

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (CCB)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS (PPGCB)**



**THIERS ARAÚJO CAMPOS**

**Desenvolvimento de nanosistemas  
contendo 17-AAG com propriedade antitumoral**

**Recife - Pernambuco**

**2016**

**THIERS ARAÚJO CAMPOS**

**Desenvolvimento de nanosistemas  
contendo 17-AAG com propriedade antitumoral**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. GIOVANNA MACHADO

Co-Orientadora: Profa. Dra. JANAINA VIANA DE MELO

**Recife - Pernambuco**

**2016**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Campos, Thiers Araújo**

**Desenvolvimento de nanosistemas contendo 17-AAG com propriedade antitumoral/ Thiers Araújo Campos– Recife: O Autor, 2016.**

**142 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Giovanna Machado**

**Coorientadora: Janaina Viana de Melo**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2016.**

**Inclui referências**

1. Nanotecnologia 2. Câncer 3. Proteínas I. Machado, Giovanna (orientadora) II. Melo, Janaina Viana de (coorientadora) III. Título

**620.5**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2016-219**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: CAMPOS, THIERS ARAÚJO

Título: Desenvolvimento de nanossistemas contendo 17-AAG com propriedade antitumoral

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em:17/02/2016

### Banca Examinadora

---

Dra. Giovanna Machado (Orientadora) – CETENE

---

Prof. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia – UFPE

---

Dra. Janaína Viana de Melo - CETENE

---

Dra. Noemia Pereira da Silva Santos – UFPE

---

Dra. Karina Lidianne Alcântara Saraiva – CPqAM

“O homem é do tamanho do seu sonho”

Fernando Pessoa

Dedico,

Aos meus pais, Albiratan e Tânia Campos, exemplo maior de amor não há.

Aos meus colegas que lutam diariamente contra o câncer.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar quando a dúvida me saltou e encorajar quando o cansaço me abateu.

Aos meus pais, Tânia e Albiratan Campos, irmãos, Tihany e Thyalles, sobrinhos, Tiffany e Thomas, pela compreensão e paciência nos momentos de ausência, nos dias difíceis durante esta trajetória.

À Dra. Giovanna Machado, por acreditar e confiar no meu trabalho, além dos seus ensinamentos que me nortearam para um caminho mais proveitoso e de sucesso.

À Dra. Janaina Melo, por ter me acolhido em sua equipe, por sua enorme paciência e pela liberdade de pensamento permitindo o elo no mundo científico.

À Dra. Patrícia Veras e Dr. Antônio Petersen, ambos pesquisadores do Centro de Pesquisa Gonzales Muniz (CPqGM/Bahia) por permitir a realização deste trabalho, com suas contribuições e colaborações prestadas.

À Profa. Dra. Noemia Santos, por todo tempo está ao meu lado durante os quatro anos de doutorado, pelo suporte através da ética e ciência.

À Camilla Silva e Rebecca Torelli pela amizade e o enorme apoio nos momentos difíceis da vida.

Às minhas parceiras de bancada e de descontração, Alessandra Mattos e Juliana Silva, pela dedicação prestada neste trabalho e nas boas risadas da vida.

Ao meu amigo Bernardo, pelo estímulo ao crescimento e nos últimos meses por ser um grande companheiro quando precisei.

Aos membros da banca examinadora, por suas contribuições para o enriquecimento da pesquisa.

À todos do CETENE pela dedicação, amizade, apoio e a enorme colaboração prestada a este trabalho.

Aos colegas da Microscopia do CETENE, pela saudável convivência em laboratório e contribuições fundamentais para o progresso deste estudo,

Keyce, Dyego, Fábria, Gaby, Ceça, Rebecca, Deyvid, Nataly, Josiane, Renata, Johan, Paulo e Nininha.

A todos os amigos que fazem o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB).

Ao Centro Acadêmico de Vitória pela utilização de suas instalações, como o laboratório Nanobiocell e o biotério.

Aos colegas do CAV/UFPE, Marllyn e Sandrelly pela amizade e colaboração nos estudos *in vitro* e *in vivo*.

A CNPq, pelo suporte financeiro para realização desta pesquisa.

A todos os outros colegas e amigos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

CAMPOS, Thiers Araújo. Desenvolvimento de um nanossistema contendo 17-AAG com propriedade antitumoral. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas, Recife, 2016.

## RESUMO

O 17-N-alil-amino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG) é um inibidor da proteína chaperona Hsp90 e tem sido estudado extensivamente como um agente anticancerígeno. O seu uso terapêutico ainda é limitado devido a sua baixa hidrofiliabilidade e toxicidade. Diante disso, o estudo tem como objetivo principal desenvolver um nanossistema contendo 17-AAG e verificar a sua ação antiproliferativa com efeitos tóxicos reduzidos. Primeiro, foram desenvolvidos lipossomas catiônicos contendo 17-AAG avaliando sua ação através de análises *in vitro* (viabilidade celular para linhagem de células Hela, MCF-7, J774 e Sarcoma 180) e *in vivo* (atividade antitumoral utilizando o tumor de Ehrlich). No segundo momento, foram preparados complexos de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD) obtidos por liofilização e caracterizados físico-quimicamente. Por último, os lipossomas contendo complexo de inclusão do 17-AAG foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e submetidos a análise de citotoxicidade frente as células Hela e MCF-7. Os lipossomas catiônicos desenvolvidos apresentaram monodispersos e com tamanho inferior a 200 nm. O 17-AAG na bicamada dos lipossomas influenciou apenas na diminuição do potencial zeta passando de +21,13 para +11,43 mV. O tratamento nas três células de câncer com estes lipossomas contendo o 17-AAG e nas diferentes concentrações estudadas, demonstraram percentuais maiores de inibição em relação ao composto livre. Já os lipossomas branco não foram tóxicos frente as células sadias como macrófagos (J774). Nos estudos *in vivo* foi verificado que não houve diferença estatística quanto ao volume do tumoral, peso dos animais, peso do tumor, peso dos órgãos e índice mitótico. No entanto, alterações foram visíveis na histomorfologia do baço, fígado e rins. Os complexos de inclusão obtidos demonstraram a integridade do 17-AAG identificado através do teor ( $99 \pm 0.79\%$ ). O diagrama de solubilidade de fases de 17-AAG:HP $\beta$ CD apresentou uma curva do tipo A<sub>L</sub>, com  $K_{1:1} = 5,3$

M<sup>-1</sup>. Na presença de 1000 mM de HPβCD, a solubilidade do 17-AAG aumentou 39 vezes. O complexo de inclusão 17-AAG:HPβCD apresentou modificações no IV, difração de raios-X, microscopia e DSC e TG, sugerindo a formação do complexo de inclusão. A citotoxicidade frente a células saudáveis (J774) evidenciaram que o complexo de inclusão apresentou efeitos inibitórios similares ao composto livre em concentrações <10 μM. Após o processo de preparação, os lipossomas contendo complexo de inclusão apresentaram diâmetro médio variando entre 142 e 157 nm, e o índice de polidispersão não superior a 0,37. As formulações mantiveram-se estáveis após 30 dias quando armazenadas a 4°C. Os resultados apresentaram, que não há diferença significativa nas formas de encapsular o 17-AAG nos lipossomas, revelando uma EE% de 99% para ambos tipos. Os lipossomas desenvolvidos neste estudo, obtiveram uma carga positiva e sua morfologia microscópica confirma o tamanho e o tipo de lipossomas preparados. Nos estudos de citotoxicidade a ação inibitória do LP-17-AAG e o LP-17-AAG:HPβCD demonstraram-se mais eficientes comparado ao fármaco livre. Estes resultados demonstram que a complexação do 17-AAG a ciclodextrina, e sua incorporação em lipossomas, proporcionou uma melhoria na estabilidade e hidrossolubilidade do composto, viabilizando, portanto, seu uso terapêutico.

**Palavras-chave:** 17-AAG; 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina; lipossomas.

## **ABSTRACT**

The 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) is an inhibitor of Hsp90 chaperone protein and has been extensively studied as an anticancer agent. The therapeutic use is still limited due to its low hydrophilicity and hepatotoxicity. Thus, the study aims to develop a nanossistema containing 17-AAG and check their antiproliferative action with reduced toxicity. First, cationic liposomes containing 17-AAG were developed evaluating their action through in vitro tests (cell viability for line of Hela cells, MCF-7, J774 and Sarcoma 180) and in vivo (antitumoral activity using the Ehrlich tumor). In the second phase, they were prepared inclusion complexes (17-AAG: HP $\beta$ CD) obtained by lyophilization and physico-chemically characterized. Finally, liposomes containing the inclusion complex of 17-AAG were prepared by lipid film hydration method and subjected forward cytotoxicity assay Hela and MCF-7 cells. Developed cationic liposomes showed monodisperse and smaller than 200 nm. The 17-AAG in the bilayer of the liposomes only influenced the decrease in zeta potential of passing +21.13 +11 to 43 mV. The treatment in all three cancer cells with these liposomes containing 17-AAG and different concentrations studied showed greater percentage inhibition compared to the free compound. Already the white liposomes were no toxicity in healthy cells such as macrophages (J774). In vivo studies it was found that there was no statistical difference in the volume of tumor, animal weight, tumor weight, organ weight and mitotic index. However, changes were visible on histomorphology of spleen, liver and kidneys. The solubility phase diagram of 17-AAG: HP $\beta$ CD showed a curved-type LA,  $K_{1:1} = 5.3 \text{ m}^{-1}$ . In the presence of HP $\beta$ CD 1000 mm, the solubility of 17-AAG increased 39 times. The inclusion complex of 17-AAG: HP $\beta$ CD presented modifications IR, X-ray diffraction, microscopy and DSC and TG, suggesting the formation of the inclusion complex. After the manufacturing process, liposome proved to be homogeneous with a mean diameter ranging between 142 and 157 nm and a polydispersity not exceeding 0.37. The front cytotoxic to healthy cells (J774) showed that the inclusion complex showed similar inhibitory effects to the free compound in concentrations of <10  $\mu\text{M}$ . After the process of preparation of the inclusion complex containing liposomes had

an average diameter between 142 and 157 nm and the polydispersion index not greater than 0.37. The formulations were stable after 30 days when stored at 4 ° C. The results showed that there is no significant difference in the ways of encapsulating 17-AAG in liposomes, revealing an EE% 99% for both types. The Liposomes developed in this study obtained a positive charge and their microscopic morphology confirms the size and type of liposomes. In cytotoxicity studies the inhibitory action of the LP-17-AAG and the LP-17-AAG: HP $\beta$ CD proved to be more efficient compared to the free drug. These results demonstrate that the complexation of cyclodextrin 17-AAG, and their incorporation into liposome gave an improvement in stability and water solubility of the compound, allowing therefore their therapeutic use.

**Keywords:** 17-AAG; 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin; liposome.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1. | Esquema do processo de metástase   | 27 |
| Figura 2. | Estrutura química de uma ciclodextrina (A) e desenho esquemático (B) ilustrando a cavidade hidrofóbica, a posição das hidroxilas primárias e secundárias e suas dimensões: altura (H), diâmetro interno (DI) e diâmetro externo (DE) (adaptado de BREWSTER; LOFTSSON, 2007). | 38 |
| Figura 3. | Diagrama de solubilidade de fases mostrando os tipos e subtipos de curvas A ( $A_L$ , $A_P$ e $A_N$ ) e B ( $B_S$ e $B_I$ ).   | 45 |
| Figura 4. | Esquema de formação dos lipossomas: estrutura do fosfolipídio, da bicamada lipídica e do lipossoma.  | 49 |
| Figura 5. | Ilustração esquemática dos diferentes tipos de lipossomas quanto ao tamanho. SUV- Pequenas Vesículas Unilamelares, LUV- Grandes Vesículas Unilamelares, MLV- Grandes Vesículas Multilamelares, MVV- Grandes Vesículas Multivesiculares.                                      | 52 |
| Figura 6. | Ilustração esquemática dos tipos de lipossomas quanto à sua composição. <b>A-</b> Lipossomas convencionais. <b>B-</b> Lipossomas furtivos. <b>C-</b> Lipossomas polimórficos. <b>D-</b> Lipossomas sítio-específicos.  | 53 |

### CAPÍTULO IV

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1. | Avaliação da citotoxicidade do 17-AAG livre e encapsulado nos lipossomas frente às células de câncer como: A- cervical Humano (Hela), B- adenocarcinoma Mamário Humano (MCF-7), C- células do sarcoma 180 (S-180), D e E macrófagos (J774). Os grupos foram tratados no período de 48 h, exceto os macrófagos que foram tratados também por 24 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando a média dos valores e seu desvio padrão.  | 75 |
| Figura 2. | A-Volume tumoral em função dos grupos tratados com o 17-AAG livre, LP-17-AAG e não tratados (controle); B- Avaliação do peso dos animais, * Encontrado diferença estatística ( $p < 0,05$ ); C- Avaliação do peso do tumor; D- Análise do peso dos órgãos (baço, fígado e rins); E- Avaliação do número de mitoses no tecido tumoral.  | 77 |
| Figura 3. | Fotomicrografias do fígado dos camundongos Swiss com tumor de Erlich. Grupo Controle (A) – Hepatócitos com binúcleos (→), espaços sinusóides (▶) e a presença de eritrócitos (*); Grupo de animais que recebeu o tratamento do 17-AAG(B, C e D) – Aumento dos espaços sinusóides (B), esteatose hepática (C) e a aderência das células de Erlich no epitélio do fígado (D); Grupo de animais que recebeu o tratamento dos Lipossomas contendo o 17-AAG (E e F) – Células de Kupffer (E) e infiltrado inflamatório (F). Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x400. | 80 |
| Figura 4. | Fotomicrografias do baço e rins dos camundongos Swiss com tumor de Erlich. Baço (A, B e C) – Folículos nodulares (→) na presença de polpa branca (*) e vermelha (▶); Rins (D, E, F, G, H e I) – Glomérulos renais(→) com espaço capsular (*) e congestão vascular (▶). Grupo Controle (A, D e G), Grupo de animais que recebeu o tratamento do 17-AAG (B, E e H); Grupo de animais que recebeu o tratamento dos Lipossomas contendo o 17-AAG (C, F e I); Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x100  | 81 |

(A-F) e x400(G-I).

**CAPÍTULO V**

|            |   |     |
|------------|---|-----|
| Figura 1.  | Espectro de varredura de diferentes concentrações do 17-AAG em metanol ( $\lambda_{\text{máx}}$ 333 nm).  | 94  |
| Figura 2.  | Curva de calibração construída com diferentes concentrações do 17-AAG (1.0 a 9.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ao $\lambda_{\text{máx}}= 333$ nm.   | 95  |
| Figura 3.  | Diagrama de solubilidade de fases do 17-AAG em função da concentração de HP $\beta$ -CD em água a 25 °C.  | 96  |
| Figura 4.  | Imagem da solubilidade em água do 17-AAG na presença da ciclodextrina (HP $\beta$ CD) preparada pela técnica freeze-dried. (a) 17-alilamino-17-demetoígeldanamicina (17-AAG) e (b) complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD).             | 97  |
| Figura 5.  | Espectros de infravermelho para o 17-alilamino-17-demetoígeldanamicina (17-AAG), 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD), complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD), e mistura física (MF).                              | 98  |
| Figura 6.  | Padrões de difração de raios -x para, (a) 17-alilamino-17-demetoígeldanamicina (17-AAG), (b) (HP $\beta$ CD), (c) complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD), e (d) mistura física (MF).   | 99  |
| Figura 7.  | Varredura Diferencial Calorimétrica (DSC) para (a) 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD), (b) 17-alilamino-17-demetoígeldanamicina (17-AAG), (c) complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD), e (d) mistura física (MF). | 101 |
| Figura 8.  | Curvas termogravimétricas para (a) 17-alilamino-17-demetoígeldanamicina (17-AAG), (b) 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD), (c) complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD), e (d) mistura física (MF).                 | 102 |
| Figura 9.  | Microscopia eletrônica de varredura do 17-AAG (A); da HP $\beta$ CD (B); do complexo de inclusão (C) e a mistura física (D).  | 103 |
| Figura 10. | Viabilidade celular das células J774 tratadas com 17-alilamino-17-demetoígeldanamicina (17-AAG) e complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD) num período de 24h (A) e 48h (B)..  | 104 |

**CAPÍTULO VI**

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Figura 1. | Fotomicrografias dos lipossomas contendo STE coradas com ácido fosfotungstíco (1%); (A) LP- 17-AAG; (B) LP-17-AAG:HP $\beta$ CD. As imagens foram analisadas por microscópio eletrônico de varredura.   | 123 |
| Figura 2. | Avaliação da citotoxicidade do 17-AAG livre e complexado (17-AAG:HP $\beta$ CD) nos lipossomas frente às células de câncer como: A e C- cervical Humano (Hela) , B e D- adenocarcinoma mamário humano (MCF-7). Os grupos foram tratados e analisados na concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ (A e B) e 0,39 $\mu\text{g/mL}$ (C e D) por 24, 48 e 72h. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando a média dos valores e seu desvio padrão. | 125 |

## LISTA DE TABELAS

### ***CAPÍTULO II***

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Tabela 1. | Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas. | 39 |
|-----------|--|----|

### ***CAPÍTULO IV***

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Tabela 1. | Caracterização dos lipossomas brancos e contendo o 17-AAG encapsulado.          | 72 |
| Tabela 2. | Valores da concentração inibitória (IC <sub>50</sub> ) para 17-AAG e LP-17-AAG. | 74 |

### ***CAPÍTULO VI***

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Tabela 1. | Estudo de estabilidade acelerada dos lipossomas branco, contendo o 17-AAG e contendo o complexo de inclusão (17-AAG:HPβCD).     | 119 |
| Tabela 2. | Estudo de estabilidade a longo prazo dos lipossomas branco, contendo o 17-AAG e contendo o complexo de inclusão (17-AAG:HPβCD). | 119 |
| Tabela 3. | Caracterização dos lipossomas: Teor (%), percentual de eficiência de Encapsulação (EE%) e potencial zeta.                       | 122 |
| Tabela 4. | Valores da concentração inibitória (IC <sub>50</sub> ) para 17-AAG, 17-AAG:HPβCD, LP-17-AAG e LP-17-AAG:HPβCD                   | 127 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                   |  |
|-------------------|--|
| µg                | Micrograma   |
| µL                | Microlitro   |
| µM                | Micromolar   |
| µm                | Micrômetro   |
| A/O               | Água/óleo  |
| A/O/A ou W/O/W    | Água/óleo/água   |
| BSA               | Albumina de soro bovino  |
| CDs               | Ciclodextrinas   |
| CGTase            | Ciclodextrina-glicosil-transferase   |
| D.P.              | Desvio padrão  |
| DL <sub>50</sub>  | Dose letal que pode causar a morte de 50% de uma dada população de organismos                                    |
| DMEM              | Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco   |
| DMSO              | Dimetilsulfóxido   |
| DMSO-d6           | Dimetilsulfóxido deuterado   |
| DNA               | Ácido desoxirribonucleico  |
| DSC               | Calorimetria térmica diferencial   |
| d <sub>v</sub>    | Diâmetro volumétrico médio   |
| G                 | Gramas   |
| H                 | Hora   |
| HPβCD             | 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina  |
| i.p.              | Intraperitoneal  |
| i.v.              | Intravenoso  |
| IC <sub>50</sub>  | Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular   |
| IV ou IR          | Infravermelho  |
| KBr               | Brometo de potássio  |
| Kg                | Quilograma   |
| MEV               | Microscopia eletrônica de varredura  |
| MF                | Mistura física   |
| MG                | Miligrama  |
| MIC               | Concentração inibitória mínima   |
| Lipo-17-AAG       | Lipossomas contendo 17-Alilamino-17-Demetoxigeldanamicina  |
| Lipo-17-AAG:HPβCD | Lipossomas contendo complexos de inclusão 17-Alilamino-17-Demetoxigeldanamicina:2 -hidroxipropil-β-ciclodextrina |

|   |  |            |      |
|---|--|------------|------|
| Min   | Minuto   |            |      |
| mL  | Mililitro  |            |      |
| mM  | Milimolar  |            |      |
| Mm  | Milímetro  |            |      |
| mV  | Milivolt   |            |      |
| m/v   | Massa/volume   |            |      |
| PGA   | Poliácido glicólico  |            |      |
| PLA   | Poliácido láctico  |            |      |
| PLGA  | Copolímero de ácido láctico e glicólico                                |            |      |
| RMN <sup>1</sup> H ou<br><sup>1</sup> H RMN | Ressonância magnética nuclear de prótons                               |            |      |
| RNA   | Ácido ribonucleico   |            |      |
| RPM   | Rotações por minuto  |            |      |
| S   | Segundo  |            |      |
| t <sub>1/2</sub>                            | Tempo de meia-vida   |            |      |
| UV  | Ultravioleta   |            |      |
| αCD   | α-ciclodextrina  |            |      |
| βCD   | β-ciclodextrina  |            |      |
| Γcd   | γ-ciclodextrina  |            |      |
| 17-AAG                                      | 17-Alilamino-17-Demetoxigeldanamicina                                  |            |      |
| 17-AAG:HPβCD                                | 17-Alilamino-17-Demetoxigeldanamicina<br>hidroxipropil-β-ciclodextrina | complexado | a 2- |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|    |                     |
|----|---------------------|
| %  | Por cento           |
| ±  | Mais/menos          |
| °C | Graus Celsius       |
| Δ  | Letra grega Delta   |
| Ε  | Letra grega Épsilon |
| Z  | Letra grega Zeta    |
| <  | Menor que           |
| Θ  | Teta                |
| Å  | Angstron            |

## SUMÁRIO

|                              |      |
|------------------------------|------|
| <b>RESUMO</b>                | I    |
| <b>ABSTRACT</b>              | II   |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>      | III  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>      | V    |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> | VI   |
| <b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>     | VIII |

### ***CAPÍTULO I***

|                      |    |
|----------------------|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> | 23 |
|----------------------|----|

### ***CAPÍTULO II***

|   |    |
|---|----|
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                         | 26 |
| <b>2.1 Câncer</b>                                       | 26 |
| <b>2.2 Tratamento do Câncer</b>                         | 29 |
| <b>2.3 Proteína chaperona</b>                           | 31 |
| 2.3.1 Proteína Hsp90                                    | 32 |
| <b>2.4 Geldanamicina</b>                                | 34 |
| 2.4.1 Tanespimicyn (17-AAG)                             | 35 |
| <b>2.5 Ciclodextrina</b>                                | 37 |
| 2.5.1 $\beta$ -Ciclodextrinas                           | 39 |
| 2.5.2 Aplicações das ciclodextrinas na indústria        | 41 |
| <b>2.6 Complexo de inclusão</b>                         | 42 |
| 2.6.1 Métodos de preparação de complexo de inclusão     | 43 |
| 2.6.2 Métodos de caracterização do complexo de inclusão | 44 |
| <b>2.7 Nanotecnologia</b>                               | 47 |
| 2.7.1 Sistemas de liberação controlada                  | 47 |
| 2.7.2 Lipossomas  | 49 |
| 2.7.2.1 Composição química e tamanho dos lipossomas     | 50 |
| 2.7.2.2 Classificação dos lipossomas                    | 52 |

|  |            |
|--|------------|
| 2.7.2.3 Métodos de preparação dos lipossomas   | 55         |
| 2.7.2.4 Métodos de caracterização dos lipossomas   | 56         |
| 2.7.2.5 Aplicabilidade dos lipossomas para o câncer  | 57         |
| <b>2.7.3 Nanossistemas e 17-AAG</b>  | <b>58</b>  |
| <br>   |            |
| <b><i>CAPÍTULO III</i></b>   |            |
| <br>   |            |
| <b>3. OBJETIVOS</b>  | <b>44</b>  |
| 3.1 Objetivo Geral   | 44         |
| 3.2 Objetivos Específicos  | 44         |
| <br>   |            |
| <b><i>CAPÍTULO IV</i></b>  |            |
| <br>   |            |
| <b>4. ARTIGO:</b> Aumento do potencial antiproliferativo e antitumoral do 17-AAG encapsulado em lipossomas                                       | <b>62</b>  |
| <br>   |            |
| <b><i>CAPÍTULO V</i></b>   |            |
| <br>   |            |
| <b>5. ARTIGO:</b> Complexo de inclusão contendo 17-AAG:2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina: Desenvolvimento, caracterização e citotoxicidade | <b>87</b>  |
| <br>   |            |
| <b><i>CAPÍTULO VI</i></b>  |            |
| <br>   |            |
| <b>6. ARTIGO:</b> Desenvolvimento de lipossomas contendo complexo de inclusão 17-AAG:HP $\beta$ CD   | <b>110</b> |
| <br>   |            |
| <b><i>CAPÍTULO VII</i></b>   |            |
| <br>   |            |
| <b>7. CONCLUSÃO GERAL</b>  | <b>132</b> |
| <br>   |            |
| <b><i>CAPÍTULO VIII</i></b>  |            |
| <br>   |            |
| <b>8. REFERÊNCIAS</b>  | <b>134</b> |

## ***CAPÍTULO I***

## **1. INTRODUÇÃO**

A proteína de choque térmico 90 (Hsp90) é uma proteína chaperona de 90 kDa, que facilita a resposta celular ao stress através da regulação da dobragem e atividade de muitas proteínas clientes, que incluem as proteínas de estimulação de crescimento celular envolvidos na transformação maligna de vários cânceres (L. NECKERS, J.B. TREPEL., 2014; TRENDOWSKI, M., 2015). O 17-N-alilamino-17-demetoxigeldanamina (tanespimycin, 17-AAG) tem sido investigado como inibidor da Hsp90. Com base nos resultados pré-clínicos promissores, o 17-AAG também está sendo testado clinicamente na quimioterapia convencional ou em combinação com outros tratamentos (PORTER, J. R.; FRITZ, C. C.; DEPEW, K. M., 2010).

Embora o índice terapêutico para tanespimycin seja excelente, a sua toxicidade (gastrointestinal e hepática) limita seu uso terapêutico para o tratamento do câncer. Devido a sua pobre solubilidade, a administração do 17-AAG não é fácil, principalmente por requerer o uso de excipientes orgânicos e esses por sua vez também são tóxicos (RICHARDSON, P. G. et al., 2010; HO, N. et al., 2012). Portanto, uma formulação melhorada para 17-AAG é necessário para eliminar o uso de excipientes orgânicos tóxicos, bem como permitir uma melhor administração de fármaco ao tecido tumoral com hepatotoxicidade aliviada. Diante dessa informação, uma rota alternativa é a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas.

As ciclodextrinas (CDs) são veículos de fármacos, formados por oligossacarídeos cíclicos unidas por ligações  $\alpha$  (1-4), que tendem a formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas hóspedes. A 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) é um derivado sintético da ciclodextrina natural  $\beta$ -ciclodextrina, bastante utilizada por apresentar alta solubilidade e baixa toxicidade (KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013; MURA, P., 2014). Mesmo com muitas vantagens apresentadas na formação dos complexos de inclusão, ainda não é suficiente para promover uma liberação controlada do 17-AAG.

Ao longo dos últimos 10 anos, mais de 25.000 publicações têm centrado nos sistemas de liberação controlada de drogas, (Drug Delivery Systems) utilizando nanossistemas. E o câncer, na face do tratamento encontra-se

dentre as linhas pesquisas mais estudadas sobre sistemas de liberação controlada por proporcionar vantagens claras nos estudos pré-clínicos e clínicos (ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S., 2014).

Considerados biocompatíveis e não imunogênicos, os lipossomas são nanovesículas esféricas que têm sido utilizados como modelos de membranas artificiais e como transportadores antitumorais *in vivo* (GHARIB, R. et al., 2015). Assim, com a redução da toxicidade do fármaco mantendo o excelente efeito antitumoral, os lipossomas oferecem uma excelente oportunidade para complexo de inclusão 17-AAG:HP $\beta$ CD otimizando os parâmetros farmacocinéticos e os efeitos farmacológicos (ANWEKAR, H., PATEL, S., SINGHAI, A. K., 2011).

## ***CAPÍTULO II***

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Câncer**

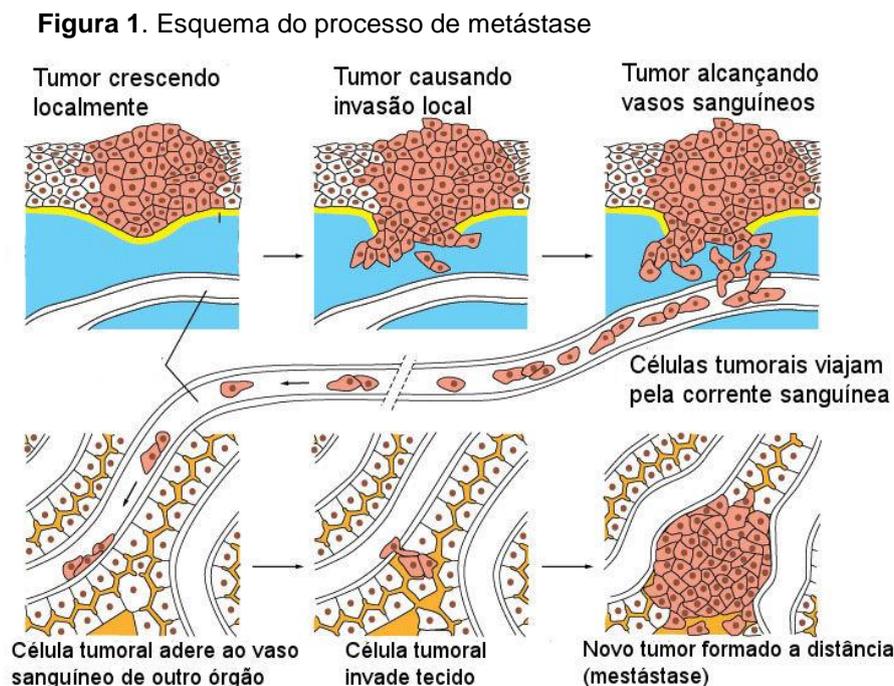
Dados da Organização Mundial de Saúde advertem que o câncer lidera as causas de morte no mundo. Em 2005, o câncer foi responsável por 7,6 milhões de mortes e, em 2007, por 7,9 milhões. Nos próximos 20 anos, haverá um aumento de 46,8% de incidência da doença. Os cinco tipos de câncer que mais matam as pessoas são câncer de pulmão (1,3 milhões de mortes por ano), estômago (1 milhão), fígado (662.000), cólon (655.000) e mama (502.000). Porém, os tipos mais incidentes, conforme os últimos anos são os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino (INCA, 2015; WHO, 2015)

O câncer é o nome dado ao conjunto de mais de 100 doenças que em comum têm o crescimento desordenado de células. Pode ser descrito também como uma rede complexa de fenômenos de multiplicação e diferenciação celular sujeitas a diferentes sistemas de controle exercidos por proteínas sintetizadas a partir de informações genéticas contidas no DNA. Essas proteínas atuam em harmonia na regulação do ciclo celular, a homeostase, que recebe influências de agentes internos e externos das células sob o controle de um sistema integrado e complexo, mantendo a população celular dentro de limites fisiológicos. Porém, alterações nesse sistema regulatório resultam em distúrbios do crescimento e da diferenciação de células ou de ambos ao mesmo tempo, que tendem as células a serem agressivas, incontroláveis e invasivas, chamadas também de neoplasias (BRASILEIRO-FILHO et al., 2012; INCA, 2015).

As neoplasias é o resultado de mutações cumulativas que alteram pontos específicos do DNA de uma célula, mudando as proteínas específicas decodificadas por genes relacionados à doença naqueles locais. As mutações afetam dois tipos de genes: os genes supressores de tumor, que são inativados nas células tumorais, pois possuem a habilidade de limitar a divisão celular; e os oncogenes que estimulam o crescimento ou divisão celular mantendo-se em estado ativo (GIBBS, 2003).

Outros fatores possuem um importante papel na etiologia do câncer e, dentre os principais, destacam-se os carcinógenos químicos e físicos, agentes infecciosos e o estilo de vida do indivíduo. Além disso, fatores endógenos relacionados com o sistema de reparo a danos do DNA e o sistema de detoxificação e eliminação de carcinógeno também influenciam a carcinogênese. Todos esses fatores atuam desencadeando alterações no DNA da célula que culminam na transformação de uma célula normal em uma célula cancerosa (ALMEIDA et al.,2010).

As células cancerosas são conceituadas por invadir e colonizar tecidos e órgãos. Essa proliferação fora de controle irá originar um tumor ou neoplasma, ou seja, um crescimento de uma massa de células anormais. À medida que as células neoplásicas permanecem agrupadas numa massa única, o tumor é dito benigno. A cura completa pode ser obtida pela remoção da massa cirurgicamente. Um tumor maligno é considerado como câncer quando as células tiverem o poder de invadir tecidos vizinhos. A capacidade de invasão geralmente implica na habilidade de escapar, entrar na corrente sanguínea ou vasos linfáticos e formar tumores secundários ou metástases em outros locais do corpo (Figura 1). Quanto mais metástases um câncer for capaz de produzir, mais difícil a sua erradicação (ALBERTS, 1997; INCA, 2015).



**Fonte:** [http://eltondacostabiologia.blogspot.com.br/2011\\_04\\_01\\_archive.html](http://eltondacostabiologia.blogspot.com.br/2011_04_01_archive.html)

Do ponto de vista clínico e comportamental, as neoplasias benignas caracterizam-se pela presença de células bem diferenciadas, com atipias celulares e arquiteturas discretas assemelhando ao tecido original, baixo índice mitótico, crescimento lento e expansivo. O tumor é bem delimitado e geralmente não reaparece após cirurgia. Por outro lado, o neoplasma maligno, também denominado anaplasia, são células que não possuem diferenciação celular, por várias alterações morfológicas e funcionais como pleomorfismo (variação de tamanho e forma tanto das células como dos núcleos) e alterações na expressão gênica com tendências à síntese de isoformas das enzimas predominantes na fase embrionária. Estas células captam aminoácidos com maior velocidade do que as células normais, são mais resistentes a hipóxia, têm menor adesão entre si e motilidade considerável, o que geralmente origina a metástase (BRASILEIRO-FILHO et al., 2012; INCA, 2015).

A penetração das células cancerosas nos vasos sangüíneos durante a invasão e extravasamento é o ponto crucial na metástase. Estudos demonstraram que essa invasão do tumor através da penetração da membrana vascular basal, requer participação ativa de enzimas hidrolíticas, destruidoras de tecidos, acarretando oclusão de vasos linfáticos e sanguíneos, como hidrolases lisossomais, colagenases, serino-protease e ativador de plasminogênio (ROUDIER, 2003; TANAKA, 2003; BRASILEIRO-FILHO et al., 2012).

A metastatização de células tumorais pode ocorrer através da disseminação linfática e hematogênica. A disseminação linfática é realizada pelo transporte em vasos linfáticos, sendo o passo comum para os carcinomas (câncer originado em tecidos epiteliais como mucosas ou pele), mas também podem se disseminar por outra via, os sarcomas (câncer com início em tecido conjuntivo). Durante a invasão da célula neoplásica, a presença do tumor pode estimular a produção e liberação de células imunocomponentes do sistema linforreticular. Os nódulos linfáticos podem ser uma barreira temporária efetiva para disseminação do tumor, todavia, as células tumorais passam rapidamente pelos nódulos linfáticos e entram no sistema linfático e circulação sanguínea. Na disseminação hematológica o fígado e os pulmões são mais

frequentemente afetados de forma secundária, pois toda drenagem da área portal flui para o fígado e todo o sangue flui para os pulmões através da veia cava (COTRAN, 2000; BRAUN, C.A.; ANDERSON, C.M, 2009; BRASILEIRO-FILHO et al., 2012).

Outro processo que está envolvido no crescimento de tumor e metástase é chamado de angiogênese, caracterizado pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos. Esse crescimento de tumores sólidos e metástase são dependentes da angiogênese do tumor, pois as células metastáticas liberam fatores de crescimento de forma direta, através das próprias células do tumor e de forma indireta, via recrutamento de outras células como macrófagos e células endoteliais (IGURA, 2001; KUMAR, V. et al., 2008; BRASILEIRO-FILHO et al., 2012).

Muitas pesquisas têm sido realizadas com o propósito de elucidar e compreender os processos de metástases secundárias a um tumor primário. A compreensão dos mecanismos moleculares da formação de metástase poderia, eventualmente, permitir um esquema de tratamento para inibir o tumor. Dessa forma, a pesquisa científica em Oncologia Clínica e/ou experimental assume papel cada vez mais relevante, desenvolvendo novas formas de tratamento, bem como novas substâncias potencialmente eficazes contra as neoplasias.

## **2.2 Tratamento do Câncer**

O desenvolvimento tumoral acontece via um processo formalmente análogo à evolução Darwiniana, as células do tumor acabam por induzir a tolerância imunológica através de diversos mecanismos, impedindo o sistema imunológico de produzir uma resposta imune eficaz (SOUZA, A. W. S. et al., 2010). Portanto, durante as últimas décadas, as principais abordagens terapêuticas empregadas no tratamento de diversos tipos de câncer na tentativa de erradicar incluem processos cirúrgicos, terapia radioativa, quimioterapia e terapia biológica (imunoterapia, hormonal e terapia gênica). A aplicação isolada ou a associação de tais modalidades tem maximizado a

chance de cura ou o controle da doença (ALMEIDA et al., 2005; ZAMARIN, D. et al., 2014).

A cirurgia, antes do advento da quimioterapia e da radioterapia, era a única possibilidade de tratamento do câncer. Naquela época, acreditava-se que uma neoplasia maligna era um problema exclusivamente local e, portanto, a cura poderia ser alcançada a partir de procedimentos cirúrgicos. Atualmente, a cirurgia é considerada a forma mais eficaz de tratamento, quando o tumor está em estágio inicial e não apresenta metástase (ALMEIDA et al., 2005; KUMAR, V., et al., 2008).

A técnica de radioterapia, empregada clinicamente em grande escala em todo o mundo, desde a década de 70, tem como principais alvos os tumores sólidos não metastizados e é frequentemente combinada com a cirurgia para aumentar a eficiência do tratamento. Entretanto, devido às suas próprias características, esta técnica atua de modo indiscriminado nos diferentes tecidos, destruindo tanto células tumorais quanto células saudáveis. Dados demonstraram que em aproximadamente dois terços dos pacientes, as neoplasias se caracterizam por micrometástases, necessitando de uma terapia sistêmica. Neste contexto, o emprego da radiação ionizante, em procedimentos terapêuticos, deve ser direcionado principalmente às células tumorais, minimizando as doses de radiação em tecidos saudáveis (WILT, T. et al., 2008; SCHERPENHUIZEN, A. et al 2015).

Introduzida na medicina há cinquenta anos, a quimioterapia refere-se à administração de drogas citotóxicas, capazes de promover morte celular ou pelo menos inibir o crescimento celular. A sua primeira utilização foi em 1940, baseada na experiência de um paciente com linfoma, sob os efeitos do gás mostarda no sistema linfático, marcando o início da quimioterapia a tumores malignos (DATTA, N. R. et al. 2015). O tratamento quimioterápico tem como objetivo, erradicar o tumor ou reduzir seu crescimento, diminuindo dessa forma os sintomas relacionados ao câncer, promovendo a cura ou prolongando a vida do paciente (BRASILEIRO-FILHO et al., 2012; DATTA, N. R. et al. 2015).

Uma grande limitação da quimioterapia no tratamento do câncer são os seus efeitos colaterais. A ação antitumoral de fármacos antineoplásicos

produzem efeitos tóxicos não só especificamente contra células cancerígenas, como células hematopoiéticas, células epiteliais intestinais e queratinócitos da matriz capilar, o que explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções (ALMEIDA et al, 2005; BRASILEIRO-FILHO et al., 2012). O corpo recupera-se destes inconvenientes após o tratamento, e o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável (KUMAR, V. et al., 2008).

Outra importante limitação da quimioterapia é a resistência específica de alguns tumores a determinados medicamentos aliada ao problema da resistência a múltiplas drogas (MDR), os quais têm sido apontados como uma das principais causas de falha terapêutica e de mortes (DATTA, N. R. et al. 2015). Portanto, pesquisadores têm encontrado alvos, especificamente proteínas envolvidas no carcinogênese, que podem ser estudados com o intuito de estabelecer novos fármacos antitumorais.

### **2.3 Proteína chaperona**

As várias condições de stress na célula, incluindo exposição ao calor, à hipóxia, metais pesados, ou pH ácido, podem estimular a ativação e regulação de proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins-HSPs). As HSPs são chaperonas dependentes de ATP (Adenosina Trifosfato), que intervem na maturação, ativação, transporte, e/ou degradação de outras proteínas clientes (TRENDOWSKI, M., 2015).

A chaperona é defenida como uma proteína que interage, estabiliza ou auxilia outra proteína a adquirir a sua conformação funcionalmente ativa. A sua função é determinada pela sua estrutura tridimensional no processo de enrolamento de proteínas recentemente sintetizadas ou danificadas, sequestrando as proteínas danificadas para serem enroladas novamente ou destruídas (ELLGAARD; HELENIUS, 2003). No caso do processo falhar, as proteínas reconhecem como impróprio e são destinadas a degradação (BERNIER et al., 2004). Quando submetidas ao calor excessivo, as cadeias de aminoácidos que são dobradas em espirais, loops e folhas começam a perder

as suas formas tornando disfuncional. Defeitos de proteína conformacionais são responsáveis por uma série de patologias, que vão desde a doença de Alzheimer até a transformação oncogênica em seres humanos (FERNANDES, et al., 2012; ORTEGA, L., et al 2014).

As Hsps (Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 e pequenas HSPs) são um grupo particular das chaperonas que merecem destaque, principalmente por constituírem uma resposta comum nos mais distintos organismos, sendo conservada ao longo de toda a escala evolutiva. Elas cooperam no processo de enrolamento de proteínas, na manutenção do proteoma, incluindo o enrolamento de proteínas recém-sintetizadas ou pós-tradução, o reenrolamento das proteínas desnaturadas pelo stress, organização oligomérica e a assistência na degradação proteolítica (SLAVOTINEK; BIESECKER, 2001; HARTL et al., 2011).

### **2.3.1 Proteína Hsp90**

Pesquisas recentes demonstraram que as células cancerosas utilizam a dinâmica das Hsps, principalmente as Hsp90, para produção de oncoproteínas, tornando essa classe das chaperonas um importante alvo terapêutico. A Hsp90 é um homodímero de aproximadamente 90 kDa, conhecido como membro da superfamília da ATPase, Girase-Hsp90-histidinaquinase-mutL (GHKL). Possui uma dobra (domínio de ligação ATP) chamada de Bergerat que é distinto de outras proteínas em consequência das ligações com ATP encontrados em cinases e ATPases (L. NECKERS, J.B. TREPEL., 2014; TRENDOWSKI, M., 2015).

O ciclo da chaperona Hsp90 é acionado pela hidrólise de ATP que funciona na dobragem de sua estrutura facilitando localização de proteínas clientes. O local de ligação de ATP dá origem a um complexo multi-chaperona com elevada atividade de ATPase. Cerca de 500 proteínas clientes foram identificadas (TRENDOWSKI, M., 2015). Essa quantidade está relacionada na sua estrutura conservada em três domínios de ligações flexíveis: O domínio de ligação do ATP localizados dentro do domínio N-terminal; O domínio do meio que é responsável pela interação das proteínas clientes; e o domínio C-terminal

importante na função de dimerização da chaperona (BURGER, A. M., 2007; L. NECKERS, J.B. TREPEL., 2014).

As co-chaperonas estão essencialmente envolvidas no ciclo de Hsp90, na atuação das transições entre as diferentes conformações da Hsp90 que ocorre espontaneamente. Assim, as proteínas clientes também podem ligar-se a Hsp90 por intermédio das co-chaperonas (Hsp70, Hsp40 entre outras) (BURGER, A. M., 2007; LI et al., 2013). Nos tecidos normais a Hsp90 é uma forma inativa, não complexada e com baixa afinidade ATPase. A ocupação do bolso de ligação do ATP inibe todas as reações de redobramento conformacionais da Hsp90, o que resulta na degradação das proteínas pelo sistema ubiquitina-proteassoma (BURGER, A. M., 2007).

A via ubiquitina-proteassoma é conhecida como a via primária de degradação de proteínas dependente de energia (ATP), distribuídas no citoplasma, retículo endoplasmático e núcleo. É estruturado hierarquicamente em várias enzimas de ativação da ubiquitina. Por exemplo, a enzima ubiquitina 1 (E1) realiza transferência de ATP para outra enzima ubiquitina conjugada 2 (E2) e assim por diante. A formação das poliubiquitinas na maioria dos casos são proteínas destinadas à degradação pelo proteossoma. A quantidade de ubiquitina e seus substratos participam na regulação do crescimento e da progressão do tumor (BURGER, A. M., 2007; NECKERS, J.B. TREPEL., 2014).

Por sua vez, o proteassoma é um complexo proteolítico que consiste num núcleo catalítico (proteassoma 26 S) de 28 subunidades, organizado sob a forma de anéis, que formam um cilindro oco sempre que ocorre a proteólise. Este complexo encontra-se presente no citoplasma, nas regiões perinucleares e no núcleo de todas as células eucariotas. A sua função consiste na degradação de proteínas deformadas previamente marcadas pela ubiquitina (BURGER, A. M., 2007; NECKERS, J.B. TREPEL., 2014).

Considerando que o Hsp90 é altamente dinâmico na biologia do câncer, expresso em altos níveis em uma variedade de cânceres humanos incluindo melanoma, leucemia e câncer de cólon, próstata, pulmão e mama, atualmente, 17 compostos inibidores da atividade do Hsp90 estão sob avaliação em

ensaios clínicos, mas até agora nenhum deles foi aprovado para uso humano (TRENDOWSKI, M., 2015).

## 2.4 Geldanamicina

Em 1970, a geldanamicina (GDM,  $C_{29}H_{40}N_2O_9$ ), um antibiótico ansamicina benzoquinona (BQA) isolada de ocorrência natural a partir do fungo *Streptomyces hygroscopicus*, apresentou atividade anticâncer através da inibição específica do complexo chaperona Hsp90 (FUKUYO, Y., HUNT, C. R., HORIKOSHI, N., 2010). A geldanamicina é um composto de propriedade hidrofóbica por constituir um anel de ansa fechado e uma benzoquinona planar incorporada nela. O anel de ansa é uma estrutura básica que compreende de uma amida planar e três ligações duplas carbono-carbono. Entre os dezesseis átomos do esqueleto da benzoquinona, nove não fazem ligações com hidrogênio, por que possui um grupo carbonil, um grupo carbamato, um grupo hidroxilo, dois grupos metoxil e quatro grupos metil (STEBBINS. C. E. et al., 1997).

A GDM foi descrita como inibidor da Hsp90 pela primeira vez, quando se investigou a inibição da formação do complexo de heteroproteína scr-Hsp90. Posteriormente, observou que a ligação da GDM no domínio N-terminal da Hsp90 é consequência de uma rede de interações entre Hsp90 e GDM, formada através de pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals (PORTER, J. R.; FRITZ, C. C.; DEPEW, K. M., 2010).

No complexo geldanamicina-Hsp90, a benzoquinona fica posicionada na entrada da bolsa de ligação permitindo poucas interações. Dois dos grupos metil do anel da ansa são centralmente posicionados para maximizar os contatos intramolecular de Van der Waals. A ponta do anel da ansa, que tem o grupo carbamato, metoxi e metil, liga-se na porção inferior da bolsa do Hsp90 permitindo uma elevada densidade de contatos também de Van der Waals. Esta conformação compactada difere das observadas com geldanamicina livres, devido à perda de coplanaridade entre o grupo amida e a benzoquinona da geldanamicina. Segundo os estudos de Stebbins e colaboradores (1997) 85% da área de superfície da geldanamicina é enterrada no complexo pela

rede de ligações de hidrogênio. Estas interações estão no fundo do bolso da Hsp90, entre o grupo carbamato da geldanamicina e a cadeia lateral de Asp93 (porção da Hsp90). A importância desta rede de ligações de hidrogênio demonstra a atividade da geldanamicina na inibição da Hsp90 (STEBBINS. C. E. et al., 1997; KITSON, R. R. et al., 2013). O entendimento fundamental da inibição do Hsp90 é atribuído pela geldanamicina assumir a estrutura de grampo C ligada a Hsp90, diminuindo a barreira de energia para isomerização (PORTER, J. R.; FRITZ, C. C.; DEPEW, K. M., 2010).

Embora a geldanamicina tenha demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* resultados convincentes na atividade anti-câncer, as suas limitações por causa da toxicidade hepática observada, permitiram o desenvolvimento de análogos com modificações no carbono 17 do anel ansa. Muitos desses derivados apresentaram efeitos hepatotóxicos diminuídos mantendo uma excelente atividade anti-tumoral levando a estudos clínicos. Por exemplo, o 17-AAG (SCHNUR, R. C. et al., 1995 BEHRSING, H. P. et al., 2005; PORTER, J. R.; FRITZ, C. C.; DEPEW, K. M., 2010).

#### **2.4.1 Tanespimicyn (17-AAG)**

O 17-Alilamino-17-demetóxi-geldanamicina, ou 17-AAG, ou tanespimycin ( $C_{31}H_{43}N_3O_8$ , Peso Molecular de 585 g/mol), é um análogo menos tóxico e mais estável dentre o grupo de inibidores de Hsp90 conhecidos como ansamicinas benzoquinona. Estudos demonstram que 17-AAG liga-se a Hsp90 com maior afinidade em células tumorais do que em células normais, verificando que a viabilidade de células tumorais do carcinoma de mama (BT474) obtiveram uma concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) de 6nM, enquanto que nas células epiteliais dos rins humanos e fibroblastos dermais apresentaram uma  $IC_{50}$  de 600 e 400 nM, respectivamente (KAMAL et al., 2003; JANIN, Y. L. 2010). Nos estudos de Myoshi e colaboradores (2012) demonstraram que nos queratinócitos (células da camada basal da epiderme) o 17-AAG influencia em vários tipos de proteínas no processo de diferenciação celular. Porém, a redução é apenas no nível de expressão de dois tipos de citoqueratinas Ck1 e Ck10, e não a inibição dos mesmos ou de outras proteínas.

Em outros relatos científicos, células de câncer tratados com 17-AAG apresentaram depleção ou diminuição dos níveis de expressão de proteínas oncogênicas (como a Hsp90, BCR-ABL, c-Raf-1, Akt, ERK, MEK, FAK) e inibição da transdução de sinal, levando à paragem do ciclo celular (através da clivagem das caspases 9 e 3), induzindo a apoptose. Essas informações da bioquímica e fisiologia das células tumorais avaliando a resposta à terapia aplicada em ambos os modelos *in vivo* e *in vitro*, representa uma assinatura molecular que é diagnóstico de inibição da Hsp90. (CHUNG et al, 2003; HO, N. et al., 2012; FAINGOLD, D. et al., 2014; WANG, B. et al., 2014).

Desde 1999, as propriedades farmacológicas do 17-AAG são estudadas em ensaios pré-clínicos e clínicos demonstrando perfis de segurança para a dosagem com picos de concentração plasmática máxima de 10  $\mu$ M. A monoterapia do 17-AAG observada nos estudos de fase clínica I foi bem tolerada em pacientes pré-tratados intensivamente com mieloma múltiplo na recidiva/refratária e no receptor-positivo do fator de crescimento epidermal humano do câncer de mama (RICHARDSON, P. G. et al., 2010; WENKERT et al., 2010; HO, N. et al., 2012).

Atualmente, segundo os dados do *U.S. National Institutes of Health*, existem 37 estudos clínicos de fase I, II e III que envolvem a terapia do 17-AAG sozinho ou combinado com outros medicamentos para tratamento de diversos tipos de câncer. Um estudo clínico de fase II já foi completado e demonstrou níveis aceitáveis de toxicidade, obtendo também uma média de sobrevida de 232 dias (n = 11), contra 173 dias no grupo não tratado, em pacientes com melanoma metastático progressivo após intervenção terapêutica com drogas atuais (PACEY et al., 2012). Muitos dos estudos clínicos em curso adotaram a combinação do 17-AAG com outras moléculas atuantes na atividade antitumoral, visto que o 17-AAG em algumas células cancerosas apenas sensibiliza retardando a progressão do tumor ou a proliferação de células tumorais (HO, N. et al., 2012).

Apesar do avanço na pesquisa clínica de fase III, o 17-AAG caracteriza-se por ser uma substância de caráter hidrofóbico e pouco solúvel em água (10  $\mu$ g/ml, 17  $\mu$ M), (GUO et al., 2008; CHANDRAN et al., 2010). A hepatotoxicidade

e a baixa bioviabilidade oral recorrente da toxicidade gastrointestinal são outros fatores limitantes dados pelas dificuldades aquosas (PORTER, J. R.; FRITZ, C. C.; DEPEW, K. M., 2010). Estas desvantagens podem bloquear a eficácia do 17-AAG em muitos cânceres, como observado em muitos ensaios clínicos de fase II. O efeito do 17-AAG na expressão da RAF quinase foi de curta duração, e nenhuma resposta objetiva anti-melanoma foi observado. Assim como, o 17-AAG também não obteve uma resposta efetiva em pacientes com câncer de próstata e carcinoma papilar renal (HO, N. et al., 2012).

Os níveis de dosagem e as frequências de 17-AAG na terapia não estão associados apenas pela toxicidade sistêmica, mas também pela toxicidade dos solventes orgânicos (Cremophor, etanol, DMSO, fosfolípidos de ovo) utilizados para solubilizar a droga (KATRAGADDA, U. et al. 2011). Diante do exposto a indústria farmacêutica, busca utilizar veículos para evitar ou minimizar a toxicidade de alguns quimioterápicos, além de melhorar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade (UEKAMA, HIRAYAMA, E IRIE, 1998).

## **2.5 Ciclodextrinas**

As ciclodextrinas (CDs) são veículos de fármacos, formados por oligossacarídeos cíclicos que vem sendo estudados nos últimos 100 anos, citados pela primeira vez em 1891 por Villiers, através do estudo sobre a digestão do amido pelo *Bacillus amylobacter*, denominando celulosina. No início do século XX, Franz Schardinger identificou as ciclodextrinas como produtos resultantes da degradação do amido pela ação da enzima amilase ciclodextrina glicosil transferase (CGTase), produzida pelo micro-organismo *Bacillus macerans*. Este microorganismo foi capaz de romper um segmento da hélice do amido e unir as duas porções terminais deste fragmento numa única molécula cíclica, ou seja, demonstrando a sua estrutura cíclica (KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013).

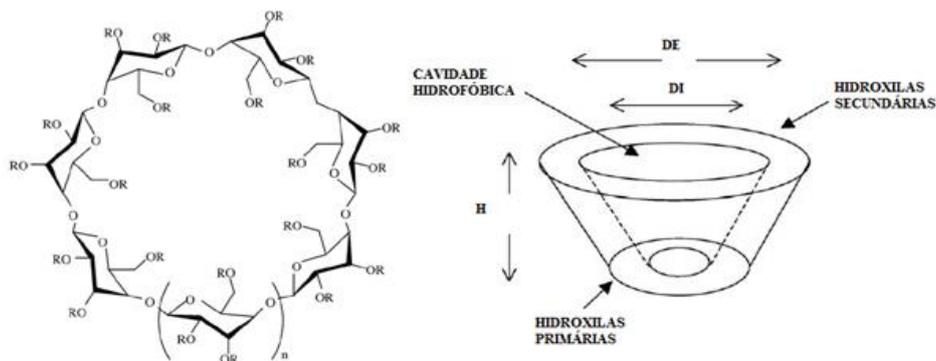
Em 1938 Freudenberg e colaboradores descobriram que as CDs apresentam uma cavidade central e com isso foi determinado seu peso molecular. Após 15 anos, Freudenberg, French e Plieninger obtiveram uma patente, retratando da formação de complexos de inclusão, pela interação das

ciclodextrinas com moléculas hidrofóbicas, permitindo o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, proteção de substâncias que poderiam ser facilmente oxidadas e a redução da volatilidade de algumas substâncias (LOFTSSON, T., BREWSTER, M.E., 2010, 2011; KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013).

As ciclodextrinas (CDs) são formadas por unidades de glicopirranose unidas por ligações  $\alpha$  (1-4), possuindo uma estrutura rígida em forma de um cone truncado (Figura 2), onde os grupos OH secundários ligados aos carbonos C-2 e C-3 ocupam a base de maior diâmetro do tronco, enquanto as hidroxilas primárias ligadas ao carbono C-6 localizam-se na base menor do tronco (CHALLA et al., 2005; LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D, 2007; KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013).

Esta conformação faz com que a cavidade central apresente características lipofílicas e uma superfície externa hidrofílica, favorecendo a disposição espacial dos grupamentos químicos, permitindo, desta forma, o processo de complexação molecular. A presença da cavidade interna hidrofóbica faz com que a ciclodextrina tenha a capacidade de alojar uma molécula hóspede, formando complexos de inclusão com uma variedade de substâncias hidrofóbicas (ARUN, et al., 2008).

**Figura 2.** Estrutura química de uma ciclodextrina (A) e desenho esquemático (B) ilustrando a cavidade hidrofóbica, a posição das hidroxilas primárias e secundárias e suas dimensões: altura (H), diâmetro interno (DI) e diâmetro externo (DE).



**Fonte:** adaptado de BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

Conhecidas também como cicloamiloses, ciclomaltoses e Schardinger dextrinas, as ciclodextrinas são classificadas de acordo com o número de unidades de glicopirranose, sendo  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina e  $\gamma$ -ciclodextrina, as quais contêm respectivamente seis, sete e oito unidades glicosídicas. Além disso, as CDs naturais apresentam diferentes propriedades, como tamanho de cavidade, reatividade, solubilidade, capacidade de complexação e efeito na estabilidade química das moléculas hóspedes (Tabela 1) (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; ARUN, R. et al., 2008; KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013).

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas.

| Propriedades                    | Ciclodextrina        |                      |                      |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                                 | $\alpha$             | $\beta$              | $\gamma$             |
| Unidades de glicopirranose      | 6                    | 7                    | 8                    |
| Peso molecular anidro (Dalton)  | 973                  | 1135                 | 1297                 |
| Fórmula empírica                | $C_{36}H_{60}O_{30}$ | $C_{42}H_{70}O_{35}$ | $C_{48}H_{80}O_{40}$ |
| Peso molecular                  | 972.85               | 1134.99              | 1297.14              |
| Dimensões aproximadas (nm)      |                      |                      |                      |
| Altura (h)                      | 0.78                 | 0.78                 | 0,78                 |
| Diâmetro interno (di)           | 0.65                 | 0.62                 | 0.80                 |
| Diâmetro externo (do)           | 1.46                 | 1.54                 | 1.75                 |
| Solubilidade (água, 25°C) mg/ml | 129.5                | 490                  | 350                  |

**Fonte:** adaptado de KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013.

### 2.5.1 $\beta$ -Ciclodextrinas

Uma análise comparativa de mais de 30 CDs atualmente conhecidas contendo formulações farmacêuticas mostra que a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) é a mais utilizada por possuir baixo custo. No entanto, a  $\beta$ CD tem limitado o seu uso pela solubilidade aquosa ser relativamente baixa. As suas dimensões moleculares são ótimas para a formação de um anel de ligações de hidrogênio

intramoleculares que neutralizam a hidratação da  $\beta$ CD, reduzindo assim a sua solubilidade (KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013).

Através da síntese por aminações, esterificações ou eterificações das hidroxilas primárias e secundárias das CDs, pesquisadores têm utilizado as CDs para modificar sua estrutura e com isso melhorar a biodisponibilidade de fármacos fracamente hidrossolúveis. Esses derivados semi-sintéticos de CDs evidenciam que a substituição de qualquer um dos grupos hidroxila por grupamentos hidrofóbicos resulta em um aumento significativo da solubilidade aquosa (CALABRÒ et al., 2004; VEIGA, F., PECORELLI, C., RIBEIRO, 2006; KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013).

A habilidade dos derivados de CDs em formar complexos solúveis em água depende do grau de substituição da ciclodextrina, quando modificada preserva as propriedades de solubilização. O grau de substituição da HP $\beta$ CD de uso farmacêutico é de aproximadamente 0,65 (que significa que em média existem 0,65 de grupamentos hidroxipropil por unidade de glicose) (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007). Portanto, 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) é um derivado obtido pelo tratamento de uma solução de  $\beta$ CD com propileno óxido, resultando em uma mistura de isômeros devido à substituição randômica dos grupamentos hidroxílicos, que tem uma atenção especial pela sua alta solubilidade, baixa toxicidade e maior cavidade hidrofóbica em comparação com outras ciclodextrinas da mesma família, fazendo desta CD uma forte candidata para incorporação em formulações farmacêuticas (VEIGA, F., PECORELLI, C., RIBEIRO, 2006; LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007; PINHO, E. et al., 2014).

A tolerância da HP $\beta$ CD em organismo humano depende da via de administração e da dose. Quando administrada intravenosamente a HP $\beta$ CD é tolerada em camundongos, macacos, ratos e cachorros em dose única por 90 dias. Especificamente nos macacos do gênero *Cynomolgus* a dose única intravenosa que pode ser aplicada considerando não letal é de 10000 mg/Kg de HP $\beta$ CD (BREWSTER, M. E., LOFTSSON, T., 2007; LOFTSSON, T., BREWSTER, M.E., 2011).

Testes clínicos com humanos foram relatados que sob administração intravenosa a HP $\beta$ CD nas doses de 0,5 / 1 / 1,5 / 2 / 2,5 ou 3g mostrou que o nível plasmático de HP $\beta$ CD declinou rapidamente e esse declínio foi bifásico. Não havendo diferença entre homens e mulheres, nos parâmetros farmacocinéticos, bem como tempo de meia vida e depuração (KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013).

### **2.5.2 Aplicações das ciclodextrinas na indústria**

Devido a sua capacidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de substâncias, as ciclodextrinas vêm sendo extensivamente utilizadas em diversos setores, destacando-se na indústria alimentícia, agrícola, cosmética, têxtil e principalmente na indústria farmacêutica. A indústria alimentícia utiliza as ciclodextrinas na produção de reagentes que reduzem odores e sabores indesejáveis. Na indústria cosmética, está ligada com a diminuição da irritação local, propiciando a ação prolongada e também a diminuição de odores (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007; LOFTSSON, T., BREWSTER, M.E., 2010). Os complexos de inclusão são encontrados também em produtos da agricultura, como é o caso dos herbicidas Isoproturon e Norflurazon e na indústria têxtil é utilizada na impregnação ou pulverização de tecidos (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007; PINHO, E. et al., 2014).

A primeira aplicação das ciclodextrinas na indústria farmacêutica foi em 1976 com a utilização de Prostaglandina E<sub>2</sub>/ $\beta$ -CD e após doze anos foi utilizado o piroxicam/ $\beta$ -CD. Porém, a primeira formulação desenvolvida foi uma solução oral de itraconazol/HP $\beta$ -CD em 1997 (LOFTSSON, T., BREWSTER, M.E., 2011).

Depois da primeira utilização das CDs, estudos começaram a descrever a utilização da HP $\beta$ CD no aumento da solubilidade de produtos de origem natural, em particular, substâncias liquênicas, como o ácido úsnico (LIRA et al., 2009), o ácido fumarprotocetrárico e a atranorina, como compostos padrão de baixa solubilidade em água (KRISTMUNDSDÓTTIR et al., 2005).

## **2.6 Complexo de inclusão**

Geralmente, substâncias químicas de baixa polaridade podem migrar para o interior da cavidade interna das CDs, fenômeno conhecido como complexação, formando complexos de inclusão dinâmicos em solução ou no estado sólido (LOFTSSON, T., BREWSTER, M.E., 2010). Isso se dá pela variedade de forças não-covalentes (química supramolecular), como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, que são responsáveis pela formação do complexo, não ocorrendo interações fortes como ligações covalentes. Contudo, devido à natureza destas ligações, o complexo ciclodextrina:fármaco está continuamente sendo formado e dissociado (KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013; PINHO, E. et al., 2014).

Os mecanismos de interação entre as CDs e o composto hidrofóbico estão envolvidos na formação de complexos de inclusão, de complexos de não-inclusão, de agregados e de soluções de fármacos supersaturadas estáveis (BREWSTER; LOFTSSON, 2007). O complexo de inclusão obtido exibe novas características físico-químicas, comparadas às moléculas livres, aumentando a solubilidade de substâncias lipofílicas, aumentando a sua biodisponibilidade e diminuindo os efeitos indesejáveis do princípio ativo (KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013).

Nos estudos de estequiometria molecular, o complexo de inclusão pode ser formado por diferentes razões molares de CDs: fármaco (1:1, 1:2 e 2:1) (Figura 3). Para as moléculas de baixo peso molecular pode ocorrer a formação do complexo de inclusão por mais de uma molécula na cavidade, assim como, as moléculas de maior peso molecular podem complexar com mais de uma molécula de ciclodextrina, dependendo da afinidade dos grupamentos e da estereoquímica da molécula (LOFTSSON; DUCHENE, 2007; KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013).

A estabilidade dos complexos de inclusão é investigada pela constante de estabilidade ( $K_c$ ). Designada também como constante de dissociação ( $K_d$ ), é avaliada pela comparação dos complexos 1:1 que está frequentemente entre 50 e 2000  $M^{-1}$ , com valores médios de 130, 490 e 350  $M^{-1}$  para  $\alpha$ CD,  $\beta$ CD e  $\gamma$ CD, respectivamente. A maioria dos métodos utilizados para a determinação

da  $K_c$  baseia-se na medida de uma propriedade física ou química da molécula hóspede com a ciclodextrina e é determinada em função da concentração. O comportamento observado (função linear, quadrática ou cúbica) é indicativo da estequiometria do complexo formado entre o fármaco e a ciclodextrina (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013).

### **2.6.1 Métodos de preparação de complexo de inclusão**

Os métodos de preparação dos complexos de inclusão mais utilizados são: mistura física, pasta, co-evaporação, co-precipitação, *spray-drying* e *freeze-drying*. Este último tem como vantagem a possibilidade de ser utilizado em escala laboratorial e também em escala industrial (CARRIER, R. L.; MILLER, L. A.; AHMED, I, 2007; LIRA ET AL., 2009; OLIVEIRA, J. et al. 2014).

No processo físico de misturas de substâncias puras (ciclodextrina e fármaco) pode haver interações entre elas, mas na literatura a mistura física é interpretada como padrão de não complexação. Outros relatos informam que ao macerar a mistura física e acrescentar solvente pode originar uma pasta uniforme que ao secar forma um pó. Essa técnica (pasta) pode permitir que ocorram interações entre os dois compostos, mas baseia-se na primeira metodologia. Aprimorando a técnica da pasta, a solução resultante da mistura com solvente miscível à água (etanol, por exemplo) pode levar a uma melhoria na interação quando submetidos ao rota-evaporador (co-evaporação). A co-precipitação é outra metodologia, realizada quando ocorre a solubilização da mistura dos constituintes do complexo de inclusão em solução, formando um precipitado. Esse método não pode ser aplicado em escala industrial pela grande quantidade de água utilizada (LOFTSSON, T., BREWSTER, M.E., 2011; OLIVEIRA, J. et al. 2014).

Para a obtenção de complexos de inclusão através do método *freeze-drying*, a ciclodextrina é completamente solubilizada em água e posteriormente o fármaco é adicionado à solução de ciclodextrina. A mistura permanece sob agitação constante durante um período de tempo pré-determinado, sendo congelada em seguida e submetida à liofilização (KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013; OLIVEIRA, J. et al. 2014).

A escolha do método de preparo de complexação é importante não só para o produto final obtido, como também a simplicidade do método, como também a rapidez, o alto rendimento e principalmente o baixo custo para reprodução em escala industrial (OLIVEIRA, J. et al. 2014).

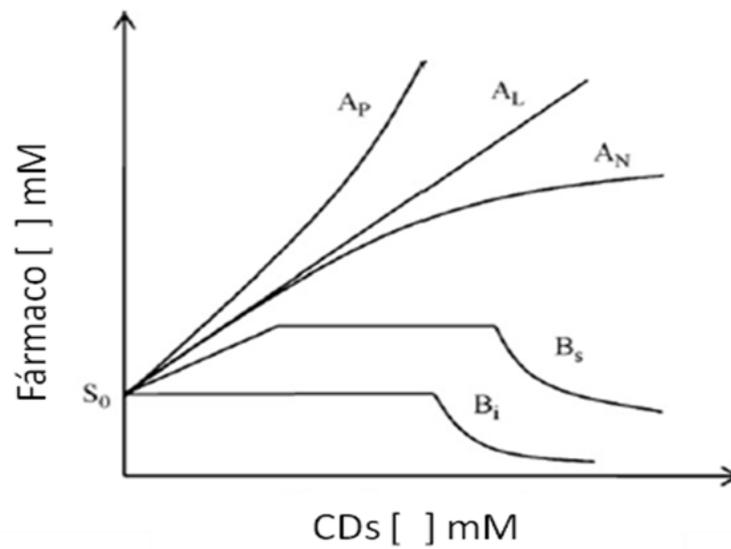
### **2.6.2 Métodos de caracterização do complexo de inclusão**

As substâncias lipofílicas que formam complexos de inclusão 1:1 CD/fármaco, onde uma molécula da CD se complexa com uma do fármaco, é analisada através do estudo de solubilidade de fases, cujo objetivo é relacionar o efeito do agente solubilizante (CDs) na solubilidade de um composto (KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013).

Os primeiros a descrever o estudo de solubilidade de fases foram Higuchi e Connors no ano de 1965, através do diagrama de solubilidade de fases, obtido pela relação da concentração molar entre o fármaco em relação a concentração molar da ciclodextrina (LOFTSSON, T., BREWSTER, M.E., 2011).

A curva da solubilidade de fases plotada a partir do diagrama é classificada em: curvas do tipo A, indicando que a molécula hóspede aumenta com incremento da concentração de CD, na formação de complexos de inclusão solúveis com razão estequiométrica molar de 1:1 fármaco:ciclodextrina; curvas do tipo B, as quais sugerem a formação de complexos de inclusão com pobre solubilidade, em alguns casos, inferior à da molécula hospedeira ocorrendo a precipitação à medida que há encapsulação. As curvas do tipo A são subtipadas em  $A_L$  (aumento linear da solubilidade do fármaco como uma função da concentração da ciclodextrina),  $A_P$  (desvio isotérmico positivo), e  $A_N$  (desvio isotérmico negativo) e as curvas do tipo B, em  $B_S$  (curva que denota complexos de limitada solubilidade) e  $B_I$  (curva que indica complexos insolúveis) (Figura 3) (LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D, 2007; KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013).

**Figura 3.** Diagrama de solubilidade de fases mostrando os tipos e subtipos de curvas A ( $A_L$ ,  $A_P$  e  $A_N$ ) e B ( $B_S$  e  $B_I$ ).



**Fonte:** adaptado de MESSNER et al., 2010).

Estes dados do gráfico permitem calcular a estequiometria e a constante de associação ( $K_{1:1}$ ) das curvas formadas, que são utilizadas para comparar as afinidades dos fármacos a diferentes CDs. Calcula-se a constante de associação para complexos de inclusão 1:1 a partir da linearidade da curva de solubilidade de fases utilizando a equação  $K_{1:1} = \text{Slope}/S_0(1 - \text{Slope})$ , em que “Slope” é a inclinação da reta e  $S_0$  é a solubilidade intrínseca do composto, assumindo como igual ao valor do Y-intercepto da curva linear (LOFTSSON, T., BREWSTER, M.E., 2010).

Outra maneira de comparar os efeitos solubilizantes das CDs, com intenção de revelar a afinidade do composto hidrofóbico é comparar suas eficiências de complexação (EC) (um parâmetro calculado sem levar em consideração a solubilidade intrínseca) pela utilização da seguinte equação:  $EC = S_0K_{1:1} = [D/CD]/[CD] = \text{Slope}/1 - \text{Slope}$ , onde  $[D/CD]$  é a concentração do complexo dissolvido;  $[CD]$ , a concentração de ciclodextrina livre dissolvida (KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013).

Muitas são as metodologias que podem ser utilizadas para a investigação dos complexos de inclusão, que permitem não só detectar a formação do complexo de inclusão, como conhecer a sua estrutura química e interações que estabelecem entre os diferentes componentes. Para verificar a integridade da molécula hóspede no complexo de inclusão, os métodos que caracterizam físico-quimicamente essa associação CDs:fármaco são difração de raios-X (XRD), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de prótons de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e estudo de solubilidade de fases (CAVALCANTI et al., 2011; KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013; VALENTE, A. J. M.; SÖDERMAN, O., 2014).

Mesmo com muitas vantagens atribuídas à formação dos complexos de inclusão, o mecanismo de complexação molecular não é suficiente para promover a liberação controlada do agente terapêutico. A fim de melhorar a estabilidade de potentes compostos lipofílicos e obter um perfil de liberação controlada, estudos estão voltados para encapsulação de complexos de inclusão em nanosistemas, denominados algumas vezes de complexo ternário (KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013).

Os complexos ternários são sistemas compostos por três moléculas diferentes. Uma molécula é a droga ativa, a segunda é a CDs, enquanto o terceiro componente melhora as propriedades físico-químicas e faz uma liberação controlada do fármaco. Por vezes, a complexação ternária reduz os efeitos colaterais de drogas. Vários estudos recentes foram dedicados a sistemas ternários onde um fosfolípido desempenhou o papel do terceiro componente. Os fosfolípidos são conhecidos por formar bicamadas, que por sua vez, formam vesículas chamadas de lipossomas (LOFTSSON, T., BREWSTER, M.E., 2012; KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T., 2013).

Portanto, para explorar o potencial terapêutico do 17-AAG é desejável desenvolver um sistema de liberação de fármaco livre de solvente orgânico o que irá além de melhorar a acumulação no tecido do tumor, minimizar a toxicidade. Dessa forma, são necessárias novas alternativas através da nanotecnologia farmacêutica.

## **2.7 Nanotecnologia**

A nanotecnologia é uma ciência em rápida expansão, que abrange o desenvolvimento de materiais no tamanho nanométrico de 5-200 nm. Nanômetro é sua unidade de medida, que correlaciona com a bilionésima parte do metro ( $10^{-9}$ ). Essa dimensão é muito superior aos padrões de moléculas orgânicas, porém com uma menor gama de abordagem de muitas proteínas e macromoléculas biológicas (FARIJ; WIFP, 2009).

No ano de 1959, o físico Richard Feynman ganhou o prêmio Nobel relatando sobre as possibilidades, vantagens e mudanças com a obtenção de materiais em nanoescala (FEYNMAN, 1959). O termo nanotecnologia ainda não havia sido abordado, quando em 1974 um pesquisador da Universidade de Tokio, Norio Taniguchi, distinguiu o novo campo da engenharia em escala sub-micrométrica, nanotecnologia, da engenharia em escala micrométrica. Anos após, Eric Drexler começou a construção de máquinas em escala molecular, de apenas alguns nanômetros de tamanho como braços de robô, motores e computadores, muito menores que uma célula. Contudo, o significado da palavra mudou para nanotecnologia, a fim de abranger os tipos mais simples de tecnologia à escala nanométrica (DURAN, N.; MATTOSO, L.H.C.; DE MORAIS, P.C., 2006)

Desde o surgimento, a nanotecnologia traz um enorme potencial à saúde humana, através do desenvolvimento de produtos farmacêuticos, no diagnóstico, na prevenção, detecção e tratamento de doenças. Em particular, a nanomedicina destaca-se na produção de sistemas específicos de liberação controlada de fármacos. Estes nanocarreadores têm propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos com baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e alta toxicidade (SAHOO et al, 2006; SAKATA et al., 2007; GAO et la., 2014).

### **2.7.1 Sistemas de liberação controlada**

A tecnologia de sistemas de liberação controlada de fármacos surgiu na década de 80, e tem o objetivo de manter o nível de fármaco no sangue dentro

da janela terapêutica, entre a concentração mínima eficaz (CME) e a concentração mínima tóxica (CMT) (SIEGEL, R.A., RATHBONE, M.J., 2012). Quando o medicamento é administrado como uma dose grande e única, o nível de droga é elevado acima CMT, causando efeitos tóxicos. Múltiplas dosagens com certo intervalo podem reduzir a concentração do fármaco no plasma sanguíneo, contudo pode obter uma eficácia subterapêutica devido a diminuição do CME. Portanto, é necessário desenvolver vetores com frequência reduzida de doses terapêuticas através de sistema de liberação controlada de fármaco (HANNAH, J.; YEO, Y., 2015).

Para manter o fármaco com liberação controlada e uma concentração adequada no plasma por um período de tempo duradouro, o vetor (nanossistema) deve possuir características fundamentadas no tamanho, lipofilia, estabilidade e citropismo do composto, bem como o comportamento em fluidos biológicos (MAGENHEIM; BENITA, 1991; SIEGEL, R.A., RATHBONE, M.J., 2012).

Outro fator determinante na liberação controlada do fármaco é o mecanismo de escape do composto pelo nanocarreador. Segundo a literatura existem três básicos mecanismos (de difusão, degradação e os estímulos de liberação controlada) (SIEGEL, R.A., RATHBONE, M.J., 2012; HANNAH, J.; YEO, Y., 2015). Um sistema reservatório do tipo cápsula é o mecanismo mostrado por difusão. O fármaco dissolvido no núcleo ou disperso na matriz do nanocarreador é acionado pela diferença de sua concentração em relação a meio que se encontra. Este sistema geralmente mostra alta taxa inicial de liberação de fármaco, porém diminui com o aumento da distância da difusão das moléculas do compostos localizadas no interior dos nanossistemas (CAUCHETIER et al., 2003). Estímulos internos ou externos (temperatura, pH, força iônica, som e eletromagnetismo) do nanocarreador também podem influenciar a liberação de fármacos. Por outro lado, há mecanismos em que as matrizes podem sofrer degradações tipicamente erosão, ocorrendo da superfície para o núcleo do nanossistema. Geralmente são sistemas favoráveis por não causar efeitos tóxicos a longo prazo (LEE, W.C., CHU, I.M., 2008).

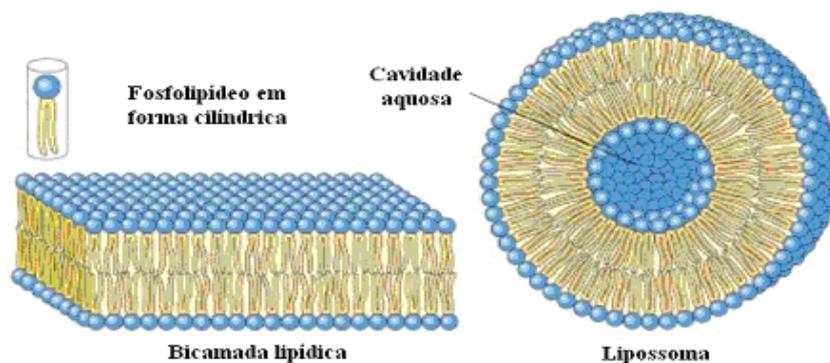
Têm-se desenvolvido muitos nanomedicamentos que podem ser utilizados como sistemas de liberação controlada, baseados na terapia do

câncer, como micropartículas, nanopartículas, lipossomas, dendrímeros, nanotubos, dentre outros. A administração desses sistemas de liberação controlada em relação às formas farmacêuticas convencionais (exemplo quimio e radio terapicos), apresenta vantagens, como: otimização do número de doses; liberação do fármaco por um tempo maior; direcionamento a alvos específicos modificando o perfil farmacocinético e aumentando a distribuição do composto no tecido tumoral; aumento da absorção celular e internalização em células cancerosas; proteção do princípio ativo da degradação; redução dos efeitos adversos indesejáveis, provenientes da redução da toxicidade para células normais; maior conveniência para o paciente e redução dos custos na saúde (GAO et al., 2014). Dentre as várias formas de sistemas de liberação controlada, os lipossomas vêm sendo o mais estudado (FARIJ; WIFP, 2009).

### 2.7.2 Lipossomas

Os lipossomas (Figura 4) são nanovesículas esféricas constituídas por bicamadas lipídicas que encerram no seu interior um ou mais compartimentos aquosos (ANWEKAR, H.; PATEL, S.; SINGHAI, A. K., 2011).

**Figura 4** Esquema de formação dos lipossomas: estrutura do fosfolípido, da bicamada lipídica e do lipossoma.



**Fonte:** Adaptado de: [courses.cm.utexas.edu](http://courses.cm.utexas.edu).

Os primeiros estudos foram realizados por Alec Bangham (1963) através da hidratação de filmes lipídicos depositados nas paredes de um frasco de

vidro, observando que as moléculas lipídicas formavam estruturas vesiculares. Logo mais, Gregory Gregoriadis investigou o transporte e a liberação de fármacos por vesículas lipossomais, propondo pela primeira vez a utilização de lipossomas, como um veículo de compostos ativos. No ano de 1965 o termo lipossoma foi determinado por Weissman, que do grego quer dizer lipos=gordura + soma=corpo (BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. DE; MAGALHÃES, N. S. S, 2007).

O grande interesse no estudo dos lipossomas é pelo fato principalmente de serem nanoestruturas carreadoras de moléculas hidrofílicas e lipofílicas (como quimioterápicos, hemoglobinas e co-fatores, antígenos, imunomoduladores e material genético), sendo considerados veículos biodegradáveis, biocompatíveis, não imunogênicos e flexíveis dependendo da sua composição, tamanho e fluidez da bicamada lipídica (BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. DE; MAGALHÃES, N. S. S, 2007; ANWEKAR, H.; PATEL, S.; SINGHAI, A. K., 2011; WAGNER, A.; VORAUER-UHL, K., 2011).

Outro dado que corrobora a importância dos lipossomas é o fato de que os elementos constituintes da bicamada lipídica são idênticos à membrana natural das células. Essa similaridade pode ser aumentada com modificações químicas na membrana do lipossoma, permitindo o direcionamento de fármacos a células alvo. A membrana celular é pontilhada com uma miríade de receptores que vinculam o meio extracelular aos seus respectivos ligantes (lipossomas cuja superfície é funcionalizada com ligantes) na transdução de um sinal no espaço intracelular. Sinal este, que pode desencadear uma infinidade de caminhos bioquímicos, causando a internalização dos sistemas lipossomais, via endocitose (WAGNER, A.; VORAUER-UHL, K., 2011).

### **2.7.2.1 Composição química e tamanho dos lipossomas**

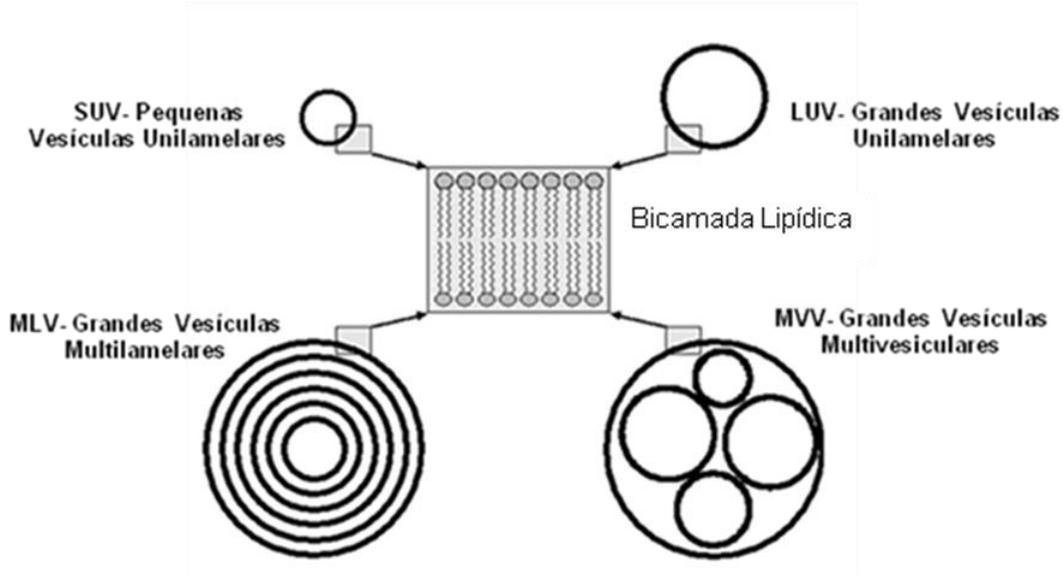
Os lipossomas são classificados quanto às suas propriedades com os sistemas biológicos mediante a via de administração farmacêutica e método de preparo. Estas propriedades são: tamanho de vesícula, número de lamelas e composição química (OLIVEIRA, et al., 2014; GHARIB, R. et al 2015).

Os lipídeos mais utilizados nas formulações de lipossomas são as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiéline, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. Os fosfolipídeos (de origem sintética ou natural) são componentes essenciais nos sistemas lipossomais, sendo a fosfatidilcolina mais utilizada, devido ao alto grau de insaturação e sua ramificação na cadeia lipídica, conferindo uma maior fluidez, rigidez e uma diminuição na oxidação. Devido a sua anfifilia, os fosfolipídeos apresentam em sua estrutura molecular uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica (KOHLI, A. G. et al., 2014; GHARIB, R. et al 2015).

Há casos em que durante a preparação dos lipossomas, esteróides são incorporados na tentativa de aumentar a rigidez da membrana lipossomal, ocasionando, conseqüentemente, a estabilidade. Um tipo de esteróide é o colesterol, que melhora a estabilidade da vesícula na presença de fluidos biológicos como o sangue, através da redução da interação das proteínas plasmáticas com as membranas dos lipossomas, diminuindo assim a desestruturização dos mesmos. Outras formulações tendem a utilizar carga na superfície das membranas dos lipossomas, com a fosfatidilserina e o fosfatidilglicerol como carga negativa e a estearilamina como carga positiva, evitando assim precipitação e instabilidade (KOHLI, A. G. et al., 2014; OLIVEIRA, J. et al., 2014; GHARIB, R. et al 2015).

O tamanho do lipossoma e o número de suas lamelas classificam os lipossomas em: vesículas multilamelares grandes (MLV- multilamellar large vesicles), vesículas unilamelares grandes (LUV - large unilamellar vesicles), vesículas multivesiculares (MMV - multivesicles vesicles) e vesículas unilamelares pequenas (SUV - small unilamellar vesicles) (Figura 5). Os SUVs mostram um diâmetro de até 100 nm, diferenciando-se dos demais tipos que variam em escala micrométrica, possuindo um compartimento aquoso (LUV), ou com vários compartimentos intercalados (MLV), ou com diferentes tamanhos de lamela (MMV) (OLIVEIRA, J. et al., 2014; GHARIB, R. et al 2015).

**Figura 5.** Ilustração esquemática dos diferentes tipos de lipossomas quanto ao tamanho. SUV- Pequenas Vesículas Unilamelares, LUV- Grandes Vesículas Unilamelares, MLV- Grandes Vesículas Multilamelares, MVV- Grandes Vesículas Multivesiculares.

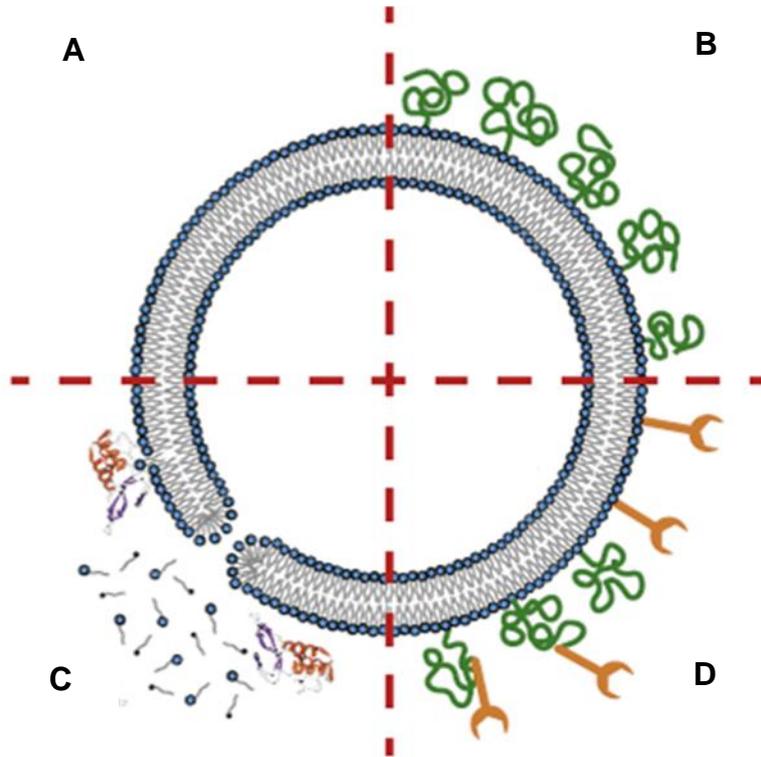


Fonte :adaptado de <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1243>).

### 2.7.2.2 Classificação dos lipossomas

Dependendo da composição química, os lipossomas podem ser classificados em convencionais, furtivos, sítio-específicos e lipossomas polimórficos (Figura 6). Conhecidos como lipossomas de primeira geração, os lipossomas convencionais são constituídos basicamente de fosfolipídios, colesterol e um lipídio de carga. Caracterizam-se por uma rápida circulação sanguínea, pois tendem a se acumular nas células do sistema retículo-endotelial, ou sistema fagocitário mononuclear, devido ao reconhecimento por macrófagos. Lipossomas do tipo LUV e MLV são rapidamente reconhecidos e eliminados da circulação (através do baço, fígado e rins), enquanto que os SUVs têm meia-vida mais longa. Por conseguinte, essa captura dos lipossomas, limita a sua aplicação nos tratamentos de diversas patologias (WAGNER, A.; VORAUER-UHL, K., 2011; AROURI, A. et al., 2013; OLIVEIRA, J. et al., 2014).

**Figura 6.** Ilustração esquemática dos tipos de lipossomas quanto à sua composição. **A-** Lipossomas convencionais. **B-** Lipossomas furtivos. **C-** Lipossomas polimórficos. **D-** Lipossomas sítio-específicos.



**Fonte:** AURORI et al., 2013

Alterações na superfície dos lipossomas é a alternativa para aumentar o tempo de permanência na corrente sanguínea. Os lipossomas furtivos apresentam na sua bicamada lipídica componentes como o gangliosídeo (GM1), fosfatidilinositol e polímeros hidrofílicos sintéticos inertes biocompatíveis, especificamente os polietilenoglicóis (PEGs), cuja finalidade é um revestimento que tenta o bloqueio da adsorção de opsoninas nos lipossomas, inibindo o processo de reconhecimento pelos macrófagos (AROURI, A. et al ., 2013; GHARIB, R. et al 2015).

Na busca de aumentar o acúmulo dos lipossomas nos tecidos e órgãos alvos, o estudo de moléculas ligantes tem sido acentuado ultimamente. A incorporação de diversos ligantes (anticorpos, glicopeptídeos, polissacarídeos e as lectinas) em lipossomas confere o direcionamento para receptores e determinantes antigênicos nas células alvo, proporcionando a distribuição

específica do fármaco encapsulado (WAGNER, A.; VORAUER-UHL, K., 2011; AROURI, A. et al ., 2013; KOHLI, A. G. et al., 2014). Os lipossomas sítio-específicos ou imunolipossomas, assim chamados por obterem moléculas ligantes em sua membrana através de ligações covalentes ou pela inserção de resíduos hidrofóbicos, combinam com as propriedades dos lipossomas furtivos, originando os lipossomas de longa duração e com receptor específico. Embora os imunolipossomas demonstrem elevada especificidade, os anticorpos têm demonstrado resposta imunogénica e a sua afinidade com antígeno pode não obter sucesso dependendo do método utilizado para imobilizar o anticorpo sobre a superfície do lipossoma (WAGNER, A.; VORAUER-UHL, K., 2011; AROURI, A. et al ., 2013; KOHLI, A. G. et al., 2014).

Os lipossomas polimórficos ou bio-responsivos são aqueles que se tornam reativos, devido à mudança na sua estrutura desencadeada por uma alteração de pH, temperatura ou carga eletrostática. Quando se trata da ação antitumoral, o tecido neoplásico possui um pH menor que o fisiológico, conferindo aos lipossomas sensíveis de pH a sua utilização para liberar o fármaco no citoplasma. São também aplicáveis como: (a) transporte de sondas fluorescentes que permitem não somente avaliar a eficácia de diferentes composições de lipossomas, como também esclarecer os mecanismos envolvidos em seu tráfego intracelular; (b) a liberação eficiente de drogas antineoplásicas ou proteínas recombinantes; (c) transporte intracelular de antígenos; (d) transporte intracelular de material genético para aplicação nas terapias antisense e gênica (AROURI, A. et al ., 2013).

Outros tipos de lipossomas polimórficos são os termo-sensíveis, formados por uma mistura de lipídios que têm sua temperatura de transição de fase um pouco acima da temperatura fisiológica (37°C). Estes são utilizados na hipertermia (tecidos com tumores, metástase, inflamações e infecções), havendo a liberação do conteúdo lipossomal após serem estimulados por aquecimento externo superior dos constituintes lipídicos do sistema. Os lipossomas catiônicos apresentam carga positiva na superfície sendo utilizado na terapia gênica para liberação de ácidos nucleicos dentro das células (AROURI, A. et al ., 2013; GHARIB, R. et al 2015).

### **2.7.2.3 Métodos de preparação dos lipossomas**

A fabricação de lipossomas não é apenas a formação aleatória das membranas, mas obter membranas formadoras de vesículas com estrutura e tamanho ideais com propósito de encapsular substâncias biologicamente ativas. Há vários métodos de preparação de lipossomas (hidratação de filme fino, evaporação de fase reversa, congela e descongela, injeção de etanol e a secagem por congelação “*Freeze-dried*”), o mais clássico é o de hidratação do filme lipídico. Nesse, a fase orgânica é preparada com a solubilização dos lipídios por solventes orgânicos, em seguida, forma-se o filme lipídico pela evaporação do(s) solvente(s) à pressão reduzida. Então, a fase aquosa é adicionada ao recipiente contendo o filme lipídico seco formando-se espontaneamente as vesículas. Os lipossomas obtidos pelo método da hidratação do filme lipídico podem ser submetidos à ação de ultrassom com ajuda de uma sonda ou banho. A energia liberada da sonda promove a diminuição do raio dos MLVs tornando-os SUVs. Às vezes, as vesículas formadas são liofilizadas e, em seguida, re-hidratadas com uma solução salina para manter a osmolaridade dos lipossomas. Técnica essa denominada de “*Freeze-dried*” (PATIL, S. G. et al., 2006; PIEL, G. et al., 2007; AROURI, A. et al., 2013).

Alguns pesquisadores a fim de obter LUVs adicionam aos fosfolípidos um surfactante (por exemplo, Tween 80) na fase orgânica e após a formação dos SUVs pela hidratação de filme fino, condicionam as formulações em ciclos alternados e repetitivos para congelar e descongelar. Portanto, as vesículas formadas são grandes e com uma única lamela (LUVs originados pela metodologia do congelamento e descongelamento)(ASCENSO, A. et al., 2013).

Quando os lipídios dissolvidos num solvente orgânico é misturado conjuntamente a uma solução aquosa contendo um fármaco hidrofílico (obtendo uma emulsão de água em óleo) e o solvente orgânico é removido sob baixa pressão, essa técnica é conhecida como método de evaporação reversa, levando à formação de um gel viscoso. Outros estudos desenvolvem lipossomas dissolvendo os fosfolípidos em etanol, e a fase orgânica resultante

é injectada por gotículas numa fase aquosa sob agitação magnética (método de injeção de etanol) (AROURI, A. et al., 2013).

#### **2.7.2.4 Métodos de caracterização dos lipossomas**

Uma única caracterização dos lipossomas não é suficiente para resolver os problemas de análise, uma vez que não fornece uma visão abrangente do estado do material, é necessário também ser investigado a nível molecular pela caracterização química e física (DOMINGO, C.; SAURINA, J., 2012).

Para seleccionar a melhor formulação lipossomal presumindo a otimização do processo, os estudos de estabilidade acelerada e em longo prazo são bastante utilizados atualmente. As formulações são submetidas a condições críticas através de ensaios de centrifugação e estresse mecânico, avaliados pelo estudo de estabilidade acelerada. Já no estudo de estabilidade em longo prazo é avaliada a durabilidade das formulações. Os lipossomas podem ser caracterizados nestes estudos de estabilidade (acelerada e em longo prazo), determinando o teor e a eficiência de encapsulação, o diâmetro e a distribuição do tamanho das partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, variações de pH, além da cinética de liberação controlada. Outros pontos relevantes neste estudo são os aspectos macroscópicos e microscópicos, de acordo com a presença de aglomerados, precipitados e cristais do fármaco nas suspensões lipossomais (KUNTSCHE, J.; HORST, J. C.; BUNJES, H., 2011; DOMINGO, C.; SAURINA, J., 2012; GHARIB, R. et al 2015).

A determinação da quantidade de fármaco nos lipossomas pode ser de acordo com o teor de fármaco e/ou eficiência de encapsulação que muitas vezes é quantificada por espectroscopia de UV-VIS ou HPLC. Outros parâmetros são estudados por técnicas como: Difração de raios-X (DRX); Análise térmica incluindo calorimetria de varredura diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA); Espectroscopia infravermelho (IR); e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (DOMINGO, C.; SAURINA, J., 2012; GHARIB, R. et al 2015). Além disso, as nanovesículas são avaliadas pela morfologia e pode ser determinada através da microscopia eletrônica de varredura e/ou microscopia eletrônica de transmissão (KUNTSCHE, J.; HORST, J. C.;

BUNJES, H., 2011; DOMINGO, C.; SAURINA, J., 2012). Embora o tamanho dos lipossomas seja determinado na microscopia, o método mais confiável e reprodutível facilmente é através da dispersão dinâmica de luz (DLS). Nesse equipamento além de analisar o tamanho, identifica concomitantemente a dispersão dos lipossomas na solução. Ao integrar uma unidade de potencial Zeta no equipamento de DLS, é possível verificar também a carga de superfície dos lipossomas (DOMINGO, C.; SAURINA, J., 2012).

### **2.7.2.5 Aplicabilidade dos lipossomas para o câncer**

O excelente potencial para encapsular fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, e sua versatilidade em termos de composição, forma, tamanho, morfologia, os lipossomas constituem os nanotransportadores mais estudados entre os vários sistemas de liberação controlada conhecidos na indústria farmacêutica. O avanço nas pesquisas clínicas com doxorrubicina permitiu desenvolver em 1990 a primeira formulação lipossomal (DOXIL® - Lipossoma peguilado) aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration). O DOXIL® foi preparado para tratar pessoas com sarcoma de Kaposi relacionados com Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida (SIDA), minimizando os efeitos da cardiotoxicidade aguda relacionada com a administração do fármaco livre. Posteriormente, outros lipossomas foram aprovados para tratamento do câncer como: Myocet®, lipossomas com doxorrubicina não peguilada; Lipo-Dox®, formulação de lipossoma com constituinte lipídico diferente (DSPC) do DOXIL®; As diferenças das formulações está envolvida na farmacocinética. A droga livre tem uma meia-vida de eliminação de 0,2h, em comparação com 2,5 h para Myocet®, 55 h para Doxil® e 65 h para LipoDox®. (OLIVEIRA, J. et al., 2014; GHARIB, R. et al 2015).

Atualmente, a doxorrubicina foi encapsulada em lipossomas termo-sensíveis (ThermoDox®) que encontra-se ainda em ensaios clínicos para câncer com metástase de fígado e colorretal (Fase II), câncer de mama (Fase II) e câncer primário do fígado (Fase III). Vários outros produtos a base de lipossomas foram estudados experimentalmente com interesse no mercado farmacêutico. Exemplos de moléculas como anfotericina B e a nistatina

(antifúngicos, daunorrubicina, vincristina, citarabina, cisplatina e recetemente mitoxantrona (quimioterápicos), vidarabina (antiviral), e por último a gentamicina e ampicilina (antibióticos) (AROURI et al., 2013; OLIVEIRA, J. et al., 2014).

Os lipossomas também são aplicáveis para o diagnóstico de cânceres, encapsulando agentes de contrastes, índio e muramilpeptídeo (ativador de macrófagos tumorícidias). Também são empregados como veículos de agentes citostático, antivirais, antiparasitários, antifúngicos, hormônios, enzimas, vacinas e genes (BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. DE; MAGALHÃES, N. S. S, 2007; OLIVEIRA, J. et al., 2014; GHARIB, R. et al 2015).

### **2.7.3 Nanossistemas e 17-AAG**

Nos últimos anos, tornou-se claro que a utilização de drogas individuais para o tratamento do câncer tem limitações e pode ter contribuído para o desenvolvimento de quimioresistência adquirida, devido à heterogeneidade neoplásica e de mutação rápida. Assim, a utilização combinada de dois ou mais fármacos quimioterapêuticos com diferentes mecanismos de ação têm sido adotada na prática clínica. Isto ultrapassa as limitações da terapia de apenas um único fármaco e conferem benefícios adicionais, como redução da dose, a melhoria de efeitos colaterais não específicos e toxicidade, a erradicação de células cancerosas resistentes e efeitos sinérgicos (PRADHAN, R. et al., 2015).

O 17-AAG é um potente inibidor da Hsp90 ainda em fase de estudo clínico para diferentes tipos de câncer avançado, incluindo o de próstata metastático, melanoma, pulmão, cólon, pâncreas, cabeça e pescoço, câncer de ovário e de mama (CHANDRAN, T. et al., 2010). Contudo, nos estudos pré-clínicos, é visto que o 17-AAG tem sido utilizado em combinação com outros fármacos através de nanocarreadores. A combinação das drogas por um sistema de liberação controlada é uma estratégia bem adequada para controlar a farmacocinética e distribuir a droga em proporções desejáveis (M.E. GODSEY, M.E.; SURYAPRAKASH, S.; LEONG, K.W.; 2013). No entanto, a co-

incorporação de moléculas de drogas com diferentes propriedades físico-químicas tem sido um desafio para muitos pesquisadores.

Um nanocarrador bem projetado tem que ser ajustado pela carga das drogas e a estrutura do nanosistema, favorecendo assim um controle das taxas de liberação dos fármacos e uma entrega-alvo. Além de, maximizar a potência terapêutica, minimizar os efeitos tóxicos associados ao composto (CHANDRAN, T. et al., 2010; M.E. GODSEY, M.E.; SURYAPRAKASH, S.; LEONG, K.W.; 2013), há necessidade de verificar a toxicidade dos excipientes orgânicos, como cremophor e dimetilsulfóxido (DMSO) que são os mais usados para solubilizar agentes quimioterápicos (HUANG, et al., 2014). O DMSO provoca efeitos secundários graves (náuseas e vômitos) e é conhecido pelo potencial tóxico no fígado e cardiotoxicidade. O cremophor EL induz reações de hipersensibilidade que exigem o pré-tratamento com anti-histamínicos e corticosteróides (LEE, J. H.; NAN, A., 2012). Vários nanocarreadores foram desenvolvidos para quimioterapia combinada (múltiplos agentes), estes incluem lipossomas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros, micelas e nanogels (KATRAGADDA et al., 2013; SAXENA, V.; HUSSAIN, M. D., 2013; PRADHAN, R. et al., 2015).

Vários trabalhos citam a combinação do 17-AAG com outros agentes quimioterápicos demonstrando resultados promissores na eficácia antitumoral. Nanogéis contendo composto hidrofílico (Doxorrubicina) e hidrofóbico (17-AAG) foram desenvolvidos com polímeros biodegradáveis à base de poli (etileno-glicol) -b-poli (ácido L-glutâmico) (PEG-b-PGA) e demonstraram ação antitumoral superior, frente ao modelo de câncer mamário, em comparação com a droga livre ou encapsulada sozinha no nanosistema (DESALE, et al., 2015). Esses nanocarreadores são formados por domínios hidrofóbicos, o que permite a adsorção do 17-AAG, formados por porções de fenilalanina dentro dos núcleos reticulados do PGA cercado por um escudo PEG (hidrofílica) (KIM et al., 2013).

Outro polímero biodegradável muito utilizado na nanotecnologia farmacêutica, o poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), exibiu através formulações de nanopartículas (NPS) contendo um combinado antitumoral, docetaxel (DTX) e tanespimycin (17-AAG), efeitos sinérgicos em camundongos

portadores de tumor escamoso (KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YAVAD, S. C., 2010; PRADHAN, R. et al., 2013, 2014). Mesmo apresentando toxicidade sistêmica mínima, a inibição mais eficaz do crescimento tumoral (75%) foi observada nos animais tratados com nanopartículas revestidas com ácido hialurônico (PLGA-AH). A modificação da superfície dessas NPS desenvolvidas de PLGA com certos polímeros hidrofílicos permite aumentar a sua internalização celular (DANHIER, et al., 2012).

Uma estratégia de terapia combinada do 17-AAG com excelentes resultados em modelos pré-clínicos é a associação com o paclitaxel. Um potente agente estabilizador de microtúbulos, o paclitaxel é um tratamento de primeira linha para metástase de ovário, de mama e pulmão. Uma vez que, o 17-AAG sensibiliza as células tumorais o paclitaxel inibe o crescimento tumoral (SAWAI, A. et al., 2008; KATRAGADDA, U. et al 2011).

Para explorar o potencial terapêutico desta estratégia de combinação, foi desenvolvido outro sistema de liberação de fármaco (micelas poliméricas), livre de solvente orgânico para o paclitaxel e 17-AAG. As micelas poliméricas são nanocarreadores mais promissores para drogas fracamente solúveis em água evitando a toxicidade por serem biodegradáveis e biocompatíveis. Os conjugados de polietilenoglicol (PEG) e lípidios como PEG-diestearoil fosfatidiletanolamina (DSPE-PEG) formam micelas estáveis em meio aquoso (CHANDRAN, T. et al., 2010; KATRAGADDA, U. et al 2011). Segundo Katragadda e colaboradores (2011) as micelas poliméricas (DSPE-PEG) contendo o 17-AAG demonstraram um aumento do efeito tóxico nas células tumorais de câncer ovariano (SKOV-3), aumentando assim o índice quimioterapêutico das drogas.

Portanto, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos (lipossomas), capazes de viabilizar a administração da 17-AAG em uma formulação que melhore sua solubilidade, bem como, aperfeiçoe a dose terapêutica diminuindo os efeitos tóxicos, torna-se uma inovação tecnológica útil no desenvolvimento de alternativas para o tratamento de câncer.

## ***CAPÍTULO III***

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o potencial da ação antitumoral do 17-AAG (17-alil-amino-17-demetoxigeldanamicina) livre ou complexado com HP $\beta$ CD (2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina) nos lipossomas frente a modelos *in vitro* e *in vivo*;

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- ✓ Desenvolver e caracterizar lipossomas contendo o 17-AAG;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade das formulações lipossomais preparadas frente às células saudáveis;
- ✓ Avaliar o perfil antiproliferativo do 17-AAG livre e encapsulado nos lipossomas através de estudos *in vitro* e *in vivo*;
- ✓ Preparar e caracterizar por métodos físico-químicos os complexos de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD);
- ✓ Desenvolver, caracterizar e avaliar os lipossomas contendo o 17-AAG e complexos de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD);
- ✓ Avaliar a ação antiproliferativa do 17-AAG livre, complexado com ciclodextrina e encapsulado em lipossomas frente às células tumorais;
- ✓ Avaliar a ação antitumoral do 17-AAG livre e encapsulado em lipossomas frente ao modelo tumoral de erlich;

## ***CAPÍTULO IV***

#### 4. ARTIGO 01

### **Aumento do potencial antiproliferativo e antitumoral do 17-AAG encapsulado em lipossomas**

Thiers Araújo Campos<sup>1,2</sup>, Juliana da Silva Cruz<sup>2</sup>, Antonio Luis de Oliveira Almeida Petersen<sup>3</sup>, Patrícia Sampaio Tavares Veras<sup>3</sup>, Marlllyn Marques da Silva<sup>4</sup>, Noêmia Pereira da Silva Santos<sup>4</sup>, Alessandra Batista Mattos<sup>2</sup>, Janaina Viana de Melo<sup>2</sup>, Giovanna Machado<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Centro de Ciências Biológicas, CCBUFPE;

<sup>2</sup>Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise/LAMM - Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, CETENE/Recife-PE;

<sup>3</sup>Laboratório de Patologia e Biointervenção - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz /BA;

<sup>4</sup>Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células/NanoBioCel - Universidade Federal de Pernambuco;

\* Autor para correspondência:

Dra. Giovanna Machado

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE)

Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise

Av. Professor Luiz Freire n1, Cidade Universitária, Recife - PE- Brasil

CEP: 50.740-540

Tel: +55-81-3334-7235

E-mail: giovanna.machado@cetene.gov.br

## **Aumento do potencial antiproliferativo e antitumoral do 17-AAG encapsulado em lipossomas**

**RESUMO:** O 17-N-alil-amino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG) é um inibidor da proteína chaperona Hsp90 e tem sido estudado como um agente anticancerígeno. O seu uso terapêutico ainda é limitado devido a sua baixa hidrofiliabilidade e toxicidade. O estudo tem como objetivo principal desenvolver um nanossistema contendo 17-AAG e verificar a sua ação antiproliferativa com efeitos tóxicos reduzidos. Foram desenvolvidos e caracterizados lipossomas catiônicos contendo 17-AAG e avaliada sua ação através de análises *in vitro* (viabilidade celular para linhagem de células Hela, MCF-7, J774 e Sarcoma 180) e *in vivo* (atividade antitumoral utilizando o tumor de Ehrlich). Os lipossomas preparados pelo método da deposição do filme lipídico seco seguido de sonicação apresentaram monodispersos e com tamanho médio < 150 nm. O potencial zeta dos lipossomas passou de +21,13 para +11,43 mV após adição do 17-AAG na formulação. O tratamento dos lipossomas com 17-AAG, nas três células de câncer e nas diferentes concentrações estudadas, demonstraram percentuais maiores de inibição em relação ao composto livre. Os lipossomas branco desenvolvidos não foram tóxicos frente as células saudáveis como macrófagos (J774). Apesar de não haver significância estatística, nos ensaios de atividade antitumoral os lipossomas contendo o 17-AAG evidenciaram menor toxicidade. Isso sugere que os lipossomas desenvolvidos tem o mesmo efeito que o fármaco livre, no entanto os efeitos tóxicos são reduzidos como demonstrados nos estudos histopatológicos.

## 1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma ferramenta utilizada na manipulação de materiais na escala nano ( $10^{-9}$ ) que revolucionou uma rede de produtos farmacêuticos [1]. Frequentemente descritos como “*drug delivery systems*”, (sistemas de liberação controlada de fármaco) os sistemas nanoparticulados têm sido estímulo para o financiamento de pesquisas voltadas principalmente para terapia do câncer [2,3]. Em particular, a produção de medicamentos antineoplásicos, através de sistemas de liberação controlada de fármaco, destaca-se por apresentar potenciais como: (1) evita os efeitos secundários da formulação melhorando a solubilidade, (2) protege o fármaco de degradação, (3) modifica a farmacocinética e a aumenta a distribuição do fármaco nos tecidos tumorais, (4) reduz a toxicidade nas células saudáveis, e (5) promove o aumento da absorção celular e internalização em células cancerígenas [1].

Vários tipos de nanocarreadores (dendrímeros, lipossomas, nanopartículas de lípidos sólidas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas peptídicas, micelas, nanoemulsões, nanoesferas, nanoconchas, nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro, entre outros) com ou sem múltiplos agentes quimioterápicos foram bem caracterizados e demonstraram boa ação antitumoral, inclusive aumento de toxicidade frente às células tumorais resistentes a terapia convencional [1]. Contudo, as formulações lipossomais são os medicamentos mais utilizados em ensaios clínicos de terapia do câncer e muitos já foram aprovados (doxorubicina-Doxil®); daunorubicina-DaunoXome®; citarabina-DepoCyt®; vincristina-Onco-TCS®; paclitaxel-LEP-ETU (NeoPharm) e EndoTAG® [4,5 e 6].

A inibição da HSP90, o que leva à degradação e a sub-regulação de várias proteínas oncogênicas, é uma estratégia muito explorada como um tratamento para diversos tipos de câncer [7]. Inibidores de HSP90, tais como 17-AAG, tem mostrado um potencial significativo em ensaios clínicos com pacientes com tumor avançado [8]. No entanto, o 17-AAG provoca hepatotoxicidade grave e estas toxicidades também estão associadas com as formulações preparadas com o mesmo. A fraca solubilidade aquosa permitiu desenvolver formulações que requerem DMSO (dimetilsulfóxido) ou Cremophor como excipientes orgânicos em geral nas formulações. O DMSO provoca efeitos secundários graves (náuseas e vômitos) e é conhecido por ser potencialmente hepatotóxico e cardiotoxicos. O cremophor induz reações de hipersensibilidade que exigem o pré-tratamento com anti-histamínicos e corticosteroides [9].

Na tentativa de achar uma alternativa para veicular o 17-AAG em nanossistemas com efeitos tóxicos reduzidos o presente trabalho desenvolve

lipossomas contendo o tanespimicyn e avalia o potencial biológico frente a modelos experimentais de câncer *in vitro* e *in vivo*.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Materiais**

Os solventes clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) e metanol (MeOH) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O 17-alilamino-17-demetóxigeldanamicina (17-AAG), colesterol (COL) e a estearilamina (EST) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St.Louis, EUA); Fosfatidilcolina de soja (PC) (98% de Epikuron 200®) foi obtido a partir de Lipoid GMBH (Ludwigshafen, Alemanha).

### **2.2 Métodos**

#### **2.1 Preparação dos lipossomas**

Os lipossomas contendo 17-AAG foram preparados a partir do método da deposição do filme lipídico seco [10]. Desta forma, os constituintes lipídicos (Fosfatidilcolina de soja e Colesterol, na razão molar 8:2, p/p ou Fosfatidilcolina de soja, Colesterol e Esterilamina, razão molar 7:1,5:0,5, p/p) e o 17-AAG foram dissolvidos na mistura de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (3:1 v/v) sob agitação magnética. O solvente da mistura foi condicionando no balão para sua remoção à vácuo por 30 min através de um rota-evaporador ( $37 \pm 1$  °C, 80 rpm), resultando na formação do filme lipídico seco. Posteriormente, o filme lipídico foi hidratado com 10 mL da solução de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7.4, produzindo lipossomas multilamelares. Em seguida, esta suspensão lipossomal foi sonicada numa determinada amplitude (50%) a pulso (on 2s, pulso off 1s) durante 5 minutos, pelo equipamento ultrassonicador de ponta (Q500 da QSonica) para produzir lipossomas pequenos unilamelares [11].

#### **2.2 Caracterização dos Lipossomas contendo 17-AAG**

Os lipossomas foram caracterizados após a preparação, com isso foram analisados os seguintes parâmetros: variação do pH; tamanho de partícula ( $\emptyset$ ); índice de polidispersidade (PDI); potencial zeta ( $\zeta$ ) e eficiência de encapsulação do fármaco (% de EE).

O pH dos lipossomas foi aferido com um eletrodo de vidro através de medidor de pH digital (Orion 5-star plus, Thermo Scientific), à temperatura ambiente. As partículas lipossomais foram diluídas em água pura na proporção de 1:5 (lipossomas: água) e dimensionados por espectroscopia de correlação de fótons (Beckman Coulter Delsa™ Nano S Analisador de Partículas). As medições de tamanho e índice de polidispersividade foram efetuadas a 25 °C com um ângulo fixo de 90° e os tamanhos das nanopartículas foram indicados a partir da média do diâmetro hidrodinâmico lipossomal (nm). O potencial zeta ( $\zeta$  mV) dos lipossomas foi medido por uma técnica de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer Nano ZS, Malvern, Reino Unido) para analisar a carga de superfície das vesículas lipídicas. Neste método os lipossomas foram diluídos na mesma proporção do método anterior.

A eficiência de encapsulação (EE%) do 17-AAG nos lipossomas foi determinada através da técnica de ultrafiltração-centrifugação utilizando unidades ultrafree® (Millipore). Para determinação da taxa de encapsulação as amostras de lipossomas foram inseridas em unidades de filtração e submetidas a centrifugação (10.000 rpm, por 1 h, a 4 °C). O 17-AAG filtrado foi determinado por espectrofotometria UV ao  $\lambda_{\text{max}} = 333$  nm. A quantificação baseou-se utilizando uma curva padrão do 17-AAG dissolvido em metanol nas concentrações variando de 1.0 a 9.0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  preparados previamente. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O total de fármaco nas formulações foi averiguado de modo que uma alíquota dos lipossomas, equivalente ao ponto médio da curva padrão, foi dissolvida em 10 mL de metanol e sonicada por 5 min. Posteriormente o 17-AAG foi quantificado pelo mesmo método anterior citado. A partir disso foi calculado a eficiência de encapsulação demonstrado pela seguinte fórmula:

$$\text{Equação 1. } \% \text{ EE} = ([17\text{-AAG filtrado}] - [17\text{-AAG total}]) / [17\text{-AAG total}] \times 100.$$

## **2.3 Estudo *in vitro***

### **2.3.1 Cultivo celular**

Foram cultivadas células do tumor ascítico (sarcoma 180), células do câncer cervical humano (Hela), adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) e células de Macrófagos (J774). Todas as células foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro/UFRJ, exceto as células do Sarcoma-180. Estas foram mantidas em camundongos por transplantação *in vivo* (0,2 mL, contendo  $1 \times 10^7$  células) do tumor ascítico a partir de camundongos com o tumor pré-implantados. Todas as células

foram mantidas em frascos de cultura e incubadas com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) para células Sarcoma-180, Hela e J774 e meio RPMI-1640 para células MCF-7, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% estreptomicina/penicilina a 37°C em estufa úmida (5% de CO<sub>2</sub>).

### **2.3.2 Preparação das amostras**

A solução do 17-AAG livre, foi preparada a partir de 6,5 mg do composto diluído em 1mL DMSO (dimetilsufóxido) à 0,5% p/p. A concentração obtida de 11 mM da solução, foi filtrada através de um filtro Millipore (0,22 µm), e em seguida diluída com meio de cultura em várias concentrações de trabalho (0,39 à 6,25 µg/mL). Alíquota de lipossoma contendo o 17-AAG (650 µg/mL), também foi filtrada e diluída para 1 mL de meio de cultura, referente as concentrações adotadas. O procedimento adotado para o lipossoma branco foi o mesmo. O tipo de meio de cultura celular utilizado para diluição era de acordo com o a linhagem de células a serem avaliadas.

### **2.3.3 Ensaio de atividade antiproliferativa**

A fim de avaliar a ação antiproliferativa do 17-AAG livre e nos lipossomas, foram utilizadas linhagens de células de câncer (Sarcoma-180, Hela e MCF-7). Além disso, as formulações lipossomais sem o fármaco foram analisadas com o objetivo de investigar a citotoxicidade dos constituintes lipídicos frente às células saudáveis como os macrófagos murinos (J774).

As células foram plaqueadas (96 poços) e incubadas (10<sup>4</sup> à 10<sup>5</sup> células/poço) com meio DMEM ou RPMI-1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% estreptomicina/penicilina sob atmosfera úmida (5% de CO<sub>2</sub>) a 37°C. Após um período de 24h, as células foram tratadas com 17-AAG ou LP-17-AAG (0,39 – 6,25 µg/mL) e incubadas por 48h. O grupo controle foi tratado com 0,1% de dimetil sulfóxido (DMSO). O crescimento celular foi quantificado pelo método de redução do 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) ao composto azul de formazan. O meio foi substituído por uma solução contendo MTT (0,5 mg/mL) por 3h para formação dos cristais de formazan que foram dissolvidos com DMSO. As absorvâncias foram medidas a 570 nm em um leitor multiplate (Multiskan Go, Thermo). O percentual de inibição celular foi calculado em relação as células tratadas com 17-AAG ou LP-17-AAG e comparadas ao grupo controle (DMSO 0,1%) representada na equação 2. A partir dos dados, uma curva de resposta da dose foi traçada e a concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) foi determinada.

$$\text{Equação 2. INIBIÇÃO (\%)} = 1 - \frac{[A_{570} \text{ população celular tratada}]}{[A_{570} \text{ população celular não tratada}]} \times 100$$

## **2.4 Estudo *in vivo***

### **2.4.1 Indução do tumor nos camundongos**

O tumor ascítico de Ehrlich foi escolhido como modelo experimental de tumores dentre os vários modelos experimentais existentes para os agentes anticancerígenos, pois suas células crescem rapidamente e é utilizada uma metodologia fácil de ser aplicada [12].

O fluido ascítico contendo células de tumor de Ehrlich viáveis foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL. As células de Ehrlich foram centrifugadas a 3000 xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi dissolvido em solução salina suficiente (0,9%) para obter o volume original. Este processo foi repetido, e as células foram coradas com uma solução de azul de tripan (0,4%) e contadas usando uma câmara de Neubauer com um microscópio com ampliação de 400 X.

A suspensão de células viáveis com uma densidade média de  $5,0 \times 10^6$  células/mL foi preparada para ser implantado no flanco direito de camundongos machos suíços (*Mus musculus*), com uma massa corporal de aproximadamente 35 g. As experiências em animais foram realizadas de acordo com a aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil). Os camundongos foram doados pelo Biotério do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (Recife/PE) e mantidos no Biotério do Centro Acadêmico de Vitória (CAV/UFPE), em uma área com iluminação controlada com acesso livre à comida e água. A implantação de tumor de Ehrlich sólido foi baseada no protocolo experimental realizado em estudos anteriores [13].

### **2.4.2 Tratamento dos animais com tumor**

Após 24 horas de inoculação do tumor, os camundongos foram tratados com doses intraperitoneais diariamente durante sete dias, contendo 1,3 mg de fármaco/Kg de peso do animal. Foram divididos em três grupos (n=7): 1- o controle, que recebeu dose de solução salina, 2- grupo que recebeu dose apenas do 17-AAG livre e 3- grupo

que recebeu a dose de lipossomas contendo 17-AAG. As doses foram preparadas a partir de uma solução com Tween 80 (0,5 % v/v em solução estéril de NaCl a 0,9%).

### **2.4.3 Avaliação da atividade antitumoral**

No oitavo dia, antes do sacrifício, os camundogos foram pesados na tentativa de avaliar a perda de peso. A inibição do crescimento do tumor foi avaliada através da remoção cirurgicamente dos tumores e analisado pelo volume tumoral com a utilização de um paquímetro, de acordo com a equação:  $v(\text{mm}^3) = (a \times b^2)/2$ , onde “a” e “b” são extensões de maior e menor diâmetro do tumor, respectivamente (LI et al., 2015).

Tumores e órgãos (fígado, rins e baço) foram retirados, e seus pesos foram medidos. Para análise histopatológica, os órgãos juntamente com o tumor, foram lavados com solução de NaCl 0,9% (p/v) e fixados em formaldeído a 10% (v/v). Os fragmentos dos tecidos foram incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura e corados pelo método hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram analisadas por imagens obtidas usando um microscópio óptico conectado a uma câmera. A histopatologia do tumor foi investigada pelo índice mitótico através do *software* Image J versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.) onde foi contabilizado o número de mitoses e averiguado através da média. As fotomicrografias foram avaliadas por 10 campos para cada lâmina com aumento final de 400x. Para confecção do gráfico os valores obtidos foram normalizados para o controle, sendo o controle igual a 100%.

### **2.5 Análise estatística**

Os valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) foram validados utilizando testes de análise de variância (ANOVA) não paramétricos de amostras independentes seguidos pelo pós-teste de bonferroni, para comparações múltiplas, ou teste *t student* quando comparado apenas por duas amostras. Todos os dados quantitativos foram em triplicata adotando a média dos valores e o seu desvio padrão, plotados através do *software* GraphPad Prism 6.0.

## **3.RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Avaliação da caracterização dos lipossomas**

Os lipossomas preparados pelo método da deposição do filme lipídico seco seguido de sonicação foram desenvolvidos sem o fármaco (LP-Branco) e com 17-AAG (LP-17-AAG). Nas formulações lipossomais também foi verificado pela presença ou ausência de um constituinte lipídico que confere carga positiva no nanossistema, a estearilamina (STE) (Tabela 1).

Após 24 horas de preparo da formulação, macroscopicamente os lipossomas apresentaram-se uma solução homogênea com aspecto leitoso e um reflexo azulado, características típicas de vesículas nanométricas monodispersa [11]. Essa informação é identificada pelo tamanho médio dos lipossomas obtidos que variaram entre 130,7 à 147,7 nm, assim como, no índice de polidispersão (0,208 – 0,317). Apesar de não haver diferenças significativas no tamanho e PDI, é visto que os lipossomas contendo o 17-AAG apresentaram-se maiores quando comparado aos brancos.

**Tabela 1.** Caracterização dos lipossomas branco e contendo o 17-AAG encapsulado.

| Formulação        | Parâmetros   |              |       |                  |      |
|-------------------|--------------|--------------|-------|------------------|------|
|                   | EE%          | Ø (nm)       | PDI*  | Potencial Z (mV) | pH   |
| LP-Branco (S/EST) | ND           | 134,9 ± 1,02 | 0,280 | ND               | 7,42 |
| LP-Branco (C/EST) | ND           | 130,7 ± 1,82 | 0,308 | +21,13 ± 0,68    | 7,61 |
| LP-17-AAG (S/EST) | 99,04 ± 0,67 | 142,3 ± 0,98 | 0,280 | ND               | 7,42 |
| LP-17-AAG(C/EST)  | 99,45 ± 0,21 | 147,7 ± 4,96 | 0,317 | +11,43 ± 0,65    | 7,60 |

\*PDI: Índice de Polidispersividade.

ND= Não determinado.

(S/EST.) - Sem constituinte lipídico estearilamina nos lipossomas.

(C/EST.) - Com constituinte lipídico estearilamina nos lipossomas.

Os dados estão apresentados em média ± desvio padrão.

Não houve diferenças estatísticas significativas em  $p < 0,05$  foram encontrados.

A sua composição química baseada apenas de fosfatidilcolina (PC) e colesterol (COL) permitiu uma excelente eficiência de encapsulação (99%) similar a qual foi preparada com a adição de um constituinte lipídico de carga positiva (STE). Dependendo da composição da membrana lipídica dos lipossomas, fármacos lipofílicos podem afetar a sua espessura, fluidez, polaridade e influenciar no encapsulamento de fármacos hidrofílicos [14]. Neste caso, os lipossomas desenvolvidos com e sem a STE, não obtiveram alteração na taxa de encapsulação do 17-AAG. A concentração lipídica é outro fator, segundo Xu e Burgess (2012), baixas concentrações de lípidos nos lipossomas, <100 mM, aumenta proporcionalmente a eficiência de encapsulação, com isso a formulação de 42 mM usada neste trabalho, confirma o que está descrito na literatura [15].

A carga de superfície das membranas, também depende da composição química dos lipossomas. A adição da STE na formulação lipossomal induz mudanças para uma carga positiva na superfície, tornando os lipossomas mais estáveis [16]. Essa propriedade foi investigada quando as formulações foram submetidas a um potencial elétrico e demonstrou uma diminuição de carga nos lipossomas quando adicionou o 17-AAG. O potencial zeta dos lipossomas passou de +21,13 para +11,43, resultando em uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ). As cadeias longas da PC resultam em uma maior atração de forças de van der Waals [17], promovendo uma forte coesão entre o 17-AAG e a bicamada lipídica dos lipossomas. Uma vez que, a interação entre droga e a membrana bicamada lipídica é eletrostática [18], o COL e a STE interagem entre si e com o fármaco, o que possibilitou a diminuição da carga e o aumento de tamanho. Nos lipossomas sem STE não foi possível mensurar sua carga, o software apresentou uma qualificação informando para consultar a qualidade da amostra. Acredita-se que as formulações sem STE deste estudo são instáveis e sofreram pequenas aglomerações devido a coalescência dos lipídios.

O pH também altera a carga elétrica da superfície proporcionado pela adsorção de íons presentes na solução da fase aquosa que ressuspende o filme de lipídio na preparação dos lipossomas [19]. Contudo, os lipossomas preparados neste estudo apresentaram um pH com variação entre 7,4 a 7,6, não evidenciando diferenças significativas. Apenas é observado uma elevação mínima de pH nos lipossomas contendo STE. As moléculas de estearilamina consistem de duas partes, um domínio hidrófobo e um domínio ionizável atribuído ao átomo de nitrogênio carregado positivamente devido ao pH fisiológico ( $\pm 7,4$ ). Com base nestes resultados, os lipossomas com estearilamina contendo o 17-AAG foram escolhidos para os ensaios biológicos.

### **3.2 Estudo *in vitro***

#### **3.2.1 Avaliação da atividade antiproliferativa**

Para examinar o efeito anti-proliferativo do 17-AAG nos lipossomas catiônicos, foi realizado o ensaio de inibição da proliferação celular nas linhagens de células cancerígenas (Figura 1). As células do câncer cervical Humano (Hela), adenocarcinoma Mamário Humano (MCF-7) e células do tumor ascítico sarcoma 180 (S-180) exibiram característica de efeitos inibitórios no crescimento celular após 48 horas de tratamento para todos os grupos testados. De acordo com ensaio de MTT, os lipossomas contendo o 17-AAG na concentração de 6,25  $\mu\text{g/mL}$  que corresponde a

10  $\mu\text{M}$ , apresentou uma inibição de 58,19 %, para Hela, 52,08 % para MCF-7, e 51,25 % para células do S-180. Quando comparado ao fármaco livre é identificado que não há diferença estatisticamente significativa, mesmo observando uma redução do percentual para 47,30 %, 51,62 % e 41,68%, nas células Hela, MCF-7 e S-180, respectivamente.

O tratamento dos lipossomas com 17-AAG, nas três células de câncer e nas diferentes concentrações estudadas, demonstraram percentuais maiores na inibição em relação ao composto livre. As células que receberam lipossomas contendo STE podem induzir a fosforilação da tirosina e treonina, a clivagem e a translocação nuclear de proteína quinase, geralmente estas proteínas estão associadas aos processos pró-apoptóticos [20].

Os valores da concentração inibitória ( $\text{IC}_{50}$ ) para o 17-AAG livre e encapsulado nos lipossomas foram calculados e estão representados na tabela 2. Observa-se que o 17-AAG encapsulado nos lipossomas diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) para células Hela e MCF-7. Mesmo as células S-180 apresentando uma diminuição passando de  $>6,25 \mu\text{g/mL}$  (fármaco livre) para  $5,93 \mu\text{g/mL}$ , a concentração inibitória que inibiu 50% das células, não foi estatisticamente significativo. A resistência na inibição pode está atribuído a agressividade das células (S-180) [21] ainda não esclarecido ou no mecanismo de ação do 17-AAG, que não está envolvido na biologia oncogênica para sarcoma-180.

**Tabela 2.** Valores da concentração inibitória ( $\text{IC}_{50}$ ) para 17-AAG e LP-17-AAG.

| Formulação | $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) |                   |                   |
|------------|---------------------------------------|-------------------|-------------------|
|            | MCF-7                                 | Hela              | Sarcoma-180       |
| 17-AAG     | $> 6,25^a$                            | $> 6,25^b$        | $> 6,25^c$        |
| LP-17-AAG  | $3,82 \pm 0,50^a$                     | $3,34 \pm 0,46^b$ | $5,93 \pm 0,28^c$ |

Os dados estão apresentados em média  $\pm$  desvio padrão.

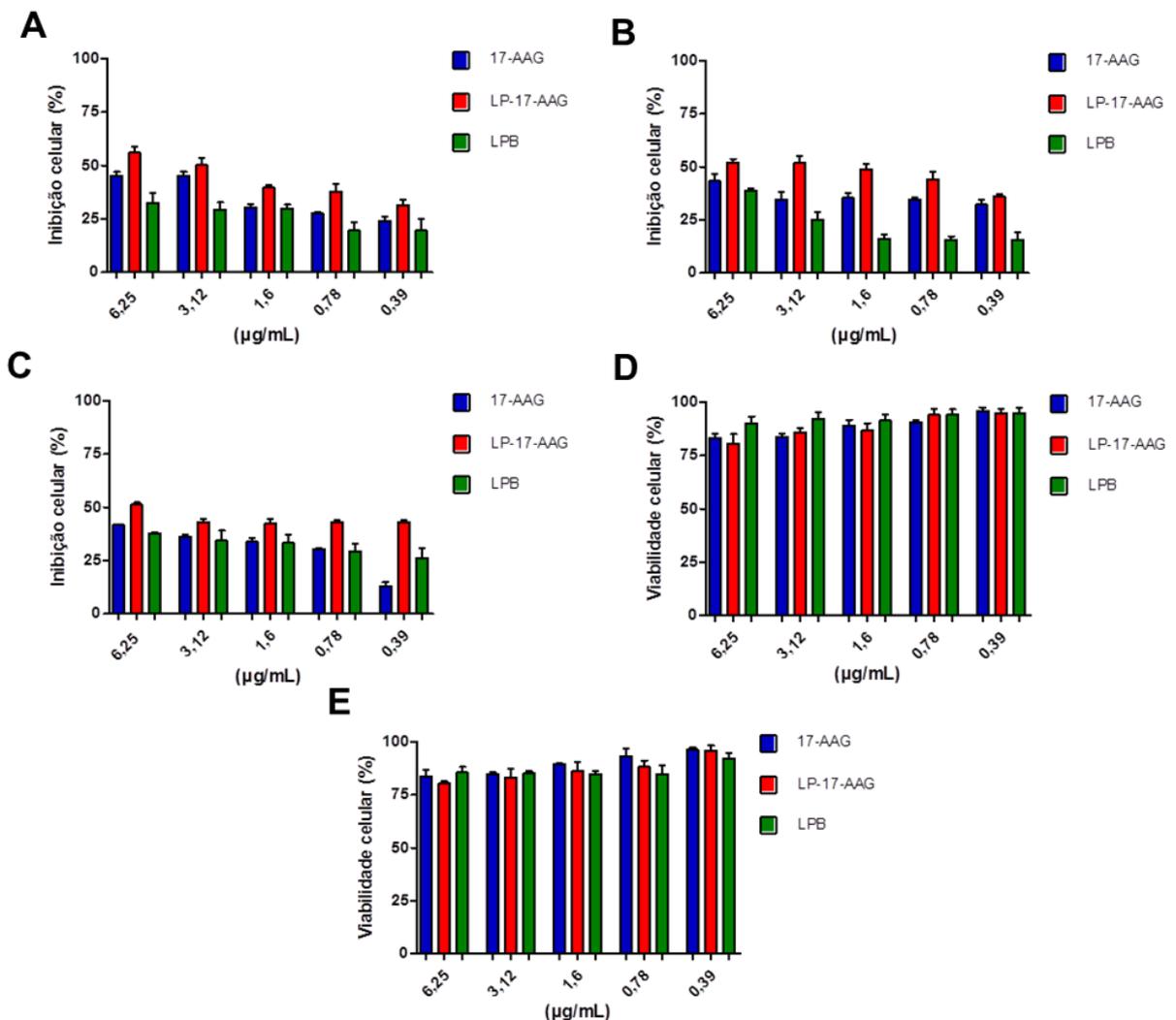
<sup>a, b</sup>  $p < 0,05$  (teste *t student*) significativamente diferente.

<sup>c</sup> Não houve diferenças estatísticas significativas em  $p < 0,05$ .

A inibição do crescimento das células de linhagem cancerígena também foi visualizada no tratamento com lipossomas sem o fármaco. No entanto, esse percentual de inibição é relativamente mínimo comparado ao 17-AAG livre e encapsulado. A apoptose induzida por lipossomas catiônicos é observada principalmente em células fagocíticas, tais como linhagem de células de macrófagos

[22]. Os lipossomas brancos desenvolvidos não foram tóxicos frente às células saudias como macrófagos (J774) quando tratadas por 24 e 48 horas (Figura 1). A viabilidade celular dos macrófagos superior a 80% nas diferentes concentrações e tratamentos corroboram que o 17-AAG encapsulado em lipossomas tem o potencial aumentado, tornando um promissor produto para terapia do câncer sem efeitos adversos.

**Figura 1.** Avaliação da citotoxicidade do 17-AAG livre e encapsulado nos lipossomas frente às células de câncer como: A- cervical Humano (Hela), B- adenocarcinoma Mamário Humano (MCF-7), C- células do sarcoma 180 (S-180), D e E macrófagos (J774). Os grupos foram tratados no período de 48 h, exceto os macrófagos que foram tratados também por 24 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando a média dos valores e seu desvio padrão.



### **3.3 Estudo *in vivo***

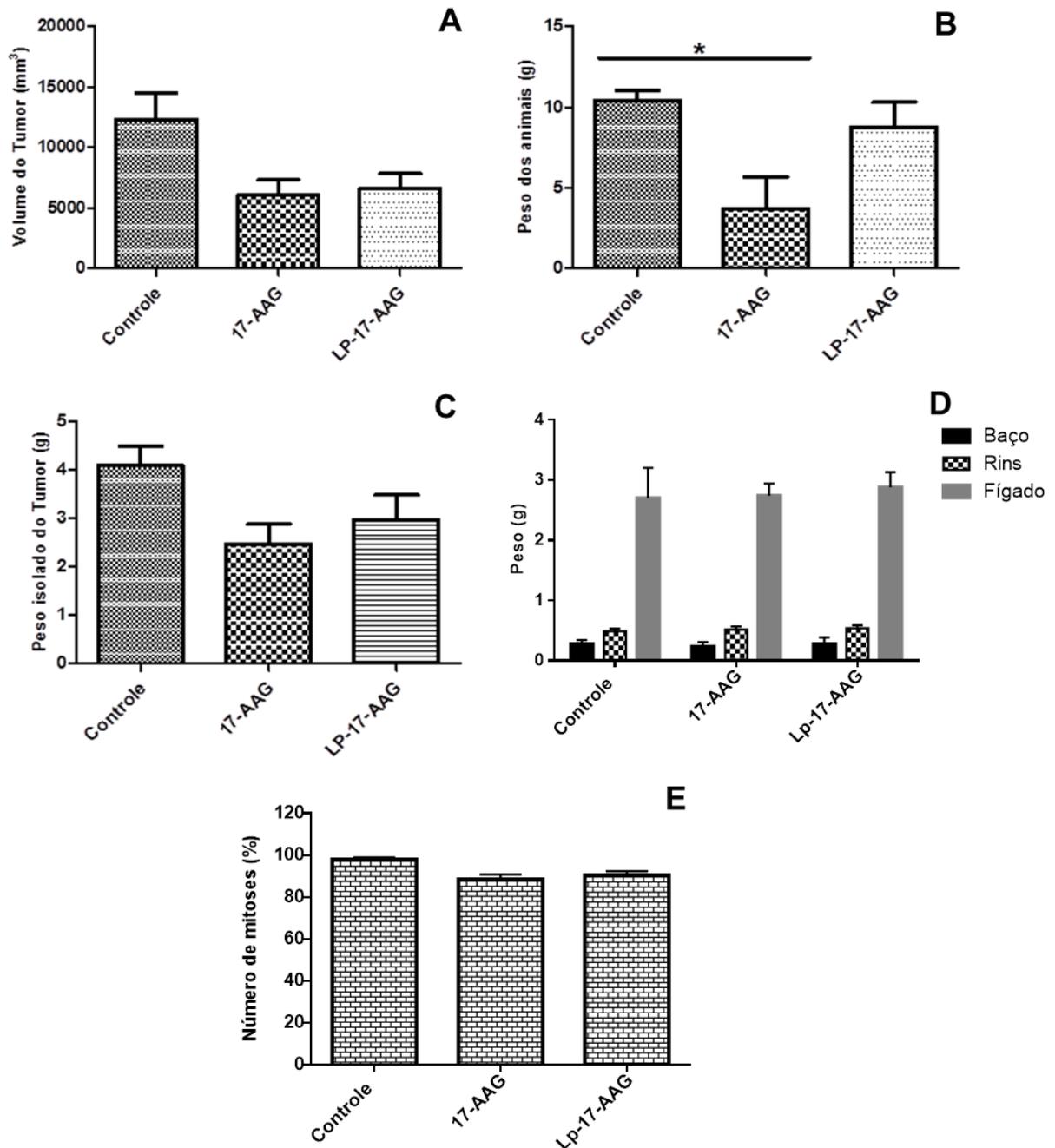
#### **3.3.1 Avaliação antitumoral do 17-AAG e LP-17-AAG**

O ensaio da atividade antitumoral representado pela média do volume tumoral (Figura 2A), não demonstrou estatisticamente significância entre os grupos tratados (17-AAG livre, encapsulado em lipossomas) e não tratado (controle) por um período de 7 dias. Este resultado está de acordo com o estudo da ação antitumoral da doxorubicina encapsulada em lipossomas (Lipo-Dox), utilizando o modelo experimental de tumor de Erlich. O grupo que recebeu a dose intravenosa de Lipo-Dox de 1,3 mg/Kg não apresentou significância estatística em comparação ao grupo não tratado [12]. Contudo, esse ensaio foi realizado num período de 21 dias o que difere do nosso estudo.

Outra informação obtida que confronta com os resultados da literatura, geralmente dados estatísticos não apresentados, é o valor da diferença do peso do animal no início e no final do tratamento representado na figura 2.B. O grupo que recebeu apenas a dose do 17-AAG livre (1,3 mg/kg), no decorrer dos dias estudados observou uma perda de peso significativa em comparação ao grupo controle. A hepatotoxicidade do composto pode levar a falta de apetite, acarretando na perda de peso como ocorre com muitos quimioterápicos [23, 24]. Por outro lado, os animais que receberam os lipossomas contendo a droga de estudo não demonstraram valores correspondentes à significância ( $p > 0,05$ ). Provando que os nanosistemas desse estudo, os lipossomas, promoveram à diminuição da toxicidade do composto.

A inibição do crescimento tumoral também foi avaliada pelo peso isolado do tumor (Figura 2C). Para o grupo tratado com a droga livre apresentou um percentual médio de  $60,53 \pm 0,90\%$  e o grupo tratado com o 17-AAG encapsulado em lipossomas de  $72,71 \pm 1,24\%$ . A pouca diferença não significativa pode está atribuída à quantidade de dias analisados (7 dias). Saad e Maad (2014) observaram que os estudos com 21 dias de tratamento em camundongos com tumor de Erlich, demonstraram resultados mais significativos ( $p < 0,01$ ) quando encapsularam a doxorubicina em lipossomas [12].

**Figura 2.** A-Volume tumoral em função dos grupos tratados com o 17-AAG livre, LP-17-AAG e não tratados (controle); B- Avaliação do peso dos animais, \* Encontrado diferença estatística ( $p < 0,05$ ); C- Avaliação do peso do tumor; D- Análise do peso dos órgãos (baço, fígado e rins); E- Avaliação do número de mitoses no tecido tumoral.



O número de mitoses encontrado no tumor é outro parâmetro que expressa a atividade no processo de divisão celular. Quanto menos mitoses encontradas, podemos sugerir diminuição da sinalização do crescimento celular. Dessa forma, a análise do índice mitótico é um importante indicador de proliferação celular [25]. Várias células tumorais com mitose foram registradas em camundongos com tumor sólido de Erlich para os tratamentos em estudo (17-AAG livre e LP-17-AAG). De acordo com os

resultados histopatológicos do tumor, através do índice de mitose (Figura 2E), o percentual observado para o tratamento com o LP-17-AAG de  $90,58 \pm 1,78\%$  não foi diferentemente significativa para o tratamento com o 17-AAG livre ( $88,51 \pm 1,78\%$ ).

Uma vez que, essa molécula é referenciada em vários trabalhos com ação antitumoral em nanossistemas como: micelas lipídicas ou poliméricas [26,27], nanogels [28] e nanopartículas [29], ainda não foi provado um sistema nanotecnológico que apresente efeitos tóxicos reduzidos. Os lipossomas desenvolvidos nesse ensaio não apresentaram aumento de peso em relação aos órgãos, do baço, fígado e rins (Figura 2D). Os resultados divulgados são preliminares para definir a diminuição da toxicidade do composto nos lipossomas. Há a necessidade de estudos complementares como a histologia desses órgãos, que será abordado a seguir.

### **3.3.2 Análise da histopatologia do Fígado, Baço e Rins**

Neste estudo foram visualizados através de microscopia óptica, os cortes histológicos do Fígado, Baço e Rins. As lâminas foram preparadas e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) com objetivo de identificar as alterações histopatológicas entre os grupos tratados.

As fotomicrografias do tecido hepático dos camundongos que foram inoculados com o tumor de Erlich e tratados com solução salina (Grupo Controle) demonstraram hepatócitos com núcleos grandes (alguns binucleados), esféricos e centrais. Semelhantes ao descrito na literatura, os hepatócitos estão associados ao arcabouço de vasos sanguíneos (sinusóides) o que foi possível verificar presença de hemácias no interior desses espaços sinusóides (Figura 3.A).

Ao comparar o corte de tecido hepático dos animais que foram previamente tratadas com 17-AAG, observaram-se células hepáticas menos vacuolizadas dispostas em espaços sinusóides mais dilatados do que os demais tratamentos, porém sem eritrócitos (Figura 3.B). Além disso, é notado uma balonização dos hepatócitos (aumento de volume citoplasmático) e deslocamento do núcleo para a periferia, dando à célula o aspecto de um anel (Figura 3.C). É uma lesão caracterizada por esteatose hepática.

Esse efeito pode estar atribuído ao caráter hepatotóxico do fármaco. Certos medicamentos também podem desencadear um processo inflamatório e degeneração gordurosa no órgão, por ocasionar lesões nas mitocôndrias do fígado, dificultando a metabolização adequada de gorduras. O acúmulo de gordura no interior dos hepatócitos tem por finalidade estocar energia para momentos de necessidade

(processo natural), onde a energia acumulada é muito maior do que no açúcar e proteínas. As células do fígado controlam os níveis de colesterol, levando o excesso de gorduras do sangue para o seu interior. Muitas vezes o excesso de armazenamento da gordura pode acarretar em uma doença metabólica, denominada esteatose hepática. Essa reação pode levar ao aparecimento de fibrose, induzindo a formação de nódulos (cirrose), que representa o estágio final de diversas doenças hepáticas crônicas [30,31].

Entretanto, não foi identificado esteatose no fígado dos animais tratados com lipossomas contendo o 17-AAG (LP-17-AAG). Por outro lado, outras alterações histológicas foram evidentes em todos os tratamentos: presença de células tumorais aderidas na cápsula hepática (Figura 3.D), hiperplasia reacional de células de Kupffer (Figura 3.E) e infiltração linfocitária no espaço porta (Figura 3.F).

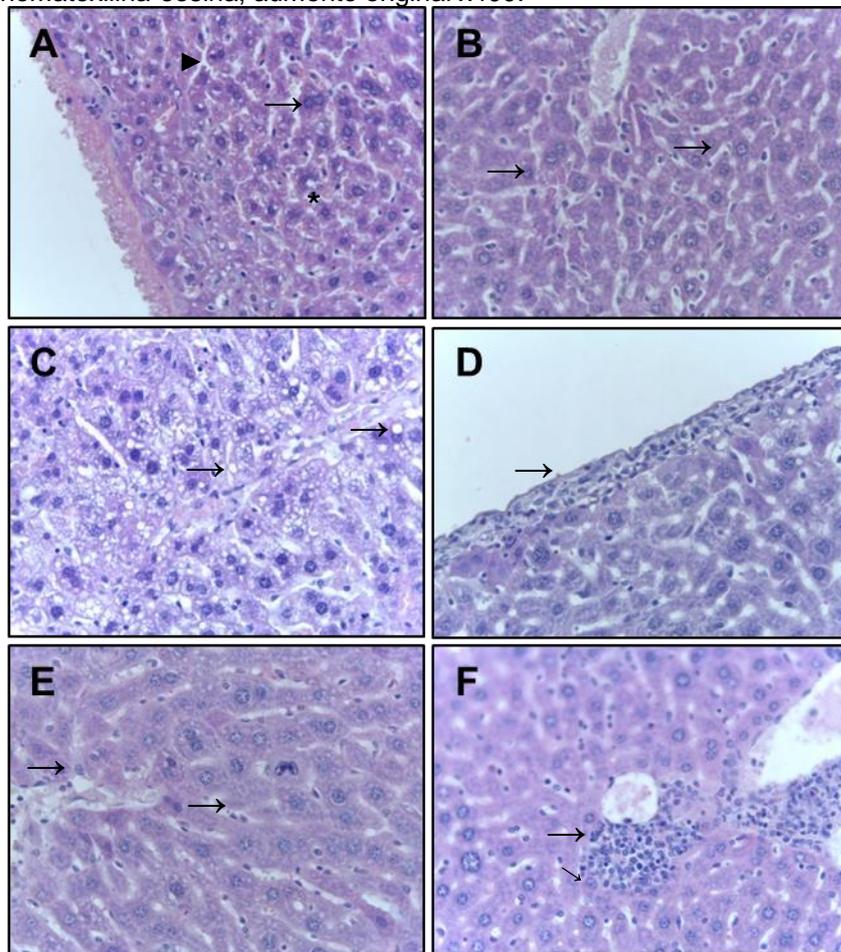
As alterações detectadas nos animais, congestão sinusoidal (eritrocitária e linfocítica), esteatose e inflamação são provenientes dos efeitos tóxicos de substâncias que podem atingir todos os sistemas e órgãos, porém é o fígado que apresenta maior susceptibilidade, provavelmente devido a dois fatores importantes: a) a sua posição anatômica, que o torna mais vulnerável e, b) o seu próprio determinismo funcional, que condiciona maior concentração celular, não apenas dos compostos a serem transformados, como também dos metabólitos resultantes. Várias desordens hepáticas distintas podem ser desencadeadas pelo uso de drogas, incluindo hepatite aguda e crônica, hepatite fulminante, cirrose hepática, doenças hepáticas colestáticas, doença hepática gordurosa não alcoólica, distúrbios vasculares do fígado e tumores hepáticos [31,32].

Na histomorfologia do baço dos animais (Figura 4.A, B e C), observou-se folículos linfóides, com presença de área maior da polpa branca no grupo do controle e tratado com lipossomas contendo o 17-AAG. Na polpa branca, encontram-se regiões de células B (folículos linfóides) e regiões de células T (córtex parafolicular). O baço é um órgão linfóide secundário formado por polpa branca e polpa vermelha. A polpa branca é uma região responsável pela resposta imunológica enquanto a polpa vermelha é responsável pela remoção de hemácias defeituosas [33].

Nos camundongos tratados apenas com fármaco não são visíveis esses nódulos da polpa branca, o que aparentemente apresentam-se fusionados, indicativo de um processo de ativação do sistema imune. A expansão da polpa vermelha muitas vezes mostra uma aparência difusa vermelha e geralmente é vista nas neoplasias mielóides incluindo neoplasias mieloproliferativas e leucemia mielóide aguda; leucemia linfoblástica aguda; bem como linfoma de célula B e linfoma de célula T. As anormalidades difusas da polpa vermelha do baço são devido à deposição anormal de

um produto metabólico em macrófagos esplênicos [33]. Possivelmente o resultado observado induz acreditar na deposição do 17-AAG ou na proliferação do câncer para o órgão esplênico. Por outro lado, não foram observadas alterações na polpa vermelha dos animais tratados com salina e LP-17-AAG.

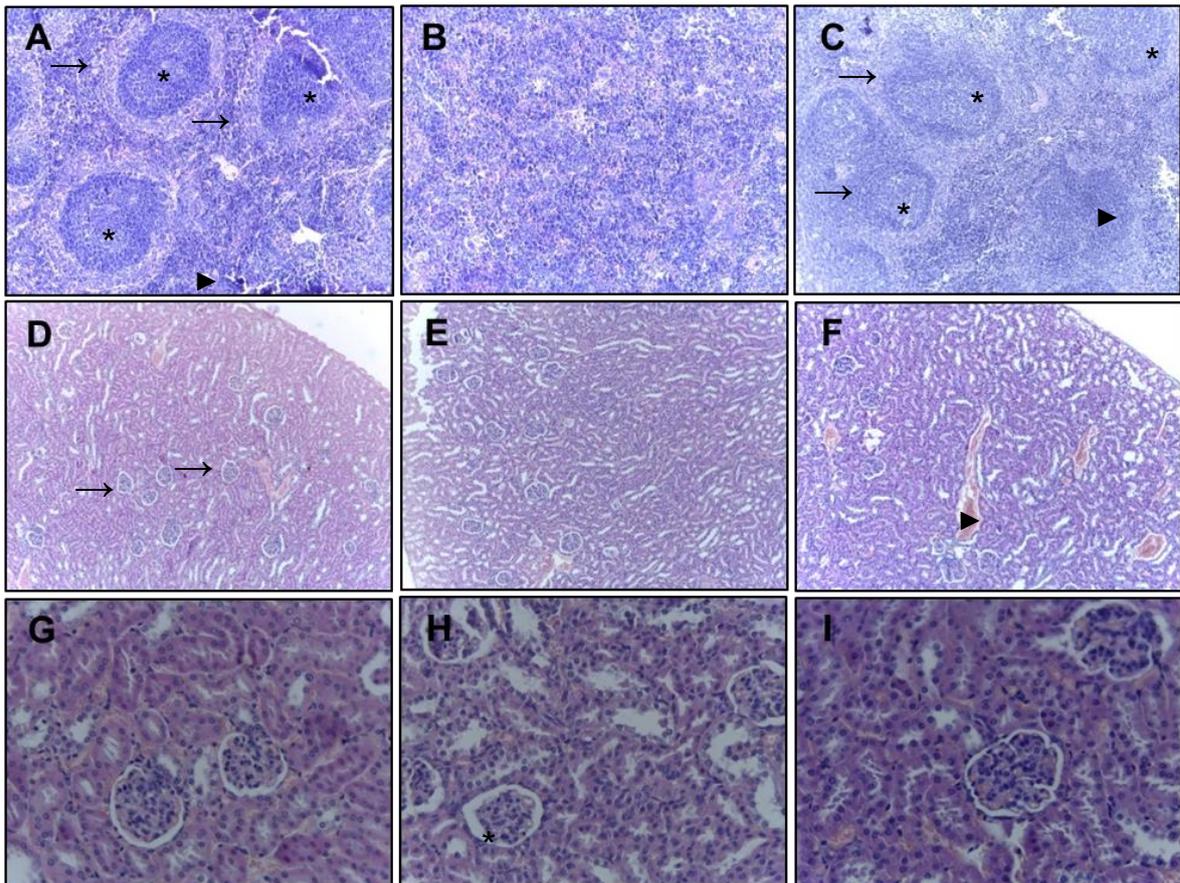
**Figura 3** - Fotomicrografias do fígado dos camundongos Swiss com tumor de Erlich. Grupo Controle (A) – Hepatócitos com binúcleos (→), espaços sinusóides (▶) e a presença de eritrócitos (\*); Grupo de animais que recebeu o tratamento do 17-AAG(B, C e D) – Aumento dos espaços sinusóides (B), esteatose hepática (C) e a aderência das células de Erlich no epitélio do fígado (D); Grupo de animais que recebeu o tratamento dos Lipossomas contendo o 17-AAG (E e F) – Células de Kupffer (E) e infiltrado inflamatório (F). Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x400.



Os rins do grupo controle com o tumor transplantado e dos grupos tratados com 17-AAG e LP-17-AAG (Figura.4 D-I) apresentaram histologicamente lóbulos bem definidos (pirâmide medular e tecido cortical recobrendo a sua base e lados) e lóbulos bem preservados. Os glomérulos (túbulos de Malpighi) preservados, inclusive numericamente, apresentaram um aspecto de espaço subcapsular dentro da normalidade do tecido e em seu contorno são observadas células epiteliais

proveniente da cápsula de Bowman. Apenas o grupo tratado com o 17-AAG livre evidenciou alguns glomerúlos com o espaço capsular aumentado e túbulos renais com arcabouço desorganizado e disforme comparado aos outros grupos (Controle e LP-17-AAG).

**Figura 4** - Fotomicrografias do baço e rins dos camundongos Swiss com tumor de Erlich. Baço (A, B e C) – Folículos nodulares (→) na presença de polpa branca (\*) e vermelha (▶); Rins (D, E, F, G, H e I) – Glomérulos renais(→) com espaço capsular (\*) e congestão vascular (▶). Grupo Controle (A, D e G), Grupo de animais que recebeu o tratamento do 17-AAG (B, E e H); Grupo de animais que recebeu o tratamento dos Lipossomas contendo o 17-AAG (C, F e I); Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x100 (A-F) e x400(G-I).



Para todos os grupos é observada uma congestão vascular nos interstícios dos vasos renais e glomérulos renais. A exposição a materiais tóxicos para o rim (agentes nefrotóxicos) causa lesão ou destroem as estruturas internas do órgão, em particular os tecidos do túbulo renal. Essas são umas das alterações estruturais mais comuns associadas ao desenvolvimento da insuficiência renal aguda [34, 35], uma vez que a patogênese do dano renal ainda não é muito bem entendida, algumas evidências sugerem coagulação vascular disseminada, a ação de substâncias proteolíticas e

vasoativas que poderiam promover e potencializar os processos de coagulação nos sítios renais [34, 35].

A análise histopatológica não evidenciou alterações nos rins dos animais tratados demonstrando uma baixa toxicidade do composto sobre esse órgão. Os rins têm por função controlar a homeostase e garantir a excreção de resíduos metabólicos, regulando o volume extracelular e balanço eletrolítico (ácido-básico), pois lesões renais podem representar danos irreversíveis. Perdas de até 50% das funções renais podem não ser percebidas, e acima disso já é considerada Síndrome Urêmica, que pode manifestar-se em praticamente todo o organismo [36].

#### **4. CONCLUSÃO**

Usando um modelo de câncer, tumor ascítico de Ehrlich, foi demonstrado o potencial dos lipossomas catiônicos como nanocarreadores para a entrega de quimioterápicos com o inibidor de HSP90, o 17-AAG. Os lipossomas desenvolvidos tem mostrado baixa citotoxicidade para as células normais (J774) e um efeito tóxico melhor que o composto livre. As nanovesículas de lipídios formadas apresentaram tamanhos e monodispersividade aplicáveis em tratamentos por via intraperitoneal. A presença da estearilamina na composição lipídica favoreceu a estabilidade das formulações, assim como a molaridade proposta no encapsulamento do 17-AAG. A ação citotóxica no período de 48 horas, evidenciou que os lipossomas contendo o fármaco possuem um aumento na sua ação anti-proliferativa frente às linhagens de células tumorais, comparado ao 17-AAG não encapsulado. A inibição do crescimento tumoral para os LP-17-AAG revelou um percentual considerável de inibição, mesmo não sendo significativo. Isso propõe que os lipossomas tem o mesmo efeito que o fármaco livre, porém com efeitos tóxicos reduzidos como mostrados nos estudos histopatológicos dos órgãos. Por fim, este estudo fornece uma visão abrangente sobre o modo de ação do uso de dos lipossomas *in vivo* como uma terapia para tumores sólidos.

## 5. REFERENCIAS

- [1]GAO, Y. et al. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 761–777, 2014.
- [2]BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 5, p. 405-411, out. 2011
- [3]KOHLLI, A. G. et al. Designer lipids for drug delivery: From heads to tails. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 274–287, 2014.
- [4]PARHI, P.; MOHANTY, M.; SAHOO, S. K. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. **Drug Discovery Today**, Orissa, v.17, n. 17-18, p. 1-9, set. 2012.
- [5]KOUDELKA, S.; TURANEK, J. Liposomal paclitaxel formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 163, n. 3, p. 322-334, nov. 2012.
- [6]CARACCILOLO, G. Liposome-protein corona in a physiological environment: Challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 11, n. 3, p. 543–557, 2015.
- [7]TRENDOWSKI, M. PU-H71: An improvement on nature's solutions to oncogenic Hsp90 addiction. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 202–216, 2015.
- [8]NECKERS, L.; TREPEL, J.B. Stressing the development of small molecules targeting HSP90. **Clin. Cancer Res.** v. 20, 275–277, 2014.
- [9]KATRAGADDA, U. et al. Multi-drug delivery to tumor cells via micellar nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, n. 1-2, p. 281–286, 2011.
- [10]BANGHAM A. D.; STANDISH M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular biology**, v.13, p. 238-252, 1965.
- [11]CADENA, P. G. et al. Biochimica et Biophysica Acta Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes. **BBA - Biomembranes**, v. 1828, n. 2, p. 309–316, 2013.
- [12]SAAD, N.; MADY, M. M. Ehrlich tumor inhibition using doxorubicin containing liposomes. **SAUDI PHARMACEUTICAL JOURNAL**, 2014.
- [13]SOARES, D. C. F. et al. Liposomes Radiolabeled with <sup>159</sup>Gd: in vitro Antitumoral Activity, Biodistribution Study and Scintigraphic Image in Ehrlich Tumor Bearing Mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol 17, 290-296, 2011.
- [14]OLIVEIRA, J. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 345–363, 2014.
- [15]XU, X.; KHAN, M.A.; BURGESS, D.J. A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API:II. Screening of critical variables, and establishment of design space at laboratory scale, **Int. J. Pharm.** 423,543–553, 2012.

- [16]CUI, Z.; LAFLEUR, M. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Lamellar self-assemblies of single-chain amphiphiles and sterols and their derived liposomes: Distinct compositions and distinct properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 177–185, 2014.
- [17]MOGHADDAM, B. et al. The application of monolayer studies in the understanding of liposomal formulations, **Int. J. Pharm.** 417, 235–244, 2011.
- [18]VILLASMIL-SÁNCHEZ, S.; RABASCO, A.M.; GONZÁLES-RODRÍGUEZ, M.L. Thermal and <sup>31</sup>P-NMR studies to elucidate sumatriptan succinate entrapment behavior in phosphatidylcholine/cholesterol liposomes. Comparative <sup>31</sup>P-NMR analysis on negatively and positively-charged liposomes, **Colloids Surf. B: Biointerfaces** 105, 14–23, 2014.
- [19]KOTY, J.; ARTUR, Z. Adsorption equilibria at interface separating electrolyte solution and phosphatidylcholine – stearylamine liposome membrane. **Biophysical Chemistry**. v. 127, p. 84–90, 2007.
- [20]LONEZ, C.; VANDENBRANDEN, M.; RUYSSCHAERT, J. Cationic lipids activate intracellular signaling pathways ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 15, p. 1749–1758, 2012.
- [21]KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. **Gann Gan**. v. 73, p. 85-90, fev. 1982
- [22]TAKANO, K. et al. Involvement of actin cytoskeleton in macrophage apoptosis induced by cationic liposomes, **Arch. Biochem. Biophys.** 518,89–94, 2012.
- [23]NATH, D.; GOSWAMI, R. Chemico-Biological Interactions Drugs of abuse and addiction: A slippery slope toward liver injury. **Chemico-Biological Interactions**, 2015.
- [24]ABU-ELSAAD, N. M. et al. The heat shock protein 90 inhibitor , 17-AAG , attenuates thioacetamide induced liver fibrosis in mice. **Pharmacological Reports**. v. 68, p. 275–282, 2016.
- [25]GADANO., A. et al. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*. **L J Ethnopharmacol**. 81,11-16, 2002.
- [26]LARSON, N. et al. Synthesis and evaluation of poly ( styrene- co -maleic acid ) micellar nanocarriers for the delivery of tanespimycin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 111–117, 2011.
- [27]SAXENA, V.; HUSSAIN, M. D. Formulation and in vitro evaluation of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) loaded polymeric mixed micelles for glioblastoma multiforme. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 350–355, 2013.
- [28]DESALE, S. S. et al. Polypeptide-based nanogels co-encapsulating a synergistic combination of doxorubicin with 17-AAG show potent anti-tumor activity in ErbB2-driven breast cancer models. **Journal of Controlled Release**, v. 208, p. 59–66, 2015.
- [29] PRADHAN, R. et al. Hyaluronic acid-decorated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for combined delivery of docetaxel and tanespimycin. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 313–323, 2015.

- [30]BRANDÃO, D. F. et al. Cirrose hepática e células estreladas do fígado. **Acta Cirúrgica Brasileira**. volume 21, pag. 54-57. 2006.
- [31]BITTENCOURT, P. L. Epidemiologia da hepatotoxicidade por drogas. **Rev. Suplemento Hepatotoxicidade**, v. 30, p. 14-16, 2011.
- [32]MARQUES, P. E. et al. Understanding liver immunology using intravital microscopy. **Journal of Hepatology**, v. 63, n. 3, p. 733–742, 2015.
- [33]O'MALLEY, D. P. et al. Recommendations for gross examination and sampling of surgical specimens of the spleen. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 19, n. 5, p. 288–295, 2015.
- [34]AMARAL, C.F.S. et al. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, p. 220-227, 1986.
- [35]SHUM, H.P., YAN, W. W., CHAN, T. M. Recent knowledge on the pathophysiology of septic acute kidney injury: A narrative review. **Journal of Critical Care**, v. 31, n. 1, p. 82–89, 2015.
- [36]SHOIEB, A.; SHIRAI, N. Polycystic kidney disease in Sprague-Dawley rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, n. 5-6, p. 361–364, 2015.

## **CAPÍTULO V**

## 5. ARTIGO 02

### **Complexo de inclusão contendo 17-AAG:2-hidroxi-propil- $\beta$ - ciclodextrina: Desenvolvimento, caracterização e citotoxicidade**

Thiers Araújo Campos<sup>1,2</sup>, Juliana da Silva Cruz<sup>2</sup>, Antonio Luis de Oliveira Almeida Petersen<sup>3</sup>, Patrícia Sampaio Tavares Veras<sup>3</sup>, Janaina Viana de Melo<sup>2</sup>, Giovanna Machado<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Centro de Ciências Biológicas, CCBUFPE;

<sup>2</sup>Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise/LAMM - Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, CETENE/Recife-PE;

<sup>3</sup>Laboratório de Patologia e Biointervenção - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz /BA;

\* Autor para correspondência:

Dra. Giovanna Machado

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE)

Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise

Av. Professor Luiz Freire n1, Cidade Universitária, Recife - PE- Brasil

CEP: 50.740-540

Tel: +55-81-3334-7235

E-mail: giovanna.machado@cetene.gov.br

## **Complexo de inclusão contendo 17-AAG:2-hidroxiopropil- $\beta$ - ciclodextrina: Desenvolvimento, caracterização e citotoxicidade**

**RESUMO:** O 17-N-alil-amino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG) é um agente anticancerígeno com limitação para o avanço na pesquisa clínica pelo fator da sua baixa solubilidade e alta toxicidade. Portanto, foram desenvolvidos complexos de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD) por liofilização e caracterizados físico-quimicamente com a finalidade de obter uma solubilidade melhorada do composto. Os complexos de inclusão obtidos demonstraram a integridade do 17-AAG identificado através do teor ( $99 \pm 0.79\%$ ). O diagrama de solubilidade de fases de 17-AAG:HP $\beta$ CD apresentou uma curva do tipo A<sub>L</sub>, com  $K_{1:1} = 5,3 \text{ M}^{-1}$ . Na presença de 1000 mM de HP $\beta$ CD, a solubilidade do 17-AAG aumentou 39 vezes. O complexo de inclusão 17-AAG:HP $\beta$ CD apresentou modificações no IV, difração de raios-X, microscopia e DSC e TG, sugerindo a formação do complexo de inclusão. A citotoxicidade frente a células saudáveis (J774) evidenciaram que o complexo de inclusão apresentou efeitos inibitórios similares ao composto livre em concentrações  $<10 \mu\text{M}$ . Portanto, a interação do 17-AAG e HP $\beta$ CD no complexo de inclusão fornece um meio alternativo de superar a baixa solubilidade aquosa do 17-AAG.

## **1. INTRODUÇÃO**

Na tentativa de desvendar os múltiplos caminhos que causam o câncer, a proteína de choque térmico 90 (Hsp90) tem sido um alvo atraente para terapia do câncer. Moleculamente é uma proteína sinalizadora responsável por modular a estabilidade e atividade de outras proteínas, como quinase e fatores de transcrição, que desempenham papel crítico no crescimento celular, ciclo celular, sobrevivência celular e apoptose [1,2]. Em comparação com tecidos normais, a Hsp90 é super-expressa em tumores sólidos e doenças malignas. Portanto, o direcionamento com inibidores químicos na Hsp90 pode induzir a degradação de proteínas oncogênicas e interromper múltiplos processos oncogênicos [3].

A geldanamicina (GDM), uma benzoquinona ansamicina é um inibidor natural da Hsp90 e tem sido estudada como um agente anticancerígeno. É sabido que GDM compete com ATP, ligando-se à Hsp90, inibindo as funções dependentes de ATP e promovendo a degradação das proteínas de choque térmico [4]. Moléculas como GDM e outras quinonas aumentam o potencial redox, logo o efeito antitumoral é mediado pela produção das espécies reativas de oxigênio (ROS), induzindo a apoptose [5]. Apesar da efetiva ação anticâncer da GDM, a progressão para ensaios clínicos foi interrompida devido aos níveis inaceitáveis de hepatotoxicidade [6]. Além disso, é uma droga instável metabolicamente e pouco solúvel em água [7]. Portanto, variantes da GDM foram desenvolvidas a fim de contornar essas propriedades indesejáveis.

O 17-N-alil-amino-17-demetoxigeldanamicina (tanespimycin, 17-AAG) derivado sintético da GDM é o primeiro inibidor do Hsp90 testado em modelos de camundongos que tem sido bastante investigado, pois mostrou um perfil de toxicidade melhorada e uma atividade biológica eficiente em comparação com GDM [8,9]. Essa ótima atividade antitumoral, com efeitos colaterais hepáticos diminuídos pode está associado à perda oxidativa do grupo 17-alilo, a partir do anel de ansamicina, devido ao metabolismo ocorrido durante a incubação do 17-AAG em microssomas do fígado. O metabólito gerado, 17-AAG continua biologicamente ativo e faz ligações de 100 vezes mais na Hsp90 das células tumorais, assim como 17-AAG, resultando na degradação de proteínas clientes (proteínas dependentes do Hsp90 para sua atividade e estabilidade). Diferentemente das células normais que demonstram uma menor ligação [10,11].

Mesmo com a utilização do 17-AAG em estudos clínicos de fase I e II com seres humanos para uma variedade de tumores sólidos, sua limitação deve-se a fraca solubilidade do composto quando é administrado intravenosamente e da presença de alguns sintomas nos indivíduos estudados (fadiga e diarreia) provenientes da

toxicidade [10,12]. Diante dessa informação, uma rota alternativa é a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas.

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos unidos por ligações  $\alpha$  (1-4), que tendem a formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas hóspedes. A estrutura molecular em forma de um cone truncado das CDs é uma consequência das unidades de glicopiranoses. O espaço interno é forrado de átomos de hidrogênio e pontes glicosídicas de oxigênio determinando o caráter lipofílico, o que facilita a entrada de substâncias com natureza hidrofóbica. A superfície externa das CDs é hidrofílica devido a presença das hidroxilas o que caracteriza o aumento da solubilidade, uma das propriedades mais interessantes para obtenção de produtos farmacêuticos, alimentícios e cosméticos. Existem cerca de 30 produtos comercializados em todo o mundo que utilizam essa tecnologia [13,14].

A 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) é um derivado sintético da ciclodextrina natural  $\beta$ -ciclodextrina, bastante utilizada por apresentar alta solubilidade e baixa toxicidade em comparação com outras ciclodextrinas da mesma família[13]. Esse aporte faz da HP $\beta$ CD uma forte candidata para incorporação em formulações farmacêuticas, proporcionando o aumento da solubilidade do 17-AAG em água, logo, sua estabilidade e biodisponibilidade são melhoradas, conferido redução dos efeitos tóxicos. Nesse contexto, o objetivo desse estudo é desenvolver e caracterizar físico-quimicamente o complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD) e avaliar o seu potencial antiproliferativo através de estudos “*in vitro*”.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Materiais**

O 17-alilamino-17-demetóxi geldanamicina (17-AAG) e 2-Hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD), foram obtidos da Sigma (St. Louis, USA). Os solventes como Clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e metanol (MeOH) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha)

### **2.2 Métodos**

#### **2.2.1 Síntese do complexo de inclusão**

Os complexos foram preparados pelo método *Freeze-Drying* [15]. O 17-AAG foi dissolvido em soluções de HP $\beta$ CD na razão molar 1:1. A suspensão permaneceu sob

agitação, a temperatura ambiente (25 °C) por 72h até verificar a formação de uma solução homogênea. Em seguida, foi congelada a -80 °C e posteriormente, liofilizada por aproximadamente 72 h. Os complexos de inclusão liofilizados foram armazenados em frascos âmbar, livre luminosidade, em um dessecador à temperatura ambiente.

### **2.2.2 Teor do 17-AAG no complexo de inclusão**

A quantificação do 17-AAG no complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD), foi determinada pelo ponto médio da curva de calibração padrão. Esse estudo objetiva avaliar a integridade da molécula durante a formação do complexo de inclusão pela metodologia adotada no preparo [15]. Anteriormente foi desenvolvido um método analítico no espectrofotômetro UV-Vis, através de um varrimento (200 e 500 nm) com diferentes concentrações de 17-AAG observando o pico de maior absorbância [15]. Seguindo este estudo uma curva de calibração foi preparada solubilizando 5 mg do 17-AAG, para um balão volumétrico contendo 25 mL de metanol. A partir dessa solução estoque padrão foram feitas diluições que variaram de 1 à 9  $\mu$ g/mL. O ensaio foi realizado em triplicata.

### **2.2.4 Estudo de solubilidade de fases**

O estudo de solubilidade de fases foi realizado de acordo com o método descrito por Higuchi e Connors [16]. Uma quantidade do pó de 17-AAG (2mg) foi adicionada em excesso à água deionizada com concentrações crescentes de HP $\beta$ CD (0-1000 mM). As suspensões foram mantidas em agitação por 72 h, a 25°C. Após esse período as amostras foram centrifugadas (3500 rpm/ 10 min) e filtradas. Uma alíquota da amostra foi coletada para quantificação por espectrofotometria UV cujo  $\lambda_{\text{max}}$  foi de 333 nm. Os dados foram analisados por regressão linear e a equação da reta ajustada segundo a equação abaixo:

$$[17\text{-AAG}] = a.[\text{HP}\beta\text{CD}] + b,$$

onde  $a$  e  $b$  correspondem à inclinação e a ordenada na origem, respectivamente.

A partir desta equação, foi realizado o cálculo da constante de associação ( $K_c$ ), pela seguinte fórmula:  $K_c = a/[(S_0) (1- a)]$ , onde  $S_0$  é a solubilidade do 17-AAG em água na ausência da solução HP $\beta$ CD. Outro parâmetro estudado a partir dos dados da curva linear do estudo de solubilidade de fases é a eficiência de complexação ( $CE = \text{inclinação} / 1 - \text{inclinação}$ ).

## **2.2.5 Caracterização dos complexos de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ -CD)**

Após a obtenção de um complexo de inclusão, o liófilo foi submetido a caracterizações físico-químicas, objetivando relacionar o efeito da ciclodextrina (agente solubilizante) na solubilidade de um composto teste. Os complexos de inclusão 17-AAG:HP $\beta$ CD foram caracterizados através das técnicas de infravermelho (IV), difração de raios X(DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise térmica com calorimetria diferencial de varredura (DSC e TG) [14-15]. Todas as amostras foram analisadas em pó (17-AAG, HP $\beta$ CD e complexo de inclusão). A mistura física foi preparada na proporção equimolar de 17-AAG para HP $\beta$ CD de 1:1 mol.

### **2.2.5.1 Infravermelho**

Os espectros de infravermelho (IV) foram realizados em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) da Bruker Vertex 70, com acessório de refletância total atenuada (Attenuated total reflectance, ATR) empregando o cristal de germânio. Todos os espectros para cada amostra (17-AAG, HP $\beta$ CD, complexo de inclusão e mistura física) foram obtidos na faixa de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### **2.2.5.2 Difração de Raios-X**

Os padrões de difração de raios-X foram realizados em um difratômetro da Bruker modelo D8 Advance, utilizando-se radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ) em um alcance  $2\theta$  entre 5- 60°C em step scan de 0,02°/s.

### **2.2.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura**

O estudo da morfologia do 17-AAG, HP $\beta$ CD, complexo de inclusão e mistura física, foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando microscópio Quanta 200F (FEI Company, Hillsboro, OR, EUA). As amostras foram fixadas em um porta amostra de alumínio usando fita de dupla face e submetidas a análise com tensão de aceleração 30 kV.

### **2.2.5.4 Análise Térmica (DSC e TG)**

Complementando a caracterização, as amostras foram submetidas aos ensaios termoanalíticos, diferencial de varredura calorimétrica e termogravimetria, utilizando um analisador (NETZSCH – STA 449 F3 Jupiter) sob atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 20,0 mL.min<sup>-1</sup> e taxa de aquecimento de 10°C/min, numa faixa de temperatura de 40 a 500°C. Os termogramas foram analisados através do software Netzsch Proteus.

### **2.2.6 Avaliação da viabilidade celular do 17-AAG e do complexo de inclusão (17-AAG:HPβ-CD);**

Para avaliar a viabilidade celular do 17-AAG livre e complexado com CDs (17-AAG:HPβ-CD), foram utilizadas e cultivadas linhagens de células de macrófagos (J774). As células foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro/UFRJ e mantidas em frascos de cultura contendo meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% estreptomicina/penicilina a 37°C em estufa úmida (5% de CO<sub>2</sub>).

Para o ensaio de citotoxicidade *in vitro*, as células de macrófagos foram cultivadas em placas de 96 poços (10<sup>5</sup> células/poço) e incubadas na mesma condição de manutenção das células. Após 24 horas, foi observado o crescimento e aderência celular. Visto uma confluência celular de aproximadamente 80%, as células foram tratadas com solução do 17-AAG livre e complexado a CDs de acordo com as concentrações de trabalho (0,2 à 100 μM). O composto e complexo de inclusão foram diluídos em DMSO (dimetilsufóxido à 0,1 % v/v), e filtrados através de um filtro Millipore (0,22 μm), antes do tratamento. Como controle positivo os macrófagos foram tratados com a mesma quantidade de DMSO utilizado para solubilizar o fármaco. Depois que as células foram incubadas por períodos de 24h e 48h, o crescimento celular foi quantificado pelo método de redução do 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) ao composto azul de formazan. Uma solução contendo MTT (0,5 mg /mL) foi substituído ao meio de cultura durante 3 horas. Para a revelação através da solubilização dos cristais de formazan, as células foram incubadas por mais 3h com dodecil sulfato de sódio (20%). As absorvâncias foram medidas a 570 nm em um leitor multiplate (Multiskan Go, Thermo). O percentual de viabilidade celular foi calculado em relação às células tratadas com 17-AAG ou HPβCD:17-AAG e comparadas ao grupo controle (DMSO 0,1%).

### 2.2.7 Análise estatística

Os valores estatisticamente significativos foram validados utilizando testes não paramétricos entre duas amostras independentes (Mann-Whitney tests),  $p < 0,05$  foi considerado como significativo. Todos os dados quantitativos foram plotados com software GraphPad Prism 6.0.

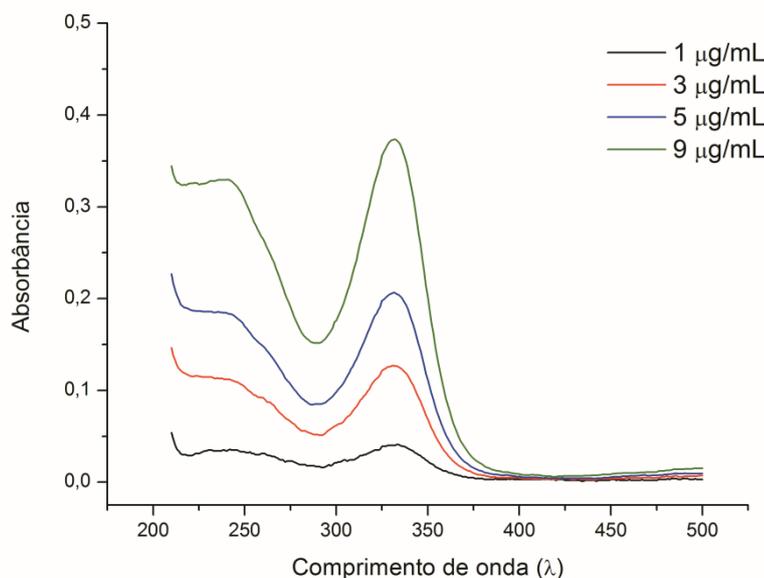
## 3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Síntese e teor do 17-AAG no complexo de inclusão

O complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD) obtido pelo método de liofilização (*Freeze-Drying*) demonstrou um excelente percentual de rendimento de  $91,90 \pm 2,21\%$ , ao comparar os complexos de inclusão de clorzoxazona com HP $\beta$ CD que obtiveram um rendimento de  $78,85\%$  [17].

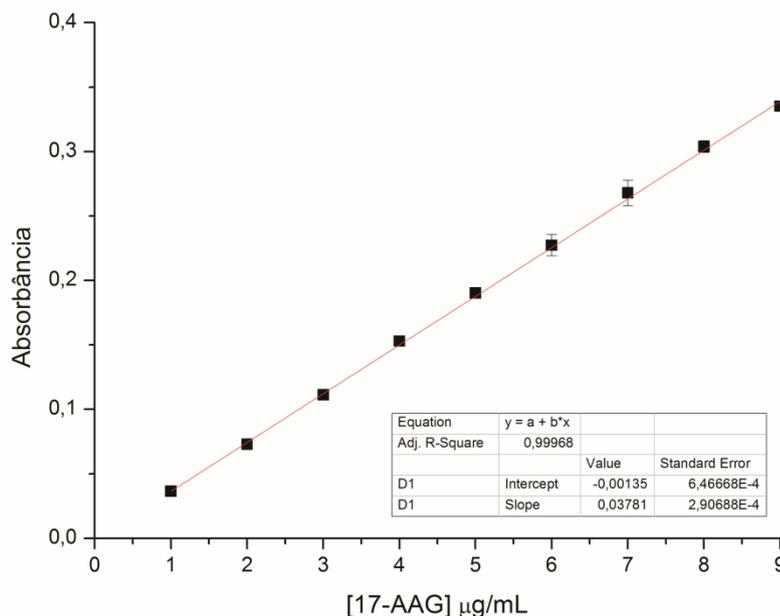
A integridade do 17-AAG no complexo de inclusão foi identificada através do teor ( $99 \pm 0,79\%$ ), calculado a partir do ponto médio da curva de calibração. O espectro de varredura do 17-AAG puro em metanol, na faixa compreendida de 200-500 nm revelou absorvância máxima no comprimento de onda de 333 nm (Figura.1), como descrito por Chandran et al., 2010 [17].

**Figura 1.** Espectro de varredura de diferentes concentrações do 17-AAG em metanol ( $\lambda_{\text{máx}}$  333 nm).



Os dados obtidos das três curvas de calibração foram ajustados por análise de regressão linear. O método espectrofotométrico apresentou linearidade a 333 nm para as concentrações estudadas (1.0 a 9.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A equação da regressão linear média obtida a partir de três curvas de calibração foi  $y = 0,0378 x + 0,0014$ , em que  $y$  é a absorbância (nm) e  $x$  a concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em equivalentes do 17-AAG (Figura. 2). O coeficiente de correlação obtido foi de 0,99968, significando que 99,97% da variação total em torno da média é explicada pela regressão linear, comprovando a adequação do método ao intervalo avaliado.

**Figura 2.** Curva de calibração construída com diferentes concentrações do 17-AAG (1.0 a 9.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ao  $\lambda_{\text{max}} = 333$  nm.



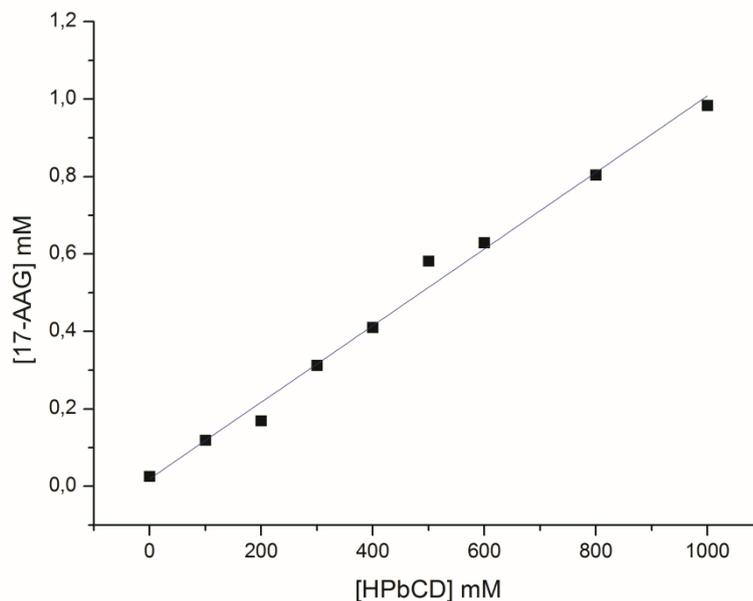
### 3.2 Estudo de solubilidade de fases

O estudo de solubilidade de fases é uma ferramenta útil para avaliar a ação do efeito de inclusão das CDs com fármacos pobremente solúveis em água e alguns parâmetros envolvidos na formação dos complexos. A Figura 3 mostra o perfil de solubilidade de fases do 17-AAG em soluções de HP $\beta$ -CD em diferentes concentrações. O diagrama de solubilidade de fases resultou em uma curva do tipo A<sub>L</sub> tal como descrito Loftsson e Duchêne[16, 26]. A curva do tipo A<sub>L</sub> demonstra um diagrama linear, onde a solubilidade do 17-AAG aumenta linearmente com o aumento

da concentração de ciclodextrina. O resultado mostra uma relação linear entre a solubilidade aparente do 17-AAG e a concentração de HP $\beta$ CD em solução aquosa, ambos a 25 °C, indicando a formação do complexo de inclusão 1:1 (fármaco:ciclodextrina). A razão molar 1:1 é o tipo de associação mais frequente, no qual uma molécula é inserida na cavidade da ciclodextrina [19]. Os dados foram ajustados pela regressão linear apresentando a seguinte equação:

$$[17\text{-AAG}]_{\text{água}} = 0,118 \times [\text{HP}\beta\text{-CD}] - 0,1418 \quad (r^2=0,9836).$$

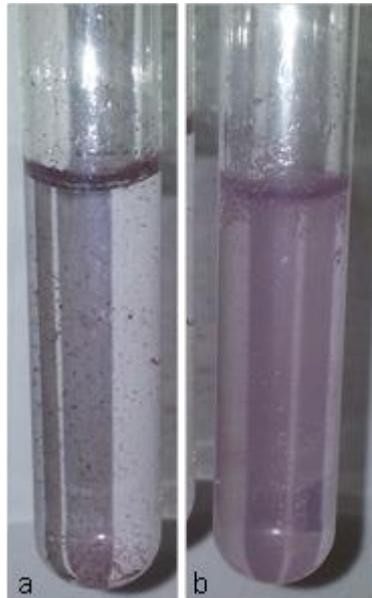
**Figura 3.** Diagrama de solubilidade de fases do 17-AAG em função da concentração de HP $\beta$ -CD em água a 25 °C.



A constante de associação ( $K_C$ ) determinada para o 17-AAG em solução aquosa de HP $\beta$ CD foi de  $5,34 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  o que indica uma forte interação entre a droga e a ciclodextrina. A alta constante de associação do 17-AAG com a HP $\beta$ CD é comparado com valores encontrados para outros fármacos com características hidrofóbicas semelhantes ao 17-AAG como a spironolactona, a qual apresentou o  $K_{1:1}$  de  $9,829 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  [20]. O aumento máximo da solubilidade do 17-AAG na solução de HP $\beta$ CD foi 0,98 mM, mais que 39 vezes com relação a sua solubilidade em água (0,03 mM). A eficiência de complexação (CE) do 17-AAG em solução aquosa de HP $\beta$ CD foi 0,134, isso significa que 1 a cada 8,5 moléculas de HP $\beta$ CD forma um complexo com o 17-AAG. As imagens da solubilidade do 17-AAG puro e do complexo de inclusão em

água podem ser visualizadas na figura 4. Pequenos aglomerados da molécula 17-AAG são visualizados na presença da água, demonstrando o seu caráter de baixa solubilidade. Em contrapartida, a solubilização do composto em meio aquoso é perceptível na presença da HP $\beta$ CD, através da técnica *freeze-drying*.

**Figura 4.** Imagem da solubilidade em água do 17-AAG na presença da ciclodextrina (HP $\beta$ CD) preparada pela técnica *freeze-dried*. (a) 17-alilamino-17-demetóxicigeldanamicina (17-AAG) e (b) complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD).



### 3.3 Caracterização dos complexos de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ -CD)

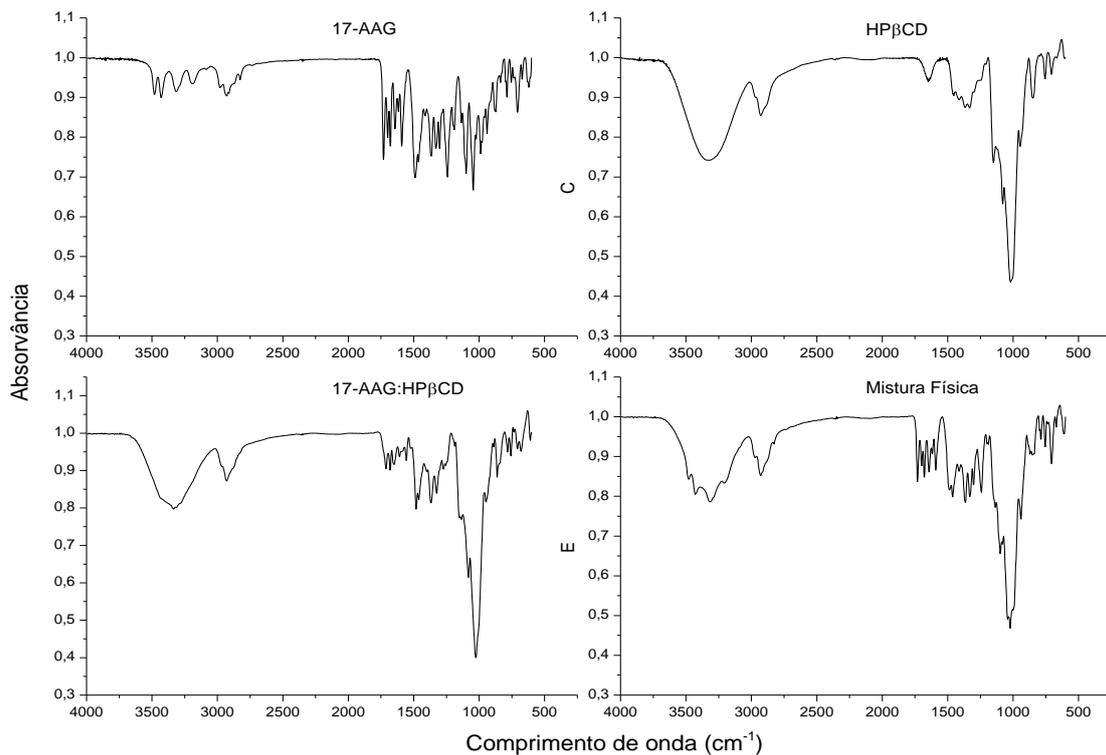
#### 3.3.1 Espectroscopia de Infravermelho

O espectrograma de infravermelho do 17-AAG, da HP $\beta$ CD, do complexo de inclusão AF:HP $\beta$ CD e da mistura física estão apresentados na Figura 5.

O comprimento de onda analisado (4000-500  $\text{cm}^{-1}$ ) apresentou vários espectros de infravermelho para o 17-AAG, destacando 5 picos que sofreram encurtamento de suas bandas na presença da HP $\beta$ CD compreendidos entre 3100 a 3700  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas são referente ao grupamento da hidroxila, faixa de larga reflectância, evidentes também no complexo de inclusão, como característica específica da HP $\beta$ CD seca e pura. Isto está atribuído às vibrações do número de OH

na molécula, indicando uma forte associação dos grupos das hidroxilas, por intermédio das ligações de hidrogênio. No entanto, a existência de uma intensidade mais baixa, picos agudos no intervalo de  $3600\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$  indicam a presença de grupos OH livres [21].

**Figura 5.** Espectros de infravermelho para o 17-alilamino-17-demetóxicigeldanamicina (17-AAG), 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD), complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD), e mistura física (MF).



As bandas típicas do 17-AAG, visíveis nos espectros entre a faixa de  $1042\text{ a }1730\text{ cm}^{-1}$ , compreendem os grupos: carbonil, carbamato, hidroxil, metoxi e metil [22]. O deslocamento ou a ausência dessas bandas características do 17-AAG nos espectros do complexo de inclusão sugere a interação do 17-AAG com HP $\beta$ CD. O 17-AAG mostrou uma banda de forte absorção para o grupamento da carbonila ( $1730\text{ cm}^{-1}$ ) sofrendo um deslocamento no complexo de inclusão ( $1712\text{ cm}^{-1}$ ). Isto pode ser interpretado como mudança na interação das ligações de hidrogênio [23]. O pico de absorção em  $1519\text{ cm}^{-1}$  foi correspondente para C=C representado pela vibração de alongamento do anel aromático e a sua intensidade diminuiu no complexo. Bandas correspondentes a C-N, também diminuíram a intensidade da vibração de alongamento observada entre  $1363\text{ e }1242\text{ cm}^{-1}$ . O grupo  $\text{CH}_3$  do 17-AAG foi

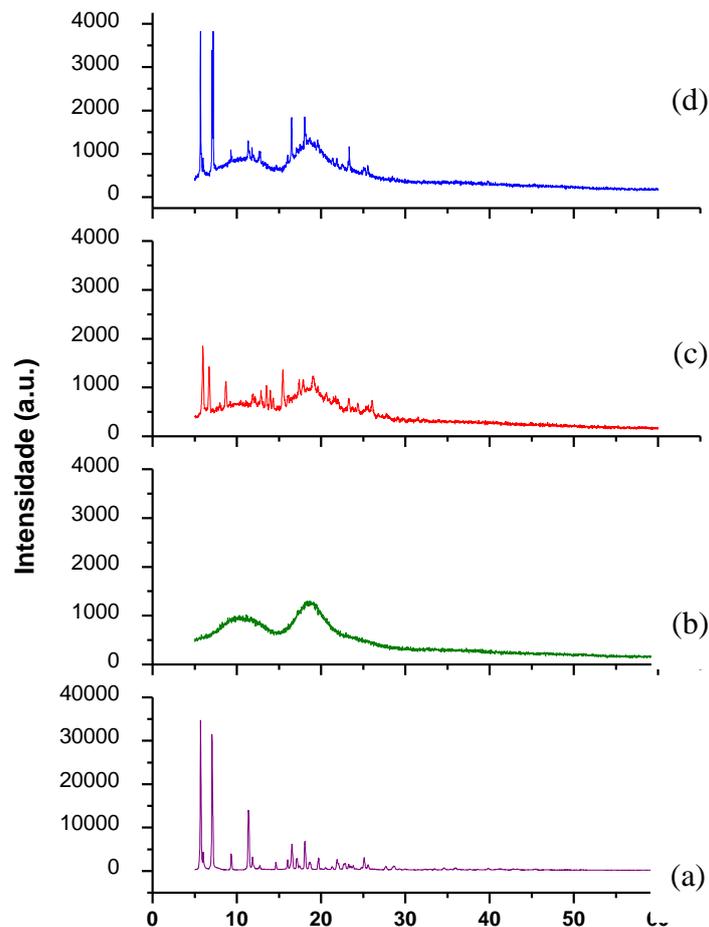
apresentado em 1486, 1463 e 1413  $\text{cm}^{-1}$ . Ao mesmo tempo, as bandas a 1099 e 1045  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a C=H do anel benzeno desapareceram.

Outras interações moleculares podem ter ocorrido entre 17-AAG e HP $\beta$ CD, promovendo a inclusão do princípio ativo na cavidade interna da HP $\beta$ CD. Contudo, algumas bandas apresentadas no infravermelho da molécula hóspede podem ser mal interpretadas, devido alta absorbância relativa das bandas da ciclodextrina [24].

### 3.3.2 Difração de Raios X

Os padrões de difração de raios x para 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD), 17-alilamino-17-demetóxicigeldanamicina (17-AAG), estão ilustrados na figura 6, bem como o complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD) e mistura física (MF).

**Figura 6.** Padrões de difração de raios -x para, (a) 17-alilamino-17-demetóxicigeldanamicina (17-AAG), (b) (HP $\beta$ CD), (c) complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD), e (d) mistura física (MF).



A natureza cristalina do 17-AAG é evidenciada através das reflexões de Bragg. Essas reflexões de Bragg também são reveladas na mistura física e no complexo de inclusão, porém com menos intensidade. As características singulares de cada composto são preservadas e observado na mistura física. Isso pode indicar que não ocorreu interação entre 17-AAG e a HP $\beta$ CD. Em contraste, a HP $\beta$ CD possui ordem de curto alcance identificado pela presença de dois largos picos e pelo halo amorfo.

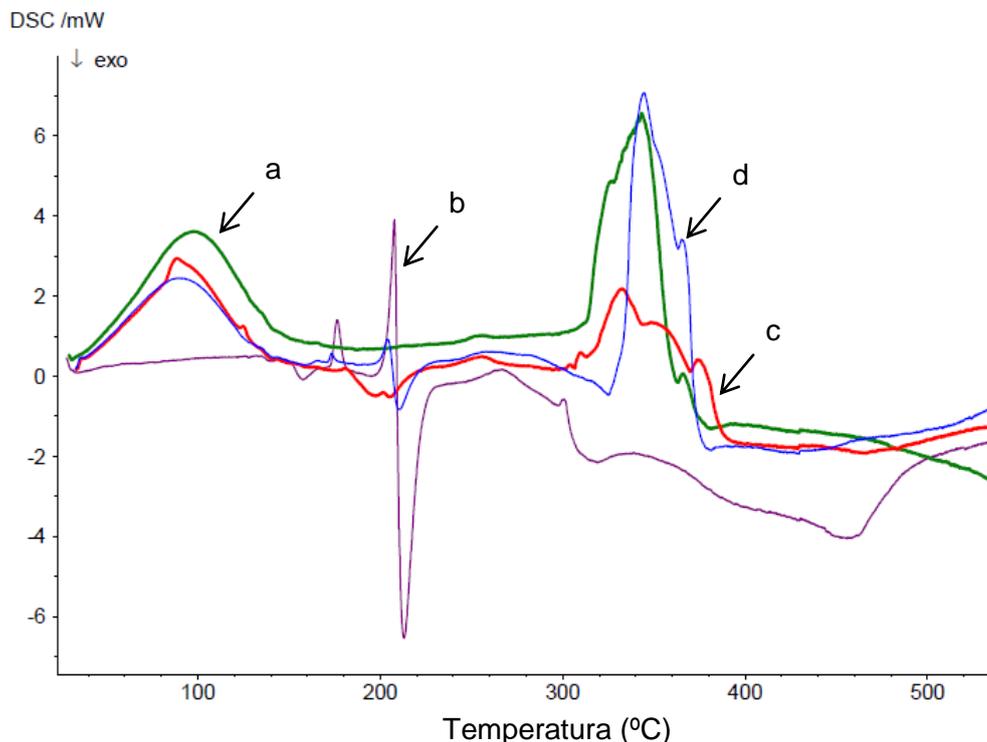
Comparando o difractograma do complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD) com o 17-AAG (figura 6a) e HP $\beta$ CD (figura 6b) isolados, fica evidenciado a sobreposição de picos, sendo um ponto adicional para supor a formação do complexo de inclusão. Este comportamento amorfo do complexo de inclusão pode indicar a interação do 17-AAG com HP $\beta$ CD, levando a formação de uma nova fase sólida relatada também na literatura [25,26].

### **3.3.3 Análise Térmica (DSC e TG)**

Os termogramas das amostras estudadas, 17-AAG, HP $\beta$ CD, complexo de inclusão e misturas física, através do ensaio de calorimetria diferencial de varredura (DSC), estão apresentados em uma análise de 40 a 500°C (Figura 7).

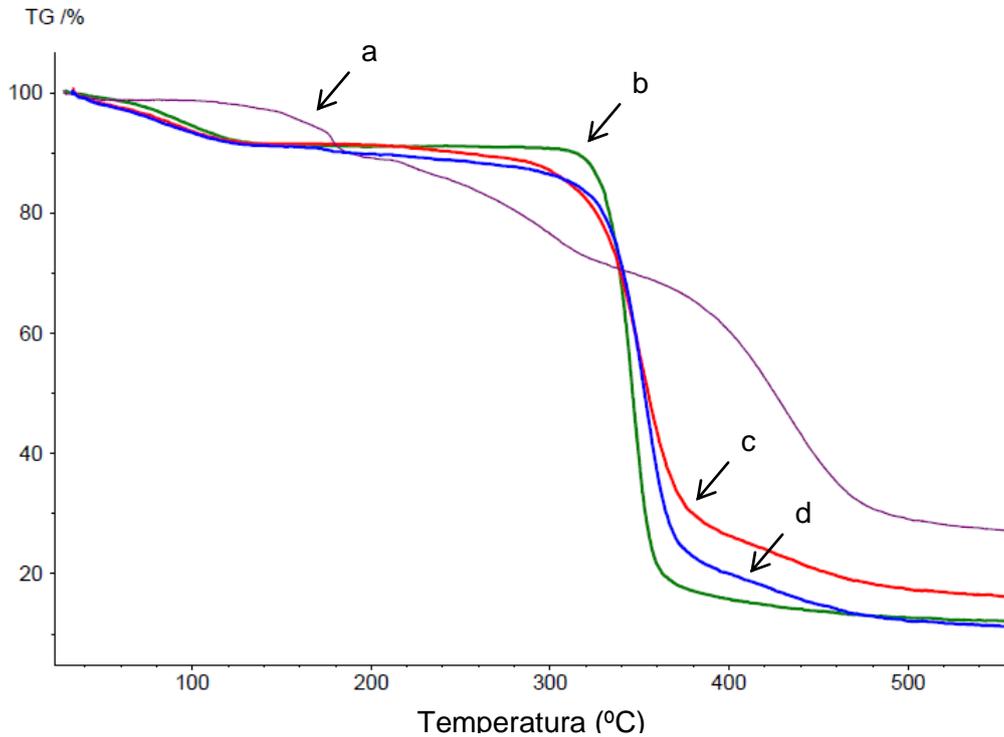
O 17-AAG exibiu picos característicos, endotérmico e exotérmico de 207 e 213°C respectivamente, como relatado na literatura [27]. O diagrama evidencia inicialmente para HP $\beta$ CD um pico endotérmico largo, entre 60 e 100 °C, com alcance o máximo em 83 °C, indicando o processo de desidratação. Um segundo pico exotérmico em torno de 350°C é identificado para HP $\beta$ CD devido ao fenômeno de decomposição [28]. A mistura física evidencia os mesmo picos (endo e exo) do 17-AAG, assim como os picos da HP $\beta$ CD. Por outro lado, o complexo de inclusão caracteriza-se pela ausência do pico que evidencia o 17-AAG. Isto pode sugerir a interação decorrente do fenômeno de complexação. Similares resultados são apresentados em outros trabalhos como alpinetina [28] e repaglinida [25] complexadas a HP $\beta$ CD.

**Figura 7.** Varredura Diferencial Calorimétrica (DSC) para (a) 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD), (b) 17-alilamino-17-demetóxicigeldanamicina (17-AAG), (c) complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD), e (d) mistura física (MF).



Outra análise térmica que corrobora com o estudo calorimétrico diferencial de varredura é a termogravimetria (TGA). Esta técnica é utilizada para acompanhar a perda e/ou ganho da massa da amostra em função da temperatura. Na figura 8 o perfil do gráfico referente ao 17-AAG demonstra vários pontos com perdas de massa ( $\Delta m$ ) ao longo da faixa de temperatura estudada. A desidratação do 17-AAG iniciou em 209°C, representando uma perda total de massa no valor de 69,51%. Diferentemente, a perda total de massa é maior para HP $\beta$ CD (79,91%), mas a sua decomposição tem um *onset* em 308°C. Para o complexo de inclusão ( $\Delta m=74,98\%$ ), a degradação iniciou a 125°C, demonstrando que a HP $\beta$ CD protege o 17-AAG e conseqüentemente acarreta um tempo maior para a degradação da molécula em estudo. Logo, ficou claro que a perda total de massa para o complexo foi maior que o 17-AAG puro. Além disso, é interessante notar que a curva de TG do complexo de inclusão apresenta a mesma característica que a da mistura física, pois a mistura mecânica dos compostos puros também pode ser caracterizada como processo de complexação molecular com as ciclodextrinas [29,30].

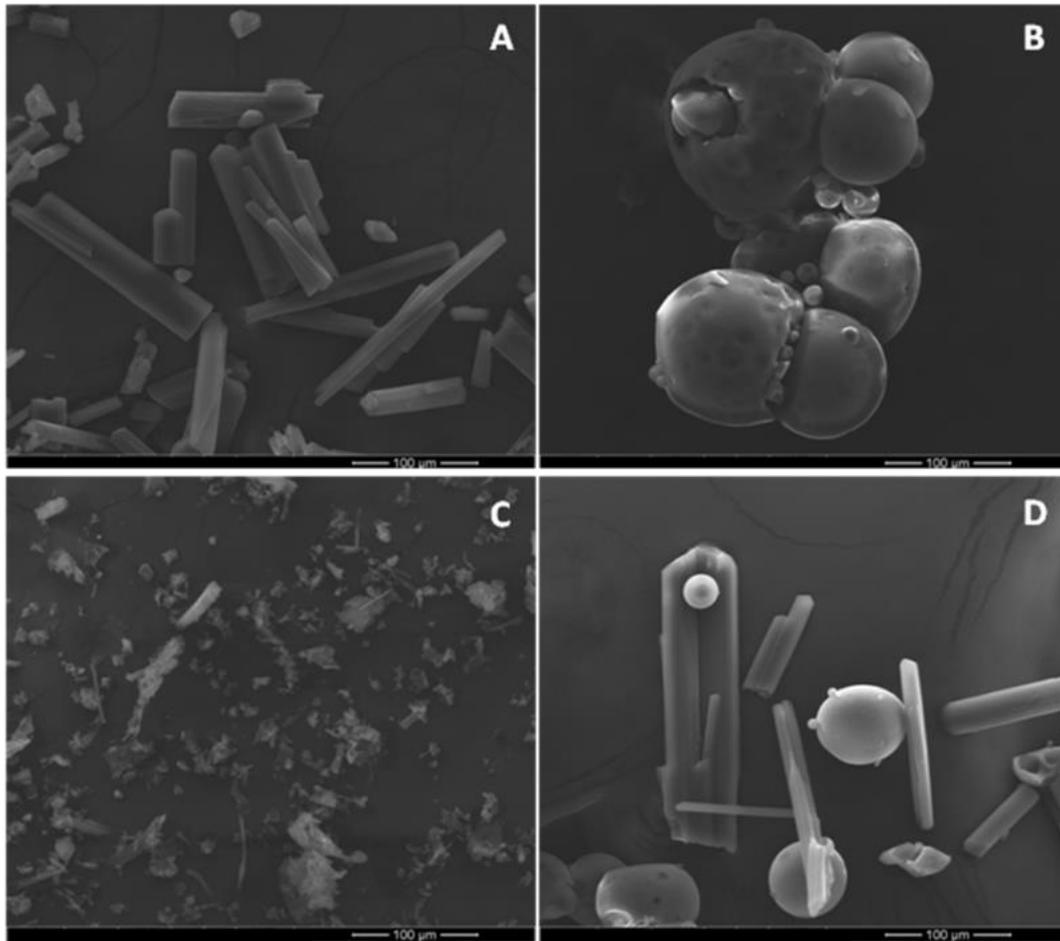
**Figura 8.** Curvas termogravimétricas para (a) 17-alilamino-17-demetóxicidanicina (17-AAG), (b) 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD), (c) complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD), e (d) mistura física (MF).



### 3.5.5 Microscopia eletrônica de varredura

As análises de MEV foram realizadas com o objetivo de avaliar tanto a morfologia quanto à forma e superfície dos constituintes puros e as mudanças produzidas pela formação do complexo de inclusão. Assim, a Figura 9 ilustra a micrografia de MEV do 17-AAG e HP $\beta$ CD puros, da mistura física (17-AAG e HP $\beta$ CD) e do complexo de inclusão 17-AAG:HP $\beta$ CD. O 17-AAG apresentou na forma de cristais aciculares (Figura 9A). Por outro lado, a HP $\beta$ CD (Figura. 9B) demonstra uma morfologia caracterizada pela forma predominantemente de esferas cilíndricas (Figura. 9B) [17]. Na mistura física (Figura. 9D) verificou-se que a morfologia foi comparável aos materiais puros de 17-AAG e HP $\beta$ CD, evidenciando a ausência de mudanças morfológicas. Por outro lado, as imagens relacionadas ao complexo de inclusão (Figura. 9C) revelaram mudanças significativas na morfologia do 17-AAG e da HP $\beta$ CD, apresentando forma amorfa e mudanças na morfologia original de ambos componentes. A comparação destas imagens mostra que o complexo de inclusão foi distinto dos componentes isolados, demonstrando a formação do complexo de inclusão pela interação entre o fármaco e a ciclodextrina [15].

**Figura 9.** Microscopia eletrônica de varredura do 17-AAG (A); da HP $\beta$ CD (B); do complexo de inclusão (C) e a mistura física (D).



### 3.4 Avaliação do ensaio de citotoxicidade

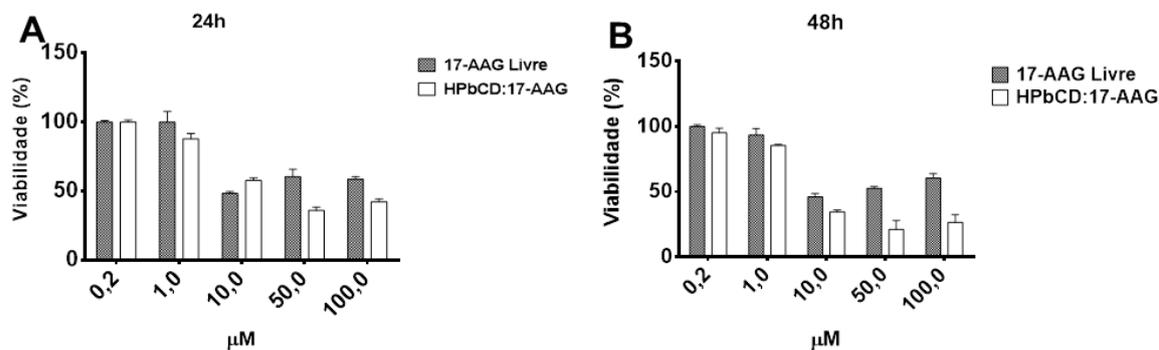
Nas células de macrófago murino (J774) tratadas com 17-AAG e complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD), por um período de 24 e 48 horas, foi realizada a avaliação de citotoxicidade através do ensaio de MTT e os resultados estão apresentados por gráficos na figura 10.

Os efeitos citotóxicos nesta linhagem de células saudáveis (J774) tratados com o 17-AAG livre e complexado, não foram determinantes para valores de uma IC<sub>50</sub>. Poucos são os trabalhos que relatam os resultados de inibição de crescimento celular frente a células normais, quando se trata de drogas antineoplásicas. Portanto, Wang e colaboradores (2014), ao realizar um estudo comparativo do 17-AAG, com outro inibidor da chaperona Hsp90 (SNX-25a), demonstrou que não foi possível determinar inibição do crescimento de algumas células como fibroblasto fetal humano (MRCS),

células do fígado (L-O2) e fibroblastos dermais (HDF) quando tratadas com o 17-AAG [31]. Assim, de acordo com os resultados ficou determinado uma IC50 superior a 100  $\mu\text{M}$  para o 17-AAG.

Estudos também demonstram que 17-AAG liga-se a Hsp90 com maior afinidade em células tumorais do que em células normais, verificando que a viabilidade de células tumorais do carcinoma de mama (BT474) obteve uma concentração inibitória (IC50) de 6nM, enquanto que nas células epiteliais dos rins humanos e fibroblastos dermais apresentaram uma IC50 de 600 e 400 nM, respectivamente [32,33].

**Figura 10.** Viabilidade celular das células J774 tratadas com 17-alilamino-17-demetóxicigeldanamicina (17-AAG) e complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD) num período de 24 (A) e 48 h (B).



No entanto, em comparação ao 17-AAG sozinho, a viabilidade celular para as células tratadas com o complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD), nas primeiras 24 horas, apresentaram valores significativos apenas para as concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$ . Após o período de 48 horas, os complexos de inclusão mostraram efeitos inibitórios significativos em relação ao 17-AAG, de  $65,36 \pm 1,3\%$ ,  $78,81 \pm 6,8\%$ , e  $73,51 \pm 5,9\%$ , para as concentrações de 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Sugere-se que o 17-AAG complexado a ciclodextrina torna-se um composto mais solúvel, o que permite a entrada da droga mais facilmente na célula. Esse mecanismo celular ainda não está bem esclarecido, porém o efeito da solubilização das ciclodextrinas (CDs) permite que a sua estrutura em forma de anel possa formar uma nova interação com os lipídios no compartimento de fase aquosa e, particularmente, os componentes lipídicos da membrana celular são reversivelmente extraídos. A remoção dos componentes lipídicos da membrana (principalmente colesterol) pode levar à lise da célula [34]. Essa solubilização do colesterol pela ciclodextrina é evidenciada, no estudo de citotoxicidade de vários derivados das ciclodextrinas, demonstrando uma

IC50 para HP $\beta$ CD, superior a 200  $\mu$ M frente às células CACO-2 (células de linhagem do adenocarcinoma colo retal humano) [34].

Portanto, o uso da HP $\beta$ CD para a formação de complexo de inclusão com o 17-AAG tornou uma ferramenta para aumentar a solubilidade da molécula e sua atividade frente às células sadias (J774). Apesar dos efeitos inibitórios similares ao composto livre em concentrações <10  $\mu$ M, os complexos de inclusão apresentaram citotoxicidade significativa maior e igual a 10  $\mu$ M, por maior tempo de exposição do composto às células (48h). Possivelmente, as CDs tenham protegido o fármaco de variantes que causam degradação de moléculas em estudos *in vitro*, submetidas ao longo período.

#### **4. CONCLUSÃO**

No presente trabalho, foram preparados com êxito complexos de inclusão do 17-AAG com HP $\beta$ CD, pelo método de liofilização. Os resultados a partir do diagrama de solubilidade de fases demonstraram a formação de uma mistura na razão molar de 1:1 do complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD). A indicação de que houve interações intermoleculares entre os compostos, 17-AAG e HP $\beta$ CD, foi analisada por técnicas de caracterização (FT-IR, DRX, DSC, TG e MEV) sugerindo a formação do complexo de inclusão. Além disso, no ensaio de citotoxicidade *in vitro* indicaram que o efeito inibitório do complexo de inclusão em macrófagos (J774) não tinha diferença significativa comparado ao 17-AAG sozinho em concentrações inferiores a 10  $\mu$ M. A interação do 17-AAG e HP $\beta$ CD no complexo de inclusão fornece um meio alternativo de superar a baixa solubilidade aquosa do 17-AAG e assim modificar a farmacocinética da molécula para o progresso nas pesquisas de câncer.

#### **5. REFERENCIAS**

[1]BURGER, A. M. Highlights in experimental therapeutics. **Cancer Letters**, v. 245, n. 1-2, p. 11–21, 2007.

[2]LU, X. et al. Hsp90 inhibitors and drug resistance in cancer: The potential benefits of combination therapies of Hsp90 inhibitors and other anti-cancer drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 8, p. 995–1004, 2012.

[3]TREPPEL, J. et al. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 8, p. 537–549, 2010.

[4]PATEL, K. et al. Engineered biosynthesis of geldanamycin analogs for Hsp90 inhibition. **Chemistry and Biology**, v. 11, n. 12, p. 1625–1633, 2004.

- [5]SAMUNI, A.; GOLDSTEIN, S. Redox properties and thiol reactivity of geldanamycin and its analogues in aqueous solutions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 22, p. 6404–6410, 2012.
- [6]PORTER, J. R.; FRITZ, C. C.; DEPEW, K. M. Discovery and development of Hsp90 inhibitors: a promising pathway for cancer therapy. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 3, p. 412–420, 2010.
- [7]CORTESE, K. et al. The HSP90 inhibitor geldanamycin perturbs endosomal structure and drives recycling ErbB2 and transferrin to modified MVBs/lysosomal compartments. **Molecular biology of the cell**, v. 24, n. 2, p. 129–44, 2013.
- [8]KITSON, R. R. A et al. Synthesis of 19-substituted geldanamycins with altered conformations and their binding to heat shock protein Hsp90. **Nature chemistry**, v. 5, n. 4, p. 307–14, 2013.
- [9]EGORIN, M. J. et al. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 330507) in CD2F1 mice<sup>1</sup>. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 291–302, 2001.
- [10]GREM, J. L. et al. Phase I and pharmacologic study of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in adult patients with solid tumors. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 9, p. 1885–1893, 2005.
- [11]NECKERS, L. Heat shock protein 90 inhibition by 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin: a novel therapeutic approach for treating hormone-refractory prostate cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 8, n. 5, p. 962–966, 2002.
- [12]JHAVERI, K. et al. Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 3, p. 742–755, 2012.
- [13]KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 167–180, 2013.
- [14]MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 238–250, 2014.
- [15]CAVALCANTI, I. M. F. et al. The encapsulation of  $\beta$ -lapachone in 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 332–340, 2011.
- [16]HIGUCHI, T., CONNORS, K.A. Phase-solubility techniques. **Adv. Anal. Chem. Instr.**4, 117–212, 1965.
- [17]TANG, P. et al. Inclusion complexes of chlorzoxazone with  $\beta$ - and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Characterization, dissolution, and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 297–305, 2015.

- [18]CHANDRAN, T. et al. Design and evaluation of micellar nanocarriers for 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 392, n. 1-2, p. 170–177, 2010.
- [19]GHARIBZAHEDI, S. M. T.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, M. Characterizing the natural canthaxanthin/2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 1147–53, 2014.
- [20]RAJABI, O. et al. Study of interaction of spironolactone with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in aqueous solution and in solid state. **Journal of Molecular Structure**, v. 878, n. 1-3, p. 78–83, 2008.
- [21]MILETIC, T., KYRIAKOS, K., GRAOVAC, A., IBRIC, S. Spray-dried voriconazole-cyclodextrin complexes: Solubility, dissolution rate and chemical stability. **Carbohydrates Polymers**. **98**, 122–131, 2013.
- [22]STEBBINS, C. E. et al. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. **Cell** **89**, 239–250, 1997.
- [23]MISIUK, W.; JOZEFOWICZ, M. Study on a host – guest interaction of hydroxypropyl-  $\beta$  -cyclodextrin with ofloxacin. **J. Mol. Liq.** **202**, 101–106, 2015.
- [24]GARCIA-ZEBIRI, I.X.; GONZALES-GAITANO, G.; SÁNCHEZ, M.; ISAISI, J.R. Fitir Study of dibenzofuran-2-carboxylic acid and its complexes with  $\beta$ -cyclodextrin. **Vibrat.spectrosc.** **33**:205-213, 2003.
- [25]LIU, J. et al. Preparation, characterization and in vivo evaluation of formulation of repaglinidewith hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, n. 1-2, p. 137–143, 2014.
- [26]SAXENA, V.; NAGUIB, Y.; HUSSAIN, M. D. Folate receptor targeted 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) loaded polymeric nanoparticles for breast cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 94, p. 274–280, 2012.
- [27]SAXENA, V.; HUSSAIN, M. D. Formulation and in vitro evaluation of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) loaded polymeric mixed micelles for glioblastoma multiforme. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 350–355, 2013.
- [28]MA, S. X. et al. Alpinetin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin host-guest system: Preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 67-68, p. 193–200, 2012.
- [29]HUANG, Z. et al. Complexation of chlorpropham with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and its application in potato sprout inhibition. **Carbohydrate Polymers**, v. 107, p. 241–246, 2014.
- [30]LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 1–11, 2007.
- [31]WANG, S. et al. SNX-25a, a novel Hsp90 inhibitor, inhibited human cancer growth more potently than 17-AAG. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 73–80, 2014.

[32]KAMAL, A. et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. **Nature** 425, 407–410, 2003.

[33]JANIN, Y. L. ATPase inhibitors of heat-shock protein 90 , second season. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 9-10, p. 342–353, 2010.

[34]KISS, T. et al. Evaluation of the cytotoxicity of  $\beta$ -cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction. **European J. Pharm. Sci.** 40, 376– 380, 2010.

## ***CAPÍTULO VI***

## 6. ARTIGO 03

### **Desenvolvimento de lipossomas contendo complexo de inclusão 17-AAG:HP $\beta$ CD**

Thiers Araújo Campos<sup>1,2</sup>, Juliana da Silva Cruz<sup>2</sup>, Rebecca Ribeiro Torelli de Souza<sup>1,2</sup>,  
Antonio Luis de Oliveira Almeida Petersen<sup>3</sup>, Patrícia Sampaio Tavares Veras<sup>3</sup>, Janaina  
Viana de Melo<sup>2</sup>, Giovanna Machado<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Centro de Ciências Biológicas, CCBUFPE;

<sup>2</sup>Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise/LAMM - Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, CETENE/Recife-PE;

<sup>3</sup>Laboratório de Patologia e Biointervenção - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz /BA;

\* Autor para correspondência:

Dra. Giovanna Machado

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE)

Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise

Av. Professor Luiz Freire n1, Cidade Universitária, Recife - PE- Brasil

CEP: 50.740-540

Tel: +55-81-3334-7235

E-mail: giovanna.machado@cetene.gov.br

## **Desenvolvimento de lipossomas contendo complexo de inclusão 17-AAG:HP $\beta$ CD**

**RESUMO:** O 17-N-alil-amino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG) é um inibidor da proteína chaperona Hsp90 e tem sido estudado extensivamente como um agente anticancerígeno. Porém, sua utilização ainda é limitada devido a sua baixa hidrofiliabilidade e toxicidade. Na tentativa de veicular esse composto em lipossomas, foi investigado a melhor forma de encapsular o 17-AAG. Os lipossomas contendo o 17-AAG e complexo de inclusão do 17-AAG foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e submetidos a análise de citotoxicidade frente as células Hela e MCF-7. Nos estudos de estabilidade acelerada e a longo prazo, as formulações lipossomais contendo o complexo de inclusão não apresentaram alterações significativas quanto ao tamanho, índice de polidispersividade e pH. Os resultados apresentaram, que não há diferença significativa nas formas de encapsular o 17-AAG nos lipossomas, revelando uma EE% de 99% para ambos tipos. Os lipossomas desenvolvidos neste estudo, obtiveram uma carga positiva de  $21,13 \pm 0,68$  mV (LP-Branco),  $11,43 \pm 0,85$  (LP-17-AAG) e  $22,6 \pm 1,85$  (LP-17-AAG:HP $\beta$ CD). A morfologia microscópica confirma o tamanho e o tipo de lipossomas preparados. Nos estudos de citotoxicidade a ação inibitória do LP-17-AAG e o LP-17-AAG:HP $\beta$ CD demonstraram-se mais eficientes comparado ao fármaco livre. Com isso, as duas formas de encapsular o 17-AAG exibiram atividades antiproliferativas similares.

## 1. INTRODUÇÃO

A proteína de choque térmico 90 (Hsp90) é um membro das proteínas chaperonas que regulam processos celulares, tais como o dobramento de proteínas, degradação da proteína e a transdução do sinal necessário para a proliferação celular e sobrevivência durante as condições normais e de doença [1]. A Hsp90 pode ligar-se a uma matriz de proteínas clientes como ErbB2, EGFR, Raf, MEK, FAK, Flt3, PDGFR, Cdk4, -6, -9 e, Akt e p53 envolvidas no desenvolvimento de vários tipos de câncer [1-4]. A inibição do Hsp90 destas proteínas clientes oncogênicas é uma abordagem inovadora para diferentes tipos de doença, especialmente em câncer.

Um derivado da geldanamicina, 17-alil-amino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG ou tanespimycin) é um excelente inibidor da Hsp90 dentre vários que tem sido explorado em ensaios clínicos [5]. Até o presente momento, a sua limitação na terapêutica não permitiu o avanço nos estudos clínicos de fase III para tratamento de diferentes tipos de câncer, que se encontram sob investigação [4-7]. Além do caráter hidrofóbico do 17-AAG, outro fator limitante, está associado a sua hepatotoxicidade igualmente encontrada para outros quimioterápicos também inibidores da Hsp90 [7,8]. Os níveis de dosagem e as frequências de 17-AAG na terapia não estão associados apenas pela toxicidade sistêmica, mas também pela toxicidade dos solventes orgânicos (Cremophor, etanol, DMSO, fosfolípidos de ovo) utilizados para solubilizar o composto sob administração intravenosa [9].

A indústria farmacêutica têm utilizado ciclodextrinas para minimizar a toxicidade de alguns quimioterápicos através do aumento de sua solubilidade. As ciclodextrinas (CDs) são veículos de fármacos, formados por oligossacarídeos cíclicos unidas por ligações  $\alpha$  (1-4), que tendem a formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas hóspedes. A 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) é um derivado sintético da ciclodextrina natural  $\beta$ -ciclodextrina, bastante utilizada por apresentar alta solubilidade e baixa toxicidade [10,11]. A tolerância da HP $\beta$ CD em organismo humano depende da via de administração e da dose. Estudos com a HP $\beta$ CD demonstraram uma boa tolerância da dose aplicada intravenosamente em camundongos, macacos, ratos e cachorros [12].

Diante de muitas vantagens apresentadas na formação dos complexos de inclusão, ainda não é suficiente para promover uma liberação controlada do 17-AAG. Objetivando melhorar a estabilidade e obter um perfil de liberação controlada do fármaco, estudos estão voltados para encapsulação de complexos de inclusão em lipossomas [13]. Considerados biocompatíveis e não imunogênicos os lipossomas são

nanovesículas esféricas constituídas por bicamadas lipídicas que encerram no seu interior um ou mais compartimentos aquosos [13]. Eles têm sido utilizados como modelos de membranas artificiais e como transportadores antitumorais *in vivo* [14]. Os lipossomas oferecem uma excelente oportunidade para complexo de inclusão 17-AAG:HP $\beta$ CD, assim otimizando os parâmetros farmacocinéticos e os efeitos farmacológicos, como a redução da toxicidade do fármaco mantendo o excelente efeito antitumoral. O presente trabalho tem como proposta principal desenvolver lipossomas com complexo de inclusão 17-AAG:HP $\beta$ CD.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Materiais**

Os solventes como Clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e metanol (MeOH) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O 17-alilamino-17-demetóxicigeldanamicina (17-AAG), colesterol (COL), a estearilamina (EST) e 2-Hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St.Louis, EUA); Fosfatidilcolina de soja (PC) (98% de Epikuron 200®) foi obtido a partir de Lipoid GMBH (Ludwigshafen, Alemanha).

### **2.2 Métodos**

#### **2.1. Preparação dos lipossomas**

Os lipossomas contendo 17-AAG foram preparados a partir do método da deposição do filme lipídico seco seguido de sonicação [15]. Os lipossomas convencionais foram desenvolvidos com fosfatidilcolina de soja (PC) e colesterol (COL), na razão molar 8:2, (p/p), enquanto os lipossomas contendo esterialamina (STE) na sua composição química foram preparados com PC, COL e STE na razão molar de 7:1,5:0,5 (p/p). Para a obtenção das formulações lipossomais contendo o 17-AAG, o fármaco foi dissolvido conjuntamente na mistura de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (3:1 v/v) sob agitação magnética. O solvente da mistura foi condicionando no balão para sua remoção à vácuo por 30 min através de um rota-evaporador (37  $\pm$ 1 °C, 80 rpm), resultando na formação do filme lipídico seco. Posteriormente, o filme lipídico foi hidratado com 10 mL da solução de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7.4, produzindo lipossomas multilamelares. Em seguida, a suspensão lipossomal foi sonicada (amplitude 50%) a pulso (on 2s, pulso off 1s) durante 5 minutos, pelo

equipamento ultrassônico de ponta (Q500 da QSonica) para produzir lipossomas pequenos unilamelares.

Os lipossomas contendo o complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD) foram preparados como descrito acima, entretanto a fase aquosa foi formada pela solução de tampão fosfato de potássio (0.1 M, pH 7.4) contendo o complexo de inclusão 17-AAG:HP $\beta$ -CD. Por sua vez, o complexo de inclusão foi desenvolvido como previamente relatado em estudos anteriores [16].

## **2.2 Caracterização dos Lipossomas**

### **2.2.1 Avaliação da estabilidade das formulações**

As formulações obtidas foram avaliadas quanto aos testes de estabilidade acelerada e a longo prazo [15]. Os ensaios de estabilidade acelerada as formulações lipossomais foram submetidas à resistência de centrifugação (6000 rpm, por 1 h, a 25 °C) e a resistência às vibrações mecânicas (180 strokes/min, 48 h, a 37 °C). Após esse processo os lipossomas foram avaliados quanto aos aspectos macroscópicos (observar se a formulação precipitou), variação de pH, tamanho de partícula e índice de polidispersão. No teste de estabilidade a longo prazo, as formulações foram armazenadas à 25°C e em intervalos de tempos regulares (0, 15, e 30 dias) foram avaliadas quanto ao pH, tamanho e sua polidispersividade.

O pH dos lipossomas foi aferido com um eletrodo de vidro através de medidor de pH digital (Orion 5-star plus, Thermo Scientific), à temperatura ambiente. As partículas lipossomais foram diluídas em água pura na proporção de 1:5 (lipossomas: água) e dimensionados por espectroscopia de correlação de fótons (Beckman Coulter Delsa <sup>TM</sup> Nano S Analisador de Partículas). As medições de tamanho e índice de polidispersividade foram efetuadas a 25 °C com um ângulo fixo de 90° e os tamanhos das nanopartículas foram indicados a partir da média do diâmetro hidrodinâmico lipossomal (nm).

### **2.2.2 Eficiência de encapsulação do 17-AAG nos lipossomas**

A eficiência de encapsulação (EE%) do 17-AAG nos lipossomas foi determinada através da técnica de ultrafiltração-centrifugação utilizando unidades ultrafree<sup>®</sup> (Millipore). Para determinação da taxa de encapsulação as amostras de lipossomas foram inseridas em unidades de filtração e submetidas a centrifugação a

10.000 rpm, por 1 h, a 4 °C. O 17-AAG filtrado foi determinado por espectrofotometria UV ao  $\lambda_{\text{max}} = 333$  nm. A quantificação baseou-se em uma curva padrão do 17-AAG dissolvido em metanol nas concentrações variando de 1.0 a 9.0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  preparada previamente. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O total de fármaco nas formulações foi averiguado de modo que uma alíquota dos lipossomas, equivalente ao ponto médio da curva padrão, foi dissolvida em 10 mL de metanol e sonicada por 5 min. Posteriormente o 17-AAG foi quantificado pelo mesmo método anterior através da espectrofotometria UV. A partir disso foi calculada a eficiência de encapsulação demonstrada pela seguinte fórmula :

**Equação 1.** % EE = ([17-AAG filtrado] - [17-AAG total ]) / [17-AAG total] x 100.

### **2.2.3 Potencial Zeta dos lipossomas**

O potencial zeta ( $\zeta$  mV) dos lipossomas foi medida por uma técnica de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer Nano ZS, Malvern, Reino Unido) para analisar a carga de superfície das vesículas lipídicas. Nesta método os lipossomas foram diluídos em água pura na proporção de 1:5 (lipossomas: água). As análises foram em triplicata.

### **2.2.4 Morfologia microscópica dos lipossomas**

A avaliação da morfologia dos lipossomas foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A formulação lipossomal foi diluída em água pura (1:10) e gotejada (10  $\mu\text{L}$ ) numa grade contendo uma rede de cobre quadrangular, revestida por uma película de carbono. Após 5 minutos, o excesso de amostra foi removido por transferência rápida em um papel de filtro e sem seguida a amostra foi corada negativamente com uma alíquota (10  $\mu\text{L}$ ) da solução de ácido fosfotúngstico (1% v/v) durante 5 minutos. Após 24 horas, as microfotografias foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai, 200, FEI) do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste- CETENE.

## **2.3 Estudo *in vitro***

### **2.3.1 Cultivo celular**

Foram cultivadas células do tipo câncer cervical humano (Hela) e adenocarcinoma mamário humano (MCF-7). As células foram mantidas em frascos de cultura e incubadas com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) para células Hela e meio RPMI-1640 para células MCF-7, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% estreptomicina/penicilina a 37°C em estufa úmida (5% de CO<sub>2</sub>). Todas as células foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro/UFRJ.

### **2.3.2 Ensaio de citotoxicidade**

A fim de avaliar a ação antiproliferaiva do 17-AAG livre e complexado com CDs (17-AAG:HPβCD) nos lipossomas, foram utilizadas linhagens de células de câncer (Hela e MCF-7). As células foram plaqueadas (96 poços) com 10<sup>4</sup> células/poço, contendo meio DMEM ou RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de estreptomicina/penicilina sob atmosfera úmida (5% de CO<sub>2</sub>) à 37°C. Após um período de 24h, as células foram tratadas com diferentes concentrações (0,39 – 6,25 µg/mL) de 17-AAG, LP-17-AAG e LP-17-AAG:HPβCD.

A solução do 17-AAG livre, foi preparada a partir de 6,5 mg do composto diluído em 1mL DMSO (dimetilsulfóxido) à 0,5% p/p. A concentração obtida de 11 mM da solução foi filtrada através de um filtro Millipore (0,22 µm) e em seguida diluída com meio de cultura, em várias concentrações de trabalho (0,39 à 6,25 µg/mL). Alíquotas dos lipossomas contendo o 17-AAG e complexo de inclusão (650 µg/mL), também foram filtradas e diluídas para 1 mL de meio de cultura, referente as concentrações adotadas. O procedimento para os lipossomas brancos foi o mesmo. O tipo de meio de cultura celular utilizado para diluição era de acordo com a linhagem de células a serem avaliadas.

As análises foram estudadas por um período de 24, 48 e 72h. O grupo controle foi tratado com 0,1% de dimetil sulfóxido (DMSO). O crescimento celular foi quantificado pelo método de redução do 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) ao composto azul de formazan [17]. O meio foi substituído por uma solução contendo MTT (0,5 mg/mL) por 3h para formação dos cristais de formazan que foram dissolvidos por DMSO. As absorvâncias foram medidas a 570 nm em um leitor multiplate (Multiskan Go, Thermo). O percentual de inibição celular foi calculado

em relação às células tratadas com 17-AAG, LP-17-AAG e LP-17-AAG:HP $\beta$ CD, comparadas ao grupo controle (equação 2). A partir dos dados, uma curva de resposta da dose foi traçada e a concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) foi determinada.

**Equação 2.** INIBIÇÃO (%) =  $1 - \frac{[A_{570} \text{ população celular tratada}]}{[A_{570} \text{ população celular não tratada}]} \times 100$

## 2.4 Análise estatística

Os valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) foram validados utilizando testes de análise de variância (ANOVA) não paramétricos de amostras independentes seguidos pelo pós-teste de bonferroni, para comparações múltiplas, ou teste *t student* quando comparado apenas por duas amostras. Todos os dados quantitativos foram em triplicata adotando a média dos valores e o seu desvio padrão, plotados através do *software* GraphPad Prism 6.0.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização dos lipossomas

#### 3.1.1 Estudo de estabilidade das formulações lipossomais

As amostras de lipossomas foram submetidas a testes de estabilidade acelerada (Tabela 1) e estabilidade a longo prazo (Tabela 2). As amostras para os lipossomas brancos foram: convencional com estearilamina (LP-Branco (C/EST)) e convencional neutro (LP-Branco (S/EST)). As amostras contendo 17-AAG foram: convencional com estearilamina (LP-17-AAG (C/EST)) e convencional neutro (LP-17-AAG (S/EST)); E as amostras com lipossoma contendo 17-AAG e complexo de inclusão foram: convencional com estearilamina (LP-17-AAG:HP $\beta$ -CD (C/EST)) e convencional neutro (LP-17-AAG:HP $\beta$ -CD (S/EST)).

Após a formulação, os aspectos macroscópicos das suspensões lipossomais foram observados, as quais exibiram aspecto leitoso e efeito Tyndall, característico de partículas nanométricas [15]. As vesículas unilamelares pequenas (SUV) formadas, foram preparadas com concentração molar de lipídeos de 42 mM encapsulando o equivalente a 0.65 mg/mL do 17-AAG no lipossoma ou a partir do complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD) contendo a mesma quantidade do composto nos

lipossomas. As formulações brancas diferem entre si na proporção dos constituintes lipídicos, contendo apenas PC:COL (8:2) e os lipossomas com a adição da STE apresentam-se na proporção de 7:1,5:0,5 p/p (PC:COL:STE).

O desenvolvimento do estudo de estabilidade acelerada tem o objetivo de submeter às preparações a condições de estresse para simular processos como transporte e armazenamento avaliados através da resistência à centrifugação e ao estresse mecânico [15]. O tamanho das nanovesículas lipídicas sem o fármaco (LP-Branco), após ser submetido ao estresse mecânico e centrifugação, demonstraram diâmetro menores em relação aos lipossomas com 17-AAG e complexo de inclusão. O índice de polidispersão confirma a quantidade de lipossomas com tamanhos iguais, variando de 0,188 a 0,584. O pH das formulações apresentou-se entre 7,25 e 7,65 e manteve-se constante após aos teste de estabilidade acelerada. Assim, observa-se que as formulações lipossomais preservaram sua estabilidade após os testes de estabilidade acelerada sem mudanças significativas.

O mesmo foi observado no estudo de estabilidade a longo prazo (Tabela 2). Depois de 30 dias do preparo das formulações, os lipossomas contendo 17-AAG preservaram o seu tamanho médio inicial de  $147,7 \pm 4,97$  nm (C/EST) e  $142,3 \pm 0,99$  nm (S/EST), para  $127,3 \pm 0,58$  nm (C/EST) e  $143,5 \pm 1,12$  nm (S/EST). Para os lipossomas contendo 17-AAG:HP $\beta$ -CD exibiram tamanho médio inicial de  $157,4 \pm 3,75$  nm (C/EST) e  $143,6 \pm 2,28$  nm (S/EST) preservando o tamanho para  $169 \pm 2,14$  nm (C/EST) e  $148,2 \pm 1,04$  nm (S/EST). Os lipossomas preparados pelo método de hidratação do filme seco de lipídio, proposto inicialmente por Banghan e colaboradores (1965), não obtiveram diferença quanto ao índice de polidispersão atingindo o máximo de 0,37. Uma maior variação no pH é identificada para LP-17-AAG:HP $\beta$ -CD, apresentando-se inicialmente com pH de 7,63 (C/EST e S/EST) e após 30 dias um decréscimo de 7,50 (C/EST) e 7,42 (S/EST). Desta forma, verifica-se que as formulações desenvolvidas contendo o fármaco ou complexo de inclusão são estáveis quanto aos aspectos analisados demonstrando que as alterações não foram significativas.

**Tabela 1.** Estudo de estabilidade acelerada dos lipossomas branco, contendo o 17-AAG e contendo o complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD).

| Formulação                       | Parâmetros         |       |      |
|----------------------------------|--------------------|-------|------|
|                                  | $\varnothing$ (nm) | PDI*  | pH   |
| <b>Estresse Mecânico</b>         |                    |       |      |
| (180 vibrações/min., 48 h, 37°C) |                    |       |      |
| LP-Branco (S/EST)                | 137,0 $\pm$ 0,04   | 0,271 | 7,41 |
| LP-Branco (C/EST)                | 115,3 $\pm$ 2,03   | 0,246 | 7,50 |
| LP-17-AAG (S/EST)                | 142,2 $\pm$ 1,68   | 0,296 | 7,30 |
| LP-17-AAG(C/EST)                 | 114,7 $\pm$ 2,62   | 0,328 | 7,65 |
| LP-17-AAG:HP $\beta$ CD (S/EST)  | 158,0 $\pm$ 5,80   | 0,584 | 7,63 |
| LP-17-AAG:HP $\beta$ CD (C/EST)  | 127,2 $\pm$ 0,16   | 0,295 | 7,63 |
| <b>Centrifugação</b>             |                    |       |      |
| (6000 rpm, 1 h, 4 °C)            |                    |       |      |
| LP-Branco (S/EST)                | 121,4 $\pm$ 0,47   | 0,188 | 7,25 |
| LP-Branco (C/EST)                | 131,0 $\pm$ 2,65   | 0,313 | 7,46 |
| LP-17-AAG (S/EST)                | 117,6 $\pm$ 1,07   | 0,216 | 7,30 |
| LP-17-AAG(C/EST)                 | 143,9 $\pm$ 0,59   | 0,316 | 7,65 |
| LP-17-AAG:HP $\beta$ CD (S/EST)  | 113,9 $\pm$ 1,34   | 0,230 | 7,63 |
| LP-17-AAG:HP $\beta$ CD (C/EST)  | 145,3 $\pm$ 6,73   | 0,508 | 7,63 |

$\varnothing$  = Tamanho do lipossoma

\*PDI: Índice de Polidispersividade.

(S/EST.) - Sem constituinte lipídico estearilamina nos lipossomas.

(C/EST.) - Com constituinte lipídico estearilamina nos lipossomas.

Os dados estão apresentados em média  $\pm$  desvio padrão.

Não houve diferenças estatísticas significativas em  $p < 0,05$  foram encontrados.

**Tabela 2.** Estudo de estabilidade a longo prazo dos lipossomas branco, contendo o 17-AAG e contendo o complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD).

| Formulação                      | Parâmetros         |       |      |                    |       |      |                    |       |      |
|---------------------------------|--------------------|-------|------|--------------------|-------|------|--------------------|-------|------|
|                                 | 0 dias             |       |      | 15 dias            |       |      | 30 dias            |       |      |
|                                 | $\varnothing$ (nm) | PDI*  | pH   | $\varnothing$ (nm) | PDI*  | pH   | $\varnothing$ (nm) | PDI*  | pH   |
| LP-Branco (S/EST)               | 134,9 $\pm$ 1,02   | 0,280 | 7,42 | 139 $\pm$ 1,89     | 0,268 | 7,41 | 139,1 $\pm$ 1,19   | 0,269 | 7,42 |
| LP-Branco (C/EST)               | 130,7 $\pm$ 1,82   | 0,308 | 7,61 | 131,6 $\pm$ 2,35   | 0,309 | 7,64 | 141,9 $\pm$ 1,10   | 0,324 | 7,62 |
| LP-17-AAG (S/EST)               | 142,3 $\pm$ 0,98   | 0,280 | 7,42 | 143,5 $\pm$ 1,12   | 0,294 | 7,48 | 143,5 $\pm$ 1,12   | 0,294 | 7,48 |
| LP-17-AAG(C/EST)                | 147,7 $\pm$ 4,96   | 0,317 | 7,60 | 127,3 $\pm$ 0,58   | 0,298 | 7,58 | 127,3 $\pm$ 0,58   | 0,298 | 7,58 |
| LP-17-AAG:HP $\beta$ CD (S/EST) | 143,6 $\pm$ 2,28   | 0,373 | 7,63 | 148,2 $\pm$ 0,82   | 0,282 | 7,41 | 148,2 $\pm$ 1,04   | 0,299 | 7,42 |
| LP-17-AAG:HP $\beta$ CD (C/EST) | 157,4 $\pm$ 3,75   | 0,352 | 7,63 | 163 $\pm$ 1,45     | 0,323 | 7,5  | 1,69 $\pm$ 2,14    | 0,315 | 7,5  |

$\varnothing$  = Tamanho do lipossoma

\*PDI: Índice de Polidispersividade.

(S/EST.) - Sem constituinte lipídico estearilamina nos lipossomas.

(C/EST.) - Com constituinte lipídico estearilamina nos lipossomas.

Os dados estão apresentados em média  $\pm$  desvio padrão.

Não houve diferenças estatísticas significativas em  $p < 0,05$  foram encontrados

É sabido que a estabilidade dos lipossomas é dependente de parâmetros como tamanho, índice de polidispersão e pH. A presença do 17-AAG na bicamada lipídica, na sua forma livre ou complexada com ciclodextrinas (17-AAG:HP $\beta$ CD), é evidenciado um aumento no diâmetro médio dos lipossomas em comparação aos lipossomas brancos. Apesar de não obter significância estatística, as formulações do LP-17-AAG:HP $\beta$ CD apresentaram o maior tamanho. Igualmente, Cavalcanti e colaboradores (2011) demonstraram um aumento dos lipossomas preparados com  $\beta$ -lapachona complexada com HP $\beta$ CD, mas a diferença não foi importante.

O índice de polidispersão corrobora com o resultado da análise do tamanho. Como este índice varia de 0 para uma amostra monodispersa até 1 para uma amostra polidispersa, os lipossomas deste estudo revelaram uma polidispersão entre 0,1 a 0,3. Estes resultados estão de acordo com a literatura quando são visualizadas amostras de lipossomas preparadas com complexos de inclusão, as quais obtiveram índices menores que 0,3 [14].

Porém, duas amostras atípicas foram identificadas nos estudos de estabilidade acelerada. Nas formulações submetidas ao estresse mecânico, foi observado que os lipossomas contendo 17-AAG:HP $\beta$ CD (S/EST), apresentaram um índice de 0,584; E quando submetidos à centrifugação, os lipossomas contendo 17-AAG:HP $\beta$ CD (C/EST) demonstraram um valor de 0,580. O movimento browniano dos lipossomas pode estar correlacionado com este resultado. De modo que o movimento das moléculas de fosfolípidos na bicamada lipídica deve-se ao movimento de rotação axial ocorrido por várias interações (hidrofóbicas e ligação de hidrogênio). Quando a interface da membrana lipídica encontra-se na fase gel torna-se mais hidrofílica com mobilidade restringida [19]. Essa mobilidade determina a passagem do composto ou do complexo de inclusão pela membrana quando se encontra hidratada. A fase gel é retornada após a hidratação lipídica pela solução contendo o complexo de inclusão. Possivelmente, parte do complexo de inclusão, composto hidrofílico, ficou no meio externo ou na superfície dos lipossomas, e ainda permaneceu pós o teste de estabilidade em maior quantidade, o que pode ter ocorrido o aumento no tamanho e na polidispersividade.

As propriedades da solução que formam os lipossomas é de extrema importância para o seu desenvolvimento, exemplo o pH. Todos os lipossomas que foram preparados com uma solução de tampão fosfato pH de 7,4, demonstraram nos ensaios de estabilidade, valores que variaram entre 7,25 e 7,65. Observa-se que os valores maiores estão atribuídos ao mesmo caso supracitado. Os lipossomas contendo complexos de inclusão possuem em sua dispersão coloidal complexos de

inclusão e unidades de HP $\beta$ CD livre presentes no exterior dos nanossistemas. A quantidade de grupos hidroxilas, da CDs favorece para uma leve alcalinidade do meio [20]. Além disso, é perceptível que o LP-17-AAG (S/EST) e LP-Branco (S/EST) revelaram menores valores de pH. A diminuição de pH pode está associada a peroxidação lipídica recorrente da ausência do lipídio STE. Sabe-se que a presença da estearilamina confere uma melhor estabilidade as formulações lipossomais [21].

### **3.1.2 EE %, Pontencial Zeta e Microscopia dos lipossomas**

O teor do 17-AAG (Tabela 3) referente a 650  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  das formulações lipossomais após o processo de preparação foi de  $94,33 \pm 3,41\%$  para LP-17-AAG (C/EST) e  $100, \pm 4,82\%$  para LP-17-AAG (S/EST), enquanto nas formulações com complexo de inclusão verificou-se uma redução no teor do fármaco com valores de  $89,23 \pm 4,36\%$  para LP-17-AAG:HP $\beta$ CD (C/EST) e  $83,60 \pm 3,84\%$  LP-17-AAG:HP $\beta$ CD (S/EST). O percurso até obtenção de um produto lipossomal contendo complexo de inclusão inclui etapas como: método de preparação de complexo de inclusão e o método de hidratação de filme seco de lipídio. Processos longos que requerem minuciosidade podem contribuir na diminuição da quantidade final do 17-AAG na formulação. Somado a isso, a diferença pode ser explicada pelo método de preparação dos lipossomas. As vesículas contendo somente o 17-AAG foram preparadas pela solubilização em fase lipofílica, ao contrário daqueles contendo complexo de inclusão. Este último foi dissolvido na fase aquosa e o volume ocupado pela fase aquosa é menor do que aquele ocupado pela fase lipídica [14].

Por outro lado, os dados da eficiência de encapsulação das formulações lipossomais exibiram valores em torno de 99%, mostrando a manutenção da estabilidade do 17-AAG durante o processo de fabricação, assim como a elevada eficiência do processo de encapsulação para todas as formulações propostas. Muitos estudos demonstraram que a incorporação de um fármaco em lipossomas na forma de complexo de inclusão resultou numa melhoria de EE%. Por exemplo,  $\beta$ -lapachona ( $98,1 \pm 1,3\%$ ) e quercitina ( $86,2 \pm 5,2\%$ ) os valores de EE% foram elevados em formulações de lipossomas contendo complexo de inclusão [18, 15].

**Tabela 3.** Caracterização dos lipossomas: Teor (%), percentual de eficiência de Encapsulação (EE%) e potencial zeta.

| Formulação              | Parâmetros   |              |                             |
|-------------------------|--------------|--------------|-----------------------------|
|                         | Teor (%)     | EE %         | Potencial Zeta (mV)         |
| LP-Branco (S/EST)       | ND           | ND           | ND                          |
| LP-Branco (C/EST)       | ND           | ND           | + 21,13 ± 0,68 <sup>a</sup> |
| LP-17-AAG (S/EST)       | 100 ± 4,82   | 99,45 ± 0,21 | ND                          |
| LP-17-AAG(C/EST)        | 94,33 ± 3,41 | 99,04 ± 0,83 | +11,43 ± 0,85 <sup>a</sup>  |
| LP-17-AAG:HPβCD (S/EST) | 83,60 ± 3,84 | 99,41 ± 0,83 | ND                          |
| LP-17-AAG:HPβCD (C/EST) | 89,23 ± 4,36 | 99,53 ± 0,30 | +22,6 ± 1,85 <sup>a</sup>   |

\*Percentual de eficiência de encapsulação .

ND= Não determinado

(S/EST.) - Sem constituinte lipídico estearilamina nos lipossomas.

(C/EST.) - Com constituinte lipídico estearilamina nos lipossomas.

Os dados estão apresentados em média ± desvio padrão.

<sup>a</sup> Houve diferença estatística significativa em  $p < 0,05$ , entre os grupos.

A interação entre os componentes lipídicos da membrana dos lipossomas é uma abordagem interessante quanto à encapsulação do 17-AAG. Tem sido demonstrado segundo a literatura que a mobilidade de rotação axial dos fosfolipídios na membrana, tem sua ação reduzida pela presença do colesterol. Esse esterol pode melhorar a eficiência de encapsulação do fármaco quando está encapsulado no lipossoma [14]. No entanto, dependendo de sua proporção na constituição dos lipossomas, o COL limita a permeabilidade das membranas em grandes quantidades [22].

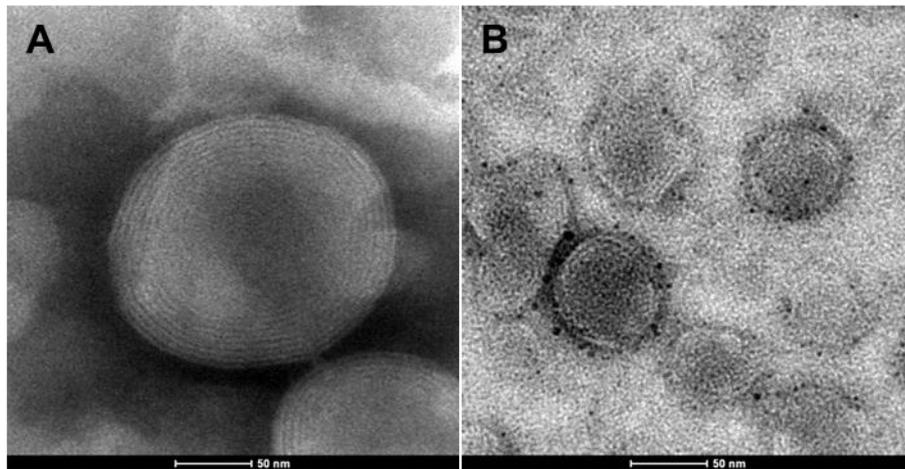
Outro lipídio que aumenta o percentual de encapsulação e melhora a estabilidade das formulações é a presença de estearilamina (STE) [22]. De acordo com a tabela 3, os lipossomas desenvolvidos neste estudo, obtiveram uma carga positiva de 21,13 ± 0,68 mV (LP-Branco), 11,43 ± 0,85 (LP-17-AAG) e 22,6 ± 1,85 (LP-17-AAG:HPβCD). Alguns estudos, que caracterizaram os complexos de inclusão em lipossomas, demonstraram que não houve diferença significativa nos valores de potencial Zeta comparado aos lipossomas sem fármaco ou complexo de inclusão [15,18]. Contudo, o LP-17-AAG apresentou uma carga diferentemente significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação as outras duas formulações com STE (LP-Branco e LP-17-AAG:HPβCD).

A redução da carga dos lipossomas contendo o 17-AAG em comparação com os lipossomas contendo complexo de inclusão, está correlacionada com a adsorção do composto na bicamada lipídica. É possível acreditar que uma interação molecular no espaço das cadeias longas dos fosfolipídios entre o 17-AAG, COL e STE, tenha

permitido a diminuição do potencial Zeta [23]. A carga superficial dos lipossomas sem STE não foi mensurável. O fator de qualidade, do *software* do equipamento, provavelmente detectou carga quase nula (0-1 mV). A proporção de lipídidos nos lipossomas branco sem STE pode ser o fator que não permitiu o equipamento detectar.

Em adição a todas as propriedades gerais discutidas das formulações coloidais (lipossomas), a morfologia microscópica também têm sido de extrema importância no entendimento das interações, como movimento browniano [24]. Qualquer indução na alteração da membrana dos lipossomas irá afetar diretamente o movimento Browniano espontâneo, que por sua vez irá influenciar o resultado final de tamanho [25]. As imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura (MET), figura 1, demonstram lipossomas com tamanho inferiores a 220 nm determinantes para um bom funcionamento no comportamento farmacocinético. Ou seja, o tamanho de lipossomas < 30 nm pode levar a uma rápida depuração renal e >400 nm leva uma rápida depuração hepática [26].

**Figura 1.** Fotomicrografias dos lipossomas contendo STE coradas com ácido fosfotungstíco (1%); (A) LP- 17-AAG; (B) LP-17-AAG:HP $\beta$ CD. As imagens foram analisadas por microscópio eletrônico de varredura.



### **3.2 Estudo in vitro**

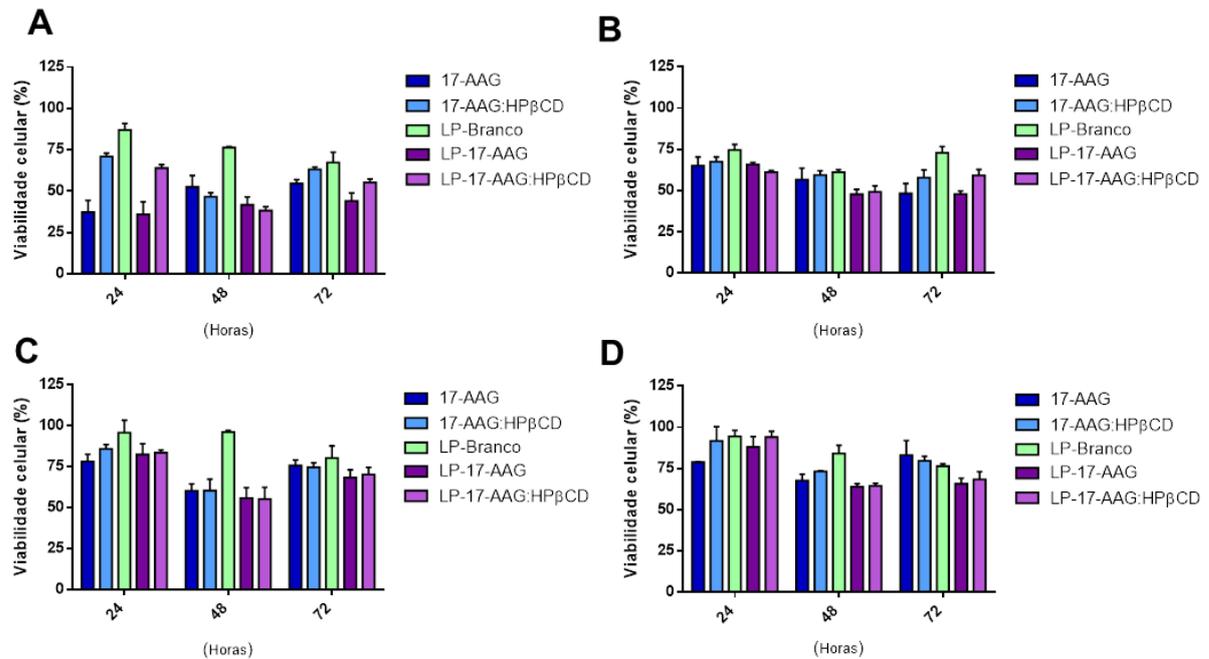
#### **3.2.1 Estudo de citotoxicidade**

Os estudos de citotoxicidade têm como objetivo avaliar o efeito anti-proliferativo da molécula de estudo frente a duas linhagens de células cancerígenas. As células do câncer cervical Humano (Hela) e células do adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) foram tratadas com o 17-AAG sozinho ou complexado a CDs (17-AAG:HP $\beta$ CD), com os lipossomas com STE sem 17-AAG (LP-Branco), contendo o 17-AAG (LP-17-AAG) e contendo o complexo de inclusão (LP-17-AAG:HP $\beta$ CD). O estudo foi investigado através do ensaio de MTT, observado a maior e menor concentração de 17-AAG nas formulações, 6,25  $\mu$ g/mL (10 $\mu$ M) e 0,39  $\mu$ g/mL (0,65 $\mu$ M) respectivamente.

A análise da viabilidade celular no período de 24, 48 e 72 horas (Figura 2), demonstraram que os lipossomas obtiveram propriedades de liberação do 17-AAG na forma livre ou no complexo de inclusão, mantidos sob as condições de cultura celular (37°C). É notado que, no primeiro tempo de estudo (Figura 2A), o LP-17-AAG demonstrou o maior efeito citotóxico ( $64 \pm 7,63\%$ ) frente às células Hela, em relação as demais. A inibição do 17-AAG sozinho, ( $62,69 \pm 7,12\%$ ) não exibiu diferença significativa comparada ao encapsulado (LP-17-AAG). O mesmo ocorreu em relação ao complexo de inclusão livre ( $29,03 \pm 2,03\%$ ) comparado ao encapsulado nos lipossomas. Porém, o LP-17-AAG demonstrou uma citotoxicidade significativa em relação ao LP-17-AAG:HP $\beta$ CD (inibição de  $35,99 \pm 2,09\%$ ). Neste contexto, a diferença de carga superficial dos lipossomas não influenciou na internalização dos lipossomas catiônicos pelas células, uma vez que, os LP-17-AAG:HP $\beta$ CD possui uma carga positiva maior, as duas formulações possuem a mesma proporção de STE.

Sabe-se que a alta densidade de cargas positivas na superfície de lipossomas aumenta drasticamente a sua adsorção na superfície da célula carregada negativamente, mas podem sofrer uma interrupção da ligação pela presença na matriz extracelular de proteínas com cargas negativas [27] Estas proteínas estão associadas ao meio de cultura utilizado no experimento, principalmente pela presença de proteínas no soro fetal bovino. A inibição dos lipossomas catiônicos foi observada no tratamento com tripsina [28]

**Figura 2.** Avaliação da citotoxicidade do 17-AAG livre e complexado (17-AAG:HP $\beta$ CD) nos lipossomas frente às células de câncer como: A e C- cervical Humano (Hela) , B e D- adenocarcinoma mamário humano (MCF-7). Os grupos foram tratados e analisados na concentração de 6,25  $\mu$ g/mL(A e B) e 0,39  $\mu$ g/mL (C e D) por 24, 48 e 72h. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando a média dos valores e seu desvio padrão.



Apesar das células Hela não apresentarem inibição do seu crescimento superior a 62%, correspondente ao tratamento com LP-17-AAG:HP $\beta$ CD por 48 horas, o lipossoma contendo o 17-AAG permanece significativamente com efeito inibitório igual de  $58,18 \pm 4,70\%$  por 48 horas e  $55,91 \pm 4,94\%$  por 72 horas. Isto demonstra que as duas formas de encapsular o 17-AAG nos lipossomas catiônicos tem citotoxicidade similares e efeito de liberação controlada. Em contraste, as células do adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), não evidenciaram valores significativos ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de estudo no tratamento de 24, 48 e 72 horas (Figura 2B). Apenas é observado que as duas formulações lipossomais (LP-17-AAG e LP-17-AAG:HP $\beta$ CD) se mantiveram nos estudos de citotoxicidade com inibições iguais entre si e superior aos compostos livres (17-AAG e 17-AAG:HP $\beta$ CD). Os resultados aparentemente correlacionam com a resistência que as células possuem ao 17-AAG.

A resistência a multiplas drogas é um obstáculo importante no tratamento de câncer. Os estudos apotam que a resistência está envolvida na super-expressão de proteínas atuantes e dependente de ATP (adenossina-trifosfato). Entre estas, a P-gp tem sido citado como a responsável pelo efluxo de fármacos das células MCF-7. Além disso, acredita-se que a super-expressão das P-glicoproteínas leva a uma maior

rigidez da membrana de células, [29] impossibilitando a passagem de fármacos por transporte passivo.

Outra informação importante é a viabilidade das células Hela superior a 50% nas menores concentrações (0,39 µg/mL) para todos os tratamentos (Figura 2C), exceto quando é observado uma diminuição na viabilidade nos tratamentos com lipossomas (LP-17-AAG e LP-17-AAG:HPβCD) nas células MCF-7, nos tempos de 48 e 72 horas (Figura 2D). O percentual de inibição do LP-17-AAG ( $34,19 \pm 3,38\%$ ) nas células MCF-7, tratadas após 72 horas, exibiu uma diferença significativa em relação ao 17-AAG não encapsulado ( $16,79 \pm 8,69\%$ ) e complexo de inclusão ( $20,32 \pm 2,16\%$ ). Assim como, as formulações contendo o complexo de inclusão ( $31,52 \pm 4,59\%$ ) para o 17-AAG. Esses resultados confirmam que as formulações lipossomais preparadas exibiram melhores efeitos.

A fim de demonstrar as vantagens dos lipossomas preparado com 17-AAG e 17-AAG:HPβCD, um índice quantitativo da concentração inibitória, IC<sub>50</sub>, que é a concentração requerida para induzir 50% de morte das células incubadas em um determinado período, foi avaliado para as duas células (Tabela 4). Por exemplo, após 24 h de incubação, a IC<sub>50</sub> determinada a partir dos dados de citotoxicidade para as linhagens de células MCF-7 não evidenciaram dados significativos. Por outro lado, foi apenas visualizado nas células Hela, tratadas com LP-17-AAG e 17-AAG livre uma IC<sub>50</sub> de  $3,42 \pm 0,47$  µg/mL e  $3,39 \pm 0,25$  µg/mL, respectivamente. A ação inibitória do LP-17-AAG se manteve com o mesmo índice (3,42 - 3,83) ao longo dos dias de estudo (48 e 72 horas) em ambas as células. Vale ressaltar que o LP-17-AAG:HPβCD demonstrou uma IC<sub>50</sub> ( $0,61 \pm 0,10$  µg/mL) significativamente melhor frente às células Hela em comparação ao LP-17-AAG no período de 48 horas. Assim como, é perceptível uma diferença em relação ao 17-AAG livre ( $>6,25$  µg/mL) e 17-AAG:HPβCD ( $3,82 \pm 0,50$  µg/mL). As duas formulações lipossomais também apresentaram melhores índices de concentração inibitória nas células MCF-7, dentro do mesmo período. Após 72 horas apenas o LP-17AAG demonstrou valores significativos para células Hela e MCF-7.

**Tabela 4.** Valores da concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) para 17-AAG, 17-AAG:HP $\beta$ CD, LP-17-AAG e LP-17-AAG:HP $\beta$ CD.

| Formulação              | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) |                 |                              |                              |                              |                              |
|-------------------------|--------------------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                         | 24 h                           |                 | 48 h                         |                              | 72 h                         |                              |
|                         | MCF-7                          | Hela            | MCF-7                        | Hela                         | MCF-7                        | Hela                         |
| 17-AAG                  | > 6,25 <sup>a</sup>            | 3,39 $\pm$ 0,25 | > 6,25 <sup>C</sup>          | > 6,25 <sup>b</sup>          | 5,31 $\pm$ 0,34 <sup>d</sup> | > 6,25 <sup>d</sup>          |
| 17-AAG:HP $\beta$ CD    | > 6,25 <sup>a</sup>            | > 6,25          | > 6,25 <sup>C</sup>          | 3,82 $\pm$ 0,50 <sup>b</sup> | > 6,25 <sup>d</sup>          | > 6,25 <sup>d</sup>          |
| LP-17-AAG               | > 6,25 <sup>a</sup>            | 3,42 $\pm$ 0,47 | 3,82 $\pm$ 0,50 <sup>C</sup> | 3,34 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup> | 3,83 $\pm$ 0,56 <sup>d</sup> | 3,83 $\pm$ 0,31 <sup>d</sup> |
| LP-17-AAG:HP $\beta$ CD | > 6,25 <sup>a</sup>            | > 6,25          | 4,76 $\pm$ 0,42 <sup>C</sup> | 0,61 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup> | > 6,25 <sup>d</sup>          | > 6,25 <sup>d</sup>          |

Os dados estão apresentados em média  $\pm$  desvio padrão.

<sup>a</sup>Não houve diferenças estatísticas significativas em  $p < 0,05$

<sup>b, C e d</sup>  $p < 0,05$  significativamente diferente.

Os resultados apresentados são consistentes em comparação com os descritos na literatura, em que o 17-AAG tem sido considerado um dos mais promissores agentes quimioterápicos contra uma variedade de câncer [30]. Estudos *in vitro* com células do câncer ovariano (SKOV-3), tratadas com micelas contendo o 17-AAG, apontaram o efeito anti-cancerígeno inferior a 5% em relação ao fármaco livre [31]. Larson e colaboradores (2011) demonstraram também que ao incorporar o 17-AAG em micelas resultou numa diminuição da capacidade para inibir o crescimento de células DU145 (células do câncer de próstata humano), obtendo uma IC<sub>50</sub> de 230  $\pm$  10 nM para micelas, em comparação com o fármaco livre (IC<sub>50</sub> de 15,0  $\pm$  0,3 nM) [32]. Apenas um trabalho citou um efeito citotóxico para células do glioblastoma quando o 17-AAG foi incorporado em micelas poliméricas, evidenciando uma IC<sub>50</sub> maior, comparada ao fármaco livre [33]. Portanto, nenhum estudo demonstrou propriedades antiproliferativas do 17-AAG com significância, quanto ao estudo em lipossomas catiônicos.

Muitos estudos têm relacionado a ação citotóxica dos lipossomas catiônicos aos possíveis mecanismos correlacionados entre si como: o estresse oxidativo, a indução de citocina e o processo de apoptose. Estas respostas dadas pelas células dependem do tipo, tamanho e natureza dos lipossomas [27]. A mistura de lipídios catiônicos com lipídios neutros aumentam as chances de apoptose. Os lipossomas desenvolvidos neste estudo contêm estearilamina, um lipídio de carga positiva que induz a fosforilação da treonina e tirosina, ambos associados ao processo pró-apoptótico [34]. Somado a isso, a presença do colesterol, modificado a fluidez dos lipossomas catiônicos, aumenta o efeito pró-apoptótico [27]. Por fim, os lipossomas contendo o 17-AAG na forma livre ou complexado a ciclodextrinas tornam-se uma nova alternativa para o câncer.

#### 4. CONCLUSÃO

Neste estudo, foram preparados lipossomas catiônicos contendo 17-AAG e 17-AAG:HP $\beta$ CD através da técnica hidratação de filme seco. As formulações apresentaram-se estáveis nos estudos de estabilidade, acelerada e a longo prazo. Os lipossomas preparados continham em sua composição química a estearilamina, demonstrados através do potencial zeta uma carga de superfície positiva. O tamanho dos lipossomas preparados foi <200nm e monodispersos, comprovado por microscopia eletrônica de varredura. Nos estudos de citotoxicidade demonstrou que não há diferença entre as formas de encapsular nos lipossomas, confirmado pelos dados da eficiência de encapsulação. Além disso, os lipossomas apresentaram liberação controlada no decorrer dos dias analisados (24, 48 e 72h). A pesquisa baseada na utilização de lipossomas catiônicos contendo o 17-AAG demonstrou a inibição da Hsp90, resultando em esgotamento de suas proteínas clientes, diminuindo assim a sobrevivência e proliferação celular.

#### 5. REFERENCIAS

[1] TREPEL, J. et al. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 8, p. 537–549, 2010.

[2] LU, X. et al. Hsp90 inhibitors and drug resistance in cancer: The potential benefits of combination therapies of Hsp90 inhibitors and other anti-cancer drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 8, p. 995–1004, 2012.

[3] BURGER, A. M. Highlights in experimental therapeutics. **Cancer Letters**, v. 245, n. 1-2, p. 11–21, 2007.

[4] CORTESE, K. et al. The HSP90 inhibitor geldanamycin perturbs endosomal structure and drives recycling ErbB2 and transferrin to modified MVBs/lysosomal compartments. **Molecular biology of the cell**, v. 24, n. 2, p. 129–44, 2013.

[5] KITSON, R. R. A et al. Synthesis of 19-substituted geldanamycins with altered conformations and their binding to heat shock protein Hsp90. **Nature chemistry**, v. 5, n. 4, p. 307–14, 2013.

[6] NECKERS, L. Heat shock protein 90 inhibition by 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin: a novel therapeutic approach for treating hormone-refractory prostate cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 8, n. 5, p. 962–966, 2002..

[7] NECKERS, L.; TREPEL, J.B. Stressing the development of small molecules targeting HSP90. **Clin. Cancer Res.** v. 20, 275–277, 2014.

[8]NATH, D.; GOSWAMI, R. Chemico-Biological Interactions Drugs of abuse and addiction: A slippery slope toward liver injury. **Chemico-Biological Interactions**, 2015.

[9]EGORIN, M. J. et al. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 330507) in CD2F1 mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 291–302, 2001.

[10]KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 167–180, 2013.

[11]MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 238–250, 2014.

[12]LOFTSSON, T., BREWSTER, M.E., 2011. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. *J. Pharm. Pharmacol.*63, 1119–1135.

[13]ANWEKAR, H.; PATEL, S.; SINGHAI, A. K. Liposome as drug carriers. **International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences**, 2, 945–951, 2011.

[14]GHARIB, R. et al. Liposomes incorporating cyclodextrin–drug inclusion complexes: Current state of knowledge. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 175–186, 2015.

[15]CADENA, P. G. et al. *Biochimica et Biophysica Acta* Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes. **BBA - Biomembranes**, v. 1828, n. 2, p. 309–316, 2013.

[16]CAMPOS, T.A. et al. Complexo de inclusão contendo 17-AAG:2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina: Desenvolvimento, caracterização e citotoxicidade. **Journal of Molecular Structure**. No prelo 2016.

[17]SOARES, D. C. F. et al. Liposomes Radiolabeled with  $^{159}\text{Gd}$ : *in vitro* Antitumoral Activity, Biodistribution Study and Scintigraphic Image in Ehrlich Tumor Bearing Mice. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol 17, 290-296, 2011

[18]CAVALCANTI, I. M. F. et al. The encapsulation of  $\beta$ -lapachone in 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 332–340, 2011.

[19]SHIMANOUCI, T. et al. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* Relationship between the mobility of phosphocholine headgroups of liposomes and the hydrophobicity at the membrane interface: A characterization with spectrophotometric measurements. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 221–230, 2011.

[20]PINHO, E. et al. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 121–135, 2014.

[21]OLIVEIRA, J. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 345–363, 2014.

[22]OLIVEIRA, J. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 345–363, 2014.

[23]CAMPOS, T.A. et al. Aumento do potencial antiproliferativo e antitumoral do 17-AAG encapsulado em lipossomas. **Journal Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. No prelo: 2016

[24]KUNTSCHE, J.; HORST, J. C.; BUNJES, H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, n. 1-2, p. 120–137, 2011.

[25]SINGH, Y. et al. Bridging small interfering RNA with giant therapeutic outcomes using nanometric liposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 220, p. 368–387, 2015.

[26]PANZITTA, M. et al. Drug delivery system innovation and Health Technology Assessment: Upgrading from Clinical to Technological Assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 495, n. 2, p. 1005–1018, 2015.

[27]LONEZ, C.; VANDENBRANDEN, M.; RUYSSCHAERT, J. Cationic lipids activate intracellular signaling pathways ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 15, p. 1749–1758, 2012.

[28]ARIMA, H. ARAMAKI, Y. TSUCHIYA, S. Contribution of trypsin-sensitive proteins to binding of cationic liposomes to the mouse macrophage-like cell line, **J. Pharm. Sci.** 86, 786–790, 1997.

[29]JIA, Y. et al. Ultrasonics Sonochemistry Comparison of cell membrane damage induced by the therapeutic ultrasound on human breast cancer MCF-7 and MCF-7 / ADR cells. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 26, p. 128–135, 2015.

[30]TRENDOWSKI, M. PU-H71: An improvement on nature's solutions to oncogenic Hsp90 addiction. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 202–216, 2015.

[31]CHANDRAN, T. et al. Design and evaluation of micellar nanocarriers for 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 392, n. 1-2, p. 170–177, 2010.

[32]LARSON, N. et al. Synthesis and evaluation of poly ( styrene- co -maleic acid ) micellar nanocarriers for the delivery of tanespimycin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 111–117, 2011.

[33]SAXENA, V.; HUSSAIN, M. D. Formulation and in vitro evaluation of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) loaded polymeric mixed micelles for glioblastoma multiforme. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 350–355, 2013.

[34] ARISAKA, M. et al. Involvement of protein kinase Cdelta in induction of apoptosis by cationic liposomes in macrophage e like. **FEBS Lett.** 584, 1016–1020, 2010.

## ***CAPÍTULO VII***

## **7. CONCLUSÃO GERAL**

O potencial da ação antitumoral do 17-AAG encapsulado em nanossistemas do tipo lipossomas catiônicos foi demonstrado através de um modelo experimental *in vivo* (tumor sólido de Ehrlich). Os dados apresentaram valores similares entre o 17-AAG livre e encapsulado, provando que os lipossomas desenvolvidos neste estudo obteve a função de veicular o composto mantendo sua atividade biológica.

Os lipossomas catiônicos, na propoção e composição dos constituintes lipídicos escolhidos, apresentaram tamanhos < 200 nm, monodispersos e com carga positiva. Essas informações permitiram uma boa encapsulação do 17-AAG nos nanossistemas, considerando o valor de 99% para a eficiência de encapsulação.

O complexo de inclusão obtido pela técnica de liofilização indicou que há interações intermoleculares entre os compostos 17-AAG e HP $\beta$ CD, demonstrados por ensaios de caracterização como: FT-IR, DRX, DSC, TG e MEV.

O desenvolvimento de lipossomas contendo complexo de inclusão (17-AAG:HP $\beta$ CD) evidenciou formulações estáveis e com um tamanho igual aos lipossomas preparados com o 17-AAG. Assim, os ensaios de citotoxicidade revelaram o mesmo parâmetro de efeito inibitório em ambas as formas de encapsular o 17-AAG nos lipossomas.

Contudo, este estudo fornece uma visão abrangente sobre o modo de ação do 17-AAG livre, complexado à HP $\beta$ CD e ambos encapsulados em lipossomas catiônicos, como alternativa para agentes inibidores do Hsp90 envolvidos no processo de neoplasias.

## ***CAPÍTULO VIII***

## 8. REFERÊNCIAS

ABU-ELSAAD, N. M. et al. The heat shock protein 90 inhibitor, 17-AAG, attenuates thioacetamide induced liver fibrosis in mice. **Pharmacological Reports**. v. 68, p. 275–282, 2016.

ALBERTS, B. et al. *Biologia Molecular da Célula*. 3 ed. Porto Alegre: **Artes Médicas**, p. 963-1006, 1997.

ALMEIDA, J.R.C. *Farmacêuticos em oncologia – uma nova realidade*. 2 ed. **Atheneu**, São Paulo, p. 111-275, 2010.

AMARAL, C.F.S. et al. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, p. 220-227, 1986.

ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S. An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 15–28, 2014.

ANWEKAR, H.; PATEL, S.; SINGHAI, A. K. Liposome as drug carriers. **International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences**, 2, 945–951, 2011.

ARIMA, H. ARAMAKI, Y. TSUCHIYA, S. Contribution of trypsin-sensitive proteins to binding of cationic liposomes to the mouse macrophage-like cell line, **J. Pharm. Sci.** 86, 786–790, 1997.

ARISAKA, M. et al. Involvement of protein kinase Cdelta in induction of apoptosis by cationic liposomes in macrophage e like. **FEBS Lett.** 584, 1016–1020, 2010.

AROURI, A. et al. Lipases, liposomes and lipid-prodrugs. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 18, n. 5, p. 419–431, 2013.

ARUN, R. et al. Cyclodextrins as drug carrier molecule: A review. **Scientia Pharmaceutica**, 76 (4), 567–598, 2008.

ASCENSO, A. et al. Novel tretinoin formulations: A drug-in-cyclodextrin-in liposome approach. **Journal of Liposome Research**, 23, 211–219, 2013.

BANGHAM A. D.; STANDISH M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular biology**, v.13, p. 238-252, 1965.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. DE; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167–179, 2007.

BEHRSING, H. P. et al. In vitro detection of differential and cell-specific hepatobiliary toxicity induced by geldanamycin and 17-allylaminogeldanamycin in rats. **Toxicol. In Vitro** v. 19, p. 1079–1088, 2005.

BERNIER, V. et al. Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 15, 222-228, 2004.

BITTENCOURT, P. L. Epidemiologia da hepatotoxicidade por drogas. **Rev. Suplemento Hepatotoxicidade**, v. 30, p. 14-16, 2011.

BRANDÃO, D. F. et al. Cirrose hepática e células estreladas do fígado. **Acta Cirúrgica Brasileira**. volume 21, pag. 54-57. 2006.

BRASILEIRO FILHO, G.; PEREIRA, F.E.L.; GUIMARÃES, R.C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celulares. In: BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo Patologia. 8. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 2012. Cap.8, p. 219-276.

BRAUN, C.A.; ANDERSON, C.M. **Fisiopatologia, alterações funcionais na saúde humana** 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Adv. Drug Del. Rev.** 59, 645-666, 2007.

BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 5, p. 405-411, out. 2011

BURGER, A. M. Highlights in experimental therapeutics. **Cancer Letters**, v. 245, n. 1-2, 11–21, 2007.

BURGER, K. N. Nanocapsules: lipid-coated Aggregates of cisplatin with high cytotoxicity. **Nature Medicine**, v. 8, p. 81-84, 2002.

CADENA, P. G. et al. Biochimica et Biophysica Acta Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes. **BBA - Biomembranes**, v. 1828, n. 2, p. 309–316, 2013.

CALABRÒ, M. L. Effects of  $\alpha$  and  $\beta$ -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones J. Pharmaceut. **Biomed.** 35, 365-377, 2004.

CAMPOS, T.A. et al. Complexo de inclusão contendo 17-AAG:2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina: Desenvolvimento, caracterização e citotoxicidade. **Journal of Molecular Structure**. No prelo 2016.

CAMPOS, T.A. et al. Aumento do potencial antiproliferativo e antitumoral do 17-AAG encapsulado em lipossomas. **Journal Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. No prelo: 2016

CARACCILO, G. Liposome-protein corona in a physiological environment: Challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 11, n. 3, p. 543–557, 2015.

CARRIER, R. L.; MILLER, L. A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 123, p. 78–99, 2007.

CAVALCANTI, I.M.F. the encapsulation of b-lapachone in 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: a physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 44. 332–340, 2011.

CHALLA, R. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS Pharm. Sci. Tech.** 6, 329-357, 2005.

CHANDRAN, T. et al. Design and evaluation of micellar nanocarriers for 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 392, n. 1-2, p. 170–177, 2010.

CORTESE, K. et al. The HSP90 inhibitor geldanamycin perturbs endosomal structure and drives recycling ErbB2 and transferrin to modified MVBs/lysosomal compartments. **Molecular biology of the cell**, v. 24, n. 2, p. 129–44, 2013.

COTRAN, R.S. Patologia estrutural e funcional. 7 ed. Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2000. P. 233-293.

CUI, Z.; LAFLEUR, M. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Lamellar self-assemblies of single-chain amphiphiles and sterols and their derived liposomes: Distinct compositions and distinct properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 177–185, 2014.

DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, 161(2), 505–522, 2012.

DATTA, N. R. et al. Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: Recent advances and promises for the future. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, n. 9, p. 742–753, 2015.

DESALE, S. S. et al. Polypeptide-based nanogels co-encapsulating a synergistic combination of doxorubicin with 17-AAG show potent anti-tumor activity in ErbB2-driven breast cancer models. **Journal of Controlled Release**, v. 208, p. 59–66, 2015.

DOMINGO, C.; SAURINA, J. An overview of the analytical characterization of nanostructured drug delivery systems: Towards green and sustainable pharmaceuticals: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 744, p. 8–22, 2012.

DUCHÊNE, D.; WOUESSIDJEWE, D.; PONCHEL, G. Cyclodextrins and carrier systems. **Journal of Controlled Release** 62, 263–268, 1999.

EGORIN, M. J. et al. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 330507) in CD2F1 mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 291–302, 2001.

ELLGAARD, L; HELENIUS, A. Quality control in the endoplasmic reticulum. **Nat Ver Mol Cell Biol**, 4, 181-191, 2003.

FAINGOLD, D. et al. Expression of focal adhesion kinase in uveal melanoma and the effects of Hsp90 inhibition by 17-AAG. **Pathology, research and practice**, v. 210, n. 11, p. 739–45, 2014.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorgan.Med. Chem.** v. 17, p. 2950-2962, 2009.

FERNANDES, P. L. D. O. et al. Ação das Proteínas de Choque Térmico em frutos. **Revista Agropecuária Científica no Semi-Árido**. V.8, n.4, p. 01-06, 2012.

FUKUYO, Y.; HUNT, C. R.; HORIKOSHI, N. Geldanamycin and its anti-cancer activities. **Cancer Letters** 290, 24-35, 2010.

GADANO., A. et al. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*. **L J Ethnopharmacol**. 81,11-16, 2002

GAO, Y. et al. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 761–777, 2014.

GARCIA-ZEBIRI, I.X.; GONZALES-GAITANO, G.; SÁNCHEZ, M.; ISAI, J.R. Fitir Study of dibenzofuran-2-carboxylic acid and its complexes with  $\beta$ -cyclodextrin. **Vibrat.spectrosc.** 33:205-213, 2003.

GHARIB, R. et al. Liposomes incorporating cyclodextrin–drug inclusion complexes: Current state of knowledge. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 175–186, 2015.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, M. Characterizing the natural canthaxanthin/2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 1147–53, 2014.

GIBBS, W.W. Raízes do câncer. **Scinetific American Brasil**, p. 39-47, ano 2, n.15, 2003.

GODSEY, M.E.; SURYAPRAKASH, S.; LEONG, K.W. Materials innovation for co-delivery of diverse therapeutic cargos, **RSC Adv**, 3, 24794–24811, 2013.

GREM, J. L. et al. Phase I and pharmacologic study of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in adult patients with solid tumors. **Journal of clinical**

**oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 9, p. 1885–1893, 2005.

GUO, W. Enzymatic reduction and glutathione conjugation of benzoquinone ansamycin heat shock protein 90 inhibitors: relevance for toxicity and mechanism of action. **Drug Metab. Dispos.** 36, 2050–2057, 2008.

HARTL, F. U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, 475, 324-332, 2011.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K.A. Phase-solubility techniques. **Adv. Anal. Chem. Instr.**, v. 4, p. 117-212, 1965.

HO, N. et al. Heat shock protein 90 and role of its chemical inhibitors in treatment of hematologic malignancies. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)** v. 5, n. 8, p. 779–801, 2012.

HUANG, J. et al. Biodegrad-able self-coated nanoparticles of poly (d,l-lactide-co-glycolide)/hyaluronic acidblock copolymers for target delivery of docetaxel to breast cancer. **Biomaterials**, 35(1), 550–566, 2014.

HUANG, Z. et al. Complexation of chlorpropham with hydroxypropyl-β-cyclodextrin and its application in potato sprout inhibition. **Carbohydrate Polymers**, v. 107, p. 241–246, 2014.

INCA - Instituto Nacional do Cancer. Acesso em 15/10/2015. [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=18](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=18)

JANIN, Y. L. ATPase inhibitors of heat-shock protein 90, second season. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 9-10, p. 342–353, 2010.

JHAVERI, K. et al. Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 3, p. 742–755, 2012.

JIA, Y. et al. Ultrasonics Sonochemistry Comparison of cell membrane damage induced by the therapeutic ultrasound on human breast cancer MCF-7 and MCF-7 / ADR cells. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 26, p. 128–135, 2015.

KAMAL, A. et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. **Nature** 425, 407–410, 2003.

KATRAGADDA, U. et al. Combined delivery of paclitaxel and tanespimycin via micellar nanocarriers: Pharmacokinetics, efficacy and metabolomics analysis. **Plos One**, 8(3), e58619, 2013.

KATRAGADDA, U. et al. Multi-drug delivery to tumor cells via micellar nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, n. 1-2, p. 281–286, 2011.

KIM, J.O. et al. Polypeptide nanogels with hydrophobic moieties in the cross-linked ionic cores: synthesis, characterization and implications for anticancer drug delivery, **J. Drug Target**, 21, 981–993, 2013.

KISS, T. et al. Evaluation of the cytotoxicity of  $\beta$ -cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction. **European J. Pharm. Sci.** 40, 376–380, 2010.

KITSON, R. R. A et al. Synthesis of 19-substituted geldanamycins with altered conformations and their binding to heat shock protein Hsp90. **Nature chemistry**, v. 5, n. 4, p. 307–14, 2013.

KOHLI, A. G. et al. Designer lipids for drug delivery: From heads to tails. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 274–287, 2014.

KOTY, J.; ARTUR, Z. Adsorption equilibria at interface separating electrolyte solution and phosphatidylcholine – stearylamine liposome membrane. **Biophysical Chemistry**. v. 127, p. 84–90, 2007.

KOUDELKA, S.; TURANEK, J. Liposomal paclitaxel formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 163, n. 3, p. 322-334, nov. 2012.

KRISTMUNDSDÓTTIR, T. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.24, p.539-543, 2005.

KUMAR, V. Et al. **Robbins Patologia Básica**, 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2008.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YAVAD, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 75 (1), 1–18, 2010.

KUNTSCHKE, J.; HORST, J. C.; BUNJES, H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, n. 1-2, p. 120–137, 2011.

KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. **Gann Gan**. v. 73, p. 85-90, fev. 1982

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 167–180, 2013.

LARSON, N. et al. Synthesis and evaluation of poly ( styrene- co -maleic acid ) micellar nanocarriers for the delivery of tanespimycin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 111–117, 2011.

LEE, J. H.; NAN, A. Combination drug delivery approaches in metastatic breast cancer. **Journal of Drug Delivery**, 17, 2012.

LI, J. et al. Integration of the accelerator Aha1 in the Hsp90 co-chaperone cycle. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, e 3, 326–331, 2013.

LIRA, M.C.B. et al. Inclusion complex of usnic acid with  $\beta$ -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, v. 64, p. 215-224, 2009.

LIU, J. et al. Preparation, characterization and in vivo evaluation of formulation of repaglinidewith hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, n. 1-2, p. 137–143, 2014.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. **J. Pharm. Pharmacol.** 62, 1607–1621, 2010.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. **J. Pharm. Pharmacol.** 63, 1119–1135, 2011.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. **J. Pharm. Sci.** 101, in press, 2012.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 1–11, 2007.

LONEZ, C.; VANDENBRANDEN, M.; RUYSSCHAERT, J. Cationic lipids activate intracellular signaling pathways ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 15, p. 1749–1758, 2012

LU, X. et al. Hsp90 inhibitors and drug resistance in cancer: The potential benefits of combination therapies of Hsp90 inhibitors and other anti-cancer drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 8, p. 995–1004, 2012.

MA, S. X. et al. Alpinetin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin host-guest system: Preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 67-68, p. 193–200, 2012.

MARQUES, P. E. et al. Understanding liver immunology using intravital microscopy. **Journal of Hepatology**, v. 63, n. 3, p. 733–742, 2015.

MILETIC, T., KYRIAKOS, K., GRAOVAC, A., IBRIC, S. Spray-dried voriconazole-cyclodextrin complexes: Solubility, dissolution rate and chemical stability. **Carbohydrates Polymers.** 98, 122–131, 2013.

MISIUK, W.; JOZEFOWICZ, M. Study on a host – guest interaction of hydroxypropyl-  $\beta$  -cyclodextrin with ofloxacin. **J. Mol. Liq.** 202, 101–106, 2015.

MOGHADDAM, B. et al. The application of monolayer studies in the understanding of liposomal formulations, **Int. J. Pharm.** 417, 235–244, 2011.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 238–250, 2014.

NATH, D.; GOSWAMI, R. Chemico-Biological Interactions Drugs of abuse and addiction: A slippery slope toward liver injury. **Chemico-Biological Interactions**, 2015.

NECKERS, L. Heat shock protein 90 inhibition by 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin: a novel therapeutic approach for treating hormone-refractory prostate cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 8, n. 5, p. 962–966, 2002.

NECKERS, L.; TREPEL, J.B. Stressing the development of small molecules targeting HSP90. **Clin. Cancer Res.** v. 20, 275–277, 2014.

OLIVEIRA, J. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 345–363, 2014.

O'MALLEY, D. P. et al. Recommendations for gross examination and sampling of surgical specimens of the spleen. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 19, n. 5, p. 288–295, 2015.

ORTEGA, L. et al. Neuropeptides 17-AAG improves cognitive process and increases heat shock protein response in a model lesion with Ab25–35. **Neuropeptides**, 48, 221–232, 2014.

PACEY, S. et al. A Phase II trial of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, tanespimycin) in patients with metastatic melanoma. **Investigational New Drugs**, v. 30, n. 1, p. 341–349, 2012.

PANZITTA, M. et al. Drug delivery system innovation and Health Technology Assessment: Upgrading from Clinical to Technological Assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 495, n. 2, p. 1005–1018, 2015

PARHI, P.; MOHANTY, M.; SAHOO, S. K. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. **Drug Discovery Today**, Orissa, v.17, n. 17-18, p. 1-9, set. 2012.

PATEL, K. et al. Engineered biosynthesis of geldanamycin analogs for Hsp90 inhibition. **Chemistry and Biology**, v. 11, n. 12, p. 1625–1633, 2004.

PATIL, S. G. et al. Preparation of liposomes. **Pharmacological Reviews** 18, 53–58, 2005.

PIEL, G. et al. Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrin and their effect on the integrity of liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, 338,35–42, 2007.

PINHO, E. et al. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 121–135, 2014.

PORTER, J. R.; FRITZ, C. C.; DEPEW, K. M. Discovery and development of Hsp90 inhibitors: a promising pathway for cancer therapy. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 3, 412–420, 2010.

PRADHAN, R. et al. Docetaxel-loaded PLGA nanoparticles: Formulation, physicochemical characterization and cytotoxicity studies. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 13(8), 5948–5956, 2013.

PRADHAN, R. et al. Hyaluronic acid-decorated poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for combined delivery of docetaxel and tanespimycin. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 313–323, 2015.

PRADHAN, R. et al. Preparation and evaluation of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG)-loaded poly (lactic acid-co-glycolic acid) nanoparticles. **Archives of Pharmacal Research** (in press), 2014.

RAJABI, O. et al. Study of interaction of spironolactone with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in aqueous solution and in solid state. **Journal of Molecular Structure**, v. 878, n. 1-3, p. 78–83, 2008.

RICHARDSON, P. G. et al. Tanespimycin monotherapy in relapsed multiple myeloma: Results of a phase 1 dose-escalation study. **British Journal of Haematology**, 150(4),438–445, 2010.

ROUDIER, M. Phenotypic heterogeneity of end-stage prostate carcinoma metastatic to bone. **Human pathology**, v.34, n.6, p. 646-653, 2003.

SAAD, N.; MADY, M. M. Ehrlich tumor inhibition using doxorubicin containing liposomes. **SAUDI PHARMACEUTICAL JOURNAL**, 2014.

SAMUNI, A.; GOLDSTEIN, S. Redox properties and thiol reactivity of geldanamycin and its analogues in aqueous solutions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 22, p. 6404–6410, 2012.

SAXENA, V.; HUSSAIN, M. D. Formulation and in vitro evaluation of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) loaded polymeric mixed micelles for glioblastoma multiforme. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 350–355, 2013.

SAXENA, V.; NAGUIB, Y.; HUSSAIN, M. D. Folate receptor targeted 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) loaded polymeric

nanoparticles for breast cancer. **Colloids Surf. B Biointerfaces** 94, 274-280, 2012.

SCHERPENHUIZEN, A. et al. The effect of exercise therapy in head and neck cancer patients in the treatment of radiotherapy-induced trismus: A systematic review. **Oral oncology**, v. 51, n. 8, p. 745–750, 2015.

SCHNUR, R. C. et al. erbB-2 oncogene inhibition by geldanamycin derivatives: synthesis, mechanism of action, and structure-activity relationships. **Journal of medicinal chemistry**, v. 38, n. 19, p. 3813–20, 1995.

SHIMANOUCI, T. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Relationship between the mobility of phosphocholine headgroups of liposomes and the hydrophobicity at the membrane interface: A characterization with spectrophotometric measurements. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 221–230, 2011.

SHOIEB, A.; SHIRAI, N. Polycystic kidney disease in Sprague-Dawley rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, n. 5-6, p. 361–364, 2015.

SHUM, H.P., YAN, W. W., CHAN, T. M. Recent knowledge on the pathophysiology of septic acute kidney injury: A narrative review. **Journal of Critical Care**, v. 31, n. 1, p. 82–89, 2015.

SINGH, Y. et al. Bridging small interfering RNA with giant therapeutic outcomes using nanometric liposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 220, p. 368–387, 2015.

SLAVOTINEK, A. M.; BIESECKER, L. G. Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease. **Trends in Genetics**, 17, 528-535, 2001.

SOARES, D. C. F. et al. Liposomes Radiolabeled with <sup>159</sup>Gd: in vitro Antitumoral Activity, Biodistribution Study and Scintigraphic Image in Ehrlich Tumor Bearing Mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol 17, 290-296, 2011.

SOUZA, A. W. S. et al. Sistema imunitário: parte II . O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 6, p. 665–679, 2010.

STEBBINS, C. E. et al. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. **Cell** 89, 239–250, 1997.

TAKANO, K. et al. Involvement of actin cytoskeleton in macrophage apoptosis induced by cationic liposomes, **Arch. Biochem. Biophys.** 518,89–94, 2012

TANAKA, E. et al. A pulmonary metastatic model of human non-small cell lung carcinoma cells in SCID mice. **International Congress Series**, v.1255, p. 239-242. 2003.

TANG, P. et al. Inclusion complexes of chlorzoxazone with  $\beta$ - and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Characterization, dissolution, and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 297–305, 2015.

TRENDOWSKI, M. PU-H71: An improvement on nature's solutions to oncogenic Hsp90 addiction. **Pharmacological Research**, v. 99, 202–216, 2015.

TREPEL, J. et al. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 8, p. 537–549, 2010.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chem-ical Reviews**, 98 (5), 2045–2076, 1998.

VALENTE, A. J. M.; SÖDERMAN, O. The formation of host-guest complexes between surfactants and cyclodextrins. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 205, p. 156–176, 2014.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. In: As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. 1 ed. Coimbra: **Minerva Coimbra**, p.19, 2006.

VILLASMIL-SÀNCHEZ, S.; RABASCO, A.M.; GONZÁLES-RODRÍGUEZ, M.L. Thermal and <sup>31</sup>P-NMR studies to elucidate sumatriptan succinate entrapment behavior in phosphatidylcholine/cholesterol liposomes. Comparative <sup>31</sup>P-NMR analysis on negatively and positively-charged liposomes, **Colloids Surf. B: Biointerfaces** 105, 14–23, 2014.

WAGNER, A.; VORAUER-UHL, K. Liposome technology for industrial purposes. **Journal of Drug Delivery**, 591325, 2011.

WANG, B. et al. Hsp90 inhibitor 17-AAG sensitizes Bcl-2 inhibitor (-) -gossypol by suppressing ERK-mediated protective autophagy and Mcl-1 accumulation in hepatocellular carcinoma cells. **Experimental Cell Research**, v. 328, n. 2, p. 379–387, 2014.

WANG, S. et al. SNX-25a, a novel Hsp90 inhibitor, inhibited human cancer growth more potently than 17-AAG. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 73–80, 2014.

WENKERT, D. et al. In Vitro Activity of Geldanamycin Derivatives against *Schistosoma japonicum* and *Brugia malayi*. **J Parasitol Res.** article id 716498, 7 pages, 2010.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <[http://apps.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/handbook-nonclinical-safety-testing/pdf/safety\\_handbook.pdf](http://apps.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/handbook-nonclinical-safety-testing/pdf/safety_handbook.pdf)>. Acesso em: 10 de outubro de 2015.

WILT T, et al. Systematic Review: Comparative Effectiveness And Harms Of Treatments For Clinically Localized Prostate Cancer. **Annals Of Internal Medicine** 148 (6): 435-448, 2008.

XU, X.; KHAN, M.A.; BURGESS, D.J.A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API:II. Screening of critical variables, and establishment of design space at laboratory scale, **Int. J. Pharm.** 423, 543–553, 2012.

ZAMARIN, D. et al. "Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy." **Sci Transl Med** 6 (226): 226ra32, 2014.