

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA**

**Desenvolvimento de um sistema terapêutico micro-/  
nanoestruturado contendo 5-fluorouracil para administração  
pulmonar**

Tese de Doutorado

**Kelly Cristine Zatta**

**Porto Alegre, março de 2016.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA**

**Desenvolvimento de um sistema terapêutico micro-/  
nanoestruturado contendo 5-fluorouracil para administração  
pulmonar**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora.

**Kelly Cristine Zatta**

**Orientadora: Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres**

Porto Alegre, março de 2016.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 01.03.2016, pela Banca Examinadora constituída por:

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres**

PPGNANOFARMA/ UFRGS

Orientadora - Presidente

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Irene Cledes Kulkamp Guerreiro**

PPGNANOFARMA / UFRGS

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Valquiria Linck Bassani**

PPGCF/ UFRGS

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky**

FCF/ USP

Zatta, Kelly Cristine

Desenvolvimento de um sistema terapêutico micro-/nanoe estruturado contendo 5-fluorouracil para administração pulmonar / Kelly Cristine Zatta. -- 2016.

160 f.

Orientadora: Sílvia Stanisçuaski Guterres.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. desenvolvimento tecnológico de micro-/nanopartículas. 2. administração pulmonar . 3. 5-fluorouracil. 4. toxicidade. 5. farmacocinética. I. Stanisçuaski Guterres, Sílvia, orient. II. Título.

Porto Alegre, março de 2016.

*“Tenho a impressão de ser uma criança brincando a beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedra mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano de verdade continua misterioso a frente dos meus olhos.”*

**(Isaac Newton)**

*Aos meus pais, Olimpio e Eronice,  
pelo amor e apoio incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

*À Profa. Dra. Sílvia Guterres, expresso meu carinho e sincero agradecimento pela confiança a mim concedida quando me deste a honra de trabalhar sob sua orientação. Esta caminhada teve início quando tive o privilégio de tê-la como banca em minha dissertação de mestrado, onde pude expressar meu profundo desejo em realizar este doutorado. Hoje quero que saiba que sou muito grata por acreditar no meu potencial, pela paciência e compreensão nos momentos delicados que vivenciei durante este período, e pelo conhecimento e ensino que pude adquirir ao longo destes anos.*

*À Professoras Solange Cristina Garcia, Teresa Dalla Costa e Maria Palmira Gremião, agradeço a oportunidade para realização de pesquisas que engrandeceram este trabalho. Agradeço imensamente a atenção dispensada, a disposição e disponibilidade para troca de ideias e importantes sugestões.*

*À UFRGS, ao PPGNanoFarma, e à CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos, que tornaram possível a realização deste trabalho.*

*À Luiza Frank, Cecília Michalowski, Paula Chaves, Caroline Souto, João Victor Laureano, colegas e amigos, pela colaboração e parceria na realização de experimentos. Muito obrigada pelo auxílio, por dividirem comigo seus conhecimentos e, principalmente, pelo carinho que me enriquece e faz toda diferença ao final deste caminho. Agradeço também aos colegas de laboratório que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.*

*À minha família, que amo tanto e que faz de mim a pessoa que sou hoje. Meu pai, Olimpio, e minha Mãe, Eronice, à vocês agradeço por todo amor, carinho, e cuidado. Mesmo distante, vivenciaram este período comigo, apoiaram nos momentos de dificuldade, torceram e vibraram a cada conquista, por ouvirem incessantemente sobre meu trabalho. Bastava saber*

*que estavam do outro lado da linha, e que eu sempre poderia contar com seu amor incondicional. O orgulho que sentem por mim me deu forças para continuar apesar das dificuldades, por isso, à vocês dedico este trabalho. À minha irmã, Vivian Mara, e ao meu sobrinho, Giuseppe Enrico, agradeço o carinho, o amor, por entender minha ausência, e a preocupação por estar longe, sempre acreditando em mim.*

*À uma pessoa muito especial em minha vida, Luciano Antonio, meu amigo, meu companheiro, meu amor, que está sempre ao meu lado, apoiando e compreendendo-me incondicionalmente, tendo sempre uma palavra de carinho nos momentos mais difíceis e delicados deste período. O meu dia podia ser o mais difícil e tortuoso, mas eu sabia que ao final do dia ele estaria me esperando com um sorriso no rosto e uma abraço apertado, fazendo todo o resto se dissipar. Obrigada pelo amor, pela cumplicidade, pelas noites em claro me ajudando, por não se importar pelas noites mal dormidas por eu estar trabalhando com a luz ligada, pelas inúmeras conversas sobre meu trabalho na volta para casa, por entender muitas vezes minha ausência, e por sempre tentar fazer meu dia mais feliz com uma flor ou um matinho no fim da tarde, por tornar esta trajetória mais leve. Enfim, obrigada por fazer parte da minha*

## ÍNDICE

|  |      |
|--|------|
| <b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b>  | VIII |
| <b>RESUMO</b>  | XII  |
| <b>ABSTRACT</b>  | XIV  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | 16   |
| <b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>  | 33   |
| <b>3. RESULTADOS</b>   | 35   |
| 3.1 CAPÍTULO I: Desenvolvimento de sistemas de liberação de micro-/ e nanopartículas contendo 5FU para administração pulmonar                            | 36   |
| 3.1.1 Material Suplementar   | 76   |
| 3.2 CAPÍTULO II: Avaliação toxicológica <i>in vivo</i> de sistemas carreadores micro-/ nanoestruturados contendo 5FU.                                    | 78   |
| 3.2.1 Material Suplementar   | 107  |
| 3.3 CAPÍTULO III: Avaliação farmacocinética do 5FU associado a micro-/ e nanocarreadores para <i>delivery</i> pulmonar por microdiálise <i>in vivo</i> . | 114  |
| 3.3.1 Material Suplementar   | 130  |
| <b>4. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS</b>   | 136  |
| <b>5. CONCLUSÕES</b>   | 147  |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | 150  |



## ÍNDICE

|  |      |
|--|------|
| <b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b>  | VIII |
| <b>RESUMO</b>  | XII  |
| <b>ABSTRACT</b>  | XIV  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | 16   |
| <b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>  | 33   |
| <b>3. RESULTADOS</b>   | 35   |
| 3.1 CAPÍTULO I: Desenvolvimento de sistemas de liberação de micro-/ e nanopartículas contendo 5FU para administração pulmonar                            | 36   |
| 3.1.1 Material Suplementar   | 76   |
| 3.2 CAPÍTULO II: Avaliação toxicológica <i>in vivo</i> de sistemas carreadores micro-/ nanoestruturados contendo 5FU.                                    | 78   |
| 3.2.1 Material Suplementar   | 107  |
| 3.3 CAPÍTULO III: Avaliação farmacocinética do 5FU associado a micro-/ e nanocarreadores para <i>delivery</i> pulmonar por microdiálise <i>in vivo</i> . | 114  |
| 3.3.1 Material Suplementar   | 130  |
| <b>4. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS</b>   | 136  |
| <b>5. CONCLUSÕES</b>   | 147  |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | 150  |

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### INTRODUÇÃO

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Camadas da pele e melanócito.   | 18 |
| Figura 2. Estágios de desenvolvimento do melanoma.  | 20 |
| Figura 3. Estrutura química do 5FU (5-fluorouracil).  | 23 |
| Figura 4. Metabolismo intracelular enzimático do 5FU: (a) Anabolismo: formação dos metabólitos ativos FdUMP e FdUTP; (b) Catabolismo: formação do metabólito inativo 5-FUH <sub>2</sub> . | 24 |
| Figura 5. Sistema respiratório.   | 27 |
| Figura 6. Sulfato de Condroitina.   | 29 |

### CAPÍTULO I

|  |    |
|--|----|
| Table 1. Constituição das formulações  | 42 |
| Table 2. Parâmetros operacionais de secagem  | 42 |
| Table 3. Propriedades obtidas a partir das análises de caracterização físico-químicas  | 51 |
| Table 4. Propriedades aerodinâmicas determinadas em Impactador em Cascata de Andersen  | 54 |
| Table 5. Isotermas de adsorção de mucina por Langmuir e Freundlich   | 61 |
| Figure 1. Tamanhos de partícula obtidos pela técnica de difração de laser (análise por volume) para as formulações 5FU-NS e 5FU-MS e 5FU puro (n = 3).   | 50 |
| Figure 2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV): imagens obtidas para as formulações pulverulentas de (a) 5FU-NS e (b) 5FU-MS. As escalas de barra representam 2 µm (direita) e 1 µm (esquerda). | 52 |
| Figure 3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) obtida para o fármaco 5FU puro (a), sulfato de condroitina (b), e formulações pulverulentas 5FU-MS (c) e 5FU-NS (d).          | 53 |
| Figure 4. Desempenho de deposição de 5FU (%) em cada estágio do Impactador em Cascata de Andersen (ACI), para as formulações 5FU-NS e 5FU-MS, e para o fármaco 5FU puro (média ± DP; n=3).           | 55 |
| Figure 5. Perfil de liberação <i>in vitro</i> : formulações 5FU-NS e 5FU-MS, e fármaco 5FU puro (média ± DP; n = 3).   | 56 |

Figure 6. Desempenho mucoadesivo obtido para as formulações 5FU-MS, MS-AD e MS-AM, determinada pela Força (mN) de destacamento a partir da membrana de mucina em função da Distância percorrida (mm). A área sob a curva representa o trabalho de mucoadesão realizado ( $W_{MA}$  - miliJoule) (média  $\pm$  DP; n=3). 58

Figure 7. Concentração de mucina adsorvida (%) pela formulação 5FU-MS, e sistemas MS-AD e MS-AM, em função da concentração inicial de mucina ( $\mu\text{g/mL}$ ). Valores obtidos a partir da média  $\pm$  DP; n=2). 59

Figure 8. Perfis de lavabilidade obtidos a partir da concentração de 5FU (%) solubilizado em função do tempo (min), para a formulação 5FU-MS, sistema MS-AM, e fármaco 5FU puro, em fluxo de lavagem fixo em 0,2 mL/min (média  $\pm$  DP; n=3). 62

## CAPÍTULO II

Tabela 1. Perfil de Sobrevivência (%) e Desenvolvimento ( $\text{m}^2$ ) em *C. elegans*, sob tratamento agudo e crônico 92

Tabela 2. Propriedades aerodinâmicas do sistema 5FU-MS.5FU-NS determinadas por ACI 100

Figura 1. Perfil de sobrevivência obtido em *C. elegans* para as amostras Controle, fármaco 5FU puro, e formulações 5FU-MS e 5FU-NS (a) tratamento agudo e (b) tratamento crônico. Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$  comparado ao grupo 5FU puro. 89

Figura 2. **Estudo de Toxicidade Aguda em *C. elegans***. Perfil do desenvolvimento obtido para as amostras Controle, fármaco 5FU puro, e formulações 5FU-MS e 5FU-NS a) Medida de desenvolvimento ( $\mu^2$ ); b) Imagens obtidas por estereomicroscópio. Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$  comparado ao grupo 5FU puro; +  $p < 0,05$  comparado ao grupo 5FU-MS. 90

Figura 3. **Estudo de Toxicidade Crônica em *C. elegans***. Perfil de desenvolvimento obtido para as amostras Controle, fármaco 5FU puro, e formulações 5FU-MS e 5FU-NS: a) Medida de desenvolvimento ( $\mu^2$ ); b) Imagens obtidas por estereomicroscópio. Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$  comparado ao grupo 5FU puro. 91

|   |     |
|---|-----|
| Figura 4. Produção de EROs obtido em <i>C. elegans</i> após tratamento agudo para as amostras Controle, fármaco 5FU puro, e formulações 5FU-MS e 5FU-NS.  | 93  |
| Figura 5. Produção de EROs obtida em <i>C. elegans</i> após tratamento agudo com o sistema de micropartículas na ausência de fármaco (formulação branca – BR).  | 95  |
| Figura 6. Curva % sobrevivência $\times$ log-dose obtida para determinação da dose letal 50%: (a) fármaco 5FU puro, (b) 5FU-MS, (c) 5FU-NS.   | 97  |
| Figura 7. <b>DL50 em <i>C. elegans</i></b> . Perfil de desenvolvimento ( $\mu^2$ ): (a) Fármaco 5FU puro, (b) 5FU-MS, (c) 5FU-NS, e suas respectivas imagens obtidas por estereomicroscópio. Legenda: * $p < 0,05$ em relação ao controle; # $p < 0,05$ em relação à concentração $0,06 \text{ mg.mL}^{-1}$ . | 98  |
| Figura 8. Desempenho dos sistemas formados pelas formulações 5FU-MS e 5FU-NS em Impactador em Cascata de Andersen (ACI), simulando a deposição pulmonar <i>in vivo</i> (média $\pm$ DP; $n=3$ ).  | 101 |
| Figura 9. Análise histológica do tecido pulmonar, representando: a) controle negativo (AR); b) sistema 5FU-MS/NS; c) fármaco 5FU puro; e d) controle positivo (SDS).  | 105 |

### CAPÍTULO III

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos obtidos por microdiálise pulmonar   | 125 |
| Figura. 1. Recuperações relativas médias das sondas de microdiálise para o 5FU obtidas <i>in vitro</i> por diálise e retrodiálise para as concentrações de 250, 500 e 1000 ng/mL do fármaco, sob os fluxos de perfusão $1 \mu\text{L}/\text{min}$ , $1,5 \mu\text{L}/\text{min}$ e $2 \mu\text{L}/\text{min}$ ( $n = 3/\text{técnica}$ ). | 123 |
| Figura 2. Recuperações relativas das sondas de microdiálise para o 5FU, obtidas <i>in vitro</i> por diálise e retrodiálise para as concentrações 250, 500 e 1000 ng/mL de fármaco, sob fluxo de perfusão de $2 \mu\text{L}/\text{min}$ ( $n=3/$ concentração/ técnica).   | 124 |
| Figura. 3. Perfis de 5FU (ng/mL) <i>versus</i> tempo (min) no tecido pulmonar, obtido após administração de dose única de tratamento para o fármaco 5FU puro, e sistemas 5FU-MS e 5FU-NS. A área sob a curva (ASC) corresponde à biodisponibilidade do fármaco. Os dados estão representados como média $\pm$ DP ( $n=4$ ).               | 127 |

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Tabela 1. Parâmetros de caracterização físico-química das formulações 5FU-MS e 5FU-NS. 140

## RESUMO

A inexistência de um agente terapêutico único satisfatório para o tratamento do melanoma metastático e a potencialidade do quimioterápico 5FU (5-fluorouracil) motivou esta pesquisa, a qual teve por objetivo o desenvolvimento tecnológico de sistemas carreadores micro-/ e nanoestruturados contendo 5FU a fim de aumentar sua eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade por meio da administração pulmonar. Duas formulações pulverulentas foram desenvolvidas com polímeros naturais, sulfato de condroitina e hidroxipropil-metil-celulose, denominadas 5FU-MS e 5FU-NS, utilizando as técnicas de aspersão e atomização vibracional piezoelétrica, respectivamente. Ambas as formulações foram avaliadas quanto às características físicas e químicas, perfil toxicológico *in vivo* (*C. elegans* e em ratos Wistar), e penetração e biodisponibilidade no tecido pulmonar pela quantificação da fração livre de fármaco por microdiálise pulmonar. A análise físico-química revelou a obtenção de partículas micrométricas para 5FU-MS e submicrométricas para 5FU-NS, com diâmetros médios de partícula de  $2,546 \pm 0,07 \mu\text{m}$  e  $0,652 \pm 0,03 \mu\text{m}$ , e fração respirável (FR%) de  $55,12 \pm 2,98$  e  $76,84 \pm 0,07$ , respectivamente. Ambas demonstraram características e propriedades adequadas para administração pulmonar, com capacidade de deposição nas porções média e profunda. A toxicidade das formulações avaliada em *C. elegans* considerou o percentual de morte, desenvolvimento,  $DL_{50}$  e produção de ROS para os nematodos sob tratamento agudo e crônico. Os resultados evidenciaram redução significativa da toxicidade proporcionada pela redução da taxa de morte e maior desenvolvimento dos grupos tratados com as formulações 5FU-MS e 5FU-NS em comparação ao fármaco livre, sugerindo perfis de segurança satisfatórios para administração. Além disso, 5FU-MS revelou-se um agente pró-oxidante, representando um diferencial promissor deste sistema, podendo alcançar maior sensibilização das células tumorais com menores doses. A toxicidade pulmonar aguda foi avaliada pela análise de LDH e proteínas

totais no fluido de lavagem bronco-alveolar (BALF) após a administração combinada das formulações 5FU-MS e 5FU-NS para administração como um sistema terapêutico único (5FU-MS/NS), e análise de dano tecidual pulmonar em ratos. Os resultados da análise bioquímica e histológica indicaram o baixo potencial de indução de lesão tecidual a partir da administração pulmonar combinada das formulações, em relação ao fármaco livre. A análise do perfil farmacocinético por microdiálise pulmonar evidenciou o êxito no desenvolvimento dos sistemas carreadores, tornando possível duplicar o  $t_{1/2}$  do 5FU e aumentar significativamente a biodisponibilidade no tecido pulmonar. Os resultados obtidos indicam a eficiência das formulações 5FU-MS e 5FU-NS em alcançar os benefícios terapêuticos do fármaco 5FU com menores doses e maiores intervalos de administração. Este trabalho de tese apresenta uma abordagem promissora na terapia de neoplasias com recorrência de metástase pulmonar.

**Palavras-chave:** câncer, melanoma, 5-fluorouracil, micro-/nanopartículas, sulfato de condroitina, hidroxipropil-metil-celulose (HPMC F4M), mucoadesão, administração pulmonar.

## ABSTRACT

The absence of a single therapeutic agent suitable for the treatment of metastatic melanoma and the potential of 5FU chemotherapy (5-fluorouracil) motivated this study, which aimed the development of carrier systems based on micro-/ and nanostructures containing 5FU to increase the therapeutic efficacy and reduce toxicity of this drug by pulmonary administration. Two different formulations of dry powders were developed with natural polymers, chondroitin sulfate and hydroxypropyl-methyl-cellulose, denominated 5FU-MS and 5FU-NS, using the spray-drying and vibrational piezoelectric atomization techniques, respectively. Both formulations were evaluated in terms of physico-chemical characteristics, in vivo toxicological behaviors (*C. elegans* and in Wistar rats), bioavailability and penetration in the lung tissue by quantifying of drug free fraction by lung microdialysis. The physicochemical analysis showed that were obtained as micrometric (5FU-MS) and submicron particles (5FU-NS), with average diameters of particle  $2.546 \pm 0.07 \mu\text{m}$  and  $0.652 \pm 0.03 \mu\text{m}$ , and respirable fraction (FR%) of  $55.12 \pm 2.98$  and  $76.84 \pm 0.07$ , respectively. Both showed suitable characteristics and properties for pulmonary delivery, with deposition capacity in the middle and deep lung portions. The toxicity of the formulations evaluated in *C. elegans* considered the death rate, body development, DL50 and production of ROS to nematodes under acute and chronic treatment. The results showed significant reduction of toxicity, reducing the death rate and greater development of the groups treated with 5FU-MS and 5FU-NS formulations compared to the free drug, suggesting satisfactory safety profile for administration. In addition, 5FU-MS proved to be a pro-oxidant agent, representing a promising differential of this system which can achieve greater sensitization of tumoral cells with lower doses. Acute pulmonary toxicity was evaluated by analyzing LDH, and total protein in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) after combined administration of 5FU-MS formulations and 5FU-NS for administration as a single therapeutic system (5FU-MS/NS) and analysis of lung tissue damage in rats. The results of biochemical



and histological analysis indicated the low potential to induce tissue damage from the pulmonary administration of combined formulations, compared to free drug. Analysis of the pharmacokinetic profile for pulmonary microdialysis showed the successful development of carrier systems, making it possible to double the  $t_{1/2}$  of 5FU and significantly increase bioavailability in lung tissue. The results indicate the effectiveness of the formulations 5FU-MS and 5FU-NS in achieving the therapeutic benefits of the drug 5FU at lower doses and higher dosing intervals. This thesis work presents a promising approach to cancer therapy with lung metastasis recurrence.

**Keywords:** cancer, melanoma, 5-fluorouracil, micro-/nanoparticles, chondroitin sulfate, hydroxypropyl-methyl-cellulose (HPMC F4M), mucoadhesion.

## **RESULTADOS**

---

Os resultados desta tese estão apresentados em três capítulos, os quais estão organizados como manuscritos para posterior submissão em periódico científico, e desta forma, o texto integral que compreende às páginas 35 – 146, foi suprimido.

O conteúdo abordado refere-se ao desenvolvimento e caracterização de formulações farmacêuticas pulverulentas contendo o fármaco 5FU para administração pulmonar, avaliação da toxicidade e farmacocinética das mesmas.

## CONCLUSÃO

---

## 5. CONCLUSÕES

- Duas formulações de pós inaláveis foram desenvolvidas com sucesso associando o quimioterápico 5FU à polímeros naturais, biodegradáveis e biocompatíveis, resultando em sistemas carreadores micro-/ e nanoestruturados de liberação controlada, com características adequadas para efetiva liberação, deposição e bioadesão pulmonar.

- 5FU-MS, foi desenvolvida utilizando HPMC pela técnica de secagem de aspersão, resultando em partículas com um diâmetro micrométrico, promotora de liberação prolongada do fármaco e atraentes propriedades bioadesivas, sugerindo efetiva capacidade mucoadesiva à mucosa pulmonar.

- 5FU-NS, foi desenvolvida utilizando a técnica de atomização vibracional piezoelétrica, resultando em partículas de tamanho reduzido (submicrométricas) com elevada fração de partículas respiráveis, indicando a potencial capacidade de deposição nas regiões mais profundas do pulmão.

- Os estudo de toxicidade *in vivo*, em *C. elegans* e em ratos Wistar, indicam o avanço alcançado com a associação do 5FU aos sistemas carreadores desenvolvidos. Ambas as formulações, 5FU-MS e 5FU-NS, apresentaram perfis de segurança satisfatórios sobre tecidos saudáveis. Além disso, ficou evidente o potencial da combinação das formulações como um sistema terapêutico único, diminuindo significativamente a toxicidade causada pelo 5FU.

- A avaliação da penetração e distribuição tecidual pela quantificação da fração livre de 5FU utilizando a técnica da microdiálise pulmonar demonstrou que a associação do

5FU a ambos os sistemas, permitiu duplicar o tempo de meia-vida do fármaco, promovendo uma biodisponibilidade 8 vezes maior que o fármaco livre, sem ocasionar significativa toxicidade.

- Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho de tese sugerem o potencial inovador deste sistema, representando uma abordagem promissora na terapia de pacientes com MM, e também como agente adjuvante em outras neoplasias com recorrência de metástase pulmonar.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alpar, H.O., Somavarapu, S., Atuah, K.N., Bramwell, V.W., 2005. Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 411-430.
2. Al-Qadi, S., Grenha, A., Remuñán-López, C., 2011. Microspheres loaded with polysaccharide nanoparticles for pulmonary delivery: Preparation, structure and surface analysis. *Carb. Polymers* 86, 25– 34.
3. Arias, J.L., Gallardo, V., Ruiz, M.A., Delgado, A.V., 2008. Magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles as 5-Fluorouracil delivery systems for active targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 54-63.
4. Balch, C.M., Buzaid, A.C., Atkins, M.B., Cascinelli, N., Coit, D.G., Fleming, I.D., Houghton, A., Jr., Kirkwood, J.M., Mihm, M.F., Morton, D.L., Reintgen, D., Ross, M.I., Sober, A., Soong, S.J., Thompson, J.A., Thompson, J.F., Gershenwald, J.E., McMasters, K.M., 2000. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer* 88, 1484-1491.
5. Beber, T.C., Andrade, D.F., Kann, B., Fontana, M.C., Coradini, K., Windbergs, M., Beck, R.C., 2014. Submicron polymeric particles prepared by vibrational spray-drying: Semisolid formulation and skin penetration/permeation studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 88, 602-613.
6. Byrne, J.D., Betancourt, T., Brannon-Peppas, L., 2008. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1615-1626.
7. Caini, S., Boniol, M., Tosti, G., Magi, S., Medri, M., Stanganelli, I., Palli, D., Assedi, M., Marmol, V.D., Gandini, S., 2014. Vitamin D and melanoma and non-melanoma skin cancer risk and prognosis: a comprehensive review and meta-analysis. *Eur. J. Cancer* 50, 2649-2658.
8. Caini, S., Raimondi, S., Johansson, H., De, G., V, Zanna, I., Palli, D., Gandini, S., 2015. Telomere length and the risk of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer: a review of the literature and meta-analysis. *J. Dermatol. Sci.* 80, 168-174.
9. Chummun, S., McLean, N. r., 2014. The management of malignant skin cancers. *Wound Management*, 30, 485-490.
10. De Mariscal, P., Bell, D. A., 1996. Fiber-based fat mimetics: methylcellulose gums. In: *Hanbook of fat replacers*. S. Roller and S. A. Jones (eds). CRC Press, Boca Raton; pp. 145-159.
11. Di, P.A., Danesi, R., Falcone, A., Cionini, L., Vannozzi, F., Masi, G., Allegrini, G., Mini, E., Bocci, G., Conte, P.F., Del, T.M., 2001. Relationship between 5-fluorouracil disposition, toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in cancer patients. *Ann. Oncol.* 12, 1301-1306.

12. Diasio, R.B., Harris, B.E., 1989. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin. Pharmacokinet.* 16, 215-237.
13. Durli, T.L., Dimer, F.A., Fontana, M.C., Pohlmann, A.R., Beck, R.C., Guterres, S.S., 2014. Innovative approach to produce submicron drug particles by vibrational atomization spray drying: influence of the type of solvent and surfactant. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 40, 1011-1020.
14. Fontana, M. C., Durli, T. L., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., Beck, R. C. R., 2014. Polymeric controlled release inhalable powder produced by vibrational spray-drying: One-step preparation and in vitro lung deposition. *Powder Technol.* 258, 49–59.
15. Gagnadoux, F., Hureauux, J., Vecellio, L., Urban, T., Le, P.A., Valo, I., Montharu, J., Leblond, V., Boisdron-Celle, M., Lerondel, S., Majoral, C., Diot, P., Racineux, J.L., Lemarie, E., 2008. Aerosolized chemotherapy. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 21, 61-70.
16. Garbe, C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Spatz, A., Grob, J.J., Malvehy, J., Newton-Bishop, J., Stratigos, A., Pehamberger, H., Eggermont, A., 2010. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur. J. Cancer* 46, 270-283.
17. GLOBOCAN – ONCOGUIA. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estimativas-no-mundo/1706/1/>. Acessado em: 15/01/2016.
18. Goel, A., Baboota, S., Sahni, J.K., Ali, J., 2013. Exploring targeted pulmonary delivery for treatment of lung cancer. *Int. J. Pharm. Investig.* 3, 8-14.
19. Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., Marais, R., 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445, 851-857.
20. Groneberg, D.A., Witt, C., Wagner, U., Chung, K.F., Fischer, A., 2003. Fundamentals of pulmonary drug delivery. *Respir. Med.* 97, 382-387.
21. GROSS, P., HATCH, T., 1963. Pulmonary clearance: its mechanism and its relation to pulmonary disease. *J. Occup. Med.* 5, 191-194.
22. Gudasi, K.B., Vadavi, R.S., Shelke, N.B., Sairam, M., Aminahbavi, T. M., 2006. Synthesis and characterization of novel polyorganophosphazenes substituted with 4-methoxybenzylamine and 4-methoxyphenethylamine for in vitro release of indomethacin and 5-fluorouracil. *Reactive & Functional Polymers*, 66, 1149–1157.
23. Haggag, Y. A. & Faheem, A. M. 2015. Evaluation of nano spray drying as a method for drying and formulation of therapeutic peptides and proteins. *Frontiers in Pharmacology*, 6, Article 140.
24. Hagiwara, A., Takahashi, T., Sawai, K., Sakakura, C., Tsujimoto, H., Imanishi, T., Ohgaki, M., Yamazaki, J., Muranishi, S., Yamamoto, A., Fujita, T., 1996. Pharmacological effects of 5-fluorouracil microspheres on peritoneal carcinomatosis in animals. *Br. J. Cancer* 74, 1392-1396.



25. Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
26. Hansch, C., Leo, A., Hoekman, D. 1995. Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. Washington, DC: American Chemical Society, p. 7.
27. Heyder, J., 2004. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 315-320.
28. Huang, L., Sui, W., Wang, Y., Jiao, Q., 2010. Preparation of chitosan/chondroitin sulfate complex microcapsules and application in controlled release of 5-fluorouracil. *Carbohydr. Polym.* 80, 168-173
29. Hunt, P.R., Olejnik, N., Sprando, R.L., 2012. Toxicity ranking of heavy metals with screening method using adult *Caenorhabditis elegans* and propidium iodide replicates toxicity ranking in rat. *Food Chem. Toxicol.* 50, 3280-3290.
30. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma). Acessado em: 15/01/2016.
31. Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Lowe, S.W., 2002. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108, 153-164.
32. Jyothi, N.V., Prasanna, P.M., Sakarkar, S.N., Prabha, K.S., Ramaiah, P.S., Srawan, G.Y., 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J. Microencapsul.* 27, 187-197.
33. Kaiser, N., Kimpfler, A., Massing, U., Burger, A.M., Fiebig, H.H., Brandl, M., Schubert, R., 2003. 5-Fluorouracil in vesicular phospholipid gels for anticancer treatment: entrapment and release properties. *Int. J. Pharm.* 256, 123-131.
34. Kaletta, T., Hengartner, M.O., 2006. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 387-398.
35. Karve, S., Werner, M.E., Sukumar, R., Cummings, N.D., Copp, J.A., Wang, E.C., Li, C., Sethi, M., Chen, R.C., Pacold, M.E., Wang, A.Z., 2012. Revival of the abandoned therapeutic wortmannin by nanoparticle drug delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 109, 8230-8235.
36. Katzung, B. G., Trevor, A. J., 2013. *Farmacologia básica e clínica* (12ed). Ed. AMGH, 1205 p.
37. Lamprecht, A., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Kawashima, Y., 2003. Microsphere design for the colonic delivery of 5-fluorouracil. *J. Control Release* 90, 313-322.
38. Lee, E.S., Park, K.H., Kang, D., Park, I.S., Min, H.Y., Lee, D.H., Kim, S., Kim, J.H., Na, K., 2007. Protein complexed with chondroitin sulfate in poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Biomaterials* 28, 2754-2762.

39. Lee, J.H., Choi, J.W., Kim, Y.S., 2011. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br. J. Dermatol.* 164, 776-784.
40. Leung, M.C., Williams, P.L., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K.J., Aschner, M., Meyer, J.N., 2008. *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol. Sci.* 106, 5-28.
41. Liu, W., Li, X., Wong, Y.S., Zheng, W., Zhang, Y., Cao, W., Chen, T., 2012. Selenium nanoparticles as a carrier of 5-fluorouracil to achieve anticancer synergism. *ACS Nano.* 6, 6578-6591.
42. Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G., 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 330-338.
43. Lu, F., Lei, L., Shen, Y.Y., Hou, J.W., Chen, W.L., Li, Y.G., Guo, S.R., 2011. Effects of amphiphilic PCL-PEG-PCL copolymer addition on 5-fluorouracil release from biodegradable PCL films for stent application. *Int. J. Pharm.* 419, 77-84.
44. Malet-Martino, M., Martino, R., 2002. Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (capecitabine, UFT, S-1): a review. *Oncologist.* 7, 288-323.
45. Masood, F., Chen, P., Yasin, T., Fatima, N., Hasan, F., Hameed, A., 2013. Encapsulation of Ellipticine in poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) based nanoparticles and its in vitro application. *Mater. Sci. Eng C. Mater. Biol. Appl.* 33, 1054-1060.
46. Masood, F., 2016. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Mater. Sci. Eng C. Mater. Biol. Appl.* 60, 569-578.
47. Meenach, S.A., Anderson, K.W., Zach, H.J., McGarry, R.C., Mansour, H.M., 2013. Characterization and aerosol dispersion performance of advanced spray-dried chemotherapeutic PEGylated phospholipid particles for dry powder inhalation delivery in lung cancer. *Eur. J. Pharm. Sci.* 49, 699-711.
48. Moser, C.V., Meissner, M., Laarmann, K., Olbrich, K., King-Himmelreich, T.S., Wolters, M.C., Geisslinger, G., Niederberger, E., 2016. The protein kinase IKKepsilon contributes to tumour growth and tumour pain in a melanoma model. *Biochem. Pharmacol.*
49. Mouawad, R., Sebert, M., Michels, J., Bloch, J., Spano, J.P., Khayat, D., 2010. Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 74, 27-39.
50. Müller, C. R., Bassani, V. L., Pohlmann, A. R., Michalowski, Petrovick, P. R., Guterres, S. S. 2000. Preparation and Characterization of Spray-Dried Polymeric Nanocapsules. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26, 3, 343-347.
51. Oliveira, A. M., Guimarães, K. L., Cerize, N. N. P., Tunussi, A. S., Poço, J. G. R. 2013. Nano Spray Drying as an Innovative Technology for Encapsulating Hydrophilic Active Pharmaceutical Ingredients (API). *J. Nanomed. Nanotechnol.* 4, 6.

52. Olsson, B., Bondesson, E., Borgström, L., Edsbäcker, S., Eirefelt, S., Ekelund, K., Gustavsson, L., Hegelund-Myrbäck, T., 2011. Chapter 2: Pulmonary Drug Metabolism, Clearance, and Absorption. H.D.C. Smyth and A.J. Hickey (eds.), *Controlled Pulmonary Drug Delivery*, 21 *Advances in Delivery Science and Technology*, DOI 10.1007/978-1-4419-9745-6\_2, © Controlled Release Society 2011.
53. Organização Mundial da Saúde (OMS). Disponível em: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>. Acessado em: 17/01/2016.
54. Otterson, G.A., Villalona-Calero, M.A., Sharma, S., Kris, M.G., Imondi, A., Gerber, M., White, D.A., Ratain, M.J., Schiller, J.H., Sandler, A., Kraut, M., Mani, S., Murren, J.R., 2007. Phase I study of inhaled Doxorubicin for patients with metastatic tumors to the lungs. *Clin. Cancer Res.* 13, 1246-1252.
55. Peters, G.J., Lankelma, J., Kok, R.M., Noordhuis, P., van Groeningen, C.J., van der Wilt, C.L., Meyer, S., Pinedo, H.M., 1993. Prolonged retention of high concentrations of 5-fluorouracil in human and murine tumors as compared with plasma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 31, 269-276.
56. Pilcer, G., Amighi, K., 2010. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm.* 392, 1-19.
57. PubChem (Chemistry Database). National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Fluorouracil#section=Top>. Acessado em: 15/04/2016.
58. Ravi Kumar, M.N., 2000. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 3, 234-258.
59. Rejinold, N.S., Muthunarayanan, M., Chennazhi, K.P., Nair, S.V., Jayakumar, R., 2011. 5-fluorouracil loaded fibrinogen nanoparticles for cancer drug delivery applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 48, 98-105.
60. Rudek, M. A., Chau, C. H., Figg, W., McLeod, W. L., 2014. *Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. Springer Science & Business Media, 836 páginas.
61. Schmid, K., Arpagaus, C., Friess, W., 2011. Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for pharmaceutical applications. *Pharm. Dev. Technol.* 16, 287-294.
62. Senft, D., Berking, C., Graf, S.A., Kammerbauer, C., Ruzicka, T., Besch, R., 2012. Selective induction of cell death in melanoma cell lines through targeting of Mcl-1 and A1. *PLoS. One.* 7, e30821.
63. Shah, N. D., Shah, V. V., Chivate, N. D., 2012. Pulmonary Drug Delivery: A Promising Approach. *J. of Appl. Pharm. Science*, 02, 33-37.
64. Shenoy, V. S., Gude, R. P., Murthy, R. S. R., 2013. In vitro evaluation of 5-fluorouracil lipid nanoparticles using B16F10 melanoma cell lines. *Int. Nano Lett.* 36, 3-9.

65. Singh, B. N., Singh, R. B., Singh, J. 2005. Effects of ionization and penetration enhancers on the transdermal delivery of 5-fluorouracil through excised human stratum corneum. *Int. J. Pharm.* 298, 98-107.
66. Simoes, M.C., Sousa, J.J., Pais, A.A., 2015. Skin cancer and new treatment perspectives: a review. *Cancer Lett.* 357, 8-42.
67. Slominski, A., Tobin, D.J., Shibahara, S., Wortsman, J., 2004. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev.* 84, 1155-1228.
68. Soengas, M.S., Lowe, S.W., 2003. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22, 3138-3151.
69. Spencer, D.S., Puranik, A.S., Peppas, N.A., 2015. Intelligent Nanoparticles for Advanced Drug Delivery in Cancer Treatment. *Curr. Opin. Chem. Eng* 7, 84-92.
70. Sun, T., Zhang, Y.S., Pang, B., Hyun, D.C., Yang, M., Xia, Y., 2014. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 53, 12320-12364.
71. Swick, J.M., Maize, J.C., Sr., 2012. Molecular biology of melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 67, 1049-1054.
72. Tanaka, F., Fukuse, T., Wada, H., Fukushima, M., 2000. The history, mechanism and clinical use of oral 5-fluorouracil derivative chemotherapeutic agents. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 1, 137-164.
73. Thomas, A.M., Kapanen, A.I., Hare, J.I., Ramsay, E., Edwards, K., Karlsson, G., Bally, M.B., 2011. Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-fluorouracil for parenteral administration: formulation design, pharmacokinetics and efficacy. *J. Control Release* 150, 212-219.
74. Uchida, S., Itaka, K., Chen, Q., Osada, K., Miyata, K., Ishii, T., Harada-Shiba, M., Kataoka, K., 2011. Combination of chondroitin sulfate and polyplex micelles from Poly(ethylene glycol)-poly{N'-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide} block copolymer for prolonged in vivo gene transfection with reduced toxicity. *J. Control Release* 155, 296-302.
75. Visser, G.W., Gorree, G.C., Peters, G.J., Herscheid, J.D., 1990. Tissue distribution of [<sup>18</sup>F]-5-fluorouracil in mice: effects of route of administration, strain, tumour and dose. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 26, 205-209.
76. Volpi, N., Maccari, F., 2006. Electrophoretic approaches to the analysis of complex polysaccharides, *J. of Chromatography B*, 834, 1-13.
77. Wang, X., Lin, J., Zhang, X., Liu, Q., Xu, Q., Tan, R.X., Guo, Z., 2003. 5-Fluorouracil-cisplatin adducts with potential antitumor activity. *J. Inorg. Biochem.* 94, 186-192.
78. Wigmore, P.M., Mustafa, S., El-Beltagy, M., Lyons, L., Umka, J., Bennett, G., 2010. Effects of 5-FU. *Adv. Exp. Med. Biol.* 678, 157-164.

79. Wolff K, Johnson RA, Suurmond D. United States: The McGraw-Hill Companies; 2009. Melanoma precursors and primary cutaneous melanoma Fitzpatrick's color atlas and synopsis of clinical dermatology. Part I: Disorders presenting in the skin and mucous membranes-section 12; pp. 300–28.
80. Yang, S., Haluska, F.G., 2004. Treatment of melanoma with 5-fluorouracil or dacarbazine in vitro sensitizes cells to antigen-specific CTL lysis through perforin/granzyme- and Fas-mediated pathways. *J. Immunol.* 172, 4599-4608.
81. Zhang, J.S., Imai, T., Suenaga, A., Otagiri, M., 2002. Molecular-weight-dependent pharmacokinetics and cytotoxic properties of cisplatin complexes prepared with chondroitin sulfate A and C. *Int. J. Pharm.* 240, 23-31.
82. Zhang, Y., Li, J., Lang, M., Tang, X., Li, L., Shen, X., 2011. Folate-functionalized nanoparticles for controlled 5-Fluorouracil delivery. *J. Colloid Interface Sci.* 354, 202-209.
83. Zou, X.H., Jiang, Y.Z., Zhang, G.R., Jin, H.M., Nguyen, T.M., Ouyang, H.W., 2009. Specific interactions between human fibroblasts and particular chondroitin sulfate molecules for wound healing. *Acta Biomater.* 5, 1588-1595.