



# COMPLEXAÇÃO DO QUIMIOTERÁPICO DOCETAXEL COM CICLODEXTRINAS

Palavras-Chave: Câncer, docetaxel, drug delivery, ciclodextrinas

Autores/as:

Simone Mayumi Shimabukuro (Puc-Campinas)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eneida de Paula (Unicamp)

Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, Instituto de Biologia / UNICAMP

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o que mais acomete as mulheres no Brasil, excluindo-se o câncer de pele não melanoma. Além disso, ele é também, uma das principais causas de morte em países desenvolvidos e em desenvolvimento [1]. Um dos quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer de mama é o Docetaxel (DTX). O DTX é um medicamento com ação antimitótica, que atua nos microtúbulos, estabilizando-os. A quebra do equilíbrio celular altera a estrutura celular e suas funções, resultando em apoptose [2]. Apesar de sua eficiência na terapêutica anticâncer, o medicamento apresenta baixa solubilidade aquosa e é comercializado na forma de uma preparação (Taxotere®) que tem alta toxicidade, por conter etanol e surfactante (Tween 80®) como agentes solubilizantes [3].

As Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, obtidos a partir do amido e por ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) de microorganismos. As ciclodextrinas naturais mais comuns são o  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD, com 6, 7 e 8 monômeros de glicose, respectivamente [4]. Além das CDs naturais, promissores derivados semi-sintéticos com elevada capacidade de reconhecimento molecular e solubilidade aquosa, como a sulfo-butiléter- $\beta$ -CD (SB- $\beta$ CD) e a hidroxipropil- $\beta$ -CD são aprovadas para uso parenteral pelo FDA [4]. A  $\beta$ -CD e seus derivados são muito empregados para formar complexos de inclusão molecular com fármacos [5]. A SB- $\beta$ CD, por exemplo, é hidrofílica e considerada não tóxica, por via oral e endovenosa; sua capacidade de inclusão é maior que a da  $\beta$ -CD devido à porção butila hidrofóbica que se estende da cavidade da CD [6], sendo essa uma vantagem da sua utilização. A gama ciclodextrina ( $\gamma$ -CD) é muito utilizada na complexação de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. Seu anel macrocíclico é maior (contém 8 monômeros de glicose) em comparação à  $\beta$ -CD, permitindo acomodar moléculas mais volumosas [7]. A  $\gamma$ -CD é digerida e metabolizada como as dextrinas lineares ou amido e após administração intravenosa é rapidamente excretada pela urina: ~ 90% em 24 h [7].

O objetivo desse trabalho foi o de complexar o quimioterápico Docetaxel com ciclodextrinas para aumentar sua solubilidade e biodisponibilidade. Inicialmente havíamos proposto encapsular o complexo obtido em lipossomas, mas por conta da pandemia da Covid-19 (acesso restrito aos laboratórios) esta segunda etapa não foi alcançada.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Docetaxel (MM = 807,87 g/mol) – Cristália Prod. Quim. Farm. Ltda; Sulfo-Butil- $\beta$ -ciclodextrina – (massa molar = 1135 g) e gama-ciclodextrina (massa molar = 1297,2 g – CycloLab R&D Ltd); acetato de sódio anidro – Synth; ácido acético – Sigma-Aldrich; álcool etílico absoluto – Dinâmica. Equipamentos: Espectrofotômetro UV-visível Cary 50 - Varian; pHmetro - Digimed DM-22; Liofilizador freeze-dry system/freezone 4.5 - Labconco. Programas de dados: Origin 8,0 – Microcal Origin; Excell (Microsoft).

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Determinação das propriedades óticas do Docetaxel: absorção no UV-VIS

O espectro de absorção do DTX foi medido no espectrofotômetro Cary 50 Bio-Varian, variando-se os comprimentos de onda de 200 à 500 nm, em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico à temperatura ambiente (25 °C). Soluções de DTX foram preparadas em etanol e tampão acetato (em pH = 4,5 ou 5,0). Os dados foram tratados nos programas Origin versão 8.0 e Excel.

### 2.2.2 Determinação de coeficiente de absorvidade molar $\epsilon$ (Curva de calibração) em etanol

Preparou-se uma solução  $1.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> de DTX em etanol e realizou-se a varredura para determinação do comprimento de onda de máxima absorção do composto. Com a varredura representada na Figura 1/resultados), observou-se o máximo de absorção em  $\lambda = 228$  nm e, portanto, as medidas para determinação de  $\epsilon$  foram realizadas nesse comprimento de onda (máxima absorção de DTX em etanol). Foram preparadas dez soluções, de concentrações crescentes de DTX para a construção da curva de calibração em triplicata (Figura 2/ resultados).

### 2.2.3 Determinação de coeficiente de absorvidade molar $\epsilon$ (Curva de calibração) em tampão acetato

O mesmo procedimento foi realizado com DTX em solução de tampão acetato pH = 4,5 e pH 5,0. O tampão acetato foi preparado em uma concentração de  $1.10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> em um balão volumétrico de 500 mL e seu pH foi ajustado com pHmetro de bancada (Digimed DM-22), sob agitação magnética em béquer. Preparou-se uma solução  $1.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> de DTX em tampão acetato e realizou-se a varredura para determinação do comprimento de onda de máxima absorção do composto. Observou-se o máximo de absorção em  $\lambda = 232$  nm. Em seguida foram preparadas soluções de concentrações crescentes de DTX para (abaixo da solubilidade) para construção da curva de calibração em triplicata. Este experimento por concentração, conforme demonstrado na (Figura 5/resultados).

### 2.2.4 Ensaios de solubilidade

As diluições de DTX em tampão acetato em pH 4,5 foram feitas para construção da curva de calibração. Foram analisadas dez concentrações de 0,01 a 0,1 mmol/L. A absorbância do sobrenadante foi lida no comprimento de onda de máxima absorção do composto, no UV (ver abaixo).

### 2.2.5 Preparo do complexo de inclusão entre docetaxel e ciclodextrina

Foi preparada uma mistura com a proporção molar de 1:10 DTX:CD, isto é 12,3 mM (metade da dose clínica, respectivamente 20 mg/mL ou 24,75 mM) de docetaxel para 123 mM de ciclodextrina. Para tanto pesamos 0,1 g de docetaxel e 1,4 g (1,6 g) de Sulfo-butil-beta-ciclodextrina (gama-ciclodextrina). O docetaxel foi diluído em etanol (10 mL) e as ciclodextrinas foram diluídas em água desionizada (10 mL). Após a solubilização dos compostos, as duas suspensões foram misturadas em um Erlenmeyer de 50 mL, e a mistura foi mantida com agitador magnético para equilíbrio e posterior liofilização. Adotamos o tempo de equilíbrio de 24 h para complexação.

Após 24 h a liofilização dos complexos foi realizada no liofilizador de bancada freeze-dry system/freezone 4.5 (Labconco). As amostras foram colocadas em tubos tipo Falcon de 50 mL e o tubo foi vedado com parafilm com alguns furos para proteção da amostra durante a liofilização. Após congelamento em nitrogênio líquido as amostras foram transferidas rapidamente para o equipamento, produzindo-se pressão negativa com a amostra ainda congelada, para permitir sublimação da água. O tempo total da liofilização foi de 24 horas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das concentrações e medidas de absorbância realizadas no comprimento de máxima absorção (228 nm, Figura 1), foi possível traçar a curva de calibração do Docetaxel em etanol e, conhecendo a equação da reta gerada, foi possível determinar o coeficiente de absorvidade molar,  $\epsilon$  (pela inclinação da reta) muito importante para quantificar o Docetaxel em formulações a serem preparadas, com ciclodextrina. Os dados da curva de calibração estão apresentados na Figura 2 A,B.

### 3.1 Curva de calibração DTX em etanol



Figura 1: Espectro de absorção do DTX diluído em etanol no UV-VIS, evidenciando  $\lambda_{max}$  em = 228 nm.

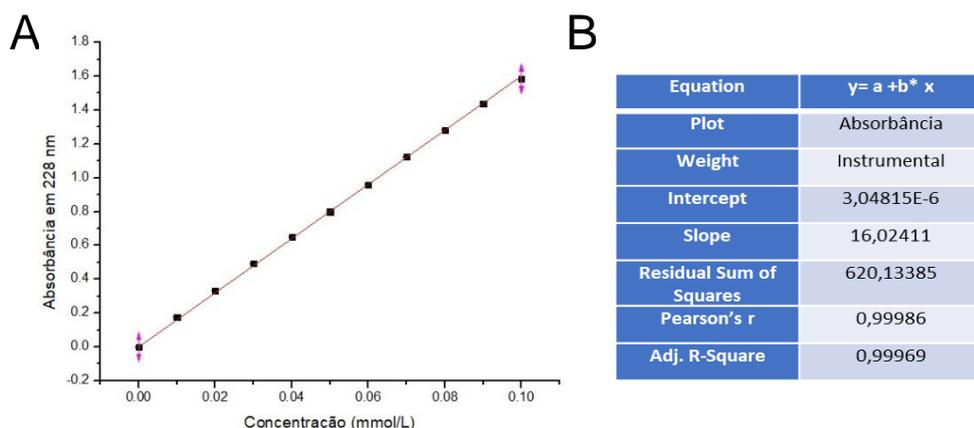


Figura 2: Curva de Calibração do DTX em etanol (A); dados da curva de calibração do composto DTX em etanol (B).

De acordo com a curva de calibração temos que a equação da reta é representada pela equação 1:

$$y = 3,04815E^{-6} + 16,02411 x \quad (1)$$

O coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) do DTX em etanol, determinado pelo coeficiente angular da reta, foi determinado =  $16024,11 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2 Curva de calibração DTX em tampão acetato a pH = 4,5

Preparou-se uma solução de DTX estoque ( $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) em tampão acetato e realizou-se a varredura para determinação do comprimento de onda de máxima absorção do composto em pH 4,5

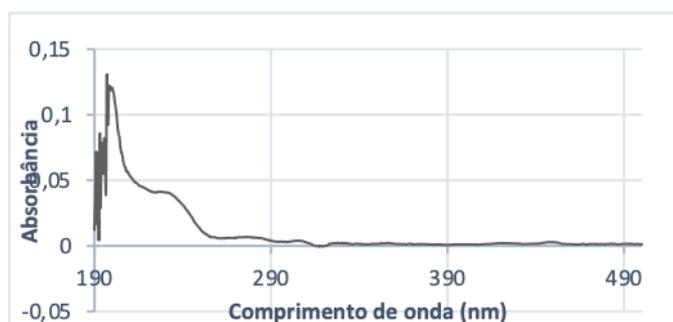


Figura 3: Varredura de DTX entre 190-500 nm, em tampão Acetato pH= 4,5.  
 $\lambda_{\text{max}} = 232 \text{ nm}$

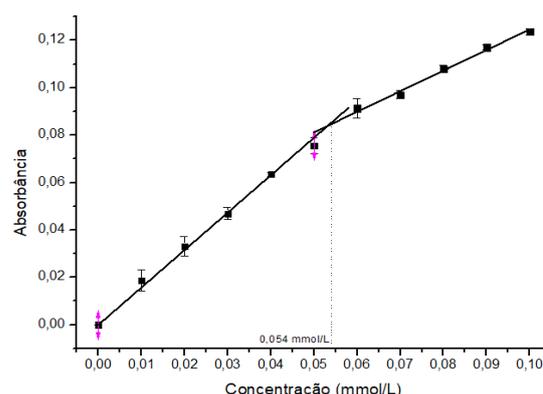


Figura 4: Curva de calibração e limite de solubilidade do DTX em tampão acetato pH = 4,5.

As diluições de DTX em tampão acetato em pH 4,5, foram feitas para construção da curva de calibração, medida em 230 nm. Com os dados obtidos construímos as curvas de calibração apresentando uma pequena inflexão, ocasionada pela saturação do composto (máxima solubilidade aquosa). O limite de solubilidade do composto foi determinado no ponto de inflexão, como mostrado na Figura 4.

De acordo com os dados obtidos o limite de solubilidade do DTX em pH 4,5 foi de  $0,054 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Após determinado o limite de solubilidade, repetimos o experimento de determinação do coeficiente de absorvidade molar, utilizando somente concentrações abaixo da inflexão / solubilidade aquosa (Figura 5).

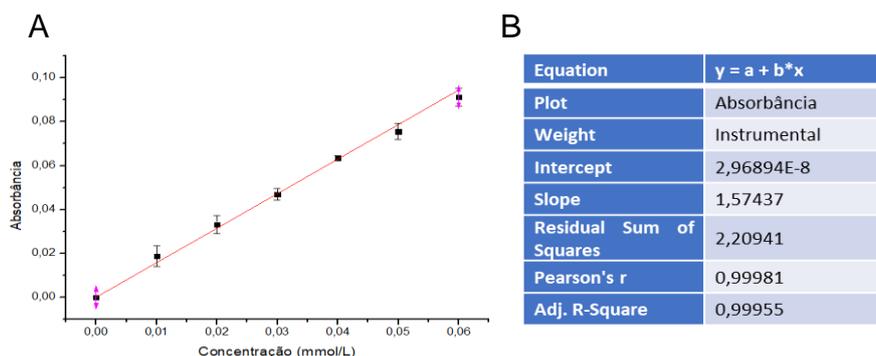


Figura 5: Curva de calibração do DTX em Tampão acetato (A) pH = 4,5; Dados da curva de calibração(B).

De acordo com a curva de calibração no pH, temos que a equação da reta é representada pela equação 2:

$$y = 2,96894E^{-8} + 1,57437x \quad (2)$$

Dessa forma o coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) do composto em tampão Acetato pH 4,5 é representado pelo coeficiente angular da reta, equivalente a  $1574,37 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 3.4. Complexo de inclusão entre docetaxel e Sulfo-butil-beta-ciclodextrina

Após preparo do complexo e sua liofilização (conforme descrito em métodos), realizou-se medidas de absorção no UV-Vis para observar se houve alterações importantes na absorvidade (e solubilidade) do docetaxel que seriam indicativas de complexação com ciclodextrina. Para tanto, o pó do complexo liofilizado foi diluído em tampão pH 4,5 ou etanol, para leitura no espectrofotômetro, como descrito a seguir.

#### 3.4.1 Absorbância do complexo docetaxel:Sulfo-butil-beta-ciclodextrina diluído em etanol.

A partir do complexo liofilizado, foi preparada suspensão na concentração de  $7,55 \times 10^{-4} \text{ M}$ . Para isso calculamos a proporção de DTX no complexo, somando as massas molares na proporção de 1:10 ( $1 \times 807,79 + 10 \times 1135 = 12157,9$  chegando a 6,6%). Com isso pesamos 0,1833 g do complexo que foi diluído em 20 mL de etanol. A medida de absorbância entre 200-500 nm foi feita, determinando-se o comprimento de onda de máxima absorção em 228 nm (Figura 6):

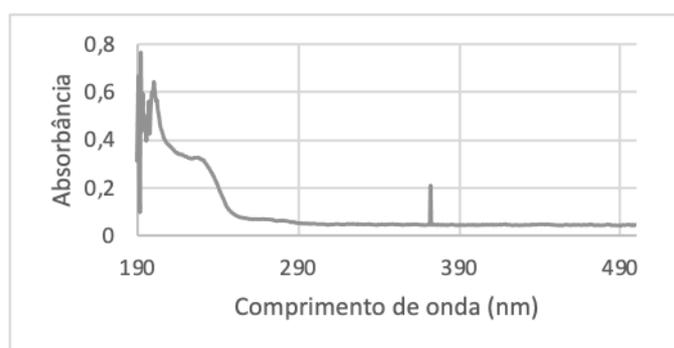


Figura 6: Varredura no UV-VIS do complexo DTX:SBE- $\beta$ CD em etanol,  $\lambda_{\text{max}} = 228 \text{ nm}$ .

A leitura da absorbância foi feita em triplicata no comprimento de onda de 228 nm, o mesmo comprimento de onda máximo determinado para o docetaxel em etanol (Figura 1). A média das absorbâncias foi determinada em 0,3048. A partir da absorção média (0,3048) foi possível calcular a concentração exata de DTX na amostra do complexo, a partir da reta da curva padrão (equação 1), determinando-se a concentração de  $1,90 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  de docetaxel no complexo.

No complexo preparado na razão molar 1:10 DTX:CD, a proporção em massa do docetaxel é de 7,118% (SF- $\beta$ CD). Considerando que a massa pesada do complexo foi de 0,1833 g, quando diluída em 20 mL a concentração de DTX esperada seria de  $7,5 \times 10^{-4}$  caso a complexação tivesse sido de 100%, porém, com a concentração obtida pela equação da reta, significa que foi complexado  $0,19 \times 10^{-4} \text{ M}$ . Isso quer dizer que foi complexado menos DTX do que a massa total no complexo, quando a diluição foi feita em etanol.

Para verificar se as propriedades óticas do DTX não se alteravam quando ele estava complexado, em uma concentração de  $5 \times 10^{-5}$  realizou-se duas varreduras para comparação do docetaxel livre em etanol e do complexo liofilizado em etanol. Os resultados são dados na Figura 7A.

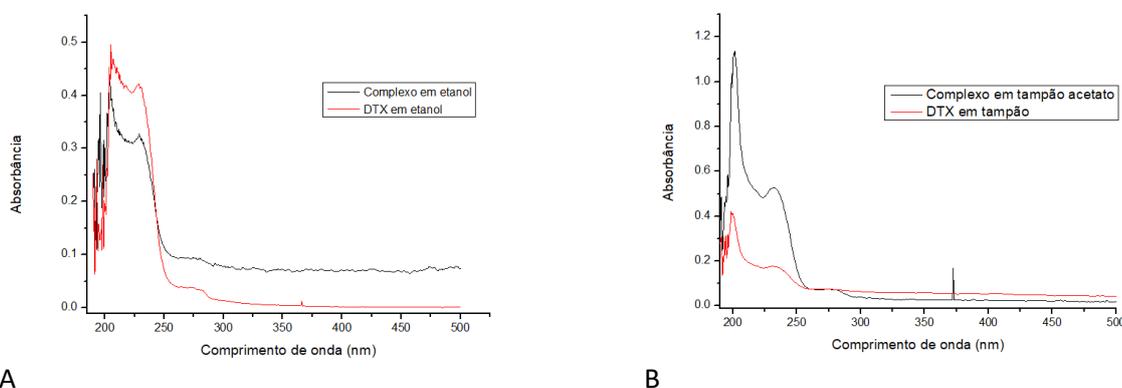


Figura 7: Espectro de absorção no UV-VIS, do DTX ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) livre e complexado com SB- $\beta$ CD, em etanol (A) e em tampão acetato, pH 4,5 (B)

O comprimento de onda se manteve muito próximo ao do DTX livre em etanol, entre 228-229 nm. Não houve variação significativa na intensidade de absorção.

### 3.4.2 Medidas de absorbância do complexo (docetaxel + Sulfobutil-beta-ciclodextrina) diluído em tampão acetato pH 4,5

Foi feito o mesmo procedimento descrito acima, porém, dessa vez o pó liofilizado do complexo foi diluído em tampão acetato de pH 4,5. A partir da absorbância média (0,3078) medida foi possível calcular a concentração exata utilizada, a partir da equação 3, determinando-se concentração igual a  $1,955 \cdot 10^{-4}$  M de docetaxel solubilizado no complexo em tampão acetato, pH 4,5.

Este resultado é relevante pois, se não houve modificação da absorção do DTX (livre vs. complexado) indica que foi possível solubilizar  $1,955 \cdot 10^{-4}$  M, isto é concentração 3,6x maior que a solubilidade do fármaco determinada neste pH ( $5,4 \cdot 10^{-5}$  M – Figura 4).

Para saber se houve variação na absorção do DTX, preparamos soluções de DTX na concentração de  $5 \cdot 10^{-5}$  M livre e complexado com SBE- $\beta$ -CD, como mostrado na Figura 7B. Ao analisar as duas curvas, observou-se que o comprimento de onda máximo do DTX em tampão quase não variou (230-231 nm – Figura 7B), porém houve aumento da intensidade de luz absorvida (efeito hiperacrômico) quando o DTX foi incluído na cavidade da ciclodextrina, evidenciando a formação do complexo.

### 3.4.3 Complexo de inclusão docetaxel:gama ciclodextrina

Assim como feito com a sulfo-butil-beta-ciclodextrina (SB- $\beta$ CD) o mesmo procedimento foi realizado com a gama ciclodextrina ( $\gamma$ -CD) para o preparo do complexo e sua posterior liofilização, mudando a massa utilizada, pois a massa molar da  $\gamma$ -CD (1297,2 g) e da SB- $\beta$ CD (1135 g), são diferentes.

#### 3.4.3.1 Medida de absorbância do complexo DTX em gama ciclodextrina diluído em etanol

A partir do complexo liofilizado, foi preparada uma solução numa concentração de  $9,97 \cdot 10^{-5}$  M. Sabendo que a porcentagem de DTX no complexo de razão molar 1:10 é de 5,683%, utilizando um balão volumétrico foi pesado 0,0275 g do complexo e diluído em 20 mL de etanol (correspondendo à concentração de  $1 \cdot 10^{-5}$  M de DTX) A medida da absorbância foi medida no comprimento de onda de 230 nm no UV-Vis e foi medida em triplicata, obtendo-se os seguintes resultados:

A suspensão ficou turva (houve dispersão de luz), ou seja, a gama ciclodextrina não estava totalmente solúvel visto que sua concentração é 10 x maior que a do docetaxel diluído em etanol portanto, durante o preparo observou-se uma turbidez e o espectro de varredura não ficou claro.

#### 3.4.3.2 Medida de absorbância do complexo DTX: $\gamma$ CD diluído em tampão acetato pH 4,5

A partir de uma massa (0,0137g) do complexo liofilizado, isto é, contendo  $5 \cdot 10^{-5}$  M de DTX, solubilizamos o mesmo em tampão acetato, pH 4,5 e medimos a absorbância do DTX:

A partir da equação 3, foi possível fazer o cálculo para chegar na concentração solubilizada, de acordo com os dados de absorbância obtidos (0,4577). Considerando que não houve efeito hiperacrômico, calculamos a concentração de  $2,9 \cdot 10^{-4}$  M de docetaxel no complexo, o que indicaria a formação do complexo, DTX: $\gamma$ CD, de forma que foi possível solubilizar  $2,9 \cdot 10^{-4}$  M, isto é 5,3x mais que a solubilidade do fármaco determinada neste pH ( $5,4 \cdot 10^{-5}$  M).

## 4. CONCLUSÕES:

De acordo com o estudo realizado, concluímos que foi possível obter complexos de inclusão do quimioterápico docetaxel com as ciclodextrinas SB- $\beta$ CD e  $\gamma$ CD e isso se faz promissor podendo ser utilizado como uma nova forma farmacêutica para aumento de solubilidade do fármaco em questão. Além disso, ciclodextrinas possuem baixo custo e são de fácil acesso bem como, fácil preparo da suspensão.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- [1] BRASIL. Ministério da saúde. Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, p.3, 2015.
- [2] NERIS, R.R., MAGNABOSCO, P., AMARAL, P.A.D., RIBEIRO, M. Â., & ANJOS, A.C.Y.D. Indução da dor pelo quimioterápico docetaxel em mulheres com câncer de mama. *Acta Paulista de Enfermagem*, 29(4), 397-404, 2016
- [3] European medicines agency. Scientific discussion. Taxotere INN Docetaxel EMEA. p.1-18 2005. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/taxotere-epar-scientific-discussion\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/taxotere-epar-scientific-discussion_en.pdf)
- [4] CUNHA-FILHO, M.S.S., & SÁ-BARRETO, L.C. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28, 1-9, 2009.
- [5] GUEDES, L.D.S. Encapsulação e caracterização do fármaco imunomodulador Imliquimod em  $\beta$ -ciclodextrina. 173f. Dissertação (mestrado) Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas – Campinas, SP. 2014. Disponível em: [http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/250350/1/Guedes\\_LucianadeSouza\\_M.pdf](http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/250350/1/Guedes_LucianadeSouza_M.pdf)
- [6] FRANZINI, C. Complexo de inclusão de anfotericina B com derivados de ciclodextrinas e sua incorporação em microemulsões lipídicas biocompatíveis / 2010, 154 f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, – UNESP – Araraquara, SP. Disponível em: <http://www.fcfa.unesp.br/arquivos/TESECRISTINA.pdf>
- [7] MUNRO, I.C., NEWBERNE, P.M., YOUNG, V.R., BÄR, A. Safety assessment of  $\gamma$ -cyclodextrin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39, 3-13, 2004.