

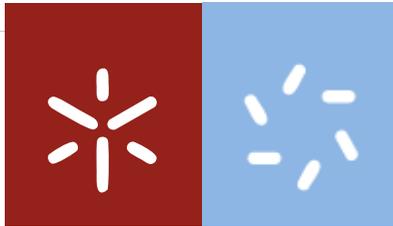


**Desenvolvimento de uma formulação
lipossomal para entrega de um fármaco
anticancerígeno**

Maria Eduarda Bárbara da Rocha

Universidade do Minho
Escola de Ciências





Universidade do Minho

Escola de Ciências

Maria Eduarda Bárbara da Rocha

**Desenvolvimento de uma formulação
lipossomal para entrega de um fármaco
anticancerígeno**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Ciências – Formação Contínua de Professores,
área de Especialização em Biologia e Geologia

Trabalho Efetuado sob a orientação da

Doutora Marlene Susana Dionísio Lúcio

Coorientação da

Prof. Doutora Maria Elisabete Cunha Dias Real Oliveira

e coorientação da

Doutora Andreia Ferreira de Castro Gomes

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DA REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO:

Nome: Maria Eduarda Bárbara da Rocha

Correio eletrónico: barbaraeduarda.pt@gmail.com

Tel./Tlm: 914773663

Número do Bilhete de Identidade: 11876754

Título da dissertação: Desenvolvimento de uma formulação lipossomal para entrega de um fármaco anticancerígeno

Ano de conclusão: 2014

Orientador(es): Doutora Marlene Susana Dionísio Lúcio
Coorientador(es): Profª. Doutora Maria Elisabete Cunha Dias Real Oliveira
Doutora Andreia Ferreira de Castro Gomes

Designação do Mestrado: Mestrado em Ciências – Formação Contínua de Professores

Área de Especialização: Biologia e Geologia

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

Universidade do Minho, __/__/____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação surge como um desejo de adquirir novos conhecimentos e atualizar conhecimentos de práticas laboratoriais que adquiri há mais de 10 anos, aquando da minha licenciatura. Este objetivo pessoal não representa apenas o resultado de horas de trabalho laboratorial, de estudo e reflexão mas também um objetivo académico a que me propus e que não seria possível alcançar sem a ajuda de um número considerável de pessoas.

À Doutora Marlene Susana Dionísio Lúcio, orientadora principal, quero expressar o meu profundo reconhecimento pela sua orientação científica e revisão crítica desta dissertação. Desejo também manifestar o meu agradecimento pela sua constante disponibilidade, apoio e confiança em mim depositada, bem como pela sua partilha de conhecimento e momentos de descontração que permitiram criar as condições indispensáveis para a realização deste trabalho.

À minha coorientadora, Prof. Doutora Maria Elisabete C. D. Real Oliveira quero expressar o meu apreço pelas discussões altamente proveitosas e a partilha de conhecimento, bem como pela sua constante disponibilidade e contínuas palavras de estímulo e apoio.

À minha coorientadora, Doutora Andreia F. C. Gomes que me proporcionou esta valiosa oportunidade de aprendizagem e que me recebeu tão bem. Bem como, a partilha de conhecimento.

Aos colegas de laboratório, em especial José Ramos, Ann Van Dijck e Ana Oliveira pelos conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho que me permitiram ultrapassar alguns obstáculos.

A todos aqueles, que de uma forma directa ou indirecta, tornaram possível a concretização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

TITLE: Development of a liposomal formulation for the delivery of an anticancer drug.

ABSTRACT

The main purpose of this project was the development and characterization of an anticancer liposomal formulation. This carrier system, with a new and promising composition, consists of lipid vesicles encapsulated with doxorubicin (DOX).

DOX is considered one of the main “first-line” anticancer drugs for a broad spectrum of tumor types, but this drug has the disadvantage of being toxic for other healthy organs and tissues. The use of liposomes as carriers of DOX is thus very appealing to counteract this disadvantage and protect the healthy tissues from contact with the DOX toxicity. Despite several liposomal formulations were already proposed for the delivery of DOX, most of them use active loading methods. These loading methods have however the disadvantage of having big amounts of DOX encapsulated with the formation of dimers for which the therapeutic value is yet to be proved.

Therefore in this work it is proposed a carrier system made of Dioctadecyldimethylammonium Bromide (DODAB) and 1-oleoyl-rac-glycerol (Monoolein (MO)) with a ratio of (1:2) because it was previously studied that this system has the potentiality of encapsulating drugs, not only at the DODAB enriched bilayer level, but also at the inverted non-lamellar MO-enriched phases at the vesicle interior. Three methods of DOX passive encapsulation in the formulation DODAB:MO (1:2) were tested. The method selected was the one where DOX was directly mixed with the two lipids, before the lipid film formation, as this achieved the highest stability of the formulations produced (tested by measuring the size and zeta potential of the liposomes overtime) and the highest DOX encapsulation efficiency (EE) (evaluated through UV/Vis spectrophotometry). EE studies revealed high encapsulation values of DOX (86,95%) turning the developed formulation in a very promising nanocarrier system for DOX. The study of the partition coefficient of DOX has confirmed that it is highly distributed in the lipid formulation. The biophysical effects of DOX in the formulation indicated an increase in the cooperativity of the phase transition confirming DOX distribution at the membrane level. Furthermore, thermodynamical parameters of DOX partitioning indicated that the drug distribution in the lipid formulation occurred spontaneously.

Cytotoxicity assays were also performed in a cancer cell line and it was concluded that the formulation with DOX encapsulated in DODAB:MO (1:2) has a better cytostatic effect than the free drug, confirming the potentiality of the developed formulation to be used in cancer treatment.

TÍTULO: Desenvolvimento de uma formulação lipossomal para a entrega de um fármaco anticancerígeno.

RESUMO

O principal objetivo deste projeto focou-se no desenvolvimento e caracterização de uma formulação lipossomal para a entrega de um fármaco anticancerígeno. Este sistema veiculador, com uma composição nova e promissora, é constituído por vesículas de lípidos que permitem a encapsulação da doxorubicina (DOX).

A DOX é considerada um dos principais fármacos anticancerígenos no tratamento de primeira linha para um amplo espectro de tumores, mas tem a desvantagem de ser tóxica para outros órgãos e tecidos saudáveis. O uso de lipossomas como transportadores de DOX pode contrariar esta desvantagem e proteger os tecidos saudáveis do contato com a toxicidade da DOX. Apesar de várias formulações lipossomais já terem sido propostas para a entrega de DOX, a maioria destas formulações usa métodos de encapsulação ativos. Estes métodos de encapsulação levam à encapsulação de grandes quantidades de DOX com a consequente formação de dímeros para os quais o valor terapêutico ainda está para ser provado.

A escolha do sistema veiculador de brometo de dioctadecildimetilamónio (DODAB) e 1-oleoil-rac-glicerol (monoleína (MO)) com uma proporção de (1:2), teve em conta o facto de estudos anteriores relatarem a existência de uma fase lamelar, rica em DODAB, e de uma fase não lamelar invertida, rica em MO, que proporciona a encapsulação do fármaco, não só ao nível da bicamada, mas também no interior das vesículas lipídicas. Este projeto focou-se em escolher, de entre três métodos de encapsulação passiva do fármaco na formulação DODAB:MO (1:2), o que obtivesse maior estabilidade, através da medição do tamanho e do potencial zeta dos lipossomas ao longo do tempo, e maior eficiência de encapsulação da DOX, através de doseamento por espectrofotometria UV/Vis. No método selecionado, a DOX solubilizada em etanol era diretamente misturada com os dois lípidos, antes da formação do filme lipídico, sendo o que originou formulações mais estáveis e com alta eficiência de encapsulação (EE) da DOX (86,95%) mostrando que a formulação desenvolvida é muito promissora para a entrega deste fármaco. O estudo do coeficiente de partição da DOX no sistema formulação lipídica/água confirmou a elevada distribuição de DOX ao nível da formulação. Também foram avaliados os efeitos biofísicos da DOX, tendo-se verificado um aumento da cooperatividade da transição de fase que confirma a elevada distribuição de DOX na formulação. Além disso, foi possível avaliar os parâmetros termodinâmicos da partição de DOX na formulação e verificar que esta ocorreu espontaneamente. Ensaio de citotoxicidade foram também realizados numa linha de células de cancro e concluiu-se que a formulação com DOX encapsulada em DODAB:MO (1:2) tem um melhor efeito citostático do que o fármaco livre confirmando a potencialidade da formulação desenvolvida para ser utilizada no tratamento do cancro.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
ABSTRACT	v
RESUMO	vii
ÍNDICE.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xxvii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xxix
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Cancro e o seu impacto a nível mundial.....	1
1.2. Vantagens da Nanomedicina face à Medicina Clássica.....	2
1.3. Lipossomas como vetores de fármacos anticancerígenos.....	3
1.4. Sistema lipossomal DODAB:MO (1:2).....	14
1.4.1. Composição e polimorfismo lipídico.....	14
1.4.2. Aplicações.....	16
1.5. Doxorrubicina.....	17
1.5.1. Características físico-químicas da doxorrubicina.....	17
1.5.2. Efeitos anticancerígenos e limitações terapêuticas da doxorrubicina.....	19
1.5.2.1. Efeitos anticancerígenos da doxorrubicina	19
1.5.2.2. Limitações terapêuticas da doxorrubicina	20
1.6. Encapsulação da doxorrubicina em lipossomas: encapsulação ativa e passiva.....	23
1.7. Características a manter e a alterar para melhorar a formulação lipossomal com doxorrubicina	26
1.8. Objetivos do trabalho.....	29
1.8.1. Objetivo geral	29
1.8.2. Objetivos específicos	29
CAPÍTULO II.....	31

2. MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1. Materiais	31
2.2. Métodos	32
2.2.1. Preparação das formulações lipossomais DODAB:MO (1:2)	32
2.2.2. Preparação das formulações lipossomais DODAB:MO (1:2) contendo doxorubicina	33
2.2.2.1. Método de hidratação	33
2.2.2.2. Método de incubação	34
2.2.2.3. Método de inclusão direta	35
2.2.3. Métodos de caracterização das formulações lipossomais com e sem doxorubicina	36
2.2.3.1. Análise do tamanho e polidispersão	36
2.2.3.2. Análise da carga superficial	40
2.2.3.3. Análise da estabilidade das formulações em condições de armazenamento	43
2.2.4. Doseamento da doxorubicina por espectroscopia	43
2.2.4.1. Espectroscopia	43
2.2.4.1.1 Espectroscopia de absorção UV-Vis	43
2.2.4.1.2 Espectroscopia de fluorescência	45
2.2.4.1.3 Construção das curvas de calibração da doxorubicina	47
2.2.4.1.4 Curvas de calibração da doxorubicina solubilizada em água ultrapura por espectroscopia de absorção UV-Vis	48
2.2.4.1.5 Curvas de calibração da doxorubicina a pH 5; 7,4 e 9	48
2.2.5. Efeitos biofísicos da doxorubicina ao nível das membranas lipídicas	51
2.2.5.1. Coeficiente de partição membrana/água da doxorubicina	51
2.2.5.1.1 Procedimento experimental da determinação do coeficiente de partição (K_p) da doxorubicina no sistema membrana aquoso	53
2.2.5.1.2 Procedimento experimental da determinação dos parâmetros termodinâmicos da partição (K_p) da doxorubicina no sistema membrana aquoso	53

2.2.5.1.3	Análise do coeficiente de partição (K_p) da doxorubicina no sistema membranar aquoso por espectroscopia derivativa.....	54
2.2.5.2.	Efeito da doxorubicina na microviscosidade e cooperatividade membranares.....	55
2.2.6.	Eficiência de encapsulação da doxorubicina nas formulações lipossomais desenvolvidas	58
2.2.7.	Estudos de citotoxicidade e cálculo da IC_{50} da doxorubicina numa linha de células cancerígenas	60
2.2.7.1.	Cultura celular de MDA-MB-468.....	60
2.2.7.1.1	Subcultura	60
2.2.7.1.2	Contagem das células.....	61
2.2.7.2.	Plaqueamento da microplaca de 96 poços	61
2.2.7.3.	Protocolo do teste colorimétrico da sulforrodamina B (SRB).....	62
2.2.7.4.	Cálculo da IC_{50} da doxorubicina em células MDA-MB-468	64
CAPÍTULO III	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1. Caracterização das formulações lipossomais com e sem doxorubicina.....		65
3.1.1. Método de hidratação		65
3.1.1.1. Tamanho e PDI		65
3.1.1.2. Potencial zeta		66
3.1.2. Método de incubação.....		68
3.1.2.1. Tamanho e PDI		68
3.1.2.2. Potencial zeta		69
3.1.3. Método de inclusão direta.....		70
3.1.3.1. Tamanho e PDI		70
3.1.3.2. Potencial zeta		70
3.1.4. Análise da estabilidade das formulações em condições de armazenamento		71
3.1.4.1. Método de Hidratação.....		71

3.1.4.1.1	Estabilidade por análise do tamanho e PDI ao longo do tempo	71
3.1.4.1.2	Estabilidade por análise do potencial zeta ao longo do tempo	72
3.1.4.2.	Método de incubação	73
3.1.4.2.1	Estabilidade por análise do tamanho e PDI no ao longo do tempo	73
3.1.4.2.2	Estabilidade do potencial zeta no tempo.....	73
3.1.4.3.	Método de inclusão direta.....	74
3.1.4.3.1	Estabilidade por análise do tamanho e PDI ao longo do tempo	74
3.1.4.3.2	Estabilidade por análise do potencial zeta ao longo do tempo	75
3.2.	Doseamento da doxorrubicina por espectroscopia	76
3.2.1.	Curva de calibração da doxorrubicina solubilizada em tampão de pH 7,4	76
3.2.1.1.	Por análise de espectrofotometria UV-Vis	76
3.2.1.2.	Por análise de espectrofluorimetria	77
3.2.2.	Curva de calibração da doxorrubicina solubilizada em tampão de pH 5	78
3.2.2.1.	Por análise de espectrofotometria UV-Vis	78
3.2.2.2.	Por análise de espectrofluorimetria	79
3.2.3.	Curva de calibração da doxorrubicina solubilizada em tampão de pH 9	81
3.2.3.1.	Por análise de espectrofotometria UV-Vis	81
3.3.	Efeitos biofísicos da doxorrubicina	83
3.3.1.	Coeficiente de partição membrana/água da doxorrubicina	83
3.3.1.1.	Avaliação da lipofilia da doxorrubicina e a sua distribuição no nanossistema veiculador	83
3.3.1.2.	Previsão do comportamento do fármaco a valores de pH biologicamente relevantes	88
3.3.1.3.	Previsão da localização da doxorrubicina no nanossistema veiculador do fármaco	90
3.3.2.	Cálculo dos parâmetros termodinâmicos da partição da doxorrubicina.....	91
3.3.3.	Efeito da doxorrubicina na microviscosidade e cooperatividade membranares....	93

3.4. Eficiência de encapsulação da doxorubicina nas formulações lipossomais desenvolvidas.....	96
3.4.1. Quantificação de doxorubicina encapsulada por medições de espectrofotometria UV-Vis	97
3.5. Teste de citotoxicidade	104
CAPÍTULO IV	109
4. CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS.....	109
4.1. Conclusões	109
4.2. Perspetivas futuras	110
Bibliografia.....	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mortalidade provocada por cancros (exceto melanoma) a nível mundial e em ambos os sexos. [14].	1
Figura 2 - Óbitos por algumas das principais causas de morte em Portugal, desde 1960 a 2012 [16].	2
Figura 3- Alguns tipos de nanovetores utilizados em terapia: (a) nanopartículas inorgânicas; (b) nanopartículas poliméricas; (c) nanopartículas lipídicas sólidas; (d) lipossomas; (e) nanocristais ou pontos quânticos; (f) nanotubos de carbono e (g) dendrímeros. Adaptado de [3, 8].	3
Figura 4 - Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e lamelaridade (nº de bicamadas lipídicas). Adaptado de [5, 6].	5
Figura 5 - Representação da organização espacial de um lipossoma (superior), bicamada lipídica (inferior) e micela (direita) (adaptado de [21]).	6
Figura 6 - Estruturas dos agregados anfifílicos em água com o seu correspondente parâmetro de empacotamento crítico (γ) e curvatura (C). Sequência lógica de mesofases com variação da concentração de lípido/quantidade de água, segundo Diagrama de Fontell.	8
Figura 7 – Principais fases físicas que uma bicamada lipídica pode adotar em função da temperatura do sistema. Adaptado de [10].	9
Figura 8 - Interações entre os lipossomas e a membrana celular.	10
Figura 9 - Direcionamento ativo e passivo do nanovetor. Adaptado de [4].	12
Figura 10 - Estrutura química, geometria do monómero e modelo molecular do lípido catiónico DODAB. Adaptado de [15].	14
Figura 11 - Complexação de ADN em lipossomas contendo o lípido DODAB. Adaptado de [11] [20].	14
Figura 12 - Estrutura química, geometria do monómero e modelo molecular do lípido MO. Adaptado de [12].	15

Figura 13 - Fases cúbicas bicontínuas (diamante e giróide) da monoleína, originam estruturas não-lamelares com curvatura negativa [18].....	16
Figura 14 - Representação estrutural da DOX na sua forma neutra e suas propriedades físico-químicas. A estrutura química foi elaborada em <i>software</i> MarvinSketch ®.....	17
Figura 15 - Representação estrutural das interconversões redox entre os anéis quinona e hidroquinona [143].	18
Figura 16 - Doxorubicina (R=OH) liga-se através do seu grupo amina à guanina do ADN. À esquerda visualiza-se uma cadeia de ADN a ligar-se à doxorubicina. À direita visualiza-se a doxorubicina a intercalar-se entre os pares de bases das cadeias de ADN (Adaptado de [144]).	20
Figura 17 - a) Miocárdio normal com pouca ou nenhuma mudança na matriz extracelular e miócitos intactos. b) Mesmas características mas em maior ampliação. c) Perda de miócitos, desorganização da matriz e fibrose difusa indicando cardiotoxicidade da doxorubicina [7].....	21
Figura 18 - Atividade da glicoproteína-P. A ilustração demonstra que o transportador utiliza a energia do ATP para o efluxo ativo de quimioterápicos através da membrana plasmática [145].	22
Figura 19 - Encapsulação ativa da doxorubicina em lipossomas exibindo gradiente transmembranar de iões promovido pelo amónio: a) Pelo método de gradiente de ião amónio, a DOX é adicionada aos lipossomas pré-formados na forma neutra devido ao grupo amina. b) DOX-NH ₂ atravessa a membrana lipossomal. c) No interior ácido dos lipossomas, o grupo amónio (ião formador do gradiente) cede iões H ⁺ à DOX, ficando esta carregada positivamente. d) Depois sofre conjugação com os aniões sulfureto (contra-ião do ião formador do gradiente) e precipita para controlar a eficiência e estabilidade da encapsulação, bem como a taxa de libertação da DOX a várias temperaturas. → Representa processos que ocorrem durante a encapsulação da DOX. → Representa processos que ocorrem durante a libertação da DOX. Adaptado de [2].....	24
Figura 20 - Representação esquemática da molécula de ADN e do local de intercalação da doxorubicina monomérica (A). Elevadas concentrações de doxorubicina formam dímeros de	

geometria paralela (B) e antiparalela (C) provocando uma possível diminuição na intercalação no ADN por impedimento estérico.....	25
Figura 21 - Eritrodisestesia palmo-plantar ou “síndrome da mão e do pé” [146].	25
Figura 22 – Microscopia eletrónica de transmissão com criogenia (Cryo-TEM) da Doxil [2].	26
Figura 23 - Representação esquemática do nanovetor desenvolvido que consiste em lipossomas de DODAB:MO (1:2) contendo DOX encapsulada de forma passiva na bicamada lamelar de DODAB e no vacúolo contendo as estruturas não lamelares invertidas de MO. Outras estratégias apresentadas representam perspectivas futuras.	28
Figura 24 - Preparação de lipossomas DODAB:MO (1:2) pelo método de hidratação do filme lipídico.	32
Figura 25 - Método de encapsulação da doxorubicina por hidratação do filme lipídico.	34
Figura 26 - Método de encapsulação da doxorubicina por incubação com lipossomas pré-formados pelo método de hidratação do filme lipídico.	35
Figura 27 - Método de encapsulação da doxorubicina por inclusão direta antes da formação do filme lipídico seco.	36
Figura 28 - Configuração típica do aparelho de DLS. Adaptado de [13].	37
Figura 29 -Correlação entre o tamanho dos nanovetores e a intensidade de dispersão.	37
Figura 30- Distribuições de número, volume e intensidade de uma mistura bimodal de nanovetores de 5 e 50 nm presentes em igual proporção.	38
Figura 31- Representação esquemática de uma distribuição por intensidade de nanovetores analisados pela técnica de dispersão de luz dinâmica. O gráfico à esquerda indica uma população com raios hidrodinâmicos uniformes, e portanto monodispersa. O gráfico da direita apresenta uma maior polidispersão (PDI) devido à presença de nanovetores pequenos e agregados maiores.	39
Figura 32- Representação esquemática de uma célula capilar descartável de avaliação do potencial-zeta. Após a aplicação de uma diferença de potencial entre os elétrodos, os	

nanovetores carregados deslocam-se em direção ao eletrodo de carga oposta à sua, provocando um desvio da frequência de dispersão de luz que nelas incide.....	40
Figura 33 - Representação esquemática da dupla camada envolvendo o nanovetor em suspensão e da variação do potencial zeta com a distância de um nanovetor carregado negativamente. Adaptado de [13].	41
Figura 34- Representação das forças de repulsão entre nanovetores carregados (esquerda) e as forças de atração entre nanovetores neutros (direita) indicando em que medida a avaliação do potencial zeta dá indicações sobre a estabilidade da suspensão.	42
Figura 35 - Orbitais eletrônicos e a absorção e emissão de luz.	43
Figura 36 - Absorção de um feixe de luz atravessando uma célula com um percurso ótico de 1 cm.	43
Figura 37 – Representação esquemática dos componentes de um espectrofotômetro de duplo feixe. Adaptado de [117].	45
Figura 38 - Representação esquemática de um espectrofluorímetro com aquisição de espectro de emissão.	46
Figura 39- Representação esquemática da determinação dos coeficientes de partição de um fármaco em sistemas bifásicos.	52
Figura 40- Representação esquemática das diferenças entre a determinação do coeficiente de partição octanol/água e lípido/água em função da lipofilia dos fármacos em estudo.	53
Figura 41 - Estrutura química do lípido semissintético DMPC.....	56
Figura 42 - Curva de perfil sigmoide representando a forma de determinação dos parâmetros r_{s1} , p_1 e r_{s2} e p_2 , correspondentes, respetivamente, à reta inicial antes da transição de fase e à reta final depois da transição de fase. Após determinação destes parâmetros, faz-se o ajuste não linear de acordo com a Equação 2.10 refinando os parâmetros T_m e cooperatividade (B).	57
Figura 43 - Câmara de Neubauer.....	61
Figura 44 - Microplaca de 96 poços: D1 a D6 (6 concentrações de DOX: 5×10^{-7} ; 5×10^{-5} ; 1×10^{-4} ; 5×10^{-4} ; 1×10^{-3} e 5×10^{-3} M); F1 a F6 (formulações DODAB:MO (1:2) com 6 concentrações de	

DOX: 5×10^{-7} ; 5×10^{-5} ; 1×10^{-4} ; 5×10^{-4} ; 1×10^{-3} e 5×10^{-3} M); L0 (lipossomas controlo); H0 (água); DMSO (controlo de morte, pois é citotóxico à temperatura ambiente); T0 (número de células ao início da experiência); C (controlo de vida) e Tris (branco).....	62
Figura 45 - Estrutura química do corante sulforrodamina B [133].	63
Figura 46 - Teste de citotoxicidade – SRB (48h).	63
Figura 47 – Tamanho médio e respetivo desvio padrão das formulações placebo de DODAB:MO (1:2) ([Doxorrubicina]=0 M) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de hidratação.	65
Figura 48 - PDI e respetivo desvio padrão das formulações placebo de DODAB:MO (1:2) ([Doxorrubicina]=0 M) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de hidratação.	65
Figura 49 - Potencial zeta e respetivo desvio padrão da formulação placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações crescentes de doxorubicina encapsulada, pelo método de hidratação.	67
Figura 50 – Tamanho médio e respetivo desvio padrão das formulações placebo de DODAB:MO (1:2) ([Doxorrubicina]=0 M) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de incubação.	68
Figura 51 - PDI e respetivo desvio padrão das formulações placebo DODAB:MO (1:2) ([Doxorrubicina]=0 M) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de incubação.	68
Figura 52 - Potencial zeta e respetivo desvio padrão da formulação placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações crescentes de doxorubicina encapsulada, pelo método de incubação.	69
Figura 53 - Tamanho e respetivo desvio padrão das formulações placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método inclusão direta.	70

Figura 54 - PDI e respetivo desvio padrão das formulações placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método inclusão direta.	70
Figura 55 - Potencial zeta e respetivo desvio padrão das formulações placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de inclusão direta.	71
Figura 56 - Avaliação da estabilidade das formulações por análise ao longo do tempo dos tamanhos e PDI da formulação placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de hidratação, ao longo de 12 semanas. t ₀ indica a primeira leitura feita imediatamente após a preparação das formulações e t ₁ a t ₁₂ indicam leituras correspondentes às semanas 1 a 12, após a preparação.	72
Figura 57 - Avaliação da estabilidade das formulações por análise ao longo do tempo do potencial zeta da formulação placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de hidratação, ao longo de 12 semanas. t ₀ indica a primeira leitura feita imediatamente após a preparação das formulações e t ₁ a t ₁₂ indicam leituras correspondentes às semanas 1 a 12 após a preparação.	72
Figura 58 - Tamanho, PDI e estabilidade de formulações de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de incubação.	73
Figura 59 - Avaliação da estabilidade das formulações por análise ao longo do tempo do potencial zeta da formulação placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de incubação, ao longo de 12 semanas. t ₀ indica a primeira leitura feita imediatamente após a preparação das formulações e t ₁ a t ₁₂ indicam leituras correspondentes às semanas 1 a 12 após a preparação.	74
Figura 60 - Avaliação dos tamanhos e PDI da formulação placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de inclusão direta, ao longo de 12 semanas. t ₀ indica a primeira leitura feita imediatamente após a preparação das formulações e t ₁ a t ₁₂ indicam leituras correspondentes às semanas 1 a 12 após a preparação.	75
Figura 61 - Avaliação da estabilidade das formulações por análise ao longo do tempo do potencial zeta da formulação placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três	

concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de inclusão direta, ao longo de 12 semanas. t_0 indica a primeira leitura feita imediatamente após a preparação das formulações e t_1 a t_{12} indicam leituras correspondentes às semanas 1 a 12 após a preparação.	75
Figura 62 - Espectros de absorvância de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão HEPES, com pH 7,4.	76
Figura 63 - Curva de calibração de absorvância das soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão HEPES, com pH 7,4, ao comprimento de onda máximo de 480 nm.	76
Figura 64 - Espectros de emissão de fluorescência de soluções padrão de doxorubicina solubilizadas em tampão HEPES, com pH 7,4.	77
Figura 65 - Curva de calibração de fluorescência de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão HEPES, com pH 7,4, ao comprimento de onda máximo de 555 nm.	77
Figura 66 - Espectros de absorvância de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão acetato, com pH 5.	78
Figura 67 - Curva de calibração de absorvância de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão acetato, com pH 5.	78
Figura 68 - Espectro de emissão de fluorescência de soluções padrão de doxorubicina solubilizadas em tampão acetato, com pH 5.	79
Figura 69 - Espectro de emissão de fluorescência de soluções padrão de doxorubicina solubilizadas em tampão acetato, a pH 5.	80
Figura 70 - Curva de calibração de fluorescência de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão acetato, com pH 5, ao comprimento de onda máximo de 555 nm. ...	80
Figura 71 - Espectro de absorvância de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão HEPES, com pH=9.	81
Figura 72 - Curva de calibração de absorvância de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão HEPES, com pH 9, ao comprimento de onda máximo de 480 nm. ..	81
Figura 73 - Espectros de absorvância da doxorubicina solubilizada em tampões com pH 5; 7,4 e 9.	82

Figura 74 - Espectros de absorvância de 3 réplicas de doxorubicina (300 μ M) representadas por D1, D2 e D3 e de amostras a uma concentração crescente de DODAB:MO e concentração fixa de doxorubicina (300 μ M) (S1-S11). As referências ou brancos correspondentes, preparadas de um modo semelhante às amostras, mas sem o fármaco, são também apresentadas (cor cinza). A) Apresenta o espectro com amostras e brancos. B) Representa os espectros obtidos depois da subtração dos brancos correspondentes (cor cinza).	83
Figura 75 - Representação de algumas etapas necessárias à determinação do coeficiente de partição da Doxorubicina (300 μ M) num sistema bifásico lipossomas DODAB:MO (1:2)/água calculado através da folha de cálculo com base em EXCEL <i>Kp Calculator</i> [23].....	84
Figura 76 - Representação de algumas etapas necessárias à determinação do coeficiente de partição da doxorubicina (300 μ M) num sistema bifásico lipossomas DODAB:MO (1:2)/água calculado através da folha de cálculo com base em EXCEL <i>Kp Calculator</i> [23].....	85
Figura 77 - Representação gráfica da 2ª Derivada a 318 nm. A preto estão representados os valores dos máximos da 1ª derivada dos espectros obtidos após a subtração de brancos e a vermelho os valores dos máximos da 1ª derivada obtidos diretamente dos espectros sem a subtração de brancos.....	85
Figura 78 - Representação de algumas etapas necessárias à determinação do coeficiente de partição da doxorubicina (150 μ M) em sistemas bifásicos lipossomas DODAB:MO (1:2)/água calculado através da folha de cálculo com base em EXCEL <i>Kp Calculator</i> [23].....	86
Figura 79 - Molécula de doxorubicina carregada positivamente. Elaborada com <i>software MarvinSketch 6.2.2</i> ©.	88
Figura 80 -Molécula de doxorubicina carregada negativamente. Elaborada com <i>software MarvinSketch 6.2.2</i> ©.	88
Figura 81 - Estrutura da doxorubicina. Às áreas azuis e vermelhas correspondem a zonas polares e as áreas cinza a zonas apolares.....	90
Figura 82 - 2ª Derivada dos espectros de absorvância de doxorubicina (300 μ M) (D1, D2 e D3) e de concentrações crescentes de DODAB:MO e concentração fixa de doxorubicina (300 μ M) (S1-S11). As referências correspondentes, preparadas de um modo semelhante às amostras, mas	

sem o fármaco, são também apresentadas (Branco a cinzento). É evidenciado o máximo da derivada do espectro que apresenta desvios para valores maiores de comprimento de onda. ...	90
Figura 83 - Ajustes dos valores da 3ª derivada, a 556 nm, calculada por espectroscopia derivativa a diferentes temperaturas (30, 37, 50, 53, 55 e 60 °C).	91
Figura 84 - Regressão de Van't Hoff para a partição da doxorubicina em LUVs de DODAB:MO (1:2).....	92
Figura 85 - Variação da energia livre de Gibbs (ΔG) da partição da doxorubicina (300 μ M) no sistema binário vesículas de DODAB:MO (1:2) e água, de acordo com a temperatura.	92
Figura 86 - Taxa média de contagem, de LUVs de DMPC na ausência de doxorubicina (círculos claros) e de LUVs de DMPC na presença de doxorubicina (círculos escuros), medida em função da temperatura. Cada ponto corresponde a um valor médio de três medições com o respetivo desvio padrão e as linhas são o melhor ajuste não linear obtido de acordo com a Equação 2.10, refinando os parâmetros T_m e cooperatividade (B).	94
Figura 87 - Taxa média de contagem, de LUVs de DMPC na ausência de doxorubicina (círculos claros) e de LUVs de DMPC na presença de doxorubicina (círculos escuros), medida em função da temperatura. Cada ponto corresponde a um valor médio de três medições com o respetivo desvio padrão e as linhas são o melhor ajuste não linear obtido de acordo com a Equação 2.10, refinando os parâmetros T_m e cooperatividade (B).	95
Figura 88 - Espectro de absorvância de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em água ultrapura.....	97
Figura 89 – Curva de calibração de absorvância de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em água ultrapura, ao comprimento de onda máximo de 480 nm.	97
Figura 90 - 1ª Derivada do espectro de absorvâncias de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em água ultrapura.	98
Figura 91 - Curva de calibração da 1ª derivada do espectro de absorvâncias de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em água ultrapura, ao comprimento de onda máximo de 442 nm.	98

Figura 92 - Espectro de absorvância dos resíduos do branco (formulação placebo de DODAB:MO (1:2) sem DOX) e de duas concentrações de doxorubicina encapsuladas por três métodos.....	99
Figura 93 - Espectro de absorvância dos filtrados do branco (formulação placebo de DODAB:MO (1:2) sem DOX) e de duas concentrações de doxorubicina encapsuladas por três métodos.....	99
Figura 94 - 1ª Derivada do espectro de absorvância dos resíduos do branco e de duas concentrações de doxorubicina encapsuladas por três métodos.....	99
Figura 95 - 1ª Derivada do espectro de absorvância dos filtrados do branco e de duas concentrações de doxorubicina encapsuladas por três métodos.....	99
Figura 96 - Eficiência de encapsulação de duas concentrações de DOX (5×10^{-5} e 5×10^{-4} M) em lipossomas de DODAB:MO (1:2) por três métodos distintos de encapsulação do fármaco: hidratação, inclusão direta e incubação.	100
Figura 97 - Comparação do tamanho (nm) (barra escura) e eficiência de encapsulação (%) (barra clara) obtidos com duas concentrações de doxorubicina em lipossomas de DODAB: MO (1:2), por dois métodos distintos de encapsulação do fármaco: incubação e inclusão direta.	102
Figura 98 - Eficiência de encapsulação da média de concentrações de doxorubicina em lipossomas de DODAB:MO (1:2), por três métodos distintos de encapsulação do fármaco: hidratação, inclusão direta e incubação.	102
Figura 99 - Espectros de absorvância dos resíduos de cinco amostras com concentrações diferentes de doxorubicina encapsulada pelo método de inclusão direta.....	103
Figura 100 - Espectros de absorvância dos filtrados de cinco amostras com concentrações diferentes de doxorubicina encapsulada pelo método de inclusão direta.....	103
Figura 101 - 1ª Derivada dos espectros de absorvância dos resíduos de cinco amostras com concentrações diferentes de doxorubicina encapsuladas pelo método de inclusão direta. ...	103
Figura 102 - 1ª Derivada do espectro de absorvância dos filtrados de cinco amostras com concentrações diferentes de doxorubicina encapsuladas pelo método de inclusão direta. ...	103

Figura 103 - Eficiência de encapsulação de concentrações crescentes de doxorubicina encapsulada em lipossomas de DODAB:MO (1:2), pelo método de inclusão direta no filme lipídico.....	104
Figura 104 - Absorvâncias, com subtração do Tris (branco), e respectivos desvios padrão de 6 concentrações de DOX livre; de 6 formulações DODAB:MO (1:2) com 6 concentrações de DOX; L0 (lipossomas controle); H0 (água); DMSO (controle de morte); t0 (células ao início da experiência); t48 (controle de vida após 48h).	105
Figura 105 - Curva de percentagem de proliferação celular vs concentração de doxorubicina (M) ao longo de 48h e determinação do IC ₅₀ da doxorubicina livre e encapsulada na formulação (DODAB:MO (1:2) + DOX).	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Breve resumo de nanovetores aprovados para a terapia do cancro, incluindo formulações lipossomais com doxorubicina em fase de desenvolvimento [57].....	13
Tabela 2 – Listagem de todos os materiais (reagentes e equipamentos) utilizados no decurso do presente trabalho	31
Tabela 3- Parâmetros usados para medir o tamanho dos nanovetores com o analisador de partículas Malvern Zetasizer Nano ZS	39
Tabela 4 - Parâmetros usados para medir o potencial zeta com o Zetasizer Nano ZS Malvern	42
Tabela 5 – Valores de coeficientes de partição (K_p) da doxorubicina ($C=150 \mu\text{M}$ e $C=300 \mu\text{M}$) em sistemas LUV((DODAB:MO)(1:2))/tampão (pH 5 e pH 7,4) e respetivos logaritmos ($\text{Log}(K_p)$) e valores de partição da doxorubicina em sistemas octanol/água a pH 5 e 7,4 (LogD).....	87
Tabela 6 – Valores de coeficientes de partição (K_p) da doxorubicina ($C=150 \mu\text{M}$) em sistemas LUV((DODAB:MO)(1:2))/Tampão (pH 5 e pH 7,4) e respetivos logaritmos ($\text{Log}(K_p)$) e valores de partição da doxorubicina em sistemas octanol/água a pH 5 e 7,4 (LogD).	89
Tabela 7- Parâmetros biofísicos T_m e B calculados para LUVs de DMPC, na ausência e na presença de doxorubicina.....	94
Tabela 8- Parâmetros biofísicos T_m e B calculados para LUVs de DODAB:MO (1:2), na ausência e na presença de doxorubicina.....	96
Tabela 9 - Valores de absorvâncias e respetivos desvios padrão dos poços tendo em conta o <i>timepoint</i> das células como 100% de proliferação	105

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- ADN – Ácido desoxirribonucleico
- ARN – Ácido ribonucleico
- ATCC (*American Type Culture Collection*) - Coleção Americana de Cultura de Células
- CHOL (*Cholesterol*) - Colesterol
- Cryo-TEM (*Cryo-Transmission Electron Microscopy*) - Microscopia eletrônica de transmissão com criogenia
- DLS (*Dynamic Light Scattering*) - Dispersão de luz dinâmica
- DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's médium*) - Meio de Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO – Dimetil-sulfóxido
- DMPC – 1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfocolina
- DODAB (*Diocadecyldimethylammonium Bromide*)- Brometo de dioctadecildimetilamônio
- DODAP (*Diocadecyldimethylammonium Phosphate*)- Fosfato de dioctadecildimetilamônio
- DOX – Doxorrubicina
- EE - Eficiência de encapsulação
- ELS (*Electrophoretic Light Scattering*) – Dispersão de luz eletroforética
- EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) – Retenção e permeabilidade aumentada
- FBS (*Fetal Bovine Serum*) – Soro bovino fetal
- FDA (*Food and Drug Administration*) - Administração de Alimentos e Medicamentos
- GUV (*Giant unilamellar vesicles*) - Vesículas unilamelares gigantes
- Fase H_I - Fase hexagonal do tipo I
- Fase H_{II} - Fase hexagonal invertida ou do tipo II
- Fase Q – Fase cúbica
- HEPES - Ácido N-(2-hidroxi-etil) piperazina-N-etanossulfônico
- IC₅₀ – Concentração inibitória de 50% do crescimento celular
- INE - Instituto Nacional de Estatística
- IV – Infravermelho
- K_p – Coeficiente de partição
- $K_{pO/A}$ - Coeficiente de partição octanol/água
- $K_{pL/A}$ - Coeficiente de partição lípido/água
- L _{α} - Fase líquido-cristalina ou fluída
- L _{β} - Fase sólido-cristalina ou gel lamelar (sem inclinação das cadeias)
- LUV (*Large Unilamellar Vesicles*) – Vesículas grandes unilamelares
- Log D - Log do coeficiente de partição octanol-água a pH 7,4

Log P - Log do Coeficiente de partição octanol-água da forma neutra

M_I - Fase micelar

M_{II} - Fase micelar invertida

MDA-MB-468 (*M.D. Anderson - metastatic breast*) – Linha de células metastáticas de mama humana

MDR (*Multidrug resistance*) – Multirresistência a fármacos

MDRR (*MDR Reversal*) – Reversores da multirresistência a fármacos

MLV (*Multilamellar Vesicles*) – Vesículas multilamelares

MO (*1-monooleoyl-rac-glycerol*) – Monoleína

MVL (*Multivesicular Vesicles*) – Lipossomas multivesiculares

MWCO (*Molecular weight cut off*) – Limite do peso molecular

NIR (*Near Infrared*) – Próximo do infravermelho

NMWL (*Nominal molecular weight limit*) – Limite de peso molecular nominal

OLV (*Oligolamellar Vesicles*) – Vesículas oligolamelares

PBS (*Phosphate buffered saline*) – Tampão fosfato salino

PEG - Polietilenoglicol

PDI (*Polydispersity index*) – Índice de polidispersão

PG – Fosfatidilglicerol

P-gp – Glicoproteína P

PK- Farmacocinética

pKa – Menos logaritmo na base 10 da constante de acidez

Q_I - Fase cúbica – micela normal ou bicontínua normal

Q_{II} - Fase cúbica bicontínua invertida ou micela invertida

Q_{II}^D - Fase cúbica bicontínua invertida do tipo diamante

Q_{II}^G - Fase cúbica bicontínua invertida do tipo giróide

QSPR (*Quantitative Structure -Property Relationship*)-Relação quantitativa estrutura/atividade

RES (*Reticuloendothelial system*) - Sistema reticuloendotelial

SRB - Sulforrodamina B

SUV (*Small Unilamellar Vesicles*) – Vesículas unilamelares pequenas

T_m (*main transition temperature*) - Temperatura de transição de fase principal

U.A.- Unidades arbitrárias

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

Vis – Visível

B - Cooperatividade

λ_{\max} - Comprimento de onda de absorção máxima

λ_{exc} - Comprimento de onda de excitação

λ_{emi} - Comprimento de onda de emissão

k - constante de Boltzmann

η - viscosidade

D - coeficiente de difusão translacional

RH - raio hidrodinâmico

ζ - Potencial Zeta

ΔG - Variação da função de Gibbs

ΔH - Variação de entalpia

ΔS - Variação da entropia

ΔT - Variação de temperatura

ε - Absortividade molar

ν - Frequência

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cancro e o seu impacto a nível mundial

O cancro é uma das principais causas de morte a nível mundial e uma análise estatística publicada pela Agência Internacional de Investigação do Cancro (“IARC- International Agency for Research of Cancer”) (Figura 1) prevê que, se as tendências estimadas continuarem, sejam diagnosticados anualmente cerca de 21,4 milhões de novos casos até 2030.

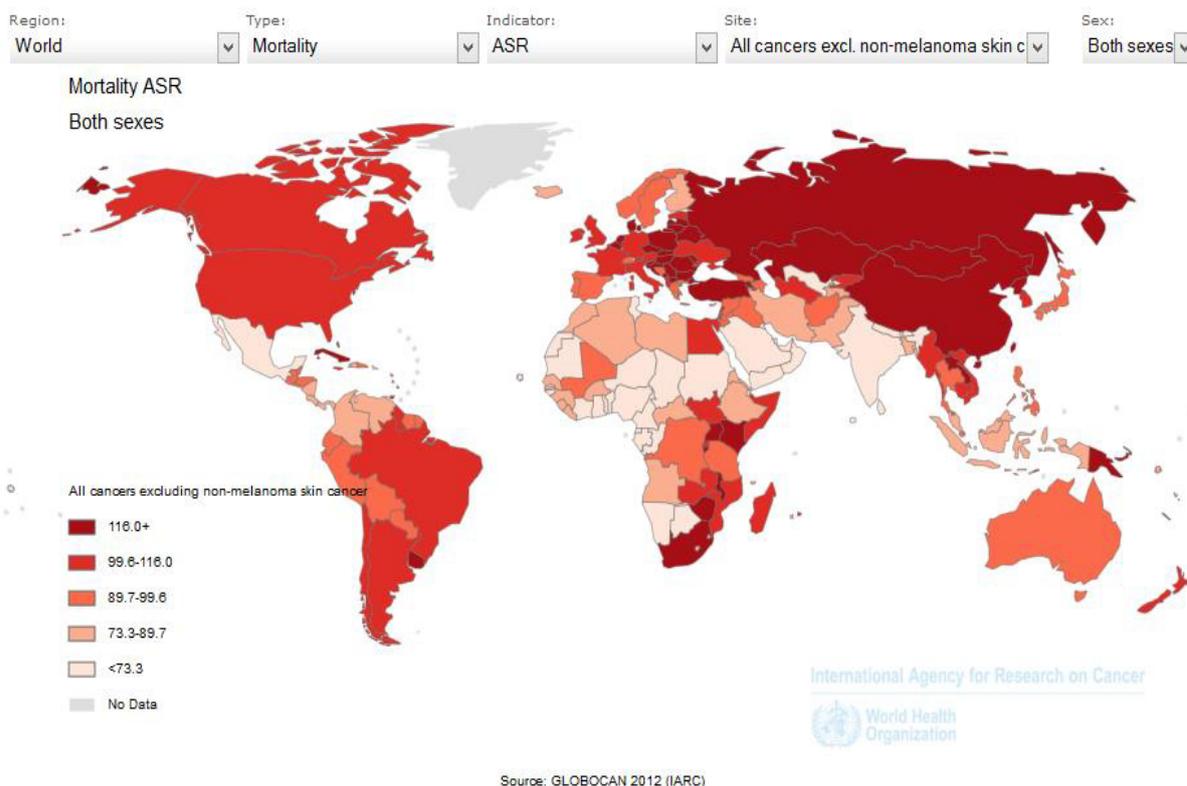
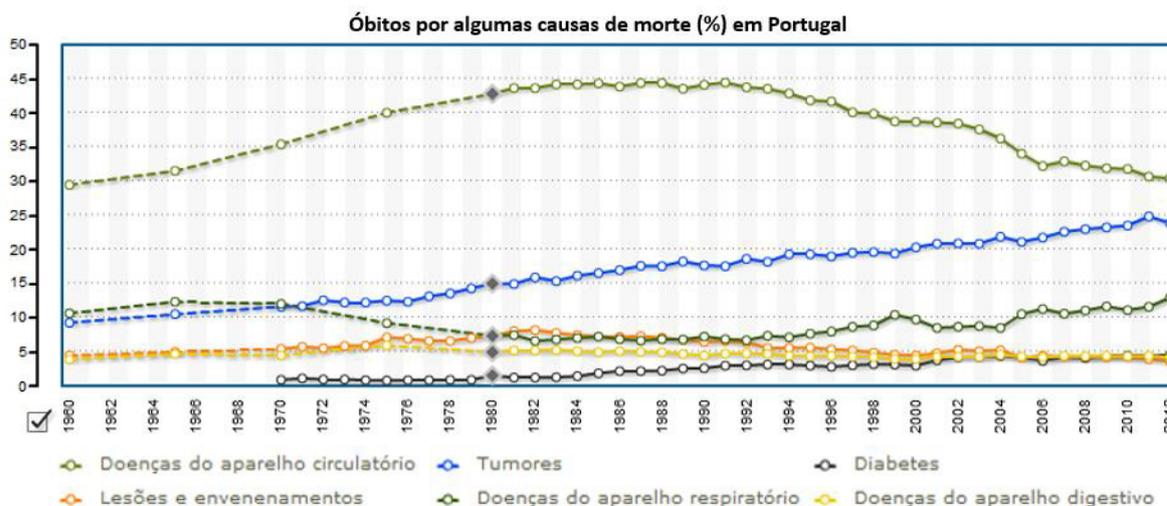


Figura 1 - Mortalidade provocada por cancros (exceto melanoma) a nível mundial e em ambos os sexos. [14]

Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE), verifica-se desde 1960 a 2012, um aumento da percentagem de óbitos por tumores em Portugal e uma tendência a partir de 1980 para que as doenças do sistema circulatório estejam a deixar de ser as principais causas de morte em Portugal, em detrimento dos tumores (Figura 2).



Fontes/Entidades: INE-DGS/MS, INE, PORDATA

Figura 2 - Óbitos por algumas das principais causas de morte em Portugal, desde 1960 a 2012 [16].

1.2. Vantagens da Nanomedicina face à Medicina Clássica

Desde há cerca de 40 anos que as terapias no tratamento do cancro consistem basicamente na remoção cirúrgica, quimioterapia e/ou radioterapia. Pelo que já se constatou estas terapias convencionais apresentam algumas limitações, tais como, o facto de aquando da remoção cirúrgica surgir a necessidade de remoção de tecido saudável em torno do tumor para precaver uma reincidência [24]; outra limitação ocorre com a quimioterapia convencional devido à rápida eliminação de fármacos resultando, consequentemente, numa ação terapêutica com reduzida biodisponibilidade. Para colmatar a reduzida biodisponibilidade, introduzem-se concentrações mais elevadas dos fármacos, de modo a garantir que estes atinjam as células-alvo. Desta forma, elevam-se os níveis de toxicidade e produzem-se vários efeitos secundários indesejáveis. Estes efeitos devem-se igualmente à falta de especificidade dos fármacos, que têm como alvo todas as células, tumorais e normais, principalmente as que apresentam um rápido crescimento, como é o caso das células do cabelo, resultando na queda capilar [25], ou das células sanguíneas, resultando em mielossupressão. Na radioterapia, emprega-se um feixe de radiações ionizantes, bastante energéticas, ao longo de algumas sessões, num dado volume de tecido que engloba o tumor, com o intuito de matar células tumorais com o menor dano possível para as células normais [26]. Como se pode depreender, a radioterapia tanto mata células tumorais como as células normais em redor do tumor, despoletando efeitos secundários indesejáveis. Para além disso, a radiação pode despoletar o aparecimento de outros tumores. Um diagnóstico precoce e terapias eficientes aumentam as hipóteses de cura do cancro [24]. Nesse sentido, a nanotecnologia é bastante promissora e tem tido grande impacto na Medicina

Clássica ao ponto de ser utilizado o termo “Nanomedicina” para a ciência que produz e manipula nanoestruturas do tamanho das biomoléculas direcionadas para as células-alvo de dada doença, permitindo um tratamento seletivo e com menos efeitos secundários indesejáveis. Vários tipos de nanovetores têm sido utilizados na terapia oncológica, como por exemplo, as nanopartículas inorgânicas (nanopartículas de ouro e magnéticas), nanopartículas poliméricas (dendrímeros e nanopartículas de quitosano), nanopartículas lipídicas sólidas, nanotubos de carbono, pontos quânticos, lipossomas, micelas, assim como os conjugados envolvendo esses nanovetores. A Figura 3 apresenta alguns nanovetores que podem ser utilizados em terapia.



Figura 3- Alguns tipos de nanovetores utilizados em terapia: (a) nanopartículas inorgânicas; (b) nanopartículas poliméricas; (c) nanopartículas lipídicas sólidas; (d) lipossomas; (e) nanocristais ou pontos quânticos; (f) nanotubos de carbono e (g) dendrímeros. Adaptado de [3, 8].

De entre estes nanovetores, os lipossomas foram o vetor escolhido para o transporte e liberação do fármaco anticancerígeno, uma vez que estes apresentam diversas vantagens que a seguir se enumeram.

1.3. Lipossomas como vetores de fármacos anticancerígenos

A farmacocinética, desde a sua administração até excreção, envolve uma série de etapas (ADME/Tox):

- Absorção - passagem do fármaco do tubo digestivo para o sangue.
- Distribuição - passagem do fármaco do sangue para diferentes tecidos, que podem corresponder ou não ao seu local de ação. O fármaco chega primeiro aos tecidos mais vascularizados, como os que pertencem ao sistema nervoso central, pulmões e coração e depois sofre redistribuição aos tecidos menos irrigados, como por exemplo, o tecido adiposo. Dependendo da distribuição, verifica-se a biodisponibilidade do fármaco, ou seja, a quantidade de fármaco que fica efetivamente disponível para exercer a sua função terapêutica.
- Metabolismo ou biotransformação - o fármaco pode sofrer alterações químicas, sendo metabolizado em um ou mais metabolitos.
- Excreção - o fármaco é depurado na forma intacta ou na forma de metabolitos.

-Toxicidade – de acordo com as suas características físico-químicas, o fármaco pode sofrer bioacumulação em determinados órgãos ou tecidos exercendo efeitos não desejáveis que determinam a sua toxicidade.

Quando ocorre administração vascular, intravenosa ou intra-arterial, o processo é mais simples, uma vez que não ocorre a absorção [27]. Quando um fármaco é administrado na sua forma livre, a sua farmacocinética depende das suas características físico-químicas, como por exemplo, o seu pKa [28] e a sua distribuição não apresenta especificidade, pelo que o fármaco atua em qualquer tipo de célula, provocando efeitos secundários indesejáveis. Daí que, a vetorização de um fármaco num agente apropriado tornaria a distribuição do fármaco no organismo independente das suas propriedades físico-químicas e passaria a ser dependente das propriedades físico-químicas do vetor. Desta forma, protege-se o fármaco desde o local de administração até ao local de ação, promove-se a sua biodisponibilidade na forma intacta nas células-alvo [29, 30] e há especificidade no ataque terapêutico às células-alvo. Neste trabalho, os nanovetores escolhidos para transportar o fármaco anticancerígeno foram os lipossomas, pois estes possuem características únicas que os tornam veículos seguros e eficazes. Hoje em dia, os lipossomas assumem uma posição de relevo como vetores de fármacos devido a várias características que os constituem, nomeadamente:

- a) São nanovetores coloidais ou vesículas nanométricas, que se formam por agregação de monómeros lipídicos em água. Apesar de serem sintéticos são **biocompatíveis** pois os seus componentes apresentam baixa toxicidade intrínseca [31] e são **biodegradáveis**.
- b) Apresentam forma esférica e são constituídos por uma ou mais bicamadas concêntricas de moléculas lipídicas, geralmente fosfolípidos, que encerram um volume aquoso [32]. Uma das vantagens dos lipossomas reside no facto de serem **fáceis de produzir e manipular o seu tamanho e a lamelaridade**. Quando apresentam uma bicamada são classificados em unilamelares e quando apresentam mais do que uma bicamada são classificados como multilamelares. Quanto ao tamanho, as vesículas unilamelares podem ser pequenas, grandes ou gigantes, sendo denominadas respetivamente de vesículas unilamelares pequenas - SUV (*small unilamellar vesicles*) com tamanho entre 20-100 nm, vesículas unilamelares grandes - LUV (*large unilamellar vesicles*) com tamanho maior que 100 nm e vesículas unilamelares gigantes – GUV (*giant unilamellar vesicles*) com tamanho maior que 1000 nm (Figura 4).

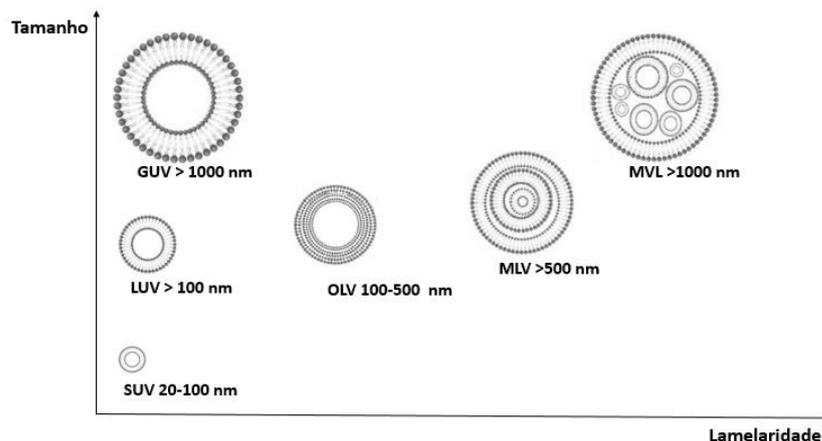


Figura 4 - Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e lamelaridade (nº de bicamadas lipídicas). Adaptado de [5, 6].

Dentro das vesículas multilamelares temos as vesículas oligolamelares - OLV (*oligolamellar vesicles*) com 2-6 bicamadas e cujo tamanho está entre 100-500 nm, que à semelhança das vesículas unilamelares, podem ser subdivididas em pequenas (SOV), grandes (LOV) e gigantes (GOV); e ainda as vesículas multilamelares - MLV (*multilamellar vesicles*) com um número de bicamadas superior a 6 e com tamanho normalmente superior a 500 nm. Existem ainda os lipossomas multivesiculares - MVL (*multivesicular liposomes*) que contêm vesículas encapsuladas e o seu tamanho é maior que 1000 nm [5, 6].

O tamanho dos lipossomas é importante pois ao serem formulados à nano escala, permitem um maior tempo de circulação e tiram proveito do efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR do Inglês “Enhanced Permeability and Retention”), ou seja, os lipossomas são mantidos em circulação no sistema vascular, mas tendem a acumular-se muito mais no tecido tumoral do que no normal. Isto deve-se ao facto de o tecido tumoral, por necessidade de maior aporte sanguíneo rico em nutrientes e oxigénio, promover a formação de novos vasos (angiogénese) com fenestrações ou poros com um diâmetro entre 380 a 780 nm. Desta forma, lipossomas de 100-200 nm têm facilidade em atravessar os poros [2] e, devido à alta pressão intersticial tumoral e à ausência de uma rede linfática funcional, ficam retidos no tecido tumoral bem vascularizado, melhorando assim a biodistribuição do fármaco. Normalmente, para aumentar o efeito EPR, um transportador de fármaco deve ter entre 10 a 100 nm, pois se os transportadores forem menores que 10 nm são rapidamente eliminados pelos rins ou através da extravasão [33] e se forem maiores do que 100-200 nm são eliminados pelo sistema reticuloendotelial (do inglês “Reticuloendothelial System” - RES).

Em geral, demora menos de uma hora para eliminar mais de cinquenta por cento dos lipossomas injetados por via intravenosa [34].

- c) Outra vantagem dos lipossomas reside na sua **natureza anfifílica ou anfipática**, ou seja, o facto de possuírem natureza polar e apolar, com características antagónicas de afinidade e repulsa para a água, fazendo com que baixem a tensão da superfície de contacto entre dois meios, sendo por esse facto geralmente denominados **agentes tensioativos ou surfactantes** [35, 36].

Quando dispersos em água, tendem a auto-organizar-se devido às interações hidrófilas/hidrófobas, interações eletrostáticas e interações de Van der Waals, de modo a que as “cabeças” hidrófilas dos lípidos - polares- fiquem viradas para o lado exterior da membrana, em contacto direto com a fase aquosa e as “caudas” hidrófobas - cadeias de ácidos gordos apolares- fiquem voltadas para o interior de modo a evitar o contacto com a água [37] (Figura 5).

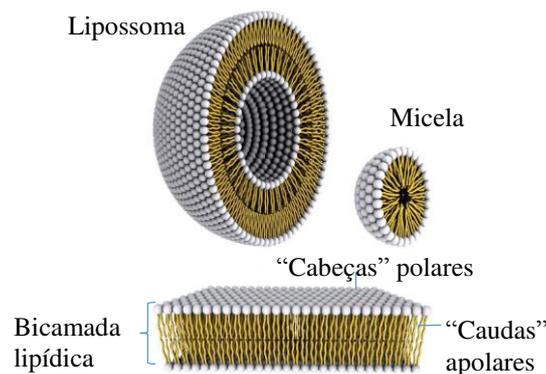


Figura 5 - Representação da organização espacial de um lipossoma (superior), bicamada lipídica (inferior) e micela (direita) (adaptado de [21]).

Este processo de auto-agregação lipídica [35] é um processo termodinâmico que ocorre devido ao efeito hidrófobo, para diminuir a energia livre de Gibbs, ΔG (ver Equação 3.2), originando assim agregados termodinamicamente mais estáveis. De uma forma breve, este efeito hidrófobo induz a exclusão da água do contacto com as porções hidrófobas dos lípidos resultando num aumento de entropia (ΔS) (ausência de restrições aos movimentos das moléculas), que diminui a energia livre de Gibbs, pelo que o processo de agregação lipídica prossegue espontaneamente [38].

Embora os lípidos apresentem as suas “cabeças” voltadas para a água são caracterizados pela sua solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água.

Este carácter anfipático **possibilita a encapsulação e transporte de moléculas hidrófilas** [39] no núcleo interno aquoso ou ao nível das cabeças polares lipídicas, de **moléculas**

lipófilas [40] na bicamada lipídica e **de moléculas anfifílicas** [41], nas duas regiões anteriores. Ao encapsular o fármaco nos lipossomas, protege-se o organismo do seu efeito em células normais e o fármaco, por sua vez, fica protegido, desde a sua administração até ao seu local de ação, da depuração ou biotransformação antes de chegar às células-alvo. Desta forma, possibilita-se o **aumento da concentração do fármaco** nas células-alvo, **otimizando o seu índice terapêutico** e conseqüentemente, **diminui-se o custo da terapia**.

d) Outra vantagem dos lipossomas é a possibilidade de **manipular a estrutura dos agregados lipídicos de acordo com as propriedades pretendidas**. Os agregados lipídicos podem adotar arranjos estruturais distintos, dependendo do fator de forma dos seus monómeros (relação entre o tamanho da “cabeça” polar e “cauda” apolar dos lípidos que constituem o agregado), da curvatura, da temperatura, da quantidade de água, do pH do sistema e da concentração da molécula anfifílica [42]. O fator de forma ou parâmetro de empacotamento crítico (γ) (Figura 6) é determinado pela seguinte equação (Equação 1.1.):

$$\gamma = \frac{v}{\alpha_0 \cdot l_c} \quad (1.1.)$$

γ = fator de forma ou parâmetro de empacotamento crítico

v = volume da molécula lipídica

l_c = comprimento efetivo das cadeias de ácidos gordos

α_0 = área da superfície média ocupada pela “cabeça” hidrófila

Valores específicos de γ estão associados a diferentes tipos de fases líquido-cristalina, que são favorecidos pela entropia dessa geometria:

- $\gamma < 1/3$ - quando as moléculas anfifílicas exibem uma configuração cônica, possuindo uma área de “cabeça” polar elevada e uma “cauda” apolar única, tendem a formar micelas esféricas.
- $1/3 < \gamma < 1/2$ – quando a área da “cabeça” polar diminui até 0,33 em relação à “cauda” apolar, tendem a formar micelas cilíndricas, que podem polimerizar e originar fases hexagonais do tipo I.
- $1/2 < \gamma \leq 1$ – quando aumenta o γ , somente as vesículas e bicamadas são entropicamente capazes de existir.
- $\gamma > 1$ – quando a área das “caudas” apolares é maior que a área das “cabeças” polares formam-se estruturas invertidas, tais como micelas invertidas que podem polimerizar e dão origem a fases hexagonais invertidas ou do tipo II [43]. Estes agregados ocorrem especialmente em solventes apolares ou quando a quantidade de água é muito reduzida.

O modelo do parâmetro de empacotamento crítico permite racionalizar qualitativamente a relação estrutura do monómero/agregação e prever alterações na agregação (por variação de composição, força iônica, temperatura, etc.).

Segundo o diagrama de Fontell, diminuindo a quantidade de água (ou aumentando a concentração de lípido) na mistura lípido/água, as estruturas vão variando de forma, obedecendo à seguinte sequência: fase micelar, fase cúbica, fase hexagonal tipo I, fase cúbica, fase lamelar e as correspondentes fases invertidas (micelar invertida e hexagonal tipo II). É importante referir que nem todos os lípidos adotam toda esta sequência de fases, contudo a sequência em função da concentração é, na maioria dos casos, respeitada (Figura 6).

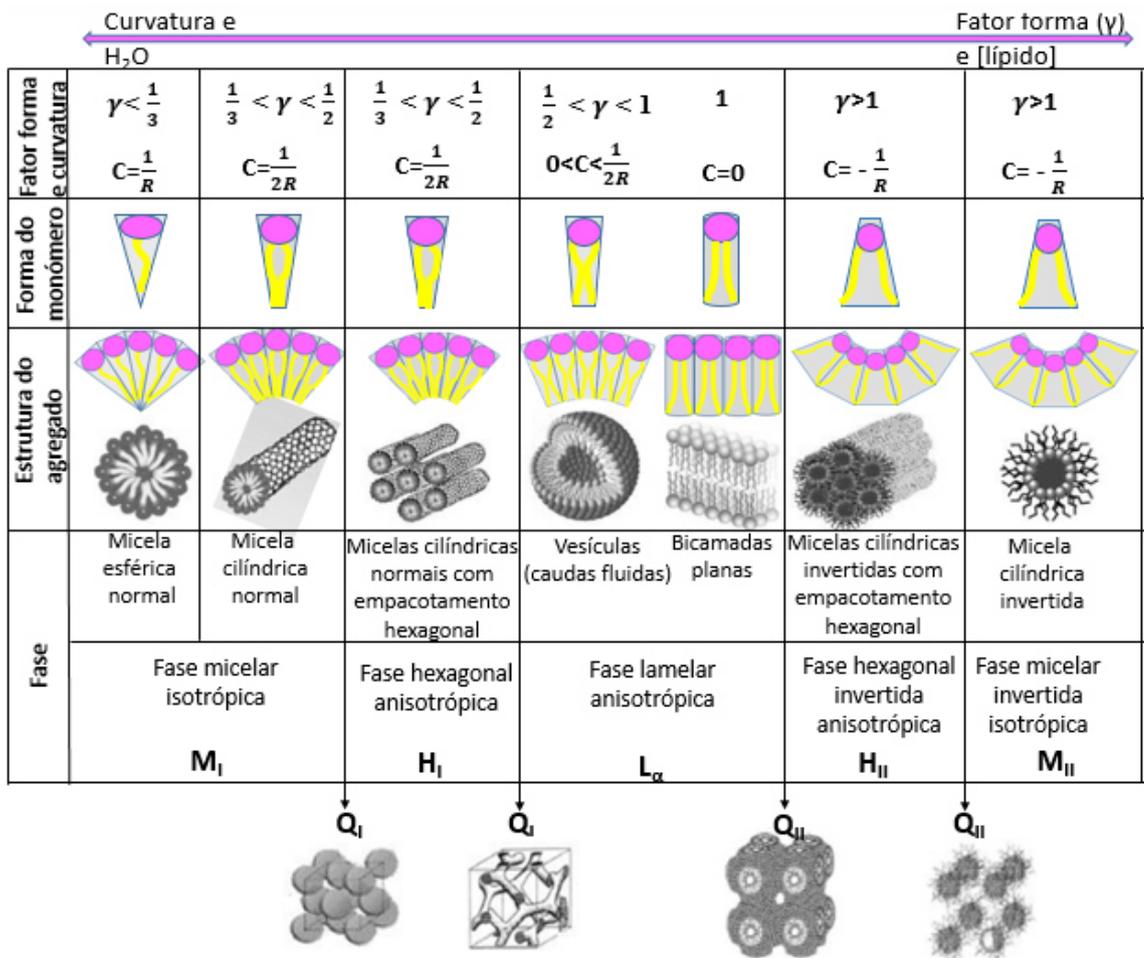


Figura 6 - Estruturas dos agregados anfífilos em água com o seu correspondente parâmetro de empacotamento crítico (γ) e curvatura (C). Sequência lógica de mesofases com variação da concentração de lípido/quantidade de água, segundo Diagrama de Fontell.

Legenda: M_I - Fase micelar; H_I - Fase hexagonal do tipo I; L_α - Fase lamelar ou estrutura em bicamada lipídica; H_{II} - Fase hexagonal invertida ou do tipo II e M_{II} - Fase micelar invertida. As estruturas que constituem a fase cúbica estão normalmente entre as fases M_I e H_I (Q_I - Fase cúbica - micelar normal), H_I e L_α (Q_I - Fase cúbica bicontínua normal), L_α e H_{II} (Q_{II} - Fase cúbica bicontínua invertida) e H_{II} e M_{II} (Q_{II} - Fase cúbica - micela invertida). Adaptado de [19] [3].

Nas condições fisiológicas, a fase mais comum e mais relevante, sob o ponto de vista biofísico, é a fase lamelar líquido-cristalina ou fase fluída (L_α), uma vez que a organização estrutural em bicamadas apresenta maior proximidade com a organização estrutural lipídica presente nas membranas biológicas [44, 45]. Para reduzir a exposição das faces laterais hidrófobas à água, as bicamadas dobram-se sobre si próprias formando vesículas. O movimento das cadeias de ácidos gordos dos lípidos assegura a fluidez da bicamada lipídica. A rotação livre das ligações simples C-C resulta em movimentos vigorosos das “caudas” de lípidos a temperaturas mais elevadas, o que também assegura a fluidez membranar, permite o aumento do volume por expansão lateral da bicamada [46] e uma diminuição da espessura membranar (Figura 7). Com a diminuição da temperatura, a bicamada sofre uma transição de fase para uma fase onde as cadeias dos ácidos gordos estão num estado mais ordenado, formando a fase lamelar sólido-cristalina ou fase gel (L_β).

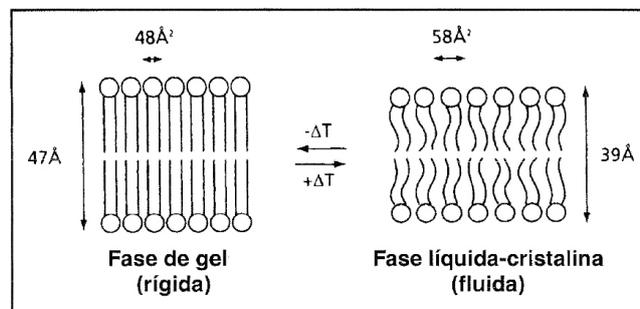


Figura 7 – Principais fases físicas que uma bicamada lipídica pode adotar em função da temperatura do sistema. Adaptado de [10].

A transição da fase gel para a fase fluída é um processo altamente endotérmico acompanhado por uma variação de entalpia (ΔH) requerida para quebra de ligações Van der Waals entre as “cabeças” lipídicas vizinhas. A temperatura de transição de fase principal (T_m – do Inglês *main transition temperature*) pode variar em função da natureza dos lípidos que constituem a bicamada e, mais precisamente, do grau de insaturação das cadeias acílicas (quanto maior o grau de insaturação, menor a T_m); do comprimento das cadeias de ácidos gordos (quanto maiores forem as cadeias, maiores são as forças de Van der Waals entre estas, e portanto, maior a T_m) e da natureza dos grupos polares (que podem dificultar o empacotamento e favorecer a fase fluída, diminuindo a T_m) [42].

Para a **seleção da composição dos lipossomas** convém escolher **lípidos** que apresentem uma **T_m superior à temperatura fisiológica** para que, quando estes forem sujeitos à temperatura fisiológica, não libertem tão facilmente o material encapsulado. No entanto, a incorporação de material nos lipossomas normalmente é mais elevada se estes apresentarem maior fluidez, pelo que a composição dos lipossomas também deverá incluir lípidos que apresentem uma **T_m mais baixa**.

- e) Uma outra vantagem dos lipossomas é o facto de estes agregados apresentarem boa estabilidade e possuírem um **tempo de vida útil longo**.
- f) Os lipossomas apresentam também como vantagem o facto de **libertarem o agente terapêutico** no alvo específico **em resposta a certos estímulos**: biológicos (variações de pH e de temperatura no organismo) ou externos (campo magnético, ultrassons). O pH intracelular e extracelular de sistemas biológicos são extremamente afetados por doenças. O pH extracelular num tumor sólido tende a ser mais ácido (~ 6,5) do que o pH do soro fisiológico (7,4), a 37 °C [47]. Por este motivo, nanossistemas transportadores de fármacos que sejam sensíveis às variações de pH podem ser utilizados para transporte e libertação do fármaco no local específico. A temperatura também pode ser utilizada para libertação específica, uma vez que podem ser desenvolvidos nanovetores que libertem o fármaco apenas em temperaturas superiores a 37 °C.
- g) Os lipossomas são muito utilizados quando são necessários sistemas de interpretação mais simples para **mimetizar o ambiente biofísico e químico das membranas biológicas**, pois possuem, tal como a membrana celular, uma estrutura lamelar em bicamada lipídica com uma natureza anfifílica e gradiente de fluidez e **conseguem transportar-se através delas devido ao seu pequeno tamanho**. O fármaco pode ser entregue nas células-alvo através de certas modificações de superfície de membrana, tais como fusão, a adsorção, a troca de lípido ou endocitose [48, 49] (Figura 8).



Figura 8 - Interações entre os lipossomas e a membrana celular.

- h) Os lipossomas têm também a vantagem de permitirem a **manipulação da carga de superfície**. De acordo com a carga dos grupos polares dos lípidos que os constituem, os lipossomas podem ser carregados positiva ou negativamente; podem ter características isoelétricas ou podem ainda ser desprovidos de carga [42]. Os lipossomas neutros são mais instáveis (têm tendência a agregar-se), daí que se dê maior preferência a formulações com carga.

- i) Os lipossomas possibilitam o **acoplamento de moléculas que aumentam o seu tempo de circulação**. Uma das técnicas mais utilizadas para aumentar o tempo de circulação no corpo é a realização de um revestimento (*coating*) com polietilenoglicol (PEG) nas vesículas, através de uma técnica chamada de PEGuilação. O PEG é considerado um polímero inerte biocompatível [50] (embora estudos recentes considerem que lipossomas com PEG anteriormente considerados biocompatíveis podem induzir certas reações secundárias através da ativação do sistema complemento [51, 52]), possui um peso molecular e estrutura que pode ser modelada para efeitos específicos e é fácil de conjugar e acoplar aos lípidos lipossomais. Ao ser biocompatível, permite que os lipossomas possam circular o tempo suficiente dentro do organismo sem serem reconhecidos como um “corpo estranho”. Esta camada hidrófila protetora aumenta o efeito de impedimento estérico evitando a ligação das proteínas do plasma à superfície lipossomal e pode aumentar a solubilidade e reduzir a imunogenicidade dos lipossomas [53]. No entanto, a camada de PEG à superfície dos lipossomas pode neutralizar ou reduzir a carga superficial e logo o potencial zeta dos lipossomas carregados, tornando-os menos estáveis em períodos de armazenamento.
- j) Os lipossomas possibilitam o **acoplamento de moléculas à sua superfície que permitem um direcionamento específico (passivo ou ativo)** (Figura 9) e uma libertação controlada do fármaco. O **direcionamento passivo** é baseado na reduzida dimensão dos nanovetores transportadores do fármaco e nas cargas que elas apresentam, que os leva a entregar o fármaco, preferencialmente, no local do tumor. Acredita-se que um dos principais fatores que afeta a adesão celular e entrega do fármaco é a carga [54]. Lipossomas com lípidos catiónicos têm maior propensão para se ligarem às células do que os com lípidos aniónicos devido à interação eletrostática com as células carregadas negativamente da membrana. Sendo assim, os lipossomas devido ao seu pequeno tamanho atravessam os poros com permeabilidade aumentada dos capilares em torno dos tumores e acumulam-se sistemicamente nos locais afetados (EPR) pois o tecido tumoral é pobre em drenagem linfática.
- Por outro lado, o **direcionamento ativo** envolve a conjugação de nanovetores com ligandos [47], como por exemplo, o folato. Estes ligandos ligam-se especificamente a certos

recetores expressos em células, o que permite que os nanovetores distribuam o fármaco apenas nessas células.

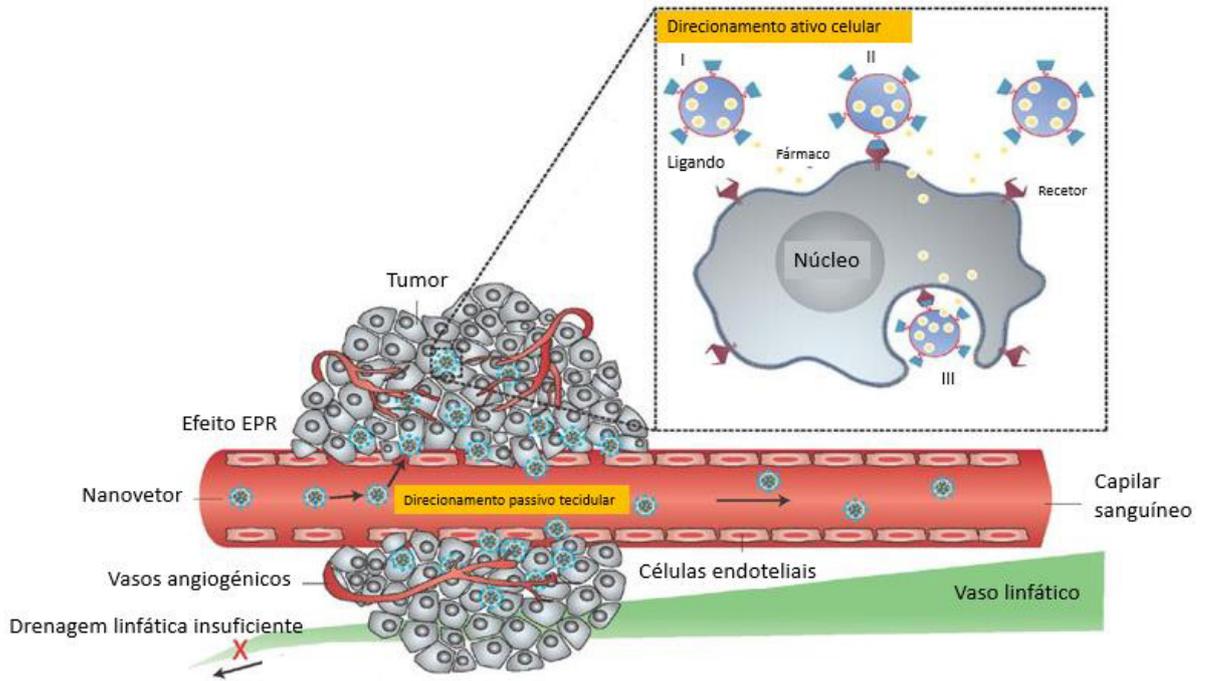


Figura 9 - Direcionamento ativo e passivo do nanovetor. Adaptado de [4].

Estima-se que estes sistemas de entrega de fármacos possam utilizar uma quantidade 100 vezes menor de princípio ativo e apresentar uma eficiência aumentada em 100 vezes [55]. Multiplicando-se os valores, trata-se de um aumento de quatro ordens de grandeza no rendimento.

Em suma, face às vantagens dos lipossomas acima enumeradas, compreende-se a grande utilização destes sistemas para a entrega de fármacos. Os primeiros lipossomas foram desenvolvidos no início da década de 60 por Alec Bangham e mais tarde foram propostos como um dos mais bem-sucedidos sistemas de entrega de fármacos, existindo já mais do que 10 aprovados pela FDA [56] (Tabela 1). A Tabela 1 apresenta um breve resumo de nanovetores aprovados para a terapia do cancro, incluindo formulações lipossomais com doxorubicina (DOX) em fase de desenvolvimento.

Tabela 1 - Breve resumo de nanovetores aprovados para a terapia do cancro, incluindo formulações lipossomais com doxorubicina em fase de desenvolvimento [57]:

Nome	Descrição do Nanovetor	Fase de desenvolvimento	Objetivo
Doxil (EUA) ou Caelyx (Canadá e Europa)	Doxorrubicina lipossomal (SSL compostos de fosfolípidos de alta T_m (53 °C), colesterol, e um lipopolímero (2000PEG-DSPE)	Aprovado pela FDA em 1995	-Prolonga o tempo de circulação de fármacos e previne a sua eliminação pelo RES. -Sarcoma de Kaposi relacionado com o VIH, cancro metastático da mama e cancro do ovário
DaunoXome	Doxorrubicina lipossomal	Aprovado	Sarcoma de Kaposi relacionado com o VIH
Myocet	Doxorrubicina lipossomal	Aprovado	Cancro metastático da mama EGFR2-positivo
Abraxane	Paclitaxel ligado a albumina	Aprovado	Cancro de mama metastático
DepoCyt	Citarabina lipossomal	Aprovado	Meningite linfomatosa intratecal
Marqibo	Sulfato de vincristina lipossomal	Aprovado	Leucemia linfoblástica aguda
Oncaspar	Nanopartícula polimérica de PEG-L-asparaginase	Aprovado	Leucemia linfoblástica aguda
Zinostatin stimalamer	Nanopartícula polimérica de ácido esteárico-málico conjugado com neocarzinostatina	Aprovado	Carcinoma hepatocelular metastático
Resovist	Nanopartícula de carboxidextrano revestido com SPIO	Aprovado	Agente de contraste para imagem de ressonância magnética para carcinoma hepatocelular
Genexol-PM	Nanopartícula polimérica metoxi-PEG-poli (D, L-lactico) de paclitaxel	Aprovado	Cancro de mama metastático
NanoTherm	Nanopartícula de aminossilano revestido com SPIO	Aprovado	Ablação local de glioblastoma multiforme
ThermoDox	Nanopartícula lipossomal com libertação térmica de doxorubicina	Fase 3	Carcinoma hepatocelular
MCC-465	Doxorrubicina lipossomal com alvo para o fragmento de anticorpo humano	Fase 1	Cancro do estômago metastático

Lista de abreviaturas: SSL- Lipossomas estericamente estabilizado; 2000PEG-DSPE- polietilenoglicol diestearoil fosfatidil etanolamina; RES- sistema reticuloendotelial; VIH - vírus da imunodeficiência humana; EGFR2 - recetor do fator de crescimento epidérmico 2; SPIO - óxido de ferro superparamagnético.

Atualmente, de entre as três formulações lipossomais de DOX aprovadas (DaunoXome, Myocet e Doxil), a Doxil é o produto mais bem-sucedido e foi o primeiro nanossistema para transporte de fármacos a ser aprovado pela FDA, em 17 de Novembro de 1995.

1.4. Sistema lipossomal DODAB:MO (1:2)

1.4.1. Composição e polimorfismo lipídico

A formulação lipossomal desenvolvida neste projeto é constituída por um lípido catiónico, brometo de dioctadecildimetilamónio (DODAB) e um lípido neutro, monoleína (MO), numa razão molar de um para dois (1:2).

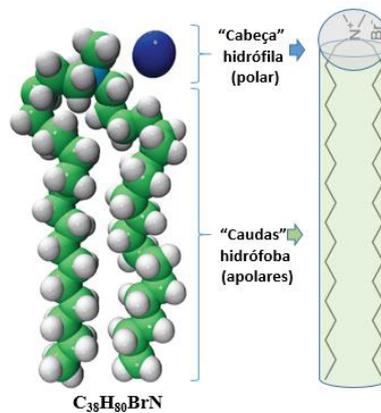


Figura 10 - Estrutura química, geometria do monómero e modelo molecular do lípido catiónico DODAB. Adaptado de [15].

O lípido DODAB foi sintetizado pela primeira vez por Kunitake e Okahata [58, 59]. Selecionou-se o lípido DODAB porque é um tensoativo de cadeia dupla de ácidos gordos saturados (C18:0), ligados a um catião quaternário de amónio, que lhe confere a carga positiva (Figura 10).

Esta carga positiva promove a internalização pelas membranas celulares (apresentam carga ligeiramente negativa) e a complexação de ácidos nucleicos (apresentam carga negativa devida ao grupo fosfato) (Figura 11).

A temperatura de transição da fase gel para líquida-cristalina (T_m) do DODAB dá-se aos 45°C [59, 60]. Esta T_m alta permite que este lípido quando aquecido acima da T_m , ou seja, acima dos 45 °C, se encontre numa fase líquida-cristalina e seja bastante permeável para encapsular o fármaco [10, 61] e quando no corpo humano (~ 37 °C), se encontre numa fase gel, estável para manter o fármaco encapsulado, sem a sua libertação imediata.

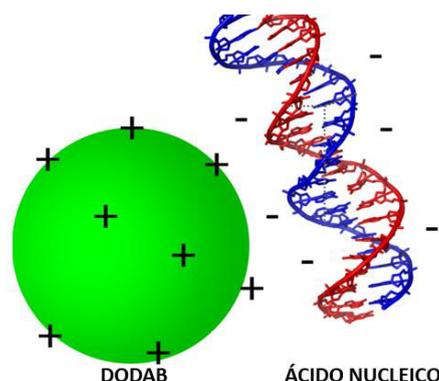


Figura 11 - Complexação de ADN em lipossomas contendo o lípido DODAB. Adaptado de [11] [20].

Mas o aumento da rigidez dos lipossomas exclusivamente constituídos por DODAB pode limitar a libertação do fármaco no corpo. Este facto pode ser atenuado pela adição de um lípido auxiliar que confira fluidez à formulação, como por exemplo, dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), a monoleína (MO) e o colesterol (CHOL) [62, 63].

A MO é um agente emulsificante de origem natural que favorece a formação de vesículas e confere fluidez à formulação lipídica contendo fármacos. Em 1984 foi apresentada pela primeira vez como um material de encapsulação biocompatível com propriedades controladas de libertação. Apresenta baixo custo, é biocompatível, biodegradável e não apresenta toxicidade [64, 65].

É uma molécula anfifílica neutra, com uma cadeia de hidrocarboneto C18, com uma ligação dupla *cis* na posição 9,10 (do ácido oleico) (Figura 12) e apresenta uma T_m a 32 °C [59].

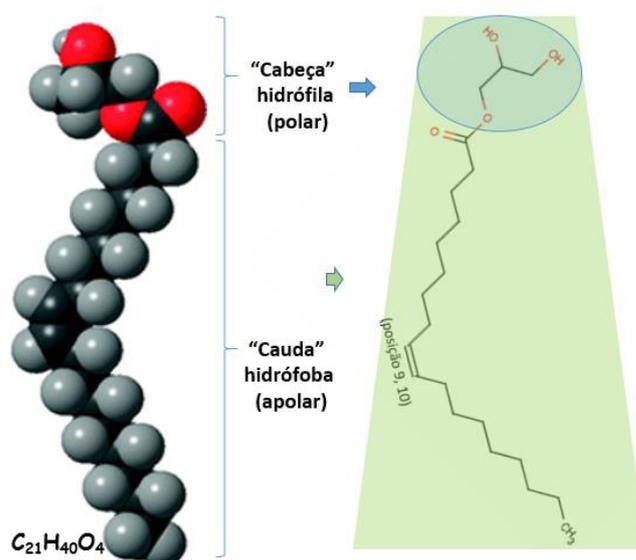


Figura 12 - Estrutura química, geometria do monómero e modelo molecular do lípido MO. Adaptado de [12].

A orientação *cis* da ligação dupla promove um maior efeito estérico da cadeia de alquilo, o que conduz à formação de estruturas não lamelares invertidas, caso o fator de forma (γ) seja maior do que um. Uma molécula de glicerol é ligada à cadeia de hidrocarbonetos por uma ligação éster. Os dois hidroxilos livres constituem a parte hidrófila da molécula.

Segundo o diagrama de fases da MO, esta apresenta duas fases cúbicas bicontínuas invertidas (diamante ou Q_{II}^D e giróide ou Q_{II}^G) diluídas [66], que originam estruturas não-lamelares com curvatura negativa (Figura 13), o que a torna uma molécula versátil podendo ser incluída em diferentes sistemas.

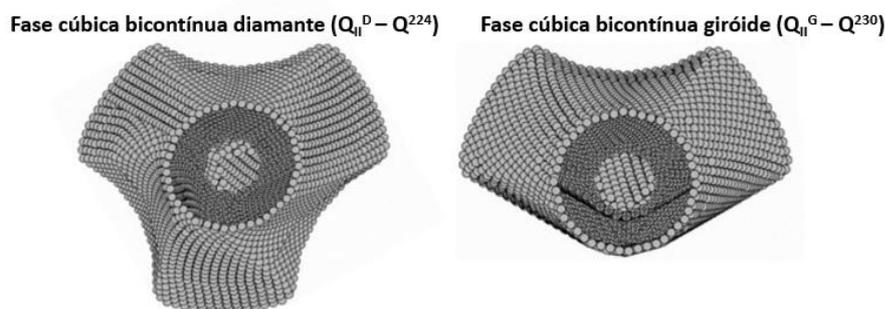


Figura 13 - Fases cúbicas bicontínuas (diamante e giróide) da monoleína, originam estruturas não-lamelares com curvatura negativa [18].

A razão molar de DODAB:MO (1:2) desenvolvida neste projeto promove a formação de fases lamelares de DODAB, contendo MO em fases não-lamelares invertidas. Desta forma, a fase lamelar de DODAB fornece à vesícula a rigidez estrutural necessária para a retenção do fármaco encapsulado, e as fases não-lamelares invertidas da MO concedem uma fluidez importante para fins de encapsulação [64]. A existência de fases não lamelares invertidas na formulação tem ainda a vantagem de promover o aumento da mobilidade lateral da cadeia lipídica que por sua vez, provoca uma melhoria na fusão dos lipossomas com a membrana das células [67]. Para além disso, o carácter fusogénico da MO promove a fusão entre as membranas dos lipoplexos e das células [63]; melhora a libertação endossomal, facilitando a libertação do conteúdo vesicular [68]. A MO é também útil para reduzir a carga global positiva de lipoplexos, pois a complexação de ácidos nucleicos (que têm carga negativa) dá-se quando o lipossoma tem carga positiva, mas uma alta carga positiva está associada a citotoxicidade. Logo a MO ao reduzir a carga global do nanossistema, diminui a citotoxicidade associada a transfecção [63].

1.4.2. Aplicações

O sistema DODAB:MO tem mostrado resultados promissores e tem sido aplicado, pelo grupo de investigação em que me inseri, para a formação de lipoplexos constituídos por:

- ADN/DODAB:MO (2:1; 1:1 e 1:2) [66] (1:2 e 1:4) [69] para transfecção;
- pADN(pSV- β -galactosidase)/DODAB:MO (4:1, 2:1 e 1:1) para transfecção eficaz de células de rim embrionárias humanas (293T), sem induzir citotoxicidade significativa [70];
- siARN/DODAB:MO para silenciamento de genes em linhas celulares de carcinoma pulmonar de não pequenas células (H1299 EGFP) e com baixa toxicidade [71].

Tendo por base o sucesso obtido com estas formulações, pretende-se no presente trabalho utilizar as vantagens da formulação acima enumeradas para o encapsulamento de um fármaco anticancerígeno, a DOX, que a seguir se descreve.

1.5. Doxorubicina

Selecionou-se a DOX como o fármaco anticancerígeno para encapsular em lipossomas por vários motivos, que se descrevem de seguida.

1.5.1. Características físico-químicas da doxorubicina

a) Características anfifílicas que favorecem o transporte da DOX por lipossomas.

A DOX é uma molécula anfifílica, constituída por um anel tetraciclina hidrofóbico que está ligado, através de uma ponte glicosídica, a um aminossacarídeo hidrofílico, a daunosamina (Figura 14). Esta característica, dependente do pH, permite que a DOX seja transportada quer no núcleo interno aquoso dos lipossomas, quer na sua membrana lípida.

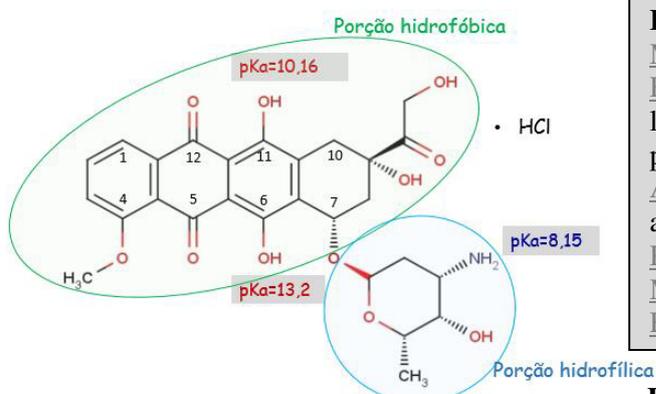


Figura 14 - Representação estrutural da DOX na sua forma neutra e suas propriedades físico-químicas. A estrutura química foi elaborada em *software* MarvinSketch®.

Fórmula molecular: C₂₇H₂₉NO₁₁. HCl

Massa Molar: 579,98

Estabilidade: estável por 24 meses na forma liofilizada e 3 meses em solução (armazenada protegida da luz)

Aspeto: pó cristalino higroscópico, composto de agulhas finas de laranja-vermelho.

Pureza: 99% [17]

Metabolização: essencialmente hepática [22]

Excreção: biliar e não se acumula no fígado [1, 3]

Propriedades Físicas [1]:

Ponto de fusão: 229-231 °C

pKa: pka1= 8,15; pka2= 10,16 e pka3= 13,2 [9]

Log P: 1,36

LogD: 0,74

b) Fraca solubilidade da DOX em solução aquosa.

A DOX é solúvel em dimetil-sulfóxido (DMSO) (100 mg/mL), solúvel em água com aquecimento (10 mg/mL) e muito pouco solúvel em etanol [72].

A encapsulação de fármacos lipófilos como a DOX em lipossomas proporciona um aumento da sua solubilidade em água e melhora a permeabilidade aos tecidos tumorais.

c) Não tem um peso molecular suficiente:

O peso molecular da DOX é de 0,54 kDa, não sendo suficiente para se conseguir difundir através dos capilares para o tumor, pois a pressão intersticial nos tumores é elevada e limita a entrada de micromoléculas [2, 73]. Assim sendo, a encapsulação da DOX em lipossomas favorecerá a entrada do fármaco nos tecidos tumorais.

d) A DOX possui três formas prototrópicas com 3 pKa associados.

A DOX é uma molécula anfótera pois o grupo amina protonável do radical açúcar ($pK_{a1}=8,15$) confere-lhe características básicas, enquanto os anéis fenólicos desprotonáveis (em C_{11} com $pK_{a2}=10,16$ e em C_6 com $pK_{a3}=13,2$) [74, 75] conferem-lhe características ácidas [76] (Figura 14).

A desprotonação das funções fenólicas do cromóforo leva a uma modificação do espectro UV/visível, causando um desvio para o vermelho. A DOX é descrita como apresentando cor laranja a um pH 7, violeta a um pH 11 e azul a pH 13 [77, 78].

e) Propriedades espectrais de absorvância e fluorescência:

A estrutura tetracíclica da DOX contém um anel hidroquinona e quinona (Figura 15). O anel quinona é de especial interesse pelo seu potencial em gerar radicais livres, uma vez que pode funcionar como doador e recetor de eletrões [76] quando excitado com certa quantidade de energia, com determinado comprimento de onda. Estes eletrões ficam num estado excitado e quando regressam ao estado fundamental, emitem fluorescência. Esta estrutura aromática complexa absorve luz visível e ultravioleta, o que lhe confere cor vermelha-alaranjada.

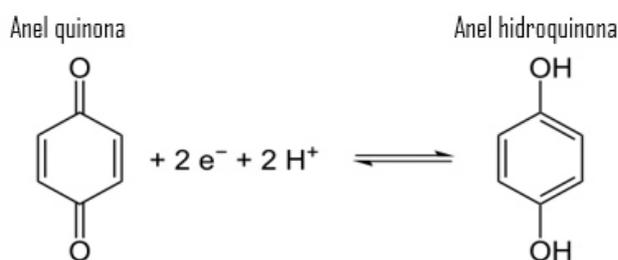


Figura 15 - Representação estrutural das interconversões redox entre os anéis quinona e hidroquinona [143].

As transições energéticas que ocorrem num átomo ou molécula podem ser determinadas através de um espectro de absorvância, que corresponde à medição da quantidade de luz absorvida em vários comprimentos de onda (λ), ou através de um espectro de fluorescência, que corresponde à medição da quantidade de fluorescência emitida em vários λ .

Os espectros de excitação e emissão de fluorescência da DOX são distintos e ambos são sensíveis ao ambiente (pH, sal, tipo de solvente, força iónica, etc.), o que permite avaliar o PK e a biodisponibilidade da DOX, por longos períodos de tempo [79].

O alto rendimento quântico de emissão de fluorescência e a sua elevada extinção molar permite a quantificação e localização rápida e exata da DOX, bem como a deteção da sua degradação química (combinada com um arranjo de díodos de cromatografia líquida de alta eficiência consegue-se seguir alguns produtos de degradação da DOX), o seu estado de agregação, assim como as mudanças no seu ambiente local (pH e grau de

hidrofobicidade) e a interação da DOX com o ADN e outras macromoléculas [79]. Outra grande vantagem da DOX é o seu longo comprimento de onda de emissão (> 550 nm).

1.5.2. Efeitos anticancerígenos e limitações terapêuticas da doxorubicina

1.5.2.1. Efeitos anticancerígenos da doxorubicina

a) **DOX é um anticancerígeno de 1ª linha para um amplo espectro de tumores.**

A DOX é o anticancerígeno mais conhecido e mais utilizado da classe das antraciclinas [80, 81]. As antraciclinas possuem atividade antibiótica e outras atividades de grande interesse farmacológico, como a atividade antitumoral, especialmente os fármacos DOX e a daunorrubicina [82, 83]. A DOX é considerada um dos principais fármacos antineoplásicos "de primeira linha" quase desde a sua descoberta.

A DOX foi originalmente isolada a partir da bactéria *Streptomyces peucetius var. caesius*, descoberta na década de 1960, perto do Mar Adriático, o que explica a origem do nome comercial adriamicina [78].

Clinicamente, a DOX é aplicada por injeção intravenosa como um fármaco livre ou sob a forma de uma formulação lipossomal contendo DOX [84]. Este fármaco tem uma ampla gama de aplicações clínicas contra uma panóplia de tumores, incluindo sarcoma de Kaposi, carcinoma, leucemia, mama, útero, ovário, pulmão [85], próstata [86], bexiga [87].

b) **A DOX interage com os ácidos nucleicos.**

A pH fisiológico, a DOX contém um grupo amina carregado positivamente que é atraído eletrostaticamente para os grupos fosfato dos ácidos nucleicos, carregados negativamente (Figura 16). Sendo assim, a estrutura planar do anel tetraciclina intercala-se entre os pares de bases das cadeias de ADN, sobretudo com a guanina [88], inibindo a enzima topoisomerase II de permitir o relaxamento do ADN superenrolado impedindo assim a ligação das cadeias do ADN, provocando ruturas simples e duplas dos filamentos. Desta forma, bloqueia-se a replicação de ADN e a transcrição do ARN [89], o que leva à morte celular.

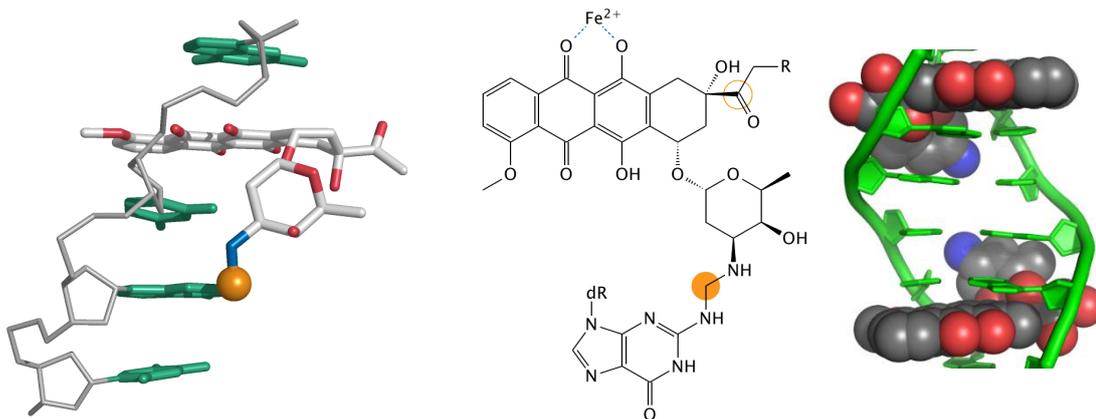


Figura 16 - Doxorubicina (R=OH) liga-se através do seu grupo amina à guanina do ADN. À esquerda visualiza-se uma cadeia de ADN a ligar-se à doxorubicina. À direita visualiza-se a doxorubicina a intercalar-se entre os pares de bases das cadeias de ADN (Adaptado de [144]).

Um efeito biológico adicional da DOX consiste na sua capacidade de gerar ferro catalisado a partir de radicais livres (H_2O_2 e HO^\bullet , que são altamente destrutivos para as células) que causam dano oxidativo ao ADN, proteínas e lípidos das membranas celulares, o que contribui para o seu efeito antitumoral.

Embora a DOX seja ativa durante todo o ciclo celular, a toxicidade máxima ocorre durante a fase de síntese (S) de ADN. Quando em baixas concentrações de fármaco, as células vão continuar a fase S, e morrer em G2 [90].

1.5.2.2. Limitações terapêuticas da doxorubicina

a) Cardiotoxicidade e outros efeitos secundários indesejáveis.

A DOX, tal como a maioria dos fármacos quimioterápicos, tem toxicidade e efeitos secundários ligados à sua utilização. A sua toxicidade mais perigosa é a cardiotoxicidade dependente da dose cumulativa, com uma incidência de cerca de 4% quando a dose é de 500-550 mg/m^2 , 18% quando a dose é de 551-600 mg/m^2 e 36% quando a dose excede 600 mg/m^2 , o que limita consideravelmente a utilidade do fármaco [91]. A sua toxicidade limitante pode levar à cardiomiopatia, que pode levar a insuficiência cardíaca congestiva e morte [92-94] (Figura 17). A toxicidade cardíaca é explicada devido à elevada afinidade que a DOX tem para com os fosfolípidos carregados negativamente, das membranas das mitocôndrias. O facto do músculo cardíaco ser rico em mitocôndrias explica, em parte, a alta cardiotoxicidade da DOX [93, 95].

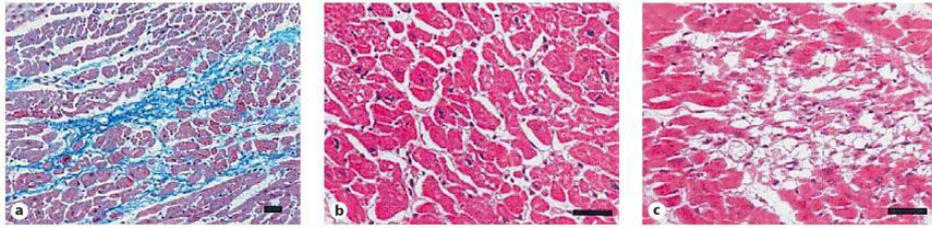


Figura 17 - a) Miocárdio normal com pouca ou nenhuma mudança na matriz extracelular e miócitos intactos.
b) Mesmas características mas em maior ampliação.
c) Perda de miócitos, desorganização da matriz e fibrose difusa indicando cardiotoxicidade da doxorubicina [7].

Estudos pré-clínicos demonstraram que a DOX encapsulada em lipossomas apresentava uma maior atividade anticancerígena e uma menor toxicidade do que a DOX livre, pois os lipossomas com cerca de 100-200 nm de tamanho facilmente extravasam os poros dos capilares (100-780 nm) ou lacunas na vasculatura que rodeiam as células tumorais [96], como por exemplo no fígado, medula óssea, baço e áreas de inflamação, excluindo o seu extravasamento em locais com junções capilares apertadas, como as do músculo do coração. Desta forma, reduz-se a cardiotoxicidade da DOX e consegue-se atingir as células-alvo e concentrar maior quantidade de fármaco nas mesmas, com menos efeitos nocivos sobre as células não-alvo, reduzindo-se as concentrações de fármaco necessárias para atingir o efeito terapêutico e, por conseguinte, reduz-se o custo da terapia [97].

A DOX, quando administrada na forma livre, apresenta outros efeitos secundários, tais como náuseas, vômitos e diarreia logo após a terapia, estomatite dentro de 7-10 dias após a administração, alopecia e reações cutâneas (hiperpigmentação da pele que recobre as veias usadas para a injeção, síndrome mão-pé [2] (Figura 21) e inchaço localizado. Provoca ainda uma elevada incidência de mielossupressão, tipicamente leucopenia e trombocitopenia. Em casos graves, pode levar a febre neutropénica e septicemia, requerendo hospitalização [98].

b) Eficácia de tratamento baixa devido à multirresistência a fármacos (MDR).

O tratamento padrão com DOX é feito por injeção venosa de uma dose relativamente elevada de DOX, na gama de 60 a 75 mg/m² que corresponde a 1,2-2,4 mg/kg de peso corporal. A DOX não é administrada oralmente devido à baixa absorção pelo sistema digestivo. O tratamento por administração endovenosa leva a um baixo índice terapêutico para os tumores cutâneos e causa vários efeitos secundários. Independentemente da sua forma de administração, a eficácia global da DOX no tratamento do cancro é baixa, devido à multirresistência a fármacos (MDR). A MDR é a capacidade das células tumorais, expostas a um único fármaco, desenvolverem resistência a uma vasta gama de fármacos.

As células tumorais são cinco vezes mais sensíveis a químicos que as células normais mas perdem essa sensibilidade e ficam resistentes. Acredita-se que o fenômeno MDR está relacionado com o aumento da produção da glicoproteína-P (gp-P), sobre-expressa em células resistentes a fármacos. A gp-P, com peso molecular de 170-180 kDa [99], atua como uma bomba de efluxo de fármacos, dependente de ATP, ou seja, promove ativamente a saída do agente quimioterápico antineoplásico para fora do citoplasma ou expelle-o a partir da bicamada lipídica que constitui a membrana celular (Figura 18).

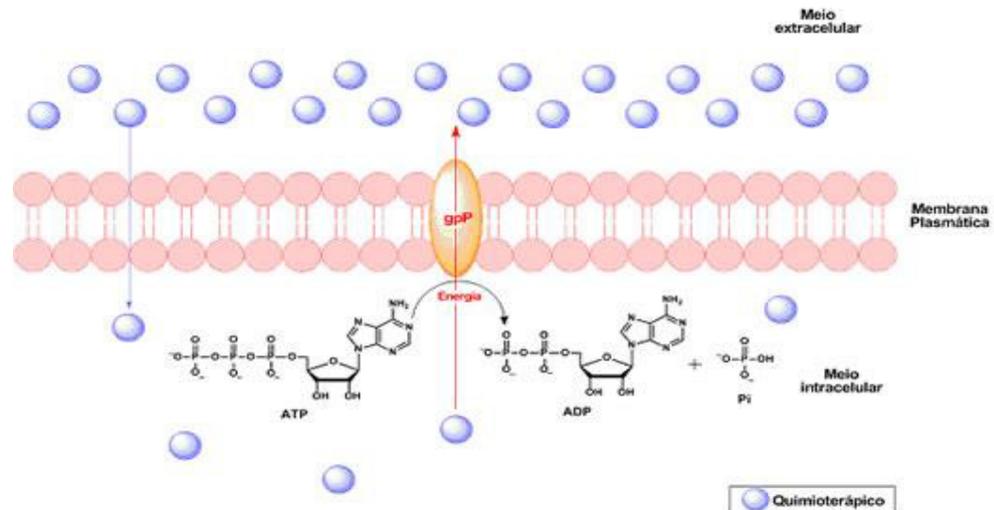


Figura 18 - Atividade da glicoproteína-P. A ilustração demonstra que o transportador utiliza a energia do ATP para o efluxo ativo de quimioterápicos através da membrana plasmática [145].

A gp-P, tal como outras proteínas relacionadas com a MDR, pode afetar a atividade dos fármacos pela modificação da homeostasia do pH. Alterações no pH intracelular alteram a partição transmembranar ou o aprisionamento intracelular de fármacos. Quando o pH intracelular fica mais ácido, devido ao aumento da taxa de glicólise aeróbia em tumores e ao aumento da hipoxia em células vizinhas ao tumor, promove a protonação dos fármacos, que normalmente são bases fracas com $7,4 < pK_a < 8,2$, aumentando a afinidade de ligação dos fármacos no meio intracelular e/ou a secreção de organelos que acumulam os fármacos. No entanto, quando o pH de células sensíveis a fármacos é deslocado para o nível observado em células resistentes a fármacos (pH 10), estes não são acumulados [100]. Sendo assim, abordagens que afetem o pH podem potencializar os efeitos dos fármacos e reverter a MDR. Para reverter a MDR empregam-se agentes reversores da multirresistência a fármacos (MDRR) que têm como função ligarem-se à gp-P, bloqueando a bomba, diminuindo o efluxo de fármacos por esta proteína transportadora [101].

- c) **Formação de dímeros com menor efeito terapêutico.** A DOX tem propensão para formar dímeros em concentrações a partir de $1 \mu\text{M}$ [102]. Estes agregados aumentam de tamanho

com o aumento da concentração de DOX. Esta oligomerização resulta da interação entre os elétrons π dos anéis aromáticos planares, entre moléculas individuais, levando ao seu empilhamento. Acredita-se que a espécie antraciclina neutra, não protonada, é a espécie dominante envolvida na auto-associação [103]. A agregação induz uma diminuição significativa de fluorescência devido à formação de dímeros não fluorescentes [79, 89]. O efeito de oligómeros na eficácia terapêutica não é contudo claro. No entanto, a DOX não monomérica não pode interagir com o ADN da mesma forma que a monomérica, e a localização exata entre as duas cadeias de ADN deve diferir [104]. Portanto, a forma, monómero ou oligómero, através da qual a DOX é internalizada pela célula tumoral pode ser um fator importante na eficácia da terapêutica do fármaco, sendo a forma oligomérica a menos eficaz.

1.6. Encapsulação da doxorubicina em lipossomas: encapsulação ativa e passiva

Para tentar resolver a limitação da toxicidade da DOX, foram desenvolvidos estudos de encapsulação deste fármaco em lipossomas, por métodos de encapsulação ativa e passiva.

As primeiras formulações de lipossomas contendo a DOX foram produzidas por encapsulação passiva do fármaco. A **encapsulação passiva** ocorre durante a formação dos lipossomas ou na sequência do processo de hidratação do filme lípido seco com uma solução aquosa, que leva à obtenção de um certo volume aquoso dentro de cada lipossoma. A DOX como é uma molécula anfipática, dependendo do pH tem o potencial para residir no núcleo aquoso dos lipossomas, bem como na bicamada lipídica.

Normalmente, os métodos de encapsulação passivos não são tão eficientes (eficiência máxima de 80 %) [49] e a proporção máxima de fármaco-lípido obtida é baixa e depende da solubilidade máxima de DOX (<10 mM) [102].

A **encapsulação ativa** recorre a um gradiente transmembranar de pH ou de iões (ácido acético para os ácidos fracos e sulfato de amónio para as bases fracas) em lipossomas pré-formados para encapsular ácidos ou bases fracas anfipáticas, que no interior adquirem carga elétrica (o que impede a sua difusão pela membrana) e posteriormente precipitam. Nichols e Deamer foram os primeiros a demonstrar este tipo de encapsulação, mas com aminas anfipáticas em lipossomas, por meio de um gradiente de pH [105]. Em 1987, os criadores da formulação lipossomal Doxil conseguiram encapsular a DOX (base fraca anfipática) como se representa na Figura 19.

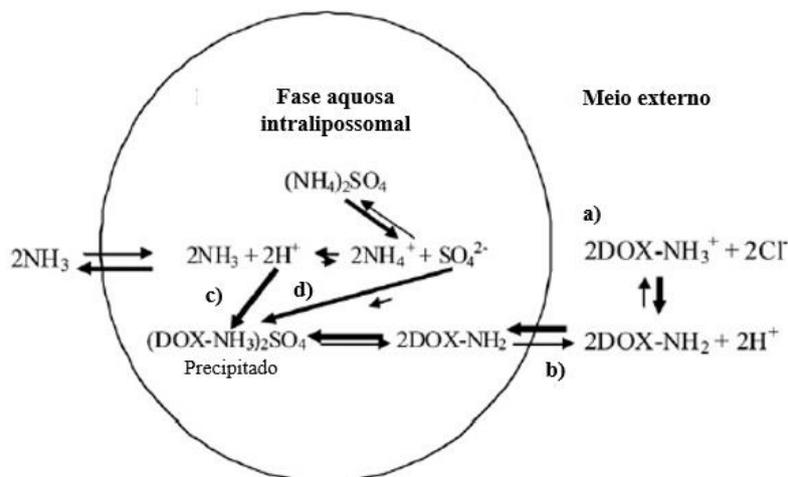


Figura 19 - Encapsulação ativa da doxorubicina em lipossomas exibindo gradiente transmembranar de iões promovido pelo amónio:

- a) Pelo método de gradiente de ião amónio, a DOX é adicionada aos lipossomas pré-formados na forma neutra devido ao grupo amina.
- b) DOX-NH₂ atravessa a membrana lipossomal.
- c) No interior ácido dos lipossomas, o grupo amónio (ião formador do gradiente) cede iões H⁺ à DOX, ficando esta carregada positivamente.
- d) Depois sofre conjugação com os aniões sulfureto (contra-ião do ião formador do gradiente) e precipita para controlar a eficiência e estabilidade da encapsulação, bem como a taxa de libertação da DOX a várias temperaturas.

→ Representa processos que ocorrem durante a encapsulação da DOX.

← Representa processos que ocorrem durante a libertação da DOX. Adaptado de [2].

A encapsulação ativa resulta em proporções de fármaco:lípido elevadas, de cerca de 48000 moléculas de DOX por lipossomas de 100 nm de diâmetro. Quanto à libertação do fármaco, estudos verificaram que este método de encapsulação da DOX permite uma libertação bifásica, que requer uma dissolução lenta do precipitado, seguida de difusão pela membrana. A vantagem deste tipo de encapsulação do fármaco é que este encapsulamento pode ser feito independentemente do tempo e do local de fabrico de lipossomas. O problema desta encapsulação, que pode afetar a eficácia terapêutica é a sua tendência para a auto-agregação a concentrações a partir de 1 µM, formando oligómeros cujos efeitos na eficácia terapêutica são ainda desconhecidos [104].

Apesar do sucesso da Doxil, algumas questões sobre a sua eficácia terapêutica se levantam, tais como:

- a) Não se conhece com certeza o efeito da oligomerização da DOX na intercalação do ADN, pelo que a DOX ativamente encapsulada na formulação de Doxil poderá ver o seu efeito terapêutico afetado devido à oligomerização. De facto, concentrações mais elevadas de DOX, como as obtidas pelos métodos de encapsulação ativa levam à formação de dímeros geometricamente mais volumosos que a molécula DOX isolada, o que possivelmente afetará a sua capacidade de intercalação no ADN e como tal o seu efeito como

anticancerígeno (Figura 20). O mesmo tipo de efeito redutor da capacidade anticancerígena da DOX e de outros citotóxicos foi verificado por associação destes com moléculas de cafeína, por um tipo de interação π - π semelhante à que ocorre entre duas moléculas de DOX;

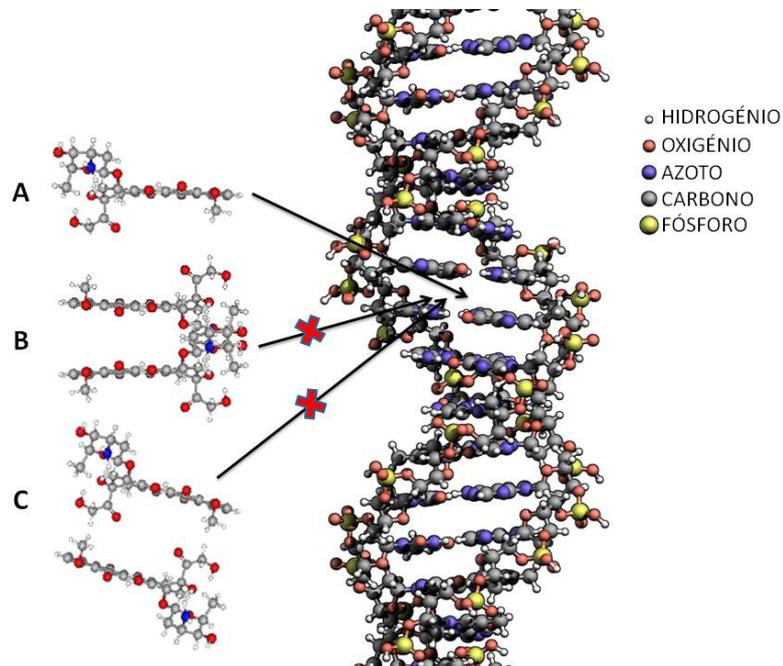


Figura 20 - Representação esquemática da molécula de ADN e do local de intercalação da doxorubicina monomérica (A). Elevadas concentrações de doxorubicina formam dímeros de geometria paralela (B) e antiparalela (C) provocando uma possível diminuição na intercalação no ADN por impedimento estérico.

b) Apesar de ser menos tóxica que a DOX livre, a Doxil (DOX em lipossomas) também apresenta efeitos secundários indesejáveis tais como: rubor e falta de ar durante a infusão intravenosa; eritrodisestesia palmo-plantar ou “síndrome da mão e do pé” que se manifesta como vermelhidão, sensibilidade, e descamação da pele das mãos e pés (Figura 21).



Figura 21 - Eritrodisestesia palmo-plantar ou “síndrome da mão e do pé” [146].

Uma das soluções apontadas para reduzir eritrodisestesia palmo-plantar seria reduzir um pouco o tempo de circulação da DOX lipossomal, substituindo o contra-íão de sulfato, o amónio pelo glucuronato que tem um coeficiente de permeabilidade semelhante ao sulfato mas não induz a precipitação de fármacos dentro dos lipossomas. O seu uso resulta num tempo de circulação da DOX um pouco mais curto que pode permitir uma menor acumulação de DOX na pele, reduzindo assim a gravidade do “síndrome da mão e do pé”, mas sem perda de eficácia terapêutica em camundongos portadores de tumor.

- c) O mecanismo de libertação da DOX e a sua internalização pelas células tumorais ainda não é conhecido (ou a DOX é internalizada na forma intacta e só dentro da célula ocorre a sua libertação ou então a DOX liberta-se no interstício tumoral e é absorvida pelas células tumorais) [2].
- d) Ao analisar imagens de microscopia eletrónica de transmissão com criogenia (cryo-TEM do inglês *Cryo-Transmission Electron Microscopy*) da Doxil consegue-se observar que os complexos de $(DOX)_2SO_4$ tocam a membrana vesicular forçando uma mudança de forma das vesículas esféricas para não-esféricas. No entanto, a membrana do lipossoma Doxil é robusta o suficiente para manter a integridade dos lipossomas (Figura 22). Mas esta mudança na forma de Doxil pode ser um dos fatores que levam à ativação do sistema complemento, provocando assim reações de toxicidade indesejáveis [2].

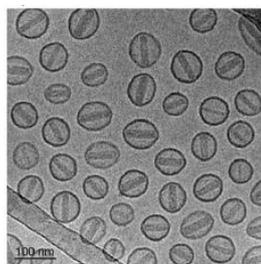


Figura 22 – Microscopia eletrónica de transmissão com criogenia (Cryo-TEM) da Doxil [2].

Estas limitações existentes na primeira formulação lipossomal de DOX apontam para o facto de haver ainda espaço para melhoria da formulação. Assim, na secção seguinte descrever-se-ão algumas propostas de melhoria às formulações lipossomais de DOX, algumas das quais foram concretizadas com este trabalho e outras que constituem as perspetivas futuras.

1.7. Características a manter e a alterar para melhorar a formulação lipossomal com doxorrubicina

Compreendendo a interação da DOX com o seu sistema veiculador permite-nos otimizar e alterar os sistemas de distribuição de fármacos já existentes ou criar um novo tipo de sistema de entrega de fármacos. Com base nas lições aprendidas com os vários estudos publicados até ao momento, é possível resumir algumas características que poderiam ser mantidas e outras que poderiam ser alteradas para melhorar ainda mais a formulação lipossomal com DOX para o tratamento do cancro:

a) Controlo de tamanho dos lipossomas.

Tamanho e polidispersão (PDI) são características muito importantes. Pretende-se portanto obter uma distribuição homogénea de nanovetores pequenos.

Alguns nanovetores propostos como veiculadores de DOX são demasiadamente grandes para permitir o extravasamento nos tecidos extra-hepáticos e para tirar proveito do efeito de EPR. Sendo assim, iremos desenvolver lipossomas do tipo LUVs com tamanhos de 100-200 nm, que são grandes o suficiente para evitar a captação pelo fígado, mas suficientemente pequenos para evitar a filtração pelo baço [53]. Os LUVs são mais adequados para a encapsulação de uma molécula anfipática como a DOX pois possuem uma interface hidrófila ao nível das cabeças polares e vacúolo aquoso e uma região lipófila na bicamada lipídica. São também de fácil e rápida preparação e detêm ainda uma elevada estabilidade e reduzidas interferências espectrais [23, 106].

b) Controle da carga de superfície dos lipossomas.

Alguns nanovetores propostos como transportadores de DOX incluem lípidos carregados negativamente, como o fosfatidilglicerol (PG). No entanto, a presença de uma fração molar elevada de PG na bicamada do lipossoma pode acelerar a absorção pelo RES e também podem induzir a ativação do sistema complemento [107].

Lipossomas com carga neutra também são indesejáveis por causa da instabilidade da formulação e porque a DOX liberta-se mais rapidamente de lipossomas neutros do que catiónicos e aniônicos porque estes últimos estabelecem forças repulsivas mútuas que os tornam mais estáveis a transportar e a aprisionar a DOX e promovem uma libertação mais prolongada e uma toxicidade e hemólise menor.

O ideal será uma carga ligeiramente positiva, que promove o direcionamento passivo, aumentando a absorção por parte das células, e adiciona a possibilidade de uma posterior complexação com os ácidos nucleicos, proporcionando um efeito terapêutico sinérgico (terapia medicamentosa e terapia génica).

c) Processo de encapsulamento da doxorubicina nos lipossomas.

Neste trabalho pretendemos resgatar a encapsulação passiva que evita a concentração e/ou precipitação de DOX no interior dos lipossomas e consequentemente evita a oligomerização. Além disso, a documentada coexistência de fases lamelares e não lamelares no sistema de transporte que irá ser utilizado [67] dá a possibilidade de encapsular o fármaco não só ao nível da bicamada, mas também no interior da fase não lamelar invertida de MO, o que pode levar a encapsulações próximas de 100 %.

d) Aumentar o tempo de circulação.

A capacidade do PEG para aumentar o tempo de circulação dos lipossomas depende tanto da quantidade de PEG adicionada como do comprimento, ou do peso molecular do polímero. Os maiores tempos de circulação no sangue foram relatados para lipossomas

com PEG de cadeia mais longa [108]. No caso da formulação desta dissertação, propomos como trabalho futuro a conjugação dos lipossomas desenvolvidos com PEG-CerC16-PE.

e) Acionar a liberação da doxorubicina.

Com as formulações conhecidas de DOX, a sua liberação é acionada pela presença de iões H^+ , como é o caso do meio ácido dos tecidos cancerígenos [2]. Em trabalhos futuros, a liberação de DOX será promovida pela incorporação de fosfato de dioctadecildimetilamónio (DODAP) na composição lipossomal, que é sensível ao pH.

f) Direcionamento ativo com hialuronato, manose e folato, bem como terapia sinérgica (com o fármaco encapsulado e complexação de ácidos nucleicos) e inibição da pg-P (glicoproteína P) são objetivos delineados para trabalhos futuros, que poderão enriquecer a formulação e torná-la mais eficiente.

Na Figura 23 pode-se observar a previsão do nanovetor multifuncional que foi desenvolvida no âmbito deste projeto (estratégias enumeradas acima como a), b) e c)) juntamente com algumas outras estratégias, ainda não desenvolvidas, mas que constituem as perspectivas futuras para o desenvolvimento final deste nanovetor (estratégias enumeradas acima como d), e) e f)).

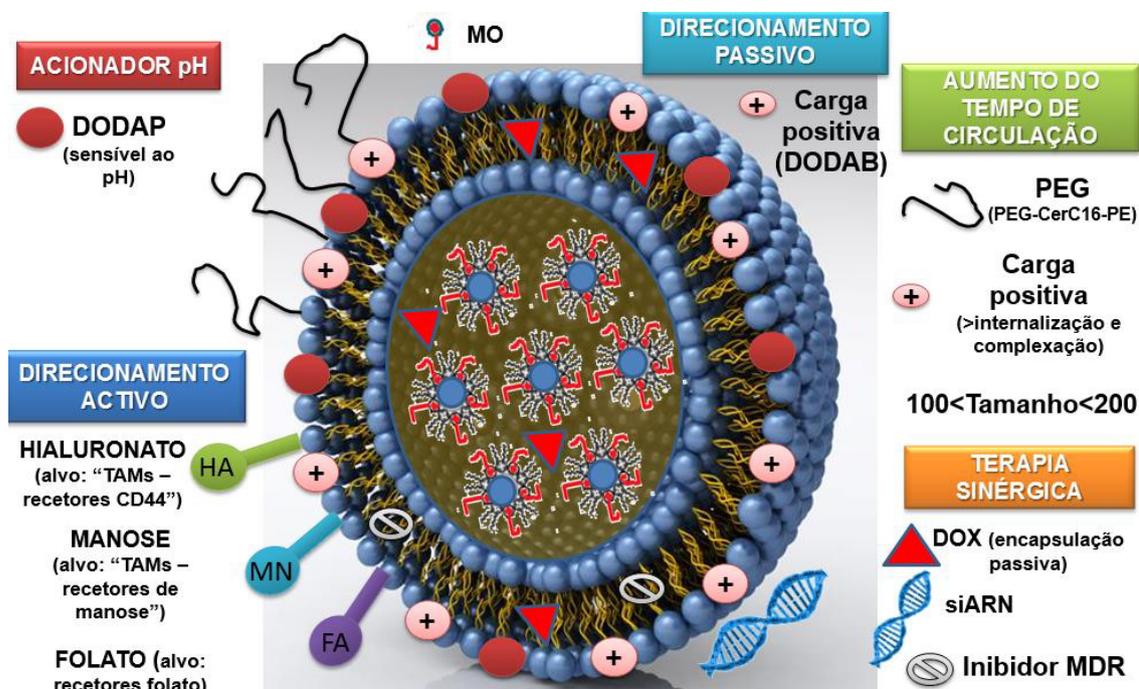


Figura 23 - Representação esquemática do nanovetor desenvolvido que consiste em lipossomas de DODAB:MO (1:2) contendo DOX encapsulada de forma passiva na bicamada lamelar de DODAB e no vacúolo contendo as estruturas não lamelares invertidas de MO. Outras estratégias apresentadas representam perspectivas futuras.

1.8. Objetivos do trabalho

1.8.1. Objetivo geral

O objetivo geral é desenvolver uma formulação lipossomal para a entrega do fármaco anticancerígeno DOX, que tenha potencial para ser aplicada na terapia cancerígena.

1.8.2. Objetivos específicos

Este projeto tem como objetivo o desenvolvimento de uma formulação lipossomal para a entrega de um fármaco anticancerígeno - a DOX.

Para tal percorreu-se uma série de etapas que se enumeram a seguir e que constituem os objetivos específicos do trabalho:

a) Determinação das curvas de calibração da DOX através de leitura, no espectrofotômetro e fluorímetro, de diferentes padrões de fármaco dissolvido em:

- água para determinar a sua eficiência de encapsulação (EE).

- tampão de pH 5 (mimetiza pH do tecido cancerígeno), pH 7,4 (mimetiza pH do soro) e pH 9 (muito próximo do pKa da DOX). Estas curvas em diferentes valores de pH servem para analisar as possíveis alterações de espectros e determinar a libertação controlada da DOX, *in vitro*, nos diferentes tecidos onde esta se irá distribuir e/ou acumular.

b) Desenvolver uma formulação lipossomal de DODAB:MO (1:2) com DOX encapsulada por três métodos: método de hidratação, incubação e inclusão direta e posterior análise do tamanho (com distribuições em intensidade e número), polidispersão (PDI), carga superficial e estabilidade ao longo do tempo, por técnicas de DLS (do inglês, *Dynamic Light Scattering* ou dispersão de luz dinâmica) e ELS (do inglês, *Electrophoretic Light Scattering* dispersão de luz eletroforética).

c) Determinação do coeficiente de partição da DOX em formulações lipossomais/água por espectroscopia derivativa, em que soluções aquosas de DOX são adicionadas a concentrações crescentes de lipossomas. Os brancos são preparados na ausência de DOX. Os perfis de retenção/libertação *in vitro* da DOX determinam-se por leitura das amostras e brancos, no espectrofotômetro, a seis temperaturas diferentes, abaixo e acima da T_m dos lípidos, de modo a imitar as membranas celulares a diferentes temperaturas e a dois valores de pH (5 e 7,4).

d) Ensaio de temperatura de transição de fase para testar as alterações biofísicas promovidas pela DOX em membranas de DMPC (modelo biomimético simples reconhecido da membrana celular) e na formulação DODAB:MO (1:2).

e) Avaliação da EE da DOX em formulações preparadas por três métodos de encapsulação diferentes. Para testar a EE tem de se centrifugar e separar a DOX encapsulada nos lipossomas,

da DOX não encapsulada e solubilizada no filtrado aquoso, para depois determinar a sua concentração em cada uma das frações, por leitura espectroscópica.

f) Teste de citotoxicidade pelo método SRB, numa linha de células cancerígenas (MDA-MB-468), por cálculo do IC₅₀ (concentração de DOX capaz de inibir 50% do crescimento celular).

CAPÍTULO II

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Na tabela 2 apresenta-se uma listagem de todos os materiais (reagentes e equipamentos) utilizados no decurso do presente trabalho:

Tabela 2 – Listagem de todos os materiais (reagentes e equipamentos) utilizados no decurso do presente trabalho

Materiais	Adquiridos de	Cidade, País
Acetato de sódio cristalino GR Hidróxido de sódio Ácido acético Etanol para análise HEPES ou ácido N-(2-hidroxietyl) piperazina-N-etanossulfónico	Merck KGaA	Darmstadt, Alemanha
Água ultrapura	Millipore Corporations	Massachusetts, EUA
Balança analítica	Denver Instrument	Nova Iorque, EUA
Banho de água quente	VWR	Wayne, EUA
Banho ultrassónico Branson 1200	Branson Ultrasonics	Danbury, EUA
Base Tris	Fisher Scientific	Leicestershire, Reino Unido
Clorofórmio MO Solução de hidróxido de sódio 50% em H ₂ O Sal de sódio de sulforrodamina B DOX Tripsina	Sigma – Aldrich	St. Louis, Missouri (EUA) e Reino Unido
Célula capilar de potencial zeta descartável Zetasizer Nano ZS Malvern	Malvern Instruments Ltd	Worcestershire, Reino Unido
Células de quartzo	Hellma Analytics	Müllheim, Alemanha
Centrífuga 5804 R	Eppendorf	Nova Iorque, EUA
Células de poliestireno descartáveis de 10x10x45 mm Filtros-R estéreis apirogénicos (0,2 µm e 0,45 µm)	Sarstedt AG&Co	Nümbrecht, Alemanha
Dispositivos de filtração centrífuga Amicon com filtros de 50 kDa (50 000 MWCO)	Merck Millipore Ireland Ltd	Tullagreen, Irlanda
DMEM	Biochrom	Alemanha
DODAB	Tokyo Chemical Industry Co. (TCI)	Toshima, Japão
Espectrofotómetro de varredura UV-3101PC UV-Vis-NIR	Shimadzu Corporation	Tóquio, Japão
Estufa Memmert U40	Memmert	Schwabach, Alemanha
Extrusor Lipex	Northern Lipids Inc.	Burnaby, Canadá
FBS	Invitrogen	EUA
Filtros de membrana de polycarbonato Nuclepore Track-Etched	Whatman	Kent, Reino Unido
Fluorímetro Perkin Elmer LS 50	Perkin Elmer	Waltham, Massachusetts (EUA)
Gás Nitrogénio	Alphagaz™	Algés, Portugal

Leitor de microplacas de absorção UV-Vis SpectraMax Plus 384	Molecular Devices	Califórnia, EUA
Linhagem celular MDA-MB-468	ATCC® HTB-132™	Maryland, EUA
Metanol	Carlo Erba Reagents	Val de Reuil, França
PBS (Cloreto de potássio Cloreto de sódio Di-Sódio Hidrogeno Fosfato 12-hidrato Potássio di-hidrogénio fosfato)	Panreac AppliChem	Barcelona, Espanha
pHmetro de bancada 691	Metrohm	Herisau, Suíça
Seringas e filtros descartáveis e estéreis 0.2 µm	Corning	Califórnia, EUA
Vórtex Genie™	Scientific industries, Inc.	Nova Iorque, EUA

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação das formulações lipossomais DODAB:MO (1:2)

Antes de iniciar qualquer um dos métodos de encapsulação da DOX a seguir descritos, prepararam-se os lipossomas DODAB:MO (1:2) sem DOX, ou seja, a formulação placebo, em triplicado. Para tal, prepararam-se soluções *stock* etanólicas 20 mM de lípidos DODAB e MO. Volumes definidos (500 µL de DODAB e 1000 µL de MO) foram retirados da solução *stock* de lípidos DODAB e MO (20 mM) em etanol e foram colocados num balão de fundo redondo. (Figura 24). Após a sua utilização, as soluções *stock* foram armazenadas no frigorífico para manter a estabilidade e foram colocadas num recipiente fechado que tem de ser rapidamente selado para diminuir o risco de contaminação até haver necessidade de as usar novamente.

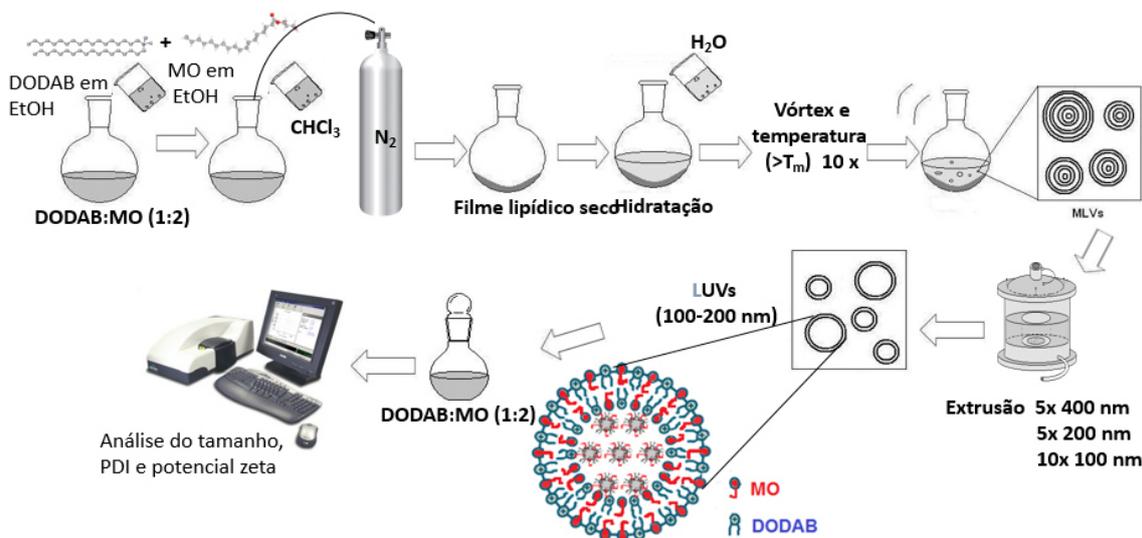


Figura 24 - Preparação de lipossomas DODAB:MO (1:2) pelo método de hidratação do filme lipídico.

À mistura etanólica de lípidos adicionou-se aproximadamente 10 mL de um solvente orgânico, o clorofórmio, para ajudar a solubilizar as substâncias e obter uma mistura homogênea. De seguida levou-se o balão para a *hotte* onde lhe foi aplicada um fluxo constante de gás nitrogénio,

com um movimento de rotação constante do balão para que todos os vestígios de solventes orgânicos evaporassem e se formasse um filme lipídico seco, tão fino quanto possível, na parede do balão. O solvente tem de ser removido de modo uniforme para evitar a cristalização de certos componentes lipídicos, que conduz a uma mistura de lípidos menos homogênea.

Hidratou-se o filme lipídico seco com 5 mL de água ultrapura e procedeu-se ao aquecimento da suspensão obtida acima da T_m do lípido com maior T_m (60 °C), alternando com agitação mecânica vigorosa no vórtex, a fim de retirar todo o filme fixado na parede do balão e obter uma suspensão com lipossomas multilamelares de DODAB:MO (1:2), com uma concentração final de 6 mM. Estes MLVs vão passar repetidamente por um extrusor *Lipex*, sob pressões de 6-8 bar, termostaticado a uma temperatura superior à temperatura de transição dos lípidos (60 °C), através de filtros de membranas de policarbonato *Nuclepore Track-Etched* com diferentes diâmetros de poro, escolhidos em função do tamanho final pretendido. Fez-se 5 passagens por um filtro de 400 nm, depois 5 passagens por um de 200 nm e no final 10 passagens por um de 100 nm, resultando na produção de LUVs, homogêneos em termos de diâmetro médio, de 100-200 nm. O uso de filtros com tamanho de poro maior, seguido por tamanhos de poros menores é necessário para se obter uma suspensão com uma distribuição homogênea de tamanho.

A extrusão possui algumas desvantagens: pode alterar a estrutura dos lipossomas assimétricos; pode diminuir a eficácia de encapsulação e para obter um tamanho pequeno de vesículas é recomendado proceder a mais de dez ciclos de extrusão através de uma membrana com um tamanho de poro inferior a 200 nm [34].

Repetiu-se este processo de hidratação do filme lipídico e extrusão para mais duas suspensões de lipossomas DODAB:MO (1:2), para obtermos triplicados da formulação placebo.

Após o processo de extrusão, as amostras foram armazenadas num frigorífico a 4 °C, até à análise de tamanho e carga de superfície no Zetasizer Nano ZS Malvern.

2.2.2. Preparação das formulações lipossomais DODAB:MO (1:2) contendo doxorrubicina

2.2.2.1. Método de hidratação

Retiraram-se 500 µL de DODAB e 1000 µL de MO das soluções *stock* de lípidos DODAB e MO (20 mM) em etanol e foram colocados num balão de fundo redondo (Figura 25). Adicionou-se aproximadamente 10 mL de clorofórmio e aplicou-se gás N₂ até se formar o filme lipídico seco na parede do balão. Hidratou-se o filme lipídico seco com uma solução de DOX (5x10⁻⁶ M) dissolvida em água ultrapura e procedeu-se ao aquecimento da solução a 60° C, ou seja, acima da T_m do lípido com maior T_m (45 °C), alternando (10 vezes) com agitação mecânica

vigorosa no vórtex, a fim de retirar o filme lipídico da parede e obter uma suspensão com vesículas multilamelares (MLVs) de DODAB:MO (1:2), com uma concentração final de 6 mM e com a DOX encapsulada.

Seguidamente procedeu-se à extrusão da suspensão de MLVs, fazendo-a passar 5 vezes através de um filtro de membrana de polycarbonato de 400 nm, 5 vezes pelo filtro de 200 nm e 10 vezes no de 100 nm, em condições de elevada pressão (6-8 bar) e a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase dos lípidos (60 °C). Com a extrusão formaram-se LUVs de DODAB:MO (1:2) com a DOX encapsulada.

Repetiu-se a hidratação e extrusão para mais duas concentrações de DOX em água (5×10^{-5} e 5×10^{-4} M). Após o processo de extrusão, as amostras foram armazenadas num frigorífico até serem analisadas no Zetasizer Nano ZS Malvern.

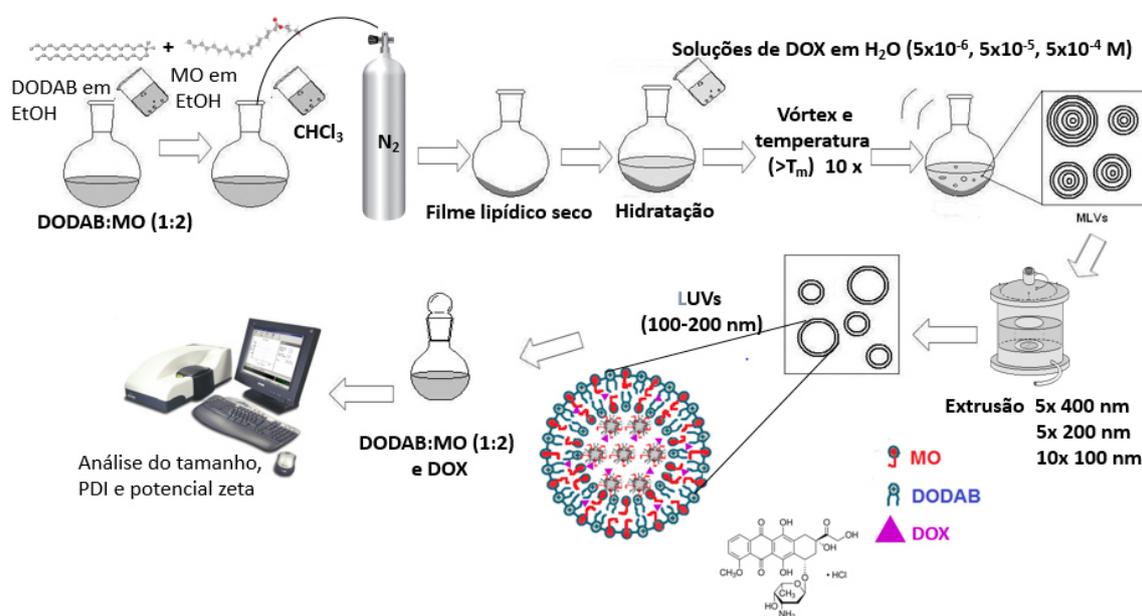


Figura 25 - Método de encapsulação da doxorrubicina por hidratação do filme lipídico.

2.2.2.2. Método de incubação

Retiraram-se 500 µL de DODAB e 1000 µL de MO das soluções *stock* de lípidos DODAB e MO (20 mM) em etanol e foram colocados num balão de fundo redondo (Figura 26). Adicionou-se aproximadamente 10 mL de clorofórmio e aplicou-se gás N₂ até se formar o filme lipídico seco na parede do balão. Hidratou-se o filme lipídico seco com 5 mL de água ultrapura e procedeu-se ao aquecimento da solução a 60° C, ou seja, acima da T_m do lípido com maior T_m (45 °C), alternando 10 vezes com agitação mecânica vigorosa no vórtex, a fim de retirar o filme lipídico da parede e obter uma suspensão com vesículas multilamelares (MLVs) de DODAB:MO (1:2), com uma concentração final de 6 mM.

Seguidamente procedeu-se à extrusão da suspensão de MLVs, fazendo passar 5 vezes através de um filtro de membrana de polycarbonato de 400 nm, 5 vezes pelo filtro de 200 nm e 10 vezes no de 100 nm, em condições de elevada pressão (6-8 bar) e a uma temperatura superior à temperatura de transição dos lípidos (60 °C). Depois da extrusão adicionou-se aos LUVs uma solução aquosa de DOX para obter uma concentração final de 5×10^{-6} M. Incubou-se a solução de DOX com os lipossomas acima da T_m (50 °C) durante 30 minutos.

Repetiu-se este método para obter mais duas concentrações finais de DOX (5×10^{-5} e 5×10^{-4} M). Após o processo de extrusão, as amostras foram armazenadas num frigorífico até serem analisadas no Zetasizer Nano ZS Malvern.

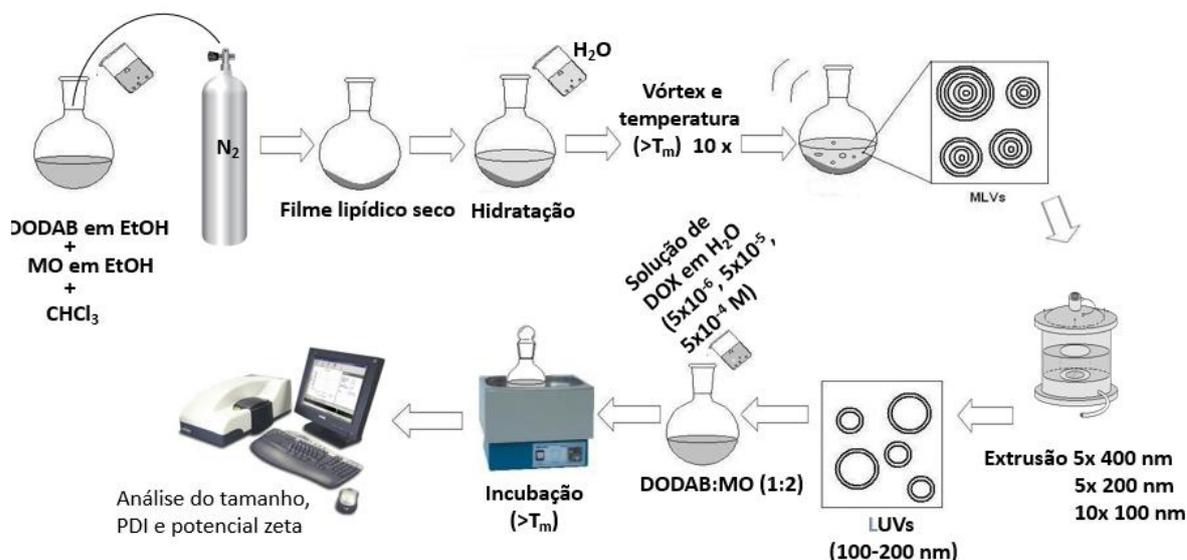


Figura 26 - Método de encapsulação da doxorubicina por incubação com lipossomas pré-formados pelo método de hidratação do filme lipídico.

2.2.2.3. Método de inclusão direta

Retiraram-se 500 μL de DODAB e 1000 μL de MO das soluções *stock* de lípidos DODAB e MO (20 mM) em etanol e foram colocados num balão de fundo redondo (Figura 27), juntamente com uma solução de DOX em etanol de concentração de 5×10^{-6} M. Adicionou-se aproximadamente 10 mL de clorofórmio e aplicou-se gás N_2 até se formar o filme lipídico seco na parede do balão. Hidratou-se o filme lipídico seco com 5 mL de água ultrapura e procedeu-se ao aquecimento da solução a 60° C, ou seja, acima da T_m do lípido com maior T_m (45 °C), alternando 10 vezes com agitação mecânica vigorosa no vórtex, a fim de retirar o filme lipídico da parede e obter uma suspensão com vesículas multilamelares (MLVs) de DODAB:MO (1:2), com uma concentração final de 6 mM e concentração final de DOX de 5×10^{-6} M.

Seguidamente procedeu-se à extrusão da suspensão de MLVs, fazendo passar 5 vezes através de um filtro de membrana de polycarbonato de 400 nm, 5 vezes pelo filtro de 200 nm e 10 vezes

no de 100 nm, em condições de elevada pressão (6-8 bar) e a uma temperatura superior à temperatura de transição dos lípidos (60 °C).

Repetiu-se este método de co-solubilização da DOX junto com os lípidos DODAB e MO em etanol antes da formação do filme lipídico para mais duas concentrações de DOX em etanol (5×10^{-5} e 5×10^{-4} M) a que se seguiu a hidratação do filme lipídico seco e a extrusão.

Após o processo de extrusão, as amostras foram armazenadas num frigorífico até serem analisadas no Zetasizer Nano ZS Malvern.

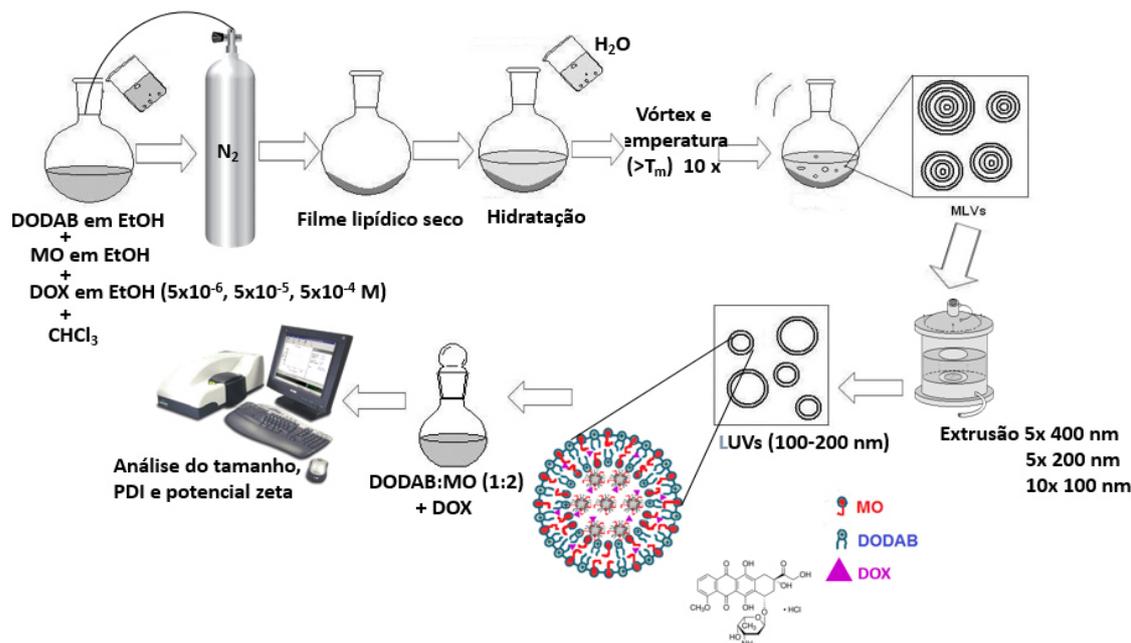


Figura 27 - Método de encapsulação da doxorubicina por inclusão direta antes da formação do filme lipídico seco.

2.2.3. Métodos de caracterização das formulações lipossomais com e sem doxorubicina

2.2.3.1. Análise do tamanho e polidispersão

A dispersão de luz dinâmica (DLS do inglês *Dynamic Light Scattering*), é uma técnica de medição da distribuição do tamanho de nanoveículos suspensos num líquido, na resolução nanométrica (no caso do aparelho utilizado a resolução é de 0,0003 μm a 10 μm) [13, 109].

Esta técnica baseia-se no conceito de que os nanoveículos em suspensão movem-se aleatoriamente devido às colisões com as moléculas de solvente e por isso a distância entre os nanoveículos está constantemente a mudar no tempo. Este movimento observado por Robert Brown ficou conhecido como “movimento Browniano”. Quando um laser (1) incide numa célula de poliestireno (2) que contém a amostra, o movimento browniano dos nanoveículos provoca a dispersão da luz em todas as direções, com intensidades diferentes, em função do tempo. O detetor (3) mede a luz dispersa e o correlador (5) estabelece a correlação entre o tamanho dos nanoveículos e a intensidade de dispersão (Figura 28 e 29).

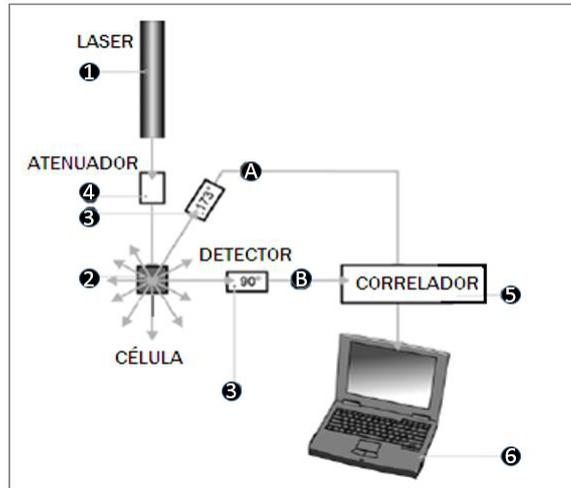


Figura 28 - Configuração típica do aparelho de DLS. Adaptado de [13].

A análise dessas flutuações de intensidade permite determinar o coeficiente de dispersão e o raio hidrodinâmico, usando a equação de Stokes-Einstein:

$$R = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (2.1.)$$

- R- raio hidrodinâmico
- K- constante de Boltzmann ($K=1,38 \times 10^{-16}$ erg/°K)
- T- temperatura absoluta
- η - viscosidade do solvente
- D- coeficiente de dispersão translacional

Sendo assim, é possível estabelecer uma correlação entre o tamanho dos nanovetores e a intensidade de dispersão, porque os nanovetores pequenos movem-se mais rapidamente num líquido, do que os maiores (Figura 29). Desta forma, os nanovetores de menores dimensões dispersam a luz incidente com flutuações de intensidades mais rápidas [13].

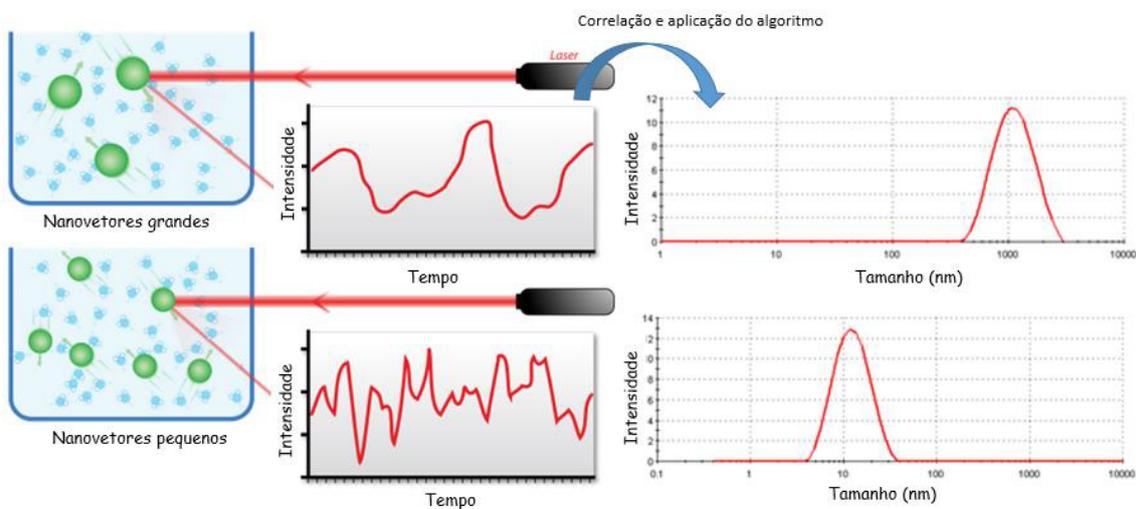


Figura 29 -Correlação entre o tamanho dos nanovetores e a intensidade de dispersão.

Para se fazer uma leitura de uma amostra devem-se fazer várias medições para assegurar que os diferentes parâmetros a medir não mudam muito e que o correlograma se mantém idêntico pois vários fatores influenciam o cálculo do tamanho dos nanovetores, entre eles inclui-se a temperatura, uma vez que interfere diretamente com a viscosidade do meio.

Os parâmetros a medir são:

- “Effective diameter” - é a medida do diâmetro de cada varrimento.
- “Mean diameter” - é a média das medidas de diâmetro dos varrimentos.
- É também importante analisar os três tipos de índice de distribuição (número, volume e intensidade) para verificar se a amostra é uniforme ou apresenta diferentes populações, como se ilustra na Figura 30 onde apenas com a distribuição por número se torna evidente a existência de duas populações de tamanhos diferentes.

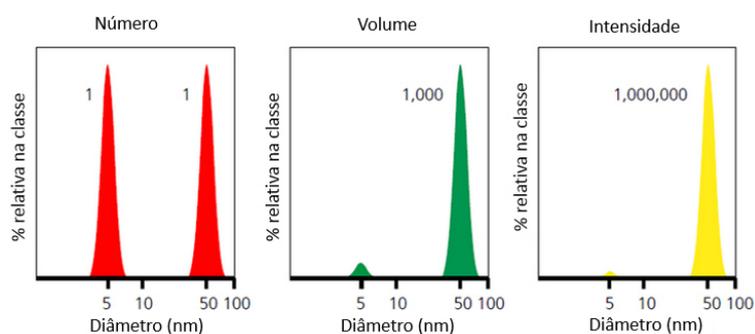


Figura 30- Distribuições de número, volume e intensidade de uma mistura bimodal de nanovetores de 5 e 50 nm presentes em igual proporção.

Caso se observe uma população com tamanhos distintos deve-se analisar o índice de distribuição por número para inferir a percentagem relativa de cada população.

- “Avg Count Rate” ou média das taxas de contagem- valor máximo = 500 Kcps (significa que a amostra está concentrada); valor mínimo = 2 Kcps (significa que a amostra está diluída ou muito concentrada). Deve-se otimizar a concentração de nanovetores para que a taxa de contagem tenha um valor razoável, tornando a medição mais fiável.
- PDI – relacionado com a largura do pico do gráfico da distribuição de tamanho, mostrando se a suspensão de nanovetores é monodispersa com uma distribuição unimodal ideal ($<0,02$), quase monodispersa ($0,02-0,08$) ou polidispersa ($>0,08$). Alta polidispersão indica a existência de nanovetores de diferentes tamanhos, e/ou de agregados (Figura 31).

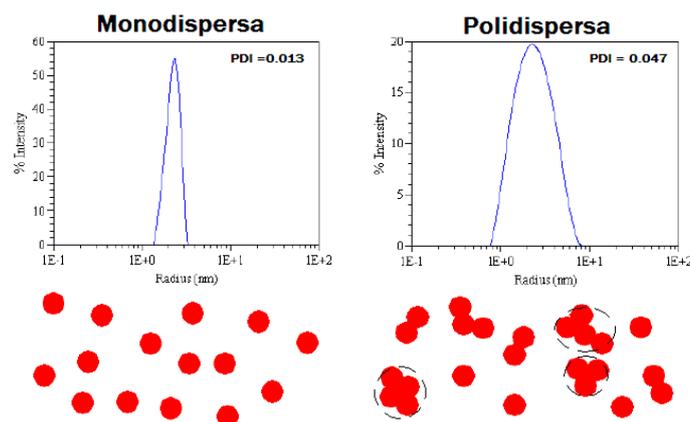


Figura 31- Representação esquemática de uma distribuição por intensidade de nanovetores analisados pela técnica de dispersão de luz dinâmica. O gráfico à esquerda indica uma população com raios hidrodinâmicos uniformes, e portanto monodispersa. O gráfico da direita apresenta uma maior polidispersão (PDI) devido à presença de nanovetores pequenos e agregados maiores.

Quando os nanovetores a medir são rígidos, é adequado atingir esses valores. No entanto, quando os nanovetores a medir são mais moldáveis, como é o caso dos lipossomas, atingir esses valores é muito mais difícil. Neste caso particular, de uma mistura de dois lípidos e de um fármaco é ainda mais difícil de alcançar um nível muito baixo de PDI. No entanto, os valores de 0,2 foram considerados aceitáveis para uma distribuição de tamanho, relativamente homogênea.

A técnica DLS permite uma análise confiável e repetível do tamanho do nanovetor em um ou dois minutos, precisando para tal, de um pequeno volume para análise e do conhecimento da viscosidade do líquido onde o nanovetor a medir se encontra [110].

Para medir o tamanho médio, o respectivo desvio padrão e o PDI das amostras, estas foram retiradas do frigorífico, onde foram guardadas e protegidas da luz para manter a estabilidade, e trazidas para a temperatura ambiente. Alíquotas de 1 mL de formulação foram colocadas em células descartáveis de poliestireno e analisadas no Malvern Zetasizer Nano ZS tendo sido realizadas três leituras independentes de dez varrimentos cada, com os parâmetros indicados na Tabela 3.

Tabela 3- Parâmetros usados para medir o tamanho dos nanovetores com o analisador de partículas Malvern Zetasizer Nano ZS.

Material	Látex de poliestireno
Índice de refração	1,590
Absorção	0,01
Dispersante	Água
Temperatura	25°C
Viscosidade	0,8872cP
Índice de refração	1,330
Opções de viscosidade da amostra	Viscosidade do dispersante é usada como amostra de viscosidade
Temperatura	25,0
Tempo de Equilíbrio	120 segundos
Tipo de célula	DTS0012 – célula de dimensionamento descartável
Ângulo de medição	173° retrodispersão (padrão NIBS)

Medição	
Número de varrimentos	10
Duração da série	10 segundos
Número de medições	3
Atraso entre as medições	0 segundos
Método de posicionamento	Procurar posição ideal
Seleção automática do atenuador	Sim

Os LUVs proporcionam bons resultados com esta técnica de determinação do raio hidrodinâmico dos nanovetores, devido à sua homogeneidade de tamanhos e à sua esfericidade [111]. Foram realizadas medições periódicas de DLS das amostras armazenadas para se analisar a perda de estabilidade durante o armazenamento que pode ocorrer por degradação dos seus componentes que culmina na rutura membranar, agregação e/ou sedimentação ao longo do tempo. Se os nanovetores se agregarem, haverá uma população maior de nanovetores com um raio maior [112]. Pode também haver perda do material encapsulado [42, 113].

2.2.3.2. Análise da carga superficial

A dispersão de luz eletroforética (ELS do inglês “*Electrophoretic Light Scattering*”) é uma técnica de medição da mobilidade eletroforética de moléculas e nanovetores dissolvidos ou dispersos num líquido. Alíquotas de cerca de 0,8 mL da formulação foram usadas no enchimento de uma célula capilar de potencial zeta descartável (optou-se pelas células descartáveis pois evitam contaminações cruzadas entre as amostras), que contém dois elétrodos e é colocada no mesmo aparelho mencionado no estudo do tamanho dos lipossomas, ou seja, o Zetasizer Nano ZS Malvern. Um laser passa através da amostra e um campo elétrico é aplicado aos elétrodos da célula capilar, criando uma diferença de potencial, obrigando os nanovetores que têm carga líquida (encontram-se carregados eletricamente quando em contacto com um eletrólito) a migrar em direção ao eléctrodo de carga oposta com uma velocidade, conhecida como mobilidade eletroforética, e a frequência de dispersão de luz provocada pelos nanovetores é desviada. O desvio da frequência de dispersão de luz (efeito de Doppler) é proporcional à mobilidade eletroforética dos nanovetores, e portanto ao potencial zeta [110] (Figura 32).

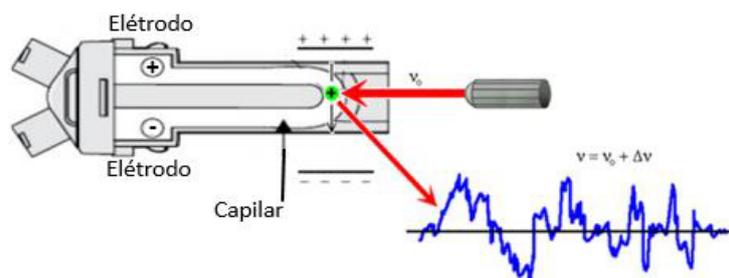


Figura 32- Representação esquemática de uma célula capilar descartável de avaliação do potencial-zeta. Após a aplicação de uma diferença de potencial entre os elétrodos, os nanovetores carregados deslocam-se em direção ao eléctrodo de carga oposta à sua, provocando um desvio da frequência de dispersão de luz que nelas incide.

A carga líquida na superfície do nanovetor afeta a distribuição de íões na sua vizinhança, aumentando a concentração de contra-íões (íões com carga oposta) junto à superfície. A força de ligação depende da distância dos contra-íões para o nanovetor em suspensão. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica na interface do nanovetor com o líquido, constituída por uma camada mais interna - camada de Stern - onde os íões se encontram fortemente ligados e a camada mais externa - camada difusa – onde os íões se encontram fracamente ligados (Figura 33). Nesta camada difusa há um limite teórico chamado de plano de corte que delimita o limite do nanovetor como uma entidade estável, com carga. Quando o nanovetor se move, os íões dentro da camada difusa acompanham o nanovetor, mas todos os íões para além do plano de corte não viajam com ele. O potencial neste limite é o potencial zeta (ζ) que indica a carga de superfície do nanovetor. O potencial nessa região decai com o aumento da distância à superfície do nanovetor até atingir o potencial da solução - potencial zero.

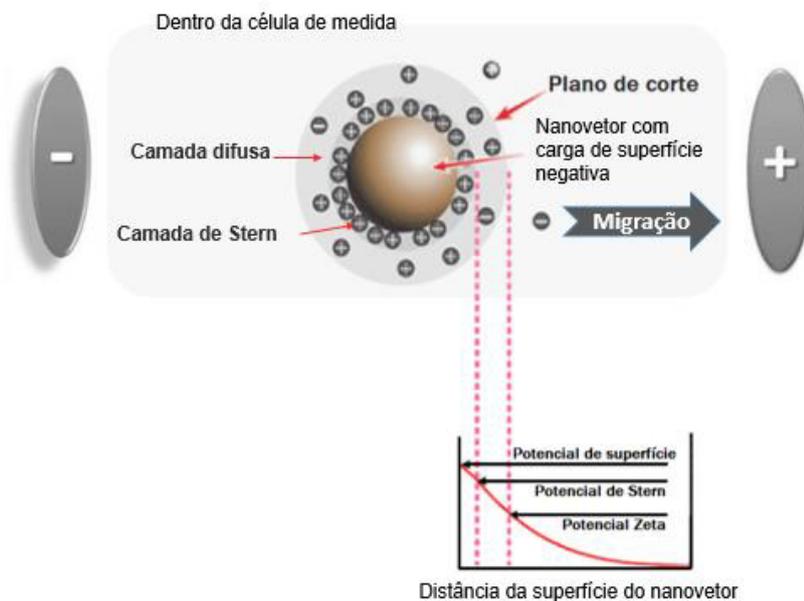


Figura 33 - Representação esquemática da dupla camada envolvendo o nanovetor em suspensão e da variação do potencial zeta com a distância de um nanovetor carregado negativamente. Adaptado de [13].

O potencial zeta pode ser calculado pela equação (Equação 2.2.) [13]:

$$z = \frac{2\epsilon f(ka)}{U_E 3\eta} \quad (2.2.)$$

z - potencial zeta

ϵ - constante dielétrica

$f(ka)$ - função de Henry

U_E - mobilidade eletroforética

η - viscosidade

Assim, o potencial zeta não é a carga efetiva do nanovetor mas depende da sua carga superficial, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio (essa camada pode mover o plano de

corde para longe da superfície do nanovetor e alterar o potencial zeta) e da composição e natureza do meio (ex.: pH, viscosidade) que o circunda.

O potencial zeta pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. Se os nanovetores têm uma carga muito negativa ou muito positiva (igual ou superior a +/- 30 mV) vão repelir-se, e portanto a suspensão ou emulsão tem estabilidade pois mantém a sua individualidade. Se os nanovetores têm um potencial zeta a rondar os +/- 20 mV, geralmente apresentam estabilidade de curto prazo. Se for mais baixo há aglomeração e instabilidade da suspensão ou emulsão [114] (Figura 34).

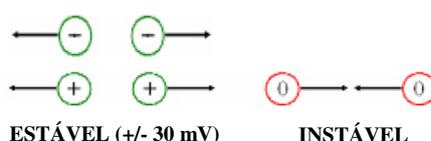


Figura 34- Representação das forças de repulsão entre nanovetores carregados (esquerda) e as forças de atração entre nanovetores neutros (direita) indicando em que medida a avaliação do potencial zeta dá indicações sobre a estabilidade da suspensão.

Para medir o potencial zeta de cada formulação lipossomal de DODAB:MO (1:2) com e sem DOX encapsulada, fizeram-se três medições independentes de 25 varrimentos. Para analisar a estabilidade do potencial zeta, este foi medido a cada semana, até ao final do projeto.

Tabela 4 - Parâmetros usados para medir o potencial zeta com o Zetasizer Nano ZS Malvern:

Material	Látex de poliestireno
Índice de refração	1,590
Absorção	0,01
Dispersante	Água
Temperatura	25°C
Viscosidade	0,8872cP
Índice de refração	1,330
Constante dielétrica	78,5
Seleção F(Ka)	Smoluchowski
Valor F(Ka)	1,50
Opções de viscosidade da amostra	Viscosidade do dispersante é usada como amostra de viscosidade
Temperatura	25,0
Tempo de Equilíbrio	120 segundos
Tipo de célula	DTS1060C – Célula zeta descartável
Ângulo de medição	173° retrodispersão (padrão NIBS)
Medição	
Número de varrimentos	25
Número de medições	3
Atraso entre as medições	0 segundos
Seleção automática do atenuador	Sim
Seleção automática de voltagem	Sim

2.2.3.3. Análise da estabilidade das formulações em condições de armazenamento

Para testar a estabilidade do tamanho e PDI das quatro amostras foram realizadas medições com a técnica de DLS a cada 8 dias, durante 4 semanas e posteriormente a cada 15 dias até ao final do projeto. Pretendia-se com isto, analisar a tendência para a rutura membranas, agregação e sedimentação dos nanovetores ao longo do tempo, vendo se o raio hidrodinâmico aumenta. Se os nanovetores se agregarem, haverá uma população maior, com um raio maior [112]. A análise da estabilidade ao longo do tempo também serviu para analisar reorganizações dos constituintes das formulações e como os três métodos de encapsulação da DOX afetam a estabilidade das formulações.

2.2.4. Doseamento da doxorrubicina por espectroscopia

Para dosear a quantidade de DOX presente nas formulações recorreu-se a técnicas de espectroscopia. Para melhor compreender os métodos espectrofotométricos utilizados, uma breve explicação sobre cada um deles será apresentada na secção seguinte.

2.2.4.1. Espectroscopia

A espectroscopia é a técnica que analisa a interação da energia radiante incidente em uma amostra (ex.: absorção ou emissão) e tem como resultado um gráfico – o espectro.

2.2.4.1.1 Espectroscopia de absorção UV-Vis

Quando um feixe de luz atravessa uma amostra, no estado gasoso, líquido ou sólido, os átomos da amostra absorvem seletivamente certas frequências da energia dos fótons da luz, passando do estado fundamental para o estado excitado, diz-se então que ocorreu absorção (Figura 35).



Figura 35 - Orbitais eletrônicos e a absorção e emissão de luz.

Ao ocorrer absorção, a intensidade do feixe de luz que é transmitida (I_1), relativamente à que incidiu sobre a amostra (I_0), diminuiu (Figura 36).

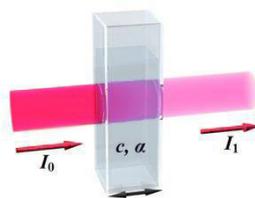


Figura 36 - Absorção de um feixe de luz atravessando uma célula com um percurso ótico de l cm.

A razão de luz que atravessa a amostra, com um comprimento de onda específico, designa-se por transmitância (T) e é dada pela seguinte equação:

$$T_{(\lambda)} = \frac{I_{(\lambda)}}{I_0} \quad (2.3.)$$

$T_{(\lambda)}$ = transmitância com um comprimento de onda específico

$I_{(\lambda)}$ = intensidade do feixe de luz transmitido

I_0 = intensidade do feixe de luz incidente

A partir da transmitância podemos obter a absorvância, pela seguinte equação:

$$A_{(\lambda)} = -\log T_{(\lambda)} \quad (2.4.)$$

A absorção da luz depende de dois princípios:

1º- A absorção da luz será tanto maior quanto mais concentrada for a solução por ela atravessada.

2º- A absorção é tanto maior quanto maior for a distância percorrida pelo feixe luminoso através das amostras. Estes princípios são unidos por meio da lei de Lambert-Beer (Equação 2.5.):

$$A_{(\lambda)} = \epsilon_{(\lambda)} c l \quad (2.5.)$$

$A_{(\lambda)}$ = absorvância (para um λ fixo)

$\epsilon_{(\lambda)}$ = absortividade molar ou coeficiente de absorção molar (para um λ fixo)

c = concentração da solução absorvente

l = distância percorrida pelo feixe luminoso através da amostra (normalmente de 1 cm)

A Lei de Lambert-Beer prevê uma proporcionalidade direta entre a absorvância da luz, a cada comprimento de onda, e a concentração da amostra. Esta relação só é válida para radiação monocromática, isto é, se possuir somente um λ e a proporcionalidade deixa de ocorrer em soluções muito concentradas (que devem ser diluídas) e em que exista mais do que uma espécie absorvente. Se existir mais do que uma espécie absorvente, a absorvância passa a ser a soma das absorvâncias de cada uma das espécies.

A absorção depende das características do material, da radiação incidente e das estruturas químicas dos compostos envolvidos. Daí ser importante escolher um solvente transparente na zona de comprimento de onda em análise e descontar a absorvância do solvente e do material utilizado (célula) para analisar a amostra, fazendo antes de uma leitura de absorvância, a subtração da linha de base (em inglês *baseline*), promovendo a leitura real de absorvância da amostra. A célula a utilizar tem de ser de quartzo ou sílica fundida porque o vidro e o plástico absorvem UV e causa a reflexão da luz visível, enquanto na região do visível podem ser utilizados materiais mais baratos como o vidro ou plásticos.

A espectroscopia de absorção UV-Vis (ultravioleta-visível) envolve a espectrofotometria que é um método de análise que utiliza um espectrofotômetro (no caso foi o de varredura Shimadzu UV-3101PC UV-Vis-NIR) que emite radiação eletromagnética, desde o UV até ao IV (infravermelho) (ou seja, desde os 190 aos 2500 nm), utilizando lâmpadas de deutério (D₂) para a região do UV (190 a 350 nm) [115] e de tungstênio para a região do Vis e do IV (350 aos 2500 nm) [116]. Essa radiação vai passar por um prisma ou rede de difração e uma fenda para uma seleção mais precisa de uma luz monocromática, essencial para aplicação da Lei de Lambert-Beer. A luz monocromática é dividida em dois feixes, um incide na célula de referência (que contém o solvente usado na preparação da amostra) e outro na amostra (Figura 37).

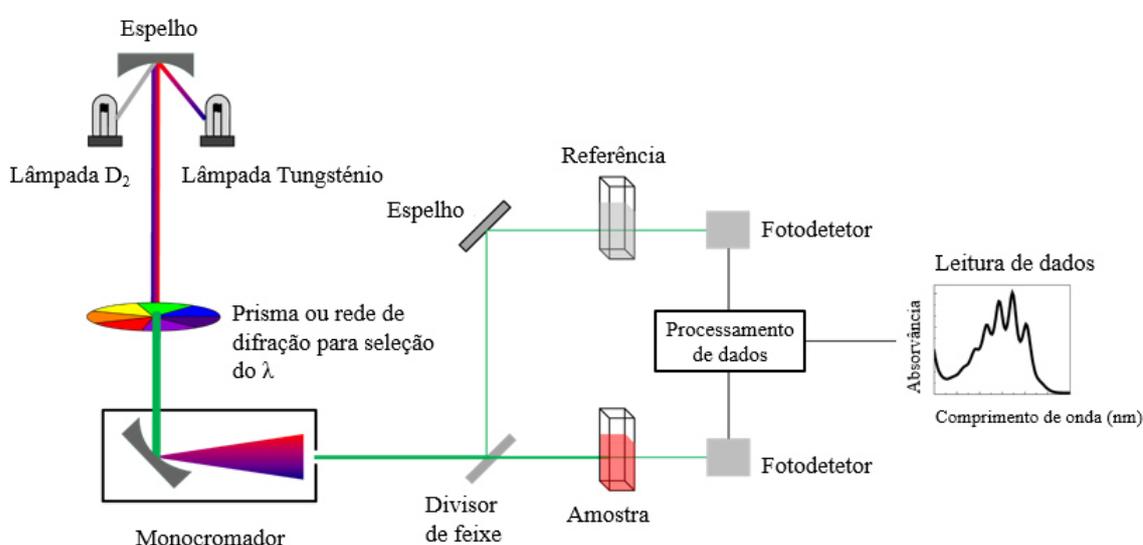


Figura 37 – Representação esquemática dos componentes de um espectrofotômetro de duplo feixe. Adaptado de [117].

O fotodetector detecta a fração de luz que passou pela amostra e referência e transfere para o computador, produzindo um espectro de absorção que representa a variação da absorvância em função do comprimento de onda da radiação incidente.

2.2.4.1.2 Espectroscopia de fluorescência

Quando um feixe de radiação incide numa substância, esta absorve luz de uma determinada energia, transitando para um estado excitado e ao regressar ao estado fundamental liberta essa energia sob a forma de luz, diz-se que ocorreu fluorescência e a substância denomina-se fluoróforo. A luz absorvida e libertada pelo fluoróforo pode ser representada pelos respetivos espectros de excitação e emissão de fluorescência [118].

Os espectrofluorímetros são constituídos por uma fonte de radiação contínua, com excitação no UV e Vis, normalmente uma lâmpada de xénon. Essa radiação passa por um monocromador de

excitação e incide na amostra, excitando o fluoróforo. A radiação emitida pelo fluoróforo passa por um monocromador de emissão e, por fim, no fotomultiplicador onde é amplificada e no detector onde é registrada. No fluorímetro, o detector da radiação localiza-se a um ângulo de 90° em relação à fonte. Este desenho geométrico serve para maximizar a detecção da fluorescência e minimizar a detecção da radiação referente à transmitância (Figura 38).

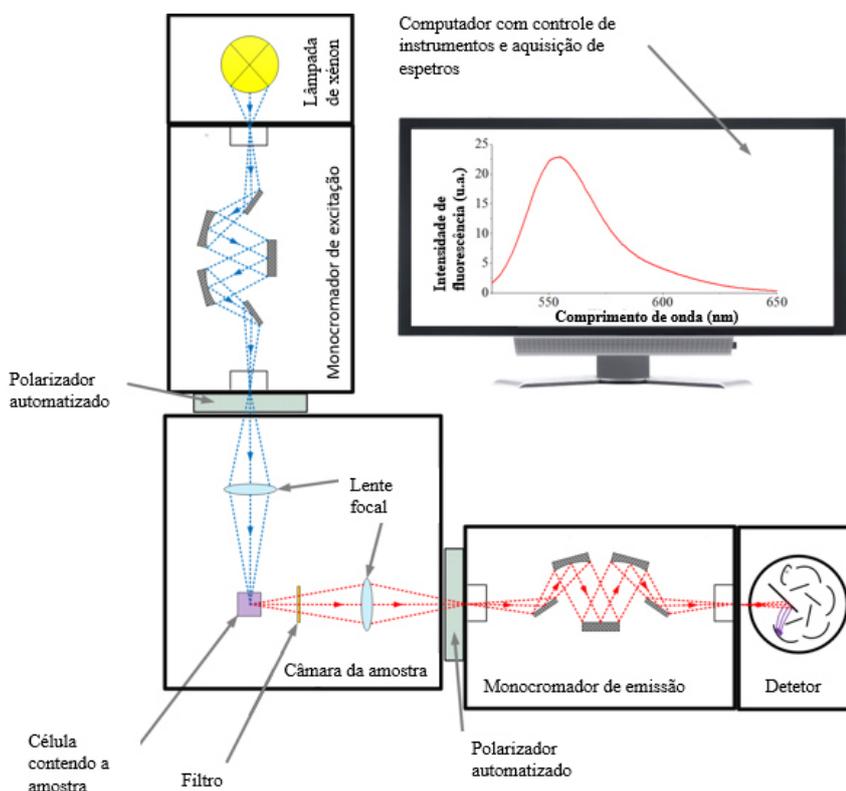


Figura 38 - Representação esquemática de um espectrofluorímetro com aquisição de espectro de emissão.

Para obter o espectro de emissão da DOX (que aparece em λ maiores) selecionou-se no monocromador de excitação um λ onde verificamos que este fármaco absorvia (que corresponde ao $\lambda_{\text{máx}}$ de absorvância da DOX obtido no espectrofotômetro UV-Vis) enquanto o segundo faz um varrimento para toda a região de λ no qual a DOX (fluoróforo) emite. Para termos a certeza que o pico de emissão obtido é o máximo que se pode obter e se é referente à fluorescência da DOX, procedemos à excitação da amostra de DOX com três λ_{exc} diferentes, o primeiro foi de valor igual ao pico de absorvância obtido no espectrofotômetro e os outros dois em torno desse valor. Se apenas a intensidade, e não o λ , mudou com a utilização de λ_{exc} diferentes, então pode-se concluir que a DOX tem características fluorescentes e o pico máximo de emissão será aquele com intensidade maior. Por norma, a emissão de radiação

eletromagnética ocorre na região Vis do espectro eletromagnético, no entanto, pode também ocorrer na região do UV ou IV.

Para obter o espectro de excitação (que aparece em λ menores) colocou-se o monocromador de emissão fixo num λ em que verificamos haver emissão da DOX (fluoróforo), e o monocromador de excitação faz um varrimento para toda a região de λ no qual o fluoróforo é excitado.

A espectrofluorimetria também foi usada para a quantificação da DOX, uma vez que é mais sensível, aproximadamente duas ordens logarítmicas maior do que a espectrofotometria de UV-Vis, pelo que é possível estender a linearidade da Lei de Lambert-Beer para concentrações menores.

2.2.4.1.3 Construção das curvas de calibração da doxorrubicina

O λ mais adequado para a determinação da concentração de um cromóforo ou de fluoróforo, através da lei de Lambert-Beer, é o λ de absorvância e de fluorescência mais intensa, ou seja, o pico de absorvância e o pico de fluorescência, respetivamente. Os valores de absorvância e de fluorescência nesses picos de intensidade máxima serviram para construir as respetivas curvas de calibração da DOX solubilizada em água e em tampões, que determinam concentrações desconhecidas de uma amostra pelos métodos fotométricos, que se expressam por uma equação matemática do tipo:

$$y = mx + b \quad r^2 \approx 1 \quad (2.6.)$$

y= absorvância/fluorescência

m= declive da reta

x= concentração da amostra

b= ordenada na origem

r= coeficiente de correlação

O declive (m) deve ter um valor estatisticamente diferente de zero, a ordenada na origem (b) não deverá ser estatisticamente diferente de zero e o coeficiente de correlação da reta de calibração não deve ser significativamente diferente de 1 [119].

A linearidade, ou seja, os resultados linearmente proporcionais à concentração de analito na amostra dentro de um intervalo de concentrações, é frequentemente testada apenas utilizando o coeficiente de correlação, r que indica-nos o grau de dependência entre duas variáveis (x e y). Quando $r=1$, este parâmetro indica-nos que todos os pontos se encontram exatamente sobre uma linha de declive positivo; quando $r=0$ indica-nos a falta de correlação entre a variável dependente (y) e a variável independente (x).

2.2.4.1.4 Curvas de calibração da doxorubicina solubilizada em água ultrapura por espectroscopia de absorção UV-Vis

Para determinar a quantidade de DOX que ficou encapsulada na formulação lipossomal foi necessário construir, de antemão, uma curva de calibração da DOX solubilizada em água ultrapura, por medições de espectrofotometria UV-Vis (absorvância).

Para elaborar esta curva de calibração começou-se por preparar uma solução de concentração rigorosa (2×10^{-3} M) de DOX solubilizada em água ultrapura. A partir dessa solução de concentração rigorosa prepararam-se oito padrões, por diluição rigorosa com concentrações de $2,8 \times 10^{-5}$, $4,0 \times 10^{-5}$, $5,2 \times 10^{-5}$, $7,2 \times 10^{-5}$, $9,2 \times 10^{-5}$, $1,3 \times 10^{-4}$, $2,0 \times 10^{-4}$ e $3,0 \times 10^{-4}$ M. Para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta fotométrica é necessário recorrer a um número suficiente de padrões (entre 5 a 8 padrões), devendo abranger toda a gama de concentrações esperadas [119].

A absorção de UV-Vis de cada amostra foi medida entre 250 nm a 600 nm. Para reduzir a razão sinal/ruído, a velocidade de leitura foi ajustada para média, a largura da fenda foi ajustada para 2 nm e a leitura com intervalos de 1 nm. A absorvância foi lida à temperatura ambiente.

2.2.4.1.5 Curvas de calibração da doxorubicina a pH 5; 7,4 e 9

As curvas de calibração da DOX solubilizada em tampões com valores de pH de 5; 7,4 e 9 foram construídas com o intuito de dosar a DOX em meios semelhantes aos usados futuramente para simular o efeito da libertação controlada da DOX no sangue (pH 7,4), nas células cancerígenas (pH 5) [47] e para abranger o pKa da amina glicosídica da DOX [79] que é próxima do pH 9, bem como, para simular o pH do duodeno, para o caso da formulação com a DOX encapsulada ser administrada por via oral e sofrer um efeito de segunda passagem, ou seja, o fármaco depois de passar pelo fígado pode ser lançado novamente para o intestino, antes de sofrer absorção para o sangue.

Os perfis de libertação controlada do fármaco da formulação *in vitro* implicam menos custos, evitam a experimentação *in vivo* em animais e revelam informação fundamental sobre: a estrutura e o comportamento da formulação a nível molecular, as possíveis interações entre fármacos e lípidos, e sua influência sobre a taxa e mecanismo de libertação do fármaco e dados sobre modelos de libertação. Essa informação permite uma abordagem científica e preditiva para o desenvolvimento de sistemas de libertação com propriedades desejáveis.

2.2.4.1.5.1 Curvas de calibração da doxorubicina a pH 7,4

Para elaborar a curva de calibração da DOX solubilizada em tampão com pH 7,4, que mimetiza o pH fisiológico do sangue, começou-se por preparar a solução tampão (solução capaz de atenuar a variação do valor do seu pH resistindo à adição, dentro de limites, de reagentes ácidos ou alcalinos) com HEPES (ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N-etanossulfônico) na concentração de 1×10^{-3} M. No pHmetro mediu-se o pH da solução preparada e acertou-se o seu valor para 7,4, com a adição de gotas de NaOH concentrado (base) ou de HCl (ácido).

De seguida, preparou-se uma solução de concentração rigorosa de DOX (1×10^{-4} M solubilizada em tampão HEPES (pH 7,4), e a partir desta prepararam-se sete soluções padrão, por diluição rigorosa, com as seguintes concentrações: $7,5 \times 10^{-5}$, $5,63 \times 10^{-5}$, $4,22 \times 10^{-5}$, $3,16 \times 10^{-5}$, $2,37 \times 10^{-5}$, $1,78 \times 10^{-5}$ e $1,33 \times 10^{-5}$ M.

Sempre que necessário, as amostras foram submetidas a ultrassons durante 30 segundos, para ajudar a solubilizar a DOX no tampão HEPES.

Estas soluções padrão foram preparadas para leitura no espectrofotómetro. A absorção de UV-Vis de cada amostra foi medida entre 250 nm a 600 nm. Para reduzir a razão sinal/ruído, a velocidade de leitura foi ajustada para média, a largura da fenda foi ajustada para 2 nm e a leitura com intervalos de 1 nm. A absorvância foi lida à temperatura ambiente.

Para elaborar a curva de calibração da DOX por fluorimetria, começou-se por preparar uma solução de concentração rigorosa (1×10^{-5} M) de DOX solubilizada em tampão HEPES (pH 7,4), e a partir desta prepararam-se seis soluções padrão, por diluição rigorosa, com as seguintes concentrações: 8×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-6} , 9×10^{-7} , 7×10^{-7} e 5×10^{-7} M.

A fluorescência de cada amostra foi lida num fluorímetro Perkin-Elmer LS50, a uma temperatura ambiente (21 °C). As fendas foram definidas para 15 nm, a velocidade de leitura foi ajustada para $500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, com leitura a intervalos de 1 nm.

O espectro de excitação foi traçado de 310 a 530 nm com λ_{emi} 555 nm. O espectro de emissão foi traçado de 520 a 670 nm com λ_{exc} 467 nm.

Os valores de emissão de fluorescência obtidos revelaram uma intensidade máxima a 555 nm, pelo que este foi o λ escolhido para construir a curva de calibração da DOX solubilizada em tampão HEPES (pH 7,4), que relaciona a concentração do fluoróforo em função da fluorescência nesse pico, expressa por uma equação matemática.

2.2.4.1.5.2 Curvas de calibração da doxorubicina a pH 5

Para elaborar a curva de calibração da DOX solubilizada em tampão pH 5, que mimetiza o pH ácido do tecido cancerígeno, começou-se por preparar a solução tampão de acetato solubilizada

em água ultrapura adicionando 352 mL de solução de 2×10^{-1} M de acetato de sódio (CH_3COONa) solubilizado em água ultrapura a 148 mL de uma solução de 2×10^{-1} M de ácido acético (CH_3COOH) solubilizado em água ultrapura.

No pHmetro mediu-se o pH da mistura de soluções ($\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$) e acertou-se o valor para 5, com a adição de gotas de NaOH concentrado (base) ou de HCl (ácido).

De seguida, prepararam-se duas soluções de concentração rigorosa de DOX (1×10^{-2} e 1×10^{-3} M) solubilizada em tampão acetato (pH 5). A partir destas prepararam-se catorze soluções padrão, por diluição rigorosa, com concentrações de: $7,14 \times 10^{-3}$, 5×10^{-4} , 1×10^{-4} , 8×10^{-5} , $6,5 \times 10^{-5}$, 5×10^{-5} , 3×10^{-5} , 1×10^{-5} , 8×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-6} , 9×10^{-7} , 7×10^{-7} e 5×10^{-7} M.

Para leitura da absorção de UV-Vis, utilizaram-se as soluções padrão anteriores numa gama de concentrações de 1×10^{-4} a 1×10^{-5} M. Cada amostra foi medida entre 250 nm a 600 nm. Para reduzir a razão sinal/ruído, a velocidade de leitura foi ajustada para média, a largura da fenda foi ajustada para 2 nm e a leitura com intervalos de 1 nm. A absorvância foi lida à temperatura ambiente.

Para leitura de fluorescência, utilizaram-se todas as soluções padrão anteriores. Cada amostra foi lida num fluorímetro Perkin-Elmer LS50, a uma temperatura ambiente (21°C). As fendas foram definidas para 15 nm, a velocidade de leitura foi ajustada para $500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, com leitura a intervalos de 1 nm.

Ao analisar as soluções padrão com a gama alargada de concentrações acima descrita verificamos que os espectros alteravam-se significativamente com o aumento da concentração, provavelmente devido à formação de dímeros de DOX. Assim sendo, estabelecemos condições diferentes para diferentes gamas de concentração como a seguir se detalha. Para a gama de concentrações de 5×10^{-7} a 1×10^{-5} M foram definidos os seguintes parâmetros: o espectro de excitação foi traçado de 310 a 530 nm com $\lambda_{\text{emi}} = 555$ nm. O espectro de emissão foi traçado de 520 a 670 nm com $\lambda_{\text{exc}} = 347$ nm.

Para a gama de concentrações de 5×10^{-5} a 1×10^{-4} M foram definidos os seguintes parâmetros: o espectro de excitação traçado de 310 a 530 nm com $\lambda_{\text{emi}} = 560/563/585$ nm. O espectro de emissão foi traçado de 510 a 670 nm com $\lambda_{\text{exc}} = 470/461/460$ nm.

Para a gama de concentrações de 5×10^{-4} a 1×10^{-3} M foram definidos os seguintes parâmetros: o espectro de excitação foi traçado de 310 a 530 nm com $\lambda_{\text{emi}} = 594$ nm. O espectro de emissão foi traçado de 510 a 670 nm com $\lambda_{\text{exc}} = 347$ nm.

Os valores de emissão de fluorescência obtidos para as soluções padrão com concentrações de 5×10^{-7} a 8×10^{-6} M revelaram uma intensidade máxima a 555 nm, pelo que este foi o λ escolhido para construir a curva de calibração da DOX solubilizada em tampão acetato (pH 5), que

relaciona a concentração do fluoróforo em função da fluorescência nesse pico, expressa por uma equação matemática. Foi utilizada somente esta gama de concentrações porque é a que garante, por observação espectral, a não formação de dímeros de DOX.

2.2.4.1.5.3 Curvas de calibração da doxorubicina a pH 9

Para elaborar a curva de calibração da DOX solubilizada em tampão de pH 9, que mimetiza o pH alcalino do intestino e abrange o pKa da amina glicosídica da DOX, começou-se por ajustar o valor do pH do tampão HEPES para 9, com a adição de gotas de NaOH concentrado (base) ou de HCl (ácido).

De seguida, preparou-se uma solução de concentração rigorosa de DOX (7×10^{-5} M) solubilizada em tampão HEPES, com pH 9. A partir dessa solução prepararam-se quatro soluções padrão, por diluição rigorosa, com concentrações de $5,25 \times 10^{-5}$, $3,94 \times 10^{-5}$, $2,95 \times 10^{-5}$ e $2,22 \times 10^{-5}$ M.

A absorção de UV-Vis de cada amostra foi medida entre 250 nm a 600 nm. Para reduzir a razão sinal/ruído, a velocidade de leitura foi ajustada para média, a largura da fenda foi ajustada para 2 nm e a leitura com intervalos de 1 nm. A absorvância foi lida à temperatura ambiente.

2.2.5. Efeitos biofísicos da doxorubicina ao nível das membranas lipídicas

2.2.5.1. Coeficiente de partição membrana/água da doxorubicina

Para caracterizar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico é primordial efetuarem-se estudos *in vitro* em modelos membranares através do uso de modelos simples e controláveis como os lipossomas, para evitar custos acrescidos com estudos em células e/ou estudos *in vivo* [120]. Estes estudos podem ser substituídos com a realização de um *screening* ou triagem que fornece informações quantitativas úteis sobre a relação estrutura química/atividade biológica (QSPR do inglês, *Quantitative Structure -Property Relationship*) e seleciona os fármacos com maior atividade farmacológica e com menos efeitos secundários [56, 121].

Para que os processos de absorção e distribuição da fase farmacocinética ocorram é necessário um equilíbrio entre lipossolubilidade (solubilidade nas membranas) e hidrossolubilidade (solubilidade em ambientes aquosos, como o sangue e o citosol). Este equilíbrio determina a lipofilia de um fármaco. Fármacos altamente lipófilos como têm menor solubilidade em água, apresentam fraca eliminação renal, e conseqüentemente, toxicidade elevada devido à bioacumulação. Estes fármacos bioacumuláveis têm tendência a estabelecerem ligação às proteínas plasmáticas e a acumularem-se nas reservas lipídicas, com conseqüente toxicidade decorrente da longa permanência no organismo. Apesar da toxicidade associada à elevada lipofilia de um fármaco, fármacos muito hidrossolúveis também não são ideais já que sofrem

de má distribuição no organismo pois é necessário um determinado grau de lipofilia para que a penetração dos fármacos nas membranas biológicas seja possível. A lipofilia é então um parâmetro fundamental na avaliação do sucesso terapêutico de um fármaco.

Para determinar a lipofilia de um composto costuma-se utilizar o coeficiente de partição no sistema octanol/água ($K_{pO/A}$) [23, 121] porque é de fácil execução, já que consiste em adicionar uma quantidade conhecida de um composto a um sistema bifásico constituído por um solvente orgânico (n-octanol), que mimetiza a fase lipófila, e água. Após a separação das fases orgânica e aquosa, determina-se a quantidade do composto presente em cada uma das fases (Figura 39).

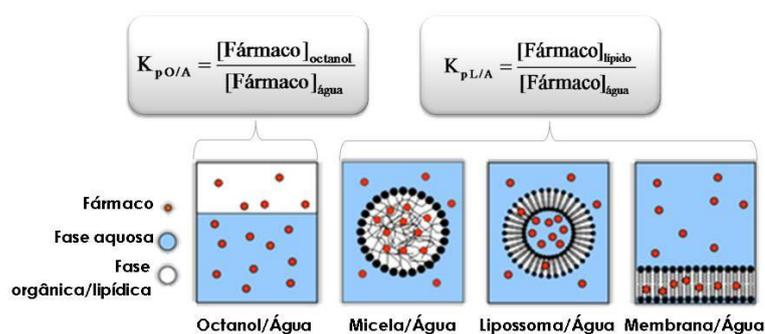


Figura 39- Representação esquemática da determinação dos coeficientes de partição de um fármaco em sistemas bifásicos.

No entanto, este modelo apresenta aplicação limitada pois o octanol não pode mimetizar as membranas biológicas, pois estas não são exclusivamente lipófilas, mas sim, anfipáticas. Por esse motivo, os sistemas octanol/água têm sido substituídos pelas micelas e lipossomas (sistemas lípido/água) devido:

- às semelhanças que estes exibem com as membranas naturais;
- por serem fáceis de preparar e manusear, e por não apresentarem os problemas de toxicidade decorrentes do uso de solventes orgânicos [122];
- por permitirem a contabilização de outro tipo de ligações (Figura 40) para além das hidrófobas (ex.: interações do tipo eletrostático, pontes de hidrogénio) aquando dos fenómenos de partição do fármaco com as membranas. Por isso é que os valores de K_p de espécies neutras, nos dois sistemas não diferem muito (pois neste caso prevalecem as ligações hidrófobas do composto à membrana que são semelhantes às que ocorreriam entre o composto e o n-octanol). No entanto, os coeficientes de partição de espécies anfipáticas ou eletricamente carregadas ao pH dos estudos são diferentes nos dois sistemas porque entram em linha de conta ligações para além das hidrófobas (exemplo entre espécies carregadas e as cabeças polares das membranas) que o sistema octanol/água não contempla.

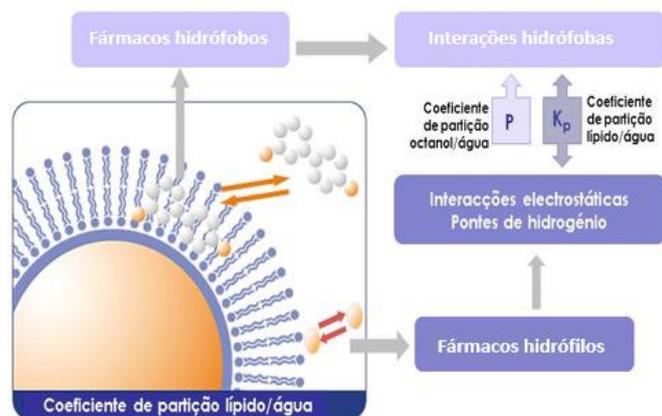


Figura 40- Representação esquemática das diferenças entre a determinação do coeficiente de partição octanol/água e lípido/água em função da lipofilia dos fármacos em estudo.

2.2.5.1.1 Procedimento experimental da determinação do coeficiente de partição (K_p) da doxorrubicina no sistema membranares aquoso

Para o cálculo do coeficiente de partição prepararam-se LUVs de DODAB:MO (1:2) tal como o descrito na secção 2.2.1. De seguida preparou-se uma série de amostras, em eppendorfs (volume final de 1800 μ L), contendo concentrações crescentes de LUVs de DODAB:MO (50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 2000 e 3000 μ M), e uma concentração constante de DOX (150 ou 300 μ M), usando a água ultrapura como solvente. Foi ainda utilizado um segundo grupo de eppendorfs (volume final de 1800 μ L), contendo brancos ou referências. Estes brancos ou referências não contêm DOX e foram preparados em simultâneo com as amostras, contendo volumes crescentes de LUVs de DODAB:MO (1:2), de modo a que as concentrações lipídicas igualassem as das amostras. As suspensões foram depois incubadas a 60 °C, durante 30 minutos antes de serem analisadas por espectrofotometria UV-Vis, na gama de comprimentos de onda de 250-600 nm. Cada um dos dois ensaios realizados com duas concentrações de DOX foi executado em triplicado.

2.2.5.1.2 Procedimento experimental da determinação dos parâmetros termodinâmicos da partição (K_p) da doxorrubicina no sistema membranares aquoso.

Efetuiu-se também um ensaio de determinação do coeficiente de partição da DOX (300 μ M) com o intuito de determinar os parâmetros termodinâmicos da partição do fármaco no nanossistema lipossomal. Este ensaio foi realizado de modo semelhante ao anterior, mas as suspensões foram incubadas a temperaturas distintas (30 °C, 37 °C, 50 °C, 53 °C, 55 °C, 57 °C e 60 °C) e a leitura dos espectros foi efetuada a cada uma das temperaturas.

Finalmente, efetuou-se um ensaio de determinação do coeficiente de partição da DOX (300 μM) de modo semelhante ao anteriormente descrito, mas em que o solvente das suspensões foi substituído por um tampão de pH 5 e por um tampão de pH 7,4.

2.2.5.1.3 Análise do coeficiente de partição (K_p) da doxorubicina no sistema membranar aquoso por espectroscopia derivativa

Para cada uma das amostras e referências preparadas durante os procedimentos experimentais acima descritos procedeu-se ao traçado dos espectros num espectrofotómetro UV-Vis, de 250 - 600 nm, com intervalos de leitura de 1 em 1 nm.

A determinação do K_p através da espectroscopia do UV-Vis baseia-se no facto de existirem variações espectrais do composto, após a sua localização num meio com diferente polaridade [123]. Porém, a quantificação de compostos transportados em lipossomas por análise das variações dos espectros UV-Vis é dificultada por uma intensificação de sinais de ruído promovida pela interferência da dispersão de luz que os lipossomas apresentam. Para reduzir essas interferências pode-se recorrer à subtração dos espectros UV-Vis dos brancos ou referências, mas para eliminar efetivamente essa interferência aplica-se o cálculo da 2ª ou 3ª derivada aos espectros obtidos, obtendo-se assim derivadas dos espectros com picos máximos ou mínimos onde se verifica variação da absorção das amostras sem interferências espectrais das referências [124, 125]. Para além disso, o espectro derivado permite uma melhor resolução das bandas que se sobrepõem [23].

A absorvância de uma solução contendo uma determinada concentração de fármaco (Abs), que é partilhado entre as fases membranar (m) e aquosa (a), pode relacionar-se com o K_p segundo a Equação 2.7:

$$Abs_T = Abs_a + \frac{(Abs_m - Abs_a)K_p[L]V_\phi}{1 + K_p[L]V_\phi} \quad (2.7)$$

Abs_T = absorvância total do composto.
 Abs_a = absorvância do composto em água.
 Abs_m = absorvância do composto na membrana.
 K_p = coeficiente de partição (adimensional).
 $[L]$ = concentração lipídica (em mol L^{-1}).
 V_ϕ = volume molar lipídico (em L mol^{-1}).

No entanto, devido às interferências espectrais da dispersão de luz pelos lipossomas não se efetua o cálculo do K_p a partir das absorvâncias da substância, mas sim a partir das derivadas das absorvâncias. As derivadas dos espectros foram calculadas a partir dos espectros de absorção UV-Vis, usando o algoritmo de Savitzky-Golay, o qual utiliza uma convolução polinomial de segunda ordem de treze pontos e um intervalo de comprimentos de onda de 0,5 nm (sub-rotinas providenciadas pelo folha de cálculos K_p calculator 3.1) [23].

O cálculo de K_p por espectrofotometria derivativa é baseado na Equação 2.8:

$$D = D_a + \frac{(D_m - D_a)K_p[L]V_\phi}{1 + K_p[L]V_\phi} \quad (2.8)$$

D = Derivada da absorvância total do composto.

D_a = Derivada do espectro de absorvância do composto em água.

D_m = Derivada do espectro de absorvância do composto na membrana.

K_p = coeficiente de partição (adimensional).

$[L]$ = concentração lipídica (em molL⁻¹).

V_ϕ = volume molar lipídico (em Lmol⁻¹).

onde,

$$D = \frac{\partial^n Abs}{\partial^n \lambda} \quad (2.9)$$

Os coeficientes de partição são então calculados por ajuste da Equação 2.8 aos dados experimentais (D versus $[L]$), através de um método de regressão não linear onde os parâmetros ajustáveis são D_m e K_p [126].

2.2.5.2. Efeito da doxorrubicina na microviscosidade e cooperatividade membranares

Os estudos de interação fármaco-membrana permitem prever o que acontece durante as fases farmacocinética e farmacodinâmica e qual o seu impacto na dinâmica membranar. De facto, o impacto na dinâmica membranar, nem sempre avaliado, é essencial uma vez que determina a funcionalidade de proteínas e recetores. No caso das formulações lipídicas, como os lipossomas, a dinâmica membranar dos lípidos que constituem essa formulação é também essencial, pois determina por exemplo, se esta formulação liberta mais fácil ou mais dificilmente o seu conteúdo.

Os fármacos interagem com os lípidos das membranas celulares e das formulações lipossomais, podendo modificar a dinâmica membranar devido ao efeito do fármaco na fluidez, por alterações na microviscosidade, ordem e/ou empacotamento dos lípidos constituintes das membranas.

O crescente interesse das interações fármaco-membrana permitiu o desenvolvimento de modelos membranares que permitissem simular processos mediados pelas membranas, de uma forma relativamente simples e de modo a limitar a heterogeneidade e complexidade das biomembranas [127]. Os lipossomas são os modelos vulgarmente utilizados para mimetizar as biomembranas devido ao ambiente químico, físico e anisotrópico que apresentam, ser semelhante aos das membranas biológicas e por serem de fácil manuseamento.

O DMPC (1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfocolina) (Figura 41) é um fosfolípido semissintético, e foi escolhido no âmbito desta dissertação pois é frequentemente usado em investigação, por apresentar um comportamento muito mais facilmente caracterizável em termos da temperatura de transição de fase e de parâmetros termodinâmicos, em comparação com as populações heterogêneas que constituem os fosfolípidos naturais. Para além disso, os lipossomas de DMPC são, à semelhança de uma grande parte dos componentes lipídicos das biomembranas, zwitteriônicos a pH fisiológico e a T_m descrita está bem caracterizada e é de 23,5 °C [42]. Estes fatores fazem do DMPC um bom e simples modelo mimético membranar.

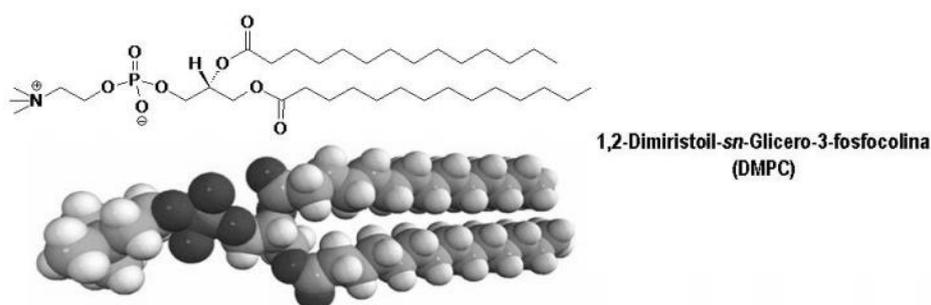


Figura 41 - Estrutura química do lípido semissintético DMPC.

Para testar como a DOX afeta as propriedades biofísicas das membranas celulares, tais como a temperatura de transição de fase (T_m), a cooperatividade da transição de fase e a microviscosidade membranar, utilizaram-se LUVs de DMPC como modelos miméticos membranares simples. Para tal, prepararam-se os LUVs de DMPC (50 mg/5 mL de água ultrapura) pelo método de hidratação e a extrusão a uma temperatura acima da T_m do DMPC (35 °C) de um modo semelhante ao já descrito na secção 2.2.1. Após preparação, os LUVs foram filtrados com filtros-R estéreis apirogênicos (0,2 μ m) para garantir a limpeza da suspensão requerida para uma boa contagem do número e tamanho das vesículas. A determinação da temperatura de transição de fase lipídica (T_m) realizou-se na presença ou na ausência de uma quantidade conhecida de fármaco. Para tal, uma alíquota de 2 mL de LUVs de DMPC (contendo ou não DOX), foi colocada numa célula de poliestireno descartável e o tamanho e número de nanovetores foi analisado no Zetasizer Nano ZS Malvern. Esta análise permitiu a determinação do valor ótimo de ajuste da posição da célula e do valor de atenuador a fixar, para posterior leitura da taxa média de contagem dos nanovetores. De seguida, definiram-se os parâmetros usados para medir o tamanho dos nanovetores e a taxa média de contagem (kcps) num intervalo de temperaturas entre 10-35 °C (intervalo que contém o valor descrito para a T_m do DMPC). Os parâmetros usados foram semelhantes aos da Tabela 3, exceto os de temperatura, tendo sido selecionado um varrimento de temperaturas entre os 10-35 °C,

com 1 °C de diferença entre leituras e com um posicionamento da célula a 1,05 nm e um valor fixo de atenuador de 6.

No ensaio realizado na presença de DOX, 1500 µL de DOX solubilizada em água ultrapura foram adicionados a 500 µL de LUVs de DMPC (concentração de DOX final: 3×10^{-4} M), seguindo-se uma incubação durante 30 minutos, a 35 °C (temperatura superior à T_m do DMPC). De seguida, a medida do tamanho dos nanovetores e a taxa média de contagem (kcps) foi realizada num intervalo de temperaturas entre 10-35 °C, com o analisador de partículas Malvern Zetasizer Nano ZS, da mesma forma descrita para os LUVs de DMPC.

Das leituras no Zetasizer, obtêm-se curvas sigmóides de variação da taxa de contagem em função da temperatura (Figura 42) e comparam-se as curvas obtidas para os lipossomas de DMPC sem DOX e com DOX, de modo a evidenciar alterações: nos valores de taxa de contagem das zonas que se encontram antes e depois da temperatura de transição de fase; e ainda no perfil de transição, se por exemplo, é suave ou mais abrupto [128-130].

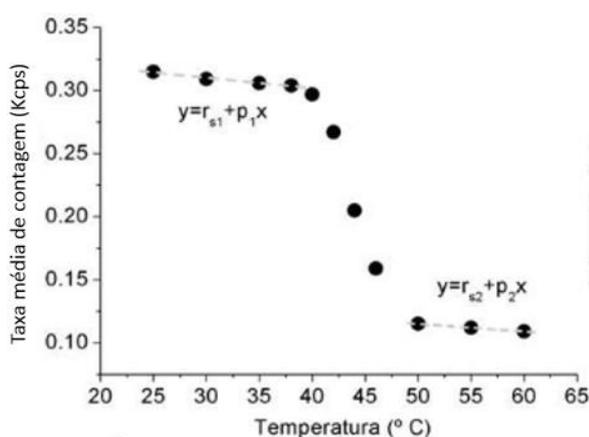


Figura 42 - Curva de perfil sigmoide representando a forma de determinação dos parâmetros r_{s1} , p_1 e r_{s2} e p_2 , correspondentes, respetivamente, à reta inicial antes da transição de fase e à reta final depois da transição de fase. Após determinação destes parâmetros, faz-se o ajuste não linear de acordo com a Equação 2.10 refinando os parâmetros T_m e cooperatividade (B).

Também é possível, a partir do perfil sigmoide obtido e do seu ponto de inflexão, calcular a cooperatividade da transição de fase e a T_m através da Equação 2.10 [128, 131].

$$TMC = r_{s1} + p_1 T + \frac{r_{s2} - r_{s1} + p_2 T - p_1 T}{1 + 10^{B(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m})}} \quad (2.10)$$

TMC = taxa média de contagem dos nanovetores;

r_{s1} e r_{s2} = ordenada na origem das retas antes (r_{s1}) e depois da transição de fase (r_{s2});

p_1 e p_2 = declive das retas obtidas nos patamares inicial (p_1) e final (p_2) do intervalo de temperaturas analisado;

T - temperatura absoluta medida dentro da célula.

T_m - temperatura de transição de fase principal do sistema membrana.

B - cooperatividade da transição de fase.

A transição da fase gel para a fase fluída membranar é um processo cooperativo quando acontece praticamente ao mesmo tempo em todos os pontos da membrana. Mas a cooperatividade pode ser perturbada quando se insere no meio lipídico uma molécula estranha, como por exemplo um fármaco. Assim, quando a cooperatividade da transição de fase varia é sinal que essa molécula se encontra no meio lipídico. Se a cooperatividade aumenta é porque a molécula se inseriu na região mais ordenada e superficial das cadeias acil (C_1 - C_7). Se a cooperatividade diminui, isso implica uma propagação lenta da transição de fase ao longo da membrana, ou seja, o desordenamento lipídico que ocorre na transição da fase gel para a fase fluída, dá-se não imediatamente, mas de uma forma mais gradual [129]. Se a cooperatividade da transição se mantém na presença do fármaco, pode-se inferir que este se encontra localizado mais profundamente no interior da bicamada lipídica resultando numa boa solubilização do fármaco na membrana que não parece interferir com a cooperatividade da transição. Se por outro lado a cooperatividade aumenta na presença do fármaco pode-se inferir que o seu carácter não é o de perturbador da ordem lipídica, mas pelo contrário o fármaco promove o empacotamento lipídico, muitas vezes por ter características anfipáticas semelhantes aos lípidos e se alojar bem entre eles, outras vezes por ser planar e se inserir entre os constituintes membranares [128, 131]. Um aumento da cooperatividade associado por exemplo a uma diminuição da T_m poderá significar já não um aumento do empacotamento lipídico, mas sim, uma boa distribuição da molécula na membrana, de forma a que a transição seja ainda mais rápida e uniforme do que seria sem a presença do fármaco.

2.2.6. Eficiência de encapsulação da doxorrubicina nas formulações lipossomais desenvolvidas

Diferentes métodos de encapsulação foram testados para analisar qual deles era mais eficiente a encapsular a DOX na formulação lipossomal DODAB:MO (1:2). No método de hidratação, uma solução de concentração conhecida de DOX em água serviu para hidratar o filme lipídico seco, ou seja, a DOX foi adicionada antes da formação dos MLVs. No método de incubação, uma solução de concentração conhecida de DOX em água foi adicionada aos LUVs. No método de inclusão direta, uma solução de concentração conhecida de DOX em etanol foi co-solubilizada com os lípidos em etanol, antes de se formar o filme lipídico seco.

Numa situação ideal a totalidade de DOX adicionada em cada método ficaria encapsulada nos lipossomas. No entanto, poderá não haver a total encapsulação da DOX nos lipossomas, restando ainda uma fração de DOX livre em solução aquosa e além disso para os métodos em que a DOX foi adicionada previamente à realização da extrusão (método de inclusão direta e

método de hidratação) também poderá ocorrer retenção de DOX nos filtros de policarbonato não sendo assim totalmente encapsulada pelos lipossomas. Para determinar a quantidade de DOX que é transportada pelos lipossomas (distribuída na bicamada lipídica ou distribuída dentro dos lipossomas nas fases não lamelares invertidas), foi realizado um ensaio de eficiência de encapsulação que consistiu em fazer passar as amostras de lipossomas contendo DOX preparados por cada um dos três métodos atrás descritos por unidades filtrantes com poros de 50 kDa (Amicon Ultra-15 com filtros de 50 kDa) para separar a DOX livre que consegue atravessar os poros do filtro e se acumula no fundo do tubo amicon (filtrado), dos lipossomas com a DOX encapsulada, que ficam retidos no filtro (resíduo), para posterior quantificação de DOX encapsulada.

Para tal, os amicons foram pré-lavados com 3 mL de álcool etílico, e centrifugados a 4000 rpm, a uma temperatura de 20 °C e durante 15 minutos. Depois de bem secos, foram lavados com a adição de 3 mL de água ultrapura e centrifugados durante 15 minutos a 4000 rpm e a uma temperatura de 20 °C. Este procedimento foi realizado duas vezes para assegurar que os filtros estavam limpos. Após o processo de lavagem, a água foi descartada e os amicons foram bem secos com papel e foram novamente centrifugados, mas de cabeça para baixo para tirar o máximo de água possível a partir do filtro. De seguida, os amicons foram recarregados com 1,5 mL de cada amostra de lipossomas de DODAB:MO (1:2) contendo DOX (encapsulada por cada um dos 3 métodos atrás descritos) e com lipossomas de DODAB:MO (1:2) sem DOX (controlo que permitiu provar que os lipossomas não passam através dos poros do filtro). Seguidamente procedeu-se à centrifugação a 4000 rpm e a uma temperatura de 20 °C até que não houvesse nenhuma mudança no volume do filtrado. No final da centrifugação, tanto o filtrado, como o resíduo foram recuperados e os volumes foram anotados e depois transferidos para eppendorfs de 2 mL, onde quer o filtrado quer o resíduo das diferentes amostras foram diluídos até 1,5 mL com água ultrapura para repor o volume inicial. A concentração de DOX nos filtrados e resíduos diluídos foi determinada por espectrofotometria UV-Vis, como mencionado na secção 2.2.4.1.1. A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada através da Equação (2.11):

$$EE (\%) = \frac{[DOX]_{incorporada}}{[DOX]_{total}} \times 100 \quad (2.11)$$

$[DOX]_{incorporada}$ = concentração (M) de doxorubicina incorporada/encapsulada no lípido, presente no resíduo
 $[DOX]_{total}$ = concentração total (M) de doxorubicina presente depois da extrusão, no resíduo e no filtrado (M)

2.2.7. Estudos de citotoxicidade e cálculo da IC₅₀ da doxorrubicina numa linha de células cancerígenas

Para avaliar o potencial de um fármaco anticancerígeno e reduzir a experimentação *in vivo* em animais, efetuam-se testes de citotoxicidade em linhas de células tumorais, cujos efeitos vão desde a alteração do metabolismo até à morte celular. Uma das premissas destes testes é que se o fármaco não promove a toxicidade nas células, tão-pouco promoverá no tecido tumoral.

2.2.7.1. Cultura celular de MDA-MB-468

A linha celular utilizada foi a MDA-MB-468 (*M.D. Anderson - metastatic breast*), uma linha celular metastática de mama humana, muito utilizada em testes de citotoxicidade da DOX e obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC). Estas células encontravam-se em criopreservação em nitrogénio líquido, foram descongeladas com duas semanas de antecedência, expandidas em frascos de cultura celular e cultivadas em DMEM (do inglês *Dulbecco's modified Eagle's médium*), um meio de crescimento sintético de pH 7,2-7,4, suplementado com 10% de FBS (do inglês *Fetal Bovine Serum*, ou seja, soro bovino fetal), e tratado com 1% de penicilina/estreptomicina (antibióticos para controlo da propagação microbiana), 1% de L-Glutamina (aminoácido essencial e suplemento fundamental dos meios de cultura) e 1% de piruvato de sódio (composto orgânico limitado nas células); e então mantidas na incubadora a 37 °C, em atmosfera húmida e a 5% de CO₂ (para manter o pH do meio).

2.2.7.1.1 Subcultura

As MDA-MB-468 são células aderentes e, como tal, o meio de cultura DMEM, foi aspirado dentro da câmara de fluxo laminar para evitar contaminações e as células foram lavadas duas vezes com PBS (do inglês: *Phosphate buffered saline*, ou seja, tampão fosfato salino) estéril. O ambiente estéril é de primordial importância visto que as culturas de células são cultivadas em meios muito nutritivos, que são ideais para a propagação de micro-organismos. Daí que o material utilizado dentro da câmara de fluxo laminar deva ser previamente autoclavado.

Para promover o destacamento das células MDA-MB-468 do frasco de cultura T25, adicionaram-se 500 µL de uma solução de tripsina estéril e incubou-se durante 3-4 minutos, a 37 °C. Decorrentes os 3-4 minutos, inativou-se a tripsina com 1,5 mL de DMEM estéril, pois este contém soro bovino fetal que inativa a tripsina, e passou-se essa suspensão para um tubo falcon.

Com o intuito de preparar um novo frasco T25 para outro ensaio, retirou-se cerca de 400 µL desse tubo falcon para um novo frasco de cultura T25 com 4,6 mL de DMEM e analisou-se a subconfluência (se cerca de 50 a 70% da área cultivável estava recoberta por células [134]) ao

microscópio invertido e incubou-se. A fim de manter as condições de subconfluência, a nutrição adequada e a eliminação de metabólitos secretados para o meio, as células devem ser destacadas e subcultivadas num novo frasco T25 a cada dois dias.

2.2.7.1.2 Contagem das células

Para determinar a diluição necessária a efetuar para obter cerca de 7500 células por poço procedeu-se à contagem das células. Para tal, foi concebida uma alíquota não estéril com 30 μL retirados da suspensão celular do tubo falcon estéril e 30 μL de corante de azul de tripano (corante que cora as células inviáveis, diferenciando as células viáveis das inviáveis). Essa alíquota foi colocada na câmara de Neubauer (Figura 43) para contagem das células viáveis ao microscópio invertido.

$$C = \frac{n^{\circ} \text{ de células contadas}}{n^{\circ} \text{ de quadrados contados}} \times 2 \times 10^{-4} \quad (2.12)$$

C= contagem das células viáveis (células/mL)

2 = fator de diluição do azul de tripano 60 $\mu\text{L}/30 \mu\text{L}=2$

10^{-4} = fator da câmara de Neubauer e da lamela: 0,1 mm^3

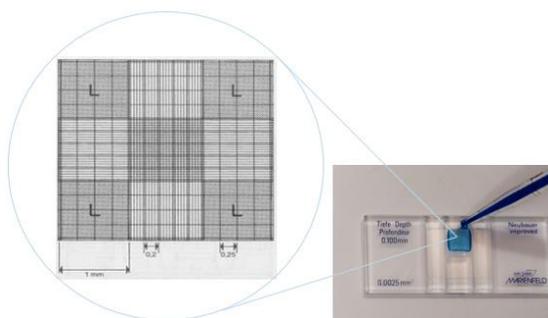


Figura 43 - Câmara de Neubauer

2.2.7.2. Plaqueamento da microplaca de 96 poços

Depois de preparar a suspensão com a diluição necessária para obter 7500 células/poço, aplicou-se 100 μL dessa suspensão diluída em cada um dos poços, com uma pipeta de repetição. Homogeneizou-se e analisou-se a microplaca ao microscópio invertido com o intuito de verificar se não se formaram agregados. De seguida, incubou-se a microplaca durante 24h para promover a adesão celular ao fundo dos poços. Ao fim desse período, analisaram-se as células ao microscópio invertido.

Dentro da câmara de fluxo, filtraram-se as amostras que iriam ser colocadas na microplaca, com seringas com filtros de 0,2 μm . Aspirou-se o meio dos poços da microplaca tendo o cuidado para não tocar no fundo do poço. De seguida adicionou-se, segundo a Figura 44, 40 μL de:

- 6 soluções de DOX solubilizada em água ultrapura (5×10^{-7} , 5×10^{-5} , 1×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1×10^{-3} e 5×10^{-3} M), representadas nos poços de D1 a D6.
- 6 formulações de DODAB:MO (1:2), as quais foram preparadas com adição de 6 soluções de DOX com as mesmas concentrações presentes de D1 a D6 e que estão representadas nos poços por F1 a F6.
- lipossomas controlo com concentração de lípido igual a $100 \mu\text{M}$ e que estão representados nos poços por L0. Os poços L0 servem para verificar a toxicidade da formulação placebo (sem fármaco).
- água ultrapura representada nos poços por H0. Os poços H0 servem para verificar a toxicidade da água.

Adicionou-se $60 \mu\text{L}$ de DMSO (para que este não exceda 30 % do volume total em cada poço).

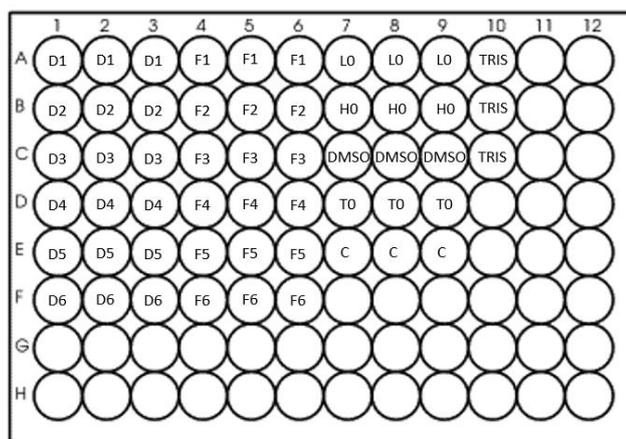


Figura 44 - Microplaca de 96 poços: D1 a D6 (6 concentrações de DOX: 5×10^{-7} ; 5×10^{-5} ; 1×10^{-4} ; 5×10^{-4} ; 1×10^{-3} e 5×10^{-3} M); F1 a F6 (formulações DODAB:MO (1:2) com 6 concentrações de DOX: 5×10^{-7} ; 5×10^{-5} ; 1×10^{-4} ; 5×10^{-4} ; 1×10^{-3} e 5×10^{-3} M); L0 (lipossomas controlo); H0 (água); DMSO (controlo de morte, pois é citotóxico à temperatura ambiente); T0 (número de células ao início da experiência); C (controlo de vida) e Tris (branco).

Adicionou-se também $160 \mu\text{L}$ de meio de cultura a todos os poços, exceto aos do DMSO, aos quais se adicionou apenas $140 \mu\text{L}$ de meio e aos T0 só se adicionou $140 \mu\text{L}$ de PBS para lavagem, que depois foi aspirado.

Homogeneizaram-se os poços e incubou-se a 37°C , durante 48h.

2.2.7.3. Protocolo do teste colorimétrico da sulforrodamina B (SRB)

Um dos testes de citotoxicidade muito utilizado e recomendado para avaliar o efeito de fármacos na proliferação celular é o teste colorimétrico da sulforrodamina B (SRB). Este teste apresenta várias vantagens: permite que um grande número de amostras seja testado em poucos dias; é sensível; permite discriminar a atividade citostática de citocida; requer equipamentos relativamente simples e a leitura da absorvância pode ser realizada várias semanas após o

término do teste [132]. Com este teste é possível medir a proliferação celular e a citotoxicidade que um fármaco como a DOX pode promover.

A sulforrodamina B é um corante fluorescente de cor violeta, com absorvância máxima a 554 nm e emissão de fluorescência máxima a 586 nm [133]. Este corante possui dois grupos sulfônicos (Figura 45) que se ligam às proteínas das membranas das células, permitindo a quantificação do número de células viáveis por meio de absorvância exibida pelas proteínas coradas pela SRB.

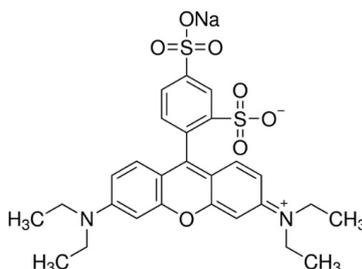


Figura 45 - Estrutura química do corante sulforrodamina B [133].

O teste colorimétrico da sulforrodamina B é efetuado após 48 h da adição dos compostos às células. Para tal, analisou-se a microplaca ao microscópio invertido e aspirou-se o líquido dos poços, com cuidado para não tocar no fundo (Figura 46).

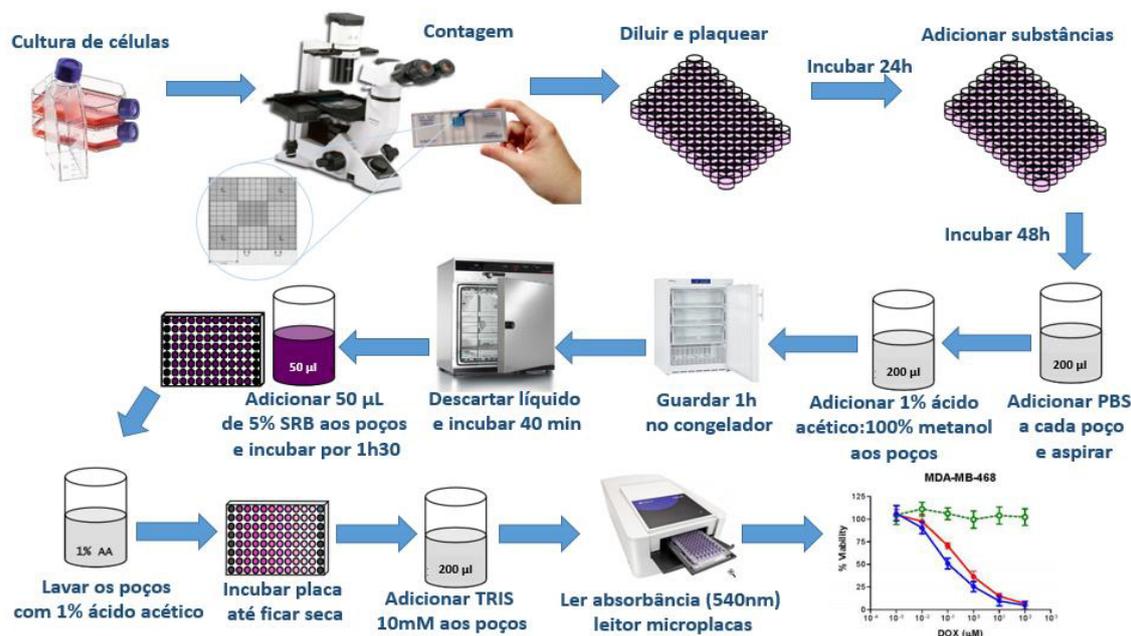


Figura 46 - Teste de citotoxicidade – SRB (48h).

Adicionou-se 200 µL de PBS aos poços, com ajuda de uma micropipeta multicanal (exceto nos T0). Aspirou-se o líquido e adicionou-se 200 µL de ácido acético: metanol (1:100) a todos os poços, para fixar as células e guardou-se durante 1 h no congelador (-20 °C). Depois desse período, descartou-se o líquido da placa, por inversão para um frasco com restos de SRB e esta

foi colocada, invertida e com a tampa da microplaca como suporte, a 37 °C, para secar, durante cerca de 30-60 minutos.

Com uma micropipeta multicanal, adicionou-se 50 µL da solução 0,5% de sulforrodamina B (em 1% de ácido acético) a todos os poços e agitou-se a microplaca por forma a uniformizar a solução de SRB. Incubou-se a placa a 37 °C por 1h30. Depois desse período, lavou-se a placa várias vezes com uma solução 1% de ácido acético, para remover o excesso de SRB que não se ligou às proteínas. Incubou-se a placa a 37 °C, por cerca de 40 minutos (até os poços estarem bem secos).

Com uma micropipeta multicanal, adicionou-se 200 µL de solução Tris 10 mM a todos os poços (e deixou-se 3 poços só com Tris que representam o branco para a leitura). Agitou-se até dissolver a SRB e leram-se as absorvâncias, a 540 nm, em um leitor de microplacas.

2.2.7.4. Cálculo da IC₅₀ da doxorubicina em células MDA-MB-468

O IC₅₀ indica a concentração, em µg/mL, de um fármaco ou outra substância necessária para inibir 50 % do crescimento celular.

O teste de citotoxicidade SRB foi realizado para conseguirmos determinar o IC₅₀ da DOX solubilizada em água ultrapura e o da DOX encapsulada na formulação DODAB:MO (1:2) e verificar qual a que apresenta maior potencial citotóxico.

Os resultados obtidos durante a leitura de absorvâncias foram usados para calcular a percentagem de proliferação celular e para traçar a variação da proliferação celular (%) em função da concentração de DOX (M) sendo assim possível examinar o efeito citotóxico de diferentes concentrações de DOX livre e encapsulada. Os valores abaixo de 100 % e acima de 0 % representam a inibição de crescimento (efeito citostático), enquanto os valores negativos, abaixo de 0 %, representam morte celular (efeito citocida) [135].

O IC₅₀ foi calculado através do ajuste linear da variação da proliferação celular (%) em função da concentração de DOX.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização das formulações lipossomais com e sem doxorubicina

Um dos objetivos desta dissertação residiu em desenvolver uma formulação lipossomal de DODAB:MO (1:2), que seria a formulação placebo, preparada segundo o método de hidratação do filme lipídico com o intuito de ser comparada com formulações de DODAB:MO (1:2) contendo concentrações crescentes de DOX encapsulada por três métodos de encapsulação passivos: hidratação, incubação e inclusão direta. Pretendia-se com isto, analisar a influência da DOX no tamanho, PDI e potencial-zeta da formulação, assim como, avaliar a influência do método de preparação e encapsulação no tamanho (com distribuições em intensidade e número), polidispersão (PDI), potencial zeta e a estabilidade ao longo de doze semanas, por técnicas de DLS e ELS.

De realçar que independentemente do método de preparação, todas as formulações sofreram extrusão e as medições pelas técnicas de DLS e ELS das formulações foram realizadas imediatamente após a extrusão ou no dia seguinte. De notar também que a formulação placebo de DODAB:MO (1:2) foi produzida em triplicado, e os resultados das medidas efetuadas corresponde à média e desvio padrão das réplicas produzidas. As formulações de DODAB:MO (1:2) contendo 3 concentrações distintas de DOX encapsuladas por 3 métodos diferentes foram produzidas apenas uma vez.

3.1.1. Método de hidratação

3.1.1.1. Tamanho e PDI

As Figuras 47 e 48 apresentam o tamanho médio e o PDI, bem como, os respetivos desvios padrão, da formulação placebo de DODAB:MO (1:2), e de três suspensões de DODAB:MO (1:2) com concentrações crescentes de DOX encapsulada pelo método de hidratação.

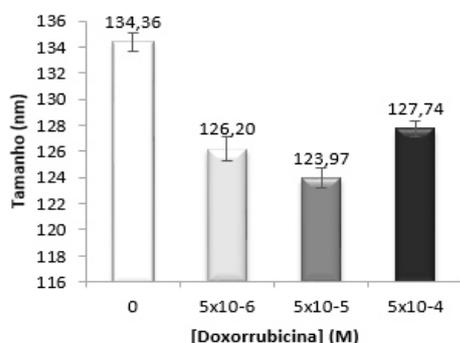


Figura 47 – Tamanho médio e respetivo desvio padrão das formulações placebo de DODAB:MO (1:2) ([Doxorrubicina]=0 M) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de hidratação.

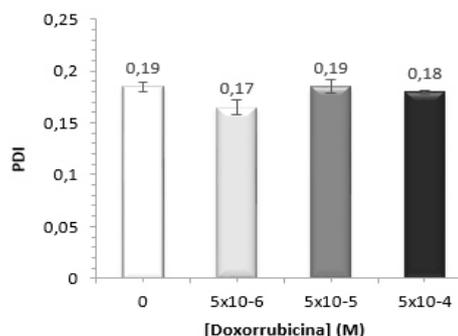


Figura 48 - PDI e respetivo desvio padrão das formulações placebo de DODAB:MO (1:2) ([Doxorrubicina]=0 M) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de hidratação.

Comparando o tamanho das quatro amostras verifica-se que este é menor que 200 nm, tal como pretendido, para tirar proveito do efeito EPR, bem como, para permitir um aumento do tempo de circulação da formulação.

Comparando o tamanho médio das três amostras de DODAB:MO (1:2) com DOX encapsulada com a formulação placebo verifica-se que adicionando DOX à formulação ocorre uma diminuição de tamanhos (Figura 47). Este facto pode ser explicado com o efeito de empacotamento que a DOX proporciona ao ser adicionada ao lipossoma ou por alguma reorganização lipídica da formulação, de forma a acomodar o fármaco, que origina assim vesículas mais condensadas.

Comparando as três formulações de DODAB:MO (1:2) contendo DOX, verifica-se que para as duas concentrações menores de DOX, o tamanho médio dos lipossomas diminui com o aumento da concentração de DOX e aumenta ligeiramente para a formulação contendo a concentração mais elevada de DOX. É provável que este ligeiro aumento de tamanho verificado para a formulação com maior quantidade de DOX se deva ao facto de esta concentração pertencer já à gama de concentrações para a qual se começam a verificar a formação de dímeros de DOX (ver Figura 68). Uma explicação possível para o aumento do tamanho dos lipossomas dever-se-á ao facto de os dímeros de DOX (cuja estrutura se encontra representada na Figura 20) serem mais volumosos e menos planares que a DOX monomérica. Assim, para melhor acomodar as volumosas estruturas oligoméricas de DOX nos lipossomas, a MO (lípidio mais fluído da formulação) reorganizar-se-á, possivelmente ao nível da bicamada lipídica de DODAB. Tal reorganização é concordante com os resultados de tamanho dos lipossomas, pois a intercalação de mais moléculas de MO ao nível da bicamada de DODAB induz uma diminuição da curvatura das vesículas, com conseqüente aumento do seu tamanho.

Quanto ao PDI verifica-se que este não se altera significativamente relativamente à formulação placebo mantendo-se inferior a 0,2 para todas as formulações. Deste modo pode concluir-se que as formulações lipossomais desenvolvidas apresentam um valor de PDI aceitável e concordante com um único tipo de população.

3.1.1.2. **Potencial zeta**

Na Figura 49 observa-se o potencial zeta e respetivo desvio padrão para cada amostra.

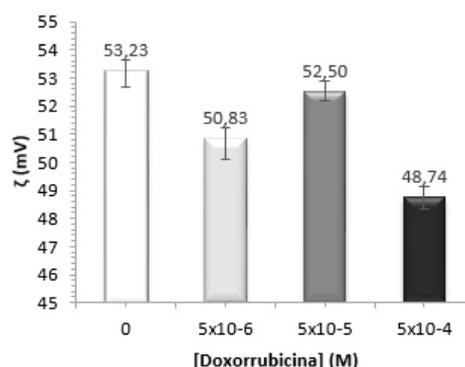


Figura 49 - Potencial zeta e respetivo desvio padrão da formulação placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações crescentes de doxorubicina encapsulada, pelo método de hidratação.

A formulação placebo de DODAB:MO (1:2) tem um potencial zeta médio de + 53,23 ± 1,14 mV, o que é próximo de outros valores reportados para o mesmo tipo de suspensão lipossomal [71]. Estes valores de carga superficial maiores que +30 mV asseguram a estabilidade da formulação devido à repulsão superficial de cargas entre os lipossomas. Além disso, a carga superficial positiva permitirá a complexação de ácidos nucleicos e assegurará uma melhor internalização celular, uma vez que as membranas celulares apresentam-se carregadas negativamente [63].

Os resultados do potencial zeta mostram que comparativamente à formulação placebo, o valor de potencial zeta é semelhante para as formulações contendo menor concentração de DOX (é necessário lembrar que diferenças de potencial zeta de ± 3 mV não são consideradas significativas). No entanto, à semelhança do que se verificava para o tamanho dos lipossomas, para a concentração mais elevada de DOX, onde a dimerização ocorre, o potencial zeta apresenta uma descida acentuada (diminuição > 3 mV) em relação à formulação placebo. Esta descida do potencial zeta é concordante com o descrito anteriormente. Assim, para melhor acomodar as volumosas estruturas oligoméricas de DOX nos lipossomas, a MO reorganizar-se-á e a intercalação de mais moléculas de MO ao nível da bicamada de DODAB induz uma diminuição da curvatura das vesículas, com conseqüente aumento do seu tamanho e diminuição da densidade de cargas positivas de DODAB.

3.1.2. Método de incubação

3.1.2.1. Tamanho e PDI

Para os lipossomas preparados por este método as conclusões são semelhantes às obtidas pelo método anterior. Ou seja, todos os lipossomas produzidos apresentam um tamanho médio menor que 200 nm, tal como pretendido e verifica-se que adicionando DOX à formulação ocorre uma diminuição de tamanhos (Figura 50).

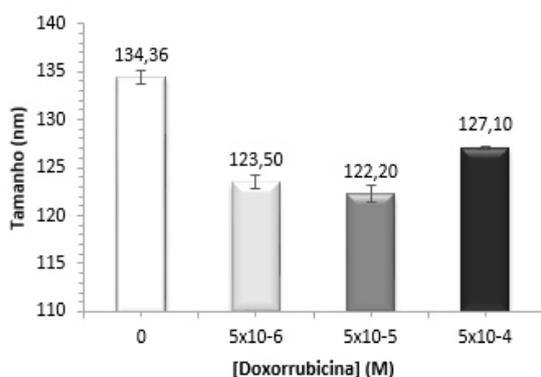


Figura 50 – Tamanho médio e respetivo desvio padrão das formulações placebo de DODAB:MO (1:2) ([Doxorrubicina]=0 M) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de incubação.

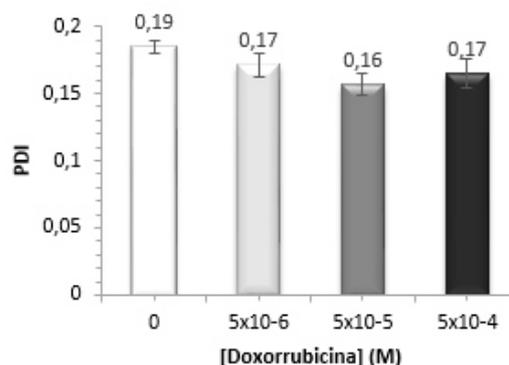


Figura 51 - PDI e respetivo desvio padrão das formulações placebo DODAB:MO (1:2) ([Doxorrubicina]=0 M) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de incubação.

Este facto pode ser explicado com o efeito de empacotamento que a DOX proporciona ao ser adicionada ao lipossoma ou por alguma reorganização lipídica da formulação, de forma a acomodar o fármaco, que origina assim vesículas mais condensadas.

Comparando as três formulações de DODAB:MO (1:2) contendo DOX, verifica-se que tal como para o método de hidratação, para as duas concentrações menores de DOX, o tamanho médio dos lipossomas diminui com o aumento da concentração de DOX e aumenta ligeiramente para a formulação contendo a concentração mais elevada de DOX. É provável que os dímeros de DOX, por serem mais volumosos e menos planares do que a DOX monomérica, induzam uma reorganização ao nível da bicamada lipídica de DODAB. Tal reorganização é concordante com os resultados de tamanho dos lipossomas, pois a intercalação de mais moléculas de MO ao nível da bicamada de DODAB induz uma diminuição da curvatura das vesículas, com consequente aumento do seu tamanho.

Quanto ao PDI (Figura 51) verifica-se que este não se altera significativamente relativamente à formulação placebo mantendo-se inferior a 0,2 para todas as formulações. Deste modo pode concluir-se que as formulações lipossomais desenvolvidas apresentam um valor de PDI aceitável e concordante com um único tipo de população.

Comparando o tamanho e PDI das formulações de DODAB:MO (1:2) com DOX encapsulada pelo método de incubação (Figuras 50 e 51) com o tamanho e PDI das formulações de DODAB:MO (1:2) com DOX encapsulada pelo método de hidratação (Figuras 47 e 48) verifica-se que o tamanho médio é menor para o método de incubação, indicando a formação de vesículas mais condensadas por este método.

3.1.2.2. Potencial zeta

Na Figura 52 observa-se o potencial zeta e respetivo desvio padrão para cada amostra.

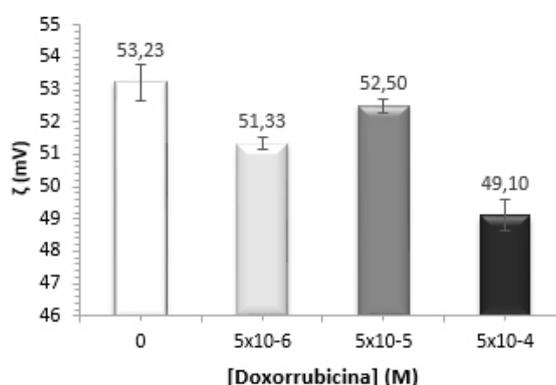


Figura 52 - Potencial zeta e respetivo desvio padrão da formulação placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações crescentes de doxorubicina encapsulada, pelo método de incubação.

Os resultados do potencial zeta são semelhantes aos do método de hidratação, verificando-se que comparativamente com a formulação placebo, o valor de potencial zeta das formulações contendo baixas concentrações de DOX não apresenta uma variação apreciável (variação <3 mV).

No entanto, à semelhança do que se verificava para o tamanho dos lipossomas, para a concentração mais elevada de DOX, onde a dimerização ocorre, o potencial zeta apresenta uma descida acentuada (diminuição > 3 mV) em relação à formulação placebo. Esta descida do potencial zeta é concordante com o descrito anteriormente. Assim, para melhor acomodar as volumosas estruturas oligoméricas de DOX nos lipossomas, a MO reorganizar-se-á e a intercalação de mais moléculas de MO ao nível da bicamada de DODAB induz uma diminuição da curvatura das vesículas, com conseqüente aumento do seu tamanho e diminuição da densidade de cargas positivas de DODAB.

3.1.3. Método de inclusão direta

3.1.3.1. Tamanho e PDI

Comparando o tamanho médio das quatro amostras presentes na Figura 53, verifica-se que este é menor que 200 nm, tal como pretendido. Os valores de PDI (Figura 54) são aceitáveis para uma mistura de lípidos e são concordantes com um único tipo de população. Comparando o tamanho e PDI das amostras contendo DOX encapsulada pelo método de inclusão direta (Figuras 53 e 54), com as amostras com DOX encapsulada pelo método de hidratação (Figuras 47 e 48) e pelo método de incubação (Figuras 50 e 51) verifica-se que o tamanho das vesículas e o PDI aumentaram. E que ao contrário dos dois métodos anteriores (hidratação e incubação), as amostras com maior tamanho são as que contêm menores concentrações de DOX (5×10^{-6} e 5×10^{-5} M) e a de tamanho menor é a que contém uma maior concentração de DOX (5×10^{-4} M).

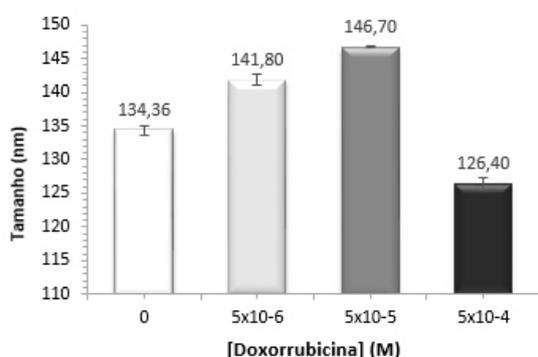


Figura 53 - Tamanho e respetivo desvio padrão das formulações placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método inclusão direta.

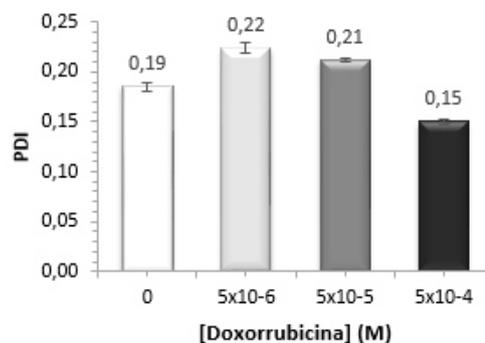


Figura 54 - PDI e respetivo desvio padrão das formulações placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método inclusão direta.

Apesar de os resultados obtidos pelos 3 métodos serem aparentemente contraditórios, como veremos na secção 3.4.1 e na Figura 96, existe para os três métodos uma relação direta entre o tamanho da vesícula e a eficiência de encapsulação, EE (%). Assim, para os três métodos, um aumento da EE (%) de DOX é acompanhada por uma condensação dos lipossomas (diminuição do tamanho), provavelmente porque na presença do fármaco na forma monomérica e para melhor o acomodar se dará uma reorganização da MO que se concentra mais no interior das vesículas. Este tipo de reorganização da MO em vesículas mais condensadas foi já observado por cryo-TEM [59].

3.1.3.2. Potencial zeta

Na Figura 55 observa-se o potencial zeta e respetivo desvio padrão para as formulações placebo de DODAB:MO (1:2) e contendo concentrações crescentes de DOX.

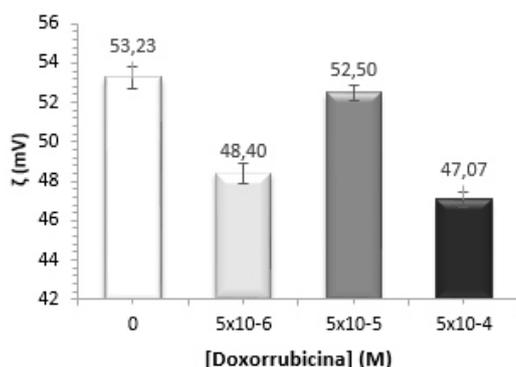


Figura 55 - Potencial zeta e respetivo desvio padrão das formulações placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de inclusão direta.

Os resultados do potencial zeta são semelhantes aos do método de hidratação e de incubação, verificando-se que para as formulações contendo concentrações de DOX, o potencial zeta apresenta uma descida em relação à formulação placebo. Esta descida do potencial zeta é concordante com o descrito anteriormente. Assim, para melhor acomodar as moléculas de DOX nos lipossomas, a MO reorganizar-se-á e a intercalação de mais moléculas de MO ao nível da bicamada de DODAB induz uma diminuição da curvatura das vesículas, com conseqüente diminuição da densidade de cargas positivas de DODAB.

3.1.4. Análise da estabilidade das formulações em condições de armazenamento

3.1.4.1. Método de Hidratação

3.1.4.1.1 Estabilidade por análise do tamanho e PDI ao longo do tempo

Como se pode observar pela figura 56, os tamanhos dos lipossomas de DODAB:MO (1:2) mantêm-se com um valor de cerca de 130 nm ao longo das 12 semanas (t₀ a t₁₂) para as formulações contendo DOX. Já a formulação placebo sofre, a partir da segunda semana, um aumento de tamanho (t₂=132; t₃=140 e t₁₂=149) que é acompanhado por um aumento do valor de PDI (t₂=0,23; t₃=0,34 e t₁₂=0,35) indicando menor estabilidade desta formulação relativamente às formulações que contêm DOX. No entanto convém realçar que a formulação contendo maior concentração de DOX, apesar de evidenciar relativamente ao placebo uma maior estabilidade, devido à maior constância dos tamanhos, evidencia uma menor estabilidade relativamente às outras formulações contendo menor concentração de DOX, tal como se pode observar pelo aumento do PDI a partir da semana 4.

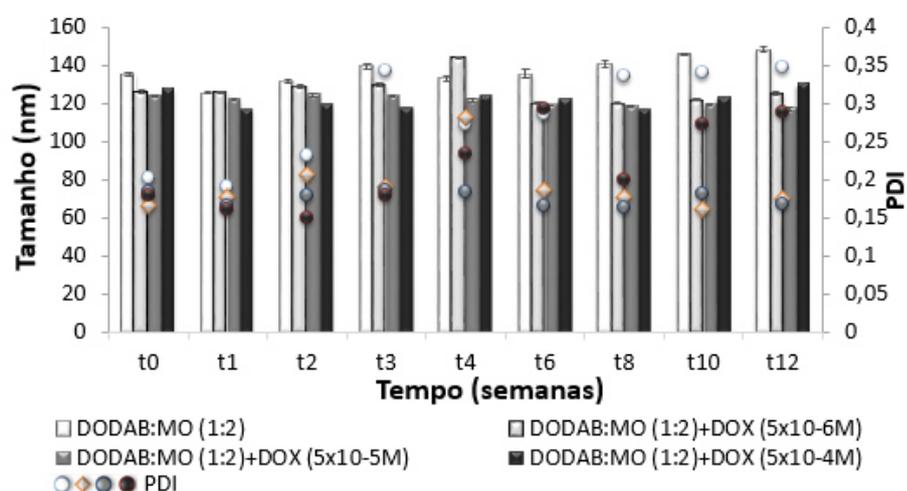


Figura 56 - Avaliação da estabilidade das formulações por análise ao longo do tempo dos tamanhos e PDI da formulação placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorrubicina encapsulada pelo método de hidratação, ao longo de 12 semanas. t0 indica a primeira leitura feita imediatamente após a preparação das formulações e t1 a t12 indicam leituras correspondentes às semanas 1 a 12, após a preparação.

3.1.4.1.2 Estabilidade por análise do potencial zeta ao longo do tempo

Com o decorrer das semanas verifica-se que o potencial zeta das amostras não variou de forma muito significativa (Figura 57) para as formulações contendo menores concentrações de DOX, mantendo para estas formulações um valor próximo dos +50 mV. Para a formulação placebo e para a formulação contendo maior concentração de DOX verificou-se maior variação do potencial zeta ao longo do tempo, o que está em consonância com a maior instabilidade destas formulações já verificada através da análise do PDI ao longo do tempo.

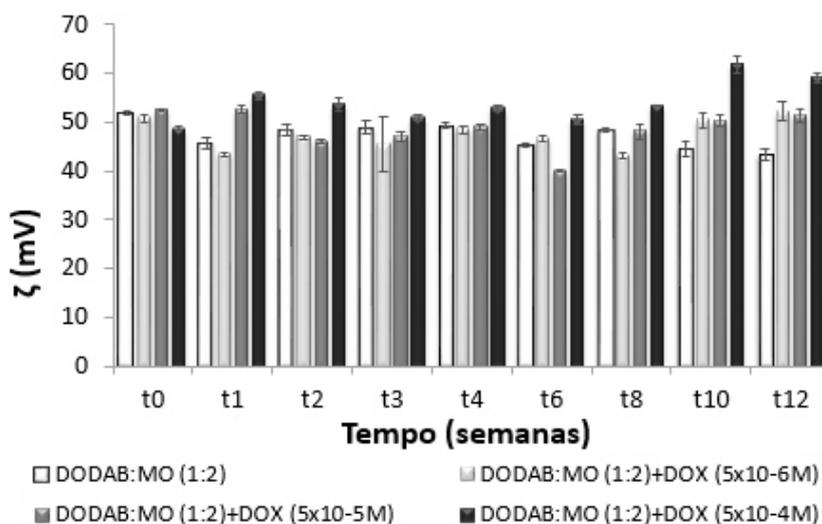


Figura 57 - Avaliação da estabilidade das formulações por análise ao longo do tempo do potencial zeta da formulação placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorrubicina encapsulada pelo método de hidratação, ao longo de 12 semanas. t0 indica a primeira leitura feita imediatamente após a preparação das formulações e t1 a t12 indicam leituras correspondentes às semanas 1 a 12 após a preparação.

3.1.4.2. Método de incubação

3.1.4.2.1 Estabilidade por análise do tamanho e PDI no ao longo do tempo

Como se pode observar pela Figura 58, os tamanhos dos lipossomas de DODAB:MO (1:2) mantêm-se com um valor de cerca de 120 nm ao longo das 12 semanas (t0 a t12) para as formulações contendo DOX. Já a formulação placebo sofre, a partir da segunda semana, um aumento de tamanho (t2=132; t3=140 e t12=149) que é acompanhado por um aumento do valor de PDI (t2=0,23; t3=0,34 e t12=0,35) indicando menor estabilidade desta formulação relativamente às formulações que contêm DOX.

As variações no tamanho médio e PDI da formulação DODAB:MO (1:2) contendo a concentração mais elevada de DOX, evidentes na semana t1 e t2 podem atribuir-se a uma insuficiente estabilização da temperatura a que o ensaio foi realizado. De facto, tal como reportado na literatura, as formulações de DODAB:MO com alto teor de MO (1:1; 1:2 e 1:4) são particularmente sensíveis aos efeitos da temperatura, que provoca aumento da fluidez dos lipossomas e coexistência de nanovetores contendo misturas de DODAB:MO e nanovetores formados exclusivamente por MO [59, 60]. Esta coexistência de nanovetores de composição distinta justifica o aumento de PDI. Uma vez que após a análise de estabilidade as amostras são armazenadas no frigorífico, a formulação contendo maior concentração de DOX recuperou a partir da semana 3 a sua organização inicial, tendo-se tido o cuidado de nos ensaios seguintes permitir tempo suficiente à estabilização da temperatura.

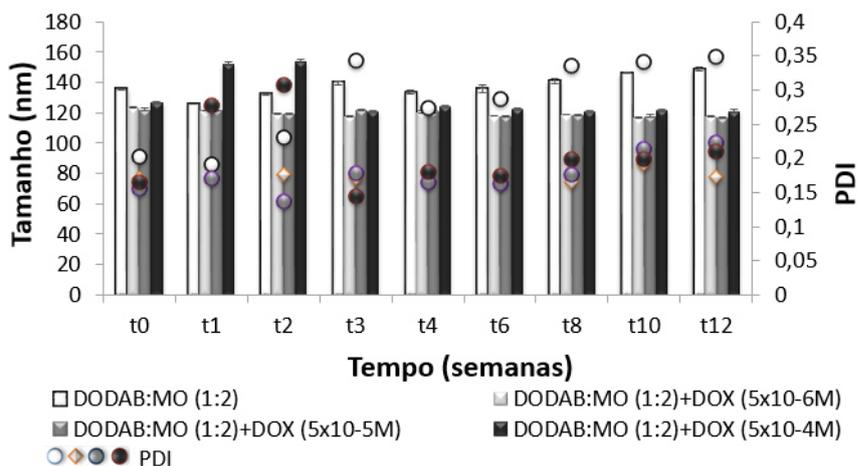


Figura 58 - Tamanho, PDI e estabilidade de formulações de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorrubicina encapsulada pelo método de incubação.

3.1.4.2.2 Estabilidade do potencial zeta no tempo

Com o decorrer das semanas verifica-se que o potencial zeta das amostras não variou de forma muito significativa (Figura 59) para as formulações contendo DOX, mantendo para estas

formulações um valor próximo dos +50 mV. Para a formulação placebo verificou-se maior variação do potencial zeta ao longo do tempo, o que está em consonância com a maior instabilidade desta formulação, já verificada através da análise do PDI ao longo do tempo.

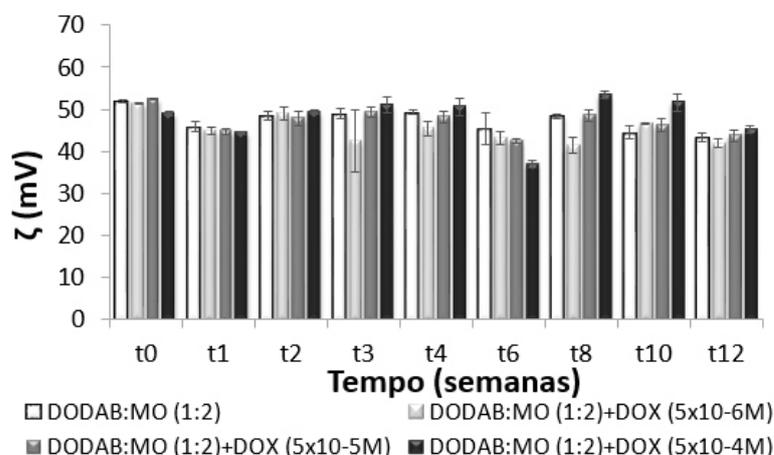


Figura 59 - Avaliação da estabilidade das formulações por análise ao longo do tempo do potencial zeta da formulação placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorrubicina encapsulada pelo método de incubação, ao longo de 12 semanas. t₀ indica a primeira leitura feita imediatamente após a preparação das formulações e t₁ a t₁₂ indicam leituras correspondentes às semanas 1 a 12 após a preparação.

3.1.4.3. Método de inclusão direta

3.1.4.3.1 Estabilidade por análise do tamanho e PDI ao longo do tempo

Analisando o tamanho e PDI das amostras de DODAB:MO (1:2) com DOX encapsulada pelo método de inclusão direta (Figura 60) verifica-se que estas formulações são estáveis ao longo de 12 semanas e tal como nos métodos anteriores apresentam maior estabilidade que a formulação placebo para a qual se verifica um aumento gradual do tamanho e PDI especialmente a partir da 4^a semana. Comparando a estabilidade das formulações contendo DOX preparadas por este método ou pelos dois métodos anteriores, constata-se que o método de inclusão direta permite a obtenção de vesículas com DOX encapsulada com uma maior estabilidade de tamanho e PDI.

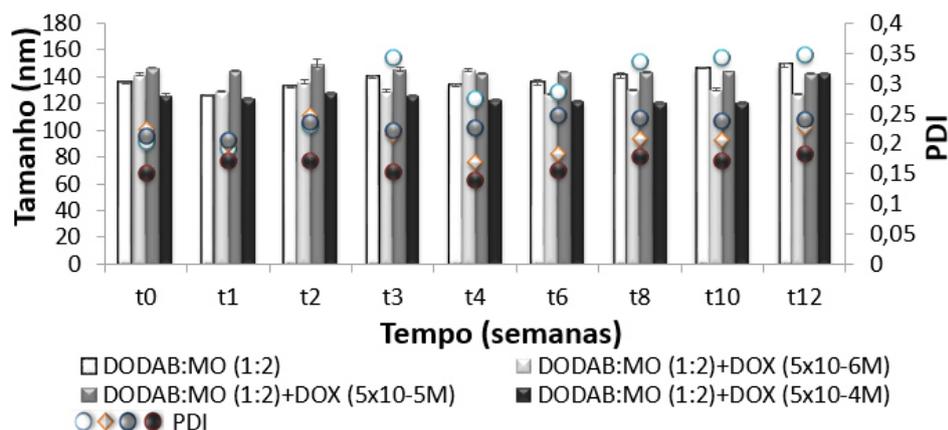


Figura 60 - Avaliação dos tamanhos e PDI da formulação placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de inclusão direta, ao longo de 12 semanas. t0 indica a primeira leitura feita imediatamente após a preparação das formulações e t1 a t12 indicam leituras correspondentes às semanas 1 a 12 após a preparação.

3.1.4.3.2 Estabilidade por análise do potencial zeta ao longo do tempo

Com o decorrer das semanas verifica-se que o potencial zeta das amostras não variou muito (Figura 61), até à quarta semana (t4), tendo-se verificado que a média dos valores das formulações apresentaram uma ligeira diminuição no valor do potencial registado ao t0. A média dos valores da formulação DODAB:MO (1:2) + DOX (5×10^{-6} M) foi de $50,07 \text{ mV} \pm 0,66$, da formulação DODAB:MO (1:2) + DOX (5×10^{-5} M) foi de $48,72 \text{ mV} \pm 1,61$ e da formulação DODAB:MO (1:2) + DOX (5×10^{-4} M) foi de $47,60 \text{ mV} \pm 0,07$. A diferença dos valores de potencial das formulações contendo DOX é portanto inferior a 3 mV, e essa constância de valores do potencial zeta sublinha a maior estabilidade das vesículas obtidas pelo método de inclusão, face às vesículas obtidas pelos métodos de hidratação e incubação.

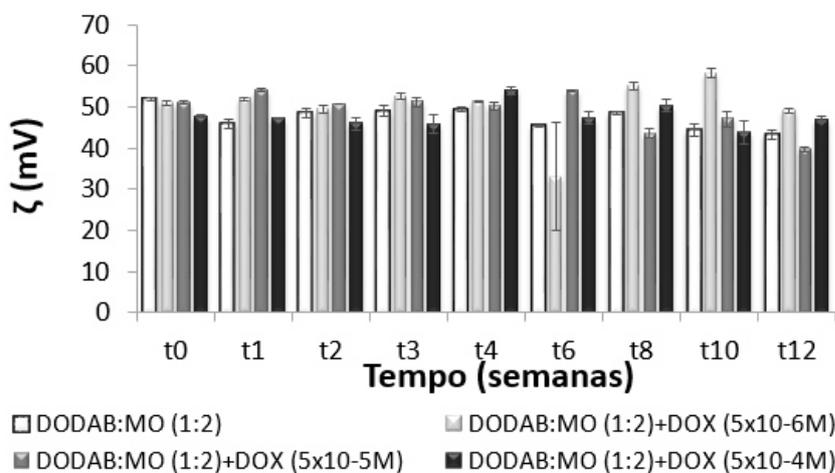


Figura 61 - Avaliação da estabilidade das formulações por análise ao longo do tempo do potencial zeta da formulação placebo de DODAB:MO (1:2) e DODAB:MO (1:2) com três concentrações de doxorubicina encapsulada pelo método de inclusão direta, ao longo de 12 semanas. t0 indica a primeira leitura feita imediatamente após a preparação das formulações e t1 a t12 indicam leituras correspondentes às semanas 1 a 12 após a preparação.

3.2. Doseamento da doxorubicina por espectroscopia

3.2.1. Curva de calibração da doxorubicina solubilizada em tampão de pH 7,4

3.2.1.1. Por análise de espectrofotometria UV-Vis

A Figura 62 representa os espectros de absorvância obtidos para padrões de concentração rigorosa de DOX solubilizada em tampão HEPES, a pH 7,4.

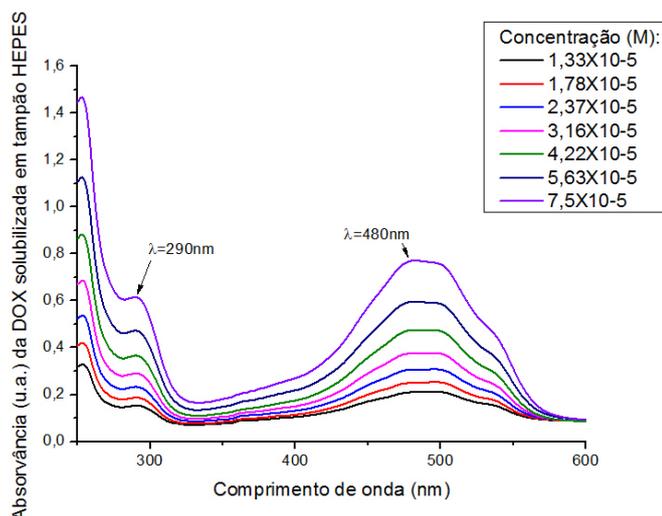


Figura 62 - Espectros de absorvância de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão HEPES, com pH 7,4.

Analisando os espectros da Figura 62 observa-se que a absorvância da DOX solubilizada em tampão HEPES é máxima a λ 480 nm. Traçando uma relação entre as concentrações de cada padrão de DOX e os valores de absorvância obtidos nesse pico, obtêm-se a curva de calibração apresentada na Figura 63.

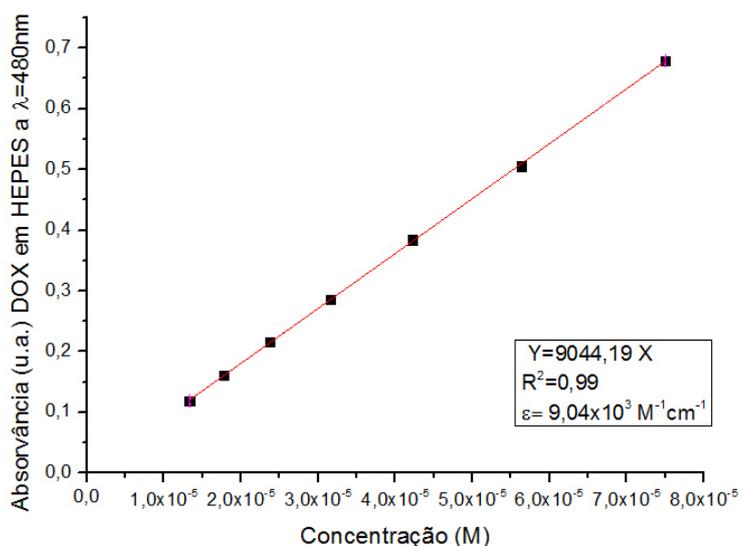


Figura 63 - Curva de calibração de absorvância das soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão HEPES, com pH 7,4, ao comprimento de onda máximo de 480 nm.

3.2.1.2. Por análise de espectrofluorimetria

Na Figura 64 podemos analisar os espectros de emissão de fluorescência obtidos para soluções padrão de concentração rigorosa de DOX solubilizada em tampão HEPES, a pH 7,4.

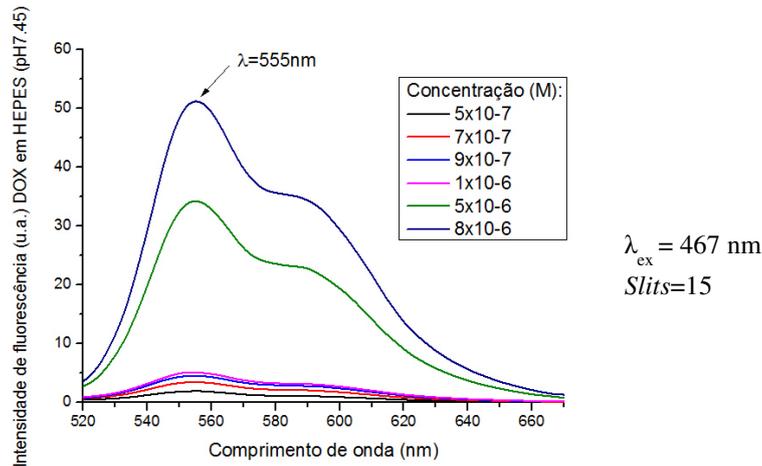


Figura 64 - Espectros de emissão de fluorescência de soluções padrão de doxorubicina solubilizadas em tampão HEPES, com pH 7,4.

Analisando os espectros de emissão de fluorescência da Figura 64 observa-se que a intensidade de fluorescência da DOX solubilizada em tampão HEPES (pH 7,4) é máxima a 555 nm. Traçando uma relação entre as concentrações de cada padrão de DOX e os valores de intensidade de fluorescência obtidos nesse pico, obtêm-se a curva de calibração apresentada na Figura 65.

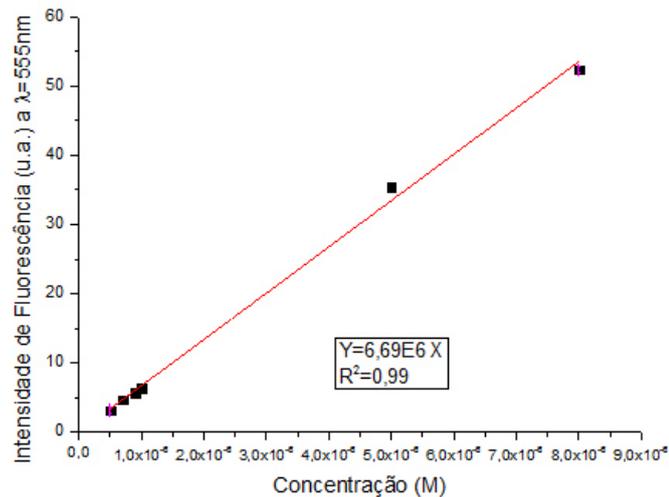


Figura 65 - Curva de calibração de fluorescência de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão HEPES, com pH 7,4, ao comprimento de onda máximo de 555 nm.

3.2.2. Curva de calibração da doxorubicina solubilizada em tampão de pH 5

3.2.2.1. Por análise de espectrofotometria UV-Vis

Na Figura 66 podemos analisar os espectros de absorvância obtidos para soluções padrão de concentração rigorosa de DOX solubilizada em tampão acetato, com pH 5.

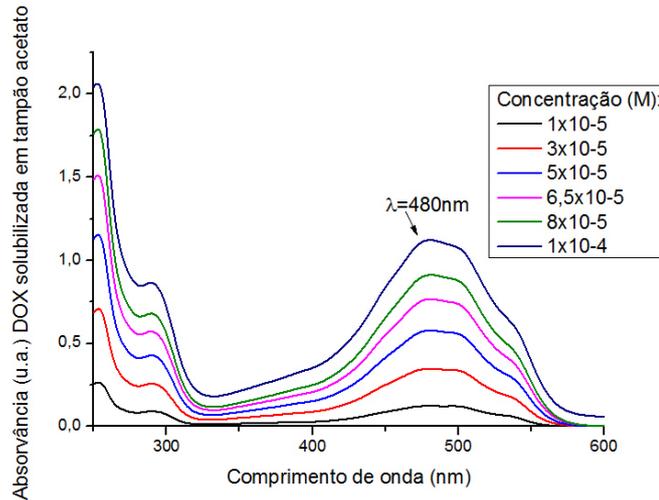


Figura 66 - Espectros de absorvância de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão acetato, com pH 5.

Analisando o espectro de absorvância da Figura 66 observa-se que a absorvância da DOX solubilizada em tampão acetato é máxima a λ 480 nm. Traçando uma relação entre as concentrações de cada padrão de DOX e os valores de absorvância obtidos nesse pico, obtém-se a curva de calibração apresentada na Figura 67.

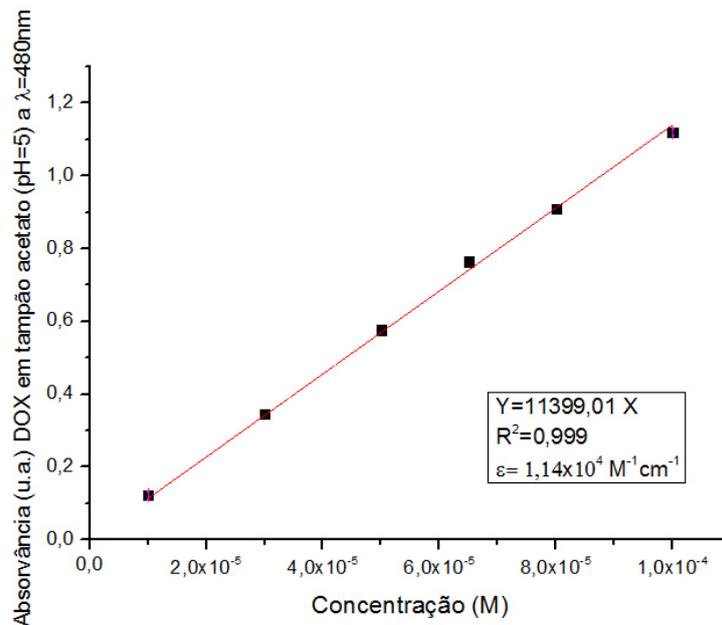


Figura 67 - Curva de calibração de absorvância de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão acetato, com pH 5.

3.2.2.2. Por análise de espectrofluorimetria

Na Figura 68 podemos analisar os espectros de emissão de fluorescência de soluções padrão de DOX, de concentração rigorosa, solubilizada em tampão acetato, com pH 5.

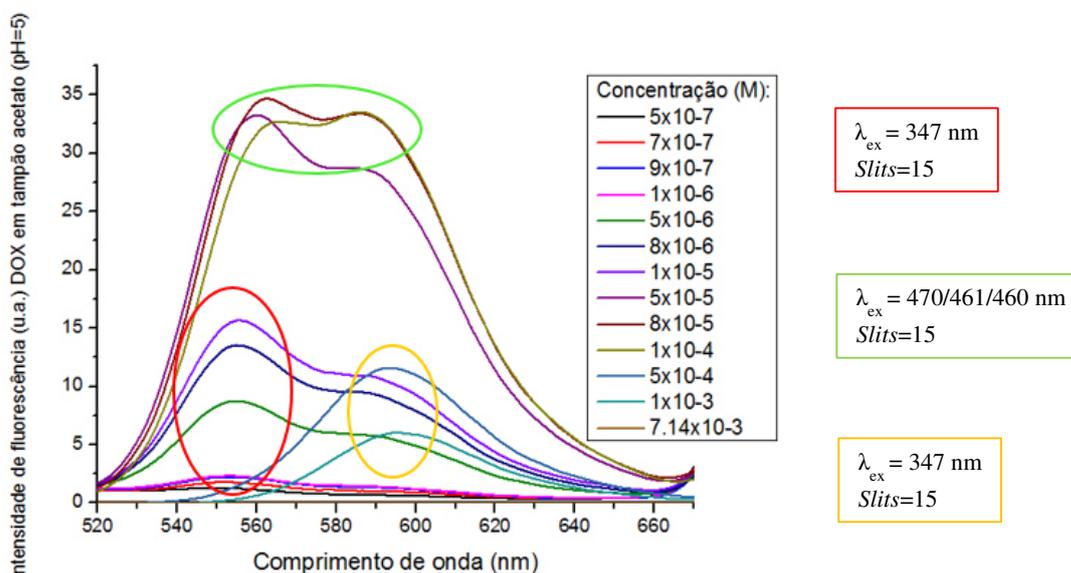


Figura 68 - Espectro de emissão de fluorescência de soluções padrão de doxorubicina solubilizadas em tampão acetato, com pH 5.

Analisando a Figura 68 verifica-se que a intensidade de fluorescência das soluções padrão com concentrações de 5×10^{-7} a 1×10^{-5} M aumenta em função da concentração e o espectro de emissão apresenta intensidade máxima a $\lambda_{\text{max}} = 555$ nm (assinalado na Figura 68 com um círculo vermelho) e uma outra banda menos intensa a $\lambda = 595$ nm. Com o aumento das concentrações de DOX, de 5×10^{-5} a 1×10^{-4} M, verifica-se um aumento muito marcado da intensidade de fluorescência, com um notório aumento da intensidade da segunda banda a $\lambda = 595$ nm (assinalado na Figura 68 com um círculo verde). Aumentando ainda mais as concentrações de DOX, de 5×10^{-4} a 1×10^{-3} M, a dupla banda de emissão de fluorescência desaparece e a intensidade de emissão de fluorescência diminui consideravelmente observando-se uma banda única de emissão a $\lambda = 595$ nm (assinalado na Figura 68 com um círculo amarelo). Este comportamento de desvio espectral da fluorescência máxima para o vermelho e de perda gradual da emissão de fluorescência é condizente com a formação de dímeros de DOX. Com efeito, a fluorescência da DOX é essencialmente devida à estrutura tetracíclica que contém um anel hidroquinona e quinona aromáticos e planares com elétrons π excitáveis capazes de emissão de fluorescência no regresso ao estado fundamental. No entanto, a partir de determinada concentração, verifica-se que a DOX se associa de uma forma dimérica estabelecendo interações do tipo π - π entre os anéis aromáticos de duas moléculas, decorrendo dessa associação mudanças espectrais e perda progressiva de emissão de fluorescência [79] [136].

Analisando os espectros de emissão de fluorescência da Figura 68 conseguimos perceber que a formação de dímeros de DOX tem início a partir da concentração 5×10^{-5} M, pois é a partir desta concentração que se começam a verificar mudanças espectrais. Para traçar a curva de calibração para a análise por fluorescência da DOX solubilizada em tampão acetato (pH 5) selecionou-se a gama de concentrações onde não se verificava a formação de dímeros e procedeu-se à análise da banda de intensidade máxima de fluorescência a $\lambda = 555$ nm (Figura 69).

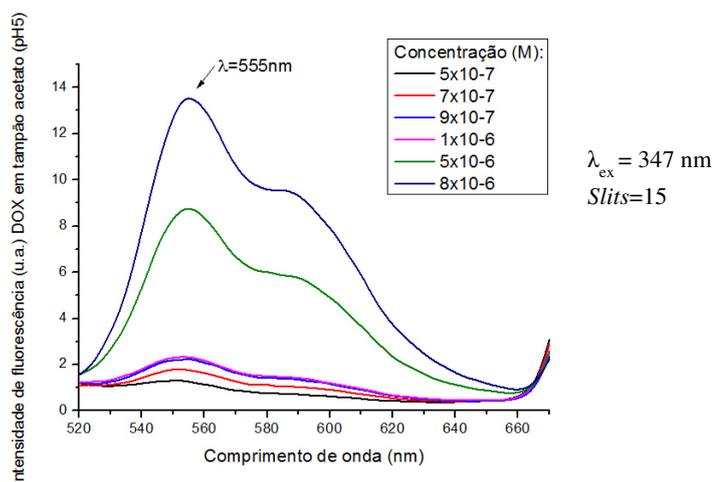


Figura 69 - Espectro de emissão de fluorescência de soluções padrão de doxorubicina solubilizadas em tampão acetato, a pH 5.

Representando os valores de fluorescência obtidos na banda onde a intensidade de emissão é máxima em função das concentrações de DOX (de 5×10^{-7} a 8×10^{-6} M), obtêm-se a curva de calibração apresentada na Figura 70.

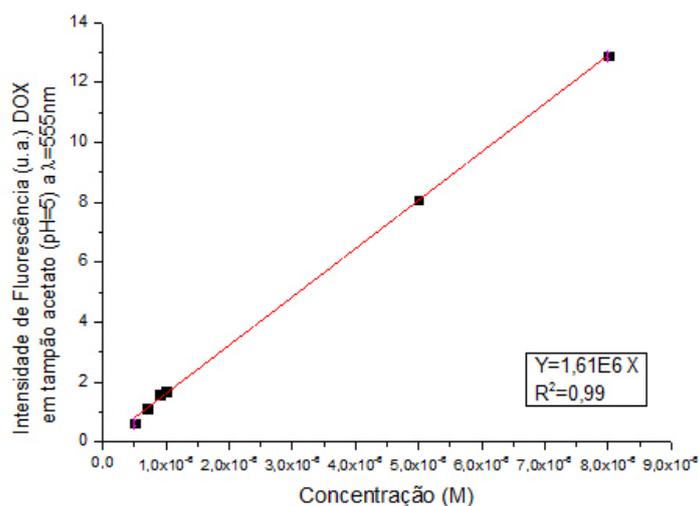


Figura 70 - Curva de calibração de fluorescência de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão acetato, com pH 5, ao comprimento de onda máximo de 555 nm.

3.2.3. Curva de calibração da doxorubicina solubilizada em tampão de pH 9

3.2.3.1. Por análise de espectrofotometria UV-Vis

Na Figura 71 podemos analisar os espectros de absorvância obtidos para soluções padrão de concentração rigorosa de DOX solubilizada em tampão HEPES, com pH 9.

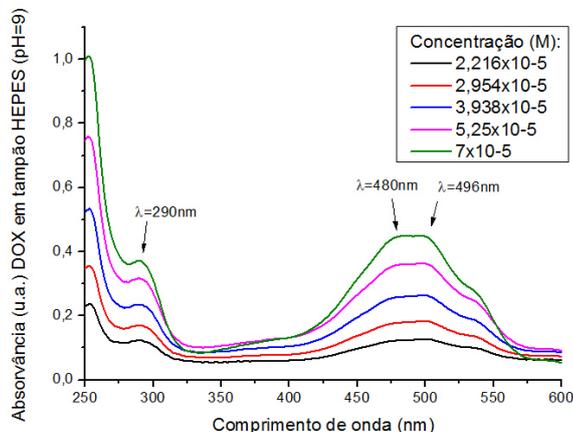


Figura 71 - Espectro de absorvância de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão HEPES, com pH=9.

Analisando o espectro de absorvância da Figura 71 observa-se que a absorvância da DOX solubilizada em tampão HEPES é máxima a λ 480 nm. Traçando uma relação entre as concentrações de cada padrão de DOX e os valores de absorvância obtidos nesse pico, obtém-se a curva de calibração apresentada na Figura 72. Uma vez que o padrão de concentração mais elevada apresenta já um desvio à linearidade da lei de Beer, a curva de calibração apresentada corresponde à gama de concentrações de DOX de $2,22 \times 10^{-5}$ a $5,25 \times 10^{-5}$ M.

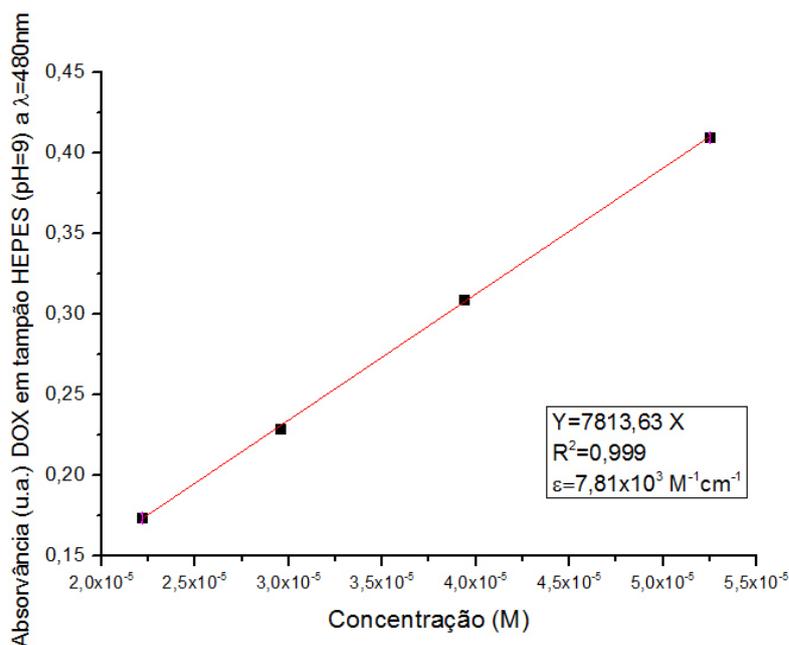


Figura 72 - Curva de calibração de absorvância de soluções padrão de doxorubicina solubilizada em tampão HEPES, com pH 9, ao comprimento de onda máximo de 480 nm.

Comparando os espectros de absorvância de três soluções com valores de concentração aproximada de DOX solubilizada a pHs 5; 7,4 e 9, verifica-se que a intensidade da absorvância aumenta (Figura 73) mas os espectros são semelhantes e não apresentam desvios nas bandas espectrais com a modificação do pH do meio. A DOX é uma molécula básica e em pH ácido a porção aminoglicosídica (hidrofílica) da DOX fica carregada positivamente ao nível do grupo amina, pois recebe iões H^+ do meio. Quando se aumenta o pH, o meio fica mais rico em iões HO^- e o grupo amina da porção aminoglicosídica é neutralizado. Apesar da porção aminoglicosídica da molécula ser afetada pelo pH do meio, a região cromófora da molécula (hidrofóbica) não sofre alterações, daí que não se evidenciem diferenças espectrais com a alteração do pH do meio.

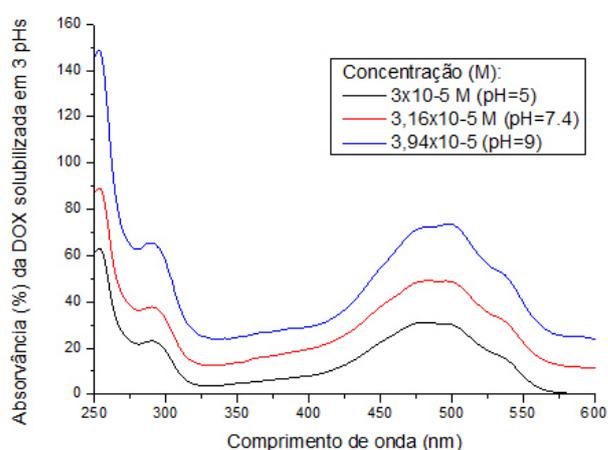


Figura 73 - Espectros de absorvância da doxorubicina solubilizada em tampões com pH 5; 7,4 e 9.

O mesmo se verifica comparando os espectros de fluorescência da DOX solubilizada em tampões com valores de pH diferentes (Figura 64 e 68), onde apenas a intensidade de fluorescência diminui com a diminuição do pH do meio, o que está previsto na literatura [79]. As curvas de calibração da DOX das alíneas 3.2.1 à 3.2.3 foram construídas com o intuito de poder determinar a concentração da DOX libertada dos lipossomas durante os testes de libertação controlada em valores de pH relevantes ao nível fisiológico: 5; 7,4 e 9. No entanto, esses ensaios não foram realizados no âmbito desta dissertação, mas serão incluídos nas perspectivas futuras de continuação do trabalho, uma vez que a sua realização está prevista para inclusão num artigo científico em preparação.

3.3. Efeitos biofísicos da doxorrubicina

3.3.1. Coeficiente de partição membrana/água da doxorrubicina

3.3.1.1. Avaliação da lipofilia da doxorrubicina e a sua distribuição no nanossistema veiculador

Na Figura 74 A apresenta-se um exemplo dos espectros de absorção UV-Vis de amostras de lipossomas de DODAB:MO (1:2) com concentrações crescentes de lípido (S1 a S11, significam concentrações de 50-3000 μM) e concentração fixa de DOX (300 μM). Os espectros de cor cinza na mesma Figura representam a absorção correspondente às referências ou brancos, ou seja, aos lipossomas de DODAB:MO (1:2) com concentrações crescentes de lípido, mas sem DOX. Como se pode verificar, apesar de nas referências, o fármaco não estar presente, ainda assim há uma variação espectral dos espectros, mais notória na zona dos 250-300 nm. Esta variação espectral deve-se à dispersão de luz provocada pelos lipossomas e constitui uma interferência importante na quantificação da DOX através da análise dos espectros.

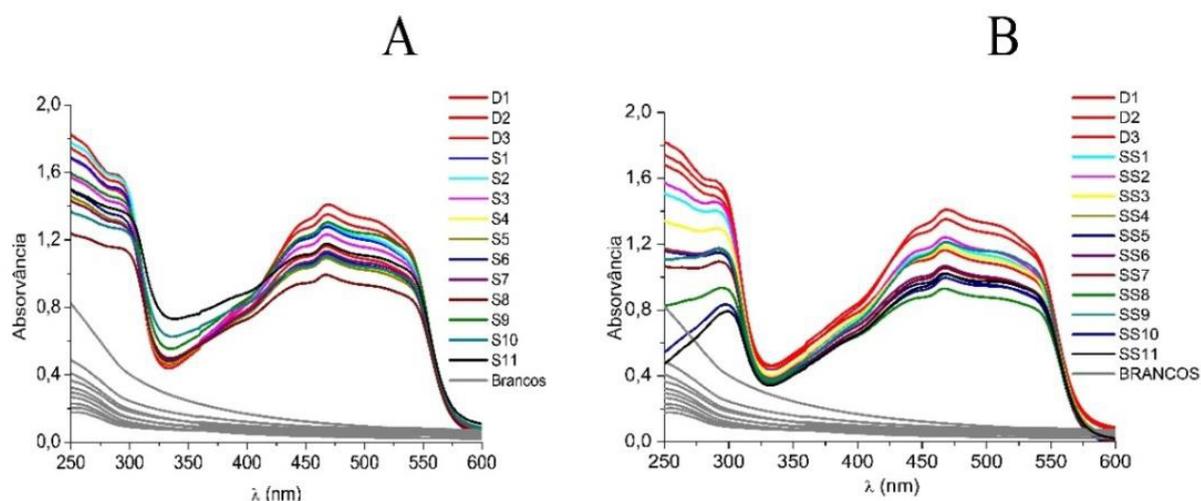


Figura 74 - Espectros de absorvância de 3 réplicas de doxorrubicina (300 μM) representadas por D1, D2 e D3 e de amostras a uma concentração crescente de DODAB:MO e concentração fixa de doxorrubicina (300 μM) (S1-S11). As referências ou brancos correspondentes, preparadas de um modo semelhante às amostras, mas sem o fármaco, são também apresentadas (cor cinza). A) Apresenta o espectro com amostras e brancos. B) Representa os espectros obtidos depois da subtração dos brancos correspondentes (cor cinza).

Para anular esta interferência, derivaram-se os espectros da Figura 74 A, como se pode observar na Figura 75 A e B. Após o traçado da 1^a derivada dos espectros da Figura 74 A é logo notória uma diminuição da interferência espectral (Figura 75 A). De facto, se observarmos os traçados cinza correspondentes à derivada dos espectros das referências concluímos que constituem uma linha que passa praticamente pelo zero. Contudo, verifica-se ainda alguma interferência de dispersão de luz não completamente anulada sobretudo nas concentrações mais elevadas de DODAB:MO e nos comprimentos de onda de 200-300 nm. Analisando a 2^a derivada (Figura 75 B), verifica-se que este problema é praticamente anulado na totalidade.

Na 2ª e 3ª derivadas dos espectros, selecionam-se os picos (máximos ou mínimos das derivadas) onde se verifica uma grande variação espectral nas amostras, mas onde as respectivas referências apresentam uma interferência nula. Finalmente, o valor de K_p LUVs/água da DOX é determinado a partir de uma regressão não linear (D vs $[L]$) obtida por ajuste da Equação 2.8 aos dados experimentais: Valor da derivada ao λ escolhido obtido para concentrações crescentes de LUVs de DODAB:MO (1:2) ($[L]$).

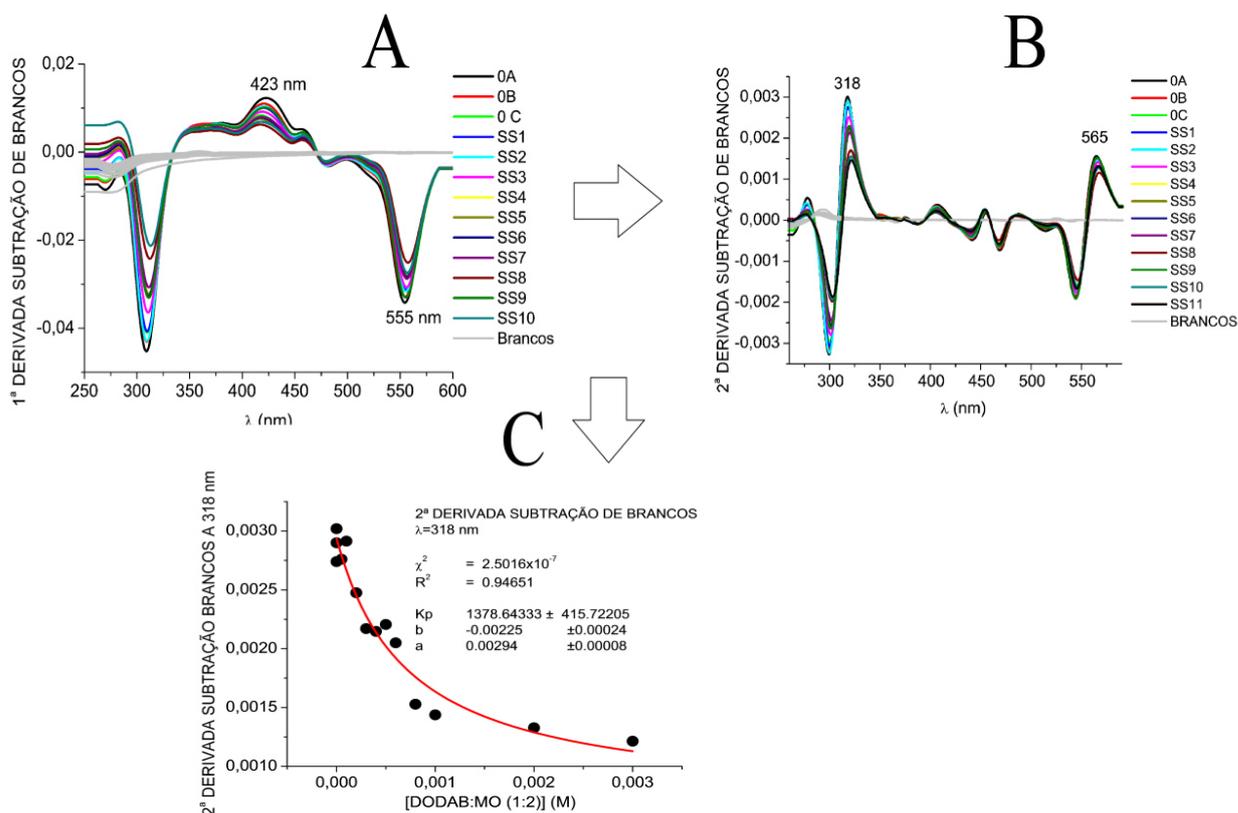


Figura 75 - Representação de algumas etapas necessárias à determinação do coeficiente de partição da Doxorubicina (300 μ M) num sistema bifásico lipossomas DODAB:MO (1:2)/água calculado através da folha de cálculo com base em EXCEL *Kp Calculator* [23].

(A,B) Representam a 1ª e 2ª Derivada dos espectros após a subtração dos brancos e a seleção de comprimentos de onda escolhidos para determinar o coeficiente de partição (C) Representação dos valores da 2ª derivada a $\lambda = 318$ nm para as amostras de doxorubicina a diferentes concentrações de DODAB:MO (1:2) e ajuste não linear usando a Equação 2.8.

Para provar que o método derivativo é o suficiente para anular a dispersão da luz pelos lipossomas, procedeu-se à análise derivativa dos espectros sem a subtração dos brancos, que apresentou resultados bastante similares à análise derivativa efetuada nos espectros após a subtração dos brancos, como se pode observar pela comparação da Figura 75, com a Figura 76 e pela análise da Figura 77.

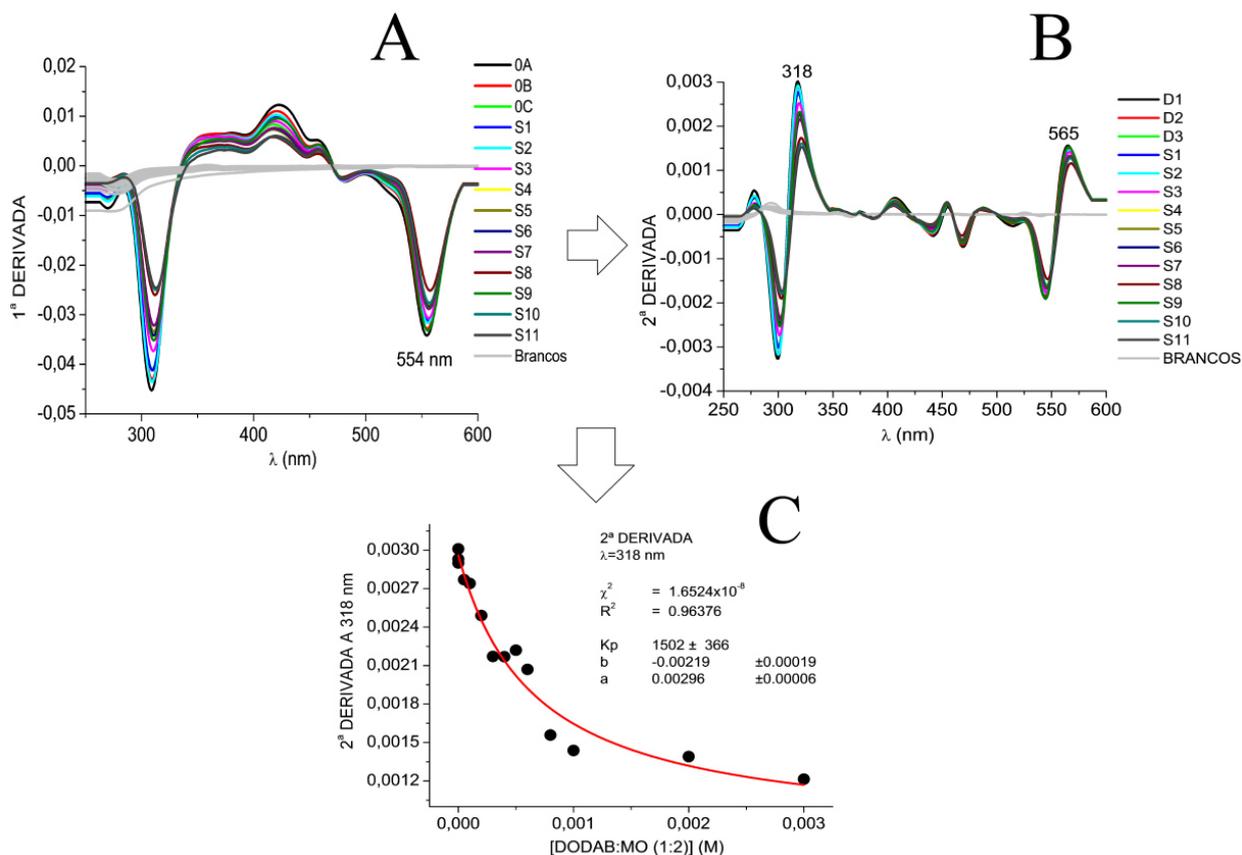


Figura 76 - Representação de algumas etapas necessárias à determinação do coeficiente de partição da doxorubicina (300 μM) num sistema bifásico lipossomas DODAB:MO (1:2)/água calculado através da folha de cálculo com base em EXCEL *Kp Calculator* [23].

(A,B) Representam a 1ª e 2ª Derivada dos espectros sem a subtração dos brancos e a seleção de comprimentos de onda escolhidos para determinar o coeficiente de partição (C) Representação dos valores da 2ª derivada a $\lambda = 318 \text{ nm}$ para as amostras de doxorubicina a diferentes concentrações de DODAB:MO (1:2) e ajuste não linear usando a Equação 2.8.

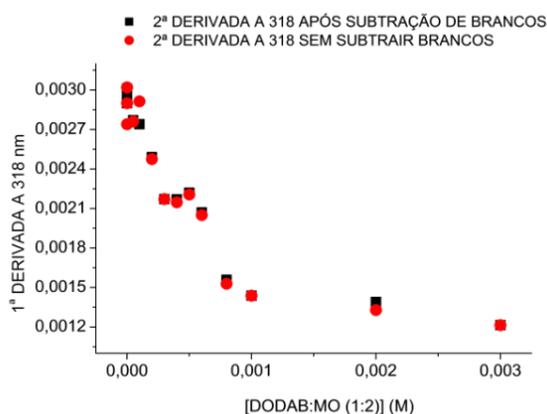


Figura 77 - Representação gráfica da 2ª Derivada a 318 nm. A preto estão representados os valores dos máximos da 1ª derivada dos espectros obtidos após a subtração de brancos e a vermelho os valores dos máximos da 1ª derivada obtidos diretamente dos espectros sem a subtração de brancos.

Desta forma, como não há diferenças significativas quer se faça ou não a subtração das referências (Figura 77), nas restantes análises desta investigação, o cálculo do K_p será sempre efetuado sem proceder à subtração das referências, procedendo apenas à derivação direta dos espectros e ao cálculo do K_p nos pontos das derivadas onde a dispersão das referências é anulada.

A análise dos espectros de absorvância da DOX a 150 μM foi efetuada da mesma forma como demonstra a Figura 78.

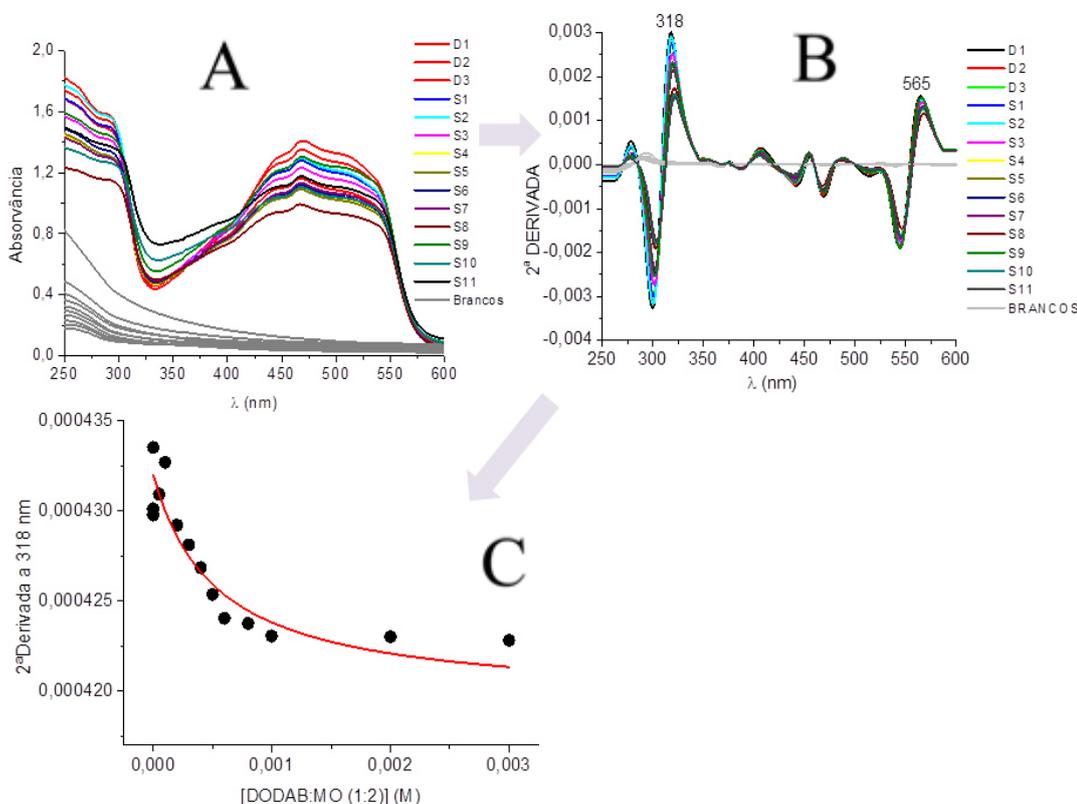


Figura 78 - Representação de algumas etapas necessárias à determinação do coeficiente de partição da doxorubicina (150 μM) em sistemas bifásicos lipossomas DODAB:MO (1:2)/água calculado através da folha de cálculo com base em EXCEL *K_p Calculator* [23].

(A,B) Representam a 1ª e 2ª Derivada dos espectros sem a subtração dos brancos e a seleção de comprimentos de onda escolhidos para determinar o coeficiente de partição (C) Representação dos valores da 2ª derivada a $\lambda = 318$ nm para as amostras de doxorubicina a diferentes concentrações de DODAB:MO (1:2) e ajuste não linear usando a Equação 2.8.

Depois de calcular os coeficientes de partição (K_p) da DOX a 150 μM e 300 μM em sistemas bifásicos LUVs de DODAB:MO (1:2)/água elaborou-se a Tabela 5 de modo a tornar mais fácil a comparação dos resultados do K_p determinados experimentalmente com o logP (coeficiente de partição num sistema octanol: água) teórico da DOX calculado com um *software* MarvinSketch 6.2.2[®] e o logP da DOX determinado experimentalmente num sistema octanol: água num trabalho descrito na literatura [1].

Tabela 5 – Valores de coeficientes de partição (K_p) da doxorubicina ($C_1=150 \mu\text{M}$ e $C_2=300 \mu\text{M}$) em sistemas bifásicos de LUVs de ((DODAB:MO)(1:2))/H₂O e respectivos logaritmos (Log (K_p)) e valores de partição da doxorubicina em sistemas octanol/água (LogP).

Kp (LUVs/H ₂ O) (molL ⁻¹)		Kp (LUVs/H ₂ O) (adimensional) ^a		LogKp		LogP ^b	LogP ^c
C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂		
1614±367	1401±143	2604±592	2260±230	3,41±0,100	3,35±0,0444	1,50	1,36

^aOs valores de K_p calculados apresentam-se em unidades de molL⁻¹. Para poder comparar com os valores adimensionais da literatura é necessário dividir o valor calculado pelo volume molar do lípido em questão (0,62 Lmol⁻¹).

^bValores de LogP da doxorubicina determinados por cálculo teórico num sistema binário octanol/água usando o *software* MarvinSketch 6.2.2[©]

^cValores de LogP da doxorubicina num sistema binário octanol/água reportados na literatura [1].

Ao analisar os valores dos coeficientes de partição (K_p) de duas concentrações de DOX (150 μM e 300 μM) num sistema bifásico de LUVs de DODAB:MO (1:2)/água, concluímos que os valores de K_p obtidos para a concentração de 150 μM são superiores aos obtidos para uma concentração de 300 μM . Este resultado não é surpreendente uma vez que estes coeficientes de partição foram determinados em água ultrapura (que apresenta pH ligeiramente ácido), e a esse pH a DOX é um fármaco carregado positivamente. Desta forma, sendo os lipossomas de DODAB:MO (1:2) vesículas carregadas positivamente devido ao DODAB que as reveste externamente ser um lípido catiónico, é compreensível que o aumento da concentração de fármaco carregado positivamente provoque alguma repulsão eletrostática face à superfície catiónica das vesículas.

Existe uma diferença significativa entre os valores do coeficiente de partição lipossoma/água e os valores do coeficiente de partição octanol/água, estes últimos retirados da literatura e através do cálculo teórico. Esta diferença prende-se com o facto de o logP ser calculado ao pH ao qual o fármaco está na forma neutra, e o logKp ser calculado na água ultrapura, onde as espécies de fármaco existem maioritariamente na sua forma carregada positivamente. Para além disso, o fármaco em estudo não é inteiramente lipófilo, o que impede o estabelecimento de uma correlação com o modelo octanol/água. Para fármacos apolares, o modelo octanol/água mimetiza razoavelmente a partição membrana/água, já para substâncias com grupos polares o mesmo não se verifica [126]. No nosso estudo não temos como intuito fazer uma comparação direta dos valores de partição membrana/água obtidos para a DOX *in vitro* com os valores da partição da DOX nos sistemas membranares do organismo, porque a determinação do K_p em lipossomas/água efetuada neste trabalho não foi feita em lipossomas que mimetizem a membrana biológica. Pretendemos sim, averiguar a partilha da DOX na formulação lipossomal DODAB:MO (1:2). Contudo o valor do logKp determinado (previsão da distribuição da DOX na formulação do nanossistema) é significativamente maior que o valor do logP da literatura

(correspondente à distribuição da DOX no organismo) sugerindo que o nanossistema DODAB:MO (1:2) aumenta grandemente a distribuição de DOX e é portanto adequado para o encapsulamento da DOX.

3.3.1.2. Previsão do comportamento do fármaco a valores de pH biologicamente relevantes

A DOX tem um **pKa = 8,15** [9]. Isto significa que a $\text{pH} < \text{pKa}$ a molécula estará carregada positivamente devido ao grupo amina que é protonado (Figura 79).

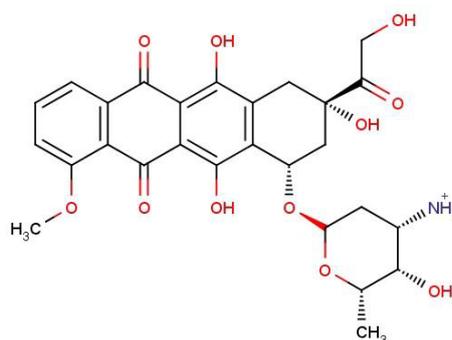


Figura 79 - Molécula de doxorubicina carregada positivamente. Elaborada com *software* MarvinSketch 6.2.2 ©.

A $\text{pH} > \text{pKa}$ a molécula estará carregada negativamente devido ao grupo enol que é desprotonado (Figura 80).

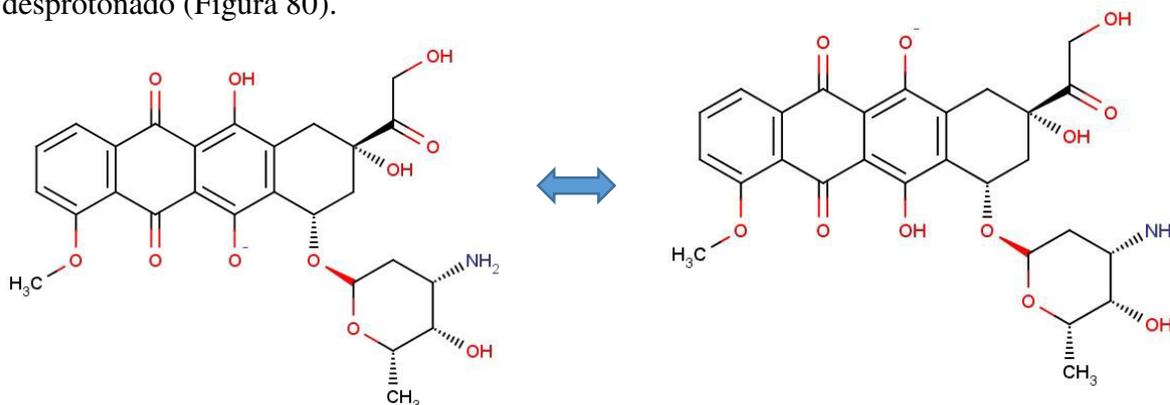


Figura 80 -Molécula de doxorubicina carregada negativamente. Elaborada com *software* MarvinSketch 6.2.2 ©.

Logo, a $\text{pH} 5$ e $\text{pH} 7,4$ a espécie maioritária da DOX é a espécie carregada positivamente verificando-se no entanto algumas diferenças:

- a $\text{pH} 5$ cerca de 99% das espécies estão carregadas positivamente
- a $\text{pH} 7,4$, 80% das espécies estão carregadas positivamente e 20% das espécies estão carregadas negativamente.

A determinação do logP de um fármaco num sistema binário octanol/água, descrito na literatura, é feita para a espécie não carregada desse fármaco (neutra), pelo que os valores de

logP são realizados a pH distintos conforme o pKa das espécies a determinar. Um parâmetro mais interessante na avaliação da partição é a determinação do logD dos fármacos, ou seja, o estudo da partição do fármaco a um dado pH.

Os logK_p da DOX determinados num sistema LUVs((DODAB:MO)(1:2))/tampão pH 5 e LUVs((DODAB:MO)(1:2))/tampão pH 7,4, são apresentados na tabela seguinte (Tabela 6) e comparados com os logD da DOX num sistema octanol/água.

Tabela 6 – Valores de coeficientes de partição (K_p) da doxorubicina (C=150 μ M) em sistemas LUV((DODAB:MO)(1:2))/Tampão (pH 5 e pH 7,4) e respetivos logaritmos ($\log(K_p)$) e valores de partição da doxorubicina em sistemas octanol/água a pH 5 e 7,4 (LogD).

K _p (LUVs/Tampão) (molL ⁻¹)		K _p (LUVs/H ₂ O) (adimensional) ^a		LogK _p		LogD ^b		LogD ^c
pH 5	pH 7,4	pH 5	pH 7,4	pH 5	pH 7,4	pH 5	pH 7,4	pH<7
1747±467	601±64	2818±753	970±102	3,45±0,119	2,99±0,0460	-1,45	0,10	0,74

^aOs valores de K_p calculados apresentam-se em unidades de molL⁻¹. Para poder comparar com os valores adimensionais da literatura é necessário dividir o valor calculado pelo volume molar do lípido em questão (0,62 Lmol⁻¹).

^bValores de LogD da doxorubicina determinados por cálculo teórico num sistema binário octanol/água usando o *software* MarvinSketch 6.2.2[©]

^cValores de LogD da doxorubicina num sistema binário octanol/água a pH ácido reportados na literatura [1].

Em ambos os valores de pH a molécula de DOX está carregada positivamente dado que o pH é menor que o pKa. No entanto, enquanto a pH 5 praticamente toda a DOX se encontra carregada positivamente, a pH 7,4 existem já algumas espécies carregadas negativamente. Tal levou-nos a esperar obter como resultados um coeficiente de partição maior a pH 7,4 do que a um pH 5. A análise dos valores de logD da DOX, determinados por cálculo teórico, vieram corroborar a nossa ideia ($K_p >$ a pH 7,4; $K_p <$ a pH 5). Contudo, as análises não foram de encontro ao esperado e verificou-se um maior coeficiente de partição a um pH 5. Desta forma, para confirmar e validar esta nova informação, fizeram-se réplicas destas análises e obtiveram-se resultados similares. O facto dos valores, a pH ácido, de logD da DOX num sistema binário octanol/água, reportados na literatura, apresentarem um valor bastante mais elevado comparado com os valores do logD da DOX quando determinados por cálculo teórico e os resultados que obtivemos leva-nos a crer que a carga positiva da DOX não prejudica tanto a lipofilia global da molécula como seria de supor. De facto, teoricamente um ião ou qualquer outra substância carregada é bastante hidrófila, no entanto se por ser carregada a pH fisiológico a DOX fosse hidrófila, esta não seria capaz de atravessar membranas e chegar ao núcleo onde se intercala no

ADN. Para além disto, a análise da Figura 81, certifica similarmente os nossos resultados uma vez que demonstra que grande parte da estrutura da DOX é lipófila.

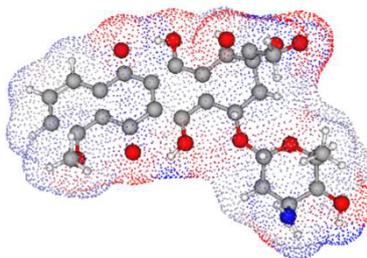


Figura 81 - Estrutura da doxorubicina. Às áreas azuis e vermelhas correspondem a zonas polares e as áreas cinza a zonas apolares.

3.3.1.3. Previsão da localização da doxorubicina no nanossistema veiculador do fármaco

Através dos estudos de partição por espectroscopia derivativa é também possível prever a localização do fármaco no nanossistema por observação dos espectros das derivadas de amostras. Se existirem desvios batocrómicos (desvios do $\lambda_{\text{máx}}$ para valores maiores de comprimento de onda) há a indicação da presença do fármaco num microambiente mais apolar, mas se existirem desvios hipsocrómicos (desvios do $\lambda_{\text{máx}}$ para valores menores de comprimento de onda) então há indicação da presença do fármaco num microambiente mais polar [137].

Por observação da Figura 82, podemos verificar que o máximo da derivada do espectro apresenta desvios para valores maiores de comprimento de onda havendo a indicação da presença do fármaco num microambiente mais apolar. Como o ambiente mais apolar nos nanossistemas usados neste tipo de estudo é a zona interna da bicamada lipídica e as estruturas formadas pela agregação da MO, podemos prever que é nesses locais que se encontra a DOX.

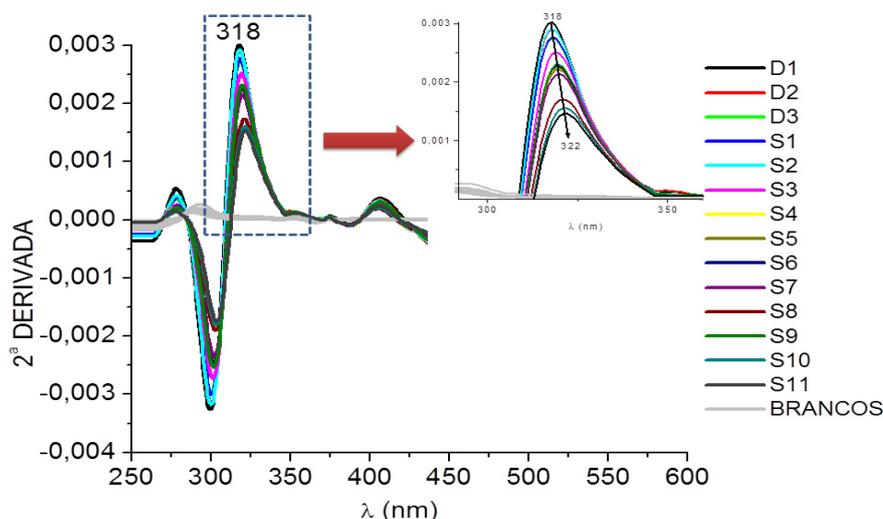


Figura 82 - 2ª Derivada dos espectros de absorvância de doxorubicina (300 μM) (D1, D2 e D3) e de concentrações crescentes de DODAB:MO e concentração fixa de doxorubicina (300 μM) (S1-S11). As referências correspondentes, preparadas de um modo semelhante às amostras, mas sem o fármaco, são também apresentadas (Brancos a cinzento). É evidenciado o máximo da derivada do espectro que apresenta desvios para valores maiores de comprimento de onda.

3.3.2. Cálculo dos parâmetros termodinâmicos da partição da doxorubicina

Para calcular os parâmetros termodinâmicos associados à partição da DOX num sistema bifásico LUVs (DODAB:MO (1:2))/água, efetuou-se a determinação do K_p da DOX (concentração 300 μM) da mesma forma anteriormente descrita, mas a várias temperaturas: 30, 37, 50, 53, 55 e 60 $^{\circ}\text{C}$. A Figura 83 ilustra um exemplo dos ajustes dos valores da 3ª derivada a 556 nm obtidos às diversas temperaturas.

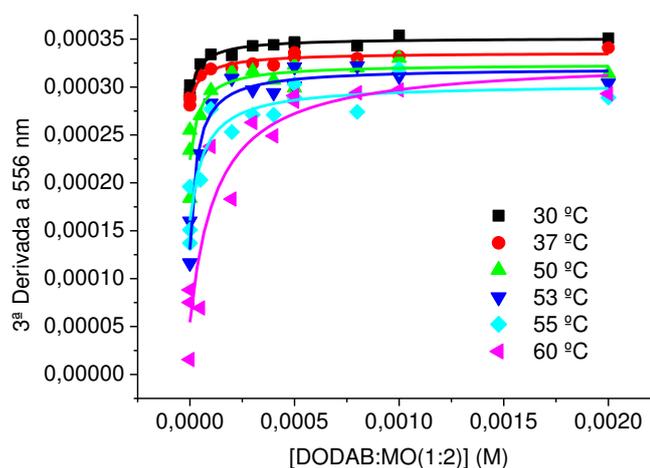


Figura 83 - Ajustes dos valores da 3ª derivada, a 556 nm, calculada por espectroscopia derivativa a diferentes temperaturas (30, 37, 50, 53, 55 e 60 $^{\circ}\text{C}$).

A análise Van't Hoff da dependência da partição da DOX no sistema LUVs/água permitiu calcular a entalpia (ΔH) (o calor da reação) e entropia (ΔS) (ausência de restrições aos movimentos das moléculas), e consequentemente, a energia livre de Gibbs (ΔG).

ΔH e ΔS envolvidas na partição foram determinadas pelo declive e ordenada na origem da regressão de Van't Hoff descrita pela seguinte equação:

$$\ln(K_p) = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3.1)$$

R = constante dos gases perfeitos ($8,314\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$)

T = temperatura (Kelvin)

ΔH = entalpia

ΔS = entropia

Uma vez que o empacotamento e o arranjo molecular é profundamente modificado na transição da fase gel para a fluída é possível observar um comportamento bifásico na representação de Van't Hoff que apresenta um perfil distinto nas duas fases lipídicas (Figura 84).

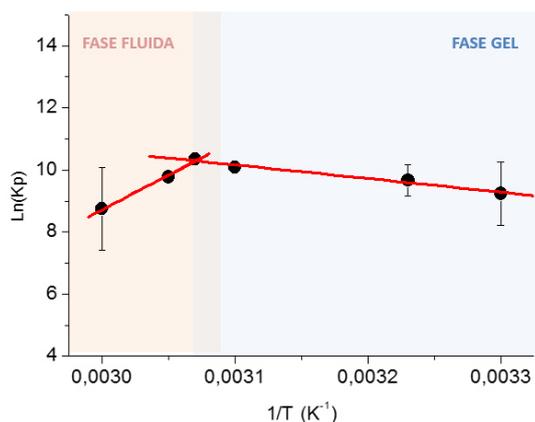


Figura 84 - Regressão de Van't Hoff para a partição da doxorubicina em LUVs de DODAB:MO (1:2).

Na fase gel, a entalpia positiva ($\Delta H=36,5 \text{ KJmol}^{-1}$ e $\Delta S=0,20 \text{ KJmol}^{-1}$) indica que a partição na fase mais ordenada é um processo endotérmico sendo necessário fornecer energia para separar as moléculas lipídicas e criar espaço na membrana das vesículas para a penetração do fármaco. Na fase fluída a entalpia negativa ($\Delta H=-183 \text{ KJmol}^{-1}$ e $\Delta S=-0,48 \text{ KJmol}^{-1}$) indica que o processo de partição é exotérmico. De facto, depois das moléculas de fármaco terem migrado da fase aquosa para a fase membranar, os espaços originais ocupados pelo fármaco na fase aquosa vão ser ocupados por moléculas de água. Este evento produz libertação de energia devido às interações água-água [138]. Valores negativos de entalpia também indicam a presença significativa de pontes de hidrogénio [139].

A energia livre de Gibbs (ΔG) é calculada a partir da ΔH e ΔS através da seguinte equação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3.2)$$

ΔG = energia livre de Gibbs

ΔH = entalpia

T = temperatura (Kelvin)

ΔS = entropia

Na Figura 85 está representada a variação da energia livre de Gibbs de acordo com a temperatura:

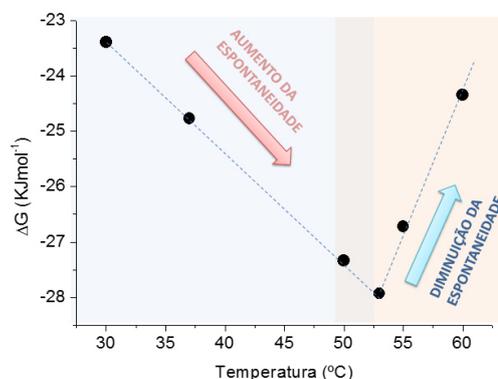


Figura 85 - Variação da energia livre de Gibbs (ΔG) da partição da doxorubicina ($300 \mu\text{M}$) no sistema binário vesículas de DODAB:MO (1:2) e água, de acordo com a temperatura.

Os valores negativos obtidos para a energia livre de Gibbs apresentados na Figura 85 indicam que o processo de interação da DOX com as vesículas de DODAB:MO (1:2) é espontâneo. Com o aumento da temperatura, ΔG torna-se mais negativo indicando que a partição é mais espontânea à medida que a membrana fica mais fluída e desorganizada, pois assim permite melhor a penetração do fármaco. No entanto, na fase fluída o aumento de temperatura diminui a espontaneidade da partição, provavelmente porque uma desordem exacerbada acaba por promover o rearranjo da monoleína e expulsão do fármaco encapsulado nas vesículas.

3.3.3. Efeito da doxorubicina na microviscosidade e cooperatividade membranares

A influência dos fármacos nas propriedades biofísicas membranares é importante tanto para avaliar como se fará a distribuição do fármaco pelas biomembranas do organismo, como para avaliar a distribuição dos fármacos em nanotransportadores membranares, como os lipossomas. Assim, por um lado testou-se a influência da DOX nas propriedades biofísicas de lipossomas de DMPC usados como modelos biomiméticos simples de membranas e, por outro lado, procedeu-se à avaliação da influência da DOX no sistema veiculador desenvolvido DODAB:MO (1:2).

Em qualquer dos casos, a influência da DOX nas propriedades biofísicas da membrana foi determinada através da avaliação do efeito deste fármaco na transição de fase lipídica e na cooperatividade da transição, para desse modo inferir sobre os efeitos da DOX na microviscosidade e ordem lipídicas. Para isso recorreu-se à técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS) procedendo-se à contagem do número de vesículas (kcps) e à avaliação do seu tamanho em função da temperatura (°C).

Representando graficamente a variação da taxa de contagem das vesículas em função da temperatura obtêm-se perfis sigmoides cujos ajustes não lineares são feitos através da equação 2.10. Com base na análise da Figura 86 é possível inferir, através das curvas sigmoides correspondentes à interação do fármaco DOX com LUVs de DMPC, que a DOX apresenta uma interação significativa com a bicamada lipídica das vesículas de DMPC.

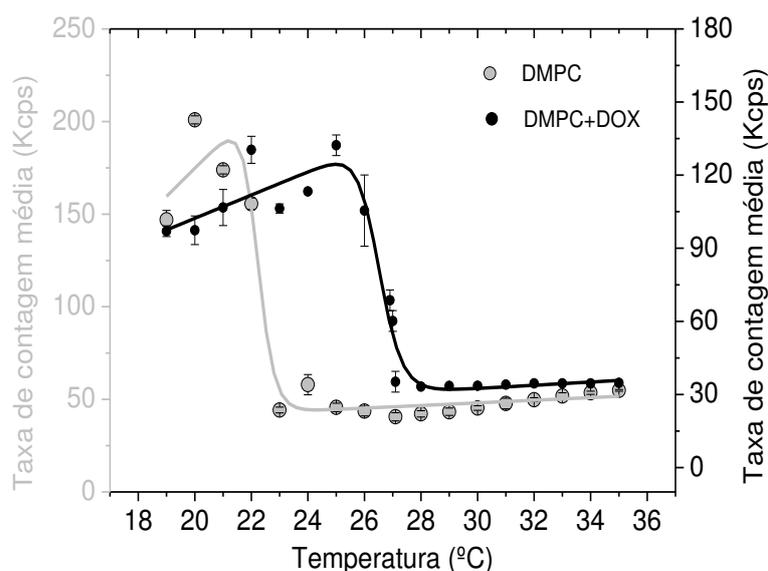


Figura 86 - Taxa média de contagem, de LUVs de DMPC na ausência de doxorubicina (círculos claros) e de LUVs de DMPC na presença de doxorubicina (círculos escuros), medida em função da temperatura. Cada ponto corresponde a um valor médio de três medições com o respetivo desvio padrão e as linhas são o melhor ajuste não linear obtido de acordo com a Equação 2.10, refinando os parâmetros T_m e cooperatividade (B).

A partir de cada um dos perfis sigmóides obtidos, foram calculados e representados na Tabela 7, os parâmetros biofísicos que caracterizam o estado da membrana: T_m e B .

Tabela 7- Parâmetros biofísicos T_m e B calculados para LUVs de DMPC, na ausência e na presença de doxorubicina.

Lípido (sem e com fármaco)	B (cooperatividade)	T_m (°C)
DMPC	188 ± 86	$21,7 \pm 2,12$
DMPC+DOX	918 ± 281	$26,8 \pm 0,08$

De acordo com o que acima foi referido, e ao analisarmos os resultados obtidos na Tabela 7 para os LUVs de DMPC é possível verificar que a DOX provoca um aumento da T_m em cerca de 5 °C e aumenta a cooperatividade da transição de fase membranar. Este efeito de ordenação membranar é provavelmente devido à geometria planar da molécula de DOX. De facto, a presença de grupos planares e hidrofóbicos permite a intercalação da DOX ao nível das bases do ADN. De igual modo, a presença destes grupos confere lipofilia à molécula de DOX e provavelmente facilitará a interação com os lípidos das membranas, promovendo o empacotamento lipídico que é observável através do aumento da T_m . Um incremento na ordenação lipídica provocada pela DOX justifica igualmente o aumento da cooperatividade e permite-nos também concluir que a DOX encontra-se localizada junto às caudas apolares da

bicamada lipídica [128, 131], mas a um nível mais superficial, C1-C7, que é uma zona mais perturbável do que as zonas mais profundas das cadeias acil e portanto, mais sujeita a ser afetada por uma molécula como a DOX que se interpõe entre as moléculas lipídicas estabelecendo ligações hidrófobas entre os seus grupos planares apolares e as caudas apolares lipídicas, o que se reflete no aumento do empacotamento lipídico e consequente aumento da microviscosidade lipídica. Um aumento da cooperatividade é também indicativo de uma distribuição homogênea da DOX pela fase lipídica. Sendo assim, podemos concluir que a DOX aumenta a microviscosidade e promove o empacotamento lipídico das membranas celulares. Esta bioacumulação da DOX na membrana enfatiza a necessidade de se encapsular a DOX em nanovetores.

Para avaliar o efeito da DOX nas propriedades biofísicas dos lipossomas desenvolvidos como seu nanossistema veiculador procedeu-se a uma análise de DLS semelhante à acima descrita.

Na Figura 87 está representada graficamente a variação da taxa de contagem das vesículas em função da temperatura tendo-se obtido perfis sigmóides cujos ajustes não lineares foram feitos através da 2.10. Com base na análise da Figura 87 é possível inferir, através das curvas sigmóides correspondentes à interação do fármaco DOX com os LUVs de DODAB:MO (1:2), que a DOX não afeta tão significativamente as propriedades biofísicas da bicamada lipídica das vesículas de DODAB:MO (1:2) como afetava a bicamada lipídica de DMPC.

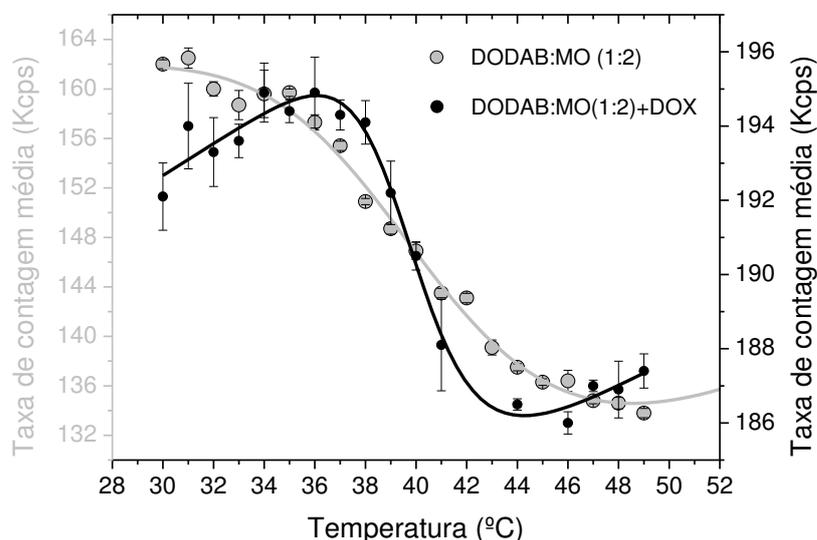


Figura 87 - Taxa média de contagem, de LUVs de DMPC na ausência de doxorubicina (círculos claros) e de LUVs de DMPC na presença de doxorubicina (círculos escuros), medida em função da temperatura. Cada ponto corresponde a um valor médio de três medições com o respetivo desvio padrão e as linhas são o melhor ajuste não linear obtido de acordo com a Equação 2.10, refinando os parâmetros T_m e cooperatividade (B).

Tal pode ser confirmado por observação de como a DOX alterou os parâmetros biofísicos que caracterizam o estado da membrana: T_m e B calculados e representados na Tabela 8, a partir de cada um dos perfis sigmoides obtidos.

Tabela 8- Parâmetros biofísicos T_m e B calculados para LUVs de DODAB:MO (1:2), na ausência e na presença de doxorubicina.

Lípido (sem e com fármaco)	B (cooperatividade)	T_m (°C)
DODAB:MO (1:2)	217 ± 58	41,7 ± 1,01
DODAB:MO (1:2)+DOX	532 ± 98	39,9 ± 0,34

De acordo com o que acima foi referido, e ao analisarmos os resultados obtidos na Tabela 8 para os LUVs de DODAB:MO (1:2) é possível verificar que a DOX não provoca alterações significativas na T_m e aumenta a cooperatividade da transição de fase membranar o que mostra, mais uma vez, a distribuição homogênea deste fármaco na fase lipídica. O facto de não haver uma perturbação significativa da T_m lipídica revela que a DOX se localiza muito mais profundamente ao nível das cadeias acil (>C₇) da bicamada lipídica ou no interior lipossomal rico em MO. Esta zona como é muito fluída, não é tão afetada pela dissolução de fármacos que nela se localizam sem alterar a T_m .

No entanto, apesar dos efeitos pouco notórios da DOX ao nível da T_m de DODAB:MO (1:2), pode-se constatar por observação da Figura 87, que a DOX diminui a microviscosidade do sistema na fase gel membranar (diminui a taxa de contagem das vesículas às temperaturas abaixo da T_m) e diminui a microviscosidade do sistema na fase fluída (diminui a taxa de contagem das vesículas às temperaturas acima da T_m).

3.4. Eficiência de encapsulação da doxorubicina nas formulações lipossomais desenvolvidas

Para determinar a quantidade de DOX encapsulada na formulação lipossomal construiu-se uma curva de calibração da DOX solubilizada em água ultrapura, por medições de espectrofotometria UV-Vis (absorvância).

3.4.1. Quantificação de doxorrubicina encapsulada por medições de espectrofotometria UV-Vis

Na Figura 88 podemos analisar o espectro de absorvância de soluções padrão de DOX de concentração rigorosa solubilizada em água ultrapura.

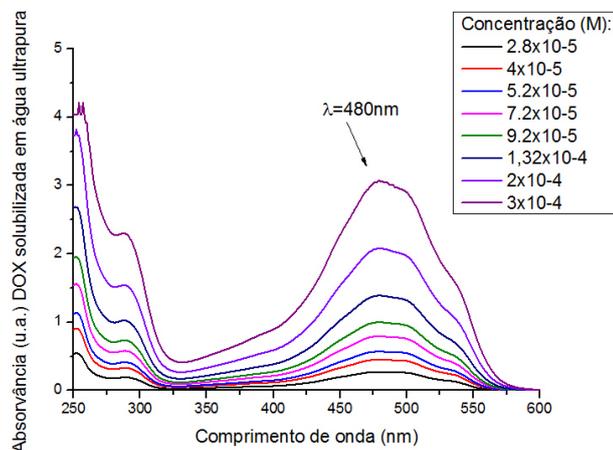


Figura 88 - Espectro de absorvância de soluções padrão de doxorrubicina solubilizada em água ultrapura.

Analisando o espectro de absorvância da Figura 88 observa-se que a banda de absorção máxima da DOX solubilizada em água ultrapura é a 480 nm. Traça-se então a correspondência dos valores de absorvância obtidos nesse pico, por cada solução padrão, obtendo-se a curva de calibração apresentada na Figura 89.

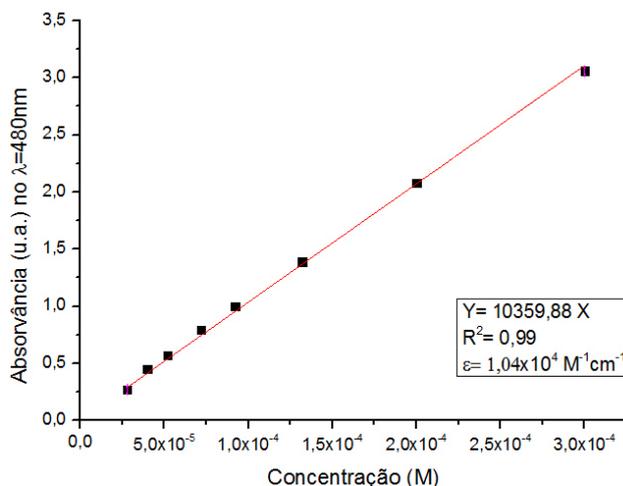


Figura 89 – Curva de calibração de absorvância de soluções padrão de doxorrubicina solubilizada em água ultrapura, ao comprimento de onda máximo de 480 nm.

É necessário ter um método de doseamento da DOX em água ultrapura, para que com a curva de calibração obtida se possa dosear a quantidade de DOX que nos ensaios de encapsulação não fica retida nos LUVs de DODAB:MO (1:2) e portanto fica no filtrado aquoso após centrifugação com os amicons.

Calculou-se também a primeira derivada do espectro de absorvância da DOX solubilizada em água ultrapura (Figura 90).

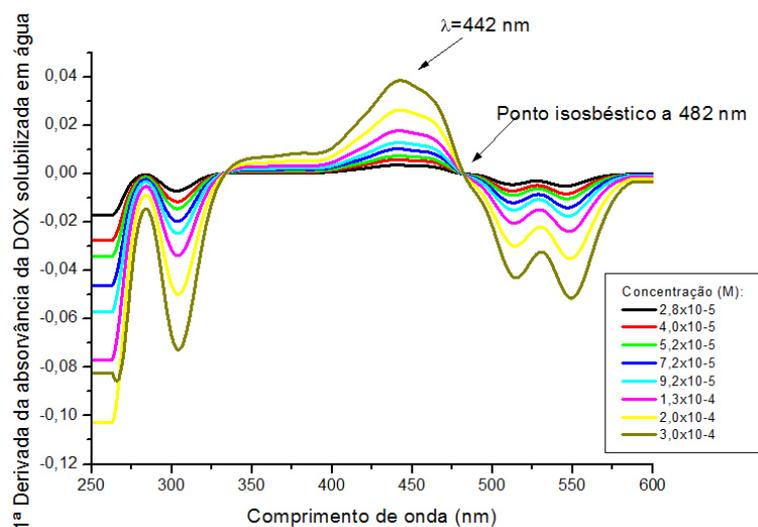


Figura 90 - 1ª Derivada do espectro de absorvâncias de soluções padrão de doxorrubina solubilizada em água ultrapura.

Analisando a primeira derivada do espectro de absorvâncias de oito soluções padrão de DOX solubilizada em água ultrapura (Figura 90) observa-se que próximo ao ponto isobéptico a 482 nm (indica a existência de duas formas iônicas do fármaco, que como vimos a este pH está maioritariamente carregada positivamente mas com coexistência de algumas espécies carregadas negativamente) [140], se encontra a 442 nm um pico intenso da derivada das absorvâncias da DOX solubilizada em água ultrapura. Com os valores das primeiras derivadas das absorvâncias obtidos nesse pico, por cada concentração de solução padrão, obtém-se a curva de calibração apresentada na Figura 91.

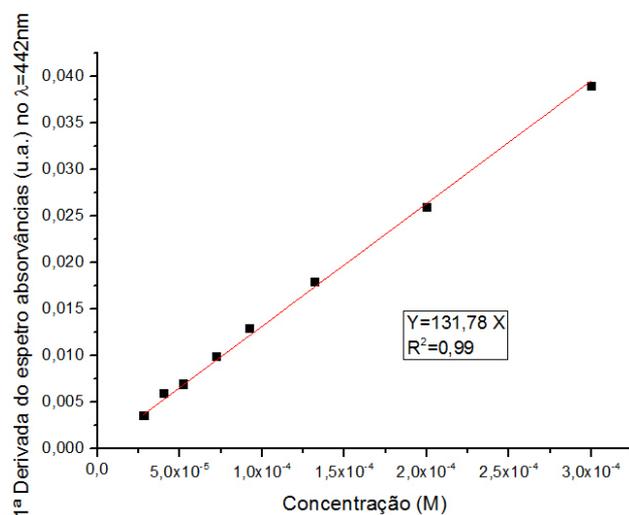


Figura 91 - Curva de calibração da 1ª derivada do espectro de absorvâncias de soluções padrão de doxorrubina solubilizada em água ultrapura, ao comprimento de onda máximo de 442 nm.

Esta curva de calibração da derivada dos espectros de absorção dos padrões (Figura 91) teve de ser elaborada para se obterem dados importantes para o cálculo da EE da DOX na formulação lipossomal DODAB:MO (1:2), tais como, a concentração da DOX que ficou retida nos lipossomas, uma vez que ao nível dos lipossomas, a dispersão de luz por eles provocada impediria um correto doseamento do fármaco se não fosse aplicado o método derivativo (que anula as interferências espectrais da dispersão de luz).

De seguida, testou-se a encapsulação de duas soluções de DOX solubilizada em água ultrapura, com as concentrações de 5×10^{-5} e 5×10^{-4} M, na formulação de DODAB:MO (1:2), pelos métodos de hidratação, incubação e inclusão direta, com o intuito de analisar qual o método mais eficiente a encapsular a DOX na formulação lipossomal DODAB:MO (1:2).

Após a centrifugação e diluição das duas amostras de cada método, foi lida a absorvância do resíduo e filtrado. O espectro de absorvância dos resíduos e dos filtrados são apresentados respetivamente na Figura 92 e 93.

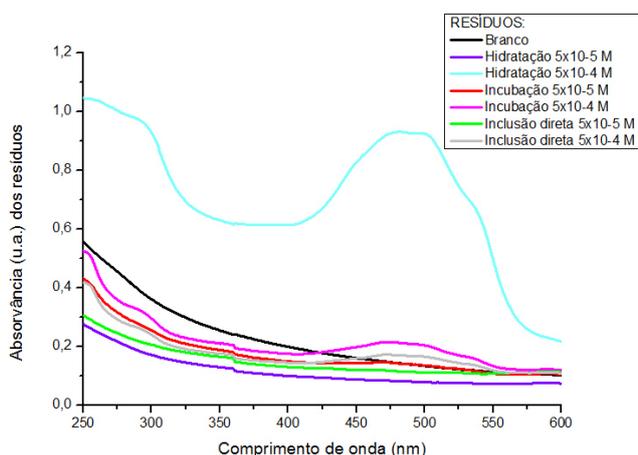


Figura 92 - Espectro de absorvância dos resíduos do branco (formulação placebo de DODAB:MO (1:2) sem DOX) e de duas concentrações de doxorrubicina encapsuladas por três métodos.

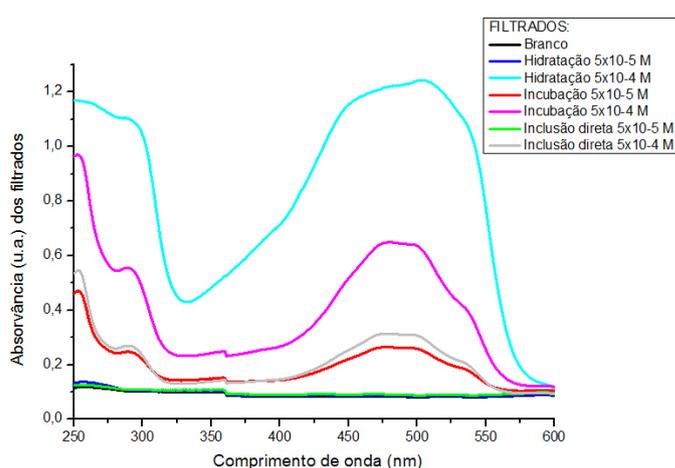


Figura 93 - Espectro de absorvância dos filtrados do branco (formulação placebo de DODAB:MO (1:2) sem DOX) e de duas concentrações de doxorrubicina encapsuladas por três métodos.

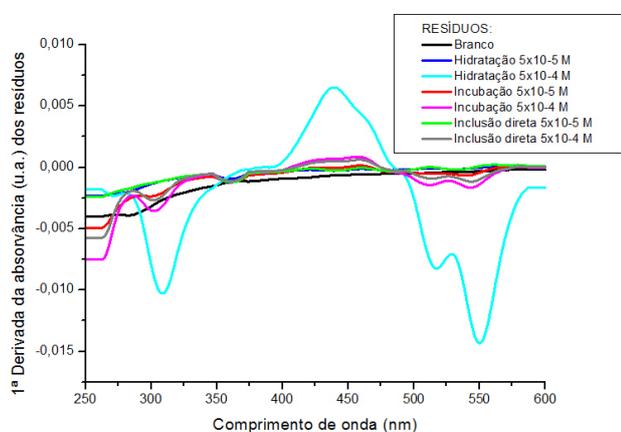


Figura 94 - 1ª Derivada do espectro de absorvância dos resíduos do branco e de duas concentrações de doxorrubicina encapsuladas por três métodos.

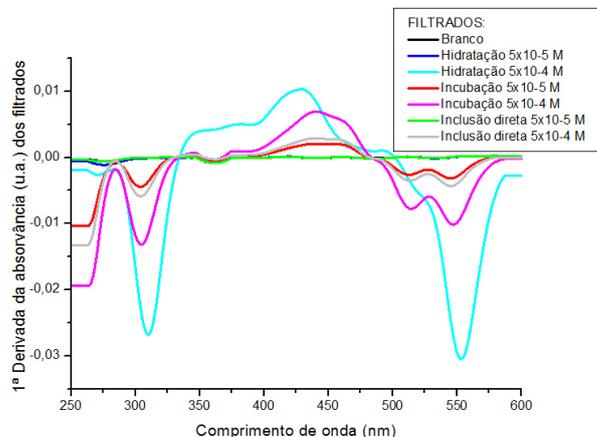


Figura 95 - 1ª Derivada do espectro de absorvância dos filtrados do branco e de duas concentrações de doxorrubicina encapsuladas por três métodos.

Para eliminar a dispersão de luz provocada pelos lipossomas, calcularam-se as primeiras derivadas dos espectros de absorvância dos resíduos (Figura 94) e nestes resíduos o cálculo da DOX presente será efetuado recorrendo à curva de calibração da derivada dos espectros (Figura 91). Nos filtrados não há o problema da dispersão de luz, pois tratam-se apenas de soluções aquosas contendo a DOX que não foi encapsulada, e portanto o doseamento da DOX nos filtrados pode ser feito diretamente nos espectros de absorção do filtrado (Figura 93) recorrendo à curva de calibração da DOX em água ultrapura (Figura 89). No entanto, o doseamento por aplicação do método derivativo é possível mesmo em soluções aquosas e para testar que este método derivativo não afetava em nada o cálculo da concentração de DOX no filtrado, procedeu-se também ao traçado da 1ª derivada dos espectros dos filtrados (Figura 95). De facto, a concentração de DOX nos filtrados apresentou valores idênticos, quando calculada quer pelo método direto quer pelo método derivativo. Por isso, e uma vez que se aplicou o método derivativo ao cálculo da concentração de DOX nos resíduos também se recorreu a este método para calcular a DOX no filtrado.

Assim registaram-se os valores obtidos na banda 422 nm da derivada dos espectros dos resíduos e filtrados e através da curva de calibração da derivada dos espectros de padrões de DOX determinou-se a concentração de DOX presente nos resíduos e filtrados. A EE foi calculada através da equação 2.11 em que a [DOX] total foi calculada pela soma da [DOX] no resíduo e no filtrado. Não se utilizou a [DOX] como sendo a [DOX] inicial adicionada, porque nos métodos de hidratação e de inclusão, a adição da DOX fez-se antes da extrusão e verificamos que houve perdas de DOX nos filtros de policarbonato, pelo que a concentração total de DOX disponível para encapsulação era inferior à inicialmente colocada.

Os resultados de EE para os vários métodos de encapsulação da DOX nos lipossomas e para duas concentrações distintas de DOX (5×10^{-5} e 5×10^{-4} M) apresentam-se representados na Figura 96.

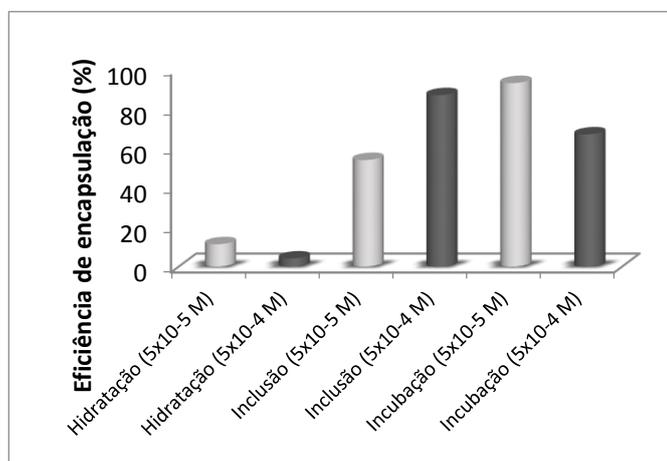


Figura 96 - Eficiência de encapsulação de duas concentrações de DOX (5×10^{-5} e 5×10^{-4} M) em lipossomas de DODAB:MO (1:2) por três métodos distintos de encapsulação do fármaco: hidratação, inclusão direta e incubação.

Analisando os dados da Figura 96 podemos inferir que o método de hidratação é o método menos eficiente para encapsular a DOX no sistema DODAB:MO (1:2). Provavelmente este método é menos eficiente devido ao facto de a DOX se encontrar carregada positivamente quando solubilizada em água ultrapura (pH ligeiramente ácido) o que promoverá a repulsão eletrostática entre a DOX e o DODAB (também carregado positivamente), aquando da hidratação do filme lipídico seco.

Segundo a Figura 96, o método de incubação é o método que proporciona maior encapsulação de DOX na formulação lipossomal DODAB:MO (1:2). No entanto, o método de inclusão direta proporciona valores de encapsulação muito semelhantes ao método de incubação, embora em ordem inversa, ou seja, a concentração mais baixa de DOX apresenta pelo método de inclusão direta um valor semelhante à concentração mais elevada de DOX encapsulada pelo método de incubação e a concentração mais elevada de DOX apresenta pelo método de inclusão direta um valor semelhante à concentração mais baixa de DOX encapsulada pelo método de incubação. Ou seja, no caso do método de inclusão direta, a encapsulação aumenta com o aumento da concentração de DOX e o inverso sucede no método de incubação. Estas diferenças, certamente, têm que ver com o modo diferente como a DOX é incluída no sistema lipossomal, uma vez que diferentes tipos de métodos de encapsulação proporcionam diferentes tipos de organização estrutural dos nanossistemas para melhor acomodarem o fármaco. Este tipo de observação já era visível nas análises de DLS, onde os métodos de incubação e inclusão direta apresentavam resultados opostos em função da concentração de DOX adicionada (ver Figuras 50 e 53).

Outra observação interessante a realizar é a existência de uma correlação entre a EE (%) de DOX nos lipossomas de DODAB:MO (1:2) e a condensação do tamanho dos lipossomas que o aumento de EE (%) proporciona (Figura 97). Ou seja, tanto pelo método de incubação, como pelo método de inclusão direta, com o aumento da EE (%) de DOX nos lipossomas de DODAB:MO (1:2) ocorre uma condensação destes lipossomas (diminuição do tamanho). Este efeito de condensação dos lipossomas por aumento da encapsulação de DOX é mais evidente no método de inclusão direta, muito provavelmente porque neste método ao adicionar-se DOX diretamente aos lípidos que irão formar o filme lipídico seco, a DOX tem maior oportunidade de se distribuir no interior das vesículas, sendo mais miscível nas estruturas ricas em MO, e provavelmente promovendo maior concentração da MO no interior do lipossoma, justificando assim a condensação dos lipossomas.

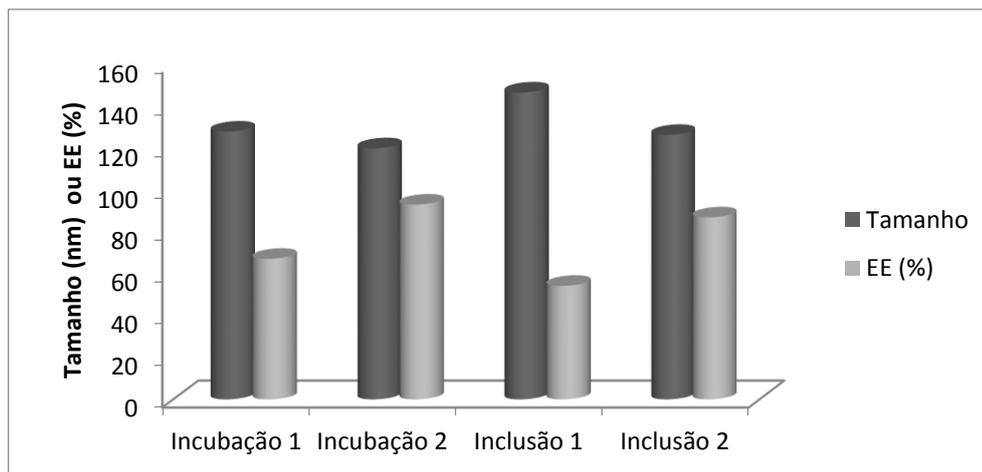


Figura 97 - Comparação do tamanho (nm) (barra escura) e eficiência de encapsulação (%) (barra clara) obtidos com duas concentrações de doxorubicina em lipossomas de DODAB:MO (1:2), por dois métodos distintos de encapsulação do fármaco: incubação e inclusão direta.

De forma a comparar os métodos de encapsulação da DOX ser mais evidente, na Figura 98 apresenta-se a representação gráfica da eficiência obtida para a encapsulação de uma média de concentrações de DOX pelos três métodos.

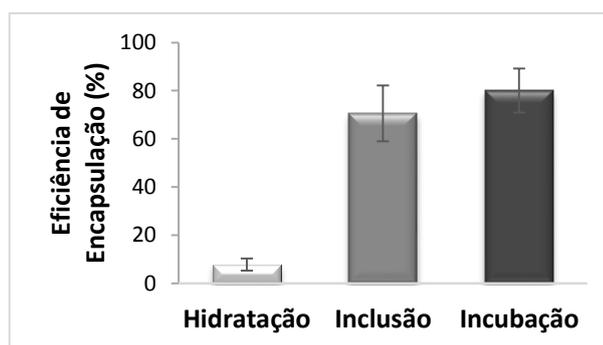


Figura 98 - Eficiência de encapsulação da média de concentrações de doxorubicina em lipossomas de DODAB:MO (1:2), por três métodos distintos de encapsulação do fármaco: hidratação, inclusão direta e incubação.

Por observação da Figura 98 conclui-se de uma forma mais evidente que o método menos eficiente para a encapsulação da DOX em lipossomas de DODAB:MO (1:2) é o método de hidratação, enquanto os métodos de inclusão e incubação apresentam valores semelhantes de encapsulação da DOX dentro do erro. No entanto, confrontando os dados da EE com os dados obtidos sobre o melhor método para a estabilidade das formulações ao longo do tempo podemos deduzir que a DOX ao ser encapsulada pelo método de inclusão apresenta maior estabilidade ao longo do tempo. Portanto, este foi o método escolhido como o ideal para encapsulação da DOX pois conjuga uma boa EE (%) com uma boa estabilidade dos LUVs formados.

Por estes motivos, decidiu-se repetir a determinação da EE (%) da DOX pelo método inclusão direta, com as duas concentrações utilizadas, 5×10^{-5} e 5×10^{-4} M, e mais três: 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 5×10^{-3} M, para confirmar se aumentando as concentrações de DOX, a EE (%) aumentava. Após a centrifugação e diluição das cinco amostras, foi lida a absorvância do resíduo e filtrado. Os espectros de absorvância dos resíduos e dos filtrados são apresentados respetivamente nas Figuras 99 e 100.

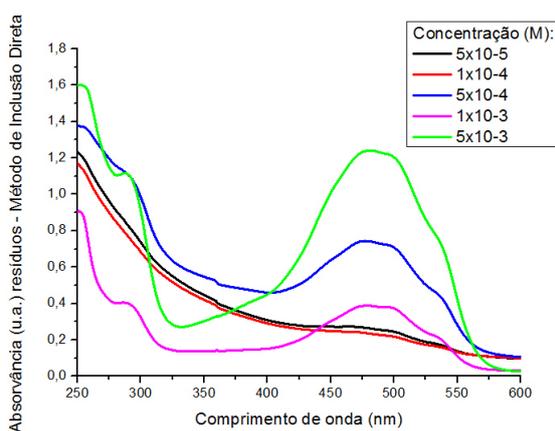


Figura 99 - Espectros de absorvância dos resíduos de cinco amostras com concentrações diferentes de doxorubicina encapsulada pelo método de inclusão direta.

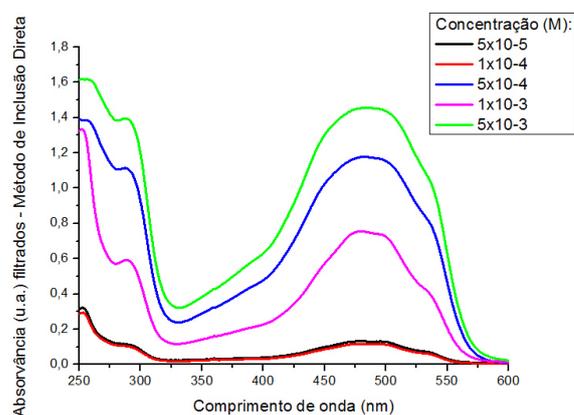


Figura 100 - Espectros de absorvância dos filtrados de cinco amostras com concentrações diferentes de doxorubicina encapsulada pelo método de inclusão direta.

Para eliminar a dispersão de luz provocada pelos lipossomas, calcularam-se as primeiras derivadas dos espectros de absorvância dos resíduos (Figura 101) e dos filtrados (Figura 102).

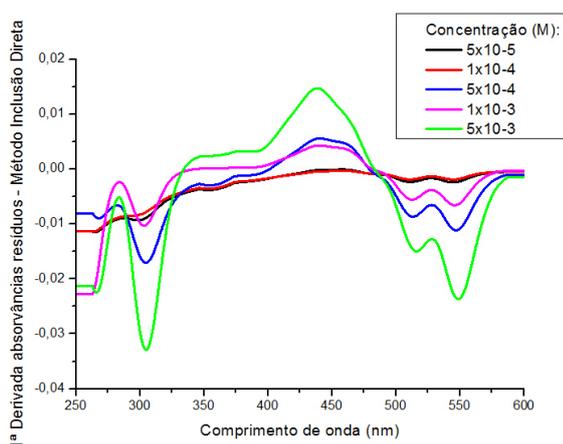


Figura 101 - 1ª Derivada dos espectros de absorvância dos resíduos de cinco amostras com concentrações diferentes de doxorubicina encapsuladas pelo método de inclusão direta.

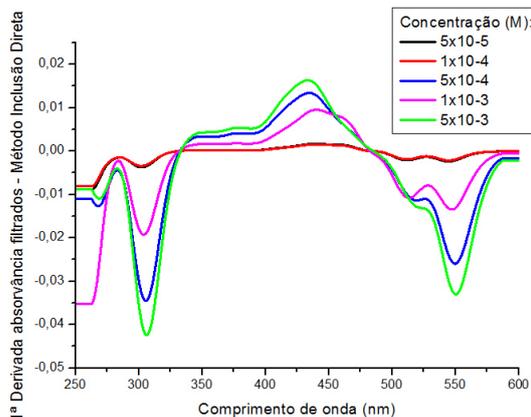


Figura 102 - 1ª Derivada do espectro de absorvância dos filtrados de cinco amostras com concentrações diferentes de doxorubicina encapsuladas pelo método de inclusão direta.

Registaram-se os valores obtidos na banda 422 nm da derivada dos espectros dos resíduos e filtrados e através da curva de calibração da derivada dos espectros de padrões de DOX determinou-se a concentração de DOX presente nos resíduos e filtrados, calculando-se EE (%) tal como o descrito anteriormente.

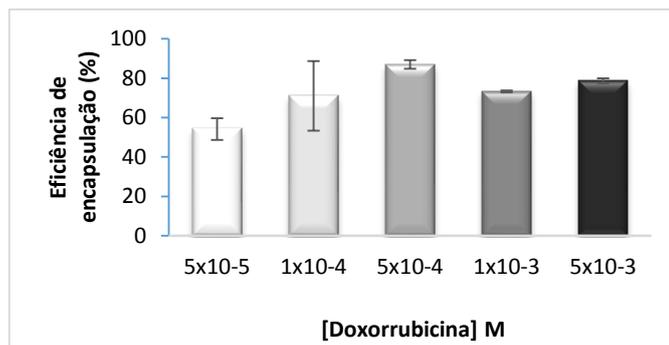


Figura 103 - Eficiência de encapsulação de concentrações crescentes de doxorubicina encapsulada em lipossomas de DODAB:MO (1:2), pelo método de inclusão direta no filme lipídico.

Depois de calculada a média e desvio padrão de dois ensaios de EE (%) podemos concluir que a EE (%) da DOX nos lipossomas de DODAB:MO (1:2) pelo método de inclusão aumenta com o aumento da concentração de DOX adicionada (Figura 103). Este comportamento verifica-se até à concentração de 5×10^{-4} M, a partir da qual esse aumento não é tão significativo, talvez porque a formulação tenha atingido um ponto de saturação da quantidade de DOX que consegue encapsular [141].

3.5. Teste de citotoxicidade

As concentrações de DOX a testar foram escolhidas tendo em conta as concentrações utilizadas para análise da EE (%) mas também o valor do IC_{50} da DOX livre em células MDA-MB-468 ($0,14 (\pm 0,05) \mu\text{M}$) [142] presente na literatura.

Todas as amostras foram testadas em triplicado (exceto o controlo de células), tendo sido calculadas média e desvio padrão da percentagem de proliferação celular.

Para podermos analisar os resultados do teste de citotoxicidade SRB (48h), na linha celular MDA-MB-468, subtraiu-se o valor da absorvância do Tris (branco) e achou-se a média e desvio padrão dos três ensaios realizados (Figura 104).

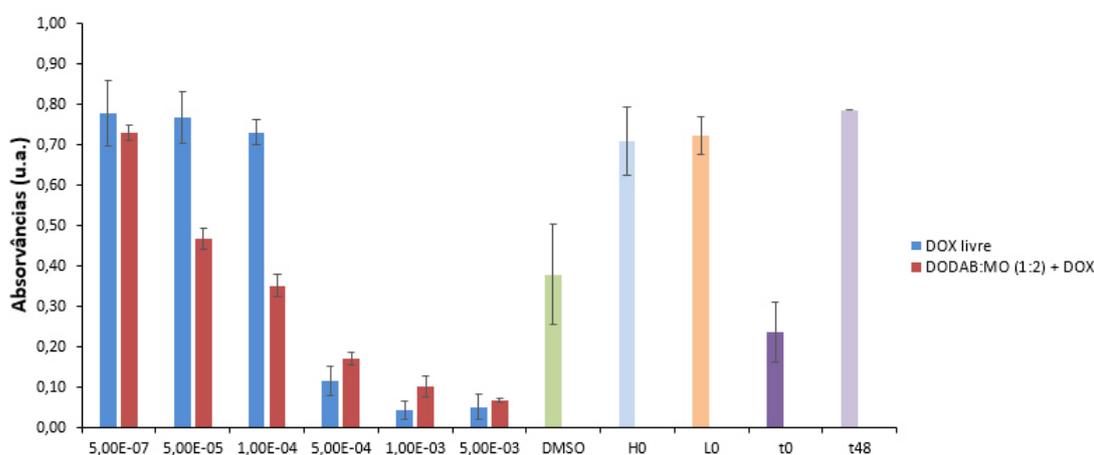


Figura 104 - Absorvâncias, com subtração do Tris (branco), e respetivos desvios padrão de 6 concentrações de DOX livre; de 6 formulações DODAB:MO (1:2) com 6 concentrações de DOX; L0 (lipossomas controlo); H0 (água); DMSO (controlo de morte); t0 (células ao início da experiência); t48 (controlo de vida após 48h).

A partir da Figura 104 conseguimos observar o crescimento das células que não foram sujeitas a tratamentos através dos valores médios de absorvâncias desde o início do teste ($t_0=0,24$) até ao final ($t_{48}=0,79$). Este valor médio de absorvância dos poços das células (0,79) foi considerado como 100% de proliferação celular. Sendo assim, os resultados da Tabela 9 foram expressos relativamente à média das leituras de absorvância dos poços das células (0,79), considerando este *timepoint* como 100% de proliferação celular.

Tabela 9 - Valores de absorvâncias e respetivos desvios padrão dos poços tendo em conta o *timepoint* das células como 100% de proliferação.

	1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio	Média	Desvio Padrão		1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio	Média	Desvio Padrão
5,00E-07	90,926	95,627	110,492	99,02	10,21	F1	94,272	89,952	94,357	92,86	2,52
5,00E-05	90,926	106,681	94,992	97,53	8,18	F2	55,648	62,509	60,222	59,46	3,49
1,00E-04	88,936	96,771	93,213	92,97	3,92	F3	41,758	48,491	43,748	44,67	3,46
5,00E-04	10,122	19,481	14,442	14,68	4,68	F4	20,667	24,224	20,794	21,90	2,02
1,00E-03	4,616	3,049	8,894	5,52	3,03	F5	9,487	12,832	16,051	12,79	3,28
5,00E-03	5,167	3,430	11,181	6,59	4,07	F6	8,047	8,936	8,851	8,61	0,49
DMSO	50,821	31,212	62,340	48,12	15,74						
H0	102,361	83,557	84,574	90,16	10,58						
L0	96,686	85,124	94,145	91,99	6,08						
T0	29,603	21,091	39,767	30,15	9,35						
Células		100,095	99,905	100,00	0,13						

Pelos dados da Tabela 9 verifica-se que o DMSO teve, como seria de prever, um efeito citotóxico embora não aos níveis habituais, originando uma taxa de proliferação celular de $48,12\% \pm 15,74$.

Relativamente à água, esta foi bem tolerada pelas células tendo-se obtido um valor médio de percentagem de proliferação celular de $90,16\% \pm 10,58$.

Analogamente o L0, ou seja, a formulação lipossomal DODAB:MO (1:2) também foi bem tolerada pelas células, tendo-se obtido um valor médio de percentagem de proliferação celular de $91,99\% \pm 6,08$.

Depois de determinada a média e desvio padrão dos três ensaios, traçou-se a curva de percentagem de proliferação celular vs concentração de DOX (M) ao longo de 48h, para determinação do IC_{50} da DOX livre e encapsulada em DODAB:MO (1:2) (Figura 105).

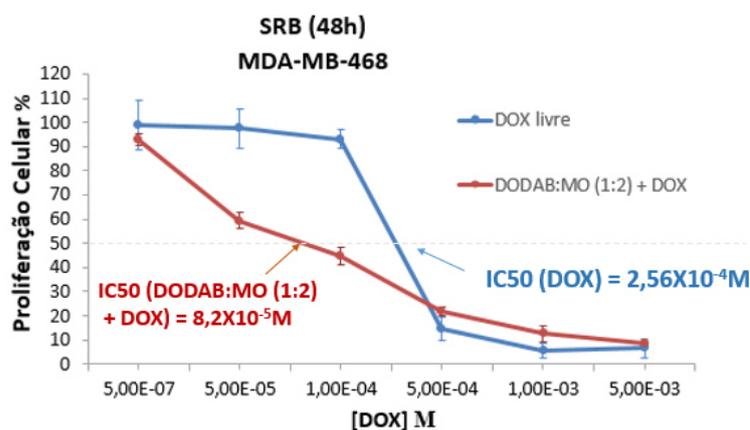


Figura 105 - Curva de percentagem de proliferação celular vs concentração de doxorrubicina (M) ao longo de 48h e determinação do IC_{50} da doxorrubicina livre e encapsulada na formulação (DODAB:MO (1:2) + DOX).

Analisando a curva de percentagem de proliferação celular vs concentração de DOX (M) ao longo de 48h verifica-se que ambas as amostras testadas têm um efeito citostático. Comparando a percentagem de proliferação celular da doxorrubicina livre, verifica-se que é mais alta do que a da formulação DODAB:MO (1:2) + DOX em concentrações entre 5×10^{-7} e 1×10^{-4} M. A partir da concentração 1×10^{-4} M e até 1×10^{-3} M verifica-se uma queda abrupta da percentagem de proliferação celular de 92,97% para 5,52%.

A percentagem de proliferação celular com a formulação de DODAB:MO (1:2) contendo DOX vai diminuindo gradualmente da concentração 5×10^{-7} e 5×10^{-4} M o que parece ser efeito da libertação controlada da doxorrubicina do lipossoma. A percentagem, neste intervalo de concentrações é mais efetiva para a diminuição da proliferação celular do que a doxorrubicina livre. Talvez porque o lipossoma atravessa melhor a barreira das membranas celulares do que a doxorrubicina livre, ou seja, internaliza mais rapidamente.

O IC_{50} foi extrapolado pela determinação das equações das retas. A formulação DODAB:MO (1:2) contendo DOX tem um IC_{50} mais baixo ($8,2 \times 10^{-5}$ M) do que a doxorrubicina livre ($2,56 \times 10^{-4}$ M), o que demonstra que a formulação DODAB:MO (1:2) é mais citotóxica (com uma ordem de grandeza inferior) que a doxorrubicina livre até à concentração de 5×10^{-4} M, o que vem corroborar o perfil citotóxico da formulação com doxorrubicina encapsulada mais

favorável e em princípio com melhor segurança cardíaca e menos mielossupressão, alopecia, náuseas e vômitos, em comparação com a doxorubicina livre.

No entanto, é importante distinguir o IC₅₀ associado ao lipossoma do IC₅₀ do lipossoma com a DOX encapsulada. Segundo estudos realizados recentemente pelo grupo de investigação onde me insiro, o IC₅₀ associado ao lipossoma é de 146,5 µg/mL, ou seja, $1,48 \times 10^{-4}$ M, o que quer dizer que o efeito citostático da formulação DODAB:MO (1:2) + DOX deve-se essencialmente à DOX libertada da formulação e não tanto à formulação DODAB:MO (1:2).

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

4.1. Conclusões

Neste trabalho foi possível desenvolver e caracterizar uma formulação lipossomal para transporte e entrega específica e eficiente de um fármaco anticancerígeno, a DOX.

A investigação realizada permite concluir que o método de inclusão direta da DOX antes de se formar o filme lipídico seco apesar de produzir formulações com tamanhos médios e PDIs mais elevados (embora dentro dos parâmetros de tamanhos pretendidos (100-200 nm)) que os outros dois métodos testados, estas são mais estáveis ao longo de doze semanas e apresentam uma elevada eficiência de encapsulação que atinge um máximo de $86,95\% \pm 4,48$. Quanto à carga de superfície dos lipossomas desenvolvidos, os valores rondam os +47 mV, o que é interessante para de futuro efetuar a complexação dos lipossomas com material genético (com carga negativa devido aos grupos fosfato) e assim obter uma formulação que aproveita a sinergia da terapia génica e da quimioterapia. Além disso, a carga positiva da superfície dos lipossomas assegura uma melhor internalização celular já que as membranas apresentam lípidos com carga superficial ligeiramente negativa e portanto a adsorção de nanoveículos carregados positivamente é facilitada.

Relativamente aos métodos de hidratação e incubação, apesar de promoverem uma diminuição dos tamanhos médios dos lipossomas e uma distribuição de tamanhos do tipo monodispersa, denotam ou uma baixa eficiência de encapsulação (no caso do método de hidratação possivelmente devido à repulsão eletrostática promovida pelas cargas positivas (DODAB) da superfície dos lipossomas e as cargas positivas da DOX) ou, por outro lado, apresentam menor estabilidade ao longo do tempo (sendo o caso do método de incubação).

O elevado valor obtido para a partição da DOX nos sistemas lipossomais desenvolvidos sugere que o nanossistema desenvolvido é adequada para o encapsulamento do fármaco em estudo.

Ao calcular os coeficientes de partição a dois valores de pH distintos, ambos acídicos, concluiu-se que a partição é elevada e que a carga positiva da doxorubicina não condiciona a sua distribuição nos nanossistemas carregados positivamente, uma vez que a molécula de fármaco possui grupos lipófilos que certamente promovem a distribuição preferencial da molécula no interior, igualmente lipófilo, das vesículas ricas em estruturas invertidas de MO.

A análise do coeficiente de partição a várias temperaturas possibilitou-nos concluir que a partição é mais espontânea à medida que a membrana fica mais fluída e desorganizada, uma vez que permite a melhor a penetração do fármaco. Porém, na fase fluída, o aumento da temperatura diminui a espontaneidade da partição. Com esta investigação, confirmou-se que a

utilização de lipossomas, como mimetização do comportamento de membranas, permite obter coeficientes de partição que traduzem a partição dos fármacos nas membranas celulares.

Quanto aos efeitos biofísicos da DOX na microviscosidade e cooperatividade membranares, verifica-se que esta promove um efeito de ordenação das membranas miméticas das membranas celulares provavelmente devido à sua estrutura planar intercaladora que favorece o empacotamento lipídico e bioacumulação, o que enfatiza a necessidade da sua encapsulação. Nas membranas das vesículas DODAB:MO (1:2) a DOX possui ainda um efeito de aumento da cooperatividade da transição de fase indicando uma boa distribuição do fármaco no seio lipídico. No entanto os efeitos sobre a temperatura de transição de fase são mínimos (ligeira redução) indicando que a molécula certamente se localiza mais profundamente na bicamada lipídica, não sendo os seus efeitos tão notórios nesta região já de si muito fluída, ou junto dos agregados de MO no interior do lipossoma. Podemos contudo observar que a DOX apresenta efeitos de redução da microviscosidade lipídica na fase gel e fluída da membrana.

Por último, dos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade podemos concluir que a formulação DODAB:MO (1:2) + DOX tem um efeito citostático mais rápido e gradual (o que parece ser um efeito da libertação controlada) do que a DOX livre, provavelmente porque o lipossoma internaliza mais rapidamente nas células. O efeito citostático verificado deve-se essencialmente à DOX libertada da formulação e não tanto à formulação. Sendo por isso, mais favorável e em princípio com melhor segurança cardíaca e menos mielossupressão, alopecia, náuseas e vómitos, em comparação com a DOX livre.

4.2. Perspetivas futuras

Os resultados obtidos nesta dissertação proporcionam novas questões bastante interessantes que nos conduzem a perspetivas para mais estudos.

- Os lipossomas devem ser capazes de transportar e libertar o fármaco de uma maneira eficiente no corpo. Daí a necessidade de realização de ensaios de libertação controlada a pH 5 (mimetiza pH do tecido cancerígeno), pH 7.4 (mimetiza pH do soro) e pH 9 (muito próximo do pKa da doxorubicina), para analisar as possíveis alterações de espetros (visto que a doxorubicina é uma molécula anfifílica e dependente do pH do meio) e determinar a libertação controlada da doxorubicina da formulação, *in vitro*, nos diferentes valores de pH.

- Realização de estudos de difração de raio-X do sistema lipossomal para verificação de confirmação da existência de fases não lamelares invertidas de MO no interior da bicamada lamelar de DODAB e realização do mesmo tipo de estudos mas após encapsulação de

doxorubicina para perceber melhor de que forma esta interage com os lípidos da formulação e como altera o seu polimorfismo.

- Realização de ensaios de localização membranar da doxorubicina com recurso a sondas desativadoras da fluorescência do fármaco.
- Realização de um acoplamento de PEG (PEG-CerC16-PE) na formulação DODAB:MO (1:2) para aumentar o tempo de circulação.
- Produção de formulações lipossomais com diferentes combinações de lípidos sensíveis ao pH e com fluidez distinta: (DSPC+DODAP):MO (1:2), um sistema lipossomal mais rígido e DODAP:MO (1:2), um sistema lipossomal mais fluído, importantes para modelar a libertação da doxorubicina e acionar a libertação do fármaco no pH ácido das células cancerígenas.
- Funcionalização das formulações lipossomais com hialuronato, manose e folato para um direcionamento ativo para as células cancerígenas, bem como a complexação com siARN para inibição do efeito MDR.
- Realização de estudos de internalização celular que evidenciem a vantagem das formulações desenvolvidas.

Bibliografia

1. Raghunand N., Mahoney B.P., Gillies R.J. (2003). Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents. *Biochemical Pharmacology*. 66(7): p. 1219-1229.
2. Barenholz Y. (2012). Doxil(R)-the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of Controlled Release*. 160(2): p. 117-134.
3. Marques E.F, Silva B.F.B. (2013). Surfactants, Phase Behaviour, in *Colloid and Interface Science*, Heidelberg, Editor. Springer.
4. Peer D., Karp J.M., Hong S., Farokhzad O.C., Margalit R., Langer R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*. 2(12): p. 751-760.
5. Laouini A., Jaafar-Maalej C., Limayem-Blouza I., Sfar S., Charcosset C., Fessi H. (2012). Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*. 1(2): p. 147-168.
6. Tyrrell D.A., Heath T.D., Colley C.M., Ryman B.E. (1976). New aspects of liposomes. *Biochimica Biophysica Acta*. 457(3-4): p. 259-302.
7. Takemura G., Fujiwara H. (2007). Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in Cardiovascular Disease*. 49(5): p. 330-352.
8. Faraji A.H., Wipf P. (2009). Nanoparticles in cellular drug delivery, in *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17: p. 2950-2962.
9. Sturgeon R.G., Schulman S.G. (1977). Electronic absorption spectra and protolytic equilibria of doxorubicin: Direct spectrophotometric determination of microconstants. *Journal of Pharmaceutical Science*. 66(7): p. 958-961.
10. Woodle M.C., Storm G. (1998). Long Circulating Liposomes: Old drugs, New therapeutics. Berlin: Springer-Verlag.
11. Blaboo10. *PAMAM DNA Complexation*. 2013-12-02 [cited 2014 14-05]; Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/File:PAMAM_DNA_Complexation.png.
12. Zhejiang NetSun Co., L. *Glyceryl monooleate*. [cited 2014 25-05]; Available from: <http://www.chemnet.com/Suppliers/6338/GLYCERYL-MONOOLEATE--1283702.html>.
13. Malvern Instruments. (2005). *Zetasizer Nano Series: Zetasizer range*. Worcestershire: Malvern Instruments Ltd.
14. IARC (2012). *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. [cited 2014 04]; Available from: <http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx>.
15. Avanti Polar Lipids, Inc. *Ether Cationic Lipids*. [cited 2014 26-04]; Available from: http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=939&Itemid=487&catnumber=890810.
16. INE-DGS/MS, INE, PORDATA (2013). *Óbitos por algumas causas de morte em Portugal*. [cited 2014 25-07]; Available from: <http://www.pordata.pt/Portugal/Obitos+por+algumas+causas+de+morte+%28percentagem%29-758>.
17. Sigma-Aldrich Co (2014). *Doxorubicin hydrochloride*. [cited 2014 20-05]; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d1515?lang=pt®ion=PT>.
18. Silva J.P.N., Oliveira M.E.C.D.R., Coutinho P.J.G. (2009). Characterization of mixed DODAB/monoolein aggregates using Nile Red as a solvatochromic and anisotropy fluorescent probe. *Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 203: p. 32-39.

19. Lúcio M. (2006). *Estudos de Anti-Inflamatórios Não Esteróides em Modelos Membranares*, University of Porto. p. 360.
20. ChemicalBook (2010). *ChemicalBook - Dimethyldioctadecylammonium bromide*. [cited 2014 16-05]; Available from: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8768654.htm.
21. Bitounis D., Fanciullino R., Iliadis A., Ciccolini J. (2012). Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept. *ISRN Pharmaceutics*, 2012: p. 738432.
22. Hardman J.G., Limbird L.E., Gilman A.G. (2001), *The pharmacological basis of therapeutics*. 10th ed., New York: McGraw-Hill.
23. Magalhães L.M., Nunes C., Lucio M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L. (2010). High-throughput microplate assay for the determination of drug partition coefficients. *Nature Protocols*. 5(11): p. 1823-1830.
24. Office of Cancer Nanotechnology Research. (2010). *Cancer Nanotechnology Plan*, Center for Strategic Scientific Initiatives. <http://nano.cancer.gov/objects/pdfs/CaNanoPlan.pdf>.
25. Instituto do Cancer. *Tratamento do câncer*. [cited 2014 25-06]; Available from: <http://www.institutodocancer.com.br/php/index.php?link=12>.
26. Moreno C., Paiva I., Gomes L., Ruas L., Carvalheiro M. (2013). Radioterapia nos tumores da hipófise – atualizações e controvérsias. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*. 8(2): p. 89-96.
27. Garrett J, Osswald W., Guimarães S. (1995). *Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas*. 3ª ed.: Porto Editora.
28. Roblot-Treupel L., Puisieux F. (1986). *Les nouvelles formes d'administration des médicaments*, L`Mondiale Paris , Editor. p. 11-18.
29. Moreira J.N. (1994). *Caracterização de lipossomas de carboplatina revestidos com O-palmitoilpululano*, in *Departamento de Zoologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia*, Universidade de Coimbra: Coimbra.
30. Puisieux F., Roblot-Treupel L. (1989). Vectorization et vecteurs de médicaments. *S.T.P. Pharma*. 5 (2): p. 107-113.
31. Allen T.M. (1997). Liposomes. Opportunities in drug delivery. *Drugs*. 54 Suppl 4: p. 8-14.
32. Vemuri S., Rhodes C.T. (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 70(2): p. 95-111.
33. Vinogradov S.V., Bronich T. K., Kabanov, A.V. (2002). Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Advanced Drug Delivery Review*. 54(1): p. 135-147.
34. Mokhtarieh A.A., Davarpanah S.J., Lee M.K. (2013). Ethanol treatment a Non-extrusion method for asymmetric liposome size optimization. *Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*. 21(1): p. 32.
35. Small D.M. (1988). *The Physical Chemistry of Lipids - from Alkanes to Phospholipids* (eds). New York: Plenum Press.
36. Tanford C. (1991). *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*. 2nd Ed. Ed. Melboourne, FL: Krieger Publishing Company.
37. Zuhorn I.S., Visser W.H., Bakowsky U., Engberts J.B., Hoekstra D. (2002). Interference of serum with lipoplex-cell interaction: modulation of intracellular processing. *Biochimica Biophysica Acta*. 1560(1-2): p. 25-36.

38. Mouritsen O.G., Jorgensen K. (1994). Dynamical order and disorder in lipid bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*. 73(1-2): p. 3-25.
39. Allen T.M., Mehra T., Hansen C., Chin Y.C. (1992). Stealth liposomes: an improved sustained release system for 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Research*. 52(9): p. 2431-2439.
40. Koning, G.A., Morselt H.W., Velinova M.J., Donga J., Gorter A., Allen T.M., Zalipsky S., Kamps J.A., Scherphof G.L. (1999). Selective transfer of a lipophilic prodrug of 5-fluorodeoxyuridine from immunoliposomes to colon cancer cells. *Biochimica Biophysica Acta*. 1420(1-2): p. 153-167.
41. Bolotin E.M., Cohen R, Bar L.K., Emanuel N., Ninio S., Lasic D.D., Barenholz Y. (1994). Ammonium sulphate gradients for efficient and stable remote loading of amphipatic weak bases into liposomes and ligando liposomes. *Journal Liposome Research*. 4: p. 455-479
42. Lasic D.D. (1993). *Liposomes - from Physics to Applications*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers Ltd.
43. Israelachvili J.N. (1998). *Intermolecular and Surface Forces*. 2nd ed. New York: Harcourt Brace & Company.
44. Jones M.N., Chapman D. (1995). *Micelles, monolayers and biomembranes*. New York: Wiley-Liss Inc.
45. Israelachvili J.N., Marčelja S., Horn R. G. (1980). Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics*.13(2). p.121-200.
46. Jones M.N. (1981), *Biochemical thermodynamics*. London: Elsevier.
47. Ganta S., Devalapally H., Shahiwala A., Amiji, M. (2008). A review of stimuli responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *Journal of Control Release*. 126(3): p. 187-204.
48. Lamprecht A., Ubrich N., Hombreiro P.M., Lehr C., Hoffman M., Maincent P. (1999). Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification. *International Journal of Pharmaceutics*. 184(1): p. 97-105.
49. Ostro M.J., Cullis P.R. (1989). Use of liposomes as injectable-drug delivery systems. *American Journal of Hospital Pharmacy*. 46(8): p. 1576-1587.
50. Chan R.T.H., Marçal H., Russell R.A., Holden P.J., Foster J.R. (2011). Application of Polyethylene Glycol to Promote Cellular Biocompatibility of Polyhydroxybutyrate Films. *International Journal of Polymer Science*, 2011: p. 1-9.
51. Torchilin V.P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Review Drug Discovery*. 4(2): p. 145-160.
52. Sawant R.R., Torchilin V.P. (2012). Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. *AAPS Journal* 14(2): p. 303-315.
53. Petros R.A., DeSimone J.M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery*. 9(8): p. 615-627.
54. Soenen, S.J., Brisson A.R., Cuyper M. (2009). Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: the magnetoliposome model. *Biomaterials*. 30(22): p. 3691-3701.
55. Jain K.K. (2008). *Handbook of Nanomedicine - Nanomolar Diagnostic and Nano-Oncology*. Ed. Humana Press, EUA.
56. Cern A., Golbraikh A. Sedykh A, Tropsha A., Barenholz Y, Goldblum A. (2012). Quantitative structure-property relationship modeling of remote liposome loading of drugs. *Journal of Controlled Release*. 160(2): p. 147-157.
57. Thakor A.S., Gambhir S.S. (2013). Nanooncology: the future of cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer Journal Clinicians*. 63(6): p. 395-418.

58. Kunitake T., Okahata Y.J. (1977). A totally synthetic bilayer membrane. *Journal of American Chemical Society*. 99: p. 3860-3861.
59. Silva J.P., Oliveira A.C., Lucio M., Gomes A.C., Coutinho P.J., Oliveira, M.E. (2014). Tunable pDNA/DODAB:MO lipoplexes: The effect of incubation temperature on pDNA/DODAB:MO lipoplexes structure and transfection efficiency. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 121: p. 371-379.
60. Jamroz D., Kepczynski M., Nowakowska M. (2010). Molecular structure of the dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) bilayer. *Langmuir*. 26(19): p. 15076-15079.
61. Berg H.C. (1993). *Random walks in biology*. Extended Paperback ed., Princeton, N.J: Princeton University Press.
62. Mufamadi M.S., Pillay V., Choonara Y.E., Du Toit L.C., Modi G., Naidoo D., Ndesendo V. M. (2011). A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. *Journal of Drug Delivery*. 2011: p. 1-19.
63. Silva J.P.N., Oliveira A.C.N., Oliveira M.E.C.D.R. (2012). *Development of Dioctadecyldimethylammonium Bromide/Monoolein Liposomes for Gene Delivery*. Cell Interaction, Sivakumar Gowder (Ed.).
64. Kulkarni C.V., Wachter W., Iglesias-Salto G., Engelskirchen S., Ahualli S. (2011). Monoolein: a magic lipid? *Physical Chemistry Chemical Physics*. 13(8): p. 3004-3021.
65. Ganem-Quintanar A., D., Quintanar-Guerrero, Buri P. (2000). Monoolein: a review of the pharmaceutical applications. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 26(8): p. 809-820.
66. Silva J.P.N., Coutinho P.J., Oliveira M.E.R. (2008). Characterization of monoolein-based lipoplexes using fluorescence spectroscopy. *Journal of Fluorescence*. 18(2): p. 555-562.
67. Oliveira I.M., Silva J.P., Feitosa E., Marques E.F., Castanheira E.M., Oliveira M.E.R. (2012). Aggregation behavior of aqueous dioctadecyldimethylammonium bromide/monoolein mixtures: a multitechnique investigation on the influence of composition and temperature. *Journal of Colloid Interface Science*. 374(1): p. 206-217.
68. Oliveira M.E.C.D.R., Coutinho P.J.G., F.P. Coutinho O.M., Gomes A.F.C., P.C. Amorim M.P., Silva J. P.N. (2011). *Application on monoolein as a new helper lipid in transfection*. United States.
69. Silva J.P., Oliveira I.M., Oliveira A.C., Lucio M., Gomes A.C., Coutinho P.J., Oliveira M.E. (2014). Structural dynamics and physicochemical properties of pDNA/DODAB:MO lipoplexes: Effect of pH and anionic lipids in inverted non-lamellar phases versus lamellar phases. *Biochimica Biophysica Acta*. 1838(10): p. 2555-2567.
70. Silva J.P., Oliveira A.C., Casal M.P., Gomes A.C., Coutinho P.J., Coutinho O.P., Oliveira M.E. (2011). DODAB:monoolein-based lipoplexes as non-viral vectors for transfection of mammalian cells. *Biochimica Biophysica Acta*. 1808(10): p. 2440-2449.
71. Oliveira A.C., Martens T.F., Raemdonck K., Adati R.D., Feitosa E., Botelho C., Gomes A.C., Braeckmans K., Oliveira M.E.R. (2014). Dioctadecyldimethylammonium:monoolein nanocarriers for efficient in vitro gene silencing. *ACS Applied Materials Interfaces*. 6(9): p. 6977-6989.
72. Cell Signaling Technology, Inc. *Doxorubicin*. [cited 2014 23-05]; Available from: <http://www.cellsignal.com/products/activators-inhibitors/5927?Ntt=doxorubicin&fromPage=search>.
73. Sarin H. (2010). Overcoming the challenges in the effective delivery of chemotherapies to CNS solid tumors. *Therapeutic Delivery*. 1(2): p. 289-305.

74. Bouma, J., Beijnen J.H., Bult A., Underberg W.J. (1986). Anthracycline antitumour agents. A review of physicochemical, analytical and stability properties. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific*. 8(2): p. 109-133.
75. Gallois L., Fiallo M., Garnier-Suillerot A. (1998). Comparison of the interaction of doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and idarubicinol with large unilamellar vesicles. Circular dichroism study. *Biochimica Biophysica Acta*, 1998. 1370(1): p. 31-40.
76. Lown, J.W. (1993). Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments. *Pharmacology & Therapeutics*. 60(2): p. 185-214.
77. Fiallo M.M., Garnier-Suillerot A., Matzanke B., Kozlowski H. (1999). How Fe³⁺ binds anthracycline antitumour compounds. The myth and the reality of a chemical sphinx. *Journal Inorganic Biochemistry*. 75(2): p. 105-115.
78. Suzuki F., Hashimoto K., Kikuchi H., Nishikawa H., Matsumoto H., Shimada J., Kawase M., Sunaga K., Tsuda T., Satoh K., Sakagami H. (2005). Induction of tumor-specific cytotoxicity and apoptosis by doxorubicin. *Anticancer Research*. 25(2A): p. 887-893.
79. Karukstis K.K., Thompson E.H., Whiles J.A., Rosenfeld R.J. (1998). Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. *Biophysical Chemistry*. 73(3): p. 249-263.
80. Mitra S., Gaur.U., Ghosh P.C., Maitra A.N. (2001). Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *Journal of Controlled Release*. 317-323.
81. Hanai K., Takaba K., Manabe S., Nakano M., Kohda A., Matsuo M. (1996). Evaluation of cardiac function by echocardiography in dogs treated with doxorubicin. *Journal of Toxicological Science*. 21(1): p. 1-10.
82. Sawyer D.B., Peng X., Chen B., Pentassuglia L., Lim C.C. (2010). Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection? *Progress in Cardiovascular Disease*. 53(2): p. 105-113.
83. Gewirtz D.A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*. 57(7): p. 727-741.
84. Gabizon A., Shmeeda H., Barenholz Y. (2003). Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clinical Pharmacokinetics*. 42(5): p. 419-436.
85. Rana D.K., Dhar S., Sarkar A., Bhattacharya S.C. (2011). Dual intramolecular hydrogen bond as a switch for inducing ground and excited state intramolecular double proton transfer in doxorubicin: an excitation wavelength dependence study. *Journal of Physical Chemistry A*. 115(33): p. 9169-9179.
86. Scher H., Yagoda A., Watson R.C., Serber M., Whitmore W. (1984). Phase II trial of doxorubicin in bidimensionally measurable prostatic adenocarcinoma. *Journal of Urology*. 131(6): p. 1099-1102.
87. Pavone-Macaluso M., Battista Ingargiola G., Tripi M., Lamartina M. (1984). Intravesical instillation of adriamycin in treatment of bladder cancer. A review. *Urology*. 23(3): p. 40-47.
88. Simpkins H., Pearlman L.F., Thompson L.M. (1984). Effects of adriamycin on supercoiled DNA and calf thymus nucleosomes studied with fluorescent probes. *Cancer Research*. 44(2): p. 613-618.
89. Agrawal P., Barthwal S.K., Barthwal R. (2009). Studies on self-aggregation of anthracycline drugs by restrained molecular dynamics approach using nuclear magnetic resonance spectroscopy supported by absorption, fluorescence, diffusion ordered spectroscopy and mass spectrometry. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 44(4): p. 1437-1451.

90. Hortobagyi G.N. (1997). Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs*. 54 (4): p. 1-7.
91. Chatterjee K., Zhang J., Honbo N., Karliner J.S. (1999). Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*. 115(2): p. 155-162.
92. Skeel R.T. (1999). *Handbook of Cancer Chemotherapy*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
93. Kenyon J. (2010). *Chemotherapy and cardiac toxicity - the lesser of two evils*. [cited 2014 10-03]; Available from: <http://www.doctorslounge.com/index.php/blogs/page/14030>.
94. Pazdur R., Wagman L.D., Camphausen K.A., Hoskins W.J. (2008). *Cancer Management: a Multidisciplinary Approach*. 11th ed.
95. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacology Review*. 56(2): p. 185-229.
96. Hobbs S.K., Monsky W.L., Yuan F., Roberts W.G., Griffith L., Torchilin V.P., Jain R.K. (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 95(8): p. 4607-4612.
97. Torchilin V.P. (2006). *Multifunctional nanocarriers*. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 58(14): p. 1532-1555.
98. Gabizon A., Catane R., Uziely B., Kaufman B., Safra T., Cohen R., Martin F., Huang A., Barenholz Y. (1994). Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Research*. 54(4): p. 987-992.
99. Hamada H., Tsuruo T. (1986). Functional role for the 170- to 180-kDa glycoprotein specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proceedings National Academy of Sciences USA*. 83(20): p. 7785-7789.
100. Sanford S., Dborshi R., Melvin S. (1993). Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Cell Biology*. 91: p. 1128-1132.
101. Klopman G., Shi L.M., Ramu A. (1997). Quantitative structure-activity relationship of multidrug resistance reversal agents. *Molecular Pharmacology*. 52(2): p. 323-334.
102. Abraham S.A., Waterhouse D.N., Mayer L.D., Cullis P.R., Madden T.D., Bally M.B. (2005). The liposomal formulation of doxorubicin. *Methods in Enzymology*. 391: p. 71-97.
103. Menozzi M., Valentini L., Vannini E., Arcamone F. (1984). Self-association of doxorubicin and related compounds in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 73(6): p. 766-770.
104. Barenholz Y., Amselem S., Goren D., Cohen R., Gelvan D., Samuni A., Golden E.B., Gabizon A. (1993). Stability of liposomal doxorubicin formulations: problems and prospects. *Medical Research Review*. 13(4): p. 449-491.
105. Nichols J.W., Deamer D.W. (1976). Catecholamine uptake and concentration by liposomes maintaining p/ gradients. *Biochimica et Biophysica Acta*. 455(1): p. 269-271.
106. Sharma A., Sharma U. (1997). Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*. 154(2): p. 123-140.
107. Szebeni J., Muggia F., Gabizon A., Barenholz Y. (2011). Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 63(12): p. 1020-1030.
108. Garbuzenko O., Barenholz Y., Prieve A. (2005). Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer. *Chemistry and Physics of Lipids*. 135(2): p. 117-129.

109. Pecora R. (2000). Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research*. 2(2): p. 123–131.
110. Malvern Instruments Lda. *Dynamic Light Scattering (DLS)* [cited 2014 11-06]; Available from: http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/default.aspx?gclid=CjwKEAjwg_afBRD3rpChlqiKt1ESJACwY6NkrCKGf-bVc3PpNSqM4439f8AJ7QhVbxypJHTpgCxt5RoCNp_w_wcB.
111. Montero M.T., Carrera I., Hernandez-Borrell J. (1994). Encapsulation of a quinolone in liposomes. Location and effect on lipid bilayers. *Journal of Microencapsulation*. 11(4): p. 423-430.
112. Schaffazick S.R., Guterres S.A. (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*. 26(5): p. 726-737.
113. New R.R.C. (1990). *Liposomes - a practical approach*. New York: Oxford University Press.
114. Mishra P.R., Al Shaal L., Muller R.H., Keck C.M. (2009). Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 371(1-2): p. 182-189.
115. Tsai D.S., Lien W. C., Lien D.H., Chen K.M., Tsai M.L., Senesky D.G., Yu Y.C., Pisano A.P., He J. H. (2013). Solar-blind photodetectors for harsh electronics. *Scientific Reports*. 3(2628): p. 1-5.
116. Okparanma R.N., Mouazen A.M. (2013). Visible and near-infrared spectroscopy analysis of a polycyclic aromatic hydrocarbon in soils. *The Scientific World Journal*. 2013: p. 1-9.
117. Sobarwiki (2013). *Schematic of UV- visible spectrophotometer*. [cited 2014 01-06]; Available from: http://pt.wikipedia.org/wiki/Espectrofot%C3%B4metro#mediaviewer/Ficheiro:Schematic_of_UV-_visible_spectrophotometer.png.
118. Lacowicz J.R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Kluwer Academic/ Plenum Press.
119. Francisco, A.M.A. *Técnica Analítica* (2008) [cited 2014 02-06]; Available from: https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/5519/6/Cap%C3%ADtulo_2.pdf.
120. Chaikin P., Rhodes G.R., Bruno R., Rohatagi S., Natarajan C. (2000), Pharmacokinetics/pharmacodynamics in drug development: an industrial perspective. *Journal of Clinical Pharmacology*. 40(12): p. 1428-1438.
121. Kerns E.H., Li D. (2008). *Drug-Like Properties: Concepts Structure, Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*. Vol. 3-15. USA: Elsevier.
122. Choi Y.W., Rogers J.A. (1990). The liposome as a model membrane in correlations of partitioning with alpha-adrenoceptor agonist activities. *Pharmaceutical Research*. 7(5): p. 508-512.
123. Pola A., Michalak K., Burliga A., Motohashi N., Kawase M. (2004). Determination of lipid bilayer/water partition coefficient of new phenothiazines using the second derivative of absorption spectra method. *European Journal Pharmacology Sciences*. 21(4): p. 421-427.
124. El-Sayed A.A., El-Salem N.A. (2005). Recent developments of derivative spectrophotometry and their analytical applications. *Analytical Sciences*. 21(6): p. 595-614.
125. Rodrigues C., Gameiro P., Reis S., Lima J.L., de Castro B. (2001). Derivative spectrophotometry as a tool for the determination of drug partition coefficients in water/dimyristoyl-L-alpha-phosphatidylglycerol (DMPG) liposomes. *Biophysical Chemistry*. 94(1-2): p. 97-106.
126. Ferreira H., Lucio M., Siquet C., Reis S. (2005). Utilização de modelos membranares na avaliação da actividade de fármacos. *Química*. 99: p. 39-51.

127. Fendler J.H. (1983). *Membrane Mimetic Chemistry*. New York: John Wiley & Sons.
128. Merino S., Vazquez J.L., Domènech O., Berlanga M, Viñas M., Montero M.T., Hernández-Borrell J. (2002). Fluoroquinolone-Biomembrane Interaction at the DPPC/PG Lipid-Bilayer Interface. *Langmuir*. 18: p. 3288-3292.
129. Engelke M., Bojarski P., Bloß R., Diehl H. (2001). Tamoxifen perturbs lipid bilayer order and permeability: comparison of DSC, fluorescence anisotropy, Laurdan generalized polarization and carboxyfluorescein leakage studies. *Biophysical Chemistry*. 90(2): p. 157-173.
130. Ghosh A.K., Basu R., Dey S., Das S., Nayak N.P., Barat B., Na P. (1995). Lipid-disordering effect of aspirin on the liposomal membrane of dipalmitoyl phosphatidyl choline - A fluorescence anisotropy study. *Colloids and Surfaces B- Biointerfaces*. 4(5): p. 309-311.
131. Vázquez J.L., Montero M.T., Merino S., Domènech À., Berlanga M., Viñas M., Hernández-Borrell J. (2001). Location and Nature of the Surface Membrane Binding Site of Ciprofloxacin: A Fluorescence Study. *Langmuir*. 17 (4): p. 1009–1014.
132. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of Natural Cancer Institute*. 82(13): p. 1107-1112.
133. Sigma-Aldrich Co. LLC (2014). *Sulforhodamine B sodium salt*. [cited 2014 28-07]; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s1402?lang=pt®ion=PT>.
134. Deschenes C., Vezina A., Beaulieu J.F., Rivard N. (2001). Role of p27(Kip1) in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology*. 120(2): p. 423-438.
135. Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolff A. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of Natural Cancer Institute*. 83(11): p. 757-766.
136. Changenet-Barret P., Gustavsson T., Markovitsi D., Manet I., Monti S. (2013). Unravelling molecular mechanisms in the fluorescence spectra of doxorubicin in aqueous solution by femtosecond fluorescence spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 15(8): p. 2937-2944.
137. Ong S., Liu H., Qiu X., Bhat G., Pidgeon C. (1995). Membrane partition coefficients chromatographically measured using immobilized artificial membrane surfaces. *Analytical Chemistry*. 67(4): p. 755-762.
138. Kawano D.F., Pereira L., Ueta J.M., de Freitas O. (2006). Acidentes com os medicamentos: como minimizá-los? *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 42(4): p. 487-495.
139. Avila C.M., Martinez F. (2003). Thermodynamics of partitioning of benzocaine in some organic solvent/buffer and liposome systems. *Chemical and Pharmaceutic Bulletin (Tokyo)*. 51(3): p. 237-240.
140. Matos C.M.S. (2001). *Interação de fármacos com lipossomas. Efeito nas propriedades físico-químicas*. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
141. Zucker D., Marcus D., Barenholz Y., Goldblum A. (2009). Liposome drugs' loading efficiency: a working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties. *Journal of Controlled Release*. 139(1): p. 73-80.
142. Patil R., Portilla-Arias J., Ding H., Konda B., Rekechenetskiy A., Inoue S., Black K.L., Holler E., Ljubimova, J.Y. (2012). Cellular Delivery of Doxorubicin via pH-Controlled Hydrazone Linkage Using Multifunctional Nano Vehicle Based on Poly(beta-L-Malic Acid). *International Journal of Molecular Sciences*. 13(9): p. 11681-11693.
143. NEUROtiker. *Equilibrium of quinone and hydroquinone*. 2014-04-02 [cited 2014 02-04]; Available from: [http:// pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Chinon_Hydrochinon.svg](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Chinon_Hydrochinon.svg).

144. Palmer M. *Lecture notes on biochemical pharmacology*. [cited 2014 04-14]; Available from: <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Pharmacology/index.html#sec405>
145. Cúpula Informática. *Novas pterocarpanoquinonas ativáveis por biorredução e sua atividade antineoplásica em células tumorais com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos*. 2014-04-14 [cited 2014-06-14]; Available from: http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/resenhas_pterocarp.html
146. Cubilla E. *Eritrodisestesia por Capecitabina: A propósito de un caso*. [cited 2014 07-13]; Available from: <http://piel-l.org/blog/11020>