



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

LÍVIA PALMERSTON MENDES

**SISTEMAS NANOESTRUTURADOS MULTICOMPARTIMENTAIS PARA CO-
ENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO CONTROLADA DE PACLITAXEL E
GENISTEÍNA: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*.**

Goiânia

2012

LÍVIA PALMERSTON MENDES

**SISTEMAS NANOESTRUTURADOS MULTICOMPARTIMENTAIS PARA CO-
ENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO CONTROLADA DE PACLITAXEL E GENISTEÍNA:
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL *IN VIVO*.**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal de
Goiás como requisito parcial para obtenção
do título Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Martins Lima

Goiânia

2012

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	09
2.1 CÂNCER	09
2.2 TRATAMENTO	11
2.3 NANOTECNOLOGIA NA TERAPIA ANTI-NEOPLÁSICA	12
2.4 PACLITAXEL	13
2.5 GENISTEÍNA	14
2.6 TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH: TAE.....	16
3 OBJETIVOS.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO PACLITAXEL E DA GENISTEÍNA	18
4.2 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS.....	18
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	20
4.3.1 Distribuição de tamanho, índice de polidispersão, pH e eficiência de encapsulação ...	20
4.3.2 Análise de nanopartículas por rastreamento (<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>)	21
4.3.3 Espalhamento múltiplo da luz (<i>Multiple Light Scattering</i>)	22
4.3.4 Perfil de liberação in vitro	22
4.4 ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	23
4.4.1 Animais	23
4.4.2 Modelo experimental	23
4.4.3 Inibição tumoral	24
4.4.4 Determinação dos níveis de VEGF no fluido ascítico	24
4.4.5 Avaliação macroscópica do efeito ant-angiogênico	25
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5 RESULTADOS	26
6 CONCLUSÕES.....	52
7 REFERÊNCIAS	53

FIGURAS

Figura 1:	Figuras representativas de sistemas nanoestruturados: nanocápsula e lipossoma.....	13
Figura 2:	Preparo das nanocápsulas através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado, seguido do revestimento das mesmas por bicamada lipídica através do processo de hidratação do filme lipídico.....	20

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

BS	Backscattering
CCT	Triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
EE	Eficiência de encapsulação
FDA	Food and Drug Administration
GEN	Genisteína
i.p.	Intra peritoneal
LSS	Lauril sulfato de sódio
NC-PC	Nanocápsulas recobertas por bicamada lipídica
NP	Nanopartículas
NTA	Nanoparticle tracking analysis
PBS	Tampão fosfato salina
PdI	Índice de polidispersão
PEG	Polietilenoglicol
PLGA	Poli(ácido-láctico-co-glicólico)
PTX	Paclitaxel
PVDF	Polivinilideno difluorido
T	Transmissão
TAE	Tumor ascítico de Ehrlich
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

RESUMO

Sistemas poliméricos e lipídicos nanoestruturados são capazes de melhorar o índice terapêutico dos fármacos encapsulados, principalmente quando se trata de fármacos antitumorais. Neste trabalho a co-encapsulação do paclitaxel (PTX) e da genisteína (GEN) foi obtida através do desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas (NC) recobertas por bicamada lipídica para a liberação controlada desses fármacos. NC contendo PTX encapsulado foram obtidas através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado. Em seguida, as NC foram recobertas por bicamada lipídica contendo GEN e suas propriedades físico-químicas foram caracterizadas. As NC recobertas mostraram eficiência de encapsulação de aproximadamente 98% para ambos os fármacos, apresentando-se na faixa de 150 nm, com distribuição monomodal. Análise das NC recobertas por *multiple light scattering* a 25 °C por 24 horas apresentou aumento de apenas 2% no perfil de *backscattering* tanto no topo quanto no fundo da amostra, indicando sutil sedimentação e cremagem, ambos fenômenos reversíveis. A cinética de liberação *in vitro* mostrou que a GEN foi completamente liberada nas primeiras 48 horas, enquanto que nesse mesmo período, menos de 10% do PTX foi liberado, atingindo 70% de liberação após 60 dias de análise. Esses resultados demonstram a obtenção de um dispositivo biodegradável para liberação controlada de GEN e PTX em diferentes estágios. Nos ensaios de atividade antitumoral *in vivo* em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich, foi avaliada a administração intra-tumoral da formulação desenvolvida com 3 concentrações diferentes de PTX na presença ou ausência de GEN. A inibição de mais de 90% do tumor comparada a um grupo controle foi alcançada com uma dose de PTX cerca de 5 vezes menor que a dose equivalente utilizada na quimioterapia convencional com PTX. Quando uma baixa dose de PTX (0,2 mg/kg/dia) foi usado para o tratamento, foi obtida uma inibição tumoral de 11%, mas, quando associada a uma dose de 12 mg/kg/dia de GEN, houve 44% de inibição do tumor e uma diminuição de cerca de 58% nos níveis do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) em comparação com animais tratados com nanopartículas sem fármaco. O efeito antiangiogênico da GEN foi evidente quando associada ao PTX, inibindo a formação de nova rede vascular formada por vasos tortuosos e congestos na região peritoneal quando em comparação com grupos tratados apenas com PTX. A co-encapsulação de GEN e PTX em um nanosistema multicompartimental de liberação controlada promoveu efeito combinado da atividade antiangiogênica aliada à atividade antitumoral, mostrando-se uma formulação com grande potencial para tratamento antineoplásico.

Palavras-chave: Paclitaxel, Genisteína, Nanopartículas, Angiogênese, Liberação controlada, Co-encapsulação, Atividade antitumoral *In vivo*

ABSTRACT

Nanostructured polymeric and lipid systems are capable of improving therapeutic index of encapsulated drugs, especially when it comes to antitumor drugs. In this work, co-encapsulation of paclitaxel (PTX) and genistein (GEN) was obtained by developing a multilayered nanocarrier for controlled release of drugs. Nanocapsules (NC) encapsulating PTX were obtained by interfacial deposition of preformed polymer method. They were further coated with a phospholipid bilayer entrapping GEN and their physical-chemical properties were characterized. Coated nanoparticles presented an entrapment efficiency of about 98% for both drugs. Particles were in the range of 150 nm and showed a monomodal distribution. Multiple light scattering analyses presented an increase of only 2% of the backscattering profile both in the top and in the bottom of the sample, indicating a slight sedimentation and creaming behaviors, both reversible phenomena. *In vitro* drug release showed that GEN was completely released within 48 hours, whereas in that same period, less than 10% of PTX was released and reached almost 70% after 60 days of analysis. The results suggest that we have developed a biodegradable device for a sustained release of GEN and PTX in different stages. *In vivo* antitumor activity assays with Ehrlich ascites tumor (EAT) bearing mice evaluated intra-tumoral administration of the developed formulation in three different concentrations of PTX in the presence or absence of GEN. Results presented more than 90% tumor inhibition in EAT-bearing mice compared to the control group when a dose of nanostructured PTX about 5 times lower than the equivalent dose used in conventional chemotherapy was used. When a low dose of PTX (0.2 mg/kg/day) was used in the treatment, 11% tumor inhibition was achieved, but when associated with a dose of 12 mg/kg/day of GEN, there was 44% tumor inhibition and a decrease of about 58% in VEGF levels compared to animals treated with blank nanoparticles. The antiangiogenic effect of GEN was evident when associated with PTX, inhibiting formation of new vascular network formed by tortuous and congested vessels in peritoneal region of mice when compared with groups treated only with PTX. Co-encapsulation of GEN and PTX in a controlled-release multicompartimental nanosystem promoted additive effect of antiangiogenic activity associated with antitumor effect, intending to be a formulation with high potential for anticancer treatment.

Keywords: Paclitaxel, Genistein, Nanoparticles, Angiogenesis, Controlled release, Co-encapsulation, *In vivo* antitumor activity.

1 INTRODUÇÃO

Mais de 12 milhões de novos casos de câncer e 7 milhões de mortes em decorrência dessa doença ocorreram no mundo no ano de 2008 (GLOBOCAN, 2012). O tratamento do câncer pode ser cirúrgico, radioterápico ou quimioterápico, sendo que geralmente são associadas ao menos dois tipos de terapia para obtenção de melhores resultados. Além disso, a associação de diferentes agentes quimioterápicos com diferentes mecanismos de ação com objetivo de melhora no efeito terapêutico e diminuição dos efeitos adversos é uma das estratégias adotadas com sucesso (INCA, 2012).

Dentre os agentes antitumorais, o paclitaxel (PTX) é comumente utilizado no tratamento de tumores sólidos devido a seu potencial citotóxico (FENG et al., 2007). Sua forma comercialmente disponível é uma dispersão micelar denominada Taxol®. Entretanto, a toxicidade do Cremofor EL®, adjuvante utilizado para sua administração, associada à necessidade de altas doses de PTX para uma boa eficácia terapêutica limita a continuidade do tratamento (GELDERBLOM et al., 2001). O desenvolvimento de nanocarreadores encapsulando fármacos antineoplásicos é uma estratégia para contornar os problemas inerentes às formulações atuais (AL-GHANANEEM et al., 2009; DANHIER et al., 2009; DUGGAN; KEATING, 2011).

Sistemas poliméricos e lipídicos nanoestruturados podem aprimorar a atividade biológica das moléculas, principalmente por modular sua farmacocinética e, como resultado, podem apresentar inúmeras vantagens como redução da toxicidade e promoção de liberação controlada dos fármacos. Dependendo do material utilizado para formação das partículas, diferentes características podem ser obtidas, controlando a liberação dos fármacos e mantendo a concentração plasmática em níveis terapêuticos durante longos períodos de tempo (GUO et al., 2010; WANG et al., 2011). Outra vantagem desses nanossistemas é a vetorização passiva pela capacidade de adentrar e acumular nos tecidos tumorais através do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR – enhanced permeability and retention) (DONG; MUMPER, 2010). Esse efeito está relacionado às anormalidades da neovasculatura tumoral,

que apresenta células endoteliais fenestradas, conferindo maior permeabilidade dos vasos a macromoléculas e nanopartículas (MAEDA, 2001).

A associação de fármacos com diferentes mecanismos de ação é uma estratégia para melhora do tratamento do tumor. Aliada à nanotecnologia, resultados promissores podem ser obtidos (AHMED et al., 2006). Recente estudo demonstrou que a combinação de um antiangiogênico (combrestatin A4) com o paclitaxel apresentou liberação temporal dos dois fármacos, promovendo um efeito antiangiogênicos agregado à inibição da proliferação celular (WANG; HO, 2010a; b).

A genisteína, uma isoflavona da soja, tem demonstrado ser um potencial agente antineoplásico. Seus efeitos antiangiogênicos e antitumorais vem sendo elucidados e envolvem, dentre outros mecanismos, a inibição de moléculas promotoras da angiogênese, como fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (SU et al., 2005; BANERJEE et al., 2008; YU et al., 2012).

Neste trabalho, o desenvolvimento de nanopartículas capazes de co-encapsular paclitaxel e genisteína em distintas regiões da nanoestrutura e com perfis de liberação diferentes pretende promover o efeito combinado destes fármacos de ampliação da atividade antitumoral.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

O tratamento do câncer é hoje um dos maiores desafios para a pesquisa no mundo. Entre homens e mulheres, mais de 12 milhões de novos casos de câncer e 7 milhões de mortes em decorrência dessa doença ocorreram no mundo no ano de 2008, sendo que os tipos mais frequentes foram de pulmão, mama, cólon e reto, estômago e próstata (GLOBOCAN, 2012). Estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2012b) evidenciam que, no ano de 2012, o câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero, levando a mais de 500 mil novos casos.

A multiplicação rápida e desordenada de células é uma das principais características do câncer. Essa multiplicação ocorre porque as células não

respondem de maneira convencional aos mecanismos homeostáticos. Ocorrem alterações do funcionamento de genes controladores do ciclo celular, em decorrência de mutações, que podem determinar a formação de tumores malignos. As células neoplásicas apresentam algumas diferenças em relação às células normais, como a inabilidade de sofrer diferenciação; proliferação celular descontrolada; morte celular por apoptose; poder de invasão e capacidade de originar metástases. A proliferação celular descontrolada ocorre devido a alterações nos fatores de crescimento e/ou nos receptores, nas vias de sinalizações intracelulares, principalmente as que controlam o ciclo celular, na expressão da telomerase e na angiogênese relacionada com o tumor (RANG et al., 2003).

As células tumorais necessitam de suprimento de oxigênio e nutrientes para que possam manter seu metabolismo e crescer. Torna-se necessário, portanto, que o tumor se desenvolva próximo a redes vasculares que fornecerão os devidos suprimentos para o seu pleno desenvolvimento (PAPETTI; HERMAN, 2002). A angiogênese é um dos eventos que ocorrem no processo de neovascularização induzida pelo tumor. Neste processo as células tumorais entram em hipóxia e começam a secretar fatores que induzem a formação de novos vasos para alimentar o tumor. Tais fatores são moléculas sinalizadoras que estimulam a migração de células endoteliais vasculares de vasos próximos ao tumor e, conseqüentemente, estimulam a formação de novos capilares essenciais para o crescimento e disseminação tumoral (NUSSENBAUM; HERMAN, 2010). Diversos eventos estão envolvidos na formação de novos vasos, dentre eles o estímulo de citocinas como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). O VEGF é encontrado em níveis elevados nos tecidos tumorais e sua inibição está associada com a diminuição da densidade vascular tumoral e redução do crescimento do tumor (HICKLIN; ELLIS, 2005; KERBEL, 2008; YU et al., 2012).

Essa nova vasculatura formada ao redor do tumor possui características anormais e específicas, sendo os vasos altamente desorganizados, tortuosos e dilatados, com várias ramificações. As junções endoteliais possuem aberturas e uma membrana basal descontínua ou ausente, proporcionando alta permeabilidade (CARMELIETE, 2000). A permeabilidade vascular é importante para a biologia do tumor e também para facilitar a entrada de proteínas e

macromoléculas, além de nanopartículas carreadoras de fármacos. Torna-se uma forma de vetorização passiva, uma vez que esses nanocarreadores irão permear pelo tecido endotelial fenestrado da vasculatura tumoral e acumular no tumor, mas são incapazes de adentrar passivamente tecidos normais, diferentemente do que ocorre com a molécula livre (MAEDA, 2001; RANGANATHAN, 2012).

2.2 TARATAMENTO

O tratamento do câncer pode ser cirúrgico, radioterápico ou quimioterápico, sendo que, geralmente, ocorre a combinação de mais de um tipo desses tratamentos, dependendo da neoplasia e do estágio em que se encontra (INCA, 2012a). A terapia antineoplásica envolve a administração de medicamentos com comprovada eficácia terapêutica e diferentes mecanismos de ação, que vão depender das características específicas da neoplasia tratada (SILVA, 2010).

Uma estratégia utilizada para se obter melhores resultados na terapia antitumoral é a associação de diferentes fármacos com a intenção de potencializar o tratamento, atingindo a neoplasia através de diferentes mecanismos, evitando assim que o tumor torne-se resistente ao medicamento usado em monoterapia (DEMIRAY et al., 2005; CASNEUF et al., 2009; XU et al., 2011). Dentre as terapias de combinação de fármacos atuais podemos ressaltar a associação de diversos fármacos citotóxicos com inibidores de fatores angiogênicos como o bevacizumab. Estudos indicam um aumento no efeito antineoplásico devido à associação dos fármacos, sem adição de efeitos colaterais (MILLER et al., 2007; CELLA et al., 2011). A associação com fármacos que atuam na angiogênese tumoral é também uma estratégia diferenciada, visto que esses não atuam diretamente na eliminação do tumor, mas ao inibir o crescimento de uma rede vascular próxima ao tumor, evitando assim a obtenção dos nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento por parte do tumor (SHEELA et al., 2006; EL-AZAB et al., 2011; BAMIAS et al., 2012). Entretanto, torna-se necessária a combinação de um antiangiogênico com um fármaco citotóxico, uma vez que a monoterapia antiangiogênica pode induzir hipóxia tumoral, levando à expressão de genes que irão reduzir de forma significativa o efeito pró-apoptótico da quimioterapia, levando à resistência tumoral (BLAGOSKLONNY, 2004).

A maioria dos agentes antineoplásicos, entretanto, provoca inúmeras reações adversas e efeitos colaterais como neutropenia, leucopenia, trombocitopenia, vômitos, perda de apetite, neurotoxicidade, imunossupressão, dentre outros (SILVA, 2010).

2.3 NANOTECNOLOGIA NA TERAPIA ANTINEOPLÁSICA

A nanotecnologia é um campo que pode abranger inúmeras áreas de estudo e que, geralmente, envolve uma interdisciplinaridade entre essas áreas. Voltada para foco farmacêutico, a nanotecnologia é aplicada principalmente no desenvolvimento de sistemas lipídicos e poliméricos nanoestruturados para carrear e/ou vetorizar novos fármacos e aqueles já usados convencionalmente na medicina (KOLISHETTI et al., 2010; BANDEKAR et al., 2012). É uma estratégia que pode conferir a esses fármacos a propriedade de controlar suas características fundamentais sem alterar sua composição química, possibilitando melhorias nas formulações (YAMAMOTO et al., 2011). Essa tecnologia é capaz de transpor obstáculos como o aumento da solubilidade de fármacos em veículos adequados para administração e de promover vantagens que envolvem a liberação controlada de fármacos em sítios de ação específicos a uma faixa terapêutica e posologia ótimas, o que leva à diminuição de efeitos colaterais e otimização do tratamento (SAHOO et al., 2008; LIU et al., 2010).

Diversos tipos de sistemas nanoestruturados têm sido desenvolvidos e caracterizados como lipossomas (YANG et al., 2007; DINIZ et al., 2008), nanocápsulas e nanoesferas poliméricas (STELLA et al., 2007; MORA-HUERTAS et al., 2010), nanopartículas lipídicas sólidas (KANG et al., 2010), micelas poliméricas (CAI et al., 2007), dentre outras. Eles podem ser compostos por lipídeos, polímeros ou ambos (Fig. 1), sendo que as características de cada sistema dependem necessariamente dos componentes que os formam, dos métodos de preparo e da partícula desenvolvida (FRÉZARD et al., 2005; SALVADOR-MORALES et al., 2009; MORA-HUERTAS et al., 2010). Esses sistemas vêm sendo desenvolvidos com êxito para o tratamento de um vasto número de neoplasias (WANG, C. et al., 2011; YAMAMOTO et al., 2011; BANDEKAR et al., 2012).

Nanosistemas co-encapsulando anti-neoplásicos de diferentes classes terapêuticas vem sendo estudados a fim de complementar ainda mais a abordagem da associação de fármacos para tratamento dos tumores. Esses sistemas poderão melhorar a farmacocinética de ambos, levando a uma sincronia das mesmas, promover direcionamento específico e liberação controlada, gerando melhora na terapia (AHMED et al., 2006; WANG, H. et al., 2011).

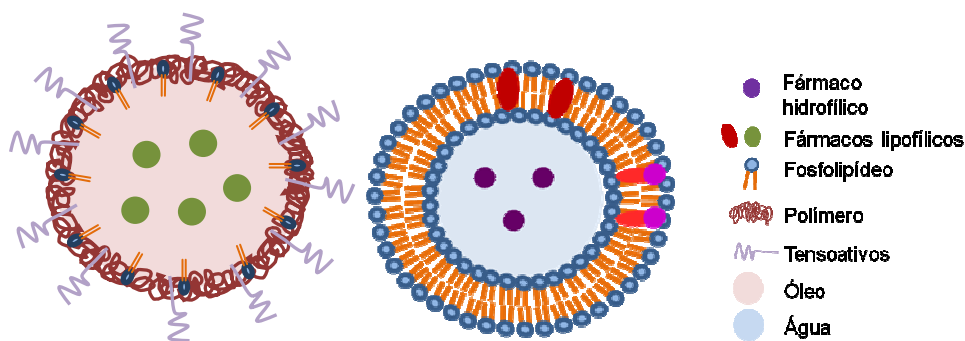


Fig 1. Representação esquemática de sistemas nanoestruturados: nanocápsula e lipossoma.

Como exemplo de nanosistema já aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) e amplamente utilizado para o tratamento de câncer de mama e ovário podemos citar o Doxil®. Trata-se de uma formulação contendo lipossomas de doxorubicina recobertos por uma camada de polietilenoglicol (PEG), que permite que eles permaneçam por mais tempo na circulação, alterando a farmacocinética do fármaco encapsulado. Quando comparada a formulação convencional de doxorubicina, o Doxil® apresenta diferente distribuição no organismo, elevada eficácia antitumoral mesmo quando usado em monoterapia, proporcionando menores efeitos tóxicos e mais segurança no tratamento (RANSON et al., 2001; DUGGAN; KEATING, 2011).

2.4 PACLITAXEL

Outro fármaco bastante estudado no âmbito da nanotecnologia é o paclitaxel, utilizado no tratamento de diversos tumores sólidos como carcinomas de mama, ovário, pulmão e bexiga (SINGLA et al., 2002; AL-GHANANEEM et al., 2009). O PTX é um quimioterápico ciclo-celular específico que age na fase mitótica (M) desse ciclo. Seu mecanismo de ação envolve a inibição do crescimento celular por estabilização de microtúbulos formados através da ligação

não covalente com tubulinas, impedindo a despolarização necessária à replicação celular, bloqueando assim o processo de divisão celular (HUIZING et al., 1995). Como a solubilidade do paclitaxel em água é baixa, cerca de 0,3 µg/mL (LEE et al., 2007), a formulação convencional do mercado é composta por Cremofor EL® (óleo de rícino polietoxilado) e etanol (1:1). A quantidade necessária desse veículo para administrar as doses requeridas de paclitaxel é significativamente alta. Vários efeitos colaterais estão relacionados a esse veículo, como nefrotoxicidade, neurotoxicidade e reações de hipersensibilidade (GELDERBLOM et al., 2001). Em vista desses problemas, inúmeros estudos são realizados para desenvolver formulações livres de Cremofor® e que possam ser mais ou tão eficazes quanto a convencional (DESAI et al., 2006; DONG; FENG, 2007; SHIKANOV et al., 2008).

O FDA aprovou em 2005 a utilização de uma formulação de paclitaxel sem Cremofor para o tratamento de câncer de mama, o Abraxane®. Trata-se de partículas de albumina com 130 nm nas quais o paclitaxel encontra-se complexado a proteínas, o que aumenta sua solubilidade, permitindo a veiculação em solvente aquoso. Isso evita a necessidade de medicação anterior ao tratamento para prevenir reações de hipersensibilidade e os efeitos colaterais relacionados ao Cremofor®, além da possibilidade de administração de uma dose mais elevada do fármaco (IBRAHIM et al., 2002; NYMAN et al., 2005; MICHA et al., 2006).

Além do Abraxane®, outras formulações nanoestruturadas vêm sendo desenvolvidas no intuito de melhorar as características do paclitaxel, aumentando sua solubilidade, biodisponibilidade, evitando efeitos tóxicos e direcionando a sítios específicos (SINGLA et al., 2002). Dentre elas, podemos citar as micelas poliméricas (CAI et al., 2007), lipossomas convencionais e peguilados (CROSASSO et al., 2000; YANG et al., 2007) e nanopartículas poliméricas (DONG; FENG, 2007; DANHIER et al., 2009).

2.5 GENISTEÍNA

Dentre novas moléculas utilizadas para o tratamento antineoplásico que abrange a estratégia de inibição da angiogênese tumoral podemos citar a genisteína. É um fármaco antiangiogênico que tem evidenciado potencial efeito no

tratamento de neoplasias impedindo também a proliferação celular e evitando o processo de metástase (SU et al., 2005; PAVESE et al., 2010). Trata-se da principal isoflavona encontrada na soja e seus derivados, com estrutura semelhante aos estrogênios cujo consumo tem sido associado a uma atividade quimiopreventiva (FUKUTAKE et al., 1996; LIGGINS et al., 2000).

A genisteína apresenta potencial antitumoral comprovado contra tumores de mama (FIORAVANTIA et al., 1998; MAGEE; ROWLAND, 2004), ovário (CHOI et al., 2007; GOSSNER et al., 2007) e colo (YU et al., 2004), dentre outros. Sua atividade antitumoral, que está intimamente ligada a sua propriedade antiangiogênica, está relacionada a diferentes mecanismos como inibição da proteína tirosina quinase, da topoisomerase I e II e da característica de apresentar efeitos anti-proliferativos, pró-apoptóticos e antioxidantes (SU et al., 2005; BANERJEE et al., 2008; PAVESE et al., 2010; YU et al., 2012). Ela atua no ciclo celular bloqueando-o na fase G0/G1, (KUZUMAKI, et al. 1998; MAJID, et al. 2008).

Atuando na angiogênese, a genisteína promove a remoção dos vasos sanguíneos neoformados e a limitação do suprimento de oxigênio e nutrientes para a célula tumoral. A atividade antiangiogênica está relacionada à inibição de fatores de crescimento e citocinas que estimulam a vascularização dos tecidos próximos ao tumor (FOTSIS et al., 1995; KIM et al., 1998; SU et al., 2005). Dentre essas moléculas, o VEGF destaca-se como um importante alvo, visto que é encontrado em altas concentrações em tumores em humanos e animais, além de apresentar papel crucial na formação de tumores ascíticos *in vivo* (SHIBUYA et al., 1999).

A associação da genisteína com outros fármacos já utilizados na terapia anti-neoplásica com atividade citotóxica tem sido uma estratégia explorada a fim de ampliar a atividade antitumoral, contribuindo para a redução da resistência do tumor (HWANG et al., 2005; LI et al., 2006; ZHANG et al., 2010).

Assim como outros agentes antitumorais, genisteína possui baixa solubilidade em água quando ativa na forma aglicona (WU et al., 2010). Uma possibilidade terapêutica que tem sido utilizada no âmbito da nanotecnologia para contornar esse problema é a encapsulação da genisteína em sistemas nanoestruturados (SI et al., 2010; VARGAS et al., 2012). Extensa pesquisa vem

sendo desenvolvida em nosso laboratório de pesquisa visando a encapsulação da genisteína em nanocarreadores como nanopartículas lipídicas sólidas e nanocápsulas poliméricas a fim de melhorar suas propriedades (ZAMPIERI, 2009; SILVA, 2012). Além desses trabalhos, a encapsulação da genisteína em lipossomas na razão molar 1:10 (genisteína:fosfolipídeo) foi obtida com eficiência de aproximadamente 99% e alta estabilidade, mostrando-se como uma alternativa para veiculação e controle da liberação desse fármaco (RIBEIRO, 2008).

2.6 TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH: TAE

No processo de pesquisa de novas moléculas antitumorais e de sistemas de liberação com fármacos de ação já conhecida, métodos alternativos de cultura celular *in vitro* e experimentos *in vivo* podem ser utilizados (AL-GHANANEEM et al., 2009; MOTA et al., 2012). Para testes *in vivo*, diferentes modelos tumorais são utilizados, podendo as células neoplásicas ser implantadas em região subcutânea gerando tumores sólidos ou na região intraperitoneal, como no caso do TAE. O TAE é um tumor líquido que apresenta alta capacidade de transplantação, não regressão e rápida proliferação. Devido a estas características e à facilidade de manuseio experimental este modelo tem sido extensamente aplicado em estudos para a investigação de antitumorais (NOGUEIRA et al., 2008; LEE et al., 2010; AGRAWAL et al., 2011).

Diante desses dados, entende-se que a associação de PTX e GEN pode levar a um efeito combinado entre os dois fármacos, com melhora da atividade antitumoral. Uma vez que a eliminação da rede vascular próxima ao tumor elimina também o aporte para entrega de fármacos citotóxicos, a co-encapsulação desses fármacos em um sistema multicompartimental nanoestruturado torna-se uma alternativa para sua veiculação e entrega ao tumor. Espera-se que o efeito antiangiogênico atribuído à genisteína irá reduzir o aporte sanguíneo ao tumor, enquanto que o paclitaxel, já acumulado no tecido tumoral pelo efeito EPR, poderá exercer o efeito citotóxico com maior eficácia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vivo* de um sistema nanoestruturado multicompartimental, para encapsulação simultânea de paclitaxel e genisteína com o propósito de aumentar a eficácia do efeito antitumoral através da ação combinada destas substâncias com distintos perfis de liberação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver uma formulação de nanocápsulas poliméricas encapsulando paclitaxel recobertas por bicamada lipídica contendo genisteína
- ✓ Caracterizar a formulação desenvolvida quanto ao tamanho, índice de polidispersão, pH e eficiência de encapsulação
- ✓ Determinar o perfil de liberação *in vitro* dos fármacos a partir dos nanocarreadores
- ✓ Avaliar a atividade citotóxica do paclitaxel associado à atividade antiangiogênica da genisteína, quando co-encapsulados em nanopartículas, em modelo tumoral *in vivo*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO PACLITAXEL E DA GENISTEÍNA

Técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvida para quantificação simultânea da GEN e do PTX e apenas alguns parâmetros de validação foram avaliados como linearidade, repetibilidade e limites de detecção e quantificação. As análises foram realizadas em cromatógrafo Varian Pro Star (EUA), equipado com amostrador automático modelo PS410, detector de UV-Visível modelo PS325 e bomba quaternária modelo PS240. Foi utilizada uma coluna de fase reversa Varian OmniSpher 3 C-18 (50x3,0mm) 3µm, mantida em temperatura ambiente. Foi realizado gradiente de fase móvel e comprimento de onda para que fosse possível a separação dos fármacos em tempo mais reduzido e para aumentar a sensibilidade de detecção de cada fármaco. Como fase móvel foi utilizada uma mistura composta por ácido trifluoroacético 0,1%: acetonitrila na proporção de 65:35 no primeiro 0,5 minuto de análise. Essa proporção foi alterada para 20:80 por 0,5 minuto, retornando à condição inicial após 1 minuto da corrida cromatográfica. O fluxo foi mantido sempre em 0,5 mL/min e a detecção ajustada em 260 nm para GEN até os 3 primeiros minutos d corrida e 227 nm para o PTX até o fim da corrida cromatográfica, com duração de 5 minutos.

4.2 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS

Nanocápsulas de PLGA encapsulando PTX recobertas por bicamada lipídica contendo GEN foram nomeadas nesse trabalho de NC-PC e preparadas de acordo com método descrito em seguida. As nanopartículas (NP) foram preparadas de acordo com o método de deposição interfacial do polímero pré-formado, conforme representado na Figura 2. Nesse método, uma fase orgânica contendo os componentes das nanocápsulas é adicionada a uma fase aquosa contendo tensoativos, para estabilização da partícula, seguida da eliminação desse solvente.

A fase orgânica foi preparada com 75 mg de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) 75:25 (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemanha), 150 µL de óleo de

triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (ABITEC, Columbus, OH, EUA), 110 mg de fosfatidilcolina de soja (PC) (LIPOID, Ludwigshafen, Alemanha) e 2,5 mg de paclitaxel (LC Laboratories, Woburn, MA, EUA), solubilizados em acetona. A fase aquosa continha poloxamer F-68 e F-127 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (1:1) a 0,37% (p/v) em água ultrapurificada. A fase orgânica (15 mL) foi diretamente vertida na fase aquosa (30 mL) sob agitação magnética, que foi mantida por mais 30 minutos. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo RV 10 control (IKA, Alemanha) a 45 rpm e 40 °C para formação das nanocápsulas e a dispersão foi concentrada para 4 mL. Essa amostra final foi filtrada em membrana de PVDF de 0,45 µm para separar o PTX não encapsulado nas nanocápsulas.

Foi preparado filme lipídico contendo 75 mg de PC e 2,5 mg de GEN. Esses componentes foram dissolvidos em 0,5 mL de clorofórmio em 0,25 mL de metanol, respectivamente, e transferidos para um balão de fundo redondo. Em seguida os solventes orgânicos foram removidos sob pressão de nitrogênio, formando o filme lipídico. O filme foi mantido em estufa a vácuo (440/2D, Nova Ética, Brasil) a 25°C durante pelo menos 1 hora, para garantir a completa remoção do solvente.

Em seguida, esse filme foi hidratado por 1 hora com a dispersão de nanocápsulas obtida anteriormente, seguido de agitação em vórtex por 5 min. Essa amostra também foi filtrada em membrana de PVDF de 0,45 µm para separar a GEN não encapsulada na bicamada lipídica. Nanopartículas sem os fármacos também foram produzidas.

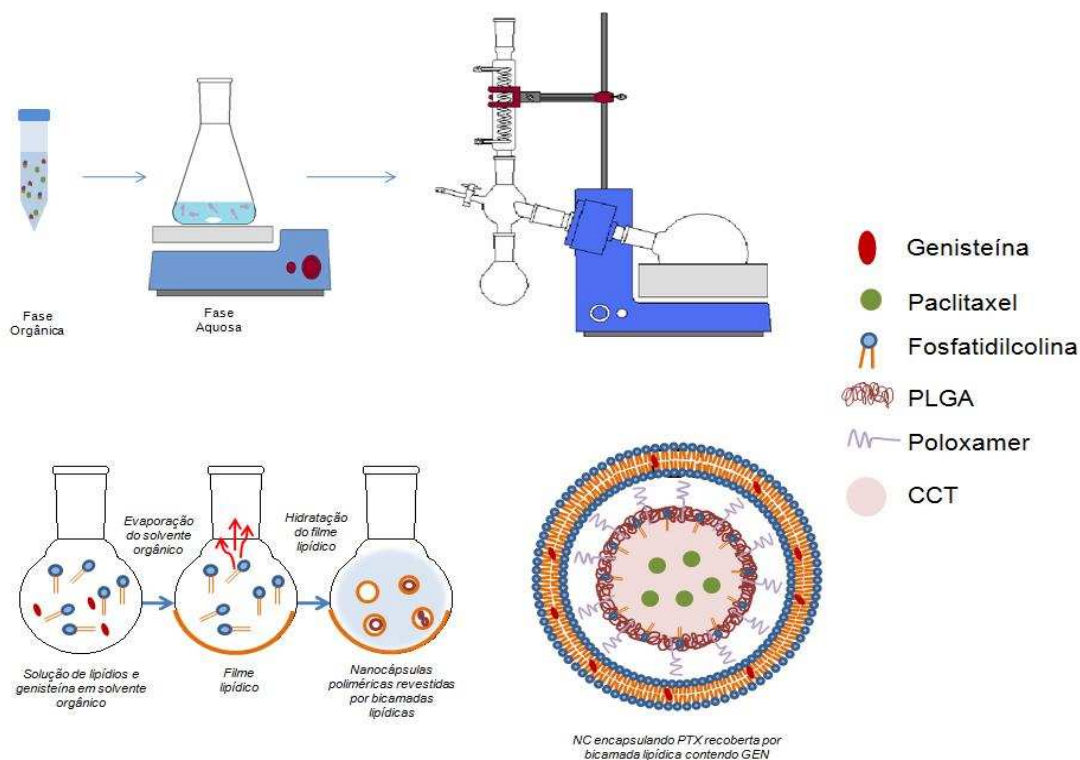


Fig. 2. Esquema de preparo das nanocápsulas através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado, seguido do revestimento das mesmas por bicamada lipídica através do processo de hidratação do filme lipídico.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.3.1 Distribuição de tamanho, índice de polidispersão, pH e eficiência de encapsulação

O diâmetro médio e o índice de polidispersão (Pdl) foram analisados por técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), que fornece a média da intensidade de espalhamento de luz das partículas que estão em movimento Browniano. Tal medida foi realizada no equipamento Zetasizer Nano-S (Malvern Instruments, Reino Unido), onde 10 μL da amostra foram diluídos com 990 μL de água ultrapurificada para análise. A medida do pH foi realizada diretamente em pHmetro PG 1800 (GEHAKA, Brasil). As nanopartículas foram caracterizadas após cada etapa de preparo.

A quantificação dos fármacos nos nanosistemas foi realizada através de metodologia desenvolvida por CLAE. Alíquotas de 100 μL da amostra antes e após filtração foram diluídas com 900 μL de metanol para romper as

nanopartículas. Essas alíquotas foram centrifugadas a 14500 rpm (Eppendorf, Alemanha) por 10 minutos para precipitação do polímero, não solúvel no metanol. A eficiência de encapsulação (%EE) de ambos os fármacos foi calculada a partir da equação:

$$\%EE = \frac{mg\text{fármaco encapsulado}}{mg\text{fármaco adicionado}} \times 100$$

4.3.2 Análise de nanopartículas por rastreamento (*Nanoparticle tracking analysis*)

Nanoparticle tracking analysis (NTA) é um método de visualizar e analisar partículas em líquidos que relaciona a taxa do movimento browniano ao tamanho da partícula. As partículas são visualizadas pelo espalhamento da luz refletida por elas quando iluminadas por um laser. Vídeos da luz espalhada pelas partículas são captados com uma câmara digital e o movimento de cada partícula é acompanhado. A taxa de movimento da partícula está relacionada ao raio hidrodinâmico da esfera equivalente, calculada através da equação de Stokes-Einstein.

Medidas por NTA foram realizadas com equipamento modelo NS500 (NanoSight, Reino Unido), equipada com um compartimento de amostras e um laser de 532 nm. Amostras de nanocápsulas não revestidas e revestidas foram diluídas antes da análise com água ultrapurificada e automaticamente injetadas no compartimento de amostras. O software utilizado para a captura e análise dos dados foi a NTA 2.3. Vídeo das amostras foi capturado por câmara EMCCD 215S, com ajustes manuais para melhoramento da imagem. O tamanho médio e os valores de DP obtidos pelo software correspondem à média aritmética dos valores calculados através dos tamanhos de todas as partículas analisadas pelo software. Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente.

Lipossomas de 25 mM de fosfatidilcolina sem fármaco foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de vigorosa agitação e extrusão (Lipex extruder, Northern Lipids, Canadá) através de uma membrana de polycarbonato de 600 nm. Esses lipossomas foram analisados por DLS e NTA. Uma alíquota da amostra foi misturada a uma alíquota de nanocápsulas não revestidas e também analisadas por DLS e NTA, a fim de comparar o tamanho e

distribuição de tamanho das vesículas lipídicas formadas na ausência das nanocápsulas e das NC-PC.

4.3.3 Espalhamento múltiplo da luz (*Multiple Light Scattering*)

As dispersões de nanopartículas foram analisadas por multiple light scattering (MLS) no equipamento Turbiscan Lab Expert (Formulaction, França). A amostra foi adicionada a uma célula de vidro e analisada durante 24 horas a 25 °C. O equipamento é composto por uma fonte de luz de infra-vermelho próximo ($\lambda = 880$ nm) que se move ao longo da célula de vidro. Essa fonte é equipada também com detectores de transmissão (T) e backscattering (BS). O detector de T recebe a luz que atravessa a amostra (a 180°) e o detector de BS recebe a luz espalhada que retorna da amostra (a 45°). Esse detector realiza a análise por toda a altura da célula, adquirindo, simultaneamente, dados de T e BS a cada 40 μ m e a cada 20 minutos durante toda análise, conforme programação estabelecida.

4.3.4 Perfil de liberação *in vitro*

O perfil de liberação da GEN e do PTX na dispersão de nanopartículas foi determinado utilizando método de diálise. Para a realização dos experimentos, foram utilizados sacos de diálise de celulose regenerada, com *cut off* de 3500 Da. Como meio receptor foi utilizada solução de lauril sulfato de sódio (LSS) a 2,0% (p/v) em água ultrapurificada. Alíquotas de 0,5 mL das NP foram adicionadas aos sacos de diálise, que foram lacrados e colocados dentro de frascos âmbar contendo o meio receptor. Esses frascos foram colocados em mini incubadora MA 410 (Marconi, Brasil) e o sistema foi mantido a 37°C, a 125 rpm por 60 dias. Amostras de 500 μ L foram coletadas do meio acceptor nos tempos de 1, 2, 3, 6 e 10 hs; 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 21, 26, 30, 40, 50 e 60 dias e analisadas diretamente por CLAE para determinar a quantidade de fármacos liberados das NP. Após coleta, o meio era repostado com 500 μ L de solução nova de LSS 2,0%. Condições *sink* foram mantidas durante todo o experimento. O procedimento foi realizado em triplicata.

Para selecionar o meio receptor utilizado e garantir condições *sink*, teste de solubilidade de ambos os fármacos em LSS 2% foi realizado em triplicata. Cerca

de 1,0 mg de fármaco foi mantido sob agitação magnética em 1,0 mL de LSS 2% a 37 °C e 600 rpm durante 24 horas. Após esse período, a amostra foi completamente filtrada em membrana de PVDF 0,45 µm e uma alíquota foi diluída em metanol para quantificação por CLAE.

4.4 ESTUDOS *IN VIVO*

4.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss*, machos, com idade entre 6 e 8 semanas (pesando aproximadamente 35 g) fornecidos pelo Instituto de Ciências Biológicas da UFG. Os animais foram agrupados em gaiolas plásticas para aclimação, separados por grupo com $n = 5$, em sala climatizada sob temperatura constante de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 horas, por 5 dias. Foram fornecidas ração comercial e água *ad libitum*. Após o período de aclimação, os animais foram submetidos ao tratamento, mantendo-se as mesmas condições. O experimento foi realizado de acordo com protocolo número 37/2009 aprovado pelo Comitê de Ética.

4.4.2 Modelo experimental

As células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) foram mantidas nas dependências do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular da Faculdade Farmácia da UFG através de sucessivas passagens entre os animais pela via intraperitoneal (i.p.), onde crescem na forma ascítica na cavidade peritoneal dos camundongos.

Uma alíquota do líquido ascítico foi retirada com uma seringa estéril da cavidade peritoneal de um camundongo, l e diluída em azul de Tripiano para contagem das células viáveis em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica. De acordo com as células contadas, foi realizada uma diluição de volume conhecido do líquido ascítico em tampão PBS pH 7,4 a fim de se obter uma concentração de 1×10^7 células/mL que seria utilizada imediatamente após o preparo no teste de inibição tumoral.

4.4.3 Inibição tumoral

Cada camundongo do teste foi inoculado na cavidade peritoneal com uma suspensão contendo 2×10^6 células de TAE em um volume de 0,2 mL, sendo que o dia de inoculação do tumor foi considerado dia 0.

Para a realização do ensaio de inibição tumoral, os animais foram separados em 6 grupos de 5 animais cada e submetidos ao tratamento durante 7 dias consecutivos com a formulação de nanopartículas por via i.p. conforme protocolo abaixo:

G12P10: PTX + GEN na dose de 10 mg/kg e 12 mg/kg por dia, respectivamente;

G0P10: PTX na dose de 10 mg/kg por dia;

G12P2: PTX + GEN na dose de 2 mg/kg e 12 mg/kg por dia, respectivamente;

G0P2: PTX na dose de 2 mg/kg por dia;

G12P0.2: PTX + GEN na dose de 0,2 mg/kg e 12 mg/kg por dia, respectivamente;

G0P0.2: PTX na dose de 0,2 mg/kg por dia;

C: grupo controle tratado com nanopartículas brancas (sem nenhum fármaco).

No oitavo dia, os animais foram submetidos à eutanásia, o líquido ascítico foi totalmente coletado e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e armazenado e o pellet de células foi ressuspensão em volume conhecido de PBS e diluído em azul de tripano para contagem das células viáveis. Os animais que receberam NP brancas formaram o grupo controle, considerando sua viabilidade celular de 100% e a porcentagem de inibição tumoral dos demais grupos foi definida com relação a ele.

4.4.4 Determinação dos níveis de VEGF no fluido ascítico

Os níveis de VEGF do fluido ascítico dos camundongos dos grupos G12P2, G0P2, G12P0.2, G0P0.2 e C foram determinados utilizando-se kit de ELISA. Os demais grupos não foram avaliados por não terem apresentado desenvolvimento tumoral. O fluido ascítico foi submetido ao ensaio em duplicata, seguindo-se as instruções do fabricante (R&D Systems). Em resumo, 50 μ L de diluente do ensaio

e 50 µL de amostra previamente diluída foram adicionados a uma microplaca de 96 poços pré-revestidas com anticorpo policlonal específico para VEGF de camundongo. VEGF recombinante de camundongo foi usado para realização da curva padrão. Após incubação durante 2 horas à temperatura ambiente, os poços foram lavados e anticorpo policlonal contra VEGF de camundongo conjugado com peroxidase foi adicionado. A incubação foi continuada durante 2 horas, e as placas foram lavadas mais uma vez. Solução de substrato foi adicionada a cada poço e incubada durante 30 min. A reação produziu um produto enzimático azul que se torna amarelo quando a solução de paragem é adicionada. A densidade óptica (OD) foi medida a 450 nm e 540 nm utilizando um leitor de microplacas Multiskan Spectrum (Thermo Scientific, EUA). Leituras a 540 nm foram subtraídas das leituras a 450 nm para corrigir imperfeições ópticas na placa.

4.4.5 Avaliação macroscópica do efeito antiangiogênico

Após submeter os camundongos à eutanásia, a pele da região abdominal foi cuidadosamente retirada para que fosse possível avaliar a angiogênese nesse local. Para isso, fotos da região da mucosa peritoneal foram obtidas através de uma câmera digital (Sony, Japão) e uma avaliação morfológica macroscópica foi realizada (NOGUEIRA et al., 2008). As imagens foram analisadas usando Image J, um programa de processamento e análise de imagens, de domínio público, que pode calcular a área de seleções definidas pelo usuário, criando histogramas de densidade dos pixels com base em uma cor específica definida pelo usuário. Neste trabalho, a área dos vasos sanguíneos da região peritoneal foi selecionada para análise da intensidade da cor vermelha.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos *in vivo* foram realizados em quintuplicata e os resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Para comparação dos valores das médias dos grupos foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para Múltiplas Comparações. Significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism (versão 5.0).

5 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de artigo científico, com sua formatação de acordo com as orientações da revista a qual será submetido:

Multicompartmental nanoparticles for co-encapsulation and multimodal drug delivery to tumor cells and neovasculature

Autores: Livia Palmerston Mendes, Marilisa Nogueira Pedroso Gaeti, Paulo Henrique Marcelino de Ávila, Marcelo de Sousa Vieira, Bruna dos Santos Rodrigues, Renato Ivan de Ávila Marcelino, Lílian Cristina Rosa dos Santos, Marize Campos Valadares, Eliana Martins Lima

De acordo com as normas da publicação: Biomaterials

Multicompartmental nanoparticles for co-encapsulation and multimodal drug delivery to tumor cells and neovasculature

Lívia Palmerston Mendes^a, Marilisa Nogueira Pedroso Gaeti^a, Paulo Henrique Marcelino de Ávila^b, Marcelo de Sousa Vieira^b, Bruna dos Santos Rodrigues^b, Renato Ivan de Ávila Marcelino^b, Lílian Cristina Rosa dos Santos^a, Marize Campos Valadares^b, Eliana Martins Lima^{a,*}

^a*Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica e Sistemas de Liberação de Fármacos – FarmaTec, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO – Brazil.*

^b*Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular – FarmaTec – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO – Brazil.*

ABSTRACT

The combination and encapsulation of paclitaxel (PTX) and genistein (GEN) was accomplished by developing a multicompartmental nanocarrier. Nanocapsules containing PTX were obtained and further coated with a phospholipid bilayer entrapping GEN. Physico-chemical properties of this nanosystem were characterized. Coated nanoparticles presented entrapment efficiency of about 98% for both drugs. Average particle diameter was 150 nm with a monomodal distribution. Multiple light scattering analysis showed an increase of 2% of the backscattering profile both in the top and in the bottom of the sample, indicating a slight sedimentation and creaming behaviors. In vitro drug release showed that GEN was completely released after 48 hours, while PTX reached 70% after 60 days of analysis, indicating two distinct patterns of drug release. Almost 90% tumor inhibition in EAT-bearing mice was achieved with no toxicity signals using a dose of PTX of 2 mg/kg/day. When a low dose of PTX (0.2 mg/kg/day) was used in the treatment, 11% tumor inhibition was achieved, but when associated with a dose of 12 mg/kg/day of GEN, there was 44% tumor inhibition and a decrease of about 58% in VEGF levels compared to animals treated with blank nanoparticles, highlighting its antiangiogenic effect, which contributed to the overall antitumor activity of the nanomedicine.

Keywords: Paclitaxel, Genistein, Angiogenesis, Nanoparticles, Controlled release, Co-encapsulation, *In vivo* antitumor test

1. Introduction

Cancer treatment usually associates antitumor agents with different mechanisms in order to improve chemotherapy efficacy and minimize adverse effects [1, 2]. Among chemotherapeutic agents, paclitaxel (PTX) is currently widely used due to its cytotoxic efficiency against solid tumors [3, 4]. However, the toxicity of the current vehicle used to administer this drug (Cremophor EL) associated with the need of administration of high doses of PTX might jeopardize a successful clinical outcome of the treatment [5].

To circumvent these disadvantages, Cremophor-free formulations are being developed and the FDA has already approved a nanoparticle formulation of albumin-bound paclitaxel for the treatment of breast cancer after failure of combination chemotherapy for the metastatic form of the disease. Several studies have investigated the role of these nanoparticles as a single agent and in combination with other drugs for the treatment of different types of solid tumors [6-8]. The combination of PTX with angiogenic inhibition factors such as bevacizumab has proven an increase in the antineoplastic effect due to the association of these drugs without an increase in side effects [9, 10]. The co-encapsulation of PTX combined with other drugs in nanocarriers may also be a promising strategy to increase therapeutic effects, also reducing side effects [11, 12].

Nanostructured polymeric and lipid-based systems may improve the biological response to many molecules, especially by modulating their pharmacokinetics and thus resulting in numerous advantages such as reduced toxicity and controlled release of the drugs. For a sustained release, different kinds of polymers or lipids, such as polydiacetylene, phospholipids and poly(ϵ -caprolactone) derivatives, may be used to modulate the release of the drug, maintaining its plasmatic concentration in therapeutic levels, during a prolonged period of time [13, 14].

Recent approaches focusing on the development of a nanocarrier system co-encapsulating two antineoplastic drugs include the use of liposomes and polymer nanoparticles whose antitumor activity result from the association of different drugs in a lower dose than the ones used in conventional therapy, overcoming undesirable toxicity and avoiding multidrug resistance (MDR) [15-17]. The association of a cytotoxic drug with drugs that act on tumor angiogenesis is a distinct

strategy, since antiangiogenic drugs do not act directly in the elimination of the tumor, but inhibit the growth of a vascular system surrounding the tumor, thereby preventing the influx of oxygen and nutrients [18-20]. Therapeutic potential of this approach has been shown for the combination of a vasculature disrupting agent, combrestatin A4, and the cytotoxic drug paclitaxel in nanoparticles, which resulted in inhibition of tumor cell proliferation and neovasculature growth [21].

Genistein (GEN), one of the major isoflavones found in soy extracts, is among new molecules used for the inhibition of tumor angiogenesis. It has shown potential antitumoral activities by its antiangiogenic effect in preventing cell proliferation and avoiding the occurrence of metastasis [22, 23]. GEN antiangiogenic and antitumor effects have been recently elucidated and involves, among other mechanisms, the inhibition of the vascular endothelial growth factor (VEGF), a molecule widely found in animal and human tumors [22, 24]. However, a known paradox of the antiangiogenic therapy is that the reduced blood supply induces tumor hypoxia, leading to the activation of factor which can significantly reduce the pro-apoptotic effect of chemotherapy, leading to tumor resistance [25]. As a result, the association of GEN with other cytotoxic drugs already used in antineoplastic therapy is required, in order to increase the antitumor activity, avoiding the occurrence of MDR cancer cells [26-28].

Given this scenario, the association of PTX and GEN in a nanostructured drug delivery system may lead to a synergic effect. The immediate release of the antiangiogenic drug combined with the sustained release of the cytotoxic agent might potentiate the antitumor activity. Thus, the aim of this work was to develop, characterize and evaluate tumor inhibition *in vivo* of a nanomedicine comprising multicompartimental nanoparticles co-encapsulating GEN and PTX with a temporal pattern of drug release.

2. Material and Methods

2.1. Material

Paclitaxel (PTX) and genistein (GEN) were acquired from LC Laboratories (Woburn, MA, USA). Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) 75:25 was purchased from BoehringerIngelheim (Ingelheim, Germany). Capric/caprylic triglyceride (CCT) was a gift from ABITEC (Columbus, OH, USA) and soy phosphatidylcholine (PC) was obtained from LIPOID (Ludwigshafen, Germany). Pluronic® F68 and F127 (poloxamer) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Acetonitrile HPLC grade and trifluoroacetic acid were acquired from JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Ultra-purified water was used and all other chemicals were of analytical reagent quality.

2.2. HPLC analysis

Reversed-phase HPLC was used for the quantitative determination of GEN and PTX in all samples. The system used was a Varian Pro Star Chromatographer (USA) equipped with an autosampler model PS410, UV-Visible detector model PS325 and a quaternary pump model PS240. Chromatographic separation was achieved in a C18 column packed with OmniSpher 3 ODS silica, with 50 mm length by 3.0 mm internal diameter (Varian, USA) at room temperature. Solvent A was Milli-Q purified water containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid, and solvent B was acetonitrile HPLC grade. The solvents were pumped through the system at a flow rate of 0.5 mL/min. A mobile phase gradient was used, starting at 65% solvent A for 0.5 min, decreasing to 20% at 1 min and returning to the initial condition until the end of analysis (5 min). In order to increase the detection sensitivity of each drug, wavelength was set at 260 nm for GEN and 227 nm for PTX. Elution time for GEN was 2.10 min while PTX eluted at 3.70 min. PTX and GEN quantifications were carried out using external standard calibration curve in the linear concentration range between 1 and 100 µg/mL. The limit of detection (LD), defined as the lowest concentration of the analyte which can be detected but not necessarily quantitated, was 0.04 µg/mL for GEN and 0.06 µg/mL for PTX. While the limit of quantification (LQ) was 0.13 µg/mL for GEN and 0.2 µg/mL for PTX.

2.3. Preparation of nanoparticles

PTX-loaded PLGA nanocapsules coated with a lipid bilayer containing GEN were denoted in this work by NC-PC and were prepared as follows. Nanocapsules of PLGA 75:25 containing PTX were prepared by interfacial deposition of preformed polymer. Briefly, PLGA and CCT were dissolved in acetone. PC and PTX (2.5 mg) were dissolved in methanol and mixed with the acetone solution. The aqueous solution was prepared using Pluronic® F68 and F127 (1:1) at 0.37% (w/v). The organic solution was dripped into the aqueous solution under magnetic stirring, which was maintained for 30 minutes. After that period, the solvents were evaporated under reduced pressure at 40 °C and 45 rpm in a rotary evaporator (Ika, Germany) during which the

nanocapsules were formed. Non-encapsulated drug was removed by filtration using a 0.45µm PVDF membrane.

PC and GEN (2.5 mg) were dissolved in a mixture of chloroform and methanol. A thin lipid film was prepared by the evaporation of the organic solvents in a nitrogen atmosphere. The flask was kept under vacuum (440/2D, Nova Ética, Brazil) for 1 hour to ensure complete removal of residual solvent. The thin-film was hydrated for 1 hour using the dispersion of polymeric nanocapsules prepared as previously described. At the end of the procedure, samples were extruded through 0.45µm membrane, which also removed the non-encapsulated genistein. Blank nanoparticles (without drugs) were also obtained for control purposes.

2.4. Nanoparticles characterization

Nanoparticles were characterized after both steps described above. The size distribution profiles were determined by dynamic light scattering (DLS) in a Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, UK), with the sample previously diluted in ultrapure water. Analysis of pH was done directly in the pHmeter PG 1800 (Gehaka, Brazil). Quantitative determination of encapsulated drugs was performed by HPLC as previously described. For the HPLC analysis, 100 µL aliquots of the sample before and after filtration were diluted with 900 µL of methanol to disrupt the nanoparticles. These aliquots were centrifuged at 14500 rpm (MiniSpin plus, Eppendorf, Germany) for 10 minutes and the supernatant was injected into the chromatographer. Encapsulation efficiency (EE) for both drugs was calculated from the following equation:

$$\%EE = \frac{\text{amount of drug encapsulated (mg)}}{\text{amount of drug added to formulation (mg)}} \times 100$$

All samples were prepared in triplicates and analysis were performed in three different batches (n=3).

2.5. Nanoparticle tracking analysis

Nanoparticle tracking analysis (NTA) is a method of visualizing and analyzing particles in liquids that relates the rate of Brownian motion to particle size. Particles are visualized by the light scattered when illuminated by a laser light. The technique calculates particle size on a particle-by

particle basis. Videos of the light scattered by the particles are captured using a digital camera and the motion of each particle is tracked from frame to frame. The rate of particle movement is related to a sphere equivalent hydrodynamic radius as calculated through the Stokes-Einstein equation [29]. NTA measurements were performed with a NanoSight NS500 (Amesbury, United Kingdom), equipped with a sample chamber and a 532-nm laser. Samples of uncoated and coated nanocapsules were diluted before analysis with ultrapure water and automatically loaded into the sample chamber. The software used for capturing and analyzing the data was the NTA 2.3. Video clips of the samples were captured by an EMCCD camera for 215 seconds with manual shutter and gain adjustments. The mean size and SD values obtained by the NTA software correspond to the arithmetic values calculated with the sizes of all the particles analyzed by the software. All measurements were performed at room temperature.

A blank liposomal dispersion prepared with 25 mM phosphatidylcholine was prepared by the hydration of a thin-lipid film method followed by vigorous agitation and extrusion (LIPEX Extruder, Northern Lipids, Canada) through a polycarbonate membrane of 600 nm. These liposomes were analyzed by NTA and DLS. An aliquot of this sample was mixed with an aliquot of uncoated nanocapsules and also analyzed by NTA and DLS in order to compare the size and size distribution of the lipid vesicles formed in the absence of the nanocapsules and the NC-PC nanoparticles.

2.7. Multiple light scattering analyses

Nanoparticles were analyzed by multiple light scattering (MLS) using Turbiscan Lab Expert (Formulation, France) before and after coating with lipid bilayer. The sample was placed in a cylindrical glass cell and analyzed for 24 hours at 25°C. The equipment consisted of a detection head with a pulsed near infra-red light source ($\lambda = 880$ nm) which moves along the glass cell. This detection head is also equipped with a synchronous transmission (T) and back scattering (BS) detectors. The T detector receives the light which goes across the sample (at 180°) and the BS detector receives the light scattered backward by the sample (at 45°) [30]. The detection head scans the entire height of the sample acquiring T and BS data simultaneously every 40 μm and each 20 minutes during 24 hours of analysis.

2.6. *In vitro* drug release

500 µl of drug loaded nanoparticles dispersion were added to a dialysis tube (MW cut off 3500 D) and sealed. The tube was immersed in 10 mL of acceptor medium prepared with sodium lauryl sulfate (SLS) 2.0% (w/v). The flasks were maintained in an orbital shaker (Marconi, Brazil) at 37°C at 125 rpm for 60 days. Samples were withdrawn from the acceptor medium and replaced by fresh medium at predetermined time points. Samples were injected directly in the HPLC system to determine the amount of drugs released from the nanoparticles. The procedure was performed in triplicate and sink conditions were maintained during the experiment. To ensure sink conditions, solubility of both drugs was assessed in several SLS concentrations during 24 hours at 37 °C in the orbital shaker. Samples were then filtered in a 0.45 µm membrane, diluted in methanol and analyzed by HPLC.

2.8. *In vivo* assay

2.8.1. *Animals*

Groups of 6-8 week-old Swiss male mice from the Institute of Biological Sciences of University Federal of Goiás were used. The animals weighing 30-35 g at the beginning of the experiment were housed under the conditions of controlled temperature (26°C ± 2°C) and light (12h light/12h dark) and received food and water *ad libitum*. The experiment was conducted according to the protocol number 37/2009 approved by the UFG Ethics Committee for Animal Studies.

2.8.2. *Tumor model*

Ehrlich ascites tumor (EAT) was maintained in the ascitic form by sequential passages in Swiss mice, by means of intra peritoneal (i.p.) transplantations of 2×10^6 tumor cells. The ascitic fluid was collected using a syringe and tumor cell count was performed in a Neubauer hemocytometer, using the trypan blue dye exclusion method.

2.8.3. *Tumor inhibition*

Animals were separated into 6 groups of 5 animals each. Each animal used in the assay was inoculated i.p. with 2×10^6 tumor cells suspended in 0.2 mL of phosphate buffered saline (PBS) solution (pH 7.4). The date of tumor inoculation was consider day 0 and the administration of

nanoparticles started at day 1. To evaluate tumor inhibition, NC-PC formulations containing PTX+GEN or PTX or GEN, at different concentrations of each drug were prepared. EAT-bearing mice were treated i.p. during 7 consecutive days with different doses of the drugs following the protocol for each group: GEN+PTX 12+10 mg/kg/day (G12P10); PTX 10 mg/kg/day (G0P10); GEN+PTX 12+2 mg/kg/day (G12P2); PTX 2 mg/kg/day (G0P2); GEN+PTX 12+0.2 mg/kg/day (G12P0.2); PTX 0.2 mg/kg/day (G0P0.2); Blank nanoparticles (control group, C).

Animals were submitted to euthanasia on the eighth day of the experiment and the ascitic fluid was collected and centrifuged for 5 minutes at 1500 rpm (3-18K, Sigma, Germany). The supernatant was reserved for the quantitation of VEGF and the pellet was resuspended in PBS solution for the counting of tumor cells using the trypan blue dye exclusion method. C group (treated with blank nanoparticles) was the control group and its cell viability was considered 100%.

2.8.4. Determination of VEGF in ascitic fluid

Levels of VEGF from the peritoneal washing supernatant of EAT-bearing mice from groups G12P2, G0P2, G12P0.2, G0P0.2 and C were determined by an ELISA Kit (Mouse VEGF Quantikine ELISA Kit) using a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. The ascitic fluid was subjected to the test in duplicate following manufacturer instructions (R&D systems). In brief, 50 μ L of assay diluent and 50 μ L of samples previously diluted were added to a 96-well microplate pre-coated with polyclonal antibody specific for mouse VEGF. Recombinant mouse VEGF was used to set up the standard curve. After incubation for 2 h at room temperature, the wells were washed and polyclonal antibody against mouse VEGF conjugated to horseradish peroxidase was added. Incubation was continued for 2 h and plates were washed again. Substrate solution was added to each well and incubated for 30 min. The enzyme reaction yielded a blue product that turns yellow when the stop solution is added. The optical density (O.D.) was measured at 450 nm and 540 nm using a microplate reader MultiskanSpectrum (Thermo Scientific, EUA). Readings at 540 nm were subtracted from the readings at 450 nm to correct for optical interferences from the plate.

2.8.5. Macroscopic evaluation of anti-angiogenic effect

At the end of the treatment, the peritoneal wall from the abdominal region of mice were carefully collected to verify angiogenesis. For this assay, photographs of a defined area were taken by a digital camera (Sony, Japan) and a macroscopic morphologic analysis was accomplished [31]. Image J was used to convert grey scale images into 8-bit binary images. The area of blood vessels from the peritoneum was selected and the number of positive pixels/mm² was determined.

2.9. Statistical analysis

In vivo experiments were performed in quintuplicate and results were expressed as mean $\pm$ SD. For comparison of mean values between groups, Analysis of Variance test (ANOVA) and Tukey's Multiple Comparison test were used. In all cases, statistical difference was accepted when $p < 0.05$. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism software (version 5.0).

3. Results

3.1. Preparation and characterization of nanoparticles

PLGA nanocapsules encapsulating PTX were prepared by the interfacial deposition of preformed polymer method. The formation of the PC envelope was accomplished in a second stage, by hydrating the phospholipid film containing genistein with the nanocapsules dispersion. The phospholipid bilayer coating was designed in order to encapsulate GEN and promote a faster release of this drug in contrast with the polymeric core of these nanoparticles. Schematic representation of the particle is presented in Fig. 1. Final formulation had an opalescent and whitish aspect.

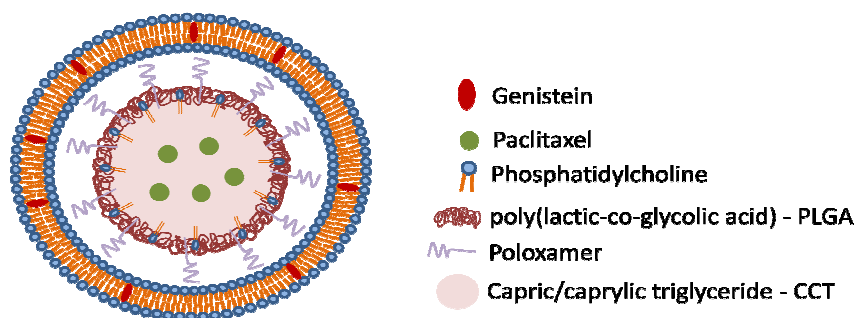


Fig. 1. Schematic illustration of the formulation of nanocapsules coated with a phosphatidylcholine bilayer (NC-PC) containing both paclitaxel and genistein - NCs comprise a capric/caprylic triglyceride core, a poly(lactic-co-glycolic acid) shell and a phospholipid bilayer coating.

Physical-chemical characteristics of the nanoparticles are presented in Table 1. Both nanoparticle dispersions (NC and NC-PC) exhibited a monomodal size distribution and polydispersity around 0.1, indicating narrow size distributions. Following the hydration of the phospholipid film with the dispersion of nanocapsules, the visual aspect of the formulation remained unaltered. The mean diameter of the phospholipid coated nanoparticles increased approximately 21% (about 25-30 nm). The multicompartimental nanoparticles also exhibited a monomodal size distribution with a similar size distribution profile in comparison to the uncoated nanocapsules.

Table 1

Physical-chemical characteristics of the paclitaxel-loaded PLGA nanocapsules (NC) uncoated and coated with a phospholipid bilayer containing genistein (NC-PC).

Nanoparticle	Diameter (nm)	PdI	pH	E.E. % ^a
Uncoated PLGA nanocapsules (NC)	125.07 ± 7.09	0.10 ± 0.02	6.15 ± 0.49	97.80 ± 1.65 (PTX)
PLGA Nanocapsules coated with PC bilayer (NC-PC)	151.53 ± 5.64	0.17 ± 0.03	6.45 ± 0.35	97.80 ± 2.21 (PTX) 97.99 ± 2.90 (GEN)

PC: phosphatidylcholine; PdI: polydispersity index; E.E.: entrapment efficiency; PTX: paclitaxel; GEN: genistein.

^a EE% represents the amount (%) of encapsulated drug in relation to the total amount of drug added to the formulation ($EE\% = (mg \text{ encapsulated drug}) / (mg \text{ drug added to formulation}) \times 100$)

Results express the mean ± SD (n=3)

Dynamic light scattering measurements of the formulations were plotted as intensity, volume and number for all samples (Fig. 2). Results show that the formulations were monodisperse, with a high homogeneity and narrow size distribution, as demonstrated by almost superposed size distribution profiles in different plots of singular batches. In order to demonstrate that the phospholipids, upon hydration of the lipid film, were able to enclose the nanocapsules forming a phospholipid envelope coating, a lipid film was hydrated with water, in the same conditions, but in the absence of nanocapsules. DLS measurements of the resulting liposomal vesicles showed an average diameter of approximately 500nm.

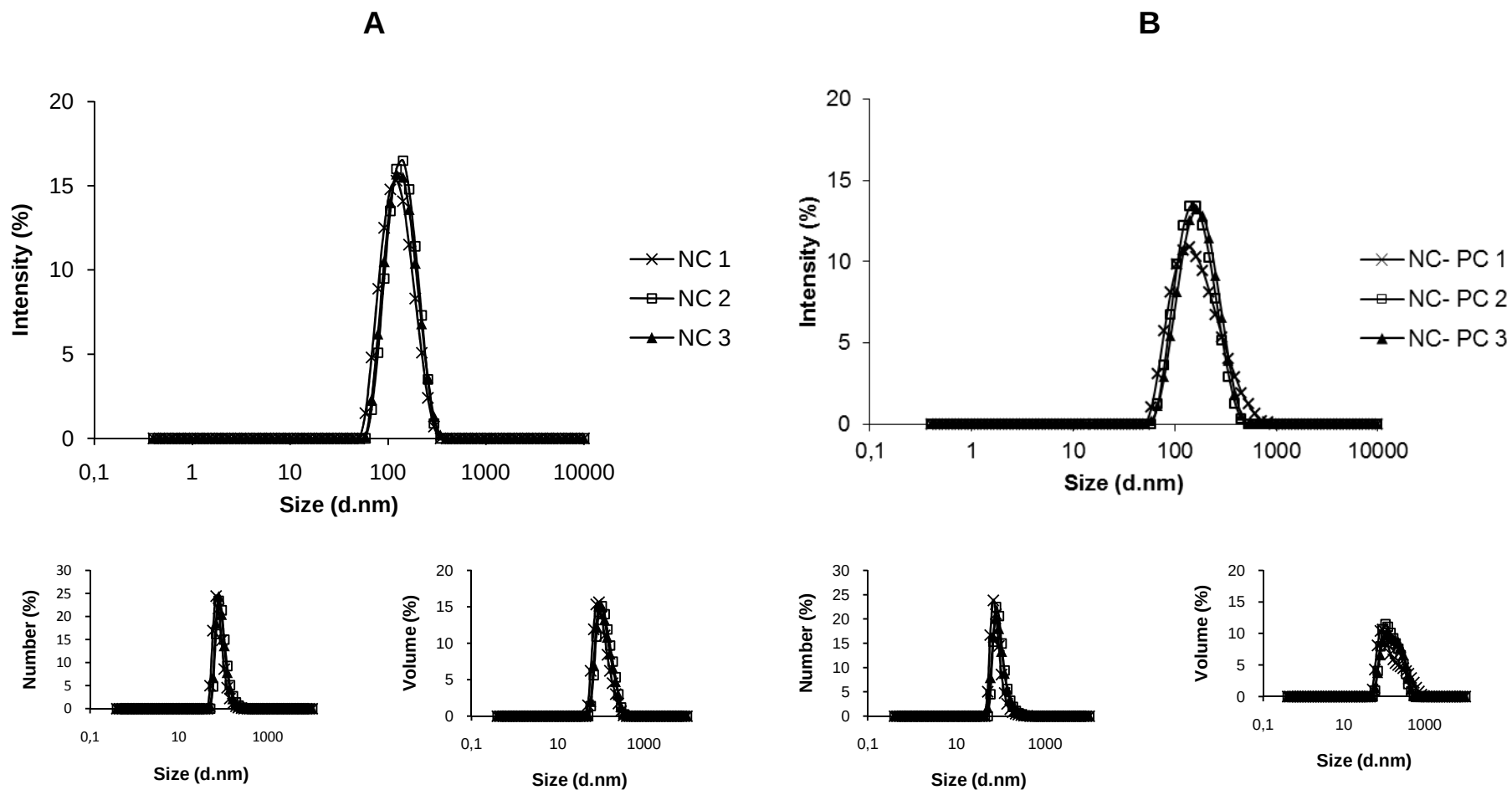


Fig. 2. Size distribution profiles by Dynamic Light Scattering considering light intensity, number, volume and particle size for the uncoated NCs (A) and after (B) coating the nanocapsules with the lipid bilayer. Each graph shows the measurement of three separate batches.

HPLC chromatograms in Fig. 3 demonstrate that NC-PCs had the characteristic peaks of the free drugs, confirming that both drugs were encapsulated in the nanoparticles. Encapsulation efficiencies for GEN and PTX were 98% and 97.8%, respectively, resulting in NC-PC formulations containing 0.51 ± 0.10 mg/mL of PTX and 0.61 ± 0.18 mg/mL of GEN.

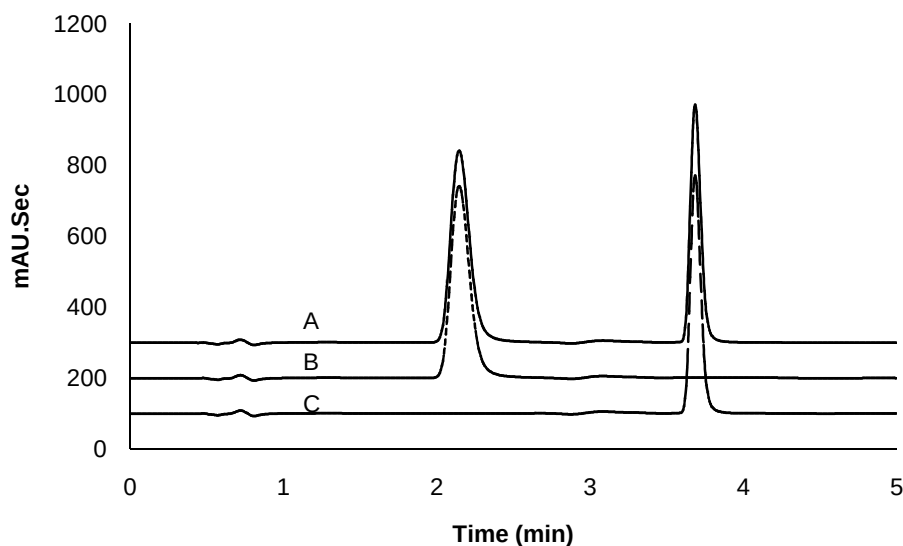


Fig. 3. HPLC chromatograms of (A) phospholipid coated nanocapsules (NC-PCs) containing both drugs, (B) genistein (GEN) and (C) paclitaxel (PTX). Samples were diluted ($100 \mu\text{g/mL}$) in methanol. Chromatographic conditions included a C18 column ($50 \times 3.0 \text{ mm}$; $3 \mu\text{m}$); mobile phase was 0.1% trifluoroacetic acid solution in water/ acetonitrile in gradient elution. Detection was UV at 260 nm for GEN and 227 nm for PTX.

3.2. Nanoparticle Tracking Analysis

With the purpose of confirming the results obtained by DLS that suggested the obtention of PC-coated nanocapsules, samples were analyzed by NTA technique (Fig. 4). Both uncoated (NC) (Fig. 4A) and coated (NC-PC) (Fig. 4B) nanoparticles exhibited only one population of particles, and no other particles in a different size range were observed. Additionally, the column charts on the left side in Figure 4 demonstrate a good agreement between NTA and DLS results, with relatively narrow size distributions for all formulations. To ensure that NC-PC formulations were not a mixture of nanocapsules and phospholipid vesicles, liposomes were obtained as described above and mixed with an aliquot of uncoated nanocapsules. DLS analyses of these liposomes before the mixture presented a mean size diameter of 517 nm and Pdl of 0.04, in agreement with NTA, which showed only one population of vesicles with a mean diameter of 587 nm and a SD of 87 nm (Fig.

4C). When liposomes were mixed with nanocapsules, DLS still showed only one population of nanoparticles with an average diameter of 185 nm with a Pdl of 0.26, while NTA clearly showed two populations of particles, noticeably in a different size distribution range (Fig. 4D).

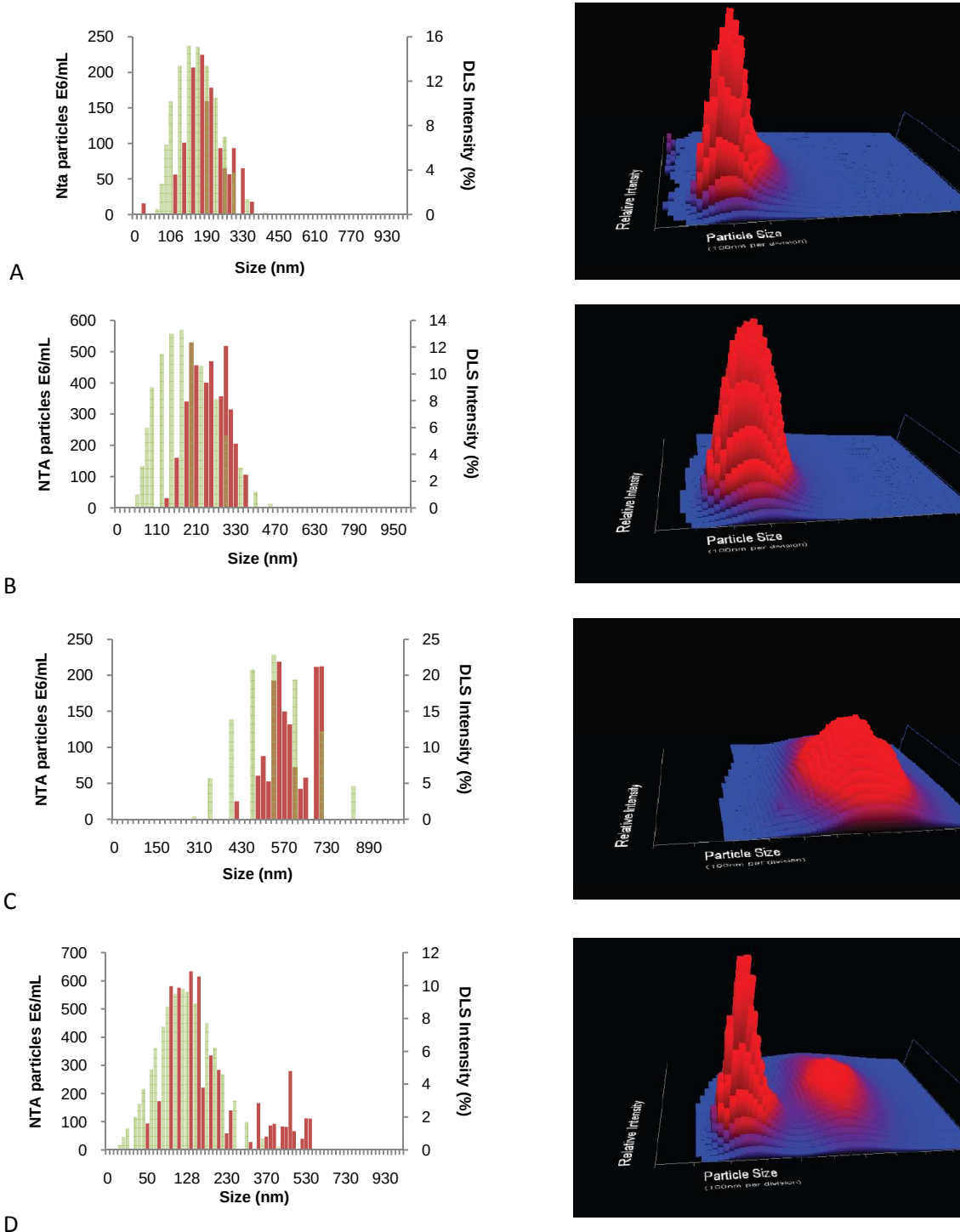


Fig. 4. Size distribution of nanoparticles from NTA (red columns) and DLS (green columns) measurements with the corresponding NTA 3D graph (size vs. intensity vs. concentration). A) PLGA nanocapsules (NC); B) PLGA nanocapsules coated with phospholipid bilayer (NC-PC) following the lipid film hydration with the NC dispersion; C) Phospholipid vesicles resulting from the lipid film hydration with water; D) Mixture of PLGA nanocapsules (NC) and phospholipid vesicles (1:10 ratio v/v).

3.3. Multiple light scattering

The backscattering profile of the nanocapsules dispersion before and after the lipid coating is presented in reference mode (Fig. 5), in which the first profile is subtracted from the other profiles. A discrete increase (about 2%) in the backscattering, both in the top and in the bottom of the sample, after coating were observed, indicating that the concentration of the particles is increasing in these areas of the sample cell. This observation is an estimative of sedimentation and creaming behaviors. Before coating, a more discrete variation can be observed only in the top region of the sample. Nevertheless, no variation can be seen in the middle of both samples, indicating that there is no change in particle size. This indicates that particles are not coalescing or flocculating while they migrate to the top or the bottom of the sample.

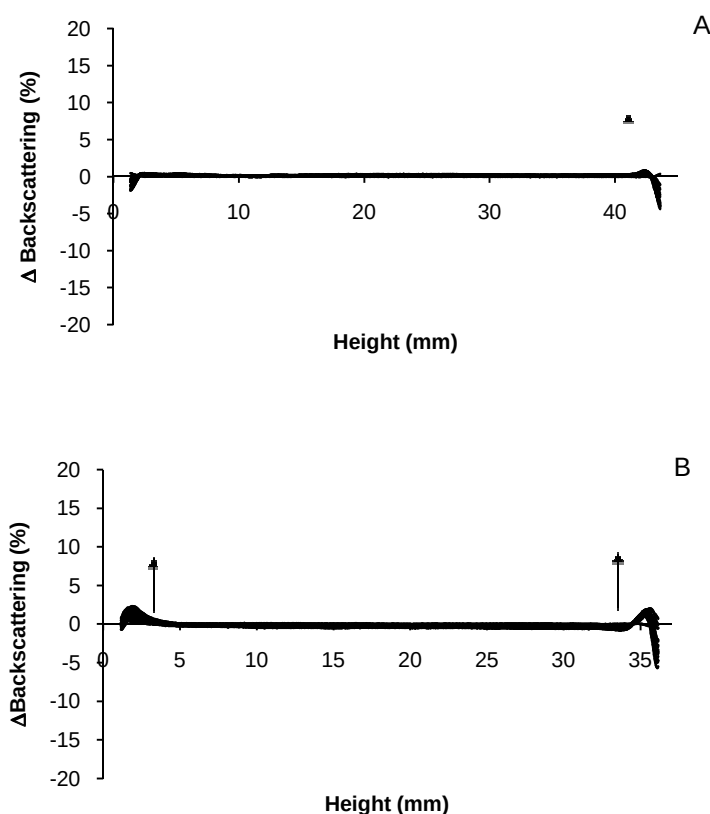


Fig. 5. Backscattering profiles of nanoparticles before (A) and after (B) coating with PC bilayer. Analysis was performed along the whole liquid column in the glass cell, at 25 °C. Data was collected at 40 μ m intervals and at every 20 minutes, during 24 hours.

3.4. *In vitro* drug release

The *in vitro* drug release profiles of PTX and GEN during 60 days are shown in Fig. 6. It can be observed that GEN is completely released during the initial 48 hours of the test, while PTX shows only a 10% release in the same time. The difference between the total amount of GEN and the amount quantified in the receptor medium (about 80%) results from the equilibrium reached between donor and receptor compartments after the complete release of the drug. After 60 days of analysis, almost 70% of PTX was released from nanoparticles. Solubility of PTX and GEN in the receptor medium (SLS 2.0%) was 672.65 ± 7.76 and 217.78 ± 8.82 $\mu\text{g/mL}$, respectively, ensuring sink conditions for the drug release assay. A noticeable temporal drug release pattern was observed. GEN entrapped in the surrounding lipid envelope of the nanoparticles was promptly released when compared to the sustained release of PTX encapsulated in the internal compartment of the polymeric core of these multicompartimental nanostructured systems.

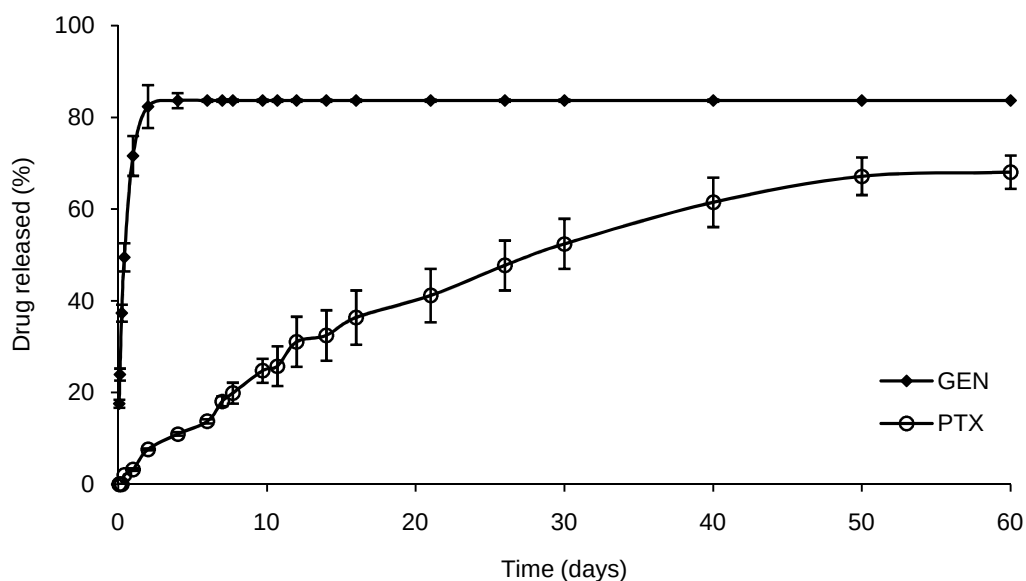


Fig. 6. *In vitro* drug release of paclitaxel (PTX) and genistein (GEN) from NC-PCs. Receptor medium was LSS 2% (w/v) separated from donor compartment by regenerated cellulose dialysis bags (MWCO 3500). Experiments were performed at 37°C during 60 days. Data represent mean $\pm$ SD (n=3).

3.5. *In vivo* assay

Each group of mice were treated with different nanoparticles formulations for up to 7 days. At the dose of 10mg/Kg/day of PTX, there was 95% and 96% tumor growth inhibition for groups G12P10 and G0P10, respectively, as shown in Fig. 7. However, animals presented diarrhea and

about 20% of weight loss at the end of the test, compared to their weight at the beginning of the test. With a 5-fold decrease in the dose of PTX in groups G12P2 and G0P2, tumor growth inhibition was 89%, similar to results found in groups G12P10 and G0P10 ($p>0.05$). In addition, animals from these groups did not show toxicity signals.

Group G0P0.2 receiving a dose of 0.2mg/Kg/day (50 times lower than the established dose) of PTX showed only 11% tumor growth inhibition. However, group G12P0.2, in which 12mg of GEN were added, presented 44% of tumor growth inhibition. This data implicate that the association of a low dose of PTX and GEN can significantly impact tumor growth inhibition.

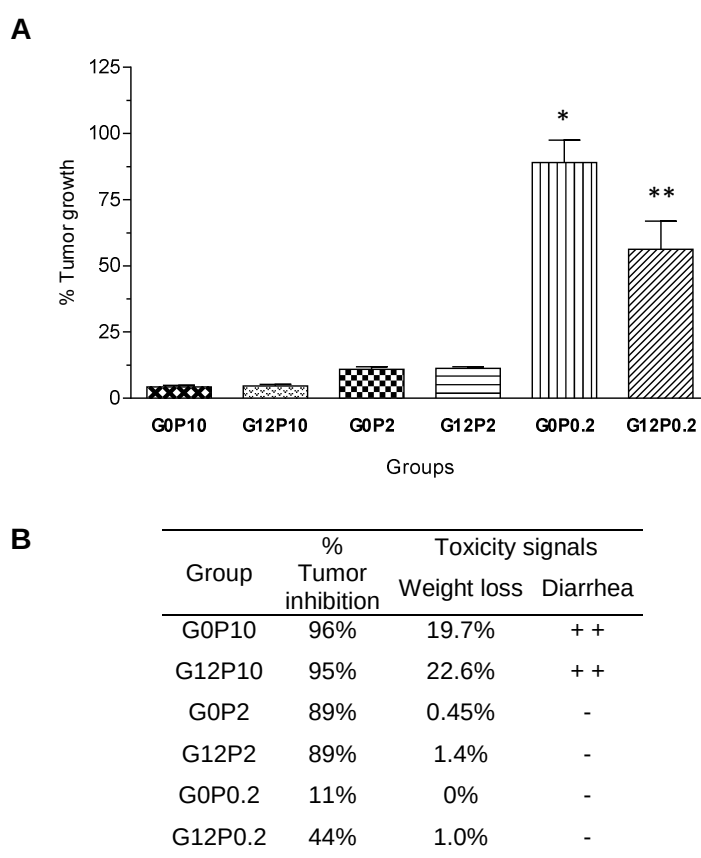


Fig. 7. Effect of different nanoparticle formulations of NC-PC and doses (GxPy, where x and y indicate mg/Kg/day of genistein and paclitaxel, respectively) on EAT-bearing mice. (A) Percentage of tumor growth, calculated in relation to the control group treated with blank nanoparticles. (B) Percentage of tumor inhibition and toxicity signals presented by animals from each group. Mice inoculated with EAT were treated with NC-PC for 7 days, starting 24h after tumor inoculation (2×10^6 cells). Results are the mean $\pm$ SD for 5 mice. Statistical analysis were performed using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison (* $p<0.05$).

Comparing ascitic fluid levels of VEGF, it was possible to see in Fig. 8 a significantly reduction on tumor levels of VEGF ($P < 0.05$) between the control group and G12P0.2. The presence of GEN reduced the amount of this cytokine by 58%. As there was a high tumor inhibition in groups G12P2 and G0P2, less than 2 ng of VEGF were quantified in the tumor.

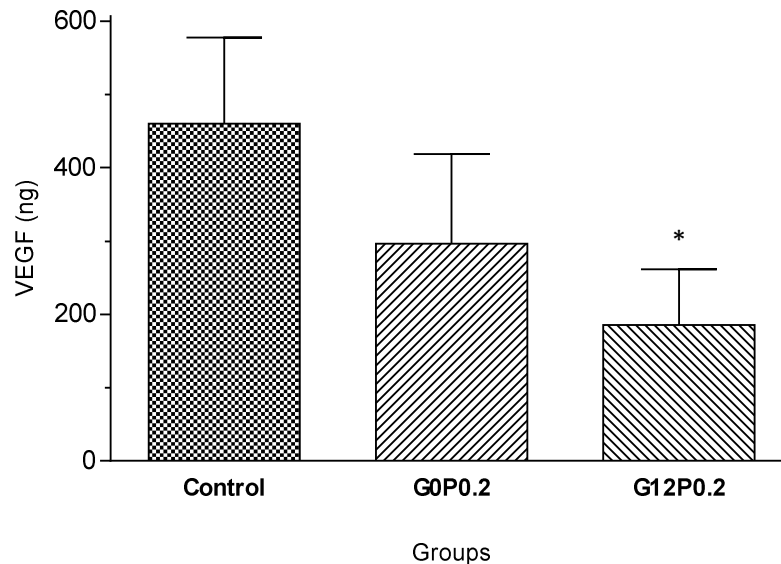


Fig. 8. Effect of treatment with nanoparticle formulations of NC-PC with a dose of 0.2mg/Kg/day of paclitaxel (G0P0.2) or in association with 12mg/Kg/day genistein (G12P0.2) on tumor levels of VEGF on day 8 post inoculation in EAT-bearing Swiss male mice. Tumor levels of VEGF were significantly ($p < 0.05$) lower than control when genistein was co-encapsulated in the nanoparticles. VEGF levels were measured using ELISA. Results are the mean $\pm$ SD for 5 mice. Statistical analysis were performed using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison (* $p < 0.05$).

Macroscopic analysis of the peritoneal wall of EAT-bearing mice (Fig. 9) allows the observation of visible changes in peritoneal vessels among different treatment protocols. The vessels were increased in number with a tortuous aspect, congested with erythrocytes and were highly dilated in EAT-bearing mice treated only with blank nanoparticles (Fig. 9B). The group where GEN was added to the treatment (Fig. 9D) presented lower density of vessels, which were not as congested or tortuous as PTX-only (Fig. 9C) and control groups, indicating its antiangiogenic effect, already shown by the evaluation of the presence of VEGF. Also, Image J analysis confirms a higher intensity of red from blood vessels in the control and G0P0.2 groups compared to G12P0.2.

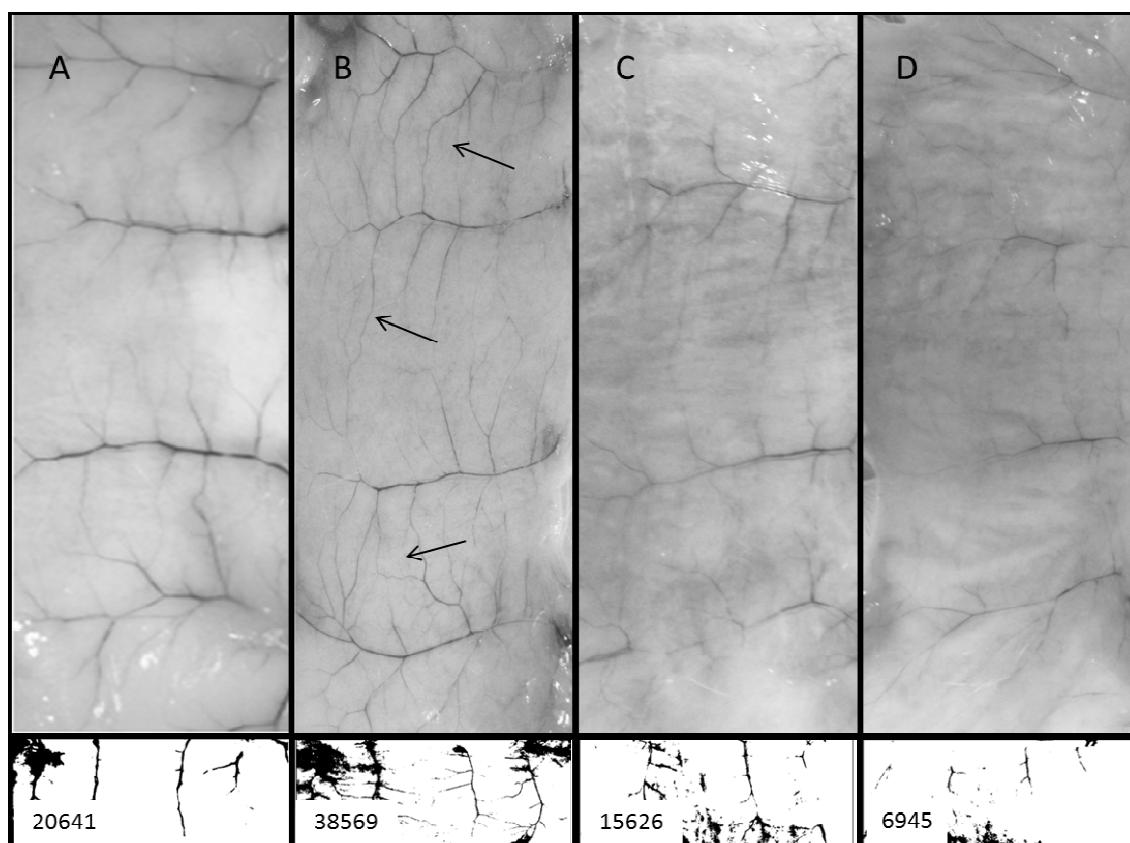


Fig. 8. Photographs of the peritoneal region of EAT-bearing mice treated with (A) blank nanoparticles, (B) 0.2mg/Kg/day of paclitaxel or (C) 0.2mg/Kg/day of paclitaxel in association with genistein (12mg/Kg/day) in nanoparticles. Intensity of blood vessels was obtained using Image J analysis and data are presented in each respective binary converted image. Arrows indicate areas of intense neovasculature.

4. Discussion

In this work, a nanostructured drug delivery system for the co-encapsulation of PTX and GEN was developed and characterized, and a different time release pattern for each drug was accomplished. Advantages and synergic effects of the combination of antiangiogenic and cytotoxic drugs have been demonstrated by several studies [32-34], however there are no reports in the literature of the association of PTX and GEN in nanostructured drug delivery systems. The encapsulation of PTX, a classical cytotoxic agent, in nanocarriers has been widely studied and presents many advantages over conventional formulations [13, 35, 36]. Conversely, very few reports are available applying nanotechnology to formulations with GEN, which also exhibits cytotoxic effects and a marked antiangiogenic activity [37-39].

Multicompartmental nanoparticles encapsulating both PTX and GEN were obtained with high encapsulation efficiency for both drugs, average diameter of approximately 150 nm and narrow size distribution. The inner core of the nanoparticles, represented by polymeric nanocapsules containing PTX presented a mean diameter of near 125nm. Following their coating by lipid bilayers entrapping GEN, DLS measurements indicated an increase of approximately 25 nm, which is consistent with the thickness of lipid bilayers [40-42]. Phospholipid bilayers assembled on the surface of the nanocapsules probably via hydrophilic interactions between the hydrophilic fraction of the surfactants in the water/polymer interface on the surface of the nanocapsules and the polar head group of the phospholipids. This process could be assumed since the DLS analysis showed a slight increase in diameter, maintaining a monomodal distribution, proved by the NTA analysis, which did not show any other population in different size distribution ranges after the lipid film envelope was formed. When liposomes of about 600 nm were prepared and mixed with uncoated nanocapsules, the presence of two nanoparticle populations, with distinct size distribution profiles, was observed. The NTA data clearly demonstrated the existence of two different populations of particles in the sample, with different light scattering intensities, showing that and the previously formed liposomes did not interact with the polymeric nanoparticles. These data support the hypotheses that PTX-loaded nanocapsules acted as a template for the assembling and deposition of the phospholipid bilayer containing GEN.

Variations of the backscattered (Δ BS) light obtained in this work remained within $\pm 2\%$ of the Δ BS scale, indicating the stability of the nanomedicine formulation, since no variation in particle diameter was observed. Multiple light scattering analysis is a valuable tool in estimating the stability of disperse systems. Data indicated very mild sedimentation and creaming phenomena and in a very slow rate, both easily reversible. Variations greater than 10% of the BS are indicative of formulation instability, typical from formulations with marked differences between disperse and continuous phases, which could compromise formulation homogeneity [43, 44].

A temporal drug release profile for each drug was observed. As GEN is entrapped in the outer lipid bilayer, it was completely released in the first 48 hours of the assay. After disruption of the bilayer, the polymer becomes available to undergo degradation and slowly release PTX, as the direct contact between water and the PLGA core increases. A sustained release of PTX is then observed. This multimodal release profile represents an interesting approach for intratumoral

delivery. The prompt release of the antiangiogenic drug initiates the mechanism of inhibiting neoangiogenesis while the cytotoxic drug, sustainably released from the nanoparticles in the tumoral mass would promote its shrinkage. Sequential anti-angiogenesis and anticancer functions were also investigated by Wang and Ho [21], co-encapsulating PTX and combretastatin A4 (CA4), with promising results [11, 21, 45]. In this work, the concept of co-encapsulation with temporal drug release was expanded to an in vivo experiment, with intratumoral administration of the nanomedicine, demonstrating additional advantages of this nanostructured drug delivery formulation.

GEN also proved its antiangiogenic effect reducing the levels of VEGF and preventing the formation of new blood vessels. GEN is a drug widely known to decrease the expression of VEGF, preventing the neoangiogenesis, which could support tumor growth [22, 24, 46]. Although VEGF is essential for tumor growth, other angiogenic factors are produced and may compensate for the decreased levels of this cytokine [19, 47], hence the need of associating GEN with cytotoxic drugs.

Administration of the multicompartimental nanoparticles co-encapsulating PTX and GEN into EAT bearing mice clearly indicated an increased performance of the antitumoral activity of the nanomedicine formulation. The administration of 0.2mg/Kg/day of PTX associated with 12mg/Kg/day of GEN inhibited tumor growth by 44%, along with a 58% decrease in VEGF levels. In contrast, nanoparticles containing only PTX, in the same dose, were able to inhibit only 11% of tumor growth. A 4-fold increase in the antitumoral activity was observed when both drugs were co-encapsulated into the multicompartimental nanoparticles.

5. Conclusion

The development of a multicompartimental nanostructured drug delivery system consisting of a PLGA nanocapsule core and a phospholipid bilayer envelope co-encapsulating both paclitaxel and genistein was successfully achieved. Physico-chemical characteristics of these nanoparticles resulted in very high entrapment efficiency for both drugs with a sustained drug release profile in different stages. Genistein showed a potential role in tumor inhibition, preventing the formation of new blood vessels and markedly reducing VEGF levels. The antiangiogenic activity of genistein and its additional effect when associated with a low dose of paclitaxel highlight the potential of multicompartimental nanostructured drug delivery systems for the combination therapy in cancer

treatment, simultaneously targeting multiple pathways towards more effective antitumoral strategies.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian research funding agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Pesquisas (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (FUNAPE) and Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

References

- [1] Uramoto H, Nakanishi R, Nagashima A, Uchiyama A, Inoue M, Osaki T, et al. A randomized phase II trial of adjuvant chemotherapy with bi-weekly carboplatin plus paclitaxel versus carboplatin plus gemcitabine in patients with completely resected non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2010;30:4695-9.
- [2] Pishvaian MJ, Slack R, Koh EY, Beumer JH, Hartley ML, Cotarla I, et al. A Phase I clinical trial of the combination of imatinib and paclitaxel in patients with advanced or metastatic solid tumors refractory to standard therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012;70:843-53.
- [3] Feng S-S, Zhao L, Zhang Z, Bhakta G, Yin Win K, Dong Y, et al. Chemotherapeutic engineering: Vitamin E TPGS-emulsified nanoparticles of biodegradable polymers realized sustainable paclitaxel chemotherapy for 168 h in vivo. *Chemical Engineering Science.* 2007;62:6641-8.
- [4] Burris HA, 3rd, Dowlati A, Moss RA, Infante JR, Jones SF, Spigel DR, et al. Phase I study of pazopanib in combination with paclitaxel and carboplatin given every 21 days in patients with advanced solid tumors. *Mol Cancer Ther.* 2012;11:1820-8.
- [5] Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer.* 2001;37:1590-8.
- [6] Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, et al. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:7794-803.
- [7] Alberts DS, Blessing JA, Landrum LM, Warshal DP, Martin LP, Rose SL, et al. Phase II trial of nab-paclitaxel in the treatment of recurrent or persistent advanced cervix cancer: A gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol.* 2012;127:451-5.
- [8] Frese KK, Neesse A, Cook N, Bapiro TE, Lolkema MP, Jodrell DI, et al. nab-Paclitaxel potentiates gemcitabine activity by reducing cytidine deaminase levels in a mouse model of pancreatic cancer. *Cancer Discov.* 2012;2:260-9.

- [9] Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2007;357:2666-76.
- [10] Cella D, Wang M, Wagner L, Miller K. Survival-adjusted health-related quality of life (HRQL) among patients with metastatic breast cancer receiving paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone: results from Eastern Cooperative Oncology Group Study 2100 (E2100). *Breast Cancer Res Treat*. 2011;130:855-61.
- [11] Wang Z, Chui WK, Ho PC. Nanoparticulate delivery system targeted to tumor neovasculature for combined anticancer and antiangiogenesis therapy. *Pharm Res*. 2011;28:585-96.
- [12] Ahmed F, Pakunlu RI, Brannan A, Bates F, Minko T, Discher DE. Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. *Journal of Controlled Release*. 2006;116:150-8.
- [13] Guo C, Liu S, Dai Z, Jiang C, Li W. Polydiacetylene vesicles as a novel drug sustained-release system. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;76:362-5.
- [14] Wang C, Wang Y, Fan M, Luo F, Qian Z. Characterization, pharmacokinetics and disposition of novel nanoscale preparations of paclitaxel. *Int J Pharm*. 2011;414:251-9.
- [15] Wu J, Lu Y, Lee A, Pan X, Yang X, Zhao X, et al. Reversal of Multidrug Resistance by Transferrin-Conjugated Liposomes Co-encapsulating Doxorubicin and Verapamil. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 2007;10:350-7.
- [16] Wang H, Zhao Y, Wu Y, Hu YL, Nan K, Nie G, et al. Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLGA copolymer nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32:8281-90.
- [17] Cosco D, Paolino D, Maiuolo J, D R, M F. Liposomes as multicompartmental carriers for multidrug delivery in anticancer chemotherapy. *Drug Deliv and Transl Res*. 2011;1:66-75.
- [18] Bamias A, Pignata S, Pujade-Lauraine E. Angiogenesis: A promising therapeutic target for ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012.
- [19] El-Azab M, Hishe H, Moustafa Y, El-Awady el S. Anti-angiogenic effect of resveratrol or curcumin in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *Eur J Pharmacol*. 2011;652:7-14.
- [20] Sheela ML, Ramakrishna MK, Salimath BP. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by Glycyrrhiza glabra. *Int Immunopharmacol*. 2006;6:494-8.
- [21] Wang Z, Ho PC. Self-assembled core-shell vascular-targeted nanocapsules for temporal antivasculature and anticancer activities. *Small*. 2010;6:2576-83.
- [22] Su SJ, Yeh TM, Chuang WJ, Ho CL, Chang KL, Cheng HL, et al. The novel targets for anti-angiogenesis of genistein on human cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2005;69:307-18.
- [23] Pavese JM, Farmer RL, Bergan RC. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29:465-82.
- [24] Yu X, Zhu J, Mi M, Chen W, Pan Q, Wei M. Anti-angiogenic genistein inhibits VEGF-induced endothelial cell activation by decreasing PTK activity and MAPK activation. *Med Oncol*. 2012;29:349-57.
- [25] Blagosklonny MV. Antiangiogenic therapy and tumor progression. *Cancer Cell*. 2004;5:13-7.

- [26] Hwang JT, Ha J, Park OJ. Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332:433-40.
- [27] Li Y, Kucuk O, Hussain M, Abrams J, Cher ML, Sarkar FH. Antitumor and antimetastatic activities of docetaxel are enhanced by genistein through regulation of osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/MMP-9 signaling in prostate cancer. *Cancer Res*. 2006;66:4816-25.
- [28] Zhang B, Shi ZL, Liu B, Yan XB, Feng J, Tao HM. Enhanced anticancer effect of gemcitabine by genistein in osteosarcoma: the role of Akt and nuclear factor-kappaB. *Anticancer Drugs*. 2010;21:288-96.
- [29] Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res*. 2010;27:796-810.
- [30] Mengual O, Meunier G, Cayre I, Puech K, Snabre P. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*. 1999;50:445-56.
- [31] Nogueira IA, Leao AB, Vieira Mde S, Benfica PL, da Cunha LC, Valadares MC. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. *J Ethnopharmacol*. 2008;120:474-8.
- [32] Teicher BA, Sotomayor EA, Huang ZD. Antiangiogenic Agents Potentiate Cytotoxic Cancer Therapies against Primary and Metastatic Disease. *Cancer Research*. 1992;52:6702-4.
- [33] Folkins C, Man S, Xu P, Shaked Y, Hicklin DJ, Kerbel RS. Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors. *Cancer Res*. 2007;67:3560-4.
- [34] Casneuf VF, Demetter P, Boterberg T, Delrue L, Peeters M, Van Damme N. Antiangiogenic versus cytotoxic therapeutic approaches in a mouse model of pancreatic cancer: an experimental study with a multitarget tyrosine kinase inhibitor (sunitinib), gemcitabine and radiotherapy. *Oncol Rep*. 2009;22:105-13.
- [35] Al-Ghananeem AM, Malkawi AH, Muammer YM, Balko JM, Black EP, Mourad W, et al. Intratumoral delivery of Paclitaxel in solid tumor from biodegradable hyaluronan nanoparticle formulations. *AAPS PharmSciTech*. 2009;10:410-7.
- [36] Mo Y, Lim LY. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: potentiation of anticancer activity by surface conjugation with wheat germ agglutinin. *J Control Release*. 2005;108:244-62.
- [37] Vargas BA, Bidone J, Oliveira LK, Koester LS, Bassani VL, Teixeira HF. Development of topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions. *J Biomed Nanotechnol*. 2012;8:330-6.
- [38] Si HY, Li DP, Wang TM, Zhang HL, Ren FY, Xu ZG, et al. Improving the anti-tumor effect of genistein with a biocompatible superparamagnetic drug delivery system. *J Nanosci Nanotechnol*. 2010;10:2325-31.
- [39] Zampieri ALTC, Ferreira FS, Resende EC, Gaeti MPN, Diniz DGA, Taveira SF, et al. Biodegradable Polymeric Nanocapsules Based on Poly(DL-lactide) for Genistein Topical Delivery: Obtention, Characterization and Skin Permeation Studies. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2013;9:527-34.
- [40] Lewis BA, Engelman DM. Lipid Bilayer Thickness Varies Linearly with Acyl Chain-Length in Fluid Phosphatidylcholine Vesicles. *J Mol Biol*. 1983;166:211-7.

- [41] Lis LJ, Mcalister M, Fuller N, Rand RP, Parsegian VA. Interactions between Neutral Phospholipid-Bilayer Membranes. *Biophysical Journal*. 1982;37:657-65.
- [42] Balgavy P, Dubnickova M, Kucerka N, Kiselev MA, Yaradaikin SP, Uhrikova D. Bilayer thickness and lipid interface area in unilamellar extruded 1,2-diacylphosphatidylcholine liposomes: a small-angle neutron scattering study. *Bba-Biomembranes*. 2001;1512:40-52.
- [43] Lemarchand C, Couvreur P, Vauthier C, Costantini D, Gref R. Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. *Int J Pharm*. 2003;254:77-82.
- [44] Celia C, Trapasso E, Cosco D, Paolino D, Fresta M. Turbiscan lab expert analysis of the stability of ethosomes and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2009;72:155-60.
- [45] Wang Z, Ho PC. A nanocapsular combinatorial sequential drug delivery system for antiangiogenesis and anticancer activities. *Biomaterials*. 2010;31:7115-23.
- [46] Banerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett*. 2008;269:226-42.
- [47] Yoshiji H, Harris SR, Thorgeirsson UP. Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued in vivo growth of human breast carcinoma cells. *Cancer Res*. 1997;57:3924-8.

6 CONCLUSÕES

Um sistema multicompartimental nanoestruturado com núcleo de PLGA e envelope fosfolipídico co-encapsulando paclitaxel e genisteína foi desenvolvido e caracterizado físico-quimicamente. As características físico-químicas das NC-PC proporcionaram uma liberação controlada dos fármacos do nanosistema em diferentes etapas. A inibição do tumor de cerca de 90% foi obtida *in vivo*, com uma dose aproximadamente 5 vezes mais baixa que a utilizada para a quimioterapia atual com nanopartículas de paclitaxel. A genisteína mostrou-se promissora na inibição do tumor, especialmente na angiogênese, inibindo a formação de novos vasos na região peritoneal de camundongos com TAE tratados com o fármaco e diminuindo os níveis de VEGF nesses animais. O papel antiangiogênico de genisteína e seu efeito sinérgico quando associada a uma baixa dose de paclitaxel destaca as partículas nanoestruturadas desenvolvidos como uma potencial estratégia para o tratamento do câncer.

7 REFERÊNCIAS

AGRAWAL, S. S.; SARASWATI, S.; MATHUR, R.; PANDEY, M. Cytotoxic and antitumor effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. **Life Sci**, v. 89, p. 147-58, 2011.

AHMED, F.; PAKUNLU, R. I.; BRANNAN, A.; BATES, F.; MINKO, T.; DISCHER, D. E. Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. **Journal of Controlled Release**, v. 116, p. 150-158, 2006.

AL-GHANANEEM, A. M.; MALKAWI, A. H.; MUAMMER, Y. M.; BALKO, J. M.; BLACK, E. P.; MOURAD, W.; ROMOND, E. Intratumoral delivery of Paclitaxel in solid tumor from biodegradable hyaluronan nanoparticle formulations. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, p. 410-7, 2009.

BAMIAS, A.; PIGNATA, S.; PUJADE-LAURINE, E. Angiogenesis: A promising therapeutic target for ovarian cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, 2012.

BANDEKAR, A.; KARVE, S.; CHANG, M.-Y.; MU, Q.; ROTOLO, J.; SOFOU, S. Antitumor efficacy following the intracellular and interstitial release of liposomal doxorubicin. **Biomaterials**, v. 33, p. 4345-4352, 2012.

BANERJEE, S.; LI, Y.; WANG, Z.; SARKAR, F. H. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. **Cancer Lett**, v. 269, p. 226-42, 2008.

BLAGOSKLONNY, M. V. Antiangiogenic therapy and tumor progression. **Cancer Cell**, v. 5, p. 13-7, 2004.

CAI, S.; VIJAYAN, K.; CHENG, D.; LIMA, E. M.; DISCHER, D. E. Micelles of different morphologies--advantages of worm-like filomicelles of PEO-PCL in paclitaxel delivery. **Pharm Res**, v. 24, p. 2099-109, 2007.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, p. 249-57, 2000.

CASNEUF, V. F.; DEMETTER, P.; BOTERBERG, T.; DELRUE, L.; PEETERS, M.; VAN DAMME, N. Antiangiogenic versus cytotoxic therapeutic approaches in a mouse model of pancreatic cancer: an experimental study with a multitarget tyrosine kinase inhibitor (sunitinib), gemcitabine and radiotherapy. **Oncol Rep**, v. 22, p. 105-13, 2009.

CELLA, D.; WANG, M.; WAGNER, L.; MILLER, K. Survival-adjusted health-related quality of life (HRQL) among patients with metastatic breast cancer receiving paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone: results from Eastern Cooperative Oncology Group Study 2100 (E2100). **Breast Cancer Res Treat**, v. 130, p. 855-61, 2011.

CHOI, E. J.; KIM, T.; LEE, M. S. Pro-apoptotic effect and cytotoxicity of genistein and genistin in human ovarian cancer SK-OV-3 cells. **Life Sci**, v. 80, p. 1403-8, 2007.

CROSASSO, P.; CERUTI, M.; BRUSA, P.; ARPICCO, S.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. **J Control Release**, v. 63, p. 19-30, 2000.

DANHIER, F.; LECOUTURIER, N.; VROMAN, B.; JEROME, C.; MARCHAND-BRYNAERT, J.; FERON, O.; PREAT, V. Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. **J Control Release**, v. 133, p. 11-7, 2009.

DEMIRAY, M.; KURT, E.; EVRENSEL, T.; KANAT, O.; ARSLAN, M.; SARAYDAROGLU, O.; ERCAN, I.; GONULLU, G.; GOKGOZ, S.; TOPAL, U.; TOLUNAY, S.; TASDELEN, I.; MANAVOGLU, O. Phase II study of gemcitabine plus paclitaxel in metastatic breast cancer patients with prior anthracycline exposure. **Cancer Invest**, v. 23, p. 386-91, 2005.

DESAI, N.; TRIEU, V.; YAO, Z.; LOUIE, L.; CI, S.; YANG, A.; TAO, C.; DE, T.; BEALS, B.; DYKES, D.; NOKER, P.; YAO, R.; LABAO, E.; HAWKINS, M.; SOON-SHIONG, P. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. **Clin Cancer Res**, v. 12, p. 1317-24, 2006.

DINIZ, D. G. A.; ALVES, C. P. I.; CASTRO, N. C.; RODOVALHO, L. F. F.; BENFICA, P. L.; VALADARES, M. C.; LIMA, E. M. Isotretinoin-Containing Liposomes: Obtention, Characterization and In Vitro Cytotoxicity on Leukemia Cells. **Applied Cancer Research**, v. 28, p. 106-112, 2008.

DONG, Y.; FENG, S.-S. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles prepared by high pressure homogenization for paclitaxel chemotherapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 342, p. 208-214, 2007.

DONG, X.; MUMPER, R. J. Nanomedicinal strategies to treat multidrug-resistant tumors: current progress. **Nanomedicine (Lond)**, v. 5, p. 597-615, 2010.

DUGGAN, S. T.; KEATING, G. M. Pegylated liposomal doxorubicin: a review of its use in metastatic breast cancer, ovarian cancer, multiple myeloma and AIDS-related Kaposi's sarcoma. **Drugs**, v. 71, p. 2531-58, 2011.

EL-AZAB, M.; HISHE, H.; MOUSTAFA, Y.; EL-AWADY EL, S. Anti-angiogenic effect of resveratrol or curcumin in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. **Eur J Pharmacol**, v. 652, p. 7-14, 2011.

FIORAVANTIA, L.; CAPPELLETTIA, V.; MIODINIA, P.; RONCHIA, E.; BRIVIOA, M.; FRONZOA, G. D. Genistein in the control of breast cancer cell growth: insights

into the mechanism of action in vitro. **Cancer Letters** **130**, v. 130, p. 143–152, 1998.

FOTSIS, T.; PEPPER, M.; ADLERCREUTZ, H.; HASE, T.; MONTESANO, R.; SCHWEIGERER, L. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 790S-797S, 1995.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, p. 511-518, 2005.

FUKUTAKE, M.; TAKAHASHI, M.; ISHIDA, K.; KAWAMURA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. **Food Chem Toxicol**, v. 34, p. 457-61, 1996.

GELDERBLOM, H.; VERWEIJ, J.; NOOTER, K.; SPARREBOOM, A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. **Eur J Cancer**, v. 37, p. 1590-8, 2001.

GLOBOCAN. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008., Lyon, 2012. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr> >. Acesso em: 3 de junho.

GOSSNER, G.; CHOI, M.; TAN, L.; FOGOROS, S.; GRIFFITH, K. A.; KUENKER, M.; LIU, J. R. Genistein-induced apoptosis and autophagocytosis in ovarian cancer cells. **Gynecol Oncol**, v. 105, p. 23-30, 2007.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin Oncol**, v. 23, p. 1011-27, 2005.

HUIZING, M. T.; MISSER, V. H.; PIETERS, R. C.; TEN BOKKEL HUININK, W. W.; VEENHOF, C. H.; VERMORKEN, J. B.; PINEDO, H. M.; BEIJNEN, J. H. Taxanes: a new class of antitumor agents. **Cancer Invest**, v. 13, p. 381-404, 1995.

HWANG, J. T.; HA, J.; PARK, O. J. Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 332, p. 433-40, 2005.

IBRAHIM, N. K.; DESAI, N.; LEGHA, S.; SOON-SHIONG, P.; THERIAULT, R. L.; RIVERA, E.; ESMAELI, B.; RING, S. E.; BEDIKIAN, A.; HORTOBAGYI, G. N.; ELLERHORST, J. A. Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. **Clin Cancer Res**, v. 8, p. 1038-44, 2002.

INCA. Câncer: tratamento., Rio de Janeiro, 2012a. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>>. Acesso em: 3 de junho.

_____. **Estimativas 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro 2012b.

KANG, K. W.; CHUN, M. K.; KIM, O.; SUBEDI, R. K.; AHN, S. G.; YOON, J. H.; CHOI, H. K. Doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles to overcome multidrug resistance in cancer therapy. **Nanomedicine**, v. 6, p. 210-3, 2010.

KERBEL, R. S. Tumor angiogenesis. **N Engl J Med**, v. 358, p. 2039-49, 2008.

KIM, H.; PETERSON, T. G.; BARNES, S. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 1419S-1425S, 1998.

KOLISHETTI, N.; DHAR, S.; VALENCIA, P. M.; LIN, L. Q.; KARNIK, R.; LIPPARD, S. J.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Engineering of self-assembled nanoparticle platform for precisely controlled combination drug therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, p. 17939-44, 2010.

KUZUMAKI, T.; KOBAYASHI, T.; ISHIKAWA, K. Genistein induces p21(Cip1/WAF1) expression and blocks the G1 to S phase transition in mouse fibroblast and melanoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 251, p. 291-5, 1998.

LEE, J. Y.; KIM, K. S.; KANG, Y. M.; KIM, E. S.; HWANG, S. J.; LEE, H. B.; MIN, B. H.; KIM, J. H.; KIM, M. S. In vivo efficacy of paclitaxel-loaded injectable in situ-forming gel against subcutaneous tumor growth. **Int J Pharm**, v. 392, p. 51-6, 2010.

LEE, S. C.; HUH, K. M.; LEE, J.; CHO, Y. W.; GALINSKY, R. E.; PARK, K. Hydrotropic polymeric micelles for enhanced paclitaxel solubility: in vitro and in vivo characterization. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 202-8, 2007.

LI, Y.; KUCUK, O.; HUSSAIN, M.; ABRAMS, J.; CHER, M. L.; SARKAR, F. H. Antitumor and antimetastatic activities of docetaxel are enhanced by genistein through regulation of osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/MMP-9 signaling in prostate cancer. **Cancer Res**, v. 66, p. 4816-25, 2006.

LIGGINS, J.; BLUCK, L. J.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W. A.; BINGHAM, S. A. Daidzein and genistein contents of vegetables. **Br J Nutr**, v. 84, p. 717-25, 2000.

LIU, Y.; LI, K.; PAN, J.; LIU, B.; FENG, S.-S. Folic acid conjugated nanoparticles of mixed lipid monolayer shell and biodegradable polymer core for targeted delivery of Docetaxel. **Biomaterials**, v. 31, p. 330-338, 2010.

MAGEE, P. J.; ROWLAND, I. R. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. **Br J Nutr**, v. 91, p. 513-31, 2004.

MAEDA, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. **Adv Enzyme Regul**, v. 41, p. 189-207, 2001.

MAJID, S. et al. Genistein induces the p21WAF1/CIP1 and p16INK4a tumor suppressor genes in prostate cancer cells by epigenetic mechanisms involving active chromatin modification. **Cancer Res**, v. 68, p. 2736-44, 2008.

MICHA, J. P.; GOLDSTEIN, B. H.; BIRK, C. L.; RETTENMAIER, M. A.; BROWN, J. V., 3RD. Abraxane in the treatment of ovarian cancer: the absence of hypersensitivity reactions. **Gynecol Oncol**, v. 100, p. 437-8, 2006.

MILLER, K.; WANG, M.; GRALOW, J.; DICKLER, M.; COBLEIGH, M.; PEREZ, E. A.; SHENKIER, T.; CELLA, D.; DAVIDSON, N. E. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. **N Engl J Med**, v. 357, p. 2666-76, 2007.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

MOTA, M. F.; BENFICA, P. L.; BATISTA, A. C.; MARTINS, F. S.; DE PAULA, J. R.; VALADARES, M. C. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. **J Ethnopharmacol**, v. 139, p. 319-29, 2012.

NOGUEIRA, I. A.; LEO, A. B.; VIEIRA MDE, S.; BENFICA, P. L.; DA CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. **J Ethnopharmacol**, v. 120, p. 474-8, 2008.

NUSSENBAUM, F.; HERMAN, I. M. Tumor angiogenesis: insights and innovations. **J Oncol**, v. 2010, p. 132641, 2010.

NYMAN, D. W.; CAMPBELL, K. J.; HERSH, E.; LONG, K.; RICHARDSON, K.; TRIEU, V.; DESAI, N.; HAWKINS, M. J.; VON HOFF, D. D. Phase I and pharmacokinetics trial of ABI-007, a novel nanoparticle formulation of paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies. **J Clin Oncol**, v. 23, p. 7785-93, 2005.

PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 282, p. C947-70, 2002.

PAVESE, J. M.; FARMER, R. L.; BERGAN, R. C. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, p. 465-82, 2010.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

RANGANATHAN, R. et al. Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 1043-60, 2012.

RANSON, M. R.; CHEESEMAN, S.; WHITE, S.; MARGISON, J. Caelyx (stealth liposomal doxorubicin) in the treatment of advanced breast cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 37, p. 115-20, 2001.

RIBEIRO, L. R. **Encapsulação da genisteína em lipossomas: caracterização das interações fármaco-lipídeo, estabilidade e atividade antioxidante**. 2008. (Mestrado). Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SAHOO, S. K.; DILNAWAZ, F.; KRISHNAKUMAR, S. Nanotechnology in ocular drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 144-151, 2008.

SALVADOR-MORALES, C.; ZHANG, L.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Immunocompatibility properties of lipid-polymer hybrid nanoparticles with heterogeneous surface functional groups. **Biomaterials**, v. 30, p. 2231-2240, 2009.

SHEELA, M. L.; RAMAKRISHNA, M. K.; SALIMATH, B. P. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by Glycyrrhiza glabra. **Int Immunopharmacol**, v. 6, p. 494-8, 2006.

SHIBUYA, M.; LUO, J. C.; TOYODA, M.; YAMAGUCHI, S. Involvement of VEGF and its receptors in ascites tumor formation. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 43 Suppl, p. S72-7, 1999.

SHIKANOV, A.; SHIKANOV, S.; VAISMAN, B.; GOLENSER, J.; DOMB, A. J. Paclitaxel tumor biodistribution and efficacy after intratumoral injection of a biodegradable extended release implant. **Int J Pharm**, v. 358, p. 114-20, 2008.

SI, H. Y.; LI, D. P.; WANG, T. M.; ZHANG, H. L.; REN, F. Y.; XU, Z. G.; ZHAO, Y. Y. Improving the anti-tumor effect of genistein with a biocompatible superparamagnetic drug delivery system. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 10, p. 2325-31, 2010.

SILVA, L. M. **Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) contendo genisteína para uso tópico**. 2012. (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SINGLA, A. K.; GARG, A.; AGGARWAL, D. Paclitaxel and its formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, p. 179-192, 2002.

STELLA, B.; ARPICCO, S.; ROCCO, F.; MARSAUD, V.; RENOIR, J.-M.; CATTEL, L.; COUVREUR, P. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 71-77, 2007.

SU, S. J.; YEH, T. M.; CHUANG, W. J.; HO, C. L.; CHANG, K. L.; CHENG, H. L.; LIU, H. S.; HSU, P. Y.; CHOW, N. H. The novel targets for anti-angiogenesis of genistein on human cancer cells. **Biochem Pharmacol**, v. 69, p. 307-18, 2005.

VARGAS, B. A.; BIDONE, J.; OLIVEIRA, L. K.; KOESTER, L. S.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F. Development of topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions. **J Biomed Nanotechnol**, v. 8, p. 330-6, 2012.

WANG, C.; WANG, Y.; FAN, M.; LUO, F.; QIAN, Z. Characterization, pharmacokinetics and disposition of novel nanoscale preparations of paclitaxel. **Int J Pharm**, v. 414, p. 251-9, 2011.

WANG, H.; ZHAO, Y.; WU, Y.; HU, Y. L.; NAN, K.; NIE, G.; CHEN, H. Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLGA copolymer nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, p. 8281-90, 2011.

WU, J.-G.; GE, J.; ZHANG, Y.-P.; YU, Y.; ZHANG, X.-Y. Solubility of Genistein in Water, Methanol, Ethanol, Propan-2-ol, 1-Butanol, and Ethyl Acetate from (280 to 333) K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 55, p. 5285-5288, 2010.

XU, B.; JIANG, Z.; KIM, S. B.; YU, S.; FENG, J.; MALZYNER, A.; DEL GIGLIO, A.; CHUNG, H. C.; SHEN, L. J.; PEN, D. L. Biweekly gemcitabine-paclitaxel, gemcitabine-carboplatin, or gemcitabine-cisplatin as first-line treatment in metastatic breast cancer after anthracycline failure: a phase II randomized selection trial. **Breast Cancer**, v. 18, p. 203-12, 2011.

YAMAMOTO, Y.; KAWANO, I.; IWASE, H. Nab-paclitaxel for the treatment of breast cancer: efficacy, safety, and approval. **Onco Targets Ther**, v. 4, p. 123-36, 2011.

YANG, T.; CUI, F. D.; CHOI, M. K.; CHO, J. W.; CHUNG, S. J.; SHIM, C. K.; KIM, D. D. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: in vitro and in vivo evaluation. **Int J Pharm**, v. 338, p. 317-26, 2007.

YU, X.; ZHU, J.; MI, M.; CHEN, W.; PAN, Q.; WEI, M. Anti-angiogenic genistein inhibits VEGF-induced endothelial cell activation by decreasing PTK activity and MAPK activation. **Med Oncol**, v. 29, p. 349-57, 2012.

YU, Z.; LI, W.; LIU, F. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. **Cancer Lett**, v. 215, p. 159-66, 2004.

ZAMPIERI, A. L. T. C. **Desenvolvimento, Caracterização e Avaliação da Permeação Cutânea da Isoflavona Genisteína em Nanocápsulas Poliméricas**. 2009. (Doutorado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

ZHANG, B.; SHI, Z. L.; LIU, B.; YAN, X. B.; FENG, J.; TA, H. M. Enhanced anticancer effect of gemcitabine by genistein in osteosarcoma: the role of Akt and nuclear factor-kappaB. **Anticancer Drugs**, v. 21, p. 288-96, 2010.