



ESTUDO DE ESTABILIDADE DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO OS ANTINEOPLÁSICOS DOXORRUBICINA E CICLOFOSFAMIDA

Talita C. Mendonça*, Simone R. Castro, Lígia N. M. Ribeiro, Ludmilla David Moura, Eneida de Paula

RESUMO

A doxorubicina (DOX) é um antibiótico antineoplásico do grupo das antraciclina, isolado de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetius*. DOX tem atividade significativa contra considerável número de tumores e é utilizada no tratamento do câncer de mama, tumores sólidos pediátricos, sarcomas e linfomas. Já a ciclofosfamida (CFM), agente alquilante, antineoplásico e imunossupressor, é um quimioterápico muito utilizado no tratamento do câncer de mama. Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são nanopartículas constituídas por uma mistura de lipídio sólido e lipídio líquido em temperatura ambiente ou corpórea, estabilizados por um tensoativo. A presença do óleo (lipídio líquido) favorece a eficiência de encapsulação (%EE) e prolonga a liberação das moléculas ativas encapsuladas nestes carreadores, pois reduzir a cristalinidade da matriz lipídica e impede a expulsão do fármaco durante a estocagem. O presente projeto teve como objetivo desenvolver formulações contendo DOX e CFM em CLN com matriz lipídica de manteiga de Ucuuba. Tais sistemas foram avaliados quanto ao tamanho de partículas, índice de polidispersão do tamanho (PDI), potencial Zeta (ZP), %EE, pH, estabilidade ao longo de 360 dias, cinética de liberação e citotoxicidade, *in vitro*. As nanopartículas de CLN_{controle} (sem fármaco) e CLN_{DOX/CFM} apresentaram tamanhos médios de: $239,4 \pm 5,4$ nm e $221,4 \pm 2,3$ nm, PDI = $0,186 \pm 0,03$ e $0,163 \pm 0,04$, ZP = $-28,63 \pm 0,21$ mV e $-23,8 \pm 0,35$ mV e pH em torno de $4,9 \pm 0,03$ e $3,6 \pm 0,01$, respectivamente. Nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão as partículas apresentaram morfologia esférica e tamanho compatível com o determinado por espalhamento de luz dinâmico, indicando que a presença dos fármacos não perturbou a estrutura das nanopartículas. Os CLN exibiram %EE > 90% para DOX e ~ 30% para CFM. O ensaio de viabilidade celular em células cancerosas (MCF7) mostrou potencialização do efeito tóxico de dos fármacos encapsulados, que perdurou por 72 h, confirmando a liberação sustentada dos quimioterápicos pelos CLN.

Palavras-chaves: Doxorubicina, ciclofosfamida, carreadores lipídicos nanoestruturados.

1. INTRODUÇÃO

A doxorubicina (DOX) é um antibiótico antineoplásico do grupo das antraciclina, descoberto nos anos 50 de isolado de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetius*^{6,14}. Seu uso, como agente antineoplásico, iniciou-se nos anos 60, para tratamento de diversos tipos de neoplasias, destacando-se os tumores sólidos e as neoplasias hematológicas⁶. Clinicamente, a doxorubicina tem atividade significativa contra considerável número de tumores, incluindo alguns que são geralmente refratários a outros fármacos^{2,4}. A DOX é utilizada no tratamento do câncer de mama, tumores sólidos da infância, sarcomas e linfomas¹⁵. A atividade antineoplásica da doxorubicina deve-se, principalmente, à sua ação no DNA. Embora os mecanismos exatos de ação não estejam completamente elucidados, ela inibe a DNA topoisomerase II, bloqueia a DNA polimerase e insere-se entre os pares de base do DNA, impedindo a síntese de macromoléculas, induzindo apoptose e gerando radicais livres durante sua metabolização¹⁰. A Ciclofosfamida (CFM), agente alquilante, antineoplásico e imunossupressor, é um quimioterápico muito utilizado no tratamento

de neoplasias malignas, como o câncer de mama e outras patologias, como a nefrite lúpica, especialmente na classe IV, de proliferativa difusa^{5,12}. Outras manifestações mais graves de lúpus eritematoso sistêmico (LES), como doença neuropsiquiátrica, também podem ser tratadas com CFM. Sua administração pode ser por via oral ou endovenosa intermitente⁵. Os efeitos tóxicos da ciclofosfamida incluem a supressão da medula óssea, toxicidade cardíaca e gonadal, cistite hemorrágica e carcinogênese, com dose cumulativa sendo o principal fator de risco³. As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram a primeira geração de nanopartículas lipídicas, produzidas pela substituição da fase oleosa (lipídio líquido, LL) de nanoemulsões por um lipídio sólido, LS¹³. A fim de superar algumas limitações, como a expulsão do fármaco durante o armazenamento^{1,7,8}, uma segunda geração de nanopartículas lipídicas foi desenvolvida: os carreadores lipídicos nanoestruturados, ou CLN⁹. A inovação de CLN consiste na adição de um LL na temperatura ambiente ou corpórea para formar a mistura de lipídios (LS + LL) que compõem o interior da nanopartícula. A presença do óleo (LL) nestes carreadores favorece a eficiência de encapsulação e prolonga a liberação das moléculas ativas encapsuladas, pois impede a expulsão do fármaco das partículas durante a estocagem, por reduzir a cristalinidade da matriz lipídica¹¹.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os CLN foram preparados através do método de emulsificação-ultrasonicação¹¹. Para determinar o tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (ZP) foi utilizado o equipamento ZetaSizer Nano ZS 90, com medidas a 25 °C. Para ambos os testes os diferentes sistemas foram diluídos 1:100 (v/v), e os resultados expressos pela média de 3 medidas. No teste de estabilidade as amostras foram acompanhadas em intervalos de tempo pré-determinados, durante 1 ano. Os experimentos de NTA foram realizados no equipamento NanoSight NS300, após diluição das amostras em água desionizada (1:5000 v/v) e em porta-amostra (~ 0,5 mL). O pH das nanoformulações de CLN foi avaliado utilizando pHmetro Digmed® DM-22 à 25 °C, previamente calibrado com os padrões de pH 7,0 e 4,0. Na análise morfológica, as amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss – LEO 906. A eficiência de encapsulação de DOX (base) e CFM nas formulações de CLN foi determinada pelo método de ultrafiltração-centrifugação⁸, nas amostras frescas e guardadas por até 360 dias. Inicialmente 0,4 mL da amostra foi transferida para uma unidade de filtração com poros de 10 kDa (Millex, millipore) acoplada a tubo tipo Eppendorf e centrifugada por 20 min a 4100 g. A solução filtrada foi coletada e os fármacos livres foram quantificados por CLAE (CFM) ou espectroscopia de fluorescência (DOX_{base}). Nos ensaios de citotoxicidade de Alamar Blue foi utilizada a linhagem de MFC7, de adenocarcinoma de mama humano. Os valores foram expressos em porcentagem de redução de resazurina em relação ao controle, no qual as células não foram expostas aos compostos testados¹⁶.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tamanho médio das partículas de CLN desenvolvidas foi de $239,4 \pm 5,4$ nm (CLN_{controle}) e $221,4 \pm 2,3$ nm (CLN_{DOX/CFM}) e os valores de PDI foram $0,18 \pm 0,03$ (CLN_{controle}) e $0,16 \pm 0,04$ (CLN_{DOX/CFM}) (Figura 1 A, B), indicando formulações de partículas de tamanho manométrico e homogêneo, como desejável para a estabilidade coloidal.

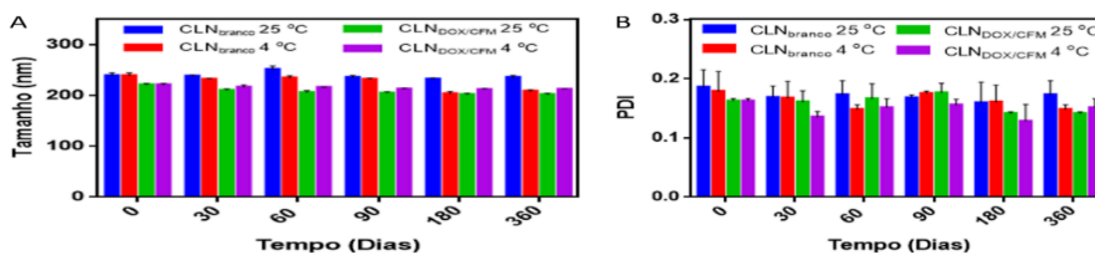


Figura 1: Resultados das análises de diâmetro médio (A) e PDI (B) dos CLN preparados, medidas por espalhamento de luz dinâmico, durante 1 ano de armazenamento nas temperaturas de 4 e 25°C.

Os valores de *ZP* nas formulações variaram entre: $-28,63 \pm 0,21$ mV ($CLN_{controle}$) e $-23,8 \pm 0,35$ mV ($CLN_{DOX/CFM}$) (Figura 2). As formulações de carreadores lipídicos desenvolvidos tiveram valores de pH em torno de $4,93 \pm 0,03$ (CLN_{branco}) e $3,66 \pm 0,01$ ($CLN_{DOX/CFM}$) (Figura 2). Os valores de *PZ* altos (em módulo) são desejáveis para a estabilidade de prateleira, já que as cargas favorecem a repulsão entre os CLN e sua estabilidade coloidal. A diferença de pH entre as formulações possivelmente ocorreu devido a presença dos fármacos. As medidas conduzidas em função do tempo não evidenciaram variação significativa nos dois parâmetros, durante um ano de estabilidade, em ambas temperaturas.

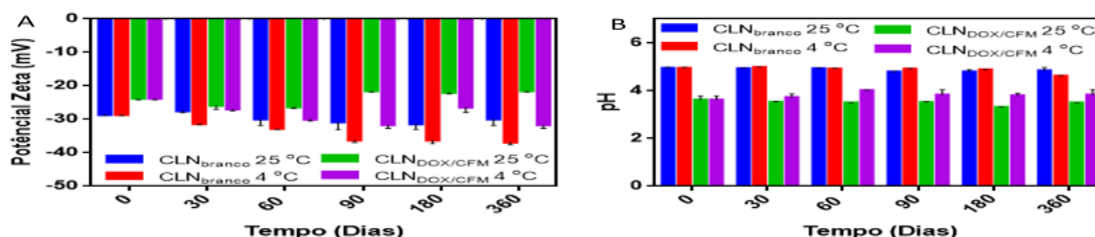


Figura 2: Resultados das análises de potencial zeta (A) e pH (B) dos CLN preparados, durante 1 ano de armazenamento nas temperaturas de 4° e 25° C.

Na Tabela 1, podemos observar que o número de partículas nas formulações foi da ordem de 10^{13} /mL não apresentando variação expressiva entre os CLN contendo DOX/CFM ($CLN_{DOX/CFM}$) e os controle, suportando a hipótese de que os fármacos não desordenam o sistema.

Tabela 1: Número de partículas/mL, determinados por NTA.

Número de partículas/ mL (10^{13})						
Tempo (dias)	0	30	60	90	180	360
CLN _{controle} a 25 °C	6,2±0,5	6,5± 0,5	6,3±0,4	6,2±0,1	6,3±0,4	5,0±0,3
CLN _{controle} a 4 °C	5,6±0,3	5,2±0,3	6,3±0,3	5,2±0,5	5,4±0,2	5,8±0,2
CLN _{DOX/CFM} a 25 °C	6,3±0,3	6,4±0,1	5,8±0,3	6,0±0,1	6,2±0,4	5,8±0,5
CLN _{DOX/CFM} 4 °C	6,0±0,2	6,7±0,2	5,9±0,2	5,7±0,1	5,6±0,3	5,7±0,3

A eficiência de encapsulação inicial, ou seja, a quantidade de fármaco presente no interior das nanopartículas foi de 94,3% para DOX e 34,2% para CFM, no 1° mês de preparo. Os resultados obtidos demonstram que a conversão da DOX para sua forma base foi eficaz, agregando uma elevada lipofilicidade à mesma e contribuindo para sua interação com os lipídios formadores da matriz lipídica dos CLN, aumentando a %EE. Por outro lado, como esperado, CFM apresentou uma baixa %EE, justificada por sua menor lipofilicidade.

Nas medidas de microscopia eletrônica de transmissão, as imagens revelaram partículas esféricas e com superfícies lisas na ausência ou presença dos fármacos (DOX/CFM), confirmando que a encapsulação de DOX e CFM não altera a integridade dos CLN produzidos (Figura 3).

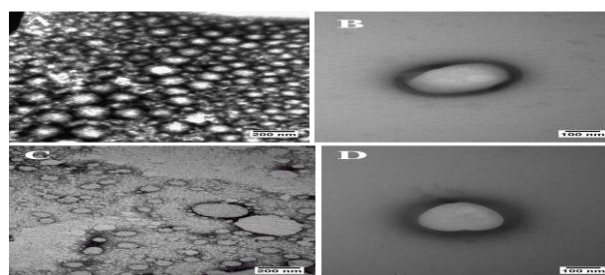


Figura 3: Fotomicrografias (MET), mostrando a morfologia das partículas de CLN, sem (A, B) e com (C e D) DOX e CFM, em duas diferentes magnitudes: 60.000x (A, C) e 100.000x (C, D).

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado por 24 h a 37 °C, respeitando a condição *sink*. DOX-HCl e CFM em solução aquosa apresentaram 100% de liberação em 7 h e 8 h de experimento, respectivamente; já a formulação CLN_{DOX/CFM} apresentou liberação prolongada, em especial de DOX, tal que após 24h somente 77% do fármaco havia sido detectado no compartimento receptor (Figura 4).

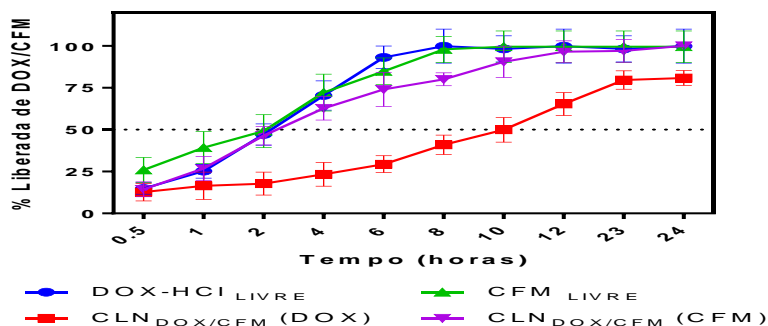


Figura 4: Cinética de liberação de DOX-HCl e CFM, em solução aquosa ou encapsuladas em carreador lipídico nanoestruturado (CLN_{DOX/CFM}), em tampão PBS pH 7,4.

A Figura 5A mostra os testes de citotoxicidade, realizados em células de câncer de mama MCF7 tratadas com DOX e CFM, livre ou encapsuladas nos CLN, por 24 h. Nessas medidas, o valor de IC₅₀ determinado para CLN_{DOX/CFM} foi ligeiramente menor (0,64 μM) que o medido para DOX/CFM livres (0,81 μM), indicando que não houve perda na atividade citotóxica dos fármacos quando encapsulados, e sim um ligeiro aumento em seu efeito tóxico sobre as células MCF7. As NLC controle, preparadas sem fármaco mostraram alguma toxicidade, mas em concentração bem maior que a dos antineoplásicos (IC₅₀ = 2,54 μM)

Analizamos o efeito do tratamento com CLN_{DOX/CFM} ao longo de 7 dias (Figura 5B). Neste tempo, confirmou-se a redução significativa da viabilidade celular que aumentava em função do tempo até 72h; o efeito após 7 dias de tratamento foi próximo ao obtido após 72 horas, suficiente para máximo efeito tóxico dos fármacos testados.

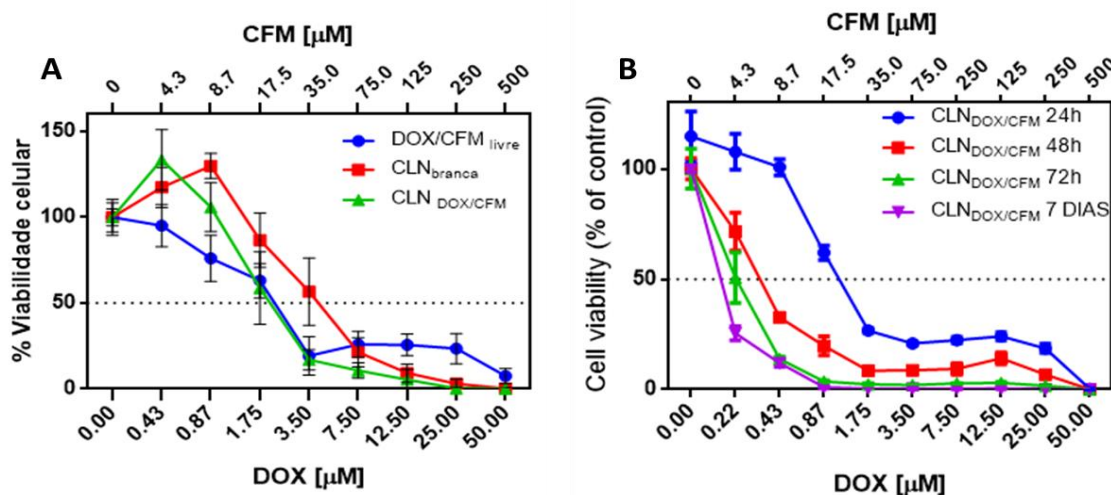


Figura 5: Ensaios de viabilidade celular, em linhagem de adenocarcinoma mamário (MCF7), pelo teste de Alamar Blue. (A) Avaliação da citotoxicidade em células tratadas com DOX e CFM, livres ou encapsuladas nos CLNs e CLN controle, por 24 horas; (B) Análise do efeito de CLN_{DOX/CFM} ao longo do tempo (0 a 7 dias).

4. CONCLUSÃO

Foram desenvolvidos carreadores lipídicos nanoestruturados encapsulando DOX na forma de base (3mg/mL) e ciclofosfamida (30 mg/mL). As nanopartículas tiveram tamanhos médios de na faixa de 200 nm, baixa polidispersão ($PDI < 0,2$), número de partículas da ordem de $10^{13}/\text{mL}$, potencial elétrico de superfície negativo e diferente de zero ($ZP \sim -26 \text{ mV}$) e pH em torno de 3,6. Nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão as partículas apresentavam-se com morfologia esférica e tamanho compatível com o determinado por DLS. Os CLN exibiram boa eficiência de encapsulação para DOX (acima de 90%) e menor (~30%) para CFM, resultado esperado considerando-se os coeficientes de partição dos fármacos. Esta diferença nas %EE refletiu no perfil de liberação sustentada dos fármacos (DOX/CFM) como observado no ensaio de liberação *in vitro*: a liberação da CFM foi mais rápida. O ensaio de viabilidade celular nas células de MCF7 demonstrou potencialização do efeito citotóxico de ambos os fármacos, quando encapsulados.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Eneida de Paula, a doutoranda Simone Ramos de Castro e também a toda equipe do laboratório de Biomembranas, pelo apoio e companheirismo. Agradecemos à FAPESP (# 2014/14457-5) pelo aporte financeiro ao projeto e ao PIBIT/CNPq pela bolsa de Iniciação científica (T.M.)

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1)FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 47, n. 2, p. 125–132, 1999.
- (2)GALLEGOS-CASTORENA, S. et al. Toxicity prevention with amifostine in pediatric osteosarcoma patients treated with cisplatin and doxorubicin. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 24, n. 6, p. 403–408, 2007.
- (3)KANNO, T. Y. N. et al. Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, p. 313–319, 2009.
- (4)MARTÍN, A. G. Safety Profile of Trabectedin in Combination With Liposomal Pegylated Doxorubicin in Relapsed Ovarian Carcinoma: Considerations for Optimal Management. **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 21, n. Supp 1, p. S6–S8, 2011.
- (5)MONTEIRO, L. A.; CHAVES, D. D. C. E.; FIGUEIREDO, L. F. DE. Conhecimento dos profissionais de enfermagem sobre a ciclofosfamida em um hospital universitário. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 15, n. 2, p. 430–436, 2013.
- (6)MORENO, M. et al. Doxorubicina liposomal no pegilada en combinación con ciclofosfamida, vincristina, prednisona y rituximab en el tratamiento de linfomas no hodgkinianos: estudio de 26 pacientes. **Medicina Clínica**, v. 134, n. 2, p. 72–75, 2010.
- (7)MUHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, p. 149–155, 1998.
- (8)MULLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 242, p. 121–128, 2002.
- (9)PUGLIA, C.; BONINA, F. Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 4, p. 429–441, 2012.
- (10)SABZICHI, M. et al. Vitamin D-Loaded Nanostructured Lipid Carrier (NLC): A New Strategy for Enhancing Efficacy of Doxorubicin in Breast Cancer Treatment. **Nutrition and Cancer**, v. 69, n. 6, p. 840–848, 2017.
- (11)SAUPE, A. et al. **Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) -- structural investigations on two different carrier systems** *Biomed Mater Eng*, 2005.
- (12)SAWADA, N. O. et al. Quality of life evaluation in cancer patients to submitted to chemotherapy. **Revista da Escola de Enfermagem**, v. 43, n. 3, p. 578–584, 2009.
- (13)SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157, n. 2, p. 171–179, 1997.
- (14)SILVA, C. B.; ALBUQUERQUE, V.; LEITE, J. Qualidade de Vida em Pacientes Portadoras de Neoplasia Mamária Submetidas a Tratamentos Quimioterápicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 2, p. 227–236, 2010.
- (15)SILVEIRA, C. P. et al. In vivo nanotoxicology of hybrid systems based on copolymer/silica/anticancer drug. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 617, n. 1, p. 1–7, 2015.
- (16)NAKAYAMA, G. R. et al. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, n. 2, p. 205–208, 1997.