 e 5. Os resultados da caracterização dos lipossomas formados apresentam-se na tabela 14.

Mais uma vez se prova que o método de hidratação C permite obter os menores valores de tamanho médio de partícula. Posto isto, este foi o método de hidratação que se adotou ao longo de todo o trabalho: 12 mg de pó dissolvidos em 0,5 mL de água, com agitação manual durante 1 minuto.

Chegado o momento de escolher uma formulação, procedeu-se a nova produção de prolipossomas usando as formulações 4 e 5, para obtenção de um triplicado e compararam-se as médias dos três lotes. A análise estatística revelou que as diferenças de diâmetro médio entre ambas não são estatisticamente significativas (figura 23). Apesar da formulação 5 ter obtido tamanhos médios relativamente menores em relação à formulação 4, esta última foi a escolhida uma vez que a quantidade de PC disponível para a realização do trabalho foi um pouco limitada e com esta formulação era usada menos PC.

Tabela 14: Resultados do diâmetro médio (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) para formulações preparadas com o método FDC, usando diferentes razões molares de PC:CH (3:1 e 4:1) e uma razão mássica lípidos:manitol de 1:5.

HIDRATAÇÃO A				
Formulação	Formulação (PC:CH)	Diâmetro médio (nm)	Polidispersão	Potencial zeta (mV)
4	3:1	917,04 ± 61,76	0,361 ± 0,030	-60,55 ± 4,48
5	4:1	923,1 ± 35,73	0,366 ± 0,028	-57,00 ± 2,01
HIDRATAÇÃO B				
Formulação	Formulação (PC:CH)	Diâmetro médio (nm)	Polidispersão	Potencial zeta (mV)
4	3:1	1055,90 ± 57,20	0,353 ± 0,040	-41,75 ± 3,66
5	4:1	1058,2 ± 93,37	0,355 ± 0,044	-49,53 ± 3,44
HIDRATAÇÃO C				
Formulação	Formulação (PC:CH)	Diâmetro médio (nm)	Polidispersão	Potencial zeta (mV)
4	3:1	596,00 ± 11,56	0,360 ± 0,025	-53,21 ± 2,34
5	4:1	646,32 ± 17,69	0,334 ± 0,020	-57,03 ± 2,14

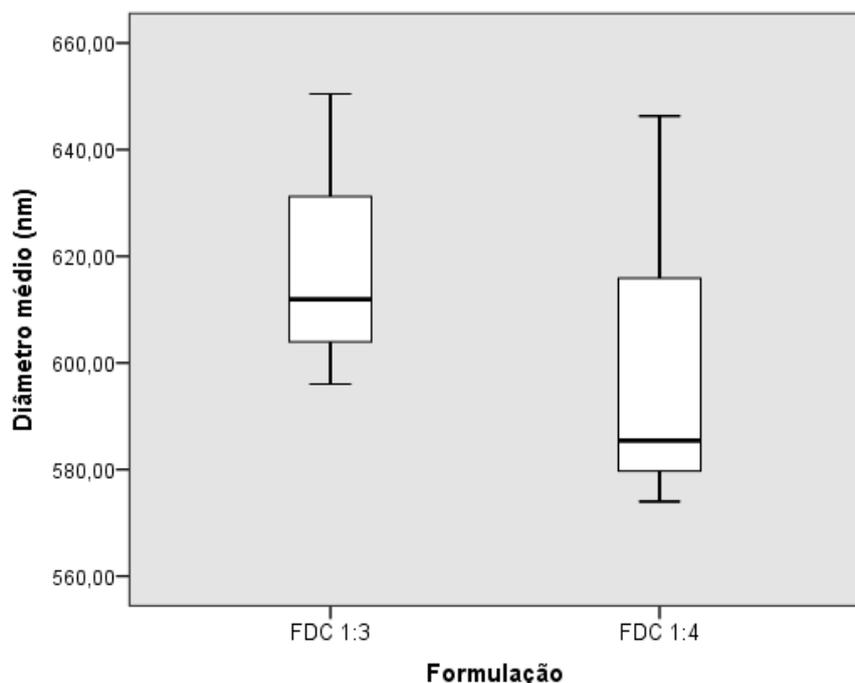


Figura 22: Caixa de bigodes do diâmetro médio dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método FDC (film deposition on carrier) com as razões molares de CH:PC de 1:3 e 1:4 ($p > 0,05$).

Estando então escolhida a razão molar entre os lípidos, procedeu-se ao estudo da razão mássica lípidos:manitol. Infelizmente, o método FDC revelou-se muito demorado. Uma vez que o objetivo era escolher a formulação o mais rápido possível, de forma a poder começar a testá-la com o fármaco, selecionar outro método tornou-se fundamental. Por essa razão, escolheu-se o método FD para prosseguir os estudos. Foram preparadas várias formulações, mantendo a razão molar PC:CH 3:1 e com diferentes razões mássicas lípidos:manitol, como apresentado no capítulo 2. Foram preparados três lotes de prolipossomas para cada uma das formulações, sendo que a hidratação usada foi a exposta acima.

Na tabela 15 estão registados os resultados de diâmetro médio, polidispersão e potencial zeta obtidos para cada formulação.

A análise estatística revelou a inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre os diâmetros médios, para as quatro formulações (figura 23). De forma a fazer uma escolha mais consciente, foi efetuada uma análise térmica dos prolipossomas através do método de calorimetria diferencial de varrimento (DSC).

Tabela 15: Resultados do diâmetro médio (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) para formulações preparadas com o método FD, usando diferentes razões mássicas de lípidos:manitol e uma razão molar PC:CH de 3:1.

Formulação	Diâmetro médio (nm)	Polidispersão	Potencial zeta (mV)
FD 1:1	470,22 ± 32,74	0,329 ± 0,015	-31,94 ± 3,73
FD 1:2,5	490,37 ± 48,37	0,320 ± 0,005	-32,88 ± 8,21
FD 1:5	507,89 ± 53,11	0,321 ± 0,012	-38,41 ± 9,92
FD 1:10	415,17 ± 30,91	0,299 ± 0,026	-40,05 ± 7,18

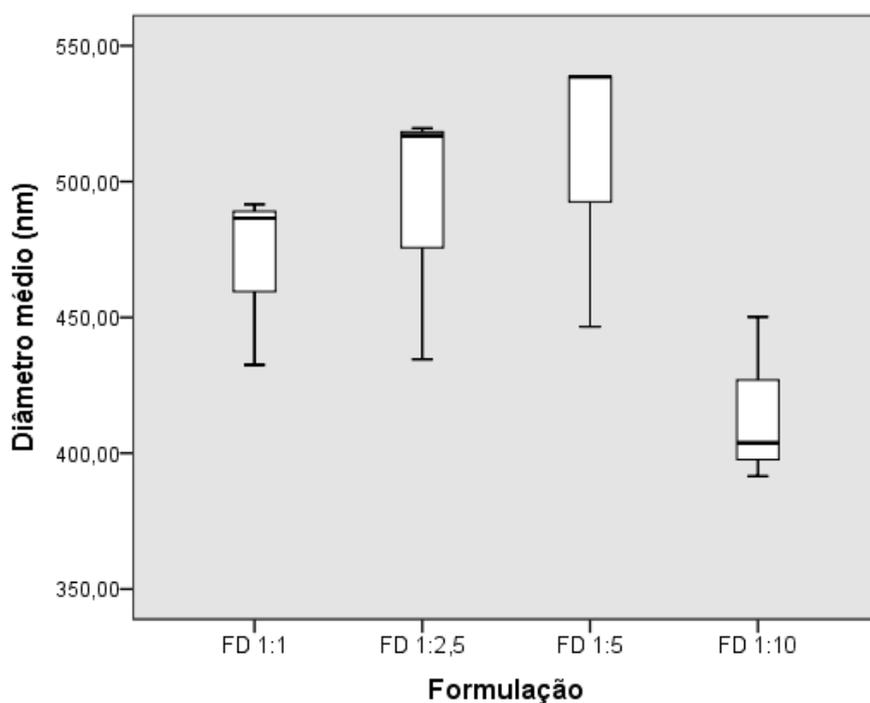


Figura 23: Caixa de bigodes do diâmetro médio dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método FD (*freeze drying*) com as razões mássicas de lípidos manitol de 1:1; 1:2,5; 1:5; 1:10 ($p > 0,05$).

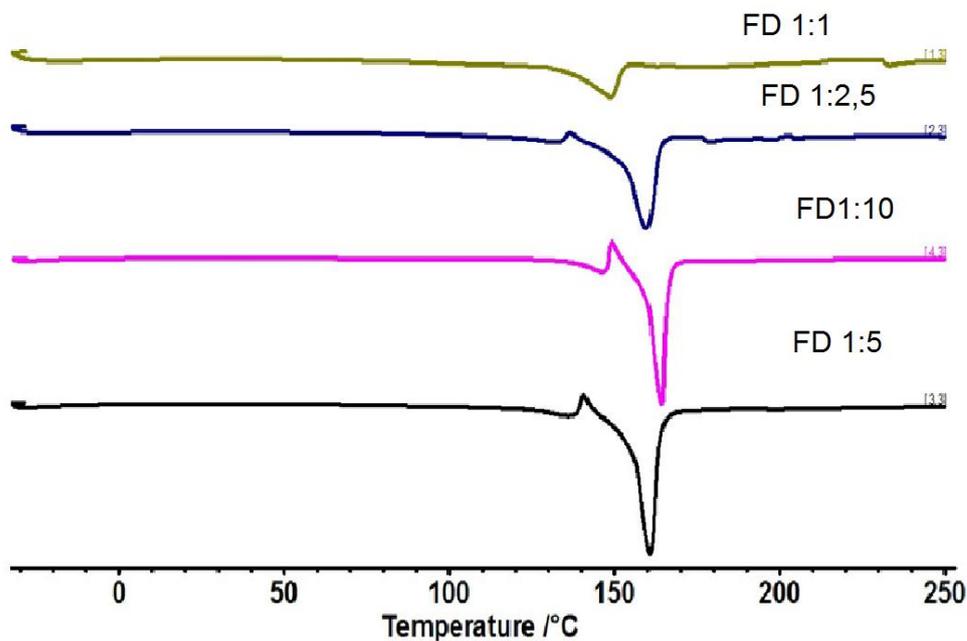


Figura 24: Termograma dos prolipossomas produzidos pelo método FD (*freeze drying*) com as razões mássicas de lípidos:manitol de 1:1; 1:2,5; 1:5; 1:10.

No termograma podemos ver que o pico que aparece associado a cada uma das formulações se refere ao manitol (termograma do manitol presente em anexo). Isso significa que de facto os restantes constituintes estão dissolvidos nele. No entanto é possível verificar que antes do pico aparece um outro, muito mais pequeno, o que poderá dever-se à existência de um polimorfismo. A literatura descreve a existência de formas polimórficas do manitol [189]. Podemos ver no termograma que o ponto de fusão dos prolipossomas é maior para a formulação com a razão mássica lípido:manitol de 1:10 (a rosa no gráfico). Ora, isto demonstra que de facto esta é a melhor formulação de todas, sendo a que apresenta um ponto de fusão mais próximo do manitol (o início do ponto de fusão obtido para o manitol experimentalmente foi de 165,9 °C).

Assim, foi escolhida a formulação: razão molar PC:CH de 3:1 e razão mássica lípidos:manitol de 1:10.

Seguiu-se a preparação de prolipossomas com a formulação escolhida, usando os três métodos, com e sem PTX.

4.5. DESENVOLVIMENTO DE PROLIPOSSOMAS COM PTX – CARACTERIZAÇÃO

Foram preparados, com os três métodos, prolipossomas com e sem PTX. Os resultados do diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e eficácia de encapsulação estão apresentados na tabela 16. Foi feita a análise estatística, de modo a determinar se as diferenças entre o diâmetro médio e potencial zeta das formulações com e sem fármaco foram estatisticamente significativos, ou seja, se a presença do PTX influenciou estes parâmetros.

Tabela 16: Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e eficácia de encapsulação dos lipossomas.

Formulação	Diâmetro médio (nm)	Polidispersão	Potencial zeta (mV)	Eficácia de encapsulação (%)
FDC s/fármaco	548,45 ± 67,00	0,334 ± 0,012	-47,38 ± 8,19	-
FDC PTX1%	515,05 ± 73,02	0,316 ± 0,015	-50,18 ± 3,52	93,65 ± 10,61
FD s/fármaco	412,93 ± 30,93	0,315 ± 0,040	-37,68 ± 5,01	-
FD PTX1%	470,50 ± 38,04	0,320 ± 0,012	-42,29 ± 1,79	85,67 ± 8,77
SD s/fármaco	242,84 ± 33,39	0,274 ± 0,028	-44,93 ± 2,84	-
SD PTX1%	247,54 ± 13,76	0,278 ± 0,010	-46,63 ± 5,59	96,07 ± 39,24

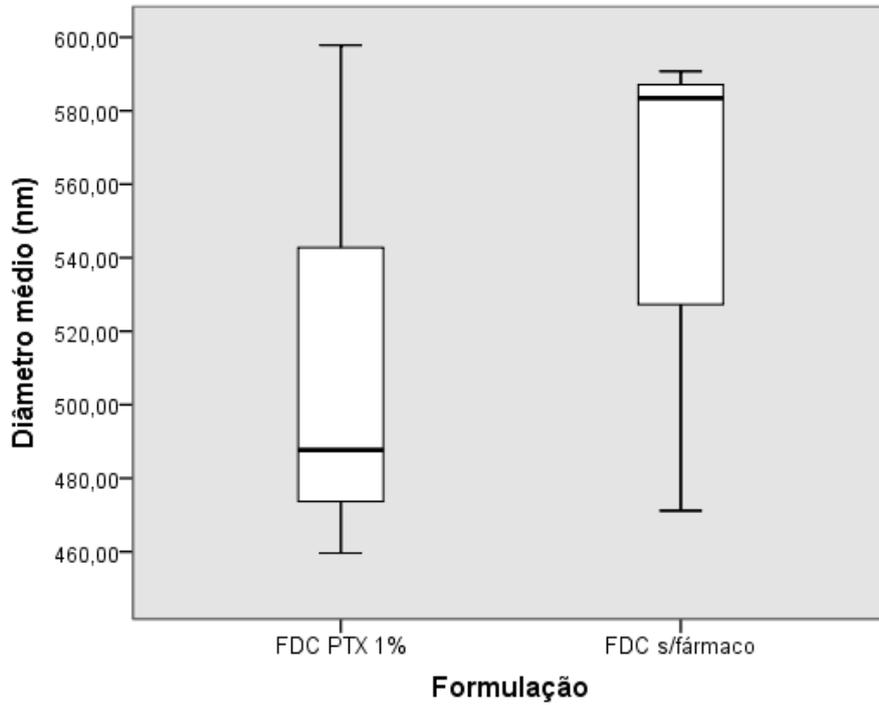


Figura 25: Caixa de bigodes do diâmetro médio dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método FDC com PTX 1% e sem fármaco ($p > 0,05$).

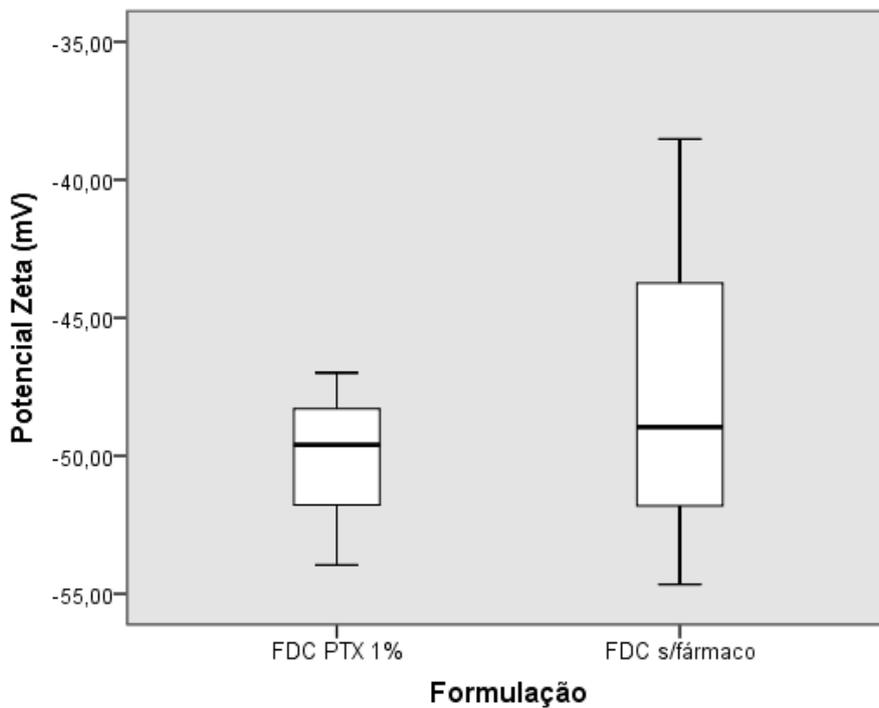


Figura 26: Caixa de bigodes do potencial zeta dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método FDC com PTX 1% e sem fármaco ($p > 0,05$).

Como é possível observar pela figura 25 e 26, os valores de diâmetro médio e potencial zeta relativos às formulações de PTX com e sem fármaco obtidos pelo método de FDC, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, pelo que se pode concluir que a presença do fármaco não influenciou estes parâmetros, o que é positivo. Os valores de potencial zeta são muito baixos, o que é um bom indicativo da estabilidade da formulação. Assim, a tendência para as partículas se aglomerarem é reduzida e a estabilidade da dispersão é elevada. Considera-se como limites os valores -30 mV e +30 mV, isto é, uma dispersão em que as partículas apresentem um potencial zeta superior a +30 mV e inferior a -30 mV é considerada estável [190, 191].

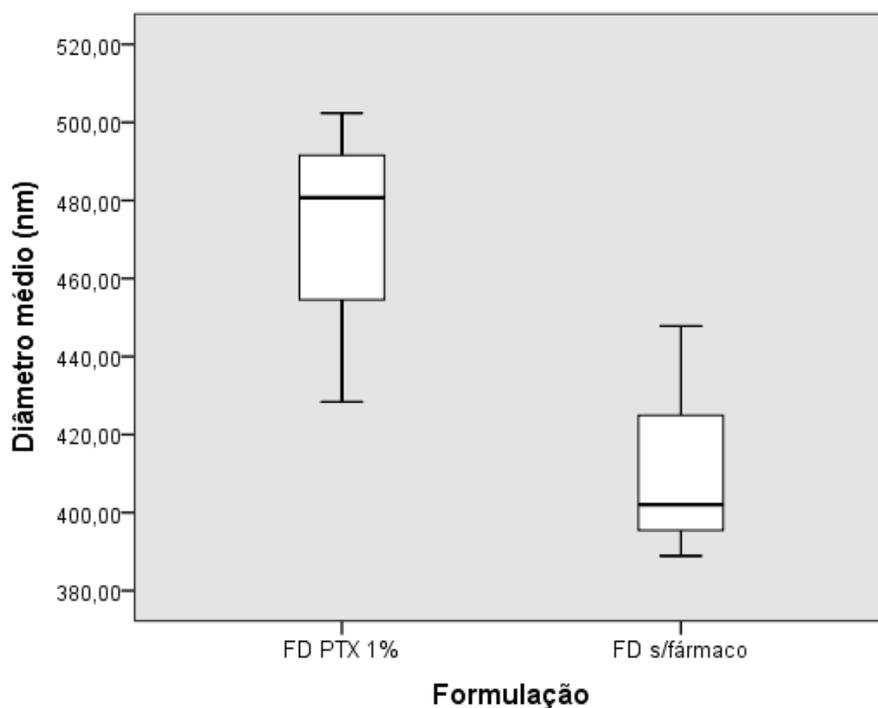


Figura 27: Caixa de bigodes do diâmetro médio dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método FD com PTX 1% e sem fármaco ($p > 0,05$).

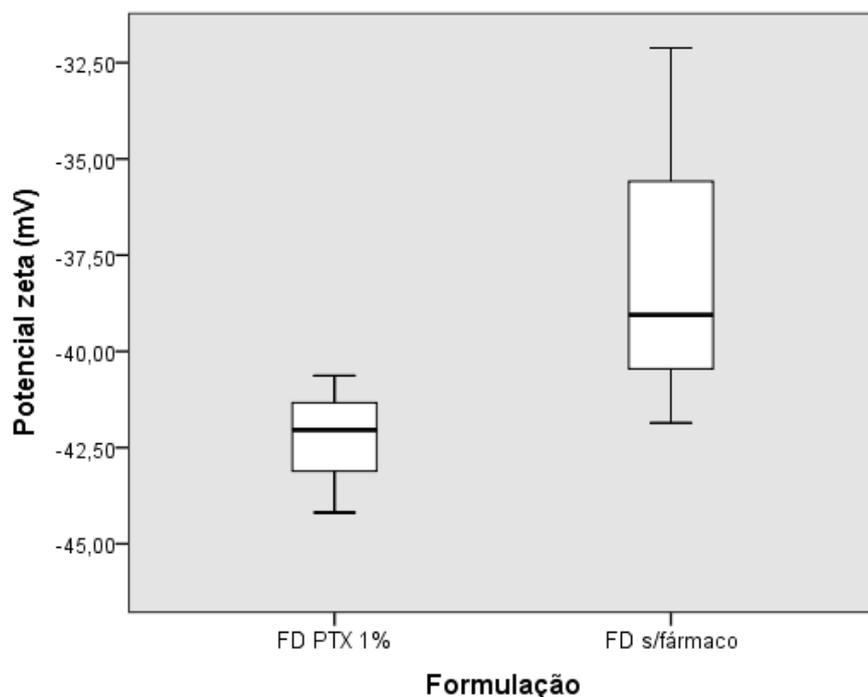


Figura 28: Caixa de bigodes do potencial zeta dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método FD com PTX 1% e sem fármaco ($p > 0,05$).

Como é possível observar pela figura 27 e 28, os valores de diâmetro médio e potencial zeta relativos às formulações de PTX com e sem fármaco obtidos pelo método de FD, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, pelo que se pode concluir que a presença do fármaco não influenciou estes parâmetros, o que é positivo. Os valores de potencial zeta, à semelhança da situação anterior, são < -30 mV, o que é um bom indicativo da estabilidade da formulação [190, 191].

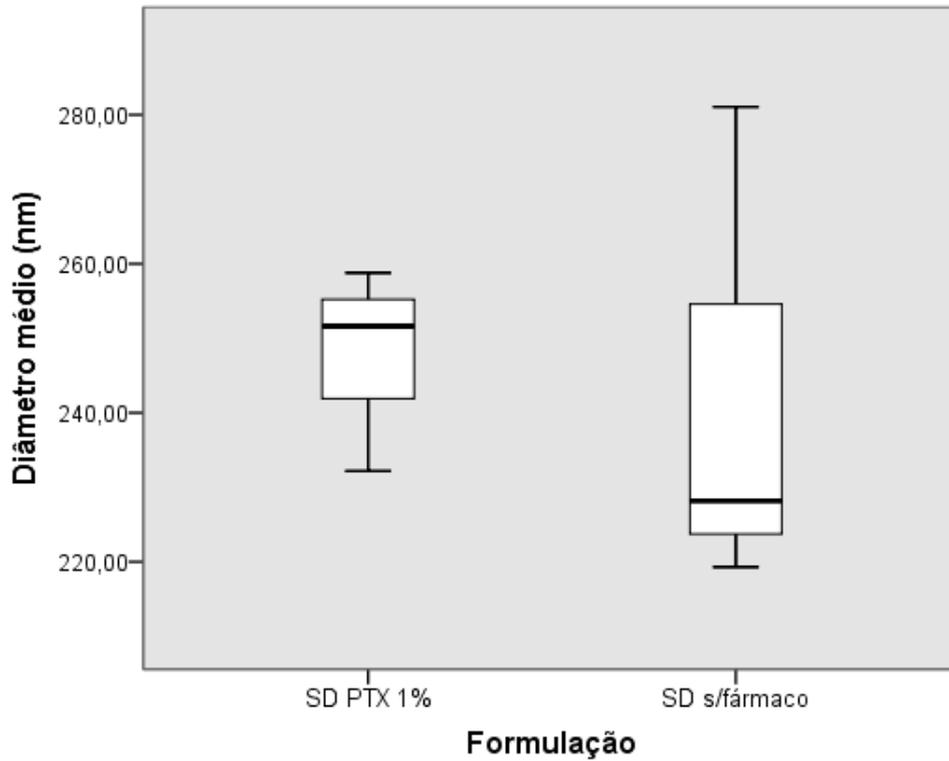


Figura 29: Caixa de bigodes do diâmetro médio dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método FD com PTX 1% e sem fármaco ($p > 0,05$).

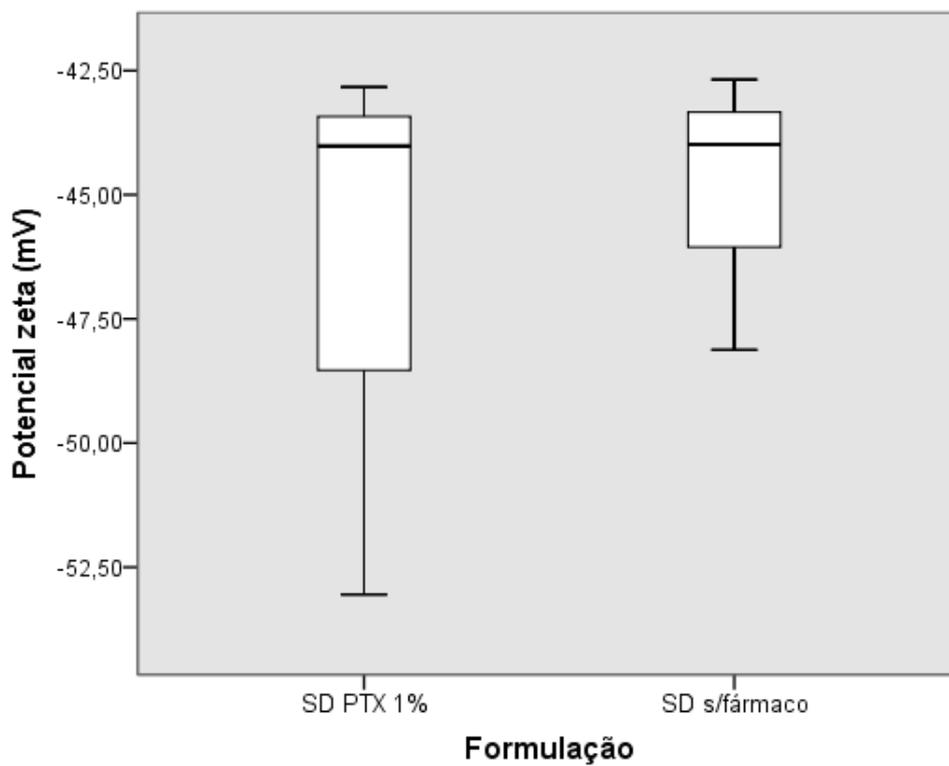


Figura 30: Caixa de bigodes do potencial zeta dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelo método SD com PTX 1% e sem fármaco ($p > 0,05$).

Quanto à formulação obtida pelo método de SD, as figuras 29 e 30 mostram que também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os diâmetros médios e potenciais zeta das formulações com e sem PTX.

Assim, para todos os métodos, a presença do fármaco na quantidade usada não causou diferenças estatisticamente significativas no diâmetro médio e potencial zeta dos lipossomas. Seria interessante estudar, futuramente, outras quantidades de fármaco e sua influência nestes parâmetros.

Pela análise dos valores da tabela 16, verifica-se uma clara diferença entre os valores de diâmetro médio obtidos para a formulação produzida pelo método SD, em comparação com os outros métodos. Foi feita a análise estatística, que veio confirmar esta mesma observação: o diâmetro médio dos lipossomas obtidos após hidratação dos prolipossomas produzidos pelo método SD é estatisticamente menor em comparação com o método FD ($p=0,05$) e com o método FDC ($p=0,01$) (figura 31). Este é um resultado de muito interesse, já que demonstra que entre todos os métodos, o SD é capaz de produzir partículas que quando hidratadas dão origem a lipossomas de menores diâmetros médios, constituindo portanto uma vantagem deste método, face aos restantes.

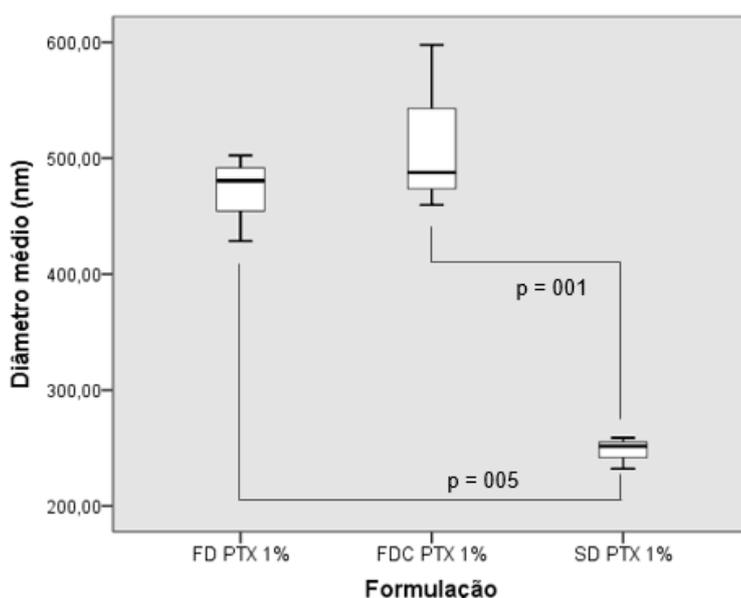


Figura 31: Caixa de bigodes do diâmetro médio dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelos três métodos com PTX 1%.

A questão do tamanho é deveras importante. De facto, o diâmetro dos lipossomas é um aspeto da sua caracterização física essencial, que irá determinar o seu sucesso clínico como vetor de fármacos. As conclusões de vários estudos é que

lipossomas menores que 100 nm têm uma menos interação com as proteínas plasmáticas, evitando assim a captura pelo sistema mononuclear fagocitário, contribuindo para um aumento do tempo de circulação no sangue e acumulando-se passivamente no tumor [115, 192]. Contrariamente, lipossomas maiores são eliminados mais rapidamente da circulação sanguínea. Assim, teoricamente um lipossomas ideal para a entrega de fármacos quimioterapêuticos deverá ter um diâmetro entre 50-100 nm. Para o alcance dos locais alvo de forma passiva, através do efeito EPR, os sistemas poderão apresentar tamanhos até 200 nm, no entanto partículas de maiores dimensões têm também demonstrado extravasamento e acumulação nas células tumorais [115]. Atendendo a estas considerações, o método de SD foi aquele que permitiu obter resultados mais promissores, uma vez que os diâmetros médios das vesículas produzidas, após hidratação, foi da gama dos 250 nm. Este método, merece pois ser futuramente explorado.

No que respeita aos valores de potencial zeta para as formulações com fármaco, estes não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os vários métodos (figura 32), o que indica que qualquer um deles permite obter resultados promissores no que respeita à estabilidade da dispersão (todos os valores de potencial zeta foram inferiores a -30mV).

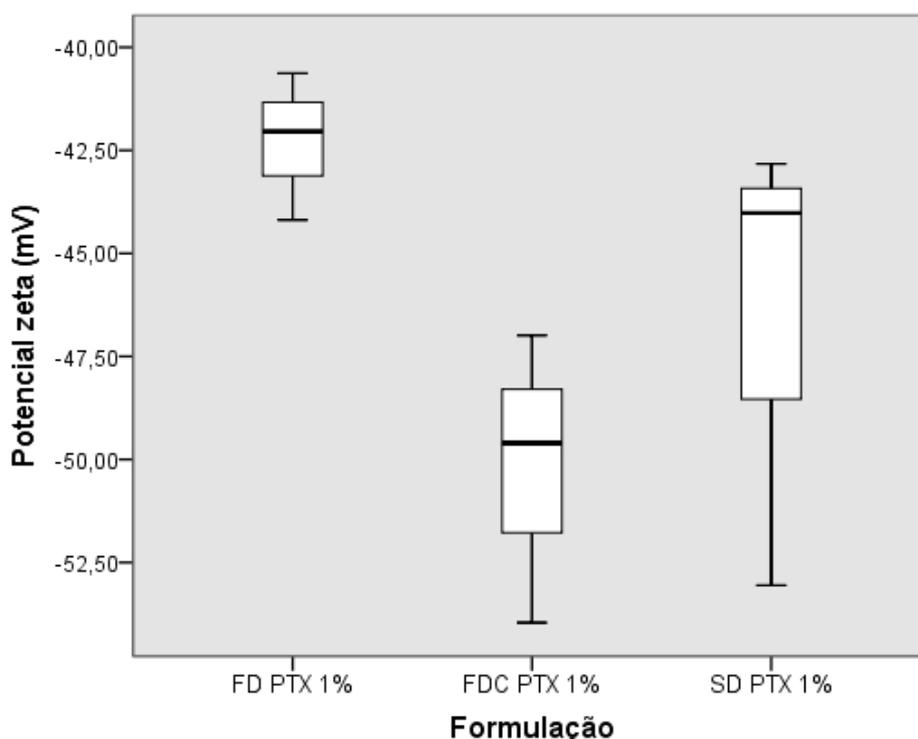


Figura 32: Caixa de bigodes do potencial zeta dos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos pelos três métodos com PTX 1% ($p > 0,05$).

Quanto à eficácia de encapsulação do PTX, os valores obtidos para os três métodos são elevados (tabela 16), sendo que todos os valores de eficácia de encapsulação obtidos foram superiores a 85%. Ora, atendendo a que o objetivo do trabalho foi a produção de prolipossomas como um sistema de transporte de fármacos, estes valores de eficácia de encapsulação do fármaco indicam que o objetivo foi cumprido e de facto criaram-se sistemas capazes de encapsular o fármaco. Mais ainda, qualquer dos métodos usados permitiram a produção de prolipossomas com uma grande capacidade de encapsulação do fármaco, o que constitui um resultado muito promissor.

Atendendo aos resultados obtidos, cada um dos métodos produziu prolipossomas que quando hidratados originam lipossomas com valores de potencial zeta baixos e valores de eficácia de encapsulação do fármaco superiores a 85%. Quanto ao diâmetro médio, o SD permitiu obter menores tamanhos, na ordem dos 250 nm, o que indica que este método é uma potencial metodologia a explorar na preparação de prolipossomas como sistemas transportadores de fármacos. Os valores do índice de polidispersão, para todos os métodos são elevados, o que indica a heterogeneidade entre os tamanhos das partículas. Este é um resultado que já se esperava, uma vez que está documentado que os prolipossomas, ao serem hidratados originam lipossomas do tipo MLV [133, 134], o que podemos apontar como desvantagem destes sistemas.

4.6. MORFOLOGIA

Foi utilizada a técnica de cryoSEM para obtenção de imagens das partículas que se formam após a hidratação dos prolipossomas, de modo a avaliar a sua morfologia.

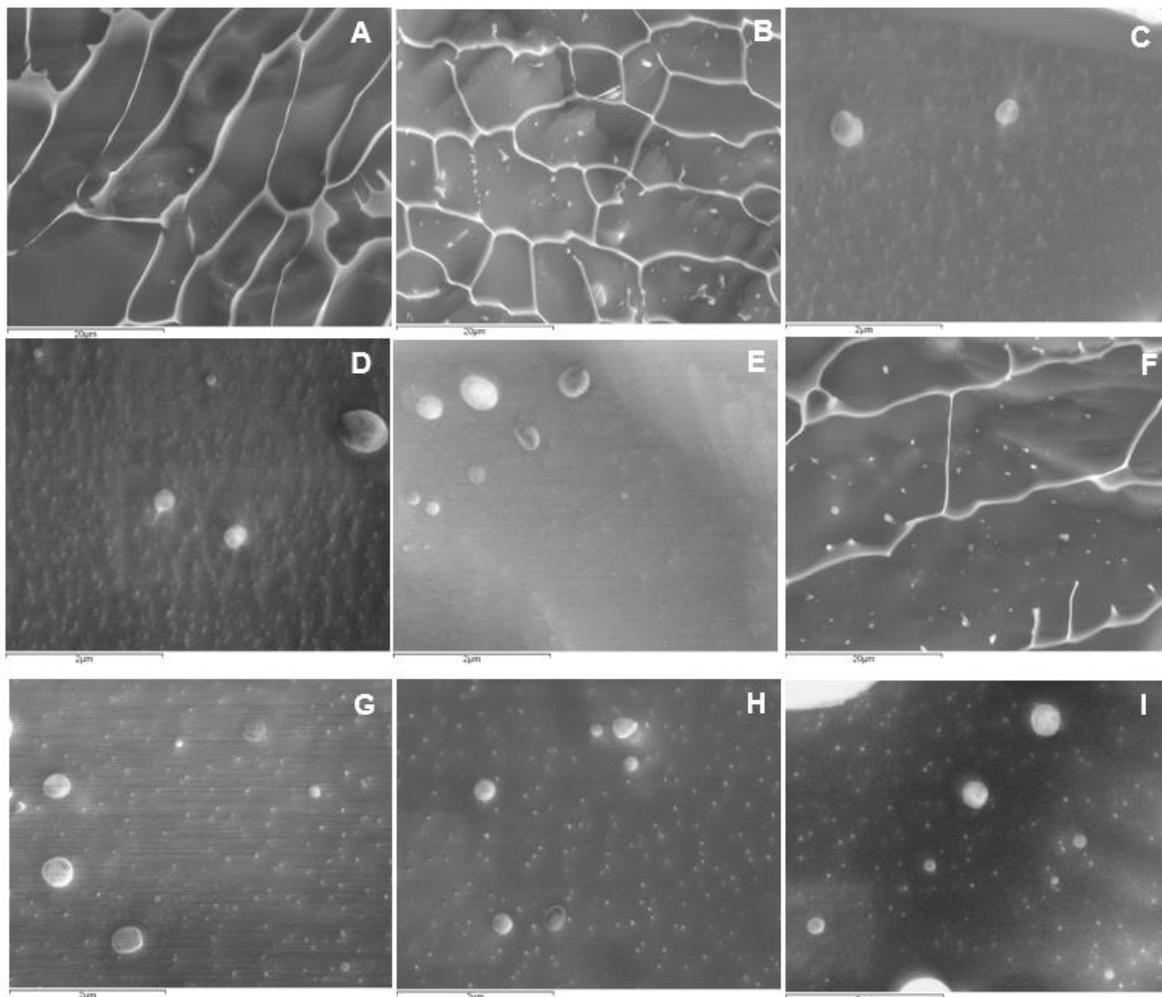


Figura 33: Imagens de cryoSEM obtidas com o Microscópio Eletrónico de Varrimento de alta resolução, com Microanálise por Raios X e sistema para observação de amostras a baixa temperatura (JEOL JSM 6301F/ Oxford INCA Energy 350/ Gatan Alto 2500, referentes aos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos com a técnica de SD. A – manitol hidratado, ampliação x2500; B – SD sem fármaco x2500; C, D e E – SD sem fármaco x2500; F – SD com PTX x 2500; G, H e I – SD com PTX x 25000.

A figura 33 refere-se à técnica de SD. Em primeiro lugar, as imagens provam que de facto, a hidratação dos prolipossomas produzidos por esta técnica leva à formação de lipossomas. É possível visualizar nas imagens de menor ampliação (B e C) a presença das partículas e de uma rede. Pensou-se que tal estrutura se devia à presença do manitol e, para o confirmar, foi hidratado manitol obtido por secagem no Nano spray dryer. Como é mostrado na imagem A, essa estrutura deve-se de facto ao manitol. As partículas apresentam uma forma aproximadamente esférica, sendo que é possível visualizar

partículas de dimensões variadas, o que vem corroborar os altos índices de polidispersão obtidos.

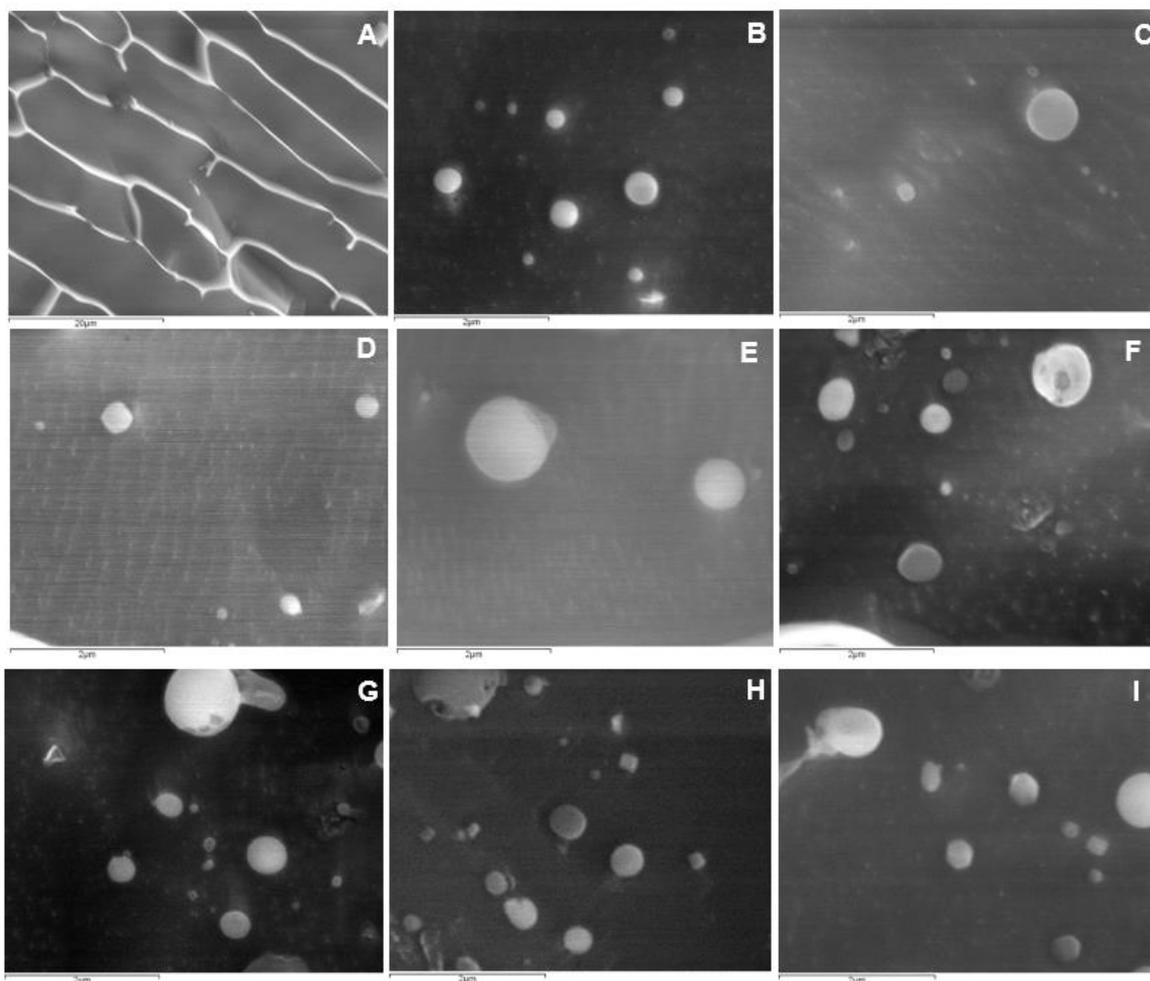


Figura 34: Imagens de crySEM obtidas com o Microscópio Eletrónico de Varrimento de alta resolução, com Microanálise por Raios X e sistema para observação de amostras a baixa temperatura (JEOL JSM 6301F/ Oxford INCA Energy 350/ Gatan Alto 2500, referentes aos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos com a técnica de FD. A – manitol hidratado, ampliação x2500; B – FD sem fármaco x2500; C, D e E – FD sem fármaco x2500; F – FD com PTX x 2500; G, H e I – FD com PTX x 25000.

A figura 34 refere-se à técnica de FD. Também aqui, as imagens provam que de facto, a hidratação dos prolipossomas produzidos por esta técnica leva à formação de lipossomas. É possível visualizar partículas de dimensões muito variadas, sendo algumas da ordem de 1 µm (figura 35 E e G). Comparando com a imagem 33, surgem aqui partículas de superiores dimensões, o que está de acordo com as diferenças de diâmetro médio das partículas obtidas para cada um dos métodos. Os lipossomas aparentam ter uma forma aproximadamente esférica, embora seja possível visualizar alguns deles com uma forma um pouco mais irregular.

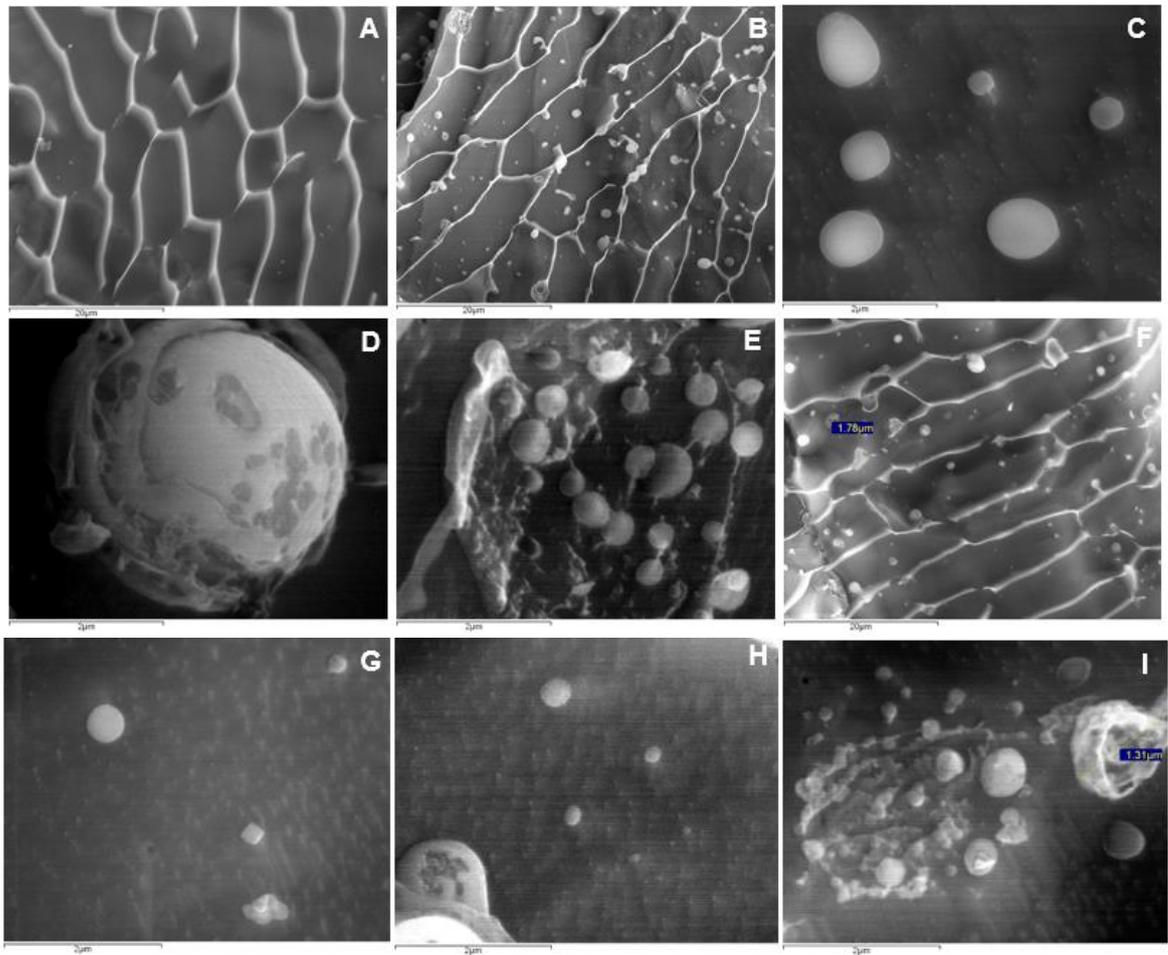


Figura 35: Imagens de cryoSEM obtidas com o Microscópio Eletrónico de Varrimento de alta resolução, com Microanálise por Raios X e sistema para observação de amostras a baixa temperatura (JEOL JSM 6301F/ Oxford INCA Energy 350/ Gatan Alto 2500, referentes aos lipossomas obtidos após hidratação de prolipossomas produzidos com a técnica de FDC. A – manitol hidratado, ampliação x2500; B – FDC sem fármaco x2500; C, D e E – FDC sem fármaco x25000; F – FDC com PTX x 2500; G, H e I – FDC com PTX x 25000.

A figura 35 refere-se às partículas obtidas através da técnica de FDC. Mais uma vez as imagens provam que de facto a hidratação dos prolipossomas produzidos por esta técnica leva à formação de lipossomas. É possível visualizar partículas de dimensões muito variadas, incluindo partículas com um tamanho superior a 2 μm (figura 36-D), com formas aproximadamente esféricas. Comparando com a imagem 33, surgem aqui partículas de superiores dimensões, o que está de acordo com as diferenças de diâmetro médio das partículas obtidas para cada um dos métodos. Alguns lipossomas apresentam uma morfologia mais irregular.

A morfologia dos prolipossomas foi também avaliada, usando a técnica de SEM – figuras 36, 37 e 38.

Comparando as imagens dos prolipossomas produzidos por diferentes técnicas, são notórias as diferenças da morfologia das partículas. A técnica de SD permitiu obter partículas com uma forma aproximadamente esférica, ao contrário dos prolipossomas obtidos pelas outras técnicas, que apresentam formas mais irregulares.

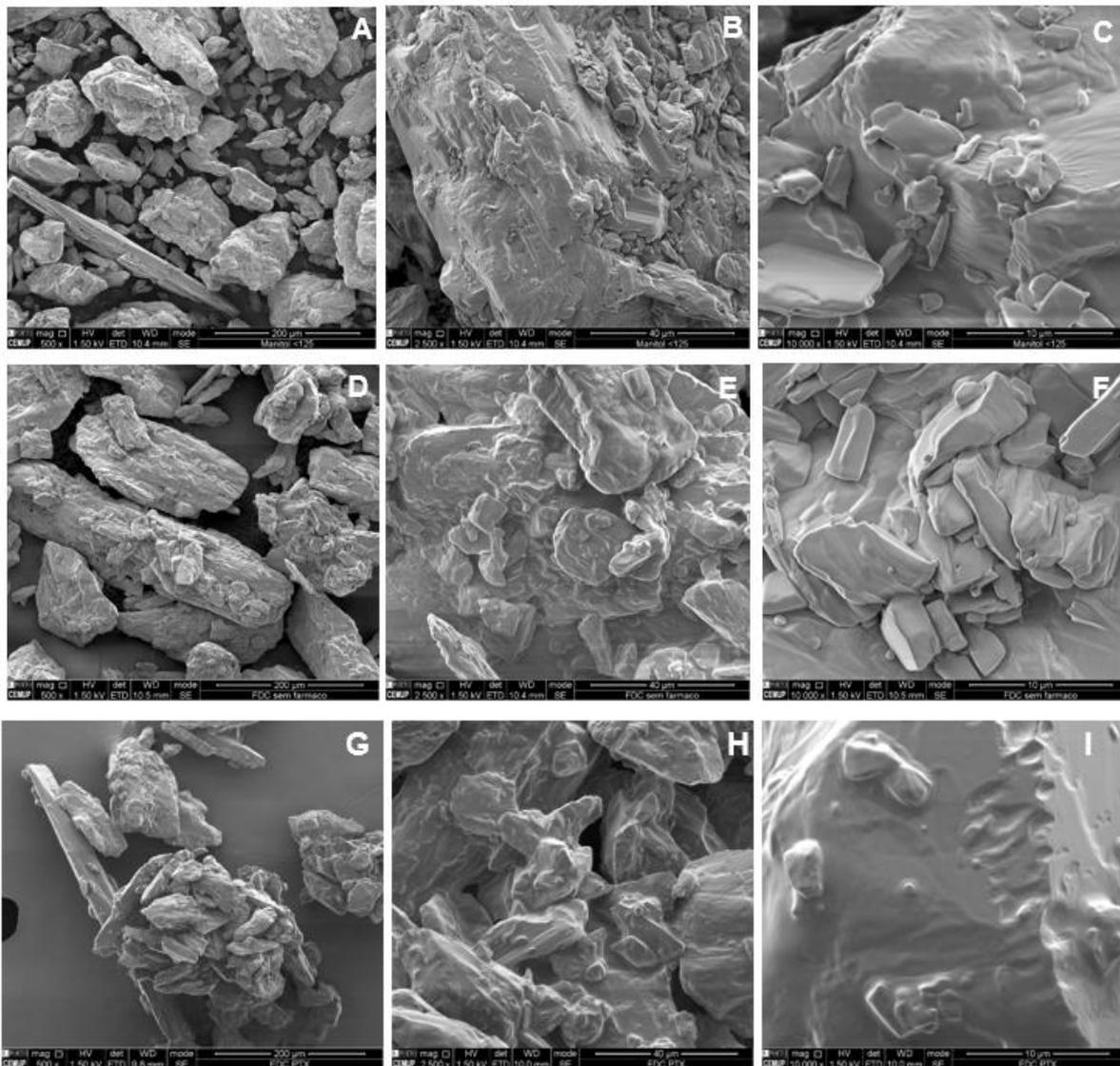


Figura 36: Imagens de SEM obtidas com o Microscópio Eletrônico de Varrimento ambiental, de alta resolução (Schottky) Quanta 400FEG ESEM / EDAX Genesis X4M referentes aos prolipossomas obtidos com a técnica FDC e manitol usado. A – manitol x500; B – manitol x2500; C – manitol x10000; D – prolipossomas FDC s/ fármaco x500; E – prolipossomas FDC s/ fármaco x2500; F – prolipossomas FDC s/ fármaco x10000; G – prolipossomas FDC com PTX x500; H – prolipossomas FDC com PTX x2500; I – prolipossomas FDC com PTX x10000.

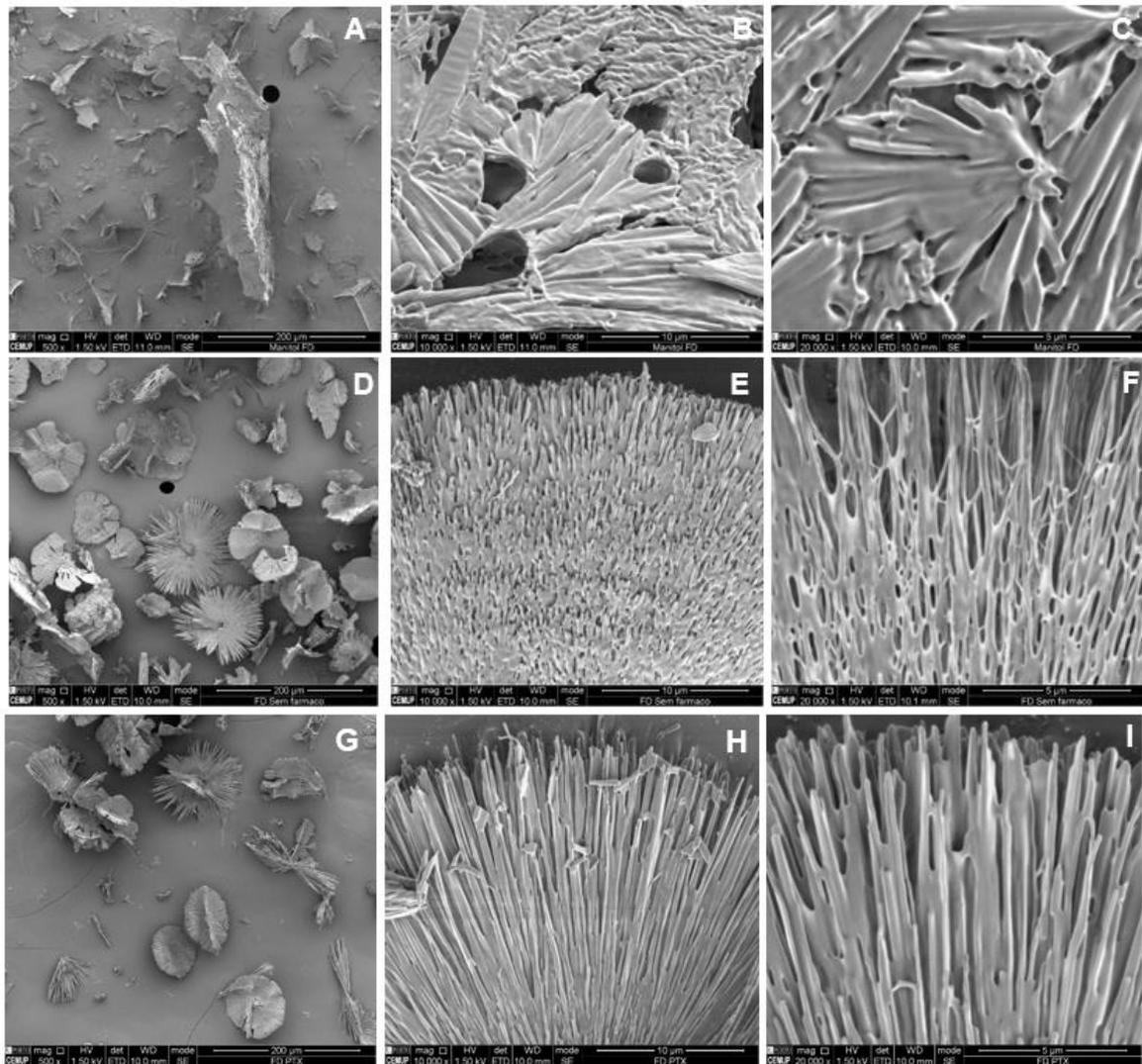


Figura 37: Imagens de SEM obtidas com o Microscópio Eletrônico de Varrimento ambiental, de alta resolução (Schottky) Quanta 400FEG ESEM / EDAX Genesis X4M referentes aos prolipossomas obtidos com a técnica FD e manitol usado. A – manitol liofilizado x500; B – manitol liofilizado x2500; C – manitol liofilizado x10000; D – prolipossomas FD s/ fármaco x500; E – prolipossomas FD s/ fármaco x2500; F – prolipossomas FD s/ fármaco x10000; G – prolipossomas FD com PTX x500; E – prolipossomas FD com PTX x2500; F – prolipossomas FD com PTX x10000.

Uma vez que o Nano Spray Dryer B-90, aparelho usado para a obtenção dos prolipossomas através do método de SD, foi especialmente concebido para a produção de nanopartículas, era esperado que os prolipossomas obtidos por este método tivessem uma morfologia esférica. Pode ainda concluir-se, ao compararmos as imagens do manitol e dos prolipossomas, para cada caso, que a morfologia apresentada pelo material transportador, determina a morfologia dos prolipossomas, o que faz sentido, atendendo a que este representa cerca de 90% do material total.

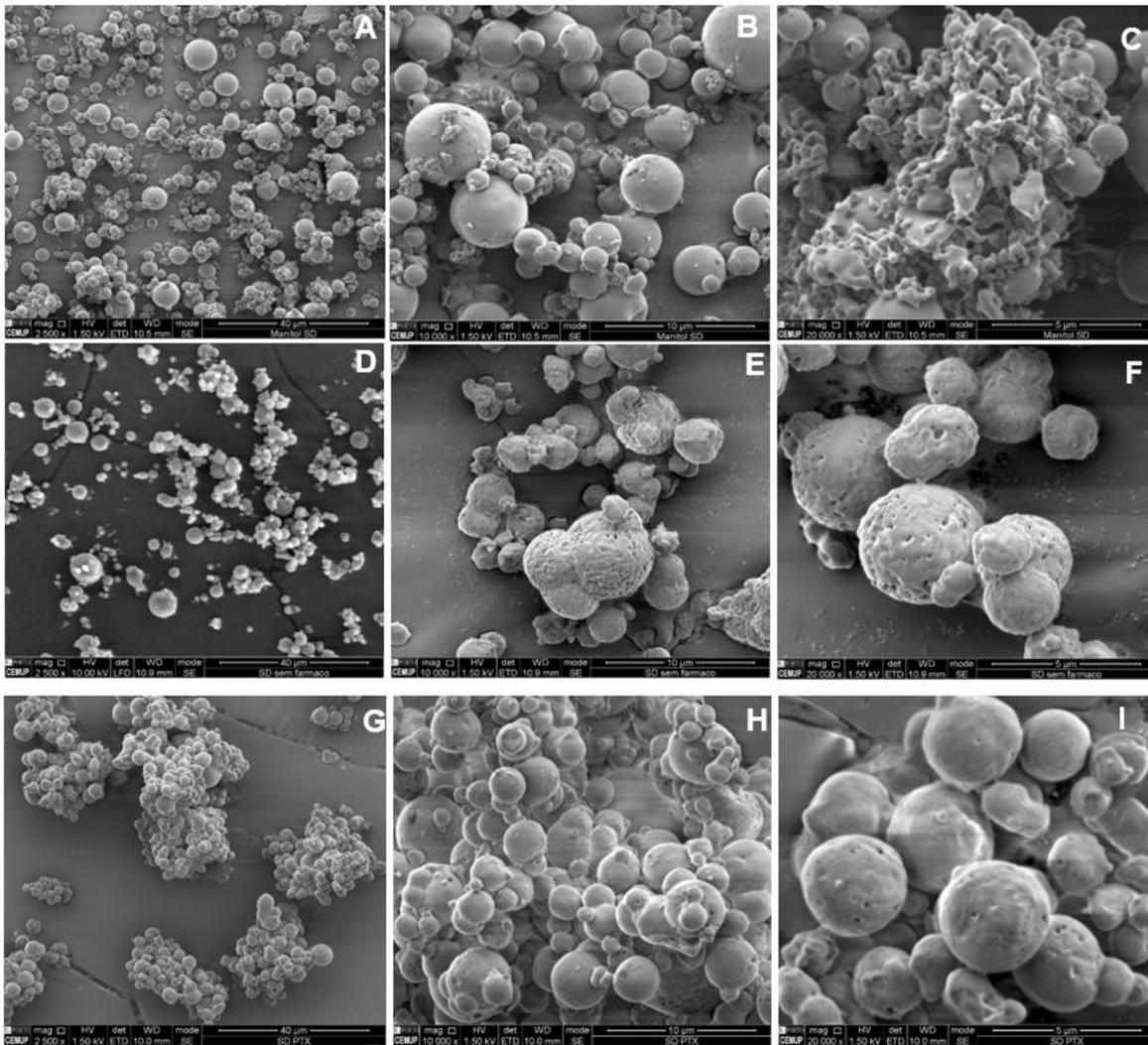


Figura 38: Imagens de SEM obtidas com o Microscópio Eletrônico de Varrimento ambiental, de alta resolução (Schottky) Quanta 400FEG ESEM / EDAX Genesis X4M referentes aos prolipossomas obtidos com a técnica SD e manitol usado. A – manitol SD x500; B – manitol SD x2500; C – manitol SD x10000; D – prolipossomas SD s/ fármaco x500; E – prolipossomas SD s/ fármaco x2500; F – prolipossomas SD s/ fármaco x10000; G – prolipossomas SD com PTX x500; E – prolipossomas SD com PTX x2500; F – prolipossomas SD com PTX x10000.

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A toxicidade apresentada por inúmeros fármacos, nomeadamente os anticancerígenos, aliada à sua capacidade de se distribuírem amplamente pelo organismo, atingindo os tecidos saudáveis, faz com que seja imprescindível investigar e criar novos veículos, que permitam o seu direcionamento às células alvo.

Os lipossomas constituem um dos tipos de vetores mais usado, apresentando inúmeras vantagens, principalmente devido à sua semelhança com as membranas celulares, o que os torna biocompatíveis. No entanto, a instabilidade física e química associada a eles, faz com que o seu “tempo de prateleira” seja baixo, o que limita muito o seu desenvolvimento para fins comerciais.

Os prolipossomas são partículas sólidas, formadas por lípidos e um material transportador que, quando hidratados, dão origem a lipossomas. Assim, apresentam as vantagens dos lipossomas, aliadas ao facto de serem partículas sólidas, o que lhes confere mais estabilidade em comparação com as formulações lipossomais. Apesar de não constituírem um tema novo, já que foram desenvolvidos pela primeira vez, no final da década de 80, são ainda uma área pouco explorada.

Neste trabalho foram desenvolvidos prolipossomas usando três metodologias: o método *film deposition on carrier*, usado pelos pioneiros na área dos prolipossomas, a liofilização (*freeze drying*) e a secagem por atomização (*spray drying*).

Foram produzidos prolipossomas com e sem fármaco. Após a sua obtenção, foram hidratados e os lipossomas formados foram caracterizados ao nível do seu tamanho, potencial zeta, eficácia de encapsulação e morfologia.

Os resultados mostraram que o método de *spray drying* permitiu obter lipossomas com um diâmetro médio na ordem dos 250 nm, resultados estatisticamente diferentes dos obtidos pelos restantes métodos. O recurso à técnica de SEM permitiu avaliar a morfologia dos prolipossomas e descobrir que de facto através do *spray drying* se obtêm partículas esféricas. O potencial zeta para todos os métodos foi menor que -30mV, um indicador de uma boa estabilidade da dispersão lipossómica e a eficácia de encapsulação do fármaco foi superior a 85%.

Os resultados levam à conclusão de que o *spray drying* foi um método que permitiu a obtenção de prolipossomas com as melhores características para possível vetorização de fármacos, merecendo ser explorado no futuro.

Os próximos passos na continuação do trabalho poderão consistir no estado da estabilidade dos prolipossomas, caracterização das suas propriedades de escoamento (característica importantíssima dos pós) e ensaios para avaliar a sua toxicidade celular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* 2000; 21 (6): 167-223.
2. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 93: 52-79.
3. Ruddon RW. Characteristics of Human Cancer. In: *CANCER BIOLOGY*. Fourth ed: OXFORD UNIVERSITY PRESS; 2007. p. 3-14.
4. Qiu B, Simon MC. Oncogenes strike a balance between cellular growth and homeostasis. *Semin Cell Dev Biol* 2015.
5. Ruddon RW. Causes of Cancer. In: *CANCER BIOLOGY*. Fourth ed: OXFORD UNIVERSITY PRESS; 2007. p. 17-55.
6. Ruddon RW. The Biochemistry and Cell Biology of Cancer. In: *CANCER BIOLOGY*. Fourth ed: OXFORD UNIVERSITY PRESS; 2007. p. 117-236.
7. Ruddon RW. Molecular Genetics of Cancer. In: *CANCER BIOLOGY*. Fourth ed: OXFORD UNIVERSITY PRESS; 2007. p. 257-356.
8. Cancer - Fact sheet. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> [acedido em 22/06/2015].
9. Mantyh PW. Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7 (10): 797-809.
10. Ruddon RW. Sequelae of Cancer and Its Treatment. In: *CANCER BIOLOGY*. Fourth ed: OXFORD UNIVERSITY PRESS; 2007. p. 472-84.
11. Chabner BA, Roberts TG. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; 5 (1): 65-72.
12. Papac RJ. Origins of cancer therapy. *Yale J Biol Med* 2001; 74 (6): 391-8.
13. Lytton-Jean AK, Kauffman KJ, Kaczmarek JC, Langer R. Cancer nanotherapeutics in clinical trials. *Cancer Treat Res* 2015; 166: 293-322.
14. Edward Chu and Vincent T. DeVita J. Principles of Cancer Chemotherapy. In: Edward Chu and Vincent T. DeVita J, editor. *Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual*: Jones and Bartlett; 2008. p. 1-10.
15. Types of chemotherapy drugs. Disponível em <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy/chemotherapyprinciplesanddepthdiscussionofthetechniquesanditsroleintreatment/chemotherapy-principles-types-of-chemo-drugs> [acedido em 20/06/2015].
16. Kingston DGI. Taxol, a molecule for all seasons. *Chem Commun* 2001; (10): 867-80.
17. Cragg GM. Paclitaxel (Taxol®): A success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development. *Med Res Rev* 1998; 18 (5): 315-31.
18. Kampan NC, Madondo MT, McNally OM, Quinn M, Plebanski M. Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 413076.
19. Singla AK, Garg A, Aggarwal D. Paclitaxel and its formulations. *Int J Pharm* 2002; 235 (1-2): 179-92.

20. McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenshein NB, Grumbine FC, Ettinger DS, Armstrong DK, et al. Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med* 1989; 111 (4): 273-9.
21. Wiernik PH, Schwartz EL, Strauman JJ, Dutcher JP, Lipton RB, Paietta E. Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol. *Cancer Res* 1987; 47 (9): 2486-93.
22. Kingston DGI. Taxol: The chemistry and structure-activity relationships of a novel anticancer agent. *Trends Biotechnol* 1994; 12 (6): 222-27.
23. Mustacchi G, De Laurentiis M. The role of taxanes in triple-negative breast cancer: literature review. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9: 4303-18.
24. Pasello G, Carli P, Canova F, Bonanno L, Polo V, Zago G, et al. Epirubicin plus paclitaxel regimen as second-line treatment of patients with small-cell lung cancer. *Anticancer Res* 2015; 35 (4): 2183-9.
25. Socinski MA. Update on taxanes in the first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol* 2014; 21 (5): e691-703.
26. Tamura K, Kikuchi E, Konno T, Ishihara K, Matsumoto K, Miyajima A, et al. Therapeutic effect of intravesical administration of paclitaxel solubilized with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-n-butyl methacrylate) in an orthotopic bladder cancer model. *BMC Cancer* 2015; 15: 317.
27. Tu L, Sun L, Xu Y, Wang Y, Zhou L, Liu Y, et al. Paclitaxel and cisplatin combined with intensity-modulated radiotherapy for upper esophageal carcinoma. *Radiat Oncol* 2013; 8: 75.
28. Xu CZ, Shi RJ, Chen D, Sun YY, Wu QW, Wang T, et al. Potential biomarkers for paclitaxel sensitivity in hypopharynx cancer cell. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6 (12): 2745-56.
29. Saville MW, Lietzau J, Pluda JM, Feuerstein I, Odom J, Wilson WH, et al. Treatment of HIV-associated Kaposi's sarcoma with paclitaxel. *Lancet* 1995; 346 (8966): 26-8.
30. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971; 93 (9): 2325-7.
31. Miller ML, Ojima I. Chemistry and chemical biology of taxane anticancer agents. *Chem Rec* 2001; 1 (3): 195-211.
32. Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SP. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg Med Chem* 2005; 13 (21): 5892-908.
33. Zhang Z, Mei L, Feng S-S. Paclitaxel drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2013; 10 (3): 325-40.
34. Ojima I, Geney R, Ungureanu IM, Li D. Medicinal chemistry and chemical biology of new generation taxane antitumor agents. *IUBMB Life* 2002; 53 (4-5): 269-74.
35. Xue M, Long BH, Fairchild C, Johnston K, Rose WC, Kadow JF, et al. Structure-activity relationships study at the 3'-N position of paclitaxel. Part 2: synthesis and biological evaluation of 3'-N-thiourea- and 3'-N-thiocarbamate-bearing paclitaxel analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 2000; 10 (12): 1327-31.
36. Kingston DG, Chaudhary AG, Chordia MD, Gharpure M, Gunatilaka AA, Higgs PI, et al. Synthesis and biological evaluation of 2-acyl analogues of paclitaxel (Taxol). *J Med Chem* 1998; 41 (19): 3715-26.
37. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 1979; 277 (5698): 665-67.

38. Janosi IM, Chretien D, Flyvbjerg H. Structural microtubule cap: stability, catastrophe, rescue, and third state. *Biophys J* 2002; 83 (3): 1317-30.
39. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004; 4 (4): 253-65.
40. Kirschner MW, Mitchison T. Microtubule dynamics. *Nature* 1986; 324 (6098): 621.
41. Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 1984; 312 (5991): 237-42.
42. Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 277-302.
43. Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 2003; 22 (47): 7280-95.
44. Pasquier E, Kavallaris M. Microtubules: a dynamic target in cancer therapy. *IUBMB Life* 2008; 60 (3): 165-70.
45. Assembly of microtubules. Disponível <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21522/figure/A5432/?report=objectonly> [acedido em 01/09/2015].
46. Jordan A, Hadfield JA, Lawrence NJ, McGown AT. Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev* 1998; 18 (4): 259-96.
47. Walczak CE, Cai S, Khodjakov A. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11 (2): 91-102.
48. Zheng Y. A membranous spindle matrix orchestrates cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11 (7): 529-35.
49. Nogales E, Wolf SG, Khan IA, Luduena RF, Downing KH. Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature* 1995; 375 (6530): 424-7.
50. Derry WB, Wilson L, Jordan MA. Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics. *Biochemistry* 1995; 34 (7): 2203-11.
51. Kumar N. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. *J Biol Chem* 1981; 256 (20): 10435-41.
52. Wang TH, Popp DM, Wang HS, Saitoh M, Mural JG, Henley DC, et al. Microtubule dysfunction induced by paclitaxel initiates apoptosis through both c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent and -independent pathways in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 1999; 274 (12): 8208-16.
53. Bocci G, Di Paolo A, Danesi R. The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel. *Angiogenesis* 2013; 16 (3): 481-92.
54. Metheny-Barlow LJ, Li LY. The enigmatic role of angiopoietin-1 in tumor angiogenesis. *Cell Res* 2003; 13 (5): 309-17.
55. Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med* 2002; 6 (1): 1-12.
56. Cragg GM, Schepartz SA, Suffness M, Grever MR. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *J Nat Prod* 1993; 56 (10): 1657-68.
57. Denis JN, Greene AE, Guenard D, Gueritte-Voegelein F, Mangatal L, Potier P. Highly efficient, practical approach to natural taxol. *Journal of the American Chemical Society* 1988; 110 (17): 5917-19.
58. Cusido RM, Onrubia M, Sabater-Jara AB, Moyano E, Bonfill M, Goossens A, et al. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. *Biotechnol Adv* 2014; 32 (6): 1157-67.

59. Holton RA, Somoza C, Kim HB, Liang F, Biediger RJ, Boatman PD, et al. First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *Journal of the American Chemical Society* 1994; 116 (4): 1597-98.
60. Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ, Ueno H, Nantermet PG, Guy RK, et al. Total synthesis of taxol. *Nature* 1994; 367 (6464): 630-4.
61. Roberts SC, Shuler ML. Large-scale plant cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 1997; 8 (2): 154-9.
62. Konno T, Watanabe J, Ishihara K. Enhanced solubility of paclitaxel using water-soluble and biocompatible 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers. *J Biomed Mater Res A* 2003; 65 (2): 209-14.
63. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer* 2001; 37 (13): 1590-8.
64. Sonnichsen DS, Relling MV. Clinical pharmacokinetics of paclitaxel. *Clin Pharmacokinet* 1994; 27 (4): 256-69.
65. Dorr RT. Pharmacology and toxicology of Cremophor EL diluent. *Ann Pharmacother* 1994; 28 (5 Suppl): S11-4.
66. Sparreboom A, van Tellingen O, Nooijen WJ, Beijnen JH. Nonlinear pharmacokinetics of paclitaxel in mice results from the pharmaceutical vehicle Cremophor EL. *Cancer Res* 1996; 56 (9): 2112-5.
67. ten Tije A, Verweij J, Loos W, Sparreboom A. Pharmacological Effects of Formulation Vehicles. *Clinical Pharmacokinetics* 2003; 42 (7): 665-85.
68. van Tellingen O, Huizing MT, Panday VR, Schellens JH, Nooijen WJ, Beijnen JH. Cremophor EL causes (pseudo-) non-linear pharmacokinetics of paclitaxel in patients. *Br J Cancer* 1999; 81 (2): 330-5.
69. Weiss RB, Donehower RC, Wiernik PH, Ohnuma T, Gralla RJ, Trump DL, et al. Hypersensitivity reactions from taxol. *J Clin Oncol* 1990; 8 (7): 1263-8.
70. Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (Taxol). *New England Journal of Medicine* 1995; 332 (15): 1004-14.
71. Spencer CM, Faulds D. Paclitaxel. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. *Drugs* 1994; 48 (5): 794-847.
72. Wiernik PH, Schwartz EL, Strauman JJ, Dutcher JP, Lipton RB, Paietta E. Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol. *Cancer Res* 1987; 47 (9): 2486-93.
73. Kumar GN, Walle UK, Bhalla KN, Walle T. Binding of taxol to human plasma, albumin and alpha 1-acid glycoprotein. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993; 80 (3): 337-44.
74. Schiller JH, Storer B, Tutsch K, Arzoomanian R, Alberti D, Feierabend C, et al. Phase I trial of 3-hour infusion of paclitaxel with or without granulocyte colony-stimulating factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12 (2): 241-8.
75. Rizzo J, Riley C, von Hoff D, Kuhn J, Phillips J, Brown T. Analysis of anticancer drugs in biological fluids: determination of taxol with application to clinical pharmacokinetics. *J Pharm Biomed Anal* 1990; 8 (2): 159-64.
76. Edward Chu and Vincent T. DeVita J. Chemotherapeutic and Biologic Drugs - Paclitaxel. In: Edward Chu and Vincent T. DeVita J, editor. *Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual*: Jones and Bartlett; 2008. p. 282-86.

77. Essayan DM, Kagey-Sobotka A, Colarusso PJ, Lichtenstein LM, Ozols RF, King ED. Successful parenteral desensitization to paclitaxel. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97 (1 Pt 1): 42-6.
78. Marupudi NI, Han JE, Li KW, Renard VM, Tyler BM, Brem H. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. *Expert Opin Drug Saf* 2007; 6 (5): 609-21.
79. Lang PA, Huober J, Bachmann C, Kempe DS, Sobiesiak M, Akel A, et al. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel. *Cell Physiol Biochem* 2006; 18 (1-3): 151-64.
80. Gadducci A, Gargini A, Palla E, Fanucchi A, Genazzani AR. Neutropenic enterocolitis in an advanced epithelial ovarian cancer patient treated with paclitaxel/platinum-based chemotherapy: a case report and review of the literature. *Anticancer Res* 2005; 25 (3c): 2509-13.
81. Mielke S, Sparreboom A, Mross K. Peripheral neuropathy: a persisting challenge in paclitaxel-based regimes. *Eur J Cancer* 2006; 42 (1): 24-30.
82. Mielke S, Sparreboom A, Steinberg SM, Gelderblom H, Unger C, Behringer D, et al. Association of Paclitaxel pharmacokinetics with the development of peripheral neuropathy in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11 (13): 4843-50.
83. Sahenk Z, Barohn R, New P, Mendell JR. Taxol neuropathy. Electrodiagnostic and sural nerve biopsy findings. *Arch Neurol* 1994; 51 (7): 726-9.
84. Scripture CD, Figg WD, Sparreboom A. Peripheral neuropathy induced by paclitaxel: recent insights and future perspectives. *Curr Neuropharmacol* 2006; 4 (2): 165-72.
85. Mielke S, Mross K, Gerds TA, Schmidt A, Wasch R, Berger DP, et al. Comparative neurotoxicity of weekly non-break paclitaxel infusions over 1 versus 3 h. *Anticancer Drugs* 2003; 14 (10): 785-92.
86. Sindrup SH, Jensen TS. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain* 1999; 83 (3): 389-400.
87. Rowinsky EK, McGuire WP, Guarnieri T, Fisherman JS, Christian MC, Donehower RC. Cardiac disturbances during the administration of taxol. *J Clin Oncol* 1991; 9 (9): 1704-12.
88. Rowinsky EK, Gilbert MR, McGuire WP, Noe DA, Grochow LB, Forastiere AA, et al. Sequences of taxol and cisplatin: a phase I and pharmacologic study. *J Clin Oncol* 1991; 9 (9): 1692-703.
89. Minotti G, Saponiero A, Licata S, Menna P, Calafiore AM, Teodori G, et al. Paclitaxel and docetaxel enhance the metabolism of doxorubicin to toxic species in human myocardium. *Clin Cancer Res* 2001; 7 (6): 1511-5.
90. Garrison JA, McCune JS, Livingston RB, Linden HM, Gralow JR, Ellis GK, et al. Myalgias and arthralgias associated with paclitaxel. *Oncology (Williston Park)* 2003; 17 (2): 271-7; discussion 81-2, 86-8.
91. Kumari P, Ghosh B, Biswas S. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *J Drug Target* 2015: 1-13.
92. Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* 1997; 154 (2): 123-40.
93. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000; 11 (4): 265-83.
94. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5 (3): 219-34.

95. Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer* 2008; 8 (6): 473-80.
96. Torchilin VP. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci* 2000; 11 Suppl 2: S81-91.
97. Torchilin VP. Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. *Handb Exp Pharmacol* 2010; (197): 3-53.
98. Greish K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *J Drug Target* 2007; 15 (7-8): 457-64.
99. Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71 (3): 409-19.
100. Parveen S, Misra R, Sahoo SK. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine* 2012; 8 (2): 147-66.
101. Torchilin V. Antibody-modified liposomes for cancer chemotherapy. *Expert Opin Drug Deliv* 2008; 5 (9): 1003-25.
102. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2007; 2 (12): 751-60.
103. Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14 (5): 1310-6.
104. Ma P, Mumper RJ. Paclitaxel Nano-Delivery Systems: A Comprehensive Review. *J Nanomed Nanotechnol* 2013; 4 (2): 1000164.
105. Onoue S, Yamada S, Chan HK. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 1025-37.
106. Perez-Herrero E, Fernandez-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 93: 52-79.
107. Bangham AD. PHYSICAL STRUCTURE AND BEHAVIOR OF LIPIDS AND LIPID ENZYMES. *Adv Lipid Res* 1963; 1: 65-104.
108. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965; 13 (1): 238-52.
109. Sessa G, Weissmann G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res* 1968; 9 (3): 310-8.
110. Sessa G, Weissmann G. Incorporation of lysozyme into liposomes a model for structure-linked latency. *J Biol Chem* 1970; 245 (13): 3295-301.
111. Gregoriadis G. The Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine. *N Engl J Med* 1976; 295 (13): 704-10.
112. Gregoriadis G, Leathwood PD, Ryman BE. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Letters* 1971; 14 (2): 95-99.
113. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4 (2): 145-60.
114. Lasic DD. Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol* 1998; 16 (7): 307-21.
115. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine* 2015; 10: 975-99.
116. Lasic DD, Needham D. The "Stealth" Liposome: A Prototypical Biomaterial. *Chem Rev* 1995; 95 (8): 2601-28.
117. Cox DLNaMM. Membranas Biológicas e Transporte. In: Lehninger PdBd, editor. 2014. p. 301.39.
118. Vemuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv* 1995; 70 (2): 95-111.
119. Cox DLNaMM. Lipídios. In: Lehninger PdBd, editor. 2014. p. 301.39.

120. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 10 (2): 81-98.
121. Taylor KMG, Morris RM. Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes. *Thermochimica Acta* 1995; 248: 289-301.
122. Maherani B, Arab-Tehrany E, R Mozafari M, Gaiani C, Linder M. Liposomes: a review of manufacturing techniques and targeting strategies. *Current Nanoscience* 2011; 7 (3): 436-52.
123. Ercole F, Whittaker MR, Quinn JF, Davis TP. Cholesterol Modified Self-Assemblies and Their Application to Nanomedicine. *Biomacromolecules* 2015; 16 (7): 1886-914.
124. Briuglia ML, Rotella C, McFarlane A, Lamprou DA. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Deliv Transl Res* 2015; 5 (3): 231-42.
125. Coderch L, Fonollosa J, De Pera M, Estelrich J, De La Maza A, Parra JL. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption. *J Control Release* 2000; 68 (1): 85-95.
126. Lasic DD. The mechanism of vesicle formation. *Biochem J* 1988; 256 (1): 1-11.
127. Santos NC, Castanho MA. Lipossomas: a bala mágica acertou? *Química nova* 2002; 25 (6B): 1181-85.
128. Edwards KA, Baeumner AJ. Analysis of liposomes. *Talanta* 2006; 68 (5): 1432-41.
129. Lopes SCdA, Giuberti CdS, Rocha TGR, Ferreira DdS, Leite EA, Oliveira MC. Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs 2013 2013-05-09.
130. Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine (Lond)* 2013; 8 (9): 1509-28.
131. Pagano RE, Weinstein JN. Interactions of liposomes with mammalian cells. *Annu Rev Biophys Bioeng* 1978; 7: 435-68.
132. Huang RT, Wahn K, Klenk HD, Rott R. Fusion between cell membrane and liposomes containing the glycoproteins of influenza virus. *Virology* 1980; 104 (2): 294-302.
133. Payne NI, Timmins P, Ambrose CV, Ward MD, Ridgway F. Proliposomes: a novel solution to an old problem. *J Pharm Sci* 1986; 75 (4): 325-9.
134. Payne NI, Browning I, Hynes CA. Characterization of proliposomes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1986; 75 (4): 330-33.
135. Janga KY, Jukanti R, Velpula A, Sunkavalli S, Bandari S, Kandadi P, et al. Bioavailability enhancement of zaleplon via proliposomes: Role of surface charge. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; 80 (2): 347-57.
136. Song K-H, Chung S-J, Shim C-K. Enhanced intestinal absorption of salmon calcitonin (sCT) from proliposomes containing bile salts. *Journal of Controlled Release* 2005; 106 (3): 298-308.
137. Bobbala SK, Veerareddy PR. Formulation, evaluation, and pharmacokinetics of isradipine proliposomes for oral delivery. *J Liposome Res* 2012; 22 (4): 285-94.
138. Basavaraj S, Betageri GV. Improved oral delivery of resveratrol using proliposomal formulation: investigation of various factors contributing to prolonged absorption of unmetabolized resveratrol. *Expert Opin Drug Deliv* 2014; 11 (4): 493-503.
139. Velpula A, Jukanti R, Janga KY, Sunkavalli S, Bandari S, Kandadi P, et al. Proliposome powders for enhanced intestinal absorption and bioavailability of raloxifene hydrochloride: effect of surface charge. *Drug Dev Ind Pharm* 2013; 39 (12): 1895-906.
140. Aundhia C, Raval J, Patel M, Shah N, Chauhan S, Sailor G, et al. Spray Drying in the Pharmaceutical Industry—A Review. *IAJPR* 2011; 1 (6): 125-38.

141. Rojanarat W, Changsan N, Tawithong E, Pinsuwan S, Chan HK, Srichana T. Isoniazid proliposome powders for inhalation-preparation, characterization and cell culture studies. *Int J Mol Sci* 2011; 12 (7): 4414-34.
142. Rojanarat W, Nakpheng T, Thawithong E, Yanyium N, Srichana T. Levofloxacin-proliposomes: opportunities for use in lung tuberculosis. *Pharmaceutics* 2012; 4 (3): 385-412.
143. Gangishetty H, Eedara BB, Bandari S. Development of ketoprofen loaded proliposomal powders for improved gastric absorption and gastric tolerance: in vitro and in situ evaluation. *Pharm Dev Technol* 2015; 20 (6): 641-51.
144. Vanic Z, Planinsek O, Skalko-Basnet N, Tho I. Tablets of pre-liposomes govern in situ formation of liposomes: concept and potential of the novel drug delivery system. *Eur J Pharm Biopharm* 2014; 88 (2): 443-54.
145. Yanamandra S, Venkatesan N, Kadajji VG, Wang Z, Issar M, Betageri GV. Proliposomes as a drug delivery system to decrease the hepatic first-pass metabolism: case study using a model drug. *Eur J Pharm Sci* 2014; 64: 26-36.
146. Zidan AS, Spinks CB, Habib MJ, Khan MA. Formulation and transport properties of tenofovir loaded liposomes through Caco-2 cell model. *J Liposome Res* 2013; 23 (4): 318-26.
147. Tantisripreecha C, Jaturanpinyo M, Panyarachun B, Sarisuta N. Development of delayed-release proliposomes tablets for oral protein drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 2012; 38 (6): 718-27.
148. Agnihotri SA, Soppimath KS, Betageri GV. Controlled release application of multilamellar vesicles: a novel drug delivery approach. *Drug Deliv* 2010; 17 (2): 92-101.
149. Xu H, He L, Nie S, Guan J, Zhang X, Yang X, et al. Optimized preparation of vinpocetine proliposomes by a novel method and in vivo evaluation of its pharmacokinetics in New Zealand rabbits. *J Control Release* 2009; 140 (1): 61-8.
150. Shah NM, Parikh J, Namdeo A, Subramanian N, Bhowmick S. Preparation, characterization and in vivo studies of proliposomes containing Cyclosporine A. *J Nanosci Nanotechnol* 2006; 6 (9-10): 2967-73.
151. Potluri P, Betageri GV. Mixed-micellar proliposomal systems for enhanced oral delivery of progesterone. *Drug Deliv* 2006; 13 (3): 227-32.
152. Misra A, Jinturkar K, Patel D, Lalani J, Chougule M. Recent advances in liposomal dry powder formulations: preparation and evaluation. *Expert Opin Drug Deliv* 2009; 6 (1): 71-89.
153. Willis L, Hayes D, Jr., Mansour HM. Therapeutic liposomal dry powder inhalation aerosols for targeted lung delivery. *Lung* 2012; 190 (3): 251-62.
154. Patil-Gadhe A, Pokharkar V. Single step spray drying method to develop proliposomes for inhalation: a systematic study based on quality by design approach. *Pulm Pharmacol Ther* 2014; 27 (2): 197-207.
155. Rojanarat W, Nakpheng T, Thawithong E, Yanyium N, Srichana T. Inhaled pyrazinamide proliposome for targeting alveolar macrophages. *Drug Deliv* 2012; 19 (7): 334-45.
156. Jahn A, Song CK, Balakrishnan P, Hong SS, Lee JH, Chung SJ, et al. AAPE proliposomes for topical atopic dermatitis treatment. *J Microencapsul* 2014; 31 (8): 768-73.
157. Ning MY, Guo YZ, Pan HZ, Yu HM, Gu ZW. Preparation and evaluation of proliposomes containing clotrimazole. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2005; 53 (6): 620-4.

158. Wang D, Kong L, Wang J, He X, Li X, Xiao Y. Polymyxin E sulfate-loaded liposome for intravenous use: preparation, lyophilization, and toxicity assessment in vivo. *PDA J Pharm Sci Technol* 2009; 63 (2): 159-67.
159. Deo MR, Sant VP, Parekh SR, Khopade AJ, Banakar UV. Proliposome-based transdermal delivery of levonorgestrel. *J Biomater Appl* 1997; 12 (1): 77-88.
160. AmBisome. Disponível em <https://www.ambisome.com/>. [Acedido a 22/08/2015].
161. Anfotericina B lipossômica. Disponível em http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=291&tipo_doc=fi [Acedido a 22/07/2015].
162. Wang S, Ye T, Yang B, Yi X, Yao H. 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin proliposomes with a novel preparation method: optimized formulation, characterization and in-vivo evaluation. *Drug Dev Ind Pharm* 2013; 39 (2): 393-401.
163. Alkan-Onyuksel H, Son K. Mixed micelles as proliposomes for the solubilization of teniposide. *Pharm Res* 1992; 9 (12): 1556-62.
164. Junping W, Maitani Y, Takayama K, Nagai T. In vivo evaluation of doxorubicin carried with long circulating and remote loading proliposome. *Int J Pharm* 2000; 203 (1-2): 61-9.
165. Wang JP, Maitani Y, Takayama K, Nagai T. Pharmacokinetics and antitumor effect of doxorubicin carried by stealth and remote loading proliposome. *Pharm Res* 2000; 17 (7): 782-7.
166. Park JM, Ahn BN, Yoon EJ, Lee MG, Shim CK, Kim CK. The pharmacokinetics of methotrexate after intravenous administration of methotrexate-loaded proliposomes to rats. *Biopharm Drug Dispos* 1994; 15 (5): 391-407.
167. Song KH, Chung SJ, Shim CK. Preparation and evaluation of proliposomes containing salmon calcitonin. *J Control Release* 2002; 84 (1-2): 27-37.
168. Liapis AlaB, R. . Freeze Drying. In: Mujumdar AS, Editor, editor. *Handbook of Industrial Drying*: CRC Press; 2006. p. 257-80.
169. Atkins PaDP, J. Phase Equilibria. In: Press OU, editor. *Physical Chemistry for the Life Sciences* 2006.
170. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58 (15): 1688-713.
171. Read EK, Shah RB, Riley BS, Park JT, Brorson KA, Rathore AS. Process analytical technology (PAT) for biopharmaceutical products: Part II. Concepts and applications. *Biotechnol Bioeng* 2010; 105 (2): 285-95.
172. Advantage 2.0 Bench Top Lyophilizer. Disponível em http://www.spscientific.com/Products/Freeze_Dryers/_Lyophilizers/VirTis/Bench_Top_Lyophilizers/AdVantage_2_0_BenchTop_Freeze_Dryer/ [Acedido em 07/08/15].
173. Cal K, Sollohub K. Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. *J Pharm Sci* 2010; 99 (2): 575-86.
174. Sollohub K, Cal K. Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. *J Pharm Sci* 2010; 99 (2): 587-97.
175. Heng D, Lee SH, Ng WK, Tan RB. The nano spray dryer B-90. *Expert Opin Drug Deliv* 2011; 8 (7): 965-72.
176. Schmid K, Arpagaus C, Friess W. Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for pharmaceutical applications. *Pharm Dev Technol* 2011; 16 (4): 287-94.
177. Nano Spray Dryer B90. Disponível em <http://www.buchi.com/en/products/spray-drying-and-encapsulation/nano-spray-dryer-b-90> [Acedido em 07/07/15].

178. Lee SH, Heng D, Ng WK, Chan HK, Tan RB. Nano spray drying: a novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *Int J Pharm* 2011; 403 (1-2): 192-200.
179. Nano particle scraper. Disponível em <http://shop.buchi.com/en-US/Product/ItemDetail/11055338> [Acedido em 03/07/15].
180. Malvern. Dynamic light scattering - An introduction in 30 minutes [11/09/2015]. Available from: <http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction.aspx>.
181. DLS. Disponível em <http://www.quantachrome.co.uk/en/dynamic-light-scattering.asp> [acedido em 12/08/15].
182. Liu Z, Chen K, Davis C, Sherlock S, Cao Q, Chen X, et al. Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. *Cancer research* 2008; 68 (16): 6652-60.
183. Nara E, Miyashita K, Ota T. Oxidative stability of liposomes prepared from soybean PC, chicken egg PC, and salmon egg PC. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 61 (10): 1736-8.
184. Mohajel N, Najafabadi AR, Azadmanesh K, Amini M, Vatanara A, Moazeni E, et al. Drying of a plasmid containing formulation: chitosan as a protecting agent. *Daru* 2012; 20 (1): 22.
185. Srinarong P, de Waard H, Frijlink HW, Hinrichs WL. Improved dissolution behavior of lipophilic drugs by solid dispersions: the production process as starting point for formulation considerations. *Expert Opin Drug Deliv* 2011; 8 (9): 1121-40.
186. Salazar J, Muller RH, Moschwitz JP. Performance comparison of two novel combinative particle-size-reduction technologies. *J Pharm Sci* 2013; 102 (5): 1636-49.
187. Saluja V, Amorij JP, Kapteyn JC, de Boer AH, Frijlink HW, Hinrichs WL. A comparison between spray drying and spray freeze drying to produce an influenza subunit vaccine powder for inhalation. *J Control Release* 2010; 144 (2): 127-33.
188. Malvern. Zeta potential - An introduction in 30 minutes. Disponível <http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104ZetaPotentialIntroduction.aspx>. Acedido em [11/09/2015].
189. Cornel J, Kidambi P, Mazzotti M. Precipitation and Transformation of the Three Polymorphs of d-Mannitol. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2010; 49 (12): 5854-62.
190. Malvern. Zeta potential - An introduction in 30 minutes [11/09/2015]. Available from: <http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104ZetaPotentialIntroduction.aspx>.
191. Mishra PR, Al Shaal L, Müller RH, Keck CM. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International journal of pharmaceutics* 2009; 371 (1): 182-89.
192. Fanciullino R, Ciccolini J. Liposome-encapsulated anticancer drugs: still waiting for the magic bullet? *Curr Med Chem* 2009; 16 (33): 4361-71.

ANEXO I

Ficha de dados do produto LIPOID E80, disponibilizada pela empresa LIPOID, a qual gentilmente cedeu o produto para este trabalho.



LIPOID E 80

Description Egg phospholipids with 80 % phosphatidylcholine

Art. No. 510300
EINECS-No. 297-639-2
CAS-No. 93685-90-6

Composition

Phospholipids		
Phosphatidylcholine + LPC	[%]	80.0 - 85.0
Phosphatidylethanolamine	[%]	7.0 - 9.5

Typical fatty acid composition in % to total fatty acids

Palmitic acid	28 - 34
Stearic acid	12 - 15
Oleic acid	26 - 30
Linoleic acid	13 - 18
Linolenic acids	n.m.t. 1.0
Polyunsaturated fatty acids C 20 and higher	6 - 10

Identity

Thin-layer chromatography complies

Purity

Non-polar lipids		
Triglycerides	[%]	n.m.t. 3.0
Cholesterol	[%]	n.m.t. 1.0
D,L- α -tocopherol	[%]	0.05 - 0.1
Free fatty acids	[%]	n.m.t. 0.05
Phosphorus	[%]	3.7 - 4.1
Acid value		7 - 10
Iodine value		65 - 69
Peroxide value		n.m.t. 3
Aflatoxin B1	[ppb]	n.m.t. 2
Aflatoxins B1, B2, G1, G2	[ppb]	n.m.t. 4
Water	[%]	n.m.t. 2.0
Particle test		complies with method PM1
Residual solvents		
Ethanol	[%]	n.m.t. 2.0
Heavy metals	[mg/kg]	n.m.t. 10

Lipoid GmbH, Frigenstraße 4, D-67065 Ludwigshafen, Germany

www.lipoid.com
www.lipoid-kosmetik.com

Document D- 510300-02 of 23.01.2014
Supersedes D- 103 of 01.02.2008

Page 1 of 2

Physical Data

Consistency	coarse agglomerates
Colour	yellowish - yellow
Solubility (5 % solution)	
Water	dispersible 20 °C
Fat	soluble 60 °C
Chlorinated hydrocarbons	soluble 20 °C
Ethanol	soluble 20 °C

Endotoxins

Endotoxins	[EU/g]	n.m.t. 6
------------	--------	----------

Bacteriological Data

Total aerobic microbial count (TAMC)	[CFU/g]	n.m.t. 100
Yeasts	[CFU/g]	n.m.t. 10
Moulds	[CFU/g]	n.m.t. 10
Escherichia coli	[/10 g]	absent
Salmonella	[/10 g]	absent
Staphylococcus aureus	[/10 g]	absent
Pseudomonas aeruginosa	[/10 g]	absent

Ingredients

Egg phospholipids, D,L- α -tocopherol

Packaging

Standard packaging 5 kg in double PE-bag

Storage Conditions

Recommended storage; In closed containers at - 20 \pm 5 °C. To avoid a negative impact on the product quality by humidity, a cooled product unit must not be opened without prior conditioning to ambient temperatures. Close opened containers immediately.

n.m.t. = not more than

The product data sheet provides the typical composition. Not all parameters mentioned above are part of the certificate of analysis.

All data and recommendations as well as formulations made herein are based on our present state of knowledge. We disclaim all liability on risks or formulae that may result from the use of our products, including improper and illicit use.

Lipoid GmbH, Frigenstraße 4, D-67065 Ludwigshafen, Germany

www.lipoid.com
www.lipoid-kosmetik.com

Document D- 510300-02 of 23.01.2014
Supersedes D- 103 of 01.02.2008

Page 2 of 2

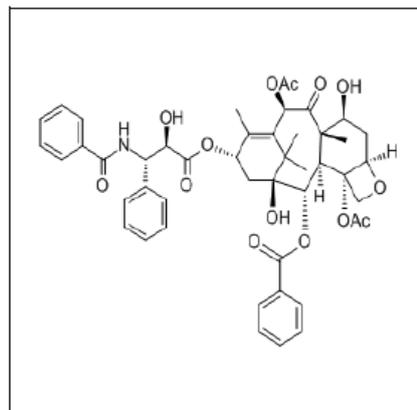
ANEXO II

Ficha de dados do paclitaxel usado neste trabalho, obtido da MedChem Express.



Product Data Sheet

Product Name: Paclitaxel
CAS No.: 33069-62-4
Cat. No.: HY-B0015
MWt: 853.91
Formula: C₄₇H₅₁NO₁₄
Purity : >98%
Solubility: DMSO 100 mg/ml Ethanol 25 mg/ml



Mechanisms: Pathways:Cell Cycle/DNA Damage; Target:Microtubule/Tubulin
Pathways:Antibody-drug conjugates/ADCs Related; Target:ADCs
cytotoxin

Biological Activity:

Paclitaxel is a microtubule polymer stabilizer with IC₅₀ of 0.1 pM in human endothelial cells.

IC₅₀ Value: 0.1 pM

Target: microtubule

in vitro: Paclitaxel inhibits non-endothelial type human cells at 10⁴ - to 10⁵ -fold higher concentrations, with IC₅₀ of 1 nM-10 nM. The selectivity of Paclitaxel inhibition of cell proliferation is also species specific, as mouse ECs are not sensitive to Paclitaxel at ultra low concentrations. Inhibition of human ECs by Paclitaxel at ultra low concentrations does not affect the cellular microtubule structure, and the treated cells do not show G₂/M cell cycle arrest and apoptosis, suggesting a novel but as yet unidentified mechanism of action. In an in vitro angiogenesis assay, Paclitaxel at ultra low concentrations blocks human ECs from forming sprouts and tubes in the three-dimensional fibrin matrix. In the presence of SMF, the effic...
with paclitaxel treatment in ovarian cancer patients: a prospective phase II GINECO trial. Support Care Cancer. 2013 Feb 19.

[2]. Pan Z, Gollahon L. Paclitaxel attenuates Bcl-2 resistance to apoptosis in breast cancer cells through an endoplasmic reticulum-mediated calcium release in a dosage dependent manner. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Feb 13. pii: S0006-291X(13)00259-3.

[3]. Habib S, Delourme J, Dhalluin X, et al. Bevacizumab and weekly paclitaxel for non-squamous non small cell lung cancer patients: A retrospective study. Lung Cancer. 2013 Feb 13. pii: S0169-5002(13)00025-1.

[4]. Park SJ, Wu CH, Gordon JD, et al. Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis. J Biol Chem. 2004 Dec 3;279(49):51057-67. Epub 2004 Sep 27.

[5]. Rao S, He L, Chakravar...

Caution: Not fully tested. For research purposes only

Medchemexpress LLC

www.medchemexpress.com

18 Wilkinson Way, Princeton, NJ 08540, USA

Tel: 609-228-6898 Fax: 609-228-5909 Email: info@medchemexpress.com Web: www.medchemexpress.com

ANEXO III

Ficha de dados de segurança do paclitaxel usado neste trabalho, obtido da MedChem Express.



Version 2.1 Revision Date: 07/08/2013
Print Date: 02/10/2014

MSDS

1 Composition

Product Name: Paclitaxel
Chemical Name:
Benzenepropanoic acid, β -(benzoylamino)- α -hydroxy-, (2aR,4S,4aS,6R,9S,11S,12S,12aR,12bS)-6,12b-bis(acetyloxy)-12-(benzyloxy)-2a,3,4,4a,5,6,9,10,11,12,12a,12b-dodecahydro-4,11-dihydroxy-4a,8,13,13-tetramethyl-5-oxo-7,11-methano-1H-cyclodeca[3,4]benz[1,2-b]oxet-9-yl ester, (α R, β S)-
CAS No.: 33089-62-4
Appearance: White to yellow(solid)
Formula: C₄₇H₅₁NO₁₄
Solubility: DMSO 100 mg/ml Ethanol 25 mg/ml

2 Handling and Storage

HANDLING- Do not breathe dust. Avoid contact with eyes, skin, and clothing. Avoid prolonged or repeated exposure.
STORAGE- Please store the product under the recommended conditions in the Certificate of Analysis.

3 Stability and Reactivity

STABILITY- Stable under normal handling conditions.
MATERIALS TO AVOID- Strong oxidizing agents.
REACTIVITY- May emit toxic gasses like Carbon monoxide, Carbon dioxide, Nitrogen oxides upon thermal decomposition.

4 Hazards Identification

Special indication of hazards to humans and the environment. Irritating to eyes, respiratory system and skin.

SKIN CONTACT- In case of contact, immediately wash skin with soap and copious amounts of water.

EYE CONTACT- In case of contact, immediately flush eyes with copious amounts of water for at least 15 minutes.

INGESTION- If swallowed, wash out mouth with water provided person is conscious. Call a physician.

6 Fire Fighting Measures

EXTINGUISHING MEDIA
Water spray- Carbon dioxide, dry chemical powder, or appropriate foam.

SPECIAL RISKS
Specific Hazard(s)- Emits toxic fumes under fire conditions.

SPECIAL PROTECTIVE EQUIPMENT FOR FIREFIGHTERS
Wear self-contained breathing apparatus and protective clothing to prevent contact with skin and eyes.

7 Accident Release Measure

PROCEDURE(S) OF PERSONAL PRECAUTION(S)-Wear respirator, chemical safety goggles, rubber boots, and heavy rubber gloves.

METHODS FOR CLEANING UP- Sweep up, place in a bag and hold for waste disposal. Avoid raising dust. Ventilate area and wash spill site after material pickup is complete.

8 Accident Release Measure

No data available.

9 Toxicological Information

To the best of our knowledge, the chemical, physical, and toxicological properties have not been thoroughly investigated.

10 Regulatory Information

CLASSIFICATION- Substance not yet fully tested.
SAFETY PHASES- 26-36 (In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protective clothing.) 36/37/38 (Irritating to eyes, respiratory system and skin.)

11 Disposal Considerations

As specific country, federal, state and local environmental regulations vary and change frequently we suggest you contact a local, authorized waste disposal contractor for adequate disposal.

12 Transport Information

RID/ADR- Non-hazardous for road transport.

IMDG- Non-hazardous for sea transport.

IATA - Non-hazardous for air transport.

purport to be all inclusive and shall be used only as a guide. The information in this document is based on the present state of our knowledge and is applicable to the product with regard to appropriate safety precautions. It does not represent any guarantee of the properties of the product. Medchemexpress LLC shall not be held liable for any damage resulting from handling or from contact with the above product.

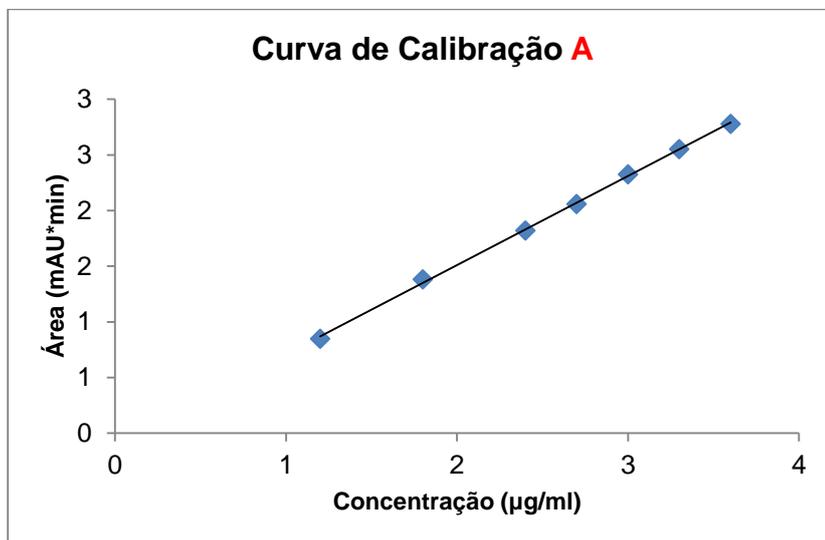
Caution: Not fully tested. For research purposes only

Medchemexpress LLC
www.medchemexpress.com

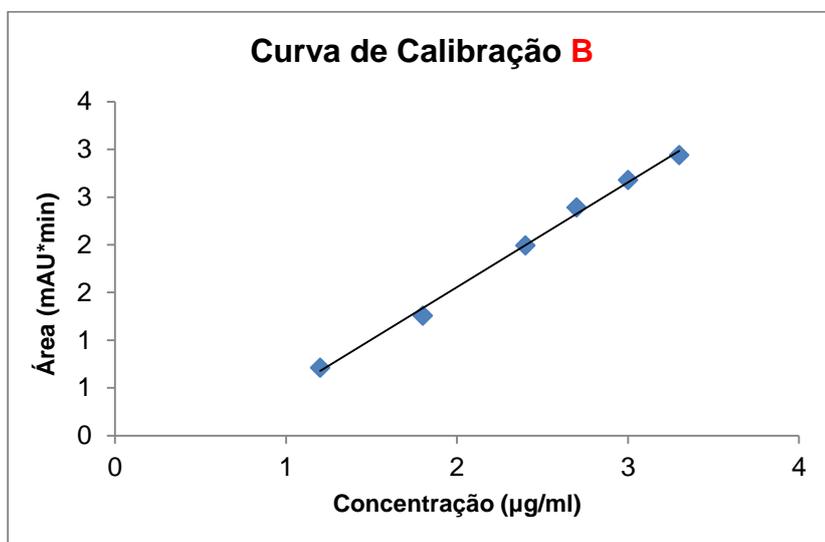
18 Wilkinson Way, Princeton, NJ 08540, USA
Tel: 609-228-6898 Fax: 609-228-5909 Email: info@medchemexpress.com Web: www.medchemexpress.com

Anexo III

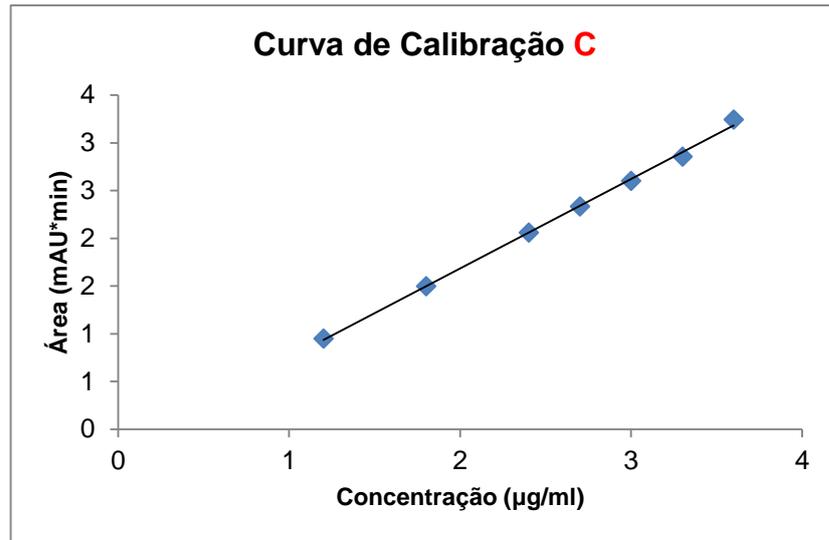
Curvas de calibração



Representação gráfica da curva de calibração para o Paclitaxel. Equação da reta: $y = 0,8005x - 0,0902$; $R^2 = 0,9993$ e $SQD = 0,0019$.



Representação gráfica da curva de calibração para o Paclitaxel. Equação da reta: $y = 1,0982x - 0,6406$; $R^2 = 0,9961$ e $SQD = 0,014$.



Representação gráfica da curva de calibração para o Paclitaxel. Equação da reta: $y = 0,9367x - 0,1883$; $R^2 = 0,9982$ e $SQD = 0,0067$.

Anexo IV

Termograma do manitol

