

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo erlotinib e avaliação do efeito antitumoral *in vitro* em células de adenocarcinoma de pulmão

FRANCIELE ALINE BRUINSMANN

PORTO ALEGRE, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo erlotinib e avaliação do efeito antitumoral *in vitro* em células de adenocarcinoma de pulmão

Dissertação apresentada por **Franciele Aline Bruinsmann** para a obtenção do TÍTULO DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof.^a Dr.^a Sílvia Stanisçuaski Guterres

PORTO ALEGRE, 2016

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 23/08/2016, pela Banca Examinadora constituída por:

Dr. Fabrício Figueiró

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a Dr.^a Renata Vidor Contri

Centro Universitário Univates

Prof.^a Dr.^a Solange Cristina Garcia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Bruinsmann, Franciele Aline

Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo erlotinib e avaliação do efeito antitumoral in vitro em células de adenocarcinoma de pulmão /

Franciele Aline Bruinsmann. -- 2016.

88 f.

Orientador: Sílvia Stanisçuaski Guterres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Câncer de pulmão. 2. Erlotinib. 3. Nanocápsulas poliméricas. I. Guterres, Sílvia Stanisçuaski, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da UFPeL, com bolsa de estudos financiada pela CAPES.

“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is not to stop questioning” Albert Einstein.

AGRADECIMENTOS

À professora Sílvia Stanisçuaski Guterres pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa. Obrigada pela confiança e orientação.

À professora Adriana Raffin Pohlmann pelas ótimas aulas e incentivo.

Ao professor Tiago Veiras Collares e à professora Fabiana Kömmling Seixas pela colaboração e incentivo.

À UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de pesquisa.

Aos colegas do Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia e do Laboratório K204 do Instituto de Química pela ajuda e companhia. Também, aos colegas do Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO) da UFPel, principalmente, a Julieti Buss e a Eduarda Schultze.

À Gabriele Dadalt Souto pela amizade, apoio e importantes contribuições.

À Gabriela Klein Couto e ao Gustavo Dias Ferreira pela amizade e por me acolherem em sua casa no período dos experimentos em Pelotas.

Ao Marcelo Zambiasi, pelo companherismo, paciência e amor.

A meus pais, Sílvio e Zélia pelo apoio e incentivo.

RESUMO

Objetivos: Desenvolver e caracterizar nanocápsulas poliméricas contendo erlotinib, bem como avaliar sua atividade antitumoral *in vitro* em células de adenocarcinoma de pulmão humano. **Metodologia:** As nanocápsulas contendo erlotinib ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) foram obtidas pelo método de nanoprecipitação utilizando poli(ϵ -caprolactona) e óleo de copaíba como parede polimérica e núcleo oleoso, respectivamente. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram: diâmetro médio e distribuição de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, concentração de partículas e pH. Para determinação do teor e eficiência de encapsulação do erlotinib, utilizou-se metodologia validada por CLAE-UV. O estudo de liberação *in vitro*, utilizando sacos de diálise, foi realizado para obter o perfil de liberação do fármaco a partir das nanocápsulas. As nanocápsulas contendo erlotinib foram avaliadas quanto ao seu potencial de inibir o crescimento, induzir a apoptose, interferir com o ciclo celular e sobrevivência clonogênica de células de adenocarcinoma de pulmão, linhagem A549. **Resultados:** As nanocápsulas apresentaram diâmetro médio de 171 ± 2 (PDI $< 0,10$), potencial zeta de $-8,17 \pm 2,26$ mV, número de partículas por mL de $6,97 \pm 0,22 \times 10^{13}$ e pH de $6,24 \pm 0,02$. O teor e a eficiência de encapsulação foram próximos de 100%. Com exceção do pH, todos parâmetros mantiveram-se iguais após 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente. Observou-se uma liberação controlada do fármaco devido à nanoencapsulação. Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que as nanocápsulas contendo erlotinib apresentaram maior atividade antitumoral quando comparado com o fármaco livre. Também foi demonstrado indução de apoptose, pela análise de ciclo celular e marcação por Anexina-V conjugada ao 7-AAD. No ensaio clonogênico, as nanocápsulas contendo erlotinib reduziram 100% o número de colônias formadas. **Conclusões:** Foram obtidas nanocápsulas com propriedades nanotecnológicas adequadas e capazes de controlar a liberação do erlotinib. Os estudos *in vitro* na linhagem celular A549 demonstraram aumento no efeito antitumoral e foi demonstrado que o encapsulamento do fármaco é imprescindível para essa melhor atividade.

Palavras-chave: câncer de pulmão, erlotinib, nanocápsulas polimérica.

ABSTRACT

Development of erlotinib-loaded nanocapsules and evaluation of the *in vitro* antitumor effect in lung adenocarcinoma cells.

Purpose: To develop and characterise erlotinib-loaded polymeric nanocapsules and to evaluate its *in vitro* antitumor activity in human lung adenocarcinoma cells.

Methodology: The erlotinib-loaded nanocapsules (0.5 mg.mL^{-1}) were obtained by nanoprecipitation method using poly (ϵ -caprolactone) and copaiba oil as the polymeric wall and oily core, respectively. The physicochemical parameters evaluated were: mean diameter and size distribution, polydispersity index, zeta potential, particle concentration and pH. An HPLC-UV validated method was used to determine the drug content and encapsulation efficiency. The *in vitro* release study using dialysis bags was performed to obtain the drug release profile from nanocapsules. The erlotinib-loaded nanocapsules were evaluated regarding their potential to inhibit the growth, induce apoptosis, interfere with the cell cycle and clonogenic survival of lung adenocarcinoma cell (A549). **Results:** The nanocapsule formulation presented z-average diameter of 171 ± 2 (PDI <0.10), zeta potential value of -8.17 ± 2.26 mV, number of particles per mL of $6.97 \pm 0.22 \times 10^{13}$, and pH value of 6.24 ± 0.02 . The drug content and the encapsulation efficiency were nearly 100%. Except for the pH value, all these parameters remained the same after 30 days of storage. A controlled release of the drug was observed due to nanoencapsulation. The cytotoxicity assays demonstrated that the erlotinib-loaded nanocapsules showed higher antitumor activity compared to free drug. Induction of apoptosis was demonstrated by cell cycle analysis and Annexin-V/7AAD staining. In the clonogenic assay, erlotinib-loaded nanocapsules reduced 100% the number of colonies formed. **Conclusions:** Nanocapsules with appropriate nanotechnological properties and capable of controlling the erlotinib release were obtained. The *in vitro* studies in the A549 cell line showed an increase in antitumor effect and was demonstrated that the drug encapsulation is essential for this better activity.

Keywords: lung cancer, erlotinib, polymeric nanocapsules.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1. Estrutura química do erlotinib.....24
- Figura 2. Acúmulo de nanopartículas pelo efeito EPR.....29

ARTIGO

- Figure 1. Radar charts plot for erlotinib-loaded nanocapsules.....51
- Figure 2. TEM images unloaded nanocapsules and erlotinib-loaded nanocapsules.....52
- Figure 3. Release profile of erlotinib from erlotinib-loaded nanocapsules and erlotinib solution.....52
- Figure 4. Effect of erlotinib-loaded nanocapsules on the cell proliferation of A549 cells.....54
- Figure 5. Treatment with erlotinib-loaded nanocapsules increased the rate of cell death on A549 cell line.....56
- Figure 6. Number of A549 cells in each phase of the cell cycle.....57
- Figure 7. Apoptosis induction by erlotinib-loaded nanocapsules on A549 cells.....58
- Figure 8. Effects of erlotinib-loaded nanocapsules on clonogenic survival of A549 cells.....59

ANEXO

- Figura 1. Curva analítica média da linearidade para o erlotinib.....86
- Figura 2. Especificidade do método analítico.....88

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1. Physicochemical characterisation of nanocapsule suspensions.....50

Table 2. Parameters obtained from mathematical modeling for erlotinib solution and erlotinib-loaded nanocapsules.....53

ANEXO

Tabela 1. Precisão do método para quantificação do erlotinib.....86

Tabela 2. Exatidão do método para quantificação do erlotinib.....87

SUMÁRIO

1. <i>INTRODUÇÃO</i>	21
1.1 Câncer de pulmão	23
1.2 Erlotinib.....	24
1.3 Nanotecnologia.....	26
1.3.1 Nanocápsulas poliméricas.....	26
1.4 Vetorização de fármacos antitumorais.....	28
2. <i>OBJETIVOS</i>	33
3. <i>ARTIGO</i>	37
4. <i>DISCUSSÃO</i>	65
5. <i>CONCLUSÃO</i>	71
6. <i>REFERÊNCIAS</i>	75
7. <i>ANEXO</i>	83

1.1. Câncer de pulmão

O câncer do pulmão é a principal causa de morte relacionada ao câncer na população mundial (Walter *et al.*, 2015), estimando-se em torno de 1,3 milhões de mortes por ano (Meert *et al.*, 2015). No Brasil, de acordo com estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são esperados 17.330 novos casos de câncer de pulmão em homens e 10.890 em mulheres para o ano de 2016 (INCA, 2015). O principal fator de risco para ocorrência de câncer de pulmão é o tabagismo, sendo responsável por cerca de 90% dos casos (Ridge *et al.*, 2013).

O câncer de pulmão apresenta uma razão mortalidade/incidência de, aproximadamente, 90%. Portanto, é considerado um dos tipos de câncer mais agressivos, a sobrevida em cinco anos é baixa, cerca de 10% a 15%. Isso porque, em geral, esse tipo de câncer é detectado em estágios avançados, uma vez que não são observados sintomas em seus estágios iniciais (INCA, 2015).

Do ponto de vista anatomopatológico, esta neoplasia apresenta dois subtipos principais: câncer de pulmão de células pequenas (SCLC, abreviatura do inglês *Small Cell Lung Cancer*) e câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC, abreviatura do inglês *Non-Small Cell Lung Cancer*). O NSCLC é responsável por 85% a 90% dos casos de câncer de pulmão, sendo um tipo menos agressivo quando comparado ao SCLC (Pavlou e Diamandis, 2010). Além disso, o NSCLC corresponde a um grupo heterogêneo composto de três tipos histológicos principais e distintos: adenocarcinoma, carcinoma epidermóide e carcinoma de grandes células (Gazdar, 2010). O adenocarcinoma é responsável por mais de 50% dos casos de NSCLC (Zugazagoitia *et al.*, 2014).

O estadiamento do câncer de pulmão é classificado conforme o Sistema TNM (do inglês, "*Tumor, Node, Metastasis*") da *American Joint Committee on Cancer*. Esse sistema utiliza três critérios para avaliar o estágio do câncer: extensão anatômica do tumor (T), presença ou ausência de comprometimento pela doença em linfonodos regionais e sua extensão (N), e a presença ou ausência de metástases (M), classificando a doença em estágio de I (doença inicial) a IV (doença metastática).

Em geral, para o tratamento do câncer de pulmão existem três alternativas: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Esses métodos podem ser associados para

obtenção de melhores resultados. Em estágio inicial, a cirurgia seguida de quimioterapia adjuvante é o tratamento de escolha, visto que essa é a modalidade que oferece a maior chance de cura (Pallis, 2012; Cortés *et al.*, 2015). Na maioria dos casos, no momento do diagnóstico, os pacientes apresentam-se com doença avançada, na qual o tumor já se espalhou além dos limites de ressecabilidade. Para pacientes com NSCLC localmente avançado, a abordagem padrão é a quimiorradioterapia, uma vez que oferece um pequeno, mas estatisticamente significativo prolongamento da sobrevida (Pallis, 2012).

1.2. Erlotinib

O erlotinib (ELB, Figura 1) é um fármaco lipofílico, derivado de quinazolina, que foi aprovado pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA), no ano de 2004, para o tratamento de pacientes com NSCLC localmente avançado ou metastizado e câncer pancreático metastizado. Caracteriza-se por ser um sólido cristalino, solúvel em solventes orgânicos como etanol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida. Sua fórmula molecular é $C_{22}H_{23}N_3O_4$, apresentando uma massa de 393,4 g/mol e pKa de 5,40 (Van Leeuwen *et al.*, 2016).

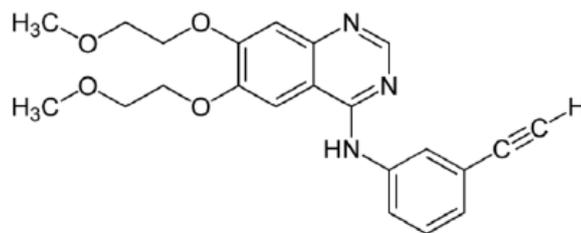


Figura 1. Estrutura química do erlotinib.

Esse fármaco inibe de forma reversível e seletiva a atividade tirosina quinase do receptor do fator de crescimento epidérmico do tipo 1 (HER1/EGFR). O EGFR é uma proteína transmembrana com atividade tirosina quinase, sendo essencial para a proliferação, migração, metabolismo, diferenciação e sobrevivência das células epiteliais normais. A atividade adequada do EGRF é necessária para manter a homeostasia celular e sua ativação anormal implica em diversas variedades de processos neoplásicos, entre eles o NSCLC (Maruyama, 2014; Wieduwilt e Moasser,

2008; Stella *et al.*,2012). O EGRF torna-se ativo por mecanismos dependentes de ligante, independentes de ligante e por superexpressão. Quando ocorre a ligação de uma proteína sinalizadora ao domínio extracelular do EGRF, esse sofre alterações conformacionais, tornando sua conformação estável e permitindo a dimerização e a autofosforilação de diversos resíduos de tirosina na porção terminal intracelular. Na célula tumoral, a autofosforilação do EGFR desencadeia uma série de vias intracelulares complexas, que resultam em proliferação celular, inibição da apoptose, capacidade de invasão tecidual, metástases, além do estímulo à neovascularização (Vlahovic Crawford, 2000).

O EGRF está superexpresso em grande parte dos casos de NSCLC e sua ativação está relacionada com um mau prognóstico (Stella *et al.*, 2012). O ELB compete com a adenosina trifosfato (ATP) pelo sítio de ligação no domínio intracelular do EGFR. Sendo assim, ele impede a ligação do ATP, levando a regressão tumoral pela parada do ciclo celular, aumento da apoptose e inibição da angiogênese (Makrilia *et al.*, 2009; Toffoli *et al.*, 2007).

Esse fármaco está disponível no mercado na forma farmacêutica de comprimido revestido (Tarceva®, Roche). Para o tratamento do NSCLC, o ELB é administrado na dose de 150 mg, via oral, uma vez ao dia. Sua absorção gastrointestinal é um processo complexo e multifatorial, caracterizado por uma biodisponibilidade baixa e variável, o que resulta em uma significativa variabilidade intraindividual (Van Leeuwen *et al.*, 2016). Em um estudo de Frohna e colaboradores (2006), foi demonstrado que a sua biodisponibilidade oral é de, aproximadamente, 60%. Além disso, esse fármaco sofre extenso metabolismo de primeira passagem (Smith *et al.*, 2008), sendo predominantemente metabolizado pela CYP3A4 e, em menor extensão, pela CYP1A2 e sua isoforma CYP1A1. Aproximadamente 75% dos seus metabolitos são excretados pelo sistema biliar (Li *et al.*, 2010).

Os efeitos adversos do ELB frequentemente relatados incluem diarreia e *rash* cutâneo, que podem ser graves, acarretando a interrupção do tratamento (Rudim *et al.*, 2008). Em um estudo de Shepherd e colaboradores (2005), foi demonstrada a ocorrência de diarreia em 55% dos pacientes e diarreia grave em 6% dos pacientes. Em outro estudo, Melosky (2012) relatou a ocorrência de *rash* cutâneo em 75% dos

pacientes. Reações cutâneas graves como a síndrome de Stevens-Johnson e a necrólise epidérmica tóxica são associadas ao tratamento (Li *et al.*, 2010). Outros efeitos incluem ceratite, sangramento gastrointestinal, anorexia, fadiga, tosse, dispneia, náusea e vômitos (Sweetman, 2011). A função hepática requer um monitoramento rigoroso, visto que foi observada a ocorrência de insuficiência hepática grave ou fatal (Brunton *et al.*, 2012). A reação adversa mais grave associada a esse fármaco é a fibrose pulmonar, no entanto a sua ocorrência é rara (Heine *et al.*, 2012).

1.3. Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que tem emergido rapidamente e que apresenta potencial aplicação em diversos setores. No campo farmacêutico, é crescente o interesse por tratamentos mais eficientes, direcionados para alvos específicos, com diminuição da dose necessária e minimização dos efeitos adversos. Neste contexto, a área de Nanotecnologia Farmacêutica apresenta grande potencial de aplicabilidade, com resultados promissores para o tratamento de diversas doenças.

Alguns exemplos de nanossistemas desenvolvidos para promover o carreamento de fármacos para fins de diagnósticos e tratamento consistem em dendrímeros, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, micelas poliméricas, nanoesferas, nanocápsulas e nanopartículas magnéticas (Marcatto e Duran, 2008; Zhu e Liao, 2015). Dentre esses diversos sistemas nanocarreadores de fármacos descritos na literatura, os que utilizam materiais como poliésteres e biopolímeros são vantajosos por serem biodegradáveis e biocompatíveis, visto que promovem a biodegradação *in vivo* das partículas e, conseqüentemente, a sua remoção do organismo (Kallinteri *et al.*, 2005).

1.3.1 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1µm, perfil granulométrico homogêneo e monomodal (Schaffazick *et al.*, 2003). As nanocápsulas consistem em uma estrutura vesicular com um invólucro polimérico ao redor de um núcleo oleoso (Fessi *et al.*, 1989) ou lipídico, que é constituído por um lipídeo sólido disperso em um lipídeo líquido (Muller *et al.*,

2001; Jager *et al.*, 2007). Na ausência de um núcleo oleoso, podem ser preparadas nanoesferas, as quais consistem em uma matriz polimérica (Pohlmann *et al.*, 2007).

Em relação aos sistemas convencionais, estudos têm demonstrado as potencialidades desses sistemas nanoparticulados por suas vantagens como: o aumento da biodisponibilidade e eficácia terapêutica (Italia *et al.*, 2009), capacidade de transpor barreiras biológicas (Frezza *et al.*, 2010), aumento da estabilidade química do fármaco em ambientes fisiológicos (Pohlmann *et al.*, 2013), redução dos efeitos adversos (Benvegnú *et al.*, 2012; Dimer *et al.*, 2014), bem como aumento do efeito antitumoral *in vitro* (Yurgel *et al.*, 2014; Fontana *et al.*, 2014) e *in vivo* (Mazzarino *et al.*, 2011; Drewes *et al.*, 2016).

Em 1989, Fessi e colaboradores propuseram o método baseado na deposição interfacial do polímero pré-formado. Para a obtenção de nanocápsulas através desse método, as matérias-primas imprescindíveis são o polímero biodegradável, componente oleoso e tensoativos. Os polímeros mais utilizados são poliésteres biodegradáveis e biocompatíveis, como o poli(l-lactídeo) (PLA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), ou o poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) (Duran *et al.*, 2011). O principal componente oleoso utilizado são os triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico, seguido pelos óleos vegetais (Pohlmann *et al.*, 2013). Dentre os óleos vegetais, destaca-se o óleo de copaíba devido a sua atividade anti-inflamatória (Veiga *et al.*, 2007) e antitumoral (Lima *et al.*, 2003). O óleo de copaíba é um exsudato extraído do tronco das árvores do gênero *Copaifera*, provenientes da região tropical da América Latina (Veiga e Pinto, 2002). Essas formulações exigem também o uso de uma associação de tensoativos, um de elevado equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL), como o polissorbato 80 e outro de baixo EHL, como o monoestearato de sorbitano (Venturini *et al.*, 2011) ou, ainda, a presença de fosfolipídios (Mundargi *et al.*, 2008) ou de polímeros oxigenados como polietilenoglicol (PEG) e os poloxameros (Zhang *et al.*, 2008). A estabilização desses sistemas em solução é decorrente da presença de micelas de polissorbato 80 (Fiel *et al.*, 2013).

A técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado, a qual foi utilizada neste trabalho, consiste em dissolver o polímero, óleo, estabilizador (tensoativo de baixo EHL) e o fármaco em um solvente miscível em água. Essa fase orgânica é

injetada em uma fase aquosa contendo estabilizador hidrofílico (tensoativo de alto EHL). As nanopartículas são originadas espontaneamente pela rápida difusão do solvente no meio aquoso e na interface óleo/água o polímero precipita ao redor das gotículas de óleo. O solvente é então removido da suspensão através da evaporação sob pressão reduzida até o ajuste do volume final da formulação.

Utilizando a técnica de nanoprecipitação, Jornada e colaboradores (2012) demonstraram ser possível modular o tamanho das nanopartículas pelo controle de variáveis como a viscosidade da fase orgânica e a concentração de material nessa fase. Nesse estudo, também foi evidenciado ser possível aumentar o teor total de fármaco pelo aumento da fração volumétrica da formulação, gerando uma maior densidade de número de partículas (Jornada *et al.*, 2012). Os mesmos autores demonstraram que a redução do volume da fase aquosa não gera alteração nas características físico-químicas da formulação (Jornada *et al.*, 2015).

1.4. Vetorização de fármacos antitumorais

A entrega de fármacos antitumorais por nanopartículas tem recebido muita atenção nos últimos anos, visto que o câncer é a segunda causa mundial de morte, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares (Pérez e Fernández, 2015). A aplicação de nanopartículas poliméricas para vetorização de fármacos em tumores sólidos se deve as suas propriedades promissoras. Primeiramente, devido ao seu tamanho reduzido, as nanopartículas são capazes de penetrar nos pequenos capilares, aumentando de forma eficiente o acúmulo de fármacos em tumores sólidos (Estanqueiro *et al.*, 2015). Este fenômeno de vetorização passiva (*passive targeting*) é conhecido como “efeito de aumento de retenção e permeabilidade” (EPR). O endotélio dos tecidos tumorais é mais permeável a estruturas de dimensões nanométricas, dessa forma as nanopartículas conseguem entrar nas fenestrações mais largas dos vasos tumorais, mas não conseguem entrar nas fenestrações do endotélio normal. As nanopartículas com diâmetro inferior a 200 nm atingem o extravasamento para tumores pelo efeito EPR de forma mais eficaz (Pérez e Fernández, 2015). A Figura 2 representa de forma esquemática o efeito EPR.

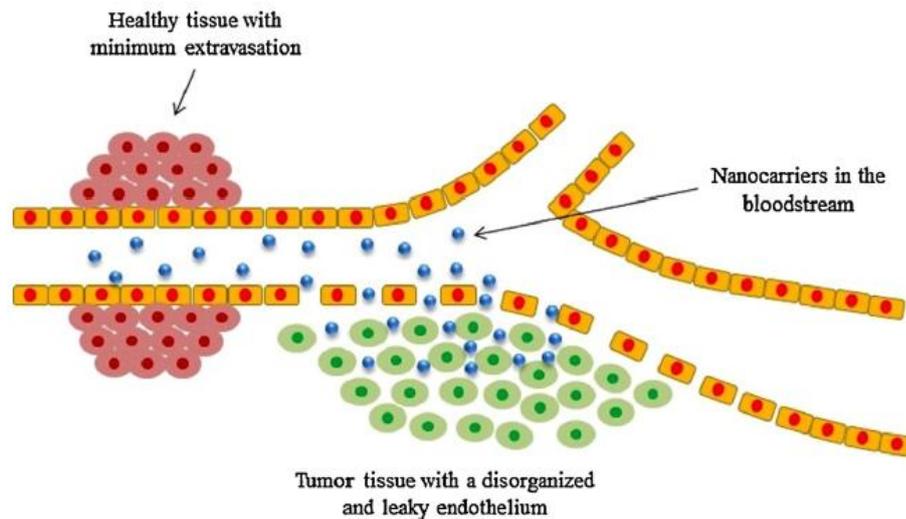


Figura 2. Acúmulo de nanopartículas pelo efeito de aumento de retenção e permeabilidade no interstício tumoral. Fonte: Estanqueiro *et al.*, 2015.

O processo inflamatório presente nos tecidos adjacentes ao tumor também contribui para alterações de permeabilidade microvascular, facilitando o direcionamento das nanopartículas para o tecido tumoral (Iyer *et al.*, 2006). Outro fator importante é o uso de polímeros biodegradáveis na produção das nanopartículas, o que permite uma liberação sustentada do fármaco para o sítio de ação (Natarajan *et al.*, 2014). Dessa forma, esses sistemas são capazes de fornecer uma maior concentração de fármaco no sítio do tumor e, conseqüentemente, concentrações mais baixas nos tecidos saudáveis. Portanto, o índice terapêutico é aumentado, ao mesmo tempo em que sua toxicidade e efeitos adversos são reduzidos (Egusquiaguirre *et al.*, 2012).

Neste sentido, a nanoencapsulação de fármacos tem sido considerada uma estratégia atraente e promissora. Nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo indometacina foram eficazes na redução da viabilidade celular e exerceram citotoxicidade seletiva para as células tumorais de glioblastomas (Bernardi *et al.*, 2008). Além disso, após administração intraperitoneal, vetorizaram a indometacina para o tecido cerebral, reduzindo o volume do tumor e suas características histopatológicas de malignidade (Bernardi *et al.*, 2009). Resultados promissores para o tratamento de glioblastomas também foram observados quando se utilizou nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol (Figueiro *et al.*, 2013).

Adicionalmente, foi demonstrado que nanocápsulas de núcleo lipídico contendo éster etílico de metotrexato foram capazes de reverter a resistência ao tratamento em linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 (Yurgel *et al.*, 2014). Em um estudo de Malguizo e colaboradores (2015), foi avaliado a atividade de nanopartículas poliméricas de poli (butil-cianoacrilato) contendo doxorubicina em duas linhagens celulares de câncer de pulmão e demonstrado um aumento da atividade antitumoral tanto *in vitro* bem como *in vivo*.

No que diz respeito ao desenvolvimento de nanocarreadores para o erlotinib, observa-se poucos artigos na literatura científica, sendo a maioria publicados recentemente. Marslin e colaboradores (2009) desenvolveram nanopartículas de PLGA contendo erlotinib, e evidenciaram menor toxicidade subaguda em ratos quando comparado com o fármaco livre. Também, micelas inversas contendo erlotinib foram desenvolvidas por Vrignaud e colaboradores (2012), em estudo que demonstrou um aumento na eficácia antitumoral *in vitro* em células de adenocarcinoma pancreático. Barghi e colaboradores (2014) desenvolveram nanopartículas com o copolímero policaprolactona-poli(etilenoglicol)-policaprolactona (PCEC) e demonstraram redução da viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células de adenocarcinoma de pulmão. Também, nanopartículas de quitosana foram preparadas por Srinivasan e Shoyele (2014) e estudaram a influência do pH na liberação do fármaco, a partir das partículas com a superfície funcionalizada com anticorpo, em comparação com aquelas não funcionalizadas. Foi observado que as partículas funcionalizadas apresentaram um maior controle da liberação do erlotinib. Recentemente, Mandal e colaboradores (2016) desenvolveram nanopartículas híbridas contendo erlotinib e demonstraram que essas nanopartículas reduzem a viabilidade celular e aumentam a captação celular.

Considerando o exposto, a presente dissertação tem por objetivo explorar as potencialidades inéditas das nanocápsulas poliméricas na veiculação do erlotinib com vistas ao tratamento do câncer de pulmão de células não pequenas. Os graves efeitos adversos e a biodisponibilidade baixa e variável deste fármaco, aliados aos benefícios relatados para as nanopartículas na vetorização de fármacos antitumorais, além da possibilidade de combinar o óleo de copaíba na estruturação do núcleo das nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo erlotinib, levando ao desenvolvimento

de um nanocarreador inédito, motivaram a pesquisa. Assim, o racional da proposta é de que a nanoencapsulação do erlotinib propiciará uma melhora da eficácia do fármaco em comparação com uma formulação controle de fármaco livre. Para averiguar esta hipótese, o trabalho utilizará linhagem de células de adenocarcinoma de pulmão (A549), avaliando a capacidade da formulação de inibir o crescimento celular, induzir apoptose e de interferir no ciclo celular, bem como por meio da avaliação da sobrevivência clonogênica nas referidas células.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanocápsulas poliméricas contendo erlotinib e investigação da sua atividade antitumoral *in vitro* em células de adenocarcinoma de pulmão humano (A549).

Objetivos específicos

- Desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo erlotinib (0,5 mg/mL);
- Validação de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV para a determinação do erlotinib em nanocápsulas poliméricas;
- Caracterização da formulação quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, número de partículas por mL, pH, teor de fármaco, eficiência de encapsulação e morfologia;
- Avaliação da estabilidade do fármaco associado às suspensões de nanocápsulas frente ao armazenamento por um período de 30 dias;
- Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do erlotinib a partir das nanocápsulas;
- Avaliação da capacidade antiproliferativa *in vitro* de nanocápsulas poliméricas contendo erlotinib na linhagem A549;
- Avaliação da capacidade da formulação de induzir apoptose e de interferir no ciclo celular;
- Avaliação da sobrevivência clonogênica em células da linhagem A549.

ARTIGO

Improving the antitumor activity of erlotinib in non-small cell lung cancer by encapsulation in polymeric nanocapsules: formulation, physicochemical characterisation and *in vitro* cytotoxicity

O texto completo deste capítulo, que no texto integral da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 39 – 64, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta do desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo erlotinib, bem como da avaliação de seu efeito antitumoral *in vitro* em linhagem de adenocarcinoma de pulmão.

DISCUSSÃO

Pelo método de nanoprecipitação, utilizando poli (ϵ -caprolactona) como parede polimérica, óleo de copaíba como núcleo oleoso e polissorbato 80 como tensoativo, foi possível obter nanocápsulas poliméricas contendo erlotinib ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$). O erlotinib é um fármaco lipofílico, que apresenta baixa biodisponibilidade oral e diversos efeitos adversos.

Os valores obtidos de diâmetro médio (espalhamento de luz dinâmico), potencial zeta (mobilidade eletroforética), número de partículas por mL (turbidimetria) e pH (potenciometria) foram de 171 ± 2 (PDI $< 0,10$), $-8,17 \pm 2,26 \text{ mV}$, $6,97 \pm 0,22 \times 10^{13}$ partículas por mL e $6,24 \pm 0,02$, respectivamente. Após a comparação com as nanocápsulas sem fármaco, concluiu-se que a encapsulação do ELB não provocou alterações nas características da formulação. O teor e a eficiência de encapsulação (CLAE-UV) foram próximos de 100%. A formulação apresentou-se estável por um período de 30 dias, a temperatura ambiente e protegida da luz. O único parâmetro que apresentou alteração foi o pH, ocorrendo diminuição no seu valor ($6,24-5,72$) ($p < 0,05$). Essa diminuição pode estar relacionada com a hidrólise parcial da cadeia lateral do polímero. A análise morfológica (microscopia eletrônica de transmissão) demonstrou a presença de nanopartículas esféricas com diâmetro semelhante ao obtido por espalhamento de luz dinâmico.

O estudo de liberação *in vitro* do erlotinib a partir da suspensão de nanocápsulas foi realizado utilizando o método de sacos de diálise e tampão acetato pH 3,7 como meio de liberação. O erlotinib foi liberado mais lentamente a partir das nanocápsulas, quando comparado com o controle (solução metanólica). Os dados de liberação foram adequadamente modelados pela equação de primeira ordem monoexponencial. A solução de ELB apresentou uma velocidade de dissolução ($k = 0,4750 \pm 0,0433 \text{ min}^{-1}$) superior à velocidade de liberação do ELB a partir das nanocápsulas ($k = 0,1948 \pm 0,0134 \text{ min}^{-1}$). Esse resultado confirma a eficiência desse nanossistema no controle da liberação.

A análise de viabilidade celular pelos ensaios de MTT e LIVE/DEAD em células A549 (adenocarcinoma de pulmão) demonstrou uma maior citotoxicidade da nanocápsula contendo erlotinib em relação ao fármaco livre. Para calcular o IC_{50} , foram testadas as concentrações na faixa de $1-40 \mu\text{M}$ para o ELB e $0,01-10 \mu\text{M}$ para a

nanocápsula. O IC_{50} encontrado para a nanocápsula contendo erlotinib foi 15 vezes maior que o IC_{50} do fármaco livre. No ensaio do MTT, a nanocápsula sem fármaco (branca) apresentou significativa inibição da taxa de proliferação celular. Entretanto, em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, a utilização de uma suspensão de nanocápsulas semelhante não apresentou citotoxicidade em células normais (HaCaT). Para demonstrar que o nanoencapsulamento é essencial para melhorar a atividade antitumoral, foi utilizado como controle em todos os experimentos *in vitro* a combinação de nanocápsulas brancas com o fármaco livre (NC+ELB).

A análise de ciclo celular, pela avaliação conteúdo de DNA corado com iodeto de propídio, evidenciou a presença de células apoptóticas (população em Sub-G1) no grupo tratado com as nanocápsulas contendo erlotinib ($5\mu\text{M}/2.8\times 10^{11}$ particles/mL). No entanto, a formulação não demonstrou induzir a parada de ciclo celular. A solução de erlotinib e a nanocápsulas branca mais o ELB (NC+ELB) desencadeou parada de ciclo na fase G0/G1. Contudo, já está relatado na literatura que o ELB induz parada de ciclo nessa fase em células da linhagem A549. A nanocápsula branca (NC) reduziu significativamente a população de células na fase S do ciclo celular, o que foi acompanhado com uma tendência em aumentar as células na fase G0/G1. Esse resultado sugere que as células se dividiram menos quando comparado ao controle (meio de cultivo), o que pode explicar a taxa de inibição do crescimento da NC demonstrada no ensaio de MTT.

A avaliação de indução de apoptose foi realizada por citometria de fluxo utilizando o kit anexina V-PE e 7-AAD. Na dose testada ($5\mu\text{M}/2.8\times 10^{11}$ particles/mL), somente a nanocápsula contendo erlotinib induziu apoptose tardia, confirmando os resultados obtidos na análise de ciclo celular. A apoptose tardia é uma fase no processo de morte celular entre a apoptose e a necrose, sendo caracterizada pela externalização da fosfatidilserina e rompimento da membrana plasmática. Assim, nessa fase, as células são marcadas tanto com o 7-AAD quanto com a Anexina V-PE.

Os resultados obtidos no ensaio clonogênico demonstraram que o tratamento com as nanocápsulas contendo erlotinib causaram redução na sobrevivência clonogênica nas duas doses testadas. Na dose de $5,7\times 10^{10}$ partículas/mL, o tratamento com a nanocápsula contendo erlotinib reduziu em 62,34% a formação de colônias. Na

dose de $2,8 \times 10^{11}$ partículas/mL, observou-se redução de 100% das colônias formadas. Esse resultado é muito relevante, visto que em tumores apenas as células clonogênicas são capazes de causar recorrência e gerar metástase. Adicionalmente, na maior dose, a nanocápsula branca mais a solução de fármaco (NC+ELB) gerou uma redução de 56,13% no número de colônias.

CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a viabilidade tecnológica na obtenção de nanocápsulas contendo erlotinib. A formulação obtida pela técnica de nanoprecipitação apresentou características físico-químicas adequadas, e a incorporação do fármaco não influenciou nas suas propriedades. Essa formulação foi estável por um período de 30 dias e o estudo de liberação foi satisfatório, tendo em vista que foi observado um perfil de liberação mais lento do fármaco quando encapsulado em nanocápsulas poliméricas. As nanocápsulas contendo erlotinib aumentaram o efeito antitumoral *in vitro* e foi demonstrado que encapsulamento do fármaco é imprescindível para essa melhor atividade. Também foi evidenciado um aumento importante na taxa de apoptose e redução na sobrevivência clonogênica em células A549. Essa formulação inovadora, portanto, é uma alternativa potencial para o desenvolvimento de forma farmacêutica oral ou pulmonar para o tratamento de NSCLC.

REFERÊNCIAS

- Barghi, L.; Asgari, D.; Barar, J.; Nakhband, A.; Valizadeh, H. Synthesis, Characterization and in vitro Anti-Tumoral Evaluation of Erlotinib-PCEC Nanoparticles. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.15, n.23, p.10281-10287, 2014.
- Benvegnú, D.M.; Barcelos, R.C.S.; Boufleur, N.; Pase, C.S.; Reckziegel, P.; Flores, F.C.; Ourique, A.F.; Nora, M.D.; Silva, C.Bo.; Beck, R.C.R.; Bürger, M E. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules decrease its adverse motor side effects and oxidative stress markers in rats. **Neurochemistry International**, v.61, n.5, p.623-631, 2012.
- Bernardi, A.; Frozza, R.L.; Jager, E.; Figueiro, F.; Bavaresco, L.; Salbego, C.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Battastini, A.M. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: an in vitro study. **European Journal Pharmacology**, v.586, n.1-3, p.24-34, 2008.
- Bernardi, A.; Braganhol, E.; Jager, E.; Figueiro, F.; Edelweiss, M.I.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Battastini, A.M.O. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Letters**, v.281, p.53-63, 2009.
- Brunton, L.L.; Chabner, B.A.; Knollmann, C.B. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12Ed. Porto Alegre: AMGH EDITORA, 2012.
- Ciardello, F.; Tortora, G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment. **New England Journal of Medicine**, v.358, p.1160-1174, 2008.
- Cortés, A.A.; Urquizu, L.C.; Cubero, J.H. Adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer: state-of-the-art. **Translational Lung Cancer Research**, v.4, n.2, p.191-197, 2015.
- Drewes, C.C.; Fiel, L.A.; Bexiga, C.G.; Asbahr, A.C.; Uchiyama, M.K.; Cogliati, B.; Araki, K.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R.; Farsky, S. Novel therapeutic mechanisms determine the effectiveness of lipid-core nanocapsules on melanoma models. **International Journal of Nanomedicine**, v.11, p.1261-1279, 2016.
- Dimer, F. A.; Ortiz, M.; Pase, C.S.; Roversi, K.; Friedrich, R.B.; Pohlmann, A. R.; Burger, M. E.; Guterres, S.S. Nanoencapsulation of Olanzapine Increases Its Efficacy in Antipsychotic Treatment and Reduces Adverse Effects. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.10, p.1137-1145, 2014.
- Durán, N.; Teixeira, Z.; Marcato, P.D. Topical application of nanostructures: solid lipid, polymeric and metallic nanoparticles. in: Beck, R.C.R.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R. (eds.). **Nanocosmetics and nanomedicine: new approaches for skin care**. berlin: springer, 2011. p. 69-99.
- Egusquiaguirre, S.P.; Igartua, M.; Hernández, R.M.; Pedraz, J.L. Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research. **Clinical and Translational Oncology**, v.14, p.83-93, 2012.

Estanqueiro, M.; Amaral, M.H.; Conceição J.; Sousa Lobo, J.M. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.126, p.631-48, 2015.

Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Amoury, N.; Benita, S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v.113, p. r1-r4, 1989.

Fiel, L.A.; Adorne, M.D.; Guterres, S.S.; Netz, P.A.; Pohlmann, A.R. Variable temperature multiple light scattering analysis to determine the enthalpic term of a reversible agglomeration in submicrometric colloidal formulations: A quick quantitative comparison of the relative physical stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.431, p.93-104, 2013.

Figueiro, F.; Bernardi, A.; Frozza, R. L.; Terroso, T.; Zannotto-Filho, A.; Jandrey, E.H.; Moreira, J.C.; Salbego, C.G.; Edelweiss, M.I.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Battastini, A.M. Resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules treatment reduces in vitro and in vivo glioma growth. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.9, p. 516-526, 2013.

Fontana, M.C.; Beckenkamp, A.; Buffon, A.; Beck, R.C. Controlled release of raloxifene by nanoencapsulation: effect on in vitro antiproliferative activity of human breast cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v.17, n.9, p.2979-91, 2014.

Frohna, P.; Lu, J.; Eppler, S.; Hamilton, M.; Wolf, J.; Rakhit, A.; Ling, J.; Kenkare-Mitra, S.R.; Lum, B.L. Evaluation of the Absolute Oral Bioavailability and Bioequivalence of Erlotinib, an Inhibitor of the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase, in a Randomized, Crossover Study in Healthy Subjects. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v.46, p.282-290, 2006

Frozza, R.L.; Bernardi, A.; Paese, K.; Hoppe, J.B.; da Silva, T.; Battastini, A.M.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Salbego, C. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.6, n.6, p.694-703, 2010.

Gazdar, A.F. Should we continue to use the term non-small-cell lung cancer?. **Annals of Oncology**, n.21, v. 7, p.vii225–vii229, 2010.

Stella, G.M.; Luisetti, M.; Inghilleri, S.; Cemmi, F.; Scabini, R.; Zorzetto, M.; Pozzi, E. Targeting EGFR in non-small-cell lung cancer: Lessons, experiences, strategies. **Respiratory Medicine**, v.106, n.2, p.173–183, 2012.

Heine ter, R.; Van den Bosch, R.T.; Schaefer-Prokop, C.M.; Lankheet N.A.; Beijnen, J.H.; Staaks, G.H.; van der Westerlaken, M.M.; Malingré, M.M.; van den Brand J.J. Fatal interstitial lung disease associated with high erlotinib and metabolite levels. A case report and a review of the literature. **Lung Cancer**, n.75, v.3, p.391-7, 2012.

Italia, J.L.; Yahya, M.M.; Singh, D.; Ravi Kumar, M.N. Biodegradable Nanoparticles Improve Oral Bioavailability of Amphotericin B and Show Reduced Nephrotoxicity

- Compared to Intravenous Fungizone®. **Pharmaceutical Research**, v.26, n.6, p.1324-31, 2009.
- Iyer, A.K.; Khaled, G.; Fang, J.; Maeda, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. **Drug Discovery Today**, v.11, n.17-18, p.812-8, 2006.
- Jäger, A.; Stefani, V.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International journal of pharmaceutics**, v.338, n.1, p.297, 2007.
- Jornada, D.S.; Fiel, L.A.; Bueno, K.; Gerent, J.F.; Petzhold, C.L.; Beck, R.C.R.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R.; Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft Matter**, v.8, p.6646-6655, 2012.
- Jornada, D.S.; Friedrich, R.B.; Ferrarini, S.; De Marchi, J.G.; Gerent, J.F.; de O.Ferreira, G.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R. Lipid-Core Nanocapsules: Reducing the Aqueous Phase Volume to Increase Encapsulation Efficiency and to Reduce the Energy and Time Consuming of the Production Process. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v.4, n.1, p.79-85, 2015.
- Kallinteri,P.; Higgins, S.; Hutcheon, G.A.; St Pourçain, C.B.; Garnett. M.C.Novel functionalized biodegradable polymers for nanoparticle drug delivery systems. **Biomacromolecules**, v.6, n.4, p.1885-94, 2005.
- Li,X.; Kamenecka, T.M.; Cameron, M.D. Cytochrome P450-Mediated Bioactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Erlotinib to a Reactive Electrophile. **Drug Metabolism and Disposition**, v.38, n.7, p.1238-45, 2010.
- Lima, S.R.M.; Junior, V.F.V.; Christo, H.B.; Pinto, A.C.; Fernandes, P.D. 2003. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga hayne* and its fractions. **Phytotherapy Research**, v.17, p.1048-1053, 2003.
- Makrilia, N.; Lappa, T.; Xyla, V.; Nikolaidis, I.; Syrigos, K. The role of angiogenesis in solid tumours: An overview. **European Journal of Internal Medicine**, v.20, p.663-71, 2009.
- Mandal, B.; Mittal, N.K.; Balabathula, P.; Thoma, L.A.; Wood, G.C. Development and in vitro evaluation of core-shell type lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib in non-small cell lung cancer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.81, p.162-71, 2016.
- Marcatto P. D.; Durán, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, p.2216-2229, 2008.
- Marslin, G.; Sheeba, C.J.; Kalaichelvan, V.K.; Manavalan, R.; Reddy, P.N.; Franklin, G. Poly(D,Llactic-co-glycolic acid) nanoencapsulation reduces Erlotinib induced subacute toxicity in rat. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.5, p.464-71, 2009.
- Mazzarino, L.; Silva, L.F.; Curta JC, Licínio. M.A.; Costa,A.; Pacheco, L.K.; Siqueira, J.M.; Montanari,J.; Romero,E.; Assreuy,J.; Santos-Silva, M.C.;Lemos-Senna, E. Curcumin-loaded lipid and polymeric nanocapsules stabilized by nonionic surfactants:

an in vitro and In vivo antitumor activity on B16-F10 melanoma and macrophage uptake comparative study. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.7, n.3, p.406-14, 2011.

Meert, A.P.; Sculier, J.P.; Berghmans, T. Lung cancer diagnosis in the emergency department. **European Respiratory Journal**, n.45, v.4, p.867-8, 2015.

Melosky, B. Supportive care treatments for toxicities of anti-egfr and other targeted agents. **Current Oncology**, v.19, p.S59-63, 2012.

Maruyama, N.I. Mechanisms of Activation of Receptor Tyrosine Kinases: Monomers or Dimers. **Cells**, v.3, n.2, p.304–330, 2014.

Melguizo, C.; Cabeza, L.; Prados, J.; Ortiz, R.; Caba, O.; Rama, A.R.; Delgado, Á.V.; Arias, J.L. Enhanced antitumoral activity of doxorubicin against lung cancer cells using biodegradable poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. **Journal of Drug Design, Development and Therapy**, v.9, p.6433-44, 2015

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa 2016. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Acesso em 05 mai 2016.

Müller, C.R.; Schaffazick, S.R; Pohlmann, A.R.; Luccas Freitas, L.; Pesce Da Silveira, N.; Dalla Costa, T.; Guterres, S.S. Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. **Pharmazie**, v. 56, p. 864-867, 2001.

Mundargi, R.C.; Babu, V.R.; Rangaswamy, V.; Patel, P.; Aminabhavi, T. M. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. **Journal of Controlled Release**, v.125, n.3, p.193-209, 2008.

Natarajan, J.V.; Nugraha, C.; Ng, X.W.; Venkatraman, S. Sustained-release from nanocarriers: a review. **Journal of Controlled Release**, v.193, p.122-38, 2014.

Pallis, A.G. A Review of Treatment in Non-small-cell Lung Cancer. **European Oncology & Haematology**, v.8, n.4, p208–12, 2012.

Pavlou M.P.; Diamandis, E.P. The cancer cell secretome: A good source for discovering biomarkers?. **Journal of Proteomics**, v.73, p.1896-906, 2010.

Pérez-Herrero, E.; Fernández-Medarde, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.93, p.52–79, 2015.

Pohlmann, A.R.; Cruz, L.; Mezzalira, G.; Soares, L.U.; Silveira, N.P.; Guterres, S.S. Structural model of polymeric nanospheres containing indomethacin ethyl ester and in vivo antiedematogenic activity. **International Journal of Nanotechnology**, v.4, p.454-467, 2007.

Pohlmann, A.R.; Fonseca, F.N.; Paese, K.; Detoni, C.B.; Coradini, K.; Beck, R.C.; Guterres, S.S. Poly(epsilon-caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion Drug Delivery**, v.10, n.5, p.623-38, 2013.

- Ridge, C.A.; Aoife, M.; McErlean.; Ginsberg, M.S. Epidemiology of Lung Cancer. **Seminars in Interventional Radiology**, n.30, v.2, p.93–98, 2013.
- Rudin, C.M.; Liu, W.; Desai, A.; Karrison, T.; Jiang, X.; Janisch, L.; Ramirez, J.; Poonkuzhali, B.; Schuetz, E.; Fackenthal, D.L.; Chen, P.; Armstrong, D.K.; Brahmer, J.R.; Fleming, G.F.; Vokes, E.E.; Carducci, M.A.; Ratain, M.J. Pharmacogenomic and Pharmacokinetic Determinants of Erlotinib. **Toxicity**, v.26, n.7, p.1119-27, 2008.
- Schaffazick, S.R.; Guterres, S.S.; Freitas, L.L.; Pohlmann, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n.5, p.726-737, 2003.
- Shepherd F.A.; Rodrigues Pereira, J.; Ciuleanu, T.; Tan, E.H.; Hirsh, V.; Thongprasert, S.; Campos, D.; Maoleekoonpiroj, S.; Smylie, M.; Martins, R.; Van Kooten, M.; Dediu, M.; Findlay, B.; Tu, D.; Johnston, D.; Bezzak, A.; Clark, G.; Santabárbara, P.; Seymour, L. Erlotinib in Previously Treated Non–Small-Cell Lung Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.353, n.2, p.123-32, 2005.
- Smith, N.F.; Baker, S.D.; Gonzalez, F.J.; Harris, J.W.; Figg, W.D.; Sparreboom, A. Modulation of erlotinib pharmacokinetics in mice by a novel cytochrome P450 3A4 inhibitor, BAS 100. **British Journal of Cancer**, n.98, v.10, p.1630-2, 2008.
- Srinivasan, A.R.; Shoyele, A.S. Influence of Surface Modification and the pH on the Release Mechanisms and Kinetics of Erlotinib from Antibody-Functionalized Chitosan Nanoparticles. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.53, n.8, p.2987-2993, 2014.
- Sweetman S.C. ed. Martindale The Complete Drug Reference, 37th ed. London, The Pharmaceutical Press, 2011.
- Toffoli, G.; De Mattia, E.; Cecchin, E.; Bionson, P.; Masier, S.; Corona, G. Pharmacology of epidermal growth factor inhibitors. **The International journal of Biological Markers**, n.22, v.(1 Suppl 4), p.S24-39, 2007.
- Van Leeuwen R.W.; Peric, R.; Hussaarts, K.G.; Kienhuis, E.; IJzerman, N.S.; de Bruijn, P.; Van der Leest, C.; Codrington, H.; Kloover, J.S.; Van der Holt, B.; Aerts, J.G.; Van Gelder, T.; Mathijssen, R.H. Influence of the Acidic Beverage Cola on the Absorption of Erlotinib in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v.34, n.12, p.1309-14, 2016.
- Veiga Junior, V.F.; Pinto, A.C. The Copaifera L. genus. **Química Nova**, v.25, n.2, p. 273-286, 2002.
- Veiga Junior, V.F.; Rosas, E.C.; Carvalho, M.V.; Henriques, M.G.M.O.; Pinto, A.C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne: A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, n.2, p.248-254, 2007.
- Venturini, C.G.; Jäger, E.; Oliveira, C.P.; Bernardi, A.; Battastini, A.M.O.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, p. 200–208, 2011.

Vlahovic,G.; Crawford,J. Activation of Tyrosine Kinases in Cancer.**The Oncologist**, v.8, n.6, p.531-538, 2000.

Vrignaud, S.; Hureauux, J.; Wack, S.; Benoit, J.P.; Saulnier, P.; Design, optimization and in vitro evaluation of reverse micelleloaded lipid nanocarriers containing erlotinib hydrochloride. **International Journal of Pharmaceutics**, v.436, p.194-200, 2012.

Walter, F.M.; Rubin, G.; Bankhead, C.; Morris, H.C.; Hall, N.; Mills, K.; Dobson, C.; Rintoul, R.C.; Hamilton, W.; Emery, J. Symptoms and other factors associated with time to diagnosis and stage of lung cancer:a prospective cohort study. **British Journal of Cancer**, v.112, p.S6–S13, 2015.

Wieduwilt, M.J.; Moasser, M.M. The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n.65, v.10, p.1566-84, 2008.

Yurgel, V.C.; Oliveira, C.P.; Begnini, K.R.; Schultze, E.; Thurow, H.S.; Leon, P.M.; Dellagostin, O.A.; Campos, V.F.; Beck, R.C.; Guterres, S.S.; Collares, T.; Pohlmann, A.R.; Seixas, F.K. Methotrexate diethyl ester-loaded lipid-core nanocapsules in aqueous solution increased antineoplastic effects in resistant breast cancer cell line. **International Journal of Nanomedicine**, v.25, v.9, p.1583-91, 2014.

Zhang, Y.; Zhu, S.Y.; Yin, L.C.; Qian, F.; Tang, C.; Yin, C.H. Preparation, characterization and biocompatibility of poly(ethylene glycol)-poly(n-butyl cyanoacrylate) nanocapsules with oil core via miniemulsion polymerization. **European Polymer Journal**, v.44, n.8, p.1654-1661, 2008.

Zhu, Y.; Liao, L. Applications of Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery: A Review. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.15, n.7, p.4753-4773, 2015.

Zugazagoitia, J.; Enguita, A.B.; Nuñez, J.A.; Iglesias, L.; Ponce, S. The new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification from a clinical perspective: current concepts and future prospects. **Journal of Thoracic Disease**, v.6, n.5, p. S526–S536, 2014.

ANEXO

Validação de metodologia analítica para quantificação de erlotinib em nanocápsulas poliméricas por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.

O método analítico para quantificação do erlotinib foi validado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limites de quantificação e detecção, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e especificidade.

A quantificação do erlotinib (ELB), a partir das nanocápsulas poliméricas, foi realizada através de CLAE em cromatógrafo Perkin Elmer Series 200, utilizando-se detector ultravioleta visível 247 nm e coluna Phenomenex C18 (5 μ , 150 x 4,6 mm). A fase móvel isocrática foi composta por 0,02M de acetato de amônio e acetonitrila em uma proporção 60:40 (v/v), com pH aparente igual à 3,3. O fluxo utilizado foi 0,8 mL por minuto.

Para a construção da curva analítica, as seguintes concentrações, a partir de uma solução padrão (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), foram preparadas: 1, 2, 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo todas diluições realizadas em fase móvel. Três curvas analíticas independentes foram construídas e a linearidade foi obtida pelo estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e analisados por Análise de Variância (ANOVA). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir da curva analítica e utilizando as equações 1 e 2.

$$LD = 3,3 . DP / S \quad (1)$$

$$LQ = 10 . DP / S \quad (2)$$

Onde: DP = Desvio padrão e S = inclinação da curva analítica.

As curvas apresentaram adequado coeficiente de correlação ($r = 0,9998$; $y = 106532x - 12669$), regressão linear significativa ($F_{\text{calculado}} = 20.211,99 > F_{\text{tabelado}} = 4,75$) e sem desvio da linearidade ($F_{\text{calculado}} = 1,65 < F_{\text{tabelado}} = 3,26$), demonstrando que o método é linear na faixa de concentração de 1 a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (figura 1). O limite de quantificação obtido foi 0,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o limite de detecção obtido foi 0,19 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

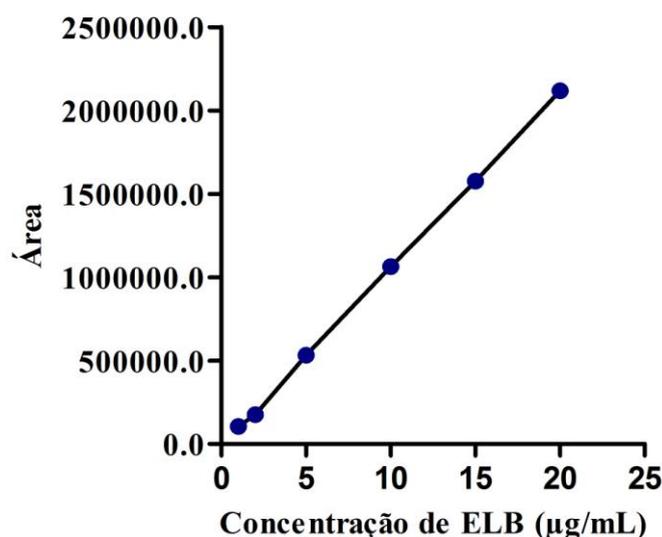


Figura 1. Representação gráfica da curva média do erlotinib, quantificada por CLAE (n = 3, para cada ponto da curva).

A precisão foi determinada ao nível de repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). A repetibilidade foi realizada a partir da análise de seis amostras, na mesma concentração ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. Para avaliação da precisão intermediária, as amostras ($10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram analisadas em três dias diferentes (n=3). Os resultados obtidos para a precisão estão expressos na Tabela 1. O desvio padrão relativo (DPR) para repetibilidade e precisão intermediária apresentaram valores que não ultrapassam 1,5%, indicando que a metodologia desenvolvida é precisa na faixa de concentrações avaliadas.

Tabela 1. Resultados da precisão do método analítico de doseamento do erlotinib em nanocápsulas através da análise do desvio padrão relativo (DPR) intra (n = 3) e inter-dia (n = 6).

Dia	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de erlotinib
	DPR
1	0,67
2	1,12
3	1,21
Repetibilidade	1,18

A exatidão foi realizada adicionando-se uma quantidade conhecida de fármaco, a partir de uma solução mãe, a uma amostra branca de nanocápsulas. As concentrações utilizadas para o teste de exatidão foram 1, 5 e 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os valores de exatidão apresentados na Tabela 2 demonstram os valores percentuais recuperados de erlotinib a partir das soluções-amostra. Estes valores encontram-se de acordo com os intervalos permitidos (RE 899 ANVISA).

Tabela 2. Avaliação da exatidão do método analítico de doseamento do erlotinib em nanocápsulas (n = 9)

Concentração de erlotinib ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Conc. \pm DP	Exatidão (%)
1	1,01 \pm 0,03	101,30
5	4,82 \pm 0,07	96,42
15	14,54 \pm 0,23	96,93

A especificidade foi determinada pela utilização de uma suspensão de nanocápsulas sem o fármaco, contendo os excipientes utilizados na sua preparação (amostra placebo). Os cromatogramas, apresentados na figura 2, demonstram que o método é específico para a quantificação de erlotinib em suspensões de nanocápsulas, não observando interferência dos demais componentes da formulação na quantificação do fármaco.

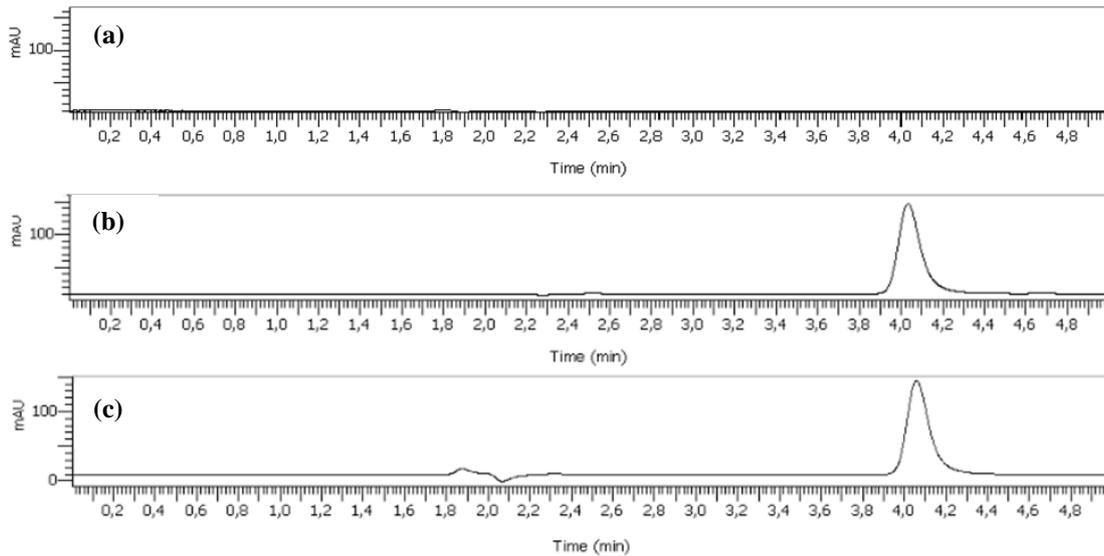


Figura 2: Cromatogramas de CLAE para o método analítico de doseamento do ELB em nanocápsulas: (a) nanocápsulas poliméricas sem fármaco, (b) amostra referente ao ponto de concentração $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de erlotinib e (c) amostra da suspensão de nanocápsulas referente ao ponto $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Referência:

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução (RE) n° 889, de 29/05/2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Ministério da Saúde: Brasil 2003.