UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Micelas de longo tempo de circulação contendo tamoxifeno
como sistema nanocarreador para otimização da terapia
do câncer de mama**

Marina Claro de Souza

Ribeirão Preto

– 2013 –

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Micelas de longo tempo de circulação contendo tamoxifeno
como sistema nanocarreador para otimização da terapia
do câncer de mama**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Marina Claro de Souza
**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Maldonado
Marchetti**

Ribeirão Preto

– 2013 –

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Souza, Marina Claro de

Micelas de longo tempo de circulação contendo tamoxifeno como sistema nanocarreador para otimização da terapia do câncer de mama. Ribeirão Preto, 2013.

124 p.: il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Marchetti, Juliana Maldonado.

1. Micelas à base de DSPE-PEG(2000)/TPGS. 2. Tamoxifeno. 3. Estudos *in vitro* e *in vivo*. 4. Câncer de mama.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marina Claro de Souza

“Micelas de longo tempo de circulação contendo tamoxifeno como sistema nanocarreador para otimização da terapia do câncer de mama”

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção de título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana M. Marchetti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Data: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Data: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Data: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Data: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Data: _____

Às pessoas mais preciosas da minha vida,

Meus adorados pais, Maria Aparecida e Benedito, grandes exemplos de amor e coragem, por terem se empenhado tanto para me dar uma boa educação e me ensinado a não me curvar diante das adversidades,

Meus queridos irmãos, Marcelo e Mateus, que, ainda que às vezes à distância, sempre estiveram ao meu lado em pensamento, me apoiando e torcendo por mim,

Meu marido e amado companheiro Luís Gustavo, por seu carinho, amizade e dedicação. Pelas diversas ocasiões em que compreendeu minha ausência para que eu pudesse estudar. Por todas as vezes que me ofereceu colo nos momentos de dificuldade e se alegrou com minhas conquistas,

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que, em seu infinito amor, me proporcionou mais esta oportunidade de crescimento moral e intelectual.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Juliana M. Marchetti, por todo o conhecimento que me foi transmitido, com imenso carinho e generosidade, bem como por sua amizade e respeito.

Ao Prof. Dr. Roberto S. Santana, da FCFRP-USP, pelo empréstimo de seu espectrofotômetro infravermelho. Ao técnico de laboratório Clóvis R. da Silva Jr. pela execução das análises.

Ao Prof. Dr. João Luis C. Lopes, da FCFRP-USP, pelo auxílio na interpretação dos espectros de absorção no infravermelho.

À Prof. Dr^a. Rose Mary Z. G. Naal, da FCFRP-USP, por ter gentilmente permitido o uso de seu fluorímetro.

À Prof. Dr^a. Glória Emília P. de Souza, da FCFRP-USP, pelas orientações sobre estudos *in vivo* em modelo animal. À técnica de laboratório Miriam Cristina C. de Melo, por treinar-me nos procedimentos de anestesia e punção cardíaca.

À Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Lanchote, da FCFRP-USP, pelos esclarecimentos sobre análise de amostras biológicas e por ter gentilmente fornecido a substância empregada como padrão interno no método bioanalítico. À especialista de laboratório Dr^a. Maria Paula M. Pereira por auxiliar no desenvolvimento do procedimento de extração e purificação das amostras de plasma.

Ao Prof. Dr. João B. Valim, da FFCLRP-USP, e à Dr^a. Fabiana T. M. C. Vicentini, da FCFRP-USP, pelas importantes críticas e sugestões colocadas durante o exame de qualificação, as quais contribuíram de maneira muito positiva para a conclusão deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Maria José V. Fonseca e à Prof^a. Dr^a. Mônica T. Pupo, ex e atual Coordenadoras do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP, respectivamente, pelo apoio recebido. Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, por sua disponibilidade e amabilidade no atendimento.

À Prof^a. Dr^a. Maria Vitória L. B. Bentley, Vice-Diretora da FCFRP-USP, pelo incentivo e agradáveis momentos de convivência no laboratório.

Ao Gerente de Produção da Fundação para o Remédio Popular - FURP, farmacêutico Ricardo de Lima e Silva, pela compreensão nos momentos em que precisei me ausentar da empresa para atender aos compromissos da pós-graduação. Aos demais colegas, especialmente às farmacêuticas Ana Cerúlia Carmo, Maria Spósito e Milena Chicaroni, pela amizade e incentivo.

Aos pós-graduandos do laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FCFRP-USP, M.Sc. Samantha S. Marotta-Oliveira e M.Sc. Josimar O. Eloy, por sua importantíssima contribuição na execução da parte experimental, bem como por suas sugestões para a elaboração da tese e artigos científicos. À farmacêutica Nathália H. S. Rocha por ter colaborado na execução dos experimentos da fase inicial deste projeto. Aos três, muito obrigada, ainda, por todo o carinho e amizade!

Ao pós-graduando do IB-Unesp, M.Sc. Marcelo C. Souza, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos funcionários do laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FCFRP-USP, especialista de laboratório Dr^a. Fabíola S. G. Praça, farmacêutico José Orestes Del Ciampo e biólogo Henrique Diniz, por suas contribuições diretas e indiretas a este trabalho, bem como pela solicitude e amizade. Ao José Orestes, agradeço, especialmente, pela execução das análises de determinação de tamanho de partícula.

À técnica de laboratório Maria Dolores S. Ferreira, da FMRP-USP, pela execução das análises de microscopia eletrônica de transmissão.

Aos funcionários do biotério da FCFRP-USP, pela prestatividade e orientações sobre manejo de animais de laboratório.

Aos colegas que passaram pelo laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FCFRP-USP, Aline, Danielle, Fábila, Fabiana Oliveira, Fernando Frizzon, Fernando Topan, Gilsane, Juliana Barcellos, Juliana Saraiva, Lívia Borgheti, Lívia Depieri, Nayara, Patrícia, Raquel, Thaís e Wagner, por tornarem o ambiente de trabalho tão agradável e acolhedor.

À minha grande amiga, Dr^a. Carolina Buzzulini, da FCAV-Unesp, sempre pronta para me ouvir e aconselhar, bem como por todos os momentos de descontração compartilhados. A todos os demais amigos e familiares que torceram por mim e que de maneira direta ou indireta se tornaram parte desta conquista.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

“Ao transferir bens materiais, o doador perde a sua posse. Há, porém, alguns atributos intrínsecos que não podem ser transferidos de um indivíduo para outro, como a beleza e coragem. O conhecimento, por outro lado, é algo tão importante que os deuses decidiram que o doador pode retê-lo mesmo que o tenha transmitido.”

Pitágoras de Samos

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas e siglas	ix
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	01
1.1. Câncer	02
1.2. Câncer de mama	03
1.3. Tratamento do câncer de mama	07
1.4. Tamoxifeno	10
1.5. Sistemas de liberação aplicados ao tratamento do câncer de mama	12
1.5.1. Micelas de longo tempo de circulação	15
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo geral	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Matérias-primas e solventes	32
3.2. Equipamentos	32
3.3. Determinação do coeficiente de partição octanol/água ($K_{O/A}$) do tamoxifeno ..	33
3.4. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação do tamoxifeno nos estudos <i>in vitro</i> utilizando CLAE	35
3.4.1. Método para determinação da eficiência de encapsulação	35
3.4.1.1. Condições de análise	36
3.4.1.2. Validação analítica	36
3.4.2. Método para quantificação do tamoxifeno nos experimentos de dissolução <i>in vitro</i>	40
3.4.2.1. Determinação do meio de dissolução	40
3.4.2.2. Desenvolvimento e validação do método analítico	41
3.5. Preparação de micelas de longo tempo de circulação à base de DSPE-PEG(n) e DSPE-PEG(n)/TPGS pela técnica de evaporação do solvente ..	42
3.5.1. Determinação da eficiência de encapsulação	45

3.5.2. Determinação da concentração micelar crítica (CMC)	46
3.5.3. Caracterização morfológica e físico-química dos sistemas micelares	47
3.5.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	47
3.5.3.2. Análise de tamanho das partículas por espalhamento dinâmico da luz (<i>dynamic light scattering</i>)	47
3.5.3.3. Espectrofotometria no infravermelho – transformada de Fourier (IV-TF) .	48
3.6. Estudos de dissolução <i>in vitro</i>	48
3.6.1. Perfil de dissolução do tamoxifeno livre	48
3.6.2. Perfil de liberação do tamoxifeno a partir dos sistemas micelares	50
3.6.2.1. Análise estatística	51
3.7. Determinação do perfil de concentração plasmática do tamoxifeno a partir dos sistemas micelares em modelo animal	52
3.7.1. Administração das formulações e obtenção das amostras de plasma	52
3.7.2. Método bioanalítico para quantificação do tamoxifeno e do N-desmetiltamoxifeno nas amostras de plasma utilizando CLAE	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. Determinação do coeficiente de partição octanol/água ($K_{O/A}$) do tamoxifeno .	57
4.2. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação do tamoxifeno nos estudos <i>in vitro</i> utilizando CLAE	57
4.2.1. Método para determinação da eficiência de encapsulação	58
4.2.1.1. Validação analítica	59
4.2.2. Método para quantificação do tamoxifeno nos experimentos de dissolução <i>in vitro</i>	65
4.2.2.1. Determinação do meio de dissolução	65
4.2.2.2. Desenvolvimento e validação analítica	67
4.3. Preparação e caracterização de micelas de longo tempo de circulação à base de DSPE-PEG(n) e DSPE-PEG(n)/TPGS pela técnica de evaporação do solvente	72
4.3.1. Obtenção das estruturas micelares, determinação da eficiência de encapsulação e análise de tamanho das partículas por espalhamento dinâmico da luz	72
4.3.2. Determinação da concentração micelar crítica (CMC)	79
4.3.3. Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	81
4.3.4. Caracterização físico-química por espectrofotometria no infravermelho – transformada de Fourier (IV – TF)	81
4.4. Estudos de dissolução <i>in vitro</i>	83
4.4.1. Perfil de dissolução do tamoxifeno livre	83

4.4.2. Perfil de liberação do tamoxifeno a partir dos sistemas micelares	85
4.4.2.1. Análise estatística	88
4.5. Determinação do perfil de concentração plasmática do tamoxifeno a partir dos sistemas micelares em modelo animal	91
4.5.1. Administração das formulações e obtenção das amostras de plasma	91
4.5.2. Quantificação do tamoxifeno e do N-desmetiltamoxifeno no plasma utilizando CLAE	92
5. CONCLUSÕES	97
6. REFERÊNCIAS	100
ANEXO	123
Anexo A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais ..	124

RESUMO

SOUZA, M.C. **Micelas de longo tempo de circulação como sistema nanocarreador para otimização da terapia do câncer de mama.** 2013. 124f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O câncer de mama é a segunda principal causa de morte entre as mulheres nos países em desenvolvimento, devido ao seu alto grau de malignidade. O tratamento baseia-se, principalmente, em terapias hormonais, uma vez que as células deste tipo de tumor expressam, em sua maioria, um elevado número de receptores hormonais, responsáveis pela regulação do crescimento do mesmo. O tamoxifeno é um fármaco da classe dos moduladores seletivos de receptores de estrógeno, que atua através do antagonismo à ativação de tais receptores por este hormônio, reduzindo, assim, a taxa de crescimento celular do tecido tumoral. Embora o tratamento com tamoxifeno seja altamente efetivo, este se relaciona a severos efeitos colaterais dose-dependentes. O objetivo central deste trabalho foi desenvolver sistemas micelares de longo tempo de circulação contendo tamoxifeno, preparados à base do fosfolípido DSPE-PEG(n), associado ou não ao derivado de vitamina E TPGS, para administração intravenosa, capazes de permitir um acúmulo maior do fármaco no sítio tumoral devido a suas dimensões nanométricas, permitindo, desta forma, a redução da dose e a consequente redução dos efeitos colaterais. A determinação da eficiência de encapsulação e a quantificação do tamoxifeno no estudo de liberação *in vitro* a partir dos sistemas obtidos foram realizadas por CLAE, utilizando métodos previamente validados. Os melhores resultados foram alcançados com as formulações à base de DSPE-PEG(2000) e TPGS, preparadas pelo método de evaporação do solvente, as quais apresentaram diâmetro médio inferior a 20 nm, baixo índice de polidispersividade e eficiência de encapsulação entre 70 e 95%. A análise por microscopia eletrônica de transmissão evidenciou o formato esférico e comprovou a homogeneidade do tamanho das partículas. Os sistemas foram caracterizados, ainda, por espectrofotometria no infravermelho para avaliação de possíveis interações entre os componentes das formulações. O perfil de liberação *in vitro* demonstrou que após 168 h, no máximo cerca de 30% do fármaco foi liberado, verificando-se que o aumento na quantidade de TPGS na formulação reduziu a porcentagem de tamoxifeno liberado. A baixa taxa de liberação *in vitro* sugere que a maior parte do fármaco mantenha-se no interior da estrutura micelar durante o período de permanência no sangue, favorecendo a chegada da nanoestrutura íntegra ao sítio tumoral. No estudo do perfil de concentração plasmática em ratos Wistar, não foi possível detectar o fármaco e seu principal metabólito pelo método por CLAE desenvolvido, sugerindo que os sistemas micelares tenham extravasado rapidamente para os órgãos.

Palavras-chave: Micelas à base de DSPE-PEG(2000)/TPGS, tamoxifeno, estudos *in vitro* e *in vivo*, câncer de mama.

ABSTRACT

SOUZA, M.C. **Long time circulation micelles containing tamoxifen as nanocarrier system for optimization of the breast cancer therapy.** 2013. 124f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Breast cancer is the second main cause of death among women in development countries due to their high malignance grade. The treatment is mainly based on hormonal therapies, once the cells of the majority of mammary tumors express a high number of hormone receptors, responsible for the tumor growth. Tamoxifen is a selective estrogen receptor modulator drug, acting through the antagonism of the activation of the estrogen receptor, reducing thus the tumor growing rate. Despite the treatment with tamoxifen is highly effective, it is related to severe dose-dependent side effects. The central objective of this work was the development of long time circulation micelles containing tamoxifen, prepared with the phospholipid DSPE-PEG(n) and TPGS, a vitamin E derivative, by the method of solvent evaporation, for intravenous administration, able to allow a higher accumulation of the drug at the tumoral site due to their nanometric dimensions, leading to a reduction in the dose and consequently in the side effects. The determination of the encapsulation efficiency and the quantification of tamoxifen in the *in vitro* release profile study from the micellar systems were carried out by HPLC, using methods previously validated. The best results were achieved with the formulations based on DSPE-PEG(2000) and TPGS, which showed mean particle diameter less than 20 nm, low polydispersity index and encapsulation efficiency ranging from 70 to 95%. The transmission electronic microscopy pointed the spherical shape and proved the homogeneity of particle size. The systems were also characterized by infrared spectrophotometry to identify eventual interactions among the components of the formulations. The *in vitro* release profile study showed that after 168 h, a maximum of about 30% of tamoxifen was released, evidencing that the increase of the TPGS amount in the formulation reduced the amount of tamoxifen released. The low rate of *in vitro* release drug suggests that the major part of the drug will remain encapsulated during the period of blood permanence, favoring the arrival of the intact nanostructure at the tumoral site. During the evaluation of the plasmatic concentration profile, conducted with Wistar rats, it was not possible to detect neither the tamoxifen nor its main metabolite, suggesting that the intact micelles may have quickly accumulated in the organs.

Keywords: DSPE-PEG(2000)/TPGS-based micelles, tamoxifen, *in vitro* and *in vivo* studies, breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química do tamoxifeno (A) e seus principais metabólitos, 4-hidroxitamoxifeno (B) e N-desmetiltamoxifeno (C)	10
Figura 2.	Representação esquemática dos locais de solubilização de substâncias de diferentes polaridades em estruturas micelares. (A) Substância apolar; (B) substância anfipática; (C) substância levemente polar; (D) substância polar	17
Figura 3.	Representação esquemática de estruturas micelares. (A) micelas fosfolipídicas; (B) micelas poliméricas	19
Figura 4.	Estrutura química dos fosfolipídeos DSPE (A), DSPE-PEG(750) (B) e DSPE-PEG(2000) (C).....	22
Figura 5.	Estrutura química do TPGS	23
Figura 6.	Representação esquemática dos aparatos adaptados avaliados no estudo do perfil de dissolução do tamoxifeno livre. (A) Tubo de diálise e agitação por mini-pás; (B) Tubo de PVC envolvido por membrana de diálise e acoplado à haste do aparato de cesta	50
Figura 7.	Cromatograma do tamoxifeno em solução metanólica, na concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	58
Figura 8.	Curva analítica do tamoxifeno em solução metanólica (concentrações de $0,1$ a $200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), obtida para estudo de linearidade do método para determinação da eficiência de encapsulação utilizando CLAE	60
Figura 9.	Cromatogramas obtidos a partir das análises de micelas isentas de tamoxifeno diluídas em metanol. (A) Micelas compostas por DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar $1,0:1,0$). (B) Micelas compostas por DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar $(1,5:1,0)$	61
Figura 10.	Curva analítica do tamoxifeno em solução metanólica, na faixa de concentração de $0,25$ a $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (faixa de trabalho)	63
Figura 11.	Cromatograma do tamoxifeno em solução de salicilato de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH $7,4$:metanol ($3:2$, v/v), na concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	68

- Figura 12.** Curva analítica do tamoxifeno em solução de salicilato de sódio 1,0 mol L⁻¹ pH 7,4:metanol (3:2, v/v) (concentrações de 0,25 a 20,0 µg mL⁻¹), obtida para estudo de linearidade do método para quantificação do fármaco nos estudos de dissolução *in vitro* utilizando CLAE 69
- Figura 13.** Cromatogramas obtidos a partir das análises de micelas isentas de tamoxifeno, diluídas em solução de salicilato de sódio 1,0 mol L⁻¹ pH 7,4:metanol (3:2, v/v). (A) Micelas compostas por DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,0:1,0). (B) Micelas compostas por DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,5: 1,0 69
- Figura 14.** Representação gráfica da análise de distribuição de tamanho de partícula da formulação preparada com o fosfolípideo DSPE não peguado, obtida por espalhamento dinâmico da luz, realizada no analisador de partículas Zetasizer Malvern, modelo Nano SZ 73
- Figura 15.** Representação gráfica da análise de distribuição de tamanho de partícula da formulação preparada com o fosfolípideo DSPE-PEG(750), obtida por espalhamento dinâmico da luz, realizada no analisador de partículas Zetasizer Malvern, modelo Nano SZ 74
- Figura 16.** Representação gráfica da análise de distribuição de tamanho de partícula da formulação preparada a partir de DSPE-PEG(750)/TPGS (1:1, p/p), obtida por espalhamento dinâmico da luz dinâmico, realizada no analisador de partículas Zetasizer Malvern, modelo Nano SZ 75
- Figura 17.** Representação gráfica da análise de distribuição de tamanho de partícula da formulação MT 09, preparada a partir de DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,0:1,0), obtida por espalhamento dinâmico da luz, realizada no analisador de partículas Zetasizer Malvern, modelo Nano SZ 77
- Figura 18.** Representação gráfica da análise de distribuição de tamanho de partícula da formulação MT 13, preparada a partir de DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,5:1,0), obtida por espalhamento dinâmico da luz, realizada no analisador de partículas Zetasizer Malvern, modelo Nano SZ 77

- Figura 19.** Representação gráfica da curva de intensidade de fluorescência do pireno *versus* logaritmo da concentração de DSPE-PEG(2000) presente na formulação MT 09 – DSPE-PG(2000)/TPGS (razão molar 1,0:1,0) preparada em diferentes concentrações, para determinação da concentração micelar crítica 80
- Figura 20.** Representação gráfica da curva de intensidade de fluorescência do pireno *versus* logaritmo da concentração de DSPE-PEG(2000) presente na formulação MT 13 – DSPE-PG(2000)/TPGS (razão molar 1,5:1,0) preparada em diferentes concentrações, para determinação da concentração micelar crítica 80
- Figura 21.** Fotomicrografias das formulações micelares desenvolvidas, obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (microscópio eletrônico de transmissão JEOL, modelo JEM 1000-CX2), tratadas com solução de contraste de acetato de uranila 2,0%, aumento de 5.000 vezes. (A) MT 09 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,0:1,0). (B) MT 13 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,5:1,0). 81
- Figura 22.** Representação gráfica dos espectros de absorção no infravermelho, adquiridos por meio do espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu, modelo IR-Prestige 21. Varreduras de 4500 - 340 cm^{-1} , resolução de 2 cm^{-1} . (A) Tampão HEPES. (B) DSPE-PEG(2000). (C) TPGS. (D) Tamoxifeno. (E) Formulação MT09 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,0:1,0) isenta de tamoxifeno. (F) Formulação MT 09 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,0:1,0) contendo tamoxifeno. (G) Formulação MT 13 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,5:1,0) isenta de tamoxifeno. (H) Formulação MT 13 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,5:1,0) contendo tamoxifeno 82
- Figura 23.** Representação gráfica do perfil de dissolução do tamoxifeno livre, obtido empregando-se dois diferentes aparatos adaptados (tubo de diálise e agitação por mini-pás; tubo de PVC envolvido por membrana de diálise e acoplado à haste de cesta). Meio de dissolução composto por solução de salicilato de sódio 1,0 mol L^{-1} pH 7,4 (volume: 100mL) velocidade rotacional de 150 rpm, temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 84
- Figura 24.** Representação gráfica do perfil de liberação *in vitro* do tamoxifeno a partir dos sistemas micelares. Meio de dissolução composto por solução de salicilato de sódio 1,0 mol L^{-1} pH 7,4 (volume: 100mL), aparato tubo de PVC envolvido por membrana de diálise e acoplado à haste de cesta, velocidade rotacional de 150 rpm, temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 86

- Figura 25.** Representação gráfica do teste estatístico empregado na avaliação comparativa da quantidade total de tamoxifeno liberada em função do tempo a partir dos sistemas micelares desenvolvidos. Tratamento 1: formulação MT 13 – DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,5:1,0). Tratamento 2: formulação MT 09 – DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,0:1,0) 90
- Figura 26.** Representação gráfica do teste estatístico empregado no desdobramento da variável quantidade de tamoxifeno liberada em função do tempo a partir dos sistemas micelares. Tratamento 1: formulação MT 13 – DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,5:1,0). Tratamento 2: formulação MT 09 – DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,0:1,0) 91
- Figura 27.** Cromatograma do tamoxifeno e N-desmetiltamoxifeno em solução metanólica, ambos na concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, após processo de purificação e extração a partir de amostra de plasma . 93
- Figura 28.** Curva analítica do tamoxifeno em solução metanólica (concentrações de $0,25$ a $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) após processo de purificação e extração, obtida para determinação da linearidade do método para quantificação em amostras de plasma utilizando CLAE 94
- Figura 29.** Curva analítica do N-desmetiltamoxifeno em metanol (concentrações de $0,25$ a $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) após processo de purificação e extração, obtida para determinação da linearidade do método para quantificação do mesmo em amostras de plasma utilizando CLAE 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Micelas compostas por DSPE-PEG(750) ou DSPE-PEG(750)/TPGS, obtidas pela técnica de evaporação do solvente, preparadas em diversas soluções tampão pH 7,4	44
Tabela 2 –	Micelas compostas por DSPE-PEG(2000) ou DSPE-PEG(2000)/TPGS, obtidas pela técnica de evaporação do solvente, preparadas em soluções tampão HEPES salino pH 7,4 de diferentes concentrações	45
Tabela 3 –	Delineamento experimental empregado na determinação do perfil de concentração plasmática do tamoxifeno a partir dos sistemas micelares, realizado em ratas adultas da linhagem Wistar	53
Tabela 4 –	Determinação do coeficiente de partição octanol/água ($K_{O/A}$) do tamoxifeno	57
Tabela 5 –	Resultados obtidos nos estudos de precisão (CV) e exatidão (E) intraensaio (n = 10/único dia) e interensaios (n = 3/5 dias consecutivos) do método para determinação de eficiência de encapsulação utilizando CLAE	62
Tabela 6 –	Avaliação da linearidade (r), precisão (CV) e exatidão (E) frente às alterações nas condições analíticas realizadas para verificação da robustez do método para determinação de eficiência de encapsulação utilizando CLAE (n = 3)	64
Tabela 7 –	Resultados obtidos nos estudos de solubilidade do tamoxifeno em diversos meio aquosos (n = 3), realizado com excesso de fármaco (10,0 mg/5,0 mL) sob agitação magnética (300 rpm), temperatura de 25°C, tempo de amostragem de 48 horas, quantificação por CLAE	67
Tabela 8 –	Resultados obtidos nos estudos de precisão (CV) e exatidão (E) intra (n = 10/único dia) e interensaios (n = 3/3 dias consecutivos) do método para quantificação do tamoxifeno nos estudos de dissolução <i>in vitro</i> utilizando CLAE	70
Tabela 9 –	Avaliação da linearidade (r), precisão (CV) e exatidão (E) frente às alterações nas condições analíticas realizadas para verificação da robustez do método para quantificação do tamoxifeno nos estudos de dissolução <i>in vitro</i> pela técnica de CLAE (n = 3)	71

- Tabela 10** – Diâmetro médio e índice de polidispersividade (IPd) das micelas à base de DSPE-PEG (2000) ou DSPE-PEG(2000)/TPGS em tampão HEPES salino 20 mmol L⁻¹ pH 7,4 76
- Tabela 11** – Resultados obtidos na avaliação da eficiência de encapsulação do tamoxifeno em sistemas micelares à base de DSPE-PEG(2000)/TPGS em diferentes proporções, preparados em tampão HEPES salino pH 7,4 20,0 mmol L⁻¹ 78
- Tabela 12** – Valores médios de tamoxifeno dissolvido (µg mL⁻¹), obtidos na avaliação do perfil de dissolução do fármaco livre (n = 3), utilizando como meio solução de salicilato de sódio 1,0 mol L⁻¹ pH 7,4 (volume: 100 mL), velocidade rotacional de 150rpm, temperatura de 37 ± 0,5°C, aparatos tubo de diálise e agitação por mini-pás (Ap. “A”) e tubo de PVC envolvido por membrana de diálise e acoplado à haste do aparato de cesta (Ap. “B”), quantificação por CLAE 84
- Tabela 13** – Análise da normalidade dos dados referentes à quantidade total de fármaco liberado ao longo do tempo, obtidos no estudo *in vitro* do perfil de liberação do tamoxifeno a partir dos sistemas micelares, pelo teste de Shapiro-Wilk (5,0% de significância) 88
- Tabela 14** – Análise da normalidade dos dados referentes ao desdobramento da variável quantidade de fármaco liberado entre as subparcelas de tempo, obtidos no estudo *in vitro* do perfil de liberação do tamoxifeno a partir dos sistemas micelares, pelo teste de Shapiro-Wilk (5,0% de significância) 89

LISTA DE AVREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área sob a curva
17-AAG	17-alilamino-17-demotoxigeldamicina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	Concentração micelar crítica
CV	Coeficiente de variação
DP	Desvio padrão
DSPE	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
E	Erro padrão
EE	Eficiência de encapsulação
EPR	Efeito de permeação e retenção vascular
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hydroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
HEPES sal.	Tampão ácido 4-(2-hydroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico salino
IARC	Agência Internacional para Pesquisa de Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPd	Índice de polidispersividade

IV – TF	Espectrofotometria no infravermelho – transformada de Fourier
KBr	Brometo de potássio
$K_{O/A}$	Coeficiente de partição octanol/água
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
mPEG-PDLLA	Ácido D,L-poli-láctico peguado
NaOH	Hidróxido de sódio
NaSal	Salicilato de sódio
N-DMT	N-desmetiltamoxifeno
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEG	Polietilenoglicol
PEO	Óxido de polietileno
PI	Padrão interno
PVC	Cloreto de polivinila
r	Coeficiente de correlação linear
RE	Receptor de estrógeno
$T_{1/2}$	Tempo de meia-vida de eliminação

TEA	Trietilamina
TFE	2,2,2-trifluoretanol
TMC	Temperatura de micelinização crítica
TMX	Tamoxifeno
TPGS	D- α -tocoferil polietilenoglicol 1000 succinato
US	Banho ultrassônico
UV	Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. CÂNCER

O câncer compreende um conjunto de mais de 100 patologias, as quais apresentam como ponto em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos e se multiplicam mais rapidamente que as células normais. As células cancerosas dividem-se de maneira agressiva e incontrolável, dando origem aos tumores malignos (neoplasias malignas), podendo difundir-se para outras regiões do corpo (metástases). Os diferentes tipos de câncer correspondem aos diferentes tipos de células afetadas, além de poderem ser classificados também quanto à velocidade de multiplicação das células tumorais, bem como por sua capacidade de invasão de tecidos e órgãos adjacentes ou distantes do tumor primário (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2013a).

O câncer é conhecido há muitos séculos, tendo sido, inicialmente, considerado como um conjunto de doenças que atingiam primordialmente os países desenvolvidos. Entretanto, há cerca de quatro décadas, esta situação global tem apresentado mudanças, de modo que, atualmente, a maior parte do ônus do câncer encontra-se em países em desenvolvimento. Assim, com o passar do tempo, o câncer tornou-se um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que até o ano de 2030, existam, anualmente, 27 milhões de novos casos, 17 milhões de mortes e ainda 75 milhões de pessoas vivas com câncer, sendo que o maior efeito deste aumento deve incidir sobre países de média e baixa rendas (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011).

Os tumores malignos representaram quase 17% dos óbitos de causa conhecida notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade, sendo considerados como a segunda principal causa de morte da população em geral desde 2003. De acordo com dados descritos no relatório *World Cancer Report* 2008, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS, verificou-se que o impacto global das neoplasias malignas mais que dobrou nos últimos 30 anos (BRASIL, 2009).

No Brasil, segundo dados do INCA – Instituto Nacional de Câncer (2007), desde 2000, o câncer vem sendo considerado a segunda principal causa de morte entre homens e mulheres, sendo inferior somente ao número de óbitos ocasionados por distúrbios do sistema circulatório. Seguindo a mesma tendência observada em diversos países, nota-se que, a partir dos anos 1960, em função de mudanças no perfil populacional, ocorreram também mudanças no perfil das enfermidades no país. Doenças infecciosas e parasitárias, que até então eram as principais causas de morte, foram substituídas por patologias do aparelho circulatório e pelas neoplasias. Esta transição epidemiológica, com a progressiva ascensão de doenças crônico-degenerativas deve-se principalmente ao envelhecimento da população, resultante do processo de urbanização, e das ações de promoção e recuperação da saúde (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011).

Atualmente, a maior parte dos tratamentos contra os diversos tipos de câncer baseia-se na aplicação sistêmica de agentes quimioterápicos e radioterápicos, os quais, frequentemente, não obtêm sucesso, em virtude do desenvolvimento de mecanismos de resistência do tumor e devido a efeitos colaterais ocasionados pela perda de seletividade do fármaco contra as células tumorais, culminando por atingir também tecidos saudáveis (PARK et al., 2010; MARTÍNEZ et al., 2012).

1.2. CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama, segundo tipo de neoplasia maligna mais frequente no mundo, corresponde a 22% dos novos casos diagnosticados anualmente, sendo o de principal incidência entre as mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2013b). Em 2007, foram diagnosticados em todo mundo cerca de 4,4 milhões de novos casos desta patologia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012). Estima-se que no mundo ocidental, ao menos uma em cada nove mulheres desenvolva este tipo de câncer ao longo de sua vida (ALI; COOMBES, 2002).

Este tipo de câncer é relativamente raro antes dos 35 anos, entretanto, acima desta faixa verifica-se um crescimento rápido e progressivo de sua incidência. Dados estatísticos demonstram que o número de casos diagnosticados vem aumentando tanto nos países desenvolvidos, quanto nos em desenvolvimento. De acordo com a OMS, nas décadas de 1960 e 1970, observou-se um aumento de dez vezes nas taxas de incidência ajustadas por idade nos Registros de Câncer de Base Populacional nos diversos continentes. A média de sobrevida após cinco anos de diagnóstico desta patologia na população mundial é de 61% (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2013b). O câncer de mama é também a segunda principal causa de morte em países em desenvolvimento, superando os índices atingidos pela tuberculose e outras infecções respiratórias e pela AIDS (ANDERSON; CHU, 2007).

A grande maioria das mortes ocasionadas por esta patologia deve-se ao surgimento de metástases, em virtude do alto grau de malignidade que estes tumores costumam apresentar (CHANG et al., 2007). Na fase metastática, nota-se um aumento de 70% na mortalidade dos pacientes (MARSDEN, 2012), quadro este agravado pelo fato de que estas metástases podem manter-se latentes ou indetectáveis por meses ou até mesmo anos, o que pode culminar em recorrência do tumor no sítio primário ou no desenvolvimento de novos tumores em tecidos e órgãos distantes (ALLAN et al., 2006).

Desde 1990, tem ocorrido um aumento de 1,5% ao ano no número de novos casos de carcinoma mamário, atribuído principalmente a mudanças no estilo de vida das mulheres, tais como: redução no número de filhos (ou mesmo nuliparidade), primeira gestação a termo em idade mais avançada, sedentarismo e hábitos alimentares inadequados. Tem-se verificado, ainda, uma antecipação na idade da menarca, aumentando o número de ciclos ovarianos. Ressalta-se o fato de que o número de ciclos ovarianos relaciona-se diretamente ao risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias, de modo que este diminui aproximadamente 15% a cada ano de retardo do início da menarca e aumenta por volta de 3% a cada ano de retardo da menopausa. A associação de todos estes fatores está relacionada com o aumento da incidência de casos de câncer de mama no período pós-menopausa.

Além disso, deve-se considerar também como fatores de risco a hereditariedade (que aumenta o risco em duas a três vezes e é responsável por 5 a 10% de todos os casos de câncer de mama), alta densidade do tecido mamário (razão entre tecido glandular e tecido adiposo na mama) e exposição à radiação ionizante, mesmo em baixas doses, especialmente durante a puberdade (BRAY; McCARRON; PARKIN, 2004; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011; PORTER, 2008).

Conforme descrito acima, a hereditariedade e os hábitos alimentares apresentam relação direta com o aumento da incidência do câncer de mama. De acordo com um estudo realizado nos Estados Unidos com 99.039 mulheres no período pós-menopausa, constatou-se que a gordura corporal e, principalmente, a deposição abdominal, aumentaram o risco de desenvolver esta patologia, uma vez que se observou maior incidência em mulheres que ganharam mais de 20 kg na idade adulta, bem como naquelas com índice de massa corpórea a partir de 25 kg m^{-2} e circunferência abdominal acima de 97 cm (AHN et al., 2007). Maior estatura também pode estar correlacionada ao aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias devido à maior exposição destes indivíduos ao hormônio do crescimento, havendo, desta maneira, maiores chances de ocorrerem erros durante a replicação do DNA (NAVES; QUINTANILHA; INUMARU, 2008). Por último, a ingestão de álcool também constitui um fator risco, tanto no período pré quanto no pós-menopausa, haja vista que o mesmo pode exercer atividade carcinogênica (TERRY et al., 2007).

Ainda em relação à hereditariedade, sabe-se também que mulheres que possuem mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* apresentam 85% de chance de desenvolver um câncer mamário antes dos 70 anos de idade (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009). Nas células normais, estes dois genes são responsáveis pela expressão de proteínas que mantêm o crescimento celular ordenado. Assim, indivíduos provenientes de famílias em que se verificam estas mutações, as quais podem suprimir a expressão destas proteínas reguladoras da proliferação celular, possuem risco aumentado em relação ao restante da população (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

Os estudos têm demonstrado, ainda, que, ao contrário do câncer de colo do útero, o câncer de mama está diretamente relacionado ao processo de urbanização da sociedade, sendo que mulheres de elevado nível socioeconômico têm apresentado maior risco de desenvolver esta patologia (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009).

Os tumores de mama podem ser agrupados em dois tipos principais. O primeiro, mais agressivo, ocorre no período pré-menopausa e suas células não apresentam receptores de estrógeno (RE-negativo). O segundo, de característica indolente, ocorre após a menopausa e caracteriza-se por apresentar receptores de estrógeno (RE-positivo). Observam-se também variações morfológicas relacionadas à presença de receptores de estrógeno, como os carcinomas medulares em RE-negativos e os carcinomas tubulares e lobulares em RE-positivos. Os carcinomas medulares associam-se, ainda, a mutações no gene *BRCA1*, sendo mais frequentes em populações de baixo risco, como as mulheres orientais, enquanto os carcinomas tubulares e lobulares correlacionam-se a mutações no gene *BRCA2*, sendo mais comumente encontrados nas populações de alto risco, como as mulheres ocidentais (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2007).

Nos Estados Unidos, em 2008, os três tipos de câncer de maior incidência entre as mulheres, responsáveis por cerca de 50% do total de casos diagnosticados, foram: de mama, pulmões e brônquios, e cólon e reto. Somente o câncer de mama foi responsável por 26% dos novos casos detectados, o que corresponde a 182.460 pacientes (JEMAL et al., 2008). De acordo com o *American Cancer Society* (2012), é também a segunda principal causa de morte, excedido somente pelos casos de câncer de pulmão. A estimativa para o ano de 2012 era de cerca de 226.870 novos casos de tumores invasivos e 63.300 novos casos de carcinomas mamários *in situ* (tumores primários não invasivos). Estimou-se, ainda, o óbito de 39.510 pacientes em função desta patologia.

Nos países em desenvolvimento, as consequências desta patologia são ainda mais severas do que em países desenvolvidos, em virtude do menor acesso da população a informações relativas à prevenção da doença, bem como aos

instrumentos de diagnóstico (ANDERSON et al., 2008). Exemplificando, na Índia, em 2001, cerca de 50 a 70% dos novos casos de câncer de mama diagnosticados encontravam-se em estágio avançado de desenvolvimento do tumor (estágio III) ou já apresentavam metástases (estágio IV) (CHOPRA, 2001). Por outro lado, ainda entre 1990 e 1992, somente 44% dos novos casos europeus e 36% dos norte-americanos encontravam-se nos estágios III ou IV (SANT et al., 2004).

No Brasil, um estudo realizado entre 2002 e 2004 mostrou que o câncer de mama foi o responsável pela maior incidência de morte entre as mulheres, com 10,44 casos para cada 100 mil mulheres (BOING et al., 2007), sendo o sul e o sudeste as regiões de maior incidência da doença (PALMERO et al., 2007). No ano de 2010, foram registradas 12.852 mortes, sendo 147 homens e 12.705 mulheres. Para o ano de 2012, a estimativa era de aproximadamente 52.680 novos casos, ou seja, 52 novos casos para cada 100 mil mulheres, correspondendo a 27,9% de todos os novos casos de câncer diagnosticados entre indivíduos do sexo feminino (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011).

Embora as técnicas diagnósticas venham permitindo a detecção do câncer de mama em estágios mais precoces, possibilitando, assim, o tratamento de maneira menos agressiva e aumentando o índice de sobrevivência, nota-se, ainda hoje, que entre os casos diagnosticados já em estágio IV, menos de 15% sobrevivem por até cinco anos após o diagnóstico (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009). Sendo assim, o desenvolvimento de terapias mais efetivas para o combate às formas mais invasivas da doença, particularmente aquelas com grande propensão a metástases, é de extrema importância na atualidade.

1.3. TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

O tratamento do câncer de mama primário é realizado, inicialmente, por meio de intervenções cirúrgicas, que abrangem a mastectomia total ou parcial, bem como a remoção dos gânglios linfáticos de regiões adjacentes. São utilizados, ainda,

a radioterapia e diversos tratamentos quimioterápicos, incluindo as terapias citotóxicas e hormonais e, mais recentemente, as terapias imunoterápicas, entre outras (TANAKA et al., 2009).

As opções de tratamento são determinadas não somente pelo estágio de desenvolvimento da doença, mas também pelo tipo de tumor, que, em linhas gerais, pode ser classificado como hormônio dependente ou não, e, ainda, pelo nível de receptores do fator de crescimento epidermal humano (HER-2/*neu*) encontrado (TANAKA et al., 2009).

Cerca de 65% dos tumores de mama diagnosticados são ER-positivos e, por este motivo, o maior número de medicamentos utilizados no tratamento desta patologia, atualmente, baseia-se em terapias hormonais, que incluem, por exemplo, moduladores seletivos para receptores de estrógeno e inibidores de aromatase (TANAKA et al., 2009).

Os receptores de estrógeno regulam o crescimento das células mamárias em resposta a este hormônio. Assim sendo, os moduladores seletivos destes receptores, tais como tamoxifeno (TMX), raloxifeno e arzoxifeno, são capazes de antagonizar sua ativação, reduzindo, assim, o crescimento da massa tumoral. A terapia hormonal tem se mostrado bastante eficaz na redução do risco de reincidência deste tipo de tumor, bem como no aumento do número de pacientes que atingem 10 anos de sobrevivência após o diagnóstico (AAPRO, 2001). Estudos constataram que o tratamento adjuvante com tamoxifeno por cinco anos foi capaz de reduzir a mortalidade anual de pacientes que apresentavam este tipo de tumor em aproximadamente 31% (EARLY BREAST CANCER TRIALISTIS, 2005).

A maior parte dos tumores, incluindo os carcinomas mamários, é tratada por meio de associações entre diversos agentes antineoplásicos, que podem apresentar efeito sinérgico ou simplesmente resultar na somatória dos efeitos dos diferentes mecanismos de ação dos fármacos empregados. Embora os efeitos terapêuticos obtidos com estas associações sejam capazes de promover um aumento significativo na eficácia do tratamento, paralelamente, verifica-se uma somatória entre os efeitos colaterais gerados por tais fármacos. Normalmente, estes efeitos

são bastante severos, muitas vezes causando sequelas que requerem tratamento ao longo do restante da vida do paciente (TANAKA et al., 2009).

Sabe-se que estes efeitos colaterais resultam da morte de células em órgãos e tecidos diferentes daquele em que se encontra o tumor, devido à não especificidade da maioria das moléculas de fármacos utilizadas atualmente para o tratamento do câncer. Os principais distúrbios causados por este tipo de tratamento referem-se ao enfraquecimento dos ossos, a danos acentuados no sistema gastrointestinal e à alopecia (TANAKA et al., 2009). Verificam-se, ainda, outros danos importantes inerentes especificamente às moléculas de determinados fármacos. Por exemplo, o uso de doxorrubicina, em formulações convencionais, pode levar à falência cardíaca congestiva irreversível (VON HOFF et al., 1979). O tratamento com tamoxifeno provoca efeitos colaterais severos, além de outras consequências que perduram mesmo após o término do tratamento, incluindo um aumento de 2,4 vezes no risco de incidência de câncer endometrial em mulheres com idade a partir de 50 anos (FISCHER et al., 2005) e 1,9 vezes no risco de doença tromboembólica (CUZICK et al., 2003).

Em geral, o tratamento medicamentoso do câncer de mama é realizado pelas vias oral e intravenosa. Para que o tratamento seja eficaz, é necessário que o fármaco consiga transpor diversos obstáculos para atingir a massa tumoral em concentrações terapêuticas. Estes obstáculos incluem barreiras físicas, tais como o trato gastrointestinal, barreiras fisiológicas, como os mecanismos celulares de extrusão de fármacos, e barreiras biofísicas, como, por exemplo, a arquitetura vascular tumoral e gradientes de pressão intersticial (FERRARI, 2005a,b). Todos estes fatores, associados à agressividade inerente à patologia em questão, podem resultar na falência do tratamento.

1.4. TAMOXIFENO

O tamoxifeno (Figura 1A) é um fármaco antiestrogênico utilizado para o tratamento do câncer de mama desde 1971 e até hoje é o fármaco mais utilizado nos casos de tumores mamários RE-positivos (GOSS et al., 2005), sendo também o único fármaco mundialmente aprovado para a prevenção da doença em mulheres pertencentes a grupos de alto risco (O'REGAN; JORDAN, 2002). Este fármaco é utilizado no tratamento do câncer de mama após mastectomia total ou parcial, bem como associado aos tratamentos quimioterápico e radioterápico.

Figura 1: Estrutura química do tamoxifeno (A) e seus principais metabólitos, 4-hidroxitamoxifeno (B) e N-desmetiltamoxifeno (C) (BUCHANAN et al., 2007).

A dose usualmente utilizada é de 0,4 a 0,8 mg kg⁻¹, por via oral (na forma de citrato), podendo ser administrada em um ou duas doses diárias. Após administração oral, o tamoxifeno sofre extensa metabolização hepática e a subsequente excreção biliar de seus metabólitos (BUCKLEY; GOA, 1989). O tempo de meia-vida de eliminação ($T_{1/2}$) do fármaco após administração oral é de 7 a 14 horas (FABIAN et al., 1981). A metabolização hepática do tamoxifeno se dá por meio do citocromo P450, originando vários metabólitos, como 4-hidroxitamoxifeno e o N-desmetiltamoxifeno (N-DMT) (Figura 1B). O 4-hidroxitamoxifeno (Figura 1C), produzido pela isoforma CYP3A4, apresenta atividade biológica semelhante à do tamoxifeno, entretanto, é eliminado rapidamente, apresentando $T_{1/2}$ ligeiramente maior do que o tamoxifeno. Quanto ao N-desmetiltamoxifeno, possui atividade

biológica inferior à do tamoxifeno, porém apresenta $T_{1/2}$ de vários dias (BUCHANAN et al., 2007; GALLICCHIO et al., 2004).

Apesar de apresentar resultados positivos significativos no tratamento da doença, o efeito antiestrogênico do tamoxifeno não se restringe apenas ao sítio tumoral. Outros efeitos colaterais relacionados à sua utilização incluem câncer hepático, embolia pulmonar, trombose venosa e distúrbios oculares, como retinopatia e opacidade corneal (DE LIMA et al., 2003). O tratamento com tamoxifeno em mulheres no período pós-menopausa também é responsável por um aumento significativo no número de distúrbios uterinos benignos, como hiperplasias e pólipos (NEVEN; VERGOTE, 2001; VOSSE et al., 2002), devido a seu efeito sobre o útero. De acordo com Neven e Vergote (2000), cerca de 40 a 50% das mulheres no período pós-menopausa que fizeram uso de tamoxifeno apresentaram algum tipo de proliferação endometrial anormal. Além dos distúrbios benignos, os estudos apontam que o efeito antiestrogênico do tamoxifeno sobre o útero pode levar também ao surgimento de carcinoma endometrial (COHEN, 2004; MARTÍNEZ et al., 2012).

Verifica-se, ainda, que alguns pacientes desenvolvem mecanismos de resistência ao tamoxifeno após longos períodos de tratamento. Neste caso, surge a necessidade de associá-lo a outra classe de fármacos utilizados no tratamento do câncer de mama, como os inibidores de aromatase, por exemplo, o letrozol (JORDAN et al., 2005). Entretanto, estes fármacos também apresentam uma série de efeitos colaterais importantes, tais como aumento significativo no número de fraturas, nas taxas séricas de colesterol e de distúrbios cardíacos severos, especialmente em pacientes no período pós-menopausa (THE BREAST INTERNATIONAL GROUP, 2005). Assim sendo, a substituição de um medicamento antiestrogênico por um inibidor de aromatase não apresenta vantagens do ponto de vista de redução de efeitos colaterais.

Todos estes efeitos colaterais associados ao uso do tamoxifeno são considerados dose-dependentes (PEYRADE et al., 1996). Uma possível estratégia para a redução destes efeitos colaterais é a preparação de um sistema para

liberação modificada do fármaco, que permita a veiculação de doses menores e mais efetivas.

1.5. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO APLICADOS AO TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

A maior parte dos agentes antineoplásicos utilizados na atualidade apresenta limitações devido ao seu alto nível de efeitos colaterais. Duas estratégias podem ser utilizadas para melhorar a eficácia dos tratamentos quimioterápicos e reduzir seus efeitos colaterais. A primeira delas é o desenvolvimento de novas moléculas de fármaco, capazes de atuar especificamente sobre o processo tumoral, tais como mesilato de imatinibe e trastuzumabe. Entretanto, o desenvolvimento de novos fármacos é um processo lento e que demanda vultosos investimentos financeiros (LI; WALLACE, 2008). A segunda estratégia é o desenvolvimento de nanocarreadores, capazes de aumentar o tempo de circulação sanguínea e facilitar o acúmulo do fármaco no sítio tumoral, em detrimento a outros tecidos e órgãos (KARATHANASIS et al., 2008). A nanomedicina tem sido apontada como uma das mais promissoras estratégias para solucionar os problemas relacionados à perda de especificidade de agentes quimioterápicos convencionais, por meio do emprego de nanocarreadores com diâmetro entre 10 e 200 nm, devido à sua capacidade de penetração intracelular, grande capacidade de encapsulamento de fármacos e especificidade por mecanismos passivos e/ou ativos (dependendo de sua composição) pelas células tumorais (MARTÍNEZ et al., 2012). Esta é uma alternativa que vem sendo amplamente explorada, em virtude do menor custo e tempo reduzido (em relação ao desenvolvimento de uma nova molécula) para seu desenvolvimento.

Os sistemas de liberação de fármacos podem apresentar diversas vantagens quando comparados a formulações convencionais, tais como:

- reduzir a flutuação da concentração plasmática de fármacos, contribuindo para a redução dos efeitos colaterais;

- prolongar o tempo de ação de fármacos com baixo $T_{1/2}$, reduzindo, consequentemente, a frequência de administração;
- prever e reproduzir os níveis de liberação.

Todos estes fatores podem contribuir para tornar as terapias mais efetivas e melhorar a adesão do paciente ao tratamento (DANCKWERTS; FASSIHI, 1991). Os sistemas de liberação possibilitam prolongar a atividade terapêutica com o máximo de segurança e eficácia e vêm sendo empregados para otimizar a terapia de diversas patologias (BOTTINI; DAVANE; CORRIGAN, 1984; HINATYSZYN et al., 1994; LIEBERMAN; LACHMAN; SCHATZ, 1990; PANG, 1998).

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas que permitam concentrar os agentes antineoplásicos no sítio tumoral é de suma importância para aumentar o índice terapêutico e melhorar o balanço entre eficácia e toxicidade destes fármacos (TANAKA et al., 2009). Os sistemas de liberação de dimensões nanométricas tornam-se cada vez mais importantes no tratamento e diagnóstico do câncer (KARATHANASIS et al., 2008). Os nanocarreadores são excelentes sistemas para a veiculação de fármacos quimioterápicos, que podem possibilitar, entre outros efeitos, o acúmulo do fármaco no sítio tumoral (YEZHELYEV et al., 2006). A inclusão de um fármaco no interior de um sistema nanoestruturado pode levar, ainda, à redução do *clearance* renal e hepático, além de reduzir o reconhecimento pelo sistema imune, alterando, desta forma, as propriedades farmacocinéticas e a biodistribuição do fármaco (ORIVE et al., 2005).

Diferentes tipos de sistemas de liberação de dimensões nanométricas vêm sendo desenvolvidos e utilizados para o tratamento dos mais diversos tipos de câncer. Uma das estratégias de liberação empregada para esse tipo de sistema baseia-se no efeito de aumento da permeação e retenção vascular (EPR) encontrado nos tecidos tumorais sólidos (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011; MAEDA; SEYMOUR; MIYAMOTO, 1992; MAEDA et al., 2000; 2003; MATSUMARA; MAEDA, 1986). Este efeito, proposto por Matsumara e Maeda (1986), explica que a

maior parte dos tumores sólidos apresenta características patofisiológicas que não são observadas em tecidos e órgãos normais, tais como extensa angiogênese e, por consequência, hipervascularização imatura, arquitetura vascular defeituosa, sistema de reconhecimento e drenagem linfática deficitários e elevadíssimo número de mediadores de permeabilidade no endotélio vascular (JAIN, 1999; MAEDA et al., 2000). Partículas nanométricas tendem a acumular-se preferencialmente nos tumores sólidos por transporte convectivo passivo, processo este conhecido como extravasamento, devido à permeabilidade vascular aumentada destas regiões tumorais (JAIN, 2001; TANAKA et al., 2009).

Diversos sistemas nanocarreadores de fármacos estão sendo estudados para o tratamento de neoplasias, como micelas, lipossomas, dendrímeros, nanocápsulas e nanoesferas, partículas lipídicas sólidas e nanopartículas cerâmicas (ORIVE et al., 2005), sendo que uma série deles encontra-se atualmente nos diversos estágios de estudos clínicos e alguns já são produzidos comercialmente. Estes sistemas vêm apresentando uma série de vantagens sobre as formulações convencionais, tais como: redução de efeitos colaterais, aumento do índice terapêutico, maior facilidade de administração do medicamento e o consequente aumento na aderência dos pacientes ao tratamento (LI; WALLACE, 2008).

Um exemplo de medicamento de base nanotecnológica para o tratamento do câncer que já se encontra disponível comercialmente nos dias atuais é o Abraxane[®] (Abraxis Bioscience), uma formulação composta por nanopartículas de albumina ligada ao paclitaxel ("*Nanoparticle albumin bound*" – (nab)-paclitaxel), com diâmetro médio na ordem de 130 nm (VISHNU; ROY, 2011). O paclitaxel é um fármaco citotóxico altamente eficaz, aprovado desde 1992 para o tratamento do câncer. Atualmente, é um dos fármacos de primeira escolha para o tratamento de carcinomas mamários metastáticos e carcinomas ovarianos em estágio avançado (ALLOUACHE et al., 2005). Porém, o mesmo é altamente lipofílico e apresenta baixo índice terapêutico. A formulação convencional (Taxol[®]) apresenta, ainda, alto índice de hipersensibilidade, em virtude da utilização de uma alta concentração de Cremophor EL[®] (óleo de mamona polietoxilado) e álcool etílico desidratado,

necessários para a solubilização do fármaco (LI et al., 1998), mesmo com pré-tratamento com corticosteroides e anti-histamínicos (KOUDELKA, 2009). O (nab)-paclitaxel possui uma formulação isenta de solventes orgânicos, desenvolvida com o objetivo de contornar a toxicidade inerente ao Cremophor EL[®]. Estudos clínicos de fase III demonstraram que esta formulação apresentou altas taxas de resposta, maior segurança e menor índice de efeitos colaterais que a formulação convencional, além de ter possibilitado um aumento na taxa de sobrevida dos pacientes (VISHNU; ROY, 2011).

1.5.1. MICELAS DE LONGO TEMPO DE CIRCULAÇÃO

A tensão superficial de uma solução de tensoativo decresce progressivamente em função do aumento da concentração, haja vista que uma maior quantidade de moléculas do tensoativo passa a compor a camada interfacial. Entretanto, em um determinado momento, ocorre a saturação desta camada interfacial, levando à formação de agregados esféricos de dimensões coloidais, denominados micelas, com o objetivo de proteger a região hidrofóbica da molécula de tensoativo do meio aquoso, de modo a permitir que o sistema atinja um estado mínimo de energia livre de Gibbs. A concentração de tensoativo (ou de quaisquer outras substâncias anfifílicas capazes de se organizar na forma de micelas, como polímeros e fosfolipídeos) em que se inicia a formação das micelas recebe o nome de concentração micelar crítica (CMC), a qual diminui com o aumento da cadeia hidrofóbica (AULTON, 2005). Em concentrações superiores à CMC, a energia livre de Gibbs do sistema é minimizada pela organização espontânea das moléculas anfifílicas, como resultado das interações hidrofóbicas entre as regiões apolares destas moléculas (ATTWOOD; FLORENCE, 1983; CARSTENS et al., 2008; KWON, 2003). As micelas são estruturas dinâmicas, em constante equilíbrio com monômeros em solução, que continuamente se formam e se rompem espontaneamente, de modo que o sistema atinja o menor valor possível de energia

livre de Gibbs. Normalmente, são estruturas esféricas, compostas por cerca de 50 a 100 moléculas da anfifila (AULTON, 2005).

O núcleo de uma micela em solução aquosa, onde se encontra a porção hidrofóbica das moléculas que a compõe, apresenta as características de um hidrocarboneto líquido, sendo capaz de solubilizar substâncias lipofílicas. Assim, é possível manter substâncias insolúveis ou parcialmente solúveis em água em solução aquosa, por meio da incorporação das mesmas em estruturas micelares. Uma ampla variedade de fármacos insolúveis tem sido formulada empregando-se o princípio da solubilização micelar. A região da micela onde a solubilização ocorre depende da natureza da substância química a ser solubilizada (Figura 2). Assim, substâncias apolares solubilizam-se no núcleo de hidrocarboneto (Figura 2A); substâncias insolúveis em água, porém contendo grupamentos polares, encontram-se orientadas com o grupo polar na superfície da micela, “encaixando-se” na estrutura micelar (Figura 2B); substâncias levemente polares sem estrutura anfifílica particionam-se entre o núcleo e a superfície polar da micela (Figura 2C) e substâncias polares encontram-se inteiramente na superfície polar da micela (Figura 2D) (AULTON, 2005).

Figura 2: Representação esquemática dos locais de solubilização de substâncias de diferentes polaridades em estruturas micelares. (A) Substância apolar; (B) substância anfipática; (C) substância levemente polar; (D) substância polar (AULTON, 2005).

Além de favorecer sua solubilização, compostos insolúveis ou muito pouco solúveis em água, que se mantêm no núcleo apolar da micela, ao mesmo tempo, são protegidos do ataque de espécies hidrolisantes e da degradação oxidativa, tornando-se, assim, mais estáveis (AULTON, 2005).

Os sistemas micelares apresentam diversas vantagens para a administração sistêmica de fármacos, como o acúmulo no interior de tumores sólidos, em virtude de suas dimensões nanométricas, sendo capazes de permeiar os vasos sanguíneos destas áreas, devido ao efeito EPR. Embora a função primária do aumento da permeabilidade vascular seja garantir o suprimento de nutrientes e oxigênio para o rápido desenvolvimento da massa tumoral, ao mesmo tempo, transforma-se em uma importante ferramenta no combate aos tumores, uma vez que possibilita o direcionamento de conjugados de fármacos para estas regiões. Um maior acúmulo do fármaco no interior dos tecidos tumorais pode permitir a veiculação de doses menores, reduzindo, assim, os efeitos colaterais (TORCHILIN, 2002).

As micelas apresentam, ainda, estabilidade superior a outros sistemas, como, por exemplo, os lipossomas, e podem ser preparados em grande quantidade com facilidade e reprodutibilidade, sendo o processo de obtenção dos mesmos, desta forma, de fácil transposição para a escala industrial (TORCHILIN, 2002). Além disso, são isentas de partículas de tamanho na ordem micrométrica e podem ser facilmente esterilizadas por filtração, utilizando-se membranas com poros de 0,22 μm , vantagem esta adicional sobre outros sistemas de liberação, como por exemplo, nanopartículas, que podem requerer uma etapa adicional de remoção de partículas micrométricas, de modo a evitar a saturação da membrana esterilizante (YOKOYAMA, 2011).

Micelas obtidas a partir de fosfolipídeos e polímeros anfífilos têm sido amplamente empregadas com o objetivo de melhorar os perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos de diversos fármacos, constituindo, assim, de um tipo de sistema de liberação bastante promissor (CAVALLARO et al., 2004; JONES; LEUROX, 1999). Estudos demonstram que moléculas anfífilas de alta massa molecular são as mais indicadas para a obtenção de micelas com diâmetro médio entre 10 e 100 nm, estáveis tanto do ponto de vista termodinâmico (devido aos baixos valores de CMC) quanto cinético (taxa real de dissociação abaixo da CMC), longo tempo de circulação e baixa toxicidade (ALLEN; MAYSINGER; EISENBERG, 1999; CAVALLARO et al., 2004). Tanto fármacos de baixa massa molecular quanto macromoléculas podem ser encapsuladas em sistemas micelares, incorporados fisicamente no núcleo hidrofóbico ou acoplados quimicamente aos copolímeros, podendo-se obter, em ambos os casos, melhora da solubilidade e estabilidade, bem como das propriedades farmacocinéticas e da biodistribuição (ADAMS; LAVASANIFAR; KOWN, 2003; WANG; WANG; LIANG, 2012). Por todas estas razões, os sistemas micelares têm se mostrado promissores para a veiculação de uma série de fármacos anticancerígenos pouco solúveis em água, tais como doxorrubicina (NAKANISHI et al., 2001), cisplatina (YOKOYAMA et al., 1996), paclitaxel (CAVALLARO et al., 2003) efenretinida (OKUDA, et al., 2009), entre outros.

Há dois tipos básicos de sistemas micelares empregados como nanocarreadores de fármacos, os poliméricos e os fosfolipídicos. As micelas poliméricas (Figura 3A) são sistemas nanoestruturados compostos por copolímeros anfifílicos (CROY; KWON, 2006), que se organizam espontaneamente quando estes últimos encontram-se em concentração superior à sua CMC e em temperatura inferior à temperatura de micelinização crítica (TMC) (LASIC, 1992). Este tipo de estrutura possui grande aplicabilidade no campo de sistemas de liberação, em virtude da alta quantidade de fármacos hidrofóbicos existentes que podem ser incorporados em sua estrutura, de maneira simples e estável (SATO et al., 2009). Os sistemas micelares podem, ainda, ser utilizados para a veiculação de fármacos hidrofílicos (MURANISHI, 1990), bem como de macromoléculas, como peptídeos e proteínas.

Figura 3: Representação esquemática de estruturas micelares. (A) micelas fosfolipídicas; (B) micelas poliméricas. Adaptado de Hussein e Pitt (2008).

O sistema imune humano é capaz de reconhecer rapidamente e promover a eliminação de corpos estranhos, por meio da adsorção de proteínas opsonizantes em sua superfície. Uma estratégia para prevenir a rápida remoção de micelas e outros sistemas nanocarreadores, mantendo-os por mais tempo em circulação, é reduzir a taxa e a extensão da opsonização, bem como o reconhecimento pelas células do sistema reticuloendotelial, o que pode ser conseguido por meio de estabilização estérea, pelo recobrimento da superfície do sistema com polímeros hidrofílicos, sendo os mais utilizados os polietilenoglicóis (PEG). Estes compostos

são biocompatíveis, culminando por reduzir a opsonização e a consequente captação pelas células do sistema reticuloendotelial do fígado, baço e medula óssea (ALLEN et al., 2002; CARSTENS et al., 2008; OWENS; PEPPAS, 2006; STOLNIK; ILLUM; DAVIS, 1995), mantendo o sistema de liberação por mais tempo na corrente circulatória, possibilitando que uma quantidade maior do fármaco atinja o tecido/órgão alvo. As moléculas de PEG são não iônicas, fato que reduz a incidência de interações eletrostáticas indesejadas com proteínas plasmáticas, além de serem biocompatíveis e praticamente atóxicas, sendo eliminadas na forma inalterada através da urina (SUTTON et. al., 2007; TORCHILIN, 2006). Além disso, a presença de moléculas de PEG na superfície das micelas pode, ainda, possuir um efeito crioprotetor e lioprotetor (KOO; RUBINSTEIN; ONYUKSEL, 2005).

A utilização de fosfolipídeos contendo centros hidrofóbicos envoltos por cadeias de PEG (“peguilados”), por meio de ligação covalente entre este último e a cabeça polar lipídica, proporciona vantagens adicionais à estabilidade dos sistemas micelares quando comparado a micelas anfifílicas convencionais, devido à acilação dos grupamentos ácidos do lipídeo, que podem contribuir significativamente para um aumento nas interações hidrofóbicas entre as cadeias poliméricas no centro da micela (SIBATA, 2004). As micelas formadas por fosfolipídeos peguilados (Figura 3B) são biocompatíveis, biodegradáveis e relativamente atóxicas (ASHOK et al., 2004; WORKING; DAYAN, 1996).

Os polietilenoglicóis, também conhecidos por óxidos de polietileno (PEO), são as moléculas hidrofílicas mais empregadas em conjugação com polímeros e fosfolipídeos formadores de micelas, pois, além de sua baixa toxicidade e imunogenicidade, sendo aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em uma série de formulações farmacêuticas, também apresentam propriedades físico-químicas únicas, como excelente solubilidade em água, alta flexibilidade e um grande volume de exclusão, dificultando o acesso à estrutura micelar (ADAMS; LAVASANIFAR; KWON, 2003; CARSTENS et al., 2008; MOLINEUX, 2002).

A baixa imunogenicidade do PEG, em função da reduzida taxa de opsonização, é devida à blindagem ocasionada pela carga superficial e por sua

elevada hidrofilicidade, prevenindo, deste modo, os dois principais mecanismos de adsorção proteica, que são as interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Adicionalmente, a redução das interações de Van der Waals, as forças repulsivas aumentadas e a formação de uma camada polimérica impermeável na superfície da partícula, como também a capacidade de se ligar a desopsoninas (substâncias de ocorrência natural que inibem a fagocitose) contribuem para seu efeito protetor dos sistemas micelares (CARSTENS et al., 2008; OWENS; PEPPAS, 2006; SOPPIMATH et al., 2001; TORCHILIN, 2006; TORCHILIN; TRUBETSKOY, 1995; VONARBOURG et al., 2006).

As micelas peguilladas possuem a vantagem adicional de apresentarem valores de CMC (da ordem de 10^{-5} a 10^{-7} mol L⁻¹) significativamente inferiores às convencionais (da ordem de 10^{-3} a 10^{-4} mol L⁻¹), constituindo-se, desta maneira, de sistemas muito mais estáveis em soluções aquosas diluídas (como no sangue, após sua administração), que se dissociam de maneira mais lenta (KATAOKA et al., 1993).

O DSPE (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina) (Figura 4A), um fosfolípídeo derivado da fosfatidiletanolamina que pode ser encontrado, principalmente, nas membranas biológicas de células nervosas, vem sendo amplamente utilizado, em sua forma conjugada com moléculas de PEG de diferentes massas moleculares, variando de 350 a 5000 Da, na preparação de sistemas nanocarreadores lipídicos, tais como micelas e lipossomas de longo tempo de circulação (AVANTI POLAR LIPIDS, 2010).

Figura 4: Estrutura química dos fosfolipídeos DSPE (A), DSPE-PEG(750) (B) e DSPE-PEG(2000) (C) (www.avantilipids.com).

Micelas de DSPE-PEG(2000) contendo docetaxel, um fármaco insolúvel em água, foram preparadas com o objetivo de melhorar a solubilidade aquosa do fármaco e eliminar os efeitos tóxicos do emulsificante empregado na formulação disponível comercialmente. O fármaco foi encapsulado com sucesso no núcleo da micela, atingido uma eficiência de encapsulação de 97%. O diâmetro médio obtido foi de 20 nm, permitindo, desta maneira, a administração intravenosa da formulação e sendo suficientemente pequeno para beneficiar-se do efeito EPR e concentrar-se no sítio tumoral por transporte passivo, reduzindo os efeitos tóxicos em outras regiões do organismo. A formulação micelar foi comparada com uma formulação convencional produzida comercialmente em estudos *in vitro* e *in vivo*. Nos estudos *in vitro*, ambas as formulações apresentaram efeitos antiproliferativos de células tumorais bastante semelhantes. Entretanto, nos estudos *in vivo*, verificou-se um significativo aumento na atividade antitumoral da formulação micelar em relação à formulação convencional, tendo sido realizados, ainda, estudos que evidenciaram a segurança terapêutica da formulação (TONG et al., 2012).

Gill, Nazzal e Kaddoumi (2011) prepararam micelas à base de DSPE-PEG(5000) contendo paclitaxel pela técnica de evaporação do solvente, para tratamento de câncer de pulmão (administração por via pulmonar). Foram obtidas

micelas com diâmetro médio de 5 nm e a eficiência de encapsulação do fármaco foi superior a 95%. Os estudos de liberação *in vitro* indicaram a liberação sustentada do fármaco. Em estudos *in vivo*, foi demonstrada a capacidade de manter o agente terapêutico concentrado no sítio de ação e em regiões próximas a ele, prolongando a atividade no pulmão e reduzindo efeitos tóxicos sistêmicos. O estudo demonstrou que o sistema micelar desenvolvido foi capaz de alterar as propriedades farmacocinéticas do paclitaxel, reduzindo significativamente os efeitos citotóxicos em órgãos não alvos quando comparado à administração de formulação convencional do fármaco por administração intravenosa.

No presente trabalho, o DSPE foi utilizado em sua forma saturada conjugado a moléculas de PEG de massa molecular de 750 (Figura 4B) e 2000 Da (Figura 4C), a fim de avaliar a influência do tamanho da cadeia do mesmo na formação dos sistemas micelares.

A vitamina E e alguns de seus derivados vêm sendo utilizados em associação com fosfolipídeos na obtenção de sistemas micelares híbridos. O mais comumente utilizado é um derivado do α -tocoferol, uma das oito isoformas da vitamina E, conjugado com uma cadeia de PEG de massa molecular de 1000 Da, chamado de TPGS (D- α -tocoferilpolietilenoglicol 1000 succinato) (Figura 5).

Figura 5: Estrutura química do TPGS (CAO; FENG, 2008).

O TPGS apresenta uma estrutura anfifílica, sendo constituído por uma região de caráter lipofílico, formada por uma volumosa cadeia alquil, e uma porção hidrofílica de grande área superficial, devido à presença das cadeias de PEG(1000).

Tais características conferem ao TPGS propriedades semelhantes às dos tensoativos não iônicos convencionais (CAO; FENG, 2008; SADOQI et. al., 2009; WILCZURA-WACHNIK et. al., 2008), permitindo, desta forma, seu emprego na preparação de sistemas micelares. Apresenta, ainda, concentração micelar crítica de aproximadamente $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e é atóxico na dose de $1,0 \text{ g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Em baixas concentrações, suas moléculas organizam-se espontaneamente na forma de micelas na presença de veículos aquosos, podendo, desta forma, ser utilizado para aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, como antivirais, antineoplásicos e imunossupressores (PRASAD et. al., 2003; SADOQI et. al., 2009; WEMPE et. al., 2009).

Mu, Elbayoumi e Torchilin (2005) compararam a eficiência de encapsulação da camptotecina em micelas de DSPE-PEG e em sistemas híbridos formados por DSPE-PEG e TPGS. Os resultados mostraram que a presença do TPGS foi capaz de aumentar a solubilidade do fármaco, levando, conseqüentemente a um aumento na eficiência de encapsulação. Estudos de citotoxicidade em células cancerosas demonstraram ainda a maior eficiência dos sistemas híbridos, quando comparados aos sistemas preparados exclusivamente com DSPE-PEG. Resultados semelhantes foram obtidos por Katragadda e colaboradores (2011), os quais prepararam micelas híbridas compostas DSPE-PEG e TPGS contendo paclitaxel e 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG). Os estudos demonstraram que a incorporação dos fármacos nos sistemas micelares promoveu um aumento na solubilidade em água de cerca de 5.000 vezes para o paclitaxel e 700 vezes para o 17-AAG, tendo sido, ainda, atingidos valores de eficiência de encapsulação de 95% e 90%, respectivamente.

Micelas híbridas à base de DSPE-PEG(2000) e TPGS foram desenvolvidas para veiculação concomitante de paclitaxel e partenolide, visando avaliar o potencial citotóxico frente a células de câncer pulmonar resistentes e sensíveis ao paclitaxel. Verificou-se um aumento considerável na eficácia da associação destes dois fármacos após a incorporação na estrutura micelar. A formulação micelar ocasionou a morte de 79% das células sensíveis ao paclitaxel, contra 46% dos fármacos em

solução. Quando foram avaliadas as células resistentes, a formulação micelar levou à morte de 70% das mesmas, contra apenas 45% dos fármacos em solução (GILL; NAZZAL; KADDOUMI, 2012).

As micelas podem ser empregadas também com fins diagnósticos. Utilizando-se do efeito EPR, agentes de contraste podem ser encapsulados em sistemas micelares, permitindo a detecção de tumores mais precocemente do que por técnicas diagnósticas tradicionais, além de possibilitarem a obtenção de imagens mais claras por serem capazes de atingir o interior da massa tumoral. Com as técnicas de diagnóstico por imagem empregadas atualmente, tumores com diâmetro inferior a 1 cm dificilmente conseguem ser detectados. Entretanto, estima-se que tumores com diâmetro de 2 – 3 mm já expressem o efeito EPR (NAKAMURA et al., 2006; SHIRAISHI et al., 2009; SHIRAISHI et al.; 2010; YOKOYAMA, 2011), uma vez que é nesta fase que se inicia a neoangiogênese, pois, neste momento, o tumor começa a encontrar dificuldades para obter oxigênio a partir dos vasos sanguíneos normais das regiões adjacentes (FOLKMAN; SHING, 1992; HOLMGREN; O'REILLY; FOLKMAN, 1995; YOKOYAMA, 2011). Desta forma, a encapsulação de agentes de contraste em estruturas micelares facilita o diagnóstico precoce, aumentando as chances de cura do paciente.

O mecanismo pelo qual as micelas interagem com as membranas celulares para liberar o fármaco no interior das células ainda não está completamente elucidado. Um estudo avaliou a penetração celular de diversos sistemas micelares fosfolipídicos peguillados marcados com uma sonda fluorescente, contendo ou não o fármaco doxorubicina. O estudo demonstrou que os fosfolipídeos utilizados incorporaram-se à membrana das células devido a suas características anfifílicas, internalizaram-se por meio de endocitose não específica e distribuíram-se no retículo endoplasmático e complexo de Golgi, sem afetar a viabilidade celular e o transporte de ATP. Assim, as micelas desestabilizaram-se ao fundir-se com as membranas celulares, onde liberaram o fármaco, o qual teve sua entrada nas células acelerada pelo aumento da fluidez das membranas, ocasionado pela inserção dos fosfolipídeos provenientes da formulação. Verificou-se, ainda, que a encapsulação do fármaco

nas micelas não alterou a distribuição intracelular do mesmo, entretanto, aumentou seu acúmulo nas células (WANG; WANG; LIANG, 2012).

Genexol PM[®] é uma formulação micelar de longo tempo de circulação aprovada para comercialização na Coreia do Sul, em 2007, encontrando-se atualmente em fase II de estudos clínicos no Japão e Estados Unidos (DENG et al., 2012; KIM et al., 2004). O princípio ativo deste medicamento é o paclitaxel, incorporado em micelas à base do polímero biodegradável ácido D,L-poli-láctico peguilado (mPEG-PDLLA) e é empregado no tratamento quimioterápico de tumores de mama, pulmão e pâncreas. Esta formulação apresenta diversas vantagens sobre a formulação convencional (Taxol[®]), por possuir baixa toxicidade e aumentar a segurança e a eficácia do medicamento. Estudos com células de carcinomas ovariano e mamário demonstraram que a formulação convencional e a micelar apresentaram citotoxicidade equivalente. Entretanto, a dose máxima tolerada em camundongos foi de 60 mg kg⁻¹ para o Genexol PM[®] e de apenas 20 mg kg⁻¹ para o Taxol[®]. A dose letal média em ratos foi de 205,4 mg kg⁻¹ (machos) e 221,6 mg kg⁻¹ (fêmeas) para o Genexol PM[®], enquanto, para o Taxol[®], foi de 8,3 mg kg⁻¹ (machos) e 8,8 mg kg⁻¹ (fêmeas), demonstrando claramente a redução da toxicidade obtida com a formulação micelar. Os estudos de farmacocinética e biodistribuição em camundongos demonstraram que a formulação micelar apresentou redução na área sob a curva (AUC) plasmática em relação à convencional, porém a concentração de paclitaxel em órgãos como fígado, baço, rins, pulmões, coração e tumor foram duas a três vezes superiores às encontradas para a formulação convencional. Verificou-se ainda, que a atividade antitumoral *in vivo* do Genexol PM[®] em tumores ovarianos e mamários foi significativamente superior à do Taxol[®] (BURT et al., 1999; KIM et al., 2001; ZHANG et al., 1997). Os diversos estudos clínicos realizados demonstraram a superioridade da formulação nanoestruturada em relação à redução da toxicidade, uma vez que não foi preciso administrar pré-tratamento com corticosteroides e anti-histamínicos aos pacientes, como se faz necessário quando da utilização da formulação convencional. Foram encontrados, ainda, casos em que a formulação micelar foi capaz de reduzir a massa tumoral em pacientes refratários previamente

tratados com Taxol[®]. Pacientes com neoplasias em diversos órgãos, inclusive carcinomas mamários em estágio metastático, apresentaram melhora com o uso da formulação nanoestruturada (KIM et al., 2004; LEE et al., 2008; LIM et al., 2010).

Diante de todo o exposto acima, observa-se que a incorporação do tamoxifeno em uma nanoestrutura micelar é uma promissora estratégia para veiculação do mesmo, em virtude, primeiramente, de sua baixa solubilidade em água, bem como pela possibilidade de direcionar o fármaco para o seu sítio de ação, reduzindo os efeitos colaterais causados pelo acúmulo do mesmo em outras regiões do organismo, especialmente sobre o útero, que eleva significativamente o risco de desenvolvimento de carcinoma endometrial.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver micelas de longo tempo de circulação contendo tamoxifeno para veiculação por via intravenosa, avaliando-as por meio de estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo animal.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação da eficiência de encapsulação e quantificação do tamoxifeno nos estudos de dissolução *in vitro*;
- Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação do tamoxifeno e seu principal metabólito, N-desmetiltamoxifeno, no estudo de determinação do perfil de concentração plasmática em ratas da linhagem Wistar;
- Preparação de micelas de longo tempo de circulação à base de DSPE-PEG(n) e DSPE-PEG(n)/TPGS pelo método de evaporação do solvente;
- Determinação da eficiência de encapsulação do tamoxifeno frente às diferentes composições lipídicas empregadas na preparação dos sistemas micelares;
- Caracterização morfológica dos sistemas obtidos, por meio das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e análise por espalhamento dinâmico da luz;

- Caracterização físico-química e avaliação da ocorrência de possíveis interações entre o fármaco e os demais componentes das formulações por espectrofotometria no infravermelho – Transformada de Fourier (IV–TF);
- Estudos *in vitro* da dissolução do tamoxifeno livre e do perfil de liberação do fármaco encapsulado nos sistemas micelares;
- Estudo do perfil de concentração plasmática do tamoxifeno a partir das formulações desenvolvidas em modelo animal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATÉRIAS-PRIMAS E SOLVENTES

- Ácido ortofosfórico 85% (lote: 1805 – Merck)
- Álcool isoamílico (lote: BCBB2365 – Sigma-Aldrich)
- Cloreto de sódio, PA (lote: 59191 – Synth)
- Clorofórmio, grau cromatográfico (lote: H41C20 – J.T. Baker)
- DSPE (lote: 180PE-115 – Avanti Polar Lipids)
- DSPE-PEG (750) (lote: 165724 – Avanti Polar Lipids)
- DSPE-PEG (2000) (lote: 176216 – Avanti Polar Lipids)
- Fosfato de sódio monobásico monoidratado, PA (lote: 91107 – Synth)
- Fosfato de sódio dibásico, PA (lote: 117738 – Synth)
- Heparina, 5000 UI/mL (Hepamax-S[®]) (lote: 1105064 – Blaüsigel)
- HEPES, 99,5% (lote: 049K5430 – Sigma-Aldrich)
- Hexano, grau cromatográfico (lote: 12066930 – Tedia)
- Hidróxido de sódio, PA (lote: 125388 – Synth)
- Isoflurano 1,0 mL mL⁻¹ (Forane[®]) (lote: 89532QA – Abbott)
- Metanol, grau cromatográfico (lote: H39E08 – J.T. Baker)
- N-desmetiltamoxifeno (lote: 080M4747V – Sigma-Aldrich)
- N-octanol, P.A. (lote: 33709 – Dinâmica)
- Salicilato de sódio, PA (lote: 131827 – Synth)
- Pireno para fluorescência (lote: 24507096 1252207 – Fluka)
- Tamoxifeno 99% (lote: 048K1239 – Sigma-Aldrich)
- TPGS (lote: 0001450713 – Sigma-Aldrich)
- Trietilamina 99,0% (TEA) (lote: 0209100143140 – Sigma-Aldrich)

3.2. EQUIPAMENTOS

- Analisador de partículas Zetasizer Malvern, modelo Nano SZ
- Balança analítica Ohaus, modelo Adventurer, sensibilidade: 0,0001 g

- Balança analítica Shimadzu, modelo AUW 220D, sensibilidade: 0,00001 g
- Banho termostatizado Fanem, modelo BM 1100
- Banho ultrassônico Quimis, modelo Q-335D
- Bomba de vácuo Tecnal, modelo TE-058
- Centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5810R
- Degaseificador Shimadzu, modelo DGU – 2A.
- Dissolutor Hanson Research, modelo SR8-Plus
- Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu, composto por bomba peristáltica modelo LC-10AD, detector de UV-Vis modelo SPD-10A e integrador modelo C-R6A
- Espectrofotômetro FT-IR Shimadzu, modelo IR-Prestige 21
- Espectrofotômetro UV-Vis Femto, modelo 800 XI
- Evaporador rotativo Ika Werker, modelo RV 05-ST
- Fluorímetro Biotek, modelo Synergy HT
- Homogeneizador tipo vórtex Ika Werker, modelo MS1
- Liofilizador Liobrás, modelo 101
- Microscópio eletrônico de transmissão JEOL, modelo JEM-100CX2
- Placa de agitação magnética com aquecimento Fisatom, modelo 752A
- Placa de agitação magnética Marte, modelo MAG 15
- Potenciômetro Digimed, modelo DM-20
- Sistema purificador de água Millipore Corporation, modelo Milli-Q Plus

3.3. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO OCTANOL/ÁGUA ($K_{O/A}$) DO TAMOXIFENO

A determinação do coeficiente de partição octanol/água ($K_{O/A}$) do tamoxifeno foi realizada em triplicata, com base nos trabalhos desenvolvidos por Netz (2004) e Wells (1988).

Inicialmente, 50 mL de octanol foram saturados com o mesmo volume de água, agitando-se a mistura em agitador magnético por 12 horas, na velocidade de 300 rpm. A mistura foi transferida para um funil de separação e mantida em repouso por 5 minutos para separação das fases. O octanol foi recolhido, transferido para tubo cônico e centrifugado na velocidade de 2500 rpm (265 x g) por 10 minutos. A água remanescente foi recolhida com auxílio de pipeta de Pasteur.

A fase aquosa contendo o tamoxifeno foi preparada por meio da adição de excesso de tamoxifeno em água (aproximadamente 20 µg mL⁻¹). A suspensão de fármaco foi mantida em agitação magnética na velocidade de 300 rpm por 30 minutos, em banho termostatizado a 37 ± 0,5°C e, posteriormente, filtrada através de membrana com poros de 0,45 µm para a separação do fármaco não solubilizado. A solução obtida foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando-se as condições descritas no item 3.4.1.1., para determinação da concentração de tamoxifeno na fase aquosa antes do particionamento com octanol.

Para determinação do coeficiente de partição octanol/água, 10 mL da solução aquosa de tamoxifeno foram adicionados a 10 mL do octanol saturado com água. A mistura foi mantida em agitação na velocidade de 300 rpm por 30 minutos, em banho termostatizado a 37 ± 0,5°C. Em seguida, a mesma foi transferida para um funil de separação e mantida em repouso por 5 minutos, para separação das fases. A fase aquosa foi recolhida e centrifugada na velocidade de 2500 rpm (265 x g) por 10 minutos, para separação do octanol residual. Na sequência, realizou-se a extração do fármaco da fase aquosa, sendo que a 0,5 mL da mesma foram adicionados 3 mL de clorofórmio. Esta mistura foi então homogeneizada em vórtex na velocidade de 2500 rpm por um minuto, e centrifugada a uma velocidade de 3500 rpm (371 x g) por 15 minutos, para separação das fases. A fase aquosa foi desprezada e o clorofórmio transferido para tubo cônico e evaporado sob fluxo de ar comprimido em câmara de exaustão. O resíduo foi ressuspenso em 100 µL de metanol (MeOH), agitado em vórtex na velocidade de 2500 rpm por 20 segundos e analisado por CLAE, empregando-se as condições descritas no item 3.4.1.1.

O coeficiente de partição octanol/água foi obtido segundo a equação descrita por Wells (1988):

$$K_{O/A} = \frac{C_1 - C_2}{C_2}$$

Em que:

C_1 = concentração do tamoxifeno na fase aquosa antes da partição

C_2 = concentração do tamoxifeno na fase aquosa depois da partição

3.4. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO TAMOXIFENO NOS ESTUDOS *IN VITRO* UTILIZANDO CLAE

Os métodos desenvolvidos neste trabalho foram validados tendo por base o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa (2003), e as recomendações do documento Q2(R1) da *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005).

3.4.1. MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Para a determinação da eficiência de encapsulação do tamoxifeno nos sistemas micelares, foi proposto um método direto utilizando a técnica de CLAE em fase reversa, empregando padronização externa. O método cromatográfico foi desenvolvido tendo como ponto de partida o estudo publicado por MacCallum e colaboradores (1996).

3.4.1.1. CONDIÇÕES DE ANÁLISE

As análises foram conduzidas utilizando-se como fase estacionária uma coluna cromatográfica de fase reversa C₁₈, com dimensões internas de 4,6 x 250 mm, partículas de 5 µm, poros de 110 Å (Gemini® – Phenomenex), protegida por coluna de guarda de mesma composição. Utilizou-se como fase móvel (degaseificada por borbulhamento de gás hélio durante 20 minutos) uma mistura de metanol e solução aquosa de trietilamina (TEA) 1,0% na proporção de 89:11 (v/v) (pH = 9,0). A vazão empregada foi de 1,2 mL min⁻¹, o volume de injeção foi de 20 µL e a temperatura de análise de 25°C. A detecção foi realizada na faixa do ultravioleta (UV), com leitura em 265 nm.

3.4.1.2. VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação deste método foi efetuada avaliando-se os seguintes parâmetros analíticos: linearidade, seletividade, precisão e exatidão intraensaio e interensaios, faixa de trabalho, limite de quantificação, limite de detecção e robustez.

A curva analítica foi preparada a partir de uma solução estoque de tamoxifeno em metanol, na concentração exata de 50,0 µg mL⁻¹. Por meio de diluições desta solução estoque, foram preparadas seis soluções padrão, também em metanol, nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 20,0 µg mL⁻¹, as quais foram filtradas através de membrana com poros de 0,45 µm. Para a obtenção da curva analítica, estas soluções foram analisadas em triplicata e um gráfico foi construído relacionando-se as concentrações do fármaco no eixo das abscissas e os valores de área dos picos obtidos (mAUUV) no eixo das ordenadas.

• LINEARIDADE

A avaliação da linearidade de um método analítico tem por objetivo verificar a proporcionalidade entre a concentração do analito e a resposta obtida. Para este

estudo, foram preparadas dez soluções padrão de tamoxifeno em metanol, na faixa de concentração de 0,1 a 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O gráfico correlacionando as concentrações do fármaco e as áreas de seus respectivos picos foi construído conforme descrito anteriormente. A equação da reta, que expressa a curva analítica, ou seja, estabelece uma relação entre a resposta medida e a concentração do analito, sendo utilizada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra (BRASIL, 2007b), pode ser definida por:

$$y = ax + b$$

Em que:

y = resposta medida (altura ou área do pico)

x = concentração do analito

a = coeficiente angular (inclinação da curva)

b = coeficiente linear (intersecção da curva com o eixo y)

A determinação da linearidade foi realizada por meio do coeficiente de correlação linear (r), obtido a partir da regressão linear da curva analítica. Considerou-se como mínimo aceitável $r > 0,99$ (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

• SELETIVIDADE

A seletividade do método foi realizada para verificar a influência dos componentes inertes na resposta analítica. Neste estudo, alíquotas de formulações inertes foram diluídas em metanol, submetidas à agitação em banho ultrassônico por 30 minutos e filtradas através de membrana com poros de 0,45 μm . Estas amostras foram analisadas nas mesmas condições que as soluções padrão, verificando-se seus perfis cromatográficos, os quais, posteriormente, foram comparados matematicamente ao perfil cromatográfico do fármaco (cálculo do percentual de

áreas de eventuais picos de componentes inertes com mesmo tempo de retenção que o fármaco).

• PRECISÃO E EXATIDÃO

As determinações da precisão e da exatidão do método foram realizadas por meio de estudos intraensaio (repetitividade e exatidão intraensaio) e interensaio (precisão intermediária e exatidão interensaio), utilizando-se soluções padrão de tamoxifeno em metanol nas concentrações de 0,25; 2,5 e 20,0 µg mL⁻¹.

Nos estudos intraensaio, foram analisadas dez alíquotas de cada uma das três soluções padrão descritas acima em um único dia e comparadas com a curva analítica.

Quanto à avaliação interensaio, os estudos foram realizados durante cinco dias consecutivos, analisando-se, em triplicata, as mesmas soluções empregadas nos estudos intraensaio. Estes resultados foram comparados aos da curva analítica, reanalisada diariamente.

A precisão do método foi avaliada por meio das dispersões das respostas obtidas em relação aos valores médios, tendo sido expressa como coeficiente de variação (CV) e calculada de acordo com a equação a seguir:

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Em que:

S = Desvio padrão

$\bar{X}$ = Médias das áreas dos picos obtidos

Considerou-se como aceitável CV < 5,0%.

A exatidão foi determinada por meio do cálculo do erro padrão (E), o qual é obtido correlacionando-se os valores de concentração obtidos experimentalmente e os valores teóricos (reais) das soluções padrão, conforme fórmula a seguir:

$$E(\%) = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor teórico}}{\text{valor teórico}} \times 100$$

O intervalo considerado aceitável foi de $-10,0 < E < 10,0\%$.

• FAIXA DE TRABALHO

A faixa de trabalho do método foi determinada considerando-se os resultados obtidos nas avaliações de linearidade, precisão e exatidão, de modo que o intervalo selecionado atendesse aos requisitos especificados para estes três parâmetros, bem como fosse adequado para a aplicação pretendida.

• LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO E DETECÇÃO

O limite de quantificação (LQ) foi considerado como o menor valor em que foram verificados precisão e exatidão dentro dos níveis de aceitação previamente estipulados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

O limite de detecção (LD) foi determinado baseando-se na relação de três vezes o ruído da linha de base (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003), tendo sido calculado por meio da equação abaixo:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

Em que:

DP_a = desvio padrão médio do intercepto com o eixo das ordenadas de três curvas de calibração

IC = inclinação da curva analítica

- **ROBUSTEZ**

A avaliação da robustez do método foi realizada por meio das seguintes variações nas condições analíticas: vazão da fase móvel (1,0; 1,2 e 1,4 mL min⁻¹), proporção entre metanol e solução de trietilamina 1,0% (87:13, 89:11; 91:9, v/v) e concentração de trietilamina na fase aquosa (0,8; 1,0 e 1,2%). Estes estudos foram realizados com as mesmas soluções utilizadas nos testes de precisão e exatidão. A verificação da influência destas variações analíticas sobre as respostas obtidas foi feita através dos cálculos de linearidade, precisão e exatidão.

3.4.2. MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DO TAMOXIFENO NOS EXPERIMENTOS DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

3.4.2.1. DETERMINAÇÃO DO MEIO DE DISSOLUÇÃO

Uma vez que o tamoxifeno é um fármaco muito pouco solúvel em água, para definir o meio de dissolução mais apropriado para os estudos *in vitro* de seu perfil de liberação a partir dos sistemas micelares, foi determinada a solubilidade do mesmo em diversos meios aquosos. Estes estudos foram conduzidos em temperatura controlada de 25°C, adicionando-se excesso do fármaco (10,0 mg) em 5,0 mL do meio aquoso. As amostras (n = 3), foram mantidas sob agitação magnética (300 rpm) até o equilíbrio (48 horas), quando foram centrifugadas por 10 minutos na velocidade de 3000 rpm (318 x g) e filtradas através de membrana com poros de 0,45 µm para separação do fármaco não solubilizado. Posteriormente, foram tomadas alíquotas de 1,0 mL das amostras, diluídas para 5,0 mL em metanol, em balão volumétrico, e analisadas por CLAE, conforme método descrito no item 3.4.2.2. Os meios avaliados foram:

- Água purificada;
- Tampão fosfato pH 7,4;

- Tampão fosfato pH 7,4 acrescido de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de salicilato de sódio (NaSal);
- Solução de salicilato de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 (ajustado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 20,0%).

3.4.2.2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

• CONDIÇÕES DE ANÁLISE

O método analítico para quantificação do tamoxifeno nos estudos *in vitro* do perfil de liberação a partir dos sistemas micelares, foi desenvolvido com base naquele empregado para determinação da eficiência de encapsulação (item 3.4.1.). Foi utilizada a mesma coluna cromatográfica (Gemini[®] C₁₈, Phenomenex – 4,6 x 250 mm, 5 μm , 110 Å), protegida por coluna de guarda de mesma composição. Utilizou-se como fase móvel uma mistura de metanol e solução aquosa de trietilamina 1,0% na proporção de 85:15 (v/v), com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. O volume de injeção foi mantido em 20 μL e a temperatura de análise em 25°C. A detecção também foi realizada na região do UV, com leitura em 265 nm.

• VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A preparação da curva analítica deu-se a partir de uma solução estoque de tamoxifeno em metanol, na concentração exata de $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por meio de diluições desta solução estoque, foram preparadas seis soluções padrão, tendo como diluente uma mistura solução de salicilato de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 e metanol (3:2, v/v), uma vez que esta solução de salicilato de sódio foi selecionada como meio de dissolução, nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida, as soluções foram filtradas através de membrana com poros de 0,45 μm . Para a obtenção da curva analítica, estas soluções foram analisadas em triplicata e foi construído um gráfico relacionando-se as

concentrações do fármaco no eixo das abscissas e os valores de área obtidos (mAUUV) no eixo das ordenadas.

Os parâmetros linearidade, seletividade, precisão e exatidão intraensaio e interensaios, faixa de trabalho e limites de quantificação e detecção, bem como os procedimentos empregados para suas determinações e os limites de aceitação estabelecidos, foram os mesmos empregados na validação do método para determinação da eficiência de encapsulação por CLAE (item 3.4.1.2.), exceto pelo fato de que as soluções padrão foram preparadas na mistura de solução de salicilato de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 e metanol (3:2, v/v).

Na avaliação da robustez do método, foram utilizadas as mesmas três soluções empregadas nos testes de precisão e exatidão. A robustez do método foi avaliada frente às seguintes variações nas condições analíticas: vazão da fase móvel (0,9; 1,0 e $1,1 \text{ mL min}^{-1}$); proporção entre metanol e solução de trietilamina 1,0% na fase móvel (84:16; 85:15 e 86:14, v/v) e concentração de trietilamina na fase aquosa (0,8; 1,0 e 1,2%). Foram calculadas a precisão e a exatidão dos resultados obtidos, verificando-se se estes permaneciam dentro dos limites previamente estabelecidos.

3.5. PREPARAÇÃO DE MICELAS DE LONGO TEMPO DE CIRCULAÇÃO À BASE DE DSPE-PEG(n) E DSPE-PEG(n)/TPGS PELA TÉCNICA DE EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE

As micelas foram preparadas pela técnica de evaporação do solvente, já consagrada para obtenção deste tipo de sistema. O desenvolvimento dos sistemas micelares à base de DSPE teve por base os estudos desenvolvidos por Lavasanifar, Samuel e Kwon (2001); Lukyanov, Gao e Torchilin (2003); Lukyanov e Torchilin (2004); Sawant e Torchilin (2009). Foi utilizado o fosfolípideo DSPE conjugado ou não com cadeias de PEG de diferentes massas moleculares (750 e 2000 Da), com o objetivo de avaliar a influência desta conjugação na formação das micelas.

Inicialmente, foi feita uma tentativa de preparar sistemas micelares isentos de tamoxifeno utilizando o fosfolípídeo DSPE não peguillado. Para tanto, 10,0 mg de DSPE foram dissolvidos em 0,5 mL de clorofórmio. O solvente foi removido completamente utilizando pressão reduzida (rotaevaporação) por uma hora, levando à formação de um filme, o qual foi ressuspensão em tampão fosfato pH 7,4 e submetido a agitação em banho ultrassônico por 20 minutos, objetivando à obtenção de uma solução límpida, onde as moléculas do fosfolípídeo organizar-se-iam na forma de micelas.

As preparações seguintes utilizaram DSPE-PEG(750) ou misturas de DSPE-PEG(750) e TPGS. Após a solubilização dos lipídeos em clorofórmio, procedeu-se a rotaevaporação por uma hora e, em seguida, os filmes formados foram ressuspensos em diferentes soluções tampão pH 7,4 (Tabela 1).

Tabela 1 – Micelas compostas por DSPE-PEG(750) ou DSPE-PEG(750)/TPGS, obtidas pela técnica de evaporação do solvente, preparadas em diversas soluções tampão pH 7,4

Formulação	Massa DSPE-PEG(750) (mg)	Massa TPGS (mg)	Volume de tampão (mL)	Ressuspensão
MI 01	5,0	---	5,0 (PBS)	20 min. US ¹
MI 02	2,5	---	5,0 (Fosfato)	20 min. US
MI 03	38,0	---	10,0 (HEPES sal. ² 10,0 mmol L ⁻¹)	20 min. US
MI 04	15,27	---	10,0 (HEPES sal. 5,0 mmol L ⁻¹)	10 min. US + 10 min. 37°C
MI 05	7,64	---	10,0 (HEPES sal. 5,0 mmol L ⁻¹)	10 min. US + 10 min. 37°C
MI 06	15,27	---	10,0 (HEPES sal. 15,0 mmol L ⁻¹)	10 min. US + 10 min. 37°C
MI 07	15,27	---	20,0 (HEPES sal. 20,0 mmol L ⁻¹)	10 min. US + 10 min. 37°C
MI 08	15,27	---	10,0 (HEPES sal. 15,0 mmol L ⁻¹)	30 min. US + 30 min. 37°C ou 60 min. US
MI 09	15,27	---	8,0 (HEPES sal. 20,0 mmol L ⁻¹)	30 min. US + 30 min. 37°C ou 60 min. US
MI 10	10,0	5,0	8,0 (HEPES sal. 20,0 mmol L ⁻¹)	30 min. US + 30 min. 37°C ou 60 min. US

¹ Banho ultrassônico

² Tampão ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico salino

Na sequência, foram preparadas micelas compostas por DSPE-PEG(2000) e TPGS (Tabela 2), contendo ou não tamoxifeno, seguindo o mesmo procedimento descrito acima. Após ressuspensão, as micelas foram mantidas em repouso a 25°C por pelo menos três horas e, então, filtradas através de membrana com poros de 0,20 µm para retenção do fármaco não encapsulado.

Tabela 2 – Micelas compostas por DSPE-PEG(2000) ou DSPE-PEG(2000)/TPGS, obtidas pela técnica de evaporação do solvente, preparadas em soluções tampão HEPES salino pH 7,4 de diferentes concentrações

Formulação	Massa DSPE-PEG(2000) (mg)	Massa TPGS (mg)	Massa tamoxifeno (mg)	Volume (mL)/Conc. HEPES (mmol L ⁻¹)	Ressuspensão
MI 11	35,0	---	---	2,5/10,0	20 min. US ¹
MI 12	35,0	---	---	2,5/5,0	20 min. US
MI 13	15,0	---	---	3,56/20	20 min. US
MI 14	10,0	5,0	---	3,56/20	20 min. US
MI 15	5,0	10,0	---	3,56/20	20 min. US
MT 01	15,0	---	1,5	3,56/20	40 min. US
MT 02	10,0	5,0	1,5	3,56/20	20 min. US
MT 03	15,0	---	1,5	3,56/20	20 min. US
MT 04	10,0	5,0	1,5	3,56/20	20 min. US
MT 05	5,0	10,0	1,5	3,56/20	20 min. US
MT 06	7,5	7,5	1,5	3,56/20	20min. US
MT 07	11,25	11,25	1,5	3,56/20	20 min. US
MT 08	16,83	9,08	2,6	3,0/20	20 min. US
MT 09	8,42	4,54	1,3	3,0/20	20 min. US
MT 10	16,83	4,54	2,1	3,0/20	20 min. US
MT 11	8,42	2,27	1,1	3,0/20	20 min. US
MT 12	12,62	6,81	1,9	3,0/20	20 min. US
MT 13	12,62	4,54	1,7	3,0/20	20 min. US
MT 14	8,42	6,8	1,5	3,0/20	20 min. US

¹ banho ultrassônico

3.5.1. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Para determinar a eficiência de encapsulação (EE) do tamoxifeno nos sistemas micelares, por método direto, foram tomadas alíquotas de 0,5 mL das formulações, diluídas para 10,0 mL em metanol, em balão volumétrico, e submetidas à agitação em banho ultrassônico por 30 minutos, para promover a desorganização

das micelas e liberar o fármaco encapsulado. Posteriormente, estas amostras foram diluídas 20 vezes em metanol (em balão volumétrico), filtradas através de membrana com poros de 0,45 µm e analisadas por CLAE, de acordo com o método descrito no item 3.4.1.1.

A eficiência de encapsulação foi calculada por meio da fórmula abaixo:

$$EE(\%) = \frac{MFE}{MFT} \times 100$$

Em que:

MFE = massa de fármaco encapsulado

MFT = massa de fármaco total

3.5.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

A determinação da CMC foi realizada pelo método da fluorescência do pireno (SEZGIN; YÜKSEL; BAYKARA, 2006). Este estudo foi conduzido com as formulações MT 09 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,0:1,0) e MT 13 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,5:1,0) isentas de tamoxifeno, preparadas em oito diferentes concentrações ($n = 3$), variando da ordem de 10^{-3} a 10^{-7} mol L⁻¹. Inicialmente, foi preparada uma solução de pireno em clorofórmio na concentração de 1,0 mg mL⁻¹. Alíquotas desta solução, correspondendo a 50 µg de pireno, foram transferidas para frascos âmbar e o solvente foi evaporado em câmara de exaustão a 25°C. Na sequência, as formulações preparadas nas diferentes concentrações foram adicionadas a estes frascos e os mesmos foram mantidos sob agitação magnética (300 rpm) por 24 horas. Após o período de agitação, as formulações foram filtradas através de membrana com poros de 0,45 µm para remoção do pireno livre. As amostras foram, então, analisadas por fluorimetria, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, utilizando como comprimento de onda de excitação 339 nm e como comprimento de onda de emissão 390 nm. Foi confeccionado um gráfico correlacionando no eixo das abscissas o logaritmo da concentração de

DSPE-PEG(2000) presente na formulação e no eixo das ordenadas a respectiva intensidade da fluorescência do pireno. A CMC foi calculada por meio da intersecção entre as regressões lineares da curva obtida.

3.5.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS MICELARES

A caracterização morfológica e físico-química dos sistemas micelares foi realizada por meio das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, análise de tamanho das partículas por espalhamento dinâmico da luz e espectrofotometria no infravermelho – transformada de Fourier.

3.5.3.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para a análise de microscopia eletrônica de transmissão, uma alíquota de cada uma das amostras (cerca de 20 μL) foi aplicada sobre uma lâmina e seca em temperatura ambiente (25°C) para formação de um filme. Em seguida, as mesmas foram submetidas a tratamento com solução aquosa de acetato de uranila 2,0%, utilizada como agente de contraste. Foram obtidas imagens com aumentos de 5.000 vezes.

3.5.3.2. ANÁLISE DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS POR ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ (*DYNAMIC LIGHT SCATTERING*)

As análises de diâmetro médio, distribuição do tamanho das partículas e índice de polidispersividade (IPd) foram realizadas por espalhamento dinâmico da luz, ou espectroscopia de correlação fotônica, utilizando laser de HeNe, operando a 4 mW e comprimento de onda de 633 nm. As amostras foram analisadas sem diluição prévia, com auxílio de cubeta de 1 cm de caminho óptico, na temperatura de

25°C, por meio de medições não invasivas (12 determinações por análise), realizadas em um ângulo de detecção de 173°.

3.5.3.3. ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO – TRANSFORMADA DE FOURIER (IV–TF)

A espectrofotometria no infravermelho – transformada de Fourier foi empregada para caracterização físico-química, bem como para avaliar a ocorrência de possíveis interações moleculares entre o fármaco e demais componentes das formulações. Sendo assim, todos os componentes foram analisados separadamente, além de terem sido analisadas as micelas contendo ou não tamoxifeno.

Cada amostra foi triturada em gral de vidro e misturada fisicamente com brometo de potássio (KBr) anidro. Esta mistura foi comprimida com auxílio de uma prensa hidráulica com punção único, empregando pressão de 6 Kgf cm⁻² para obtenção de pastilhas translúcidas. Em relação às amostras de sistemas micelares, as mesmas foram previamente liofilizadas, de modo que seus componentes retornassem ao estado sólido e pudessem ser misturados ao KBr para obtenção das pastilhas.

Foram efetuadas varreduras no intervalo de número de onda de 4500 até 340 cm⁻¹, com resolução de 2 cm⁻¹ (32 varreduras por amostra).

3.6. ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

3.6.1. PERFIL DE DISSOLUÇÃO DO TAMOXIFENO LIVRE

Previamente ao estudo *in vitro* do perfil de liberação do tamoxifeno encapsulado nos sistemas micelares, foi realizada a dissolução do fármaco livre. Este teste teve como finalidade conhecer o perfil de dissolução do fármaco no meio

de dissolução, para que pudesse ser verificada a influência das formulações sobre a liberação do fármaco.

A fim de avaliar qual o aparato mais apropriado para este estudo, foram testados dois diferentes aparatos adaptados ($n = 3$) previamente desenvolvidos em nosso laboratório (PRAÇA et al., 2008). No primeiro deles (Figura 6A), o fármaco foi introduzido em um tubo de diálise (*cut off* de 6.000 – 8.000 Da), tendo as duas extremidades fechadas com fio de nylon. Este dispositivo foi então colocado em um *sinker*, de modo a impedir que flutuasse na cuba de dissolução, e a agitação do meio foi realizada utilizando-se mini-pás. No segundo (Figura 6B), um tubo de cloreto de polivinila (PVC) foi envolvido por uma membrana de diálise (*cut off* de 6.000 – 8.000 Da) em uma das extremidades e fixado na haste do aparato 1 (cesta) pela outra extremidade.

As demais condições utilizadas neste estudo foram:

- Meio: solução de salicilato de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4;
- Volume de meio: 100 mL;
- Velocidade rotacional: 150 rpm;
- Temperatura: $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$;
- Volume de amostra coletado: 3,0 mL (reposto com meio de dissolução fresco);
- Tempos de amostragem: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 12,0; 24,0; 36,0 e 48,0 horas.

Figura 6: Representação esquemática dos aparatos adaptados avaliados no estudo do perfil de dissolução do tamoxifeno livre. (A) Tubo de diálise e agitação por mini-pás; (B) Tubo de PVC envolvido por membrana de diálise e acoplado à haste do aparato de cesta.

As amostras coletadas foram diluídas na proporção de 3:2 (v/v) em metanol, utilizando balão volumétrico, filtradas através de membrana com poros de 0,45 μm e analisadas por CLAE, utilizando as condições descritas no item 3.4.2.2. A curva analítica foi preparada utilizando como diluente uma mistura de solução de salicilato de sódio 1,0 mol L⁻¹ pH 7,4 e metanol (3:2, v/v).

3.6.2. PERFIL DE LIBERAÇÃO DO TAMOXIFENO A PARTIR DOS SISTEMAS MICELARES

O estudo *in vitro* do perfil de liberação, visando avaliar a quantidade de tamoxifeno liberado por unidade de tempo a partir dos sistemas micelares desenvolvidos, formulações MT 09 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,0:1,0) e MT 13 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,5:1,0), foi realizado em dissolutor (n = 5), com o dispositivo adaptado de tubo de PVC envolvido por uma membrana de diálise e acoplado à haste do aparato de cesta, preparado conforme descrito no item 3.6.1. As demais condições utilizadas foram:

- Meio: solução de salicilato de sódio 1,0 mol L⁻¹ pH 7,4;
- Volume de meio: 100 mL;

- Velocidade rotacional: 150 rpm;
- Temperatura: $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$;
- Volume de amostra coletado: 3,0 mL (reposto com meio de dissolução fresco);
- Tempos de amostragem: 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144 e 168 horas.

As amostras coletadas foram diluídas para 5,0 mL em metanol, em balão volumétrico, filtradas através de membrana com poros de $0,45\ \mu\text{m}$ e analisadas por CLAE, utilizando as condições descritas no item 3.4.2.2. A curva analítica foi preparada utilizando como diluente a mistura de solução de salicilato de sódio $1,0\ \text{mol L}^{-1}$ pH 7,4 e metanol (3:2, v/v). A partir dos resultados obtidos, foi confeccionado o gráfico de concentração de fármaco liberado em função do tempo, comparando-se o perfil de liberação de ambas as formulações avaliadas. Estes dados foram, ainda, comparados aos do estudo de dissolução do tamoxifeno livre, com o objetivo de avaliar a influência das estruturas micelares na solubilidade do fármaco.

3.6.2.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo de liberação *in vitro* do tamoxifeno a partir dos sistemas micelares foi realizado por meio de delineamento inteiramente casualizado com parcela subdividida no tempo. Os resultados foram avaliados estatisticamente para averiguar se os mesmos apresentavam diferença significativa em relação à quantidade de fármaco liberada ao longo do tempo, considerando-se o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Primeiramente, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade. Em seguida, aqueles que apresentaram distribuição

normal foram avaliados pelo teste T de Student e, para os que não apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

3.7. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DO TAMOXIFENO A PARTIR DOS SISTEMAS MICELARES EM MODELO ANIMAL

O estudo para determinação do perfil de concentração plasmática do tamoxifeno e de seu principal metabólito, N-desmetiltamoxifeno, foi realizado com ratas adultas da linhagem Wistar. Para este estudo, foram selecionados animais com peso corporal entre 150 e 200 g, os quais foram mantidos em gaiolas coletivas (três animais por caixa de 41 x 34 x 16 cm), em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e controle automático de iluminação, com ciclos de luz de 12 horas claro/12 horas escuro, tratados com água e ração *ad libitum*. O estudo foi previamente submetido à aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto (protocolo nº 09.1.647.53.5 – Anexo A).

3.7.1. ADMINISTRAÇÃO DAS FORMULAÇÕES E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA

Os animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com a formulação recebida (Tabela 3). Cada grupo foi subdividido em dois para que as colheitas de sangue pudessem ser alternadas. No caso das formulações isentas de fármaco (placebo), cada uma delas foi administrada a seis animais ($n = 3$) e, no caso das formulações contendo tamoxifeno, cada uma foi administrada a 12 animais ($n = 6$).

Tabela 3 – Delineamento experimental empregado na determinação do perfil de concentração plasmática do tamoxifeno a partir dos sistemas micelares, realizado em ratas adultas da linhagem Wistar

Grupo	N° de animais (n x 2)	Tratamento
1	6	MT 13 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,5:1,0) isenta de tamoxifeno
2	6	MT 09 (DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,0:1,0) isenta de tamoxifeno
3	12	MT 13 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,5:1,0) contendo tamoxifeno
4	12	MT 09 (DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,0:1,0) contendo tamoxifeno

Os animais foram acondicionados na sala de experimentação 24 horas antes do início do estudo para ambientação. Cada animal, devidamente identificado, recebeu tratamento com 200 µL da respectiva formulação, administrada por via intravenosa, pela veia caudal lateral, previamente dilatada por imersão da cauda em água aquecida (40 – 50°C) por cerca de 30 segundos, utilizando agulha de 0,45 x 13 mm (26 gauge x ½”). Para a administração das formulações, os animais foram colocados em um contentor, composto por um cilindro de PVC com diâmetro apropriado apoiado em uma base, com um divisor para ajuste do comprimento e uma fenda que permitia a exteriorização da cauda, retornando à caixa imediatamente após o procedimento.

As coletas de sangue foram realizadas com os animais anestesiados por via inalatória com isoflurano, mantendo-se a oxigenação. Durante o procedimento, os animais anestesiados foram mantidos em uma plataforma e, após a obtenção do sangue, o anestésico foi retirado e os sinais vitais (respiração e batimentos cardíacos) foram acompanhados até recuperação total dos animais, quando os mesmos retornaram às gaiolas.

As amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca, sendo a área previamente desinfetada com solução de etanol 70%, com auxílio de agulha de 0,7 x 30 mm (22 gauge x 1¼”), nos seguintes tempos pós-tratamento: 1, 2, 4, 8, 12,

24, 36 e 48 horas. Conforme explicado anteriormente, as coletas foram realizadas alternadamente nos animais, de modo que cada um deles foi submetido a quatro procedimentos ao longo de 48 horas.

As amostras de sangue (volume = 300 μL) foram transferidas para tubos cônicos de 1,5 mL contendo 30 μL de heparina, homogeneizadas e centrifugadas por 15 minutos, na velocidade de 4500 rpm (477 x g) e temperatura de 8°C. Os sobrenadantes (plasma) foram coletados com auxílio de micropipeta, transferidos para novos tubos e imediatamente armazenados a -20°C. Terminada esta etapa, todas as amostras congeladas foram transferidas para armazenamento a -70°C, onde foram mantidas até o momento da análise.

Após a obtenção da última amostra de sangue, o respectivo animal foi mantido anestesiado e sacrificado em ambiente saturado com isoflurano, confirmando-se o óbito pela ausência de reflexos, movimentos respiratórios e batimentos cardíacos (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008).

3.7.2. MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO TAMOXIFENO E DO N-DESMETILTAMOXIFENO NAS AMOSTRAS DE PLASMA UTILIZANDO CLAE

As condições cromatográficas do método empregado para a quantificação do tamoxifeno e de seu principal metabólito, N-desmetiltamoxifeno, nas amostras de plasma foram as mesmas utilizadas para quantificação do fármaco no estudo de liberação *in vitro* (item 3.4.2.2.). Porém, por tratar-se de uma matriz biológica, que exigia extenso processo de purificação e extração dos analitos, foi utilizada a técnica de padronização interna, de acordo com o preconizado pela resolução RDC nº 27/2012, da Anvisa (2012). O processo de purificação e extração teve por base o estudo conduzido por Broniscer e colaboradores (2000), o qual utilizou a substância flurazepam como padrão interno (PI).

Para a preparação da curva analítica, utilizou-se como ponto de partida uma solução estoque de tamoxifeno e N-desmetiltamoxifeno em metanol, ambos na concentração de 250,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A partir desta solução estoque, foram preparadas

seis soluções padrão em metanol, por meio de diluições adequadas, obtendo as concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 5,0 10,0 e 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as quais foram filtradas através de membrana com poros de 0,45 μm .

Para a obtenção da curva analítica em plasma, a 150 μL de plasma branco, foram adicionados 150 μL de cada uma das soluções padrão em metanol, 15 μL da solução de padrão interno (na concentração de 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em metanol) e 135 μL de metanol, em tubo cônico tipo *ependorf*. Esta mistura foi agitada em vórtex por um minuto e centrifugada a 2500 rpm (265 x g) por 10 minutos, na temperatura de 10°C. A fase líquida foi coletada e transferida para novo tubo cônico, onde foi adicionado 1,0 mL de uma solução de hexano:álcool isoamílico (98,5:1,5; v/v). A nova mistura foi agitada em vórtex por 5 minutos e, após separação das fases, foi coletada aquela composta por hexano:álcool isoamílico. A mistura de solventes foi evaporada sob fluxo de ar comprimido em capela de exaustão (25°C) e o resíduo foi ressuspenso em 100 μL de metanol. Estas soluções foram analisadas em triplicata. Para a confecção das curvas analíticas para o tamoxifeno e para o N-desmetiltamoxifeno, foram construídos dois gráficos relacionando-se as concentrações do analito (tamoxifeno ou N-desmetiltamoxifeno) no eixo das abscissas e as razões entre os valores de área obtidos (mAUUV) para os picos do respectivo analito e do padrão interno no eixo das ordenadas. A linearidade das curvas de calibração foi avaliada por meio de regressão linear e determinação do coeficiente de correção linear.

Para verificação da recuperação, foram comparados os valores de área obtidos para cada concentração do analito (tamoxifeno ou N-desmetiltamoxifeno) submetida ao processo de extração descrito acima com os valores de área obtidos para soluções equivalentes à concentração inicial dos mesmos em metanol, analisadas sob as mesmas condições.

Em relação às amostras, foram tomados 150 μL de plasma de cada uma delas, adicionando-se 15 μL da solução de padrão interno e 285 μL de metanol. A partir deste ponto, foi efetuado o mesmo procedimento de purificação e extração efetuado para a obtenção das soluções padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO OCTANOL/ÁGUA ($K_{O/A}$) DO TAMOXIFENO

A determinação do coeficiente de partição octanol/água é empregada na avaliação do grau de lipofilicidade de uma substância. O resultado obtido para o tamoxifeno (Tabela 4) indicou que após o particionamento, o fármaco migrou em sua totalidade para a fase orgânica, evidenciando sua elevada lipofilicidade. Este resultado fornece embasamento para a necessidade de utilizar substâncias adjuvantes no meio de dissolução, de modo a garantir a solubilização adequada do tamoxifeno no mesmo.

Tabela 4 – Determinação do coeficiente de partição octanol/água ($K_{O/A}$) do tamoxifeno

C_1^A ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	C_2^B ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$K_{O/A}$
$0,50 \pm 0,05$	0,00	∞

^A Concentração de tamoxifeno na água antes da partição

^B Concentração de tamoxifeno na água após a partição

4.2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO TAMOXIFENO NOS ESTUDOS *IN VITRO* UTILIZANDO CLAE

A validação analítica é uma etapa fundamental no desenvolvimento de uma formulação, uma vez que é por meio dela que se garante que o método desenvolvido atende às exigências das aplicações analíticas pretendidas, assegurando a veracidade dos resultados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Agências regulatórias brasileiras e de outros países contêm documentos oficiais, nos quais se encontram as diretrizes que dever ser seguidas nos processos de validação, de modo que se obtenham dados claros e objetivos das evidências que comprovem que um método analítico é adequado para o uso proposto (CHIARADIA, 2009).

4.2.1. MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A CLAE em fase reversa é a técnica de primeira escolha para análise quantitativa da maioria dos fármacos, em virtude de sua estabilidade, eficiência e reprodutibilidade. O tempo de retenção do analito na coluna depende, principalmente, de sua afinidade pela fase estacionária, a qual pode ser modulada pela polaridade da fase móvel, composta, basicamente, por água ou soluções tampão, adicionadas de modificadores orgânicos, como metanol e acetonitrila. Nesta técnica, em que são utilizadas fases estacionárias apolares e fases móveis polares, de maneira geral, o tempo de retenção do analito diminui à medida que se aumenta a proporção do solvente orgânico na fase móvel, ou seja, aumenta-se sua força cromatográfica, em virtude da redução da polaridade, uma vez que aumenta sua semelhança com a fase estacionária apolar (CASS; DEGANI, 2001; OLIVEIRA, 2009; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Empregando-se as condições descritas no método desenvolvido para determinação da eficiência de encapsulação do tamoxifeno (item 3.4.1.1.), o fármaco apresentou tempo de retenção em torno de 7 minutos (Figura 7).

Figura 7: Cromatograma do tamoxifeno em solução metanólica, na concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.1.1. VALIDAÇÃO ANALÍTICA

• LINEARIDADE

Linearidade pode ser definida como a capacidade de um método analítico produzir resultados direta ou indiretamente proporcionais à concentração do analito em uma determinada faixa (BARROS, 2002; SOUZA, 2009). Para a determinação da linearidade, é necessário construir uma curva correlacionando a concentração do analito e o sinal medido (área ou altura do pico cromatográfico), utilizando-se, para tanto, de, no mínimo, cinco soluções com concentrações diferentes do mesmo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). A partir da regressão linear da curva obtida, é possível determinar a equação da reta e o coeficiente de correlação linear. Este último avalia a dispersão do conjunto de pontos obtidos, sendo que, quanto mais próximo a 1,0, menor a dispersão, logo, maior a linearidade da curva (CHIARADIA, 2009; RIBANI et al., 2004).

A linearidade do método em estudo foi avaliada no intervalo de concentração compreendido entre 0,1 e 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados demonstraram que as respostas obtidas (áreas dos picos) foram proporcionais à concentração de tamoxifeno ao longo de toda a faixa avaliada, uma vez que o coeficiente de correlação linear apresentou valor superior a 0,99 (Figura 8).

Figura 8: Curva analítica do tamoxifeno em solução metanólica (concentrações de 0,1 a 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), obtida para estudo de linearidade do método para determinação da eficiência de encapsulação utilizando CLAE.

• SELETIVIDADE

A seletividade de um método analítico é definida como sua capacidade de distinguir a resposta do analito das dos outros componentes da amostra (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2007). Assim, o estudo de seletividade tem por objetivo avaliar o grau de interferência de quaisquer outros componentes que estejam presentes na amostra sobre o analito, tais como outros princípios ativos, excipientes, impurezas, produtos de degradação, substâncias endógenas, etc (CHIARADIA, 2009; PASCHOAL et al., 2008; RIBANI et al., 2004).

No estudo de seletividade, alíquotas de micelas isentas de tamoxifeno, compostas por DSPE-PEG(2000) e TPGS em tampão HEPES salino 20 mmol L⁻¹, foram preparadas conforme técnica descrita anteriormente e analisadas por CLAE. Os resultados (Figura 9) mostraram que não há interferência da formulação na análise do tamoxifeno, uma vez que não foi evidenciado nenhum outro pico na região correspondente ao tempo de retenção do fármaco.

Figura 9: Cromatogramas obtidos a partir das análises de micelas isentas de tamoxifeno diluídas em metanol. (A) Micelas compostas por DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,0:1,0). (B) Micelas compostas por DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,5:1,0).

• PRECISÃO E EXATIDÃO

Precisão pode ser definida como a avaliação da proximidade entre os resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003), ou seja, avalia a dispersão dos resultados oriundos de ensaios independentes de uma amostra, sendo determinada através do coeficiente de variação (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2007).

De acordo com o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Inmetro (2007), o ensaio de precisão intraensaio, ou repetitividade, tem a função de avaliar o nível de concordância entre os resultados provenientes de medições sucessivas do analito, as quais devem ser efetuadas sob as mesmas condições, empregando-se o mesmo procedimento de extração, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo local e em um curto espaço de tempo. Já a precisão interensaios (ou precisão intermediária), é realizada com amostras idênticas, empregando-se o mesmo método, mas alterando-se uma ou mais condições (por exemplo: dias diferentes, diferentes equipamentos, diferentes analistas). Assim, é capaz de fornecer indicações a respeito das variações ocorridas dentro do

laboratório, verificando se o mesmo método produzirá sempre os mesmos resultados, sendo o mais representativo estudo da variabilidade dos resultados obtidos em um mesmo laboratório (RIBANI et al., 2004).

O termo exatidão refere-se ao grau de concordância entre o valor médio obtido e o valor de referência, considerado como verdadeiro, sendo expressa em porcentagem (BARROS, 2002; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2007; SOUZA, 2009). A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, aparecendo sempre associada a valores de precisão. Os limites de precisão e exatidão podem ser mais estreitos para níveis de concentração mais elevados e mais amplos para concentrações muito reduzidas (RIBANI et al., 2004), como no caso de métodos bioanalíticos, por exemplo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012).

Todos os resultados obtidos nos estudos de precisão e exatidão intraensaio e interensaios encontraram-se dentro dos limites considerados como aceitáveis, ou seja, $CV < 5,0\%$ e $-10 < E < 10\%$ (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultados obtidos nos estudos de precisão (CV) e exatidão (E) intraensaio (n = 10/único dia) e interensaios (n = 3/5 dias consecutivos) do método para determinação de eficiência de encapsulação utilizando CLAE

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,25		2,5		20,0	
Parâmetros	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)
Intraensaio	4,83	5,30	3,11	-3,13	1,46	-0,68
Interensaios	3,86	6,72	1,71	-0,63	1,10	0,13

• FAIXA DE TRABALHO

A faixa de trabalho do método deriva do estudo de linearidade, devendo ser definida também com base na aplicação pretendida. Além disso, o intervalo

selecionado como faixa de trabalho deve atender aos requisitos de precisão e exatidão (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Assim, a mesma foi definida compreendendo o intervalo de 0,25 a 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 10).

Figura 10: Curva analítica do tamoxifeno em solução metanólica, na faixa de concentração de 0,25 a 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (faixa de trabalho).

• ROBUSTEZ

A robustez de um método é definida como a sua capacidade de resistir a pequenas variações nos parâmetros analíticos, sem que haja prejuízo nos resultados obtidos, servindo, desta maneira, como indicador de confiabilidade no uso corrente. Durante o desenvolvimento de um método, é fundamental que seja efetuado o estudo de robustez, pois, caso seja detectada alguma susceptibilidade do mesmo frente a alguma variação analítica, a mesma deve ser controlada rigorosamente e precauções devem ser incluídas no procedimento operacional (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

As modificações realizadas nas condições de análise (vazão da fase móvel, proporção entre metanol e solução de trietilamina 1,0% na fase móvel e concentração de trietilamina na fase aquosa) não promoveram nenhum tipo de alteração além dos limites estabelecidos no que diz respeito à linearidade, precisão

e exatidão, no intervalo de concentração selecionado como faixa de trabalho (Tabela 6).

Tabela 6 – Avaliação da linearidade (r), precisão (CV) e exatidão (E) frente às alterações nas condições analíticas realizadas para verificação da robustez do método para determinação de eficiência de encapsulação utilizando CLAE ($n = 3$)

Vazão da fase móvel (mL min ⁻¹)						
	1,0		1,2		1,4	
r	0,9990		1,0000		1,0000	
Concentração (µg mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)
0,25	1,56	1,08	2,40	8,36	2,29	9,74
2,5	1,68	-0,68	0,77	-1,82	1,13	-2,16
20,0	1,50	-0,24	0,98	0,05	0,68	-0,33
Proporção MeOH : TEA (v/v)						
	87:13		89:11		91:9	
r	1,0000		1,0000		1,0000	
Concentração (µg mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)
0,25	2,58	2,62	2,40	8,36	0,20	-7,80
2,5	0,47	-2,65	0,77	-1,82	0,11	-1,37
20,0	1,73	-0,04	0,98	0,05	0,54	-0,11
% TEA						
	0,8		1,0		1,2	
r	1,0000		1,0000		1,0000	
Concentração (µg mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)
0,25	1,85	-5,52	2,40	8,36	1,22	9,72
2,5	1,07	-3,13	0,77	-1,82	0,90	-5,75
20,0	1,43	-0,12	0,98	0,05	0,51	-0,09

• LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO E DETECÇÃO

O limite de quantificação corresponde à menor concentração do analito em que são atendidos os requisitos de precisão e exatidão aceitáveis, empregando-se as condições analíticas previamente estipuladas (AGÊNCIA NACIONAL DE

VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Assim sendo, o limite de quantificação para o método em questão foi de $0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O limite de detecção corresponde à menor concentração do analito que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada. No caso de métodos instrumentais, tais como a CLAE, o mesmo pode ser determinado por meio de uma relação estabelecida entre o desvio padrão do intercepto com o eixo das ordenadas e a inclinação da curva (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Aplicando-se a equação descrita no item 3.4.1.2., o limite de detecção obtido para este método foi de $0,032 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os resultados apresentados nos testes de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de quantificação e robustez mostraram que o método desenvolvido é adequado para determinar a eficiência de encapsulação do tamoxifeno nos sistemas micelares, conforme proposto inicialmente.

4.2.2. MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DO TAMOXIFENO NOS EXPERIMENTOS DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

4.2.2.1. DETERMINAÇÃO DO MEIO DE DISSOLUÇÃO

Os estudos *in vitro* de liberação de fármacos devem ser realizados em condições de *sink*, ou seja, a concentração de fármaco liberado deve ser suficientemente baixa para que não ocorra saturação do meio, alterando, assim, o gradiente de liberação. Para garantir as condições de *sink*, a concentração de fármaco no meio de dissolução deve ser a equivalente a 10% de sua concentração de saturação (WASHINGTON, 1990). Esta é uma etapa crítica no delineamento de estudos de liberação de fármacos hidrofóbicos, uma vez que a manutenção das condições de *sink* pode requerer concentrações extremamente baixas de fármaco, atingidas utilizando-se volumes muito elevados de meio de dissolução e dificultando a quantificação do mesmo (CHO et al., 2004).

Uma vez que o tamoxifeno é um fármaco praticamente insolúvel em água, é necessária a utilização de adjuvantes no meio de dissolução para garantir as condições de *sink*. Estudos prévios utilizaram como meio de dissolução para este fármaco tampão fosfato salino pH 7,4 acrescido de 0,5% de lauril sulfato de sódio (CHAWLA; AMIJI, 2002). Entretanto, como o presente trabalho trata de um sistema de liberação composto por uma estrutura micelar, ou seja, uma estrutura fluida e dinâmica, gerada pela organização espontânea de moléculas anfifílicas em meio aquoso, a utilização de um agente tensoativo no meio de dissolução não é indicada, uma vez que as moléculas do tensoativo podem interagir com a estrutura micelar, levando à desestruturação do sistema e gerando falsos resultados.

Estudos do perfil de liberação *in vitro* de fármacos pouco solúveis em água, como paclitaxel e camptotecina, a partir de sistemas micelares, vêm sendo realizados empregando-se soluções de substâncias hidrotrópicas, objetivando aumentar a solubilidade destes fármacos em meio aquoso, garantindo, desta forma, as condições de *sink* (CHO et al., 2004; MU; ELBAYOUMI; TORCHILIN, 2005).

Substâncias hidrotrópicas são compostos alcalinos capazes de aumentar a solubilidade de substâncias hidrofóbicas em comparação à água pura (ANDELIN et al., 1989). Para tanto, as soluções hidrotrópicas salinas são preparadas em concentrações próximas à saturação, a partir de álcalis ou sais alcalinos terrosos de ácido como benzoico, salicílico, benzenossulfônico e fenolsulfônico, entre outros (KORPINEN; FARDIM, 2009).

Os estudos de solubilidade foram realizados utilizando-se diversos meios com pH ajustado para 7,4, objetivando mimetizar o pH plasmático, uma vez que a via de administração pretendida era a intravenosa. Os resultados obtidos (Tabela 7) mostraram que o meio em que o tamoxifeno apresentou solubilidade mais elevada foi a solução de salicilato de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4.

Tabela 7 – Resultados obtidos no estudo de solubilidade do tamoxifeno em diversos meio aquosos (n = 3), realizado com excesso de fármaco (10,0 mg/5,0mL) sob agitação magnética (300 rpm), temperatura de 25°C, tempo de amostragem de 48 horas e quantificação por CLAE

Meio	Solubilidade ($\pm$ DP) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Água purificada	< LQ
Tampão fosfato pH 7,4	< LQ
Tampão fosfato pH 7,4 + NaSal 1,0 mol L ⁻¹	9,17 ($\pm$ 1,86)
NaSal 1,0 mol L ⁻¹ pH 7,4	12,92 ($\pm$ 0,98)

Os resultados demonstraram que é imprescindível a utilização de uma substância auxiliar para permitir a solubilização do tamoxifeno em meio aquoso, uma vez que os valores obtidos para água purificada e tampão fosfato pH 7,4 estavam abaixo do limite de quantificação. O meio no qual o tamoxifeno apresentou maior solubilidade foi a solução de salicilato de sódio 1,0 mol L⁻¹ pH 7,4, que, portanto, foi eleita como meio de dissolução.

4.2.2.2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Após a determinação do meio de dissolução, procedeu-se a validação do método analítico para quantificação do tamoxifeno nos estudos de dissolução *in vitro*. O método utilizado foi adaptado daquele desenvolvido para determinação da eficiência de encapsulação (item 3.4.1.1.), utilizando-se como diluente para as soluções da curva analítica a mistura de solução de salicilato de sódio 1,0 mol L⁻¹ pH 7,4 (meio de dissolução) e metanol na proporção de 3:2 (v/v), tal qual as amostras foram preparadas. Foi necessário aumentar a quantidade de solução de trietilamina 1,0% na fase móvel, reduzindo, assim, sua força cromatográfica, bem como reduzir a vazão de 1,2 para 1,0 mL min⁻¹, para retardar a eluição do tamoxifeno, pois o salicilato de sódio, presente em alta concentração, interferia significativamente na quantificação do fármaco utilizando-se as condições empregadas na determinação da eficiência de encapsulação, onde as amostras

foram preparadas apenas em metanol. Nas condições aqui utilizadas, o tamoxifeno apresentou tempo de retenção de 12,5 minutos (Figura 11).

Figura 11: Cromatograma do tamoxifeno em solução de salicilato de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4:metanol (3:2, v/v), na concentração de $5,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

• VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A linearidade deste método foi avaliada no intervalo de concentração compreendido entre $0,25$ e $20,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, o qual foi, posteriormente, selecionado como faixa de trabalho. O coeficiente de correlação linear, calculado a partir da regressão linear da curva analítica, evidenciou a proporcionalidade entre as repostas obtidas (áreas dos picos) e as concentrações das soluções padrão, uma vez que foi superior a 0,99 (Figura 12).

Figura 12: Curva analítica do tamoxifeno em solução de salicilato de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4:metanol (3:2, v/v), obtida para estudo de linearidade do método para quantificação do fármaco nos estudos de dissolução *in vitro* utilizando CLAE.

O estudo de seletividade, realizado por meio da análise de alíquotas de micelas isentas de fármaco, contendo DSPE-PEG(2000) e TPGS em tampão HEPES salino 20 mmol L^{-1} , diluídas tal como as soluções da curva analítica, demonstrou que não há interferência da formulação na análise do tamoxifeno, uma vez que não foi evidenciado nenhum pico na região correspondente ao tempo de retenção do fármaco (Figura 13).

Figura 13: Cromatogramas obtidos a partir das análises de micelas isentas de tamoxifeno diluídas em solução de salicilato de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4:metanol (3:2, v/v). (A) Micelas compostas por DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,0:1,0). (B) Micelas compostas por DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,5:1,0).

Os resultados dos ensaios de precisão e exatidão intraensaio e interensaios apresentaram valores considerados aceitáveis, ou seja, dentro dos limites especificados ($CV < 5,0\%$; $-10,0 < E < 10,0\%$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Resultados obtidos nos estudos de precisão (CV) e exatidão (E) intraensaio (n = 10/único dia) e interensaios (n = 3/3 dias consecutivos) do método para quantificação do tamoxifeno nos estudos de dissolução *in vitro* utilizando CLAE

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,25		2,5		20,0	
Parâmetros	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)
Intraensaio	3,41	-3,57	3,05	0,42	2,85	-2,01
Interensaios	2,25	1,66	2,10	-0,36	2,39	0,86

Uma vez que o método apresentou linearidade, precisão e exatidão em todo o intervalo de concentração avaliado, o mesmo foi selecionado como faixa de trabalho, já que este intervalo atendia à aplicação pretendida.

Na determinação do limite de quantificação, considerou-se o menor valor de concentração de solução padrão em que a precisão e a exatidão encontravam-se dentro dos limites pré-estabelecidos. Verificou-se, por meio de tal análise, que este valor coincidia com o menor valor da curva analítica, ou seja, $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$. O limite de detecção, calculado pela equação descrita no item 3.4.1.2. foi de $0,022 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Quanto à robustez do método (Tabela 9), as alterações avaliadas (vazão da fase móvel, proporção entre metanol e solução de trietilamina 1,0% na fase móvel e concentração de trietilamina na fase aquosa) não foram capazes de alterar os valores de linearidade, precisão e exatidão obtidos além dos limites estabelecidos. Conclui-se assim, que o método é robusto frente a todas as variações testadas.

Tabela 9 – Avaliação da linearidade (r), precisão (CV) e exatidão (E) frente às alterações nas condições analíticas realizadas para verificação da robustez ($n = 3$) do método para quantificação do tamoxifeno nos estudos de dissolução *in vitro* utilizando CLAE

Vazão da fase móvel (mL min ⁻¹)						
	0,9		1,0		1,1	
r	0,9999		0,9999		0,9999	
Concentração (µg mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)
0,25	2,67	-6,67	2,25	1,66	4,41	-1,65
2,5	1,93	-0,61	2,10	-0,36	2,69	1,02
20,0	1,75	-1,16	2,39	0,86	1,02	-0,75
Proporção MeOH : TEA (v/v)						
	86:14		85:15		84:16	
r	1,0000		0,9999		1,0000	
Concentração (µg mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)
0,25	3,94	-9,22	2,25	1,66	1,59	-5,08
2,5	3,42	-1,71	2,10	-0,36	3,22	0,43
20,0	0,17	-0,06	2,39	0,86	2,20	-1,27
% TEA						
	0,8		1,0		1,2	
r	1,0000		0,9999		1,0000	
Concentração (µg mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)
0,25	4,82	-6,6	2,25	1,66	1,16	-4,37
2,5	1,93	-0,90	2,10	-0,36	2,89	-2,47
20,0	3,10	0,66	2,39	0,86	1,14	4,59

4.3. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICELAS DE LONGO TEMPO DE CIRCULAÇÃO À BASE DE DSPE-PEG(n) E DSPE-PEG(n)/TPGS PELA TÉCNICA DE EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE

4.3.1. OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS MICELARES, DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E ANÁLISE DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS POR ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ

O processo de obtenção de micelas fosfolipídicas pelo método de evaporação do solvente, seguido da hidratação do filme lipídico é a técnica mais usualmente empregada para obtenção deste tipo de nanoestrutura. Em linhas gerais, este processo compreende a solubilização do(s) lipídeo(s) e do fármaco em um solvente orgânico volátil, o qual é evaporado, levando à formação de um filme. Este filme é então hidratado, utilizando-se uma solução tampão e submetido a agitação vigorosa, originando as estruturas micelares. Se houver excesso de fármaco, ultrapassando a capacidade de solubilização das micelas, ocorre a precipitação do fármaco não encapsulado na forma cristalina, o qual pode ser removido facilmente por filtração (LUKYANOV; TORCHILIN, 2004).

A formação das estruturas micelares foi verificada por meio da análise por espalhamento dinâmico da luz ou espectroscopia de correlação fotônica. Esta técnica tem por base o movimento browniano, que corresponde ao movimento aleatório das partículas sob o impacto do solvente sobre sua superfície. É possível estabelecer uma relação entre a frequência e a amplitude deste movimento com o tamanho das partículas e com a viscosidade do solvente, sendo que quanto menor a partícula, maior a intensidade do movimento browniano (MALVERN, 2011). O ideal é que a formulação apresente perfil de distribuição monomodal e baixo índice de polidispersividade (IPd), o que indica uniformidade no tamanho das partículas (AULTON, 2005). A determinação do tamanho de partícula é de fundamental importância neste trabalho, em virtude da via de administração pretendida (intravenosa).

De acordo com estas análises, as primeiras tentativas realizadas, utilizando o fosfolípido DSPE não peguado, demonstraram que não houve formação de micelas, uma vez que o perfil de distribuição de tamanho apresentou múltiplas populações e com elevado índice de polidispersividade (Figura 14). Verificou-se, desta maneira, que o DSPE não peguado não permitiu a formação de estruturas organizadas em meio aquoso, possivelmente devido à sua elevada hidrofobicidade.

Figura 14: Representação gráfica da distribuição de tamanho de partícula da formulação preparada com o fosfolípido DSPE não peguado, obtida por espalhamento dinâmico da luz, realizada no analisador de partículas Zetasizer Malvern, modelo Nano SZ.

Por este motivo, passou-se a utilizar o fosfolípido conjugado a PEG(750) (Tabela 1), uma vez que este último apresenta maior caráter hidrofílico, conferindo ao conjugado maior característica hidrofílica também. A princípio, utilizou-se tampão fosfato pH 7,4 como meio para ressuspensão do filme lipídico (formulações MI 01 e MI 02), conforme método desenvolvido por Sibata e colaboradores (2004), porém, esta solução tampão não se mostrou adequada para a obtenção dos sistemas pretendidos. Na sequência, foram preparadas diversas formulações empregando-se tampão HEPES salino pH 7,4 em diferentes concentrações ($5,0 - 20 \text{ mmol L}^{-1}$) (formulações MI 03 a MI 09), conforme descrito em estudos anteriores (LAVASANIFAR; SAMUEL; KWON, 2001; LUKYANOV; GAO; TORCHILIN, 2003; LUKYANOV; TORCHILIN, 2004; SAWANT; TORCHILIN, 2009). Os resultados

mostraram que mesmo com o aumento da concentração do tampão não foi possível obter um perfil de distribuição de tamanho monomodal (Figura 15).

Figura 15: Representação gráfica da distribuição de tamanho de partícula de formulação preparada com o fosfolípido DSPE-PEG(750), obtida por espalhamento dinâmico da luz, realizada no analisador de partículas Zetasizer Malvern, modelo Nano SZ.

Paralelamente, avaliou-se também a influência do método de ressuspensão do filme lipídico – banho ultrassônico *versus* incubação em banho termostaticado a 37°C. De acordo com Sawant e Torchilin (2009), o aquecimento a 37°C pode aumentar a eficiência de encapsulação de fármacos pouco solúveis em água, porém, verificou-se que este último processo não se mostrou adequado para a obtenção dos sistemas propostos, uma vez que a incubação levou à formação de múltiplas populações, aumentando o índice de polidispersividade.

A incorporação de TPGS ao filme lipídico, levando à formação de sistemas híbridos compostos por DSPE-PEG(750)/TPGS, ressuspensos em tampão HEPES salino, também não foi capaz de promover a formação de um sistema de tamanho uniforme. Sendo assim, todas as formulações preparadas com o fosfolípido DSPE-PEG(750) não apresentaram resultados satisfatórios, tendo por base a distribuição de tamanho de partículas e o índice de polidispersividade (Figura 16). A hipótese levantada é que a cadeia de PEG(750) não possui característica hidrofílica

suficientemente elevada para permitir a organização regular na forma de micelas das moléculas do fosfolípídeo conjugado a ela, mesmo quando associado ao TPGS.

Figura 16: Representação gráfica da distribuição de tamanho de partícula de formulação preparada a partir de DSPE-PEG(750)/TPGS (1:1, p/p), obtida por espalhamento dinâmico da luz, realizada no analisador de partículas Zetasizer Malvern, modelo Nano SZ.

Para confirmação da hipótese descrita acima, o DSPE-PEG(750) foi substituído por DSPE-PEG(2000), uma vez que, quanto mais elevada a massa molecular da cadeia de PEG, maior sua hidrofiliicidade. Sendo assim, o PEG(2000) confere ao conjugado uma região hidrofílica maior, favorecendo sua interação com o meio aquoso, de modo a facilitar a organização das moléculas na forma de micelas.

As formulações preparadas com DSPE-PEG(2000) (Tabela 2), associado ou não ao TPGS, demonstraram que a hipótese apresentada era correta, uma vez que a conjugação do fosfolípídeo com uma molécula de PEG de maior caráter hidrofílico favoreceu a formação das estruturas micelares (Tabela 10).

Tabela 10 - Diâmetro médio e índice de polidispersividade (IPd) das micelas à base de DSPE-PEG(2000) ou DSPE-PEG(2000)/TPGS em tampão HEPES salino 20 mmol L⁻¹ pH 7,4

Formulação	Diâmetro médio (nm)	IPd
MI 11	--- ¹	1,000
MI 12	--- ²	1,000
MI 13	--- ²	1,000
MI 14	19,3	0,241
MI 15	--- ¹	1,000
MT 01	--- ²	0,310
MT 02	--- ²	0,751
MT 03	20,2	0,221
MT 04	17,0	0,214
MT 05	--- ²	0,398
MT 06	16,4	0,216
MT 07	18,7	0,286
MT 08	32,7 ²	0,445
MT 09	20,2	0,270
MT 10	16,9	0,104
MT 11	27,6	0,137
MT 12	20,8	0,312
MT 13	15,0	0,084
MT 14	20,4	0,280

¹ Formulação apresentando múltiplas populações

² Formulação apresentando duas populações, uma delas compatível com diâmetro de micelas (< 100 nm)

A partir do momento em que foram obtidas micelas inertes com distribuição de tamanho e índice de polidispersividade adequados, iniciaram-se os testes para incorporação do tamoxifeno nos sistemas micelares (formulações MT 01 a MT 14).

Entre as preparações contendo fármaco, somente as formulações MT 01, MT 02 e MT 05 não apresentaram distribuição de tamanho de partícula adequado. Nestas formulações, foram observadas duas populações distintas e definidas. A primeira delas, com diâmetro médio ao redor de 20 nm, composta por micelas e uma segunda população, com diâmetro médio superior a 200 nm, provavelmente formada por estruturas lipossomais. A formulação MT 08 apresentou prevalência de sistemas micelares (aproximadamente 70%), entretanto, apresentou uma segunda população com diâmetro médio acima de 200 nm.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que as micelas foram obtidas adequadamente utilizando-se misturas de DSPE-PEG(2000) e TPGS em

que o primeiro foi utilizado na mesma proporção molar (Figura 17) ou acima daquela empregada para o TPGS (Figura 18). Os sistemas contendo quantidade maior de TPGS em relação ao DSPE-PEG(2000) não apresentaram resultados satisfatórios. Em termos de análise de distribuição de tamanho de partícula, o melhor resultado obtido foi o referente à formulação MT 13 composta por DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,5:1,0), a qual apresentou o menor índice de polidispersividade (0,084).

Figura 17: Representação gráfica da distribuição de tamanho de partícula da formulação MT 09, preparada a partir de DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,0:1,0), obtida por espalhamento dinâmico da luz, realizada no analisador de partículas Zetasizer Malvern, modelo Nano SZ.

Figura 18: Representação gráfica da distribuição de tamanho de partícula da formulação MT 13, preparada a partir de DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,5:1,0), obtida por espalhamento dinâmico da luz, realizada no analisador de partículas Zetasizer Malvern, modelo Nano SZ.

As preparações que apresentaram perfil de distribuição de tamanho de partícula monomodal foram submetidas à determinação da eficiência de encapsulação do tamoxifeno, realizada de acordo com o método descrito no item 3.4.1.1. Os resultados obtidos (Tabela 11) demonstraram que os sistemas micelares desenvolvidos apresentaram elevadas taxas de eficiência de encapsulação do tamoxifeno. Com exceção da formulação MT 14, que apresentou eficiência de encapsulação de 62,58%, todas as formulações apresentaram valores entre 70 e 95%.

Tabela 11 – Resultados obtidos na avaliação da eficiência de encapsulação do tamoxifeno em sistemas micelares à base de DSPE-PEG(2000)/TPGS em diferentes proporções, preparados em tampão HEPES salino 20,0 mol L⁻¹ pH 7,4

Formulação	Eficiência de encapsulação (%)
MT 07	79,01%
MT 08	93,75%
MT 09	88,22%
MT 10	70,47%
MT 11	74,17%
MT 12	76,60%
MT 13	76,80%
MT 14	62,58%

Embora o melhor valor de eficiência de encapsulação tenha sido alcançado pela formulação MT 08, esta não foi considerada a melhor formulação devido ao fato de apresentar uma população com diâmetro médio de partícula superior a 200 nm, além da população composta por estruturas micelares. Excluindo-se, portanto, esta formulação, os resultados mostram que a formulação em que se obteve a maior taxa de eficiência de encapsulação foi a MT 09 (88,22%), composta por DSPE-PEG(2000) /TPGS na proporção molar de 1,0:1,0.

Considerando-se que a formulação MT 13 foi a que apresentou o menor índice de polidispersividade e a formulação MT 09 a que apresentou a mais elevada

taxa de eficiência de encapsulação, ambas foram selecionadas para dar continuidade aos estudos.

4.3.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

Sendo o pireno uma substância pouco solúvel em água, o mesmo tende a incorporar-se espontaneamente às micelas, mantendo-se em seu interior, por sua afinidade com a porção hidrofóbica das mesmas. Em concentrações inferiores à CMC, onde as moléculas anfifílicas encontram-se dispersas no meio aquoso de maneira desordenada, o pireno encontra-se livre e culmina por precipitar devido a sua baixa solubilidade em água, podendo ser removido por filtração. Assim, em concentrações inferiores à CMC, são observados valores baixos de intensidade de fluorescência do pireno. Entretanto, a partir deste ponto, verifica-se um expressivo aumento na intensidade da fluorescência (SEZGIN; YÜKSEL; BAYKARA, 2006). Ao ser traçado um gráfico correlacionando o logaritmo da concentração da substância anfifílica *versus* a intensidade de fluorescência do pireno, obtém-se uma curva com duas porções lineares. A CMC corresponde à intersecção entre estes dois segmentos, obtida por meio da regressão linear de cada uma destas porções.

Como as formulações desenvolvidas eram compostas por duas moléculas anfifílicas, DSPE-PEG(2000) e TPGS, uma delas, o fosfolípídeo DSPE-PEG(2000), foi selecionado para confecção do gráfico descrito acima, realizando-se posteriormente o cálculo da proporção da outra molécula.

Os resultados obtidos (Figuras 19 e 20) demonstram que, para ambas as formulações, a CMC encontra-se na ordem de 10^{-5} mol L⁻¹. Para a formulação MT 09 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,0:1,0), a CMC obtida foi de $5,01 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ para ambas as moléculas. Para a formulação MT 13 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,0:1,0), a CMC calculada foi de $3,55 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ de DSPE-PEG(2000) para $2,37 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ de TPGS, evidenciando a estabilidade destas formulações em soluções aquosas altamente diluídas. Uma vez que o fator que exerce maior influência sobre a CMC, reduzindo-o, é a porção hidrofóbica (SEZGIN; YÜKSEL;

BAYKARA, 2006), conforme esperado, a formulação MT 13 apresentou um valor inferior à MT 09, uma vez que possui uma quantidade maior de DSPE, molécula esta mais hidrofóbica do que o TPGS.

Figura 19: Representação gráfica da curva de intensidade de fluorescência do pireno *versus* logaritmo da concentração de DSPE-PEG(2000) presente na formulação MT 09 – DSPE-PG(2000)/TPGS (razão molar 1,0:1,0) preparada em diferentes concentrações, para determinação da concentração micelar crítica.

Figura 20: Representação gráfica da curva de intensidade de fluorescência do pireno *versus* logaritmo da concentração de DSPE-PEG(2000) presente na formulação MT 13 – DSPE-PG(2000)/TPGS (razão molar 1,5:1,0) preparada em diferentes concentrações, para determinação da concentração micelar crítica.

4.3.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

As micelas obtidas também foram caracterizadas morfologicamente por meio de microscopia eletrônica de transmissão. As fotomicrografias obtidas (Figura 21) permitiram visualizar estruturas esféricas, encontrando-se em concordância com os resultados provenientes das análises de tamanho das partículas realizadas por espalhamento dinâmico da luz em relação à uniformidade do tamanho das estruturas micelares.

Figura 21: Fotomicrografias das formulações micelares desenvolvidas, obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (microscópio eletrônico de transmissão JEOL, modelo JEM 1000-CX2), tratadas com solução de contraste de acetato de uranila 2,0%, aumento de 5.000 vezes. (A) MT 09 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,0:1,0). (B) MT 13 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,5:1,0).

4.3.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA POR ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO – TRANSFORMADA DE FOURIER (IV – TF)

As formulações MT 09 e MT 13, contendo ou não tamoxifeno, bem como as matérias-primas empregadas no preparo das mesmas, foram analisadas por espectrofotometria no infravermelho – transformada de Fourier para avaliar possíveis interações entre os componentes, ocorridas ao longo do processo de obtenção dos sistemas micelares (Figura 22).

Figura 22: Representação gráfica dos espectros de absorção no infravermelho, obtidos no espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu, modelo IR-Prestige 21. Varreduras de 4500-340 cm^{-1} , resolução de 2 cm^{-1} . (A) Tampão HEPES. (B) DSPE-PEG(2000). (C) TPGS. (D) Tamoxifeno. (E) Formulação MT09(DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,0:1,0) isenta de tamoxifeno. (F) formulação MT 09(DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,0:1,0) contendo tamoxifeno. (G) formulação MT 13(DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,5:1,0) isenta de tamoxifeno. (H) formulação MT 13(DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,5:1,0) contendo tamoxifeno.

Os resultados permitem observar que os espectros de absorção de luz na região do infravermelho referentes às formulações correspondem à sobreposição dos espectros de seus componentes, sugerindo que nenhum tipo de interação ou reação tenha ocorrido. Este resultado era esperado, uma vez que a molécula do tamoxifeno (Figura 1A) apresenta poucas possibilidades de interação, por não apresentar nenhum grupamento capaz de efetuar interações fortes, como por

exemplo, pontes de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. A molécula deste fármaco apresenta dois anéis benzênicos monossustituídos e um dissustituído, sendo que todos os substituintes são pouco reativos. O átomo de oxigênio do grupamento éter também possui baixa reatividade, em função do impedimento estérico ocasionado pela presença de um anel benzênico e uma cadeia carbônica. Por fim, possui ainda, um grupamento amina trissustituído, também de baixa reatividade. Além disso, a molécula de tamoxifeno encontra-se encapsulada no interior da estrutura micelar, protegida pela porção apolar de seus constituintes, reduzindo ainda mais as possibilidades de interação molecular.

Em relação às duas formulações, por apresentarem a mesma composição qualitativa, era esperado que os espectros de ambas apresentassem exatamente as mesmas bandas de absorção, fato este que também foi evidenciado.

4.4. ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

4.4.1. PERFIL DE DISSOLUÇÃO DO TAMOXIFENO LIVRE

Previamente ao estudo *in vitro* do perfil de liberação do tamoxifeno a partir dos sistemas micelares, foi realizada a avaliação da dissolução do fármaco livre para que os resultados pudessem ser comparados. Neste estudo, foram testados também dois dispositivos adaptados em nosso laboratório (tubo de diálise com agitação por mini-pás e tubo de PVC envolvido por membrana de diálise, acoplado à haste do aparato de cesta), conforme descrito no item 3.6.1., com o objetivo de avaliar qual deles seria mais apropriado como aparato de dissolução.

Os resultados (Tabela 12 e Figura 23) mostraram que nas amostras referentes ao aparato composto por um tubo de PVC envolvido por uma membrana de diálise (amostras Ap. "B"), embora tenham apresentado uma concentração de fármaco dissolvido inferior à observada quando se utilizou o tubo de diálise (amostras Ap. "A"), a variação entre as replicatas foi significativamente inferior,

obtendo-se maior homogeneidade dos resultados. Por este motivo, este dispositivo foi selecionado para ser utilizado no estudo do perfil de liberação do fármaco a partir dos sistemas micelares.

Tabela 12 – Valores médios de tamoxifeno dissolvido ($\mu\text{g mL}^{-1}$), obtidos na avaliação do perfil de dissolução do fármaco livre ($n = 3$), utilizando como meio solução de salicilato de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 (volume: 100 mL), velocidade rotacional de 150rpm, temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, aparatos tubo de diálise e agitação por mini-pás (Ap. “A”) e tubo de PVC envolvido por membrana de diálise e acoplado à haste do aparato de cesta (Ap. “B”), quantificação por CLAE.

Tempo (h)	0,5	1	2	4	8	12	24	36	48
<i>Média Ap. “A”</i>	< LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,381	0,622	1,028	1,052
<i>CV (%) Ap. “A”</i>	---	---	---	---	---	39,42	36,63	56,05	27,55
<i>Média Ap. “B”</i>	< LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,299	0,441	0,602	0,715
<i>CV (%) Ap. “B”</i>	---	---	---	---	---	0,28	0,47	3,82	0,69

Figura 23: Representação gráfica do perfil de dissolução do tamoxifeno livre, obtido empregando-se dois diferentes aparatos adaptados (tubo de diálise e agitação por mini-pás; tubo de PVC envolvido por membrana de diálise e acoplado à haste do aparato de cesta). Meio de dissolução composto por solução de salicilato de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 (volume: 100mL), velocidade rotacional de 150 rpm, temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

4.4.2. PERFIL DE LIBERAÇÃO DO TAMOXIFENO A PARTIR DOS SISTEMAS MICELARES

Os estudos de liberação *in vitro* têm por finalidade avaliar a quantidade de fármaco liberado a partir de uma formulação ao longo do tempo, sendo uma das mais importantes ferramentas empregadas durante o desenvolvimento de uma forma farmacêutica. Por meio deste estudo, são obtidas informações que podem auxiliar a realização de etapas posteriores do desenvolvimento, como os estudos *in vivo* em modelo animal e estudos clínicos (AMIDON et al., 1995; LARAUS; COOPER, 1961).

Os resultados (Figura 24) mostram que as duas formulações avaliadas apresentaram diferentes quantidades de tamoxifeno liberado ao longo do tempo. A formulação MT09 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,0:1,0) exibiu uma concentração final de fármaco liberado de $2,134 \mu\text{g mL}^{-1}$ (equivalente a 21% de liberação), ao passo que a formulação MT 13 (DSPE-PEG(2000)/TPGS razão molar 1,5:1,0) exibiu um valor de $3,036 \mu\text{g mL}^{-1}$ (equivalente a 33% de liberação). Verificou-se que ambas as formulações apresentaram coeficientes de variação elevados (Figura 25), especialmente a formulação MT 09, na qual a quantidade de fármaco liberado foi menor. Estas variações são justificadas pela baixa concentração do fármaco em solução, de modo que pequenas variações na quantidade dissolvida entre as replicatas geraram elevados valores de coeficiente de variação. Observa-se que, para a formulação MT 13, a partir de 120 horas de estudo, o coeficiente de variação apresentou redução significativa, uma vez que a quantidade de fármaco liberado estava mais elevada, minimizando o efeito das variações individuais sobre o desvio padrão do teste.

Figura 24: Representação gráfica do perfil de liberação *in vitro* do tamoxifeno a partir dos sistemas micelares obtidos. Meio de dissolução composto por solução de salicilato de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 (volume: 100 mL), aparato tubo de PVC envolvido por membrana de diálise e acoplado à haste do aparato de cesta, velocidade rotacional de 150 rpm, temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

No caso de nanocarreadores sólidos, como nanopartículas, é possível acrescentar tensoativos e solventes ao meio de dissolução, de modo a aumentar a solubilidade do fármaco e, conseqüentemente, reduzir as variações entre as replicatas. Entretanto, no caso de sistemas dinâmicos, como micelas e lipossomas, estes recursos não são indicados, pois podem gerar desestabilização dos nanocarreadores, gerando falsos resultados de liberação do fármaco.

A liberação lenta e incompleta do fármaco a partir dos sistemas micelares, mesmo em condições de *sink*, foi observada também no estudo conduzido por Mu, Elbayoumi e Torchilin (2005). Neste estudo, foram desenvolvidas micelas à base de DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 2,0:1,0) contendo camptotecina, um fármaco praticamente insolúvel em água, assim como o tamoxifeno. No estudo de liberação *in vitro*, utilizando como meio de dissolução solução de salicilato de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, foi verificada a liberação de apenas cerca de 20% do fármaco, indicando que os sistemas micelares foram capazes de manter a maior parte do fármaco encapsulado, devido a interações moleculares entre o mesmo e a porção hidrofóbica do TPGS. Resultados semelhantes foram obtidos por Wang, Mongayt e Torchilin (2005), os quais prepararam micelas híbridas contendo paclitaxel. O estudo de

liberação *in vitro* evidenciou a liberação de 15% do total de fármaco após 72 horas. Estes resultados permitem inferir que a maior parte do fármaco não será liberada no plasma, mantendo-se encapsulada no núcleo das micelas até que as mesmas atinjam a região tumoral por meio do efeito EPR, concentrando o fármaco em seu sítio de ação.

Verificou-se, ainda, que a formulação MT 13 promoveu um aumento na concentração de tamoxifeno dissolvido quando comparado ao teste de dissolução do fármaco livre. Enquanto no estudo realizado com o fármaco livre, após 48 horas, a concentração de fármaco no meio de dissolução empregando-se o aparato composto por tubo de PVC envolvido por membrana de diálise foi de $0,715 \mu\text{g mL}^{-1}$, a concentração de tamoxifeno liberado a partir da formulação MT 13 foi de $1,168 \mu\text{g mL}^{-1}$, representando um aumento de aproximadamente 40% na concentração de fármaco em solução. Sendo assim, este estudo evidenciou não somente que os sistemas micelares foram capazes de sustentar a liberação do tamoxifeno por 168 horas, como também a formulação MT 13 promoveu um aumento na concentração de fármaco liberado, em função das características anfifílicas apresentadas pelo DSPE-PEG(2000) e o TPGS.

Mu, Elbayoumi e Torchilin (2005) verificaram que a presença do TPGS em sistemas micelares híbridos com fosfolipídeos peguilados favorece não somente a encapsulação do fármaco, como também mantém-no retido em seu interior devido a interações moleculares estabelecidas entre o fármaco hidrofóbico e o anel aromático presente na região apolar da molécula de TPGS, aumentando a estabilidade dos sistemas micelares. Estes dados estão em concordância com os resultados obtidos, uma vez que ao término das 168 horas de estudo, a formulação MT 09, que continha proporcionalmente uma quantidade maior de TPGS do que a formulação MT 13, liberou uma quantidade menor de tamoxifeno.

4.4.2.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma vez que foram observados elevados valores de coeficiente de variação nos resultados do estudo de liberação *in vitro*, os mesmos foram submetidos a tratamento estatístico para verificar se, apesar disto, a diferença entre a quantidade de fármaco liberado a partir dos dois sistemas micelares desenvolvidos era estatisticamente significativa, considerando-se o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Os testes de normalidade demonstraram que os dados referentes à quantidade total de fármaco liberado ao longo do tempo não apresentaram distribuição normal (Tabela 13). Quanto aos desdobramentos da variável quantidade de tamoxifeno liberado entre as subparcelas tempo, somente o tempo de amostragem de 12 horas não apresentou distribuição normal (Tabela 14).

Tabela 13 – Análise da normalidade dos dados referentes à quantidade total de fármaco liberado ao longo do tempo, obtidos no estudo *in vitro* do perfil de liberação do tamoxifeno a partir dos sistemas micelares pelo teste de Shapiro-Wilk (5,0% de significância)

Formulação	Valor de p
MT 09 - DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,0:1,0)	< 0,0001
MT 13 - DSPE-PEG(2000) /TPGS (razão molar 1,5:1,0)	< 0,0001

Tabela 14 – Análise da normalidade dos dados referentes ao desdobramento da variável quantidade de fármaco liberado entre as subparcelas de tempo, obtidos no estudo *in vitro* do perfil de liberação do tamoxifeno a partir dos sistemas micelares pelo teste de Shapiro-Wilk (5,0% de significância)

Tempo de amostragem (h)	Valor de p
12	< 0,0001
24	0,1821
36	0,0915
48	0,3998
60	0,2635
72	0,1026
96	0,5724
120	0,6315
144	0,3931
168	0,7891

A quantidade total de fármaco liberado em função do tempo (Figura 25) apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as duas formulações. O desdobramento da variável Q (quantidade total de fármaco liberado) entre as subparcelas de tempo permitiu verificar variações estatísticas ($p < 0,05$) a partir do tempo de amostragem de 12 horas, mantendo-se até o final do experimento (Figura 26). Sendo assim, foi observado que a formulação MT 13, composta por DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,5:1,0), promoveu uma liberação do tamoxifeno significativamente ($p > 0,05$) superior à formulação MT 09, composta por DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,0:1,0).

Figura 25: Representação gráfica do teste estatístico empregado na avaliação comparativa da quantidade total de tamoxifeno liberada em função do tempo a partir dos sistemas micelares desenvolvidos. Tratamento 1: formulação MT 13 (DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,5:1,0). Tratamento 2: formulação MT 09 (DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,0:1,0).

Figura 26: Representação gráfica do teste estatístico empregado no desdobramento da variável quantidade de tamoxifeno liberada em função do tempo a partir dos sistemas micelares desenvolvidos. Tratamento 1: formulação MT 13 (DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,5:1,0). Tratamento 2: formulação MT 09 (DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar 1,0:1,0).

4.5. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DO TAMOXIFENO A PARTIR DOS SISTEMAS MICELARES EM MODELO ANIMAL

4.5.1. ADMINISTRAÇÃO DAS FORMULAÇÕES E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA

Após administração das formulações aos animais pertencentes aos quatro grupos experimentais não foi observada nenhuma alteração no comportamento dos mesmos.

O isoflurano foi selecionado como anestésico para o procedimento de obtenção de sangue por via intracardíaca, pelo fato de, além de ser administrado por uma via não invasiva (inalatória), também alcançar o efeito anestésico e ser

eliminado rapidamente, tornando-se apropriado para este estudo, uma vez que o procedimento de coleta das amostras demandava pouco tempo e o animal se recuperaria em poucos minutos.

Este fármaco é considerado um anestésico bastante seguro, que pode ser utilizado como agente único ou em associação a outros compostos para atingir a anestesia geral. Apresenta baixa toxicidade hepática e renal, destacando-se, ainda, seu reduzido grau de biotransformação (0,2%) (TARDELLI et al., 1988), o que o torna adequado para ser empregado em um experimento que envolva um fármaco amplamente metabolizado pelo fígado, como o tamoxifeno.

Apresenta, ainda, mínimo efeito inotrópico negativo, diminui a resistência vascular sistêmica, podendo reduzir a pressão arterial média com aumento reflexo da frequência cardíaca. Exibe efeito mínimo sobre a geração e a condução do impulso cardíaco e raramente se observa arritmia cardíaca associada a seu uso (TARDELLI et al., 1988).

Verificou-se que o isoflurano efetivamente promoveu um aumento na frequência cardíaca nos animais anestesiados. Este fato, inclusive, facilitou a coleta do sangue, tornando o processo mais rápido e, conseqüentemente, permitiu que os animais fossem mantidos anestesiados por períodos menores, favorecendo sua recuperação.

Praticamente não foi verificada a ocorrência de hemólise nas amostras de sangue obtidas, as quais foram centrifugadas logo após serem obtidas e os plasmas separados foram armazenados na temperatura de -70°C até o momento da análise.

4.5.2. QUANTIFICAÇÃO DO TAMOXIFENO E DO N-DESMETILTAMOXIFENO NO PLASMA UTILIZANDO CLAE

Como o plasma é uma matriz biológica complexa, necessita ser previamente submetido ao um processo químico para remoção de impurezas que, ao mesmo tempo, podem tanto interferir na análise do fármaco, quanto causar danos ao equipamento e à coluna cromatográfica. Sempre que possível, o método por CLAE

empregando a padronização interna deve ser utilizado para a quantificação de fármacos em amostras de plasma (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012). A técnica de padronização interna consiste na adição de uma mesma quantidade de uma solução de concentração fixa de determinado composto, denominado padrão interno, a todas as soluções padrão e amostras antes de efetuar a etapa de extração e purificação das mesmas (CHIARADIA, 2009).

Empregando-se as condições descritas no item 3.7.2., o tamoxifeno e o N-desmetiltamoxifeno puderam ser analisados adequadamente, apresentando tempos de retenção em torno de 12 e 10 minutos, respectivamente (Figura 27).

Figura 27: Cromatograma do tamoxifeno e do N-desmetiltamoxifeno em solução metanólica, ambos na concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, após processo de purificação e extração a partir de amostra de plasma.

O método empregado para quantificação do tamoxifeno e do N-desmetiltamoxifeno apresentou linearidade, conforme observado nas curvas analíticas confeccionadas considerando-se as razões entre as áreas do analito e do padrão interno (Figuras 28 e 29), onde, para ambas as curvas, os valores de coeficiente de correlação linear obtidos foram superiores a 0,99.

Figura 28: Curva analítica do tamoxifeno em solução metanólica (concentrações de 0,25 a 25,0 µg mL⁻¹) após processo de purificação e extração, obtida para determinação da linearidade do método para quantificação em amostras de plasma.

Figura 29: Curva analítica do N-desmetiltamoxifeno em solução metanólica (concentrações de 0,25 a 25,0 µg mL⁻¹) após processo de purificação e extração, obtida para determinação da linearidade do método para quantificação em amostras de plasma.

Para verificação da recuperação, foram comparados os valores de área obtidos para cada concentração de cada um dos analitos (tamoxifeno ou N-desmetiltamoxifeno) submetidos ao processo de purificação e extração descrito no

item 3.7.2., com os valores de área obtidos para soluções equivalentes à concentração dos mesmos em metanol antes de efetuada a extração, analisadas sob as mesmas condições. A recuperação ficou em torno de 60 – 65% no intervalo de concentração estudado, para ambos os analitos.

Utilizando-s o método descrito no item 3.7.2., não foi possível detectar o tamoxifeno e seu metabólito N-desmetiltamoxifeno nas amostras de plasma coletadas. Alguns fatos que podem justificar a ausência do fármaco nas amostras devem ser considerados. O primeiro deles é que a primeira amostragem de sangue foi realizada uma hora após a administração da formulação. Durante este tempo, possivelmente, boa parte das micelas tenha deixado a circulação, acumulando-se nos órgãos, razão pela qual não tenho sido possível quantificar o fármaco no plasma. É possível, ainda, que concentrações baixas de tamoxifeno ainda estivessem presentes, mas em razão da sensibilidade do método, cujo ponto inferior da curva analítica era de $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, somado à recuperação da amostra de, no máximo, 65%, o mesmo não foi detectado.

Apesar da conjugação com PEG, a princípio, ter a função de manter o sistema nanocarreador circulante por um período de tempo prolongado, as partículas podem extravasar rapidamente para os tecidos por influência do solvente empregado no processo de obtenção das micelas. Dois estudos complementares avaliaram a influência do solvente empregado no processo de obtenção de um sistema micelar pela técnica de evaporação do solvente. Neste estudo, foram preparadas micelas de ácido poliaspártico-co-benzóico conjugado a PEG(5200) contendo camptotecina. Foram preparadas formulações utilizando os solventes clorofórmio e 2,2,2-trifluoetanol (TFE) para solubilizar o fármaco. Com ambos os solventes, foram obtidas micelas com diâmetro médio e eficiência de encapsulação semelhantes. Entretanto, os estudos apontaram que, para as formulações preparadas empregando-se o clorofórmio como solvente, após quatro horas da administração das mesmas, por via intravenosa, a porcentagem máxima de camptotecina circulante no plasma observada foi de 9,3% da dose inicial. Em relação às formulações preparadas com a utilização de TFE, a concentração

plasmática após quatro horas, chegou a atingir 28,6% da dose inicial (WATANABE et al., 2006; HARADA et al., 2011). É possível que, no presente trabalho, o clorofórmio, que também foi empregado para solubilizar o tamoxifeno, o DSPE-PEG(2000) e o TPGS, tenha contribuído para o rápido extravasamento da formulação do plasma.

O fato de a formulação micelar não ter permanecido por um tempo prolongado no plasma não significa necessariamente que a mesma tenha sido capturada pelo sistema imune para ser eliminada. O rápido decréscimo da concentração plasmática pode ser um indicativo de uma rápida migração para os órgãos, em virtude de suas dimensões muito reduzidas. Assim, a redução do tempo circulante pode até mesmo contribuir para a redução de efeitos colaterais sistêmicos. Um estudo em camundongos realizado durante o desenvolvimento do produto comercial Genexol PM[®] (micelas poliméricas peguiladas contendo paclitaxel), indicou que a formulação micelar administrada na dose de 50 mg kg⁻¹ apresentou a mesma AUC de concentração plasmática que o Taxol[®] (formulação convencional) administrado na dose de 20 mg kg⁻¹, ou seja, a concentração plasmática da formulação micelar foi 2,5 vezes inferior à da formulação convencional. Contudo, a concentração de fármaco em diversos órgãos foi 2 – 3 vezes superior a partir da solução micelar quando comparado à formulação contendo paclitaxel livre, aumentando a eficácia do medicamento (KIM et al., 2001).

5. CONCLUSÕES

Com base nos métodos selecionados e nos resultados obtidos nesta pesquisa, concluiu-se que:

- Os métodos para determinação da eficiência de encapsulação e quantificação do tamoxifeno nos estudos de liberação *in vitro* utilizando a CLAE foram desenvolvidos e validados com sucesso, uma vez que foram satisfeitos os requisitos especificados para linearidade, precisão e exatidão intraensaio e interensaios, seletividade, limites de quantificação e detecção e robustez;
- Os fosfolípidos DSPE e DSPE-PEG(750) não se mostraram adequados para a obtenção dos sistemas micelares, em virtude de seu equilíbrio hidrófilo-lipófilo inadequado para esta finalidade;
- Por meio da associação entre o fosfolípido DSPE-PEG(2000) e o derivado de vitamina E TPGS, em diferentes proporções, as micelas foram obtidas adequadamente pela técnica de evaporação do solvente, apresentando diâmetro médio de cerca de 20 nm, distribuição monomodal de tamanho das partículas e baixo índice de polidispersividade. A homogeneidade do tamanho das micelas pode ser confirmada através de análise por microscopia eletrônica de transmissão. Foram atingidos elevados valores de eficiência de encapsulação, variando de, aproximadamente, 70 a 95%. A análise por espectrofotometria no infravermelho – transformada de Fourier indicou que não ocorreu nenhum tipo de interação molecular entre o fármaco e os demais componentes das formulações;

- Os estudos *in vitro* de dissolução do fármaco livre e perfil de liberação do tamoxifeno a partir dos sistemas micelares evidenciaram que estes últimos foram capazes de sustentar a liberação do fármaco por 168 horas, sendo que, ao término do estudo, o valor máximo de fármaco liberado foi de aproximadamente 30%, o que sugere que a maior parte do mesmo não seja liberada plasma. Além disso, a formulação à base de DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar de 1,5:1,0) promoveu um aumento na quantidade de fármaco dissolvida quando comparada ao fármaco não encapsulado;
- A formulação contendo DSPE-PEG(2000)/TPGS (razão molar de 1,0:1,0) liberou menor quantidade de fármaco, em virtude da maior proporção de TPGS presente. A análise estatística demonstrou que a quantidade de fármaco liberada ao longo do tempo foi significativamente ($p < 0,05$) dependente da composição dos sistemas micelares, verificando-se que o aumento na concentração de TPGS reduziu a porcentagem liberada do tamoxifeno devido a interações moleculares entre o fármaco e sua porção hidrofóbica, evidenciando uma maior capacidade de manter o tamoxifeno encapsulado até o momento que o sistema atinja o sítio alvo;
- Em relação ao estudo de perfil de concentração plasmática do tamoxifeno em modelo animal, não foi possível detectar o fármaco e seu principal metabólito por meio do método de quantificação utilizado, sugerindo que a maior parte da formulação tenha extravasado rapidamente para os órgãos em virtude de suas dimensões reduzidas.

6. REFERÊNCIAS

AAPRO, M.S. Adjuvant therapy of primary breast cancer: a review of key findings from the 7th international conference, St. Gallen. **The Oncologist**, v. 6, p. 376–385, 2001.

ADAMS, M.L.; LAVASANIFAR, A.; KWON, G.S. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p. 1343–1355, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC 27, de 17 de maio de 2012. **Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos**. Brasília, DF, 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.pdf>. Acesso em: 07/2012.

_____. Resolução RES 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, DF, 2003. Disponível em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>>. Acesso em: 09/2010.

AHN, J. et al. Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk. **Archives of Internal Medicine**, v. 167, p. 2091–2102, 2007.

ALI, S.; COOMBES, R.C. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 101–112, 2002.

ALLAN, A.L. et al. Tumor dormancy and cancer stem cells: implications for the biology and treatment of breast cancer metastasis. **Breast Disease**, v. 26, p. 87–98, 2006.

ALLEN, C. MAYSINGER, D.; EISENBERG, A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 16, n. 1–4, p. 3–27, 1999.

ALLEN, C. et al. Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations use of surface grafted poly(ethylene glycol). **Bioscience Reports**, v. 22, p. 225–250, 2002.

ALLOUACHE, D. et al. First line therapy with gemcitabine and paclitaxel in locally, recurrent or metastatic breast cancer: a phase II study. **BMC Cancer**, v. 5, p. 151, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. USA, 2012. Disponível em: <<http://www.cancer.org>>. Acesso em: 03/2012.

_____. **What are the risk factors for breast cancer?** USA, 2009. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-riskfactors>>. Acesso em: 01/2010.

AMIDON, G.L. et al. A theoretical basis for biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

ANDELIN, J. et al. Technologies for Reducing Dioxin in the Manufacture of Bleached Wood Pulp. Background Paper [OTABP-O-54], U.S. Congress, Office of Technology Assessment: Washington DC, 1989.

ANDERSON, B.O. et al. Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries. **Cancer**, v. 113, (Supl. 8), p. 2221–2243, 2008.

ANDERSON, G.F., CHU, E. Expanding priorities-confronting chronic disease in countries with low income. **New England Journal of Medicine**, v. 356, p. 209–211, 2007.

ASHOK, B. et al. In vitro characterization of pegylated phospholipid micelles for improved drug solubilization: effects of PEG chain length and PC incorporation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 2476–2487, 2004.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A.T. **Surfactant Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology**. London: Champan and Hall. 1983. 794 pp.

AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 pp.

AVANTI POLAR LIPIDS, 2010. Polymers & polymerizable lipids. Disponível em: <http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=101&Itemid=109>. Acesso em: 07/2010.

BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v. 64, n.2, p. 175–177, 2002.

BOING, A.F. et al. A carga das neoplasias no Brasil: mortalidade e morbidade hospitalar entre 2002 e 2004. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 4, p. 317–322, 2007.

BOTTINI, P.B.; DAVANE, J.G.; CORRIGAN, I. Sustained absorption does not necessarily reduce the systemic availability of propranolol. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 10, p. 1757–1775, 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de informações sobre mortalidade**. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sim/obtmmap.htm>>. Acesso em: 03/2009.

BRAY, F., McCARRON, P., PARKIN, D.M. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. **Breast Cancer Research**, v. 6, p. 229–239, 2004.

BRONISCER, A. et al. Radiation therapy and high-dose tamoxifen in the treatment of patients with diffuse brainstem gliomas: results of a Brazilian cooperative study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n.6, p. 1246–1253, 2000.

BUCHANAN, C.M. et al. Pharmacokinetics of tamoxifen after intravenous and oral dosing of tamoxifen–hydroxybutenyl- β -cyclodextrin formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 3, p. 644–660, 2007.

BUCKLEY, M.T.; GOA, K.L. Tamoxifen: a reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetics properties, and therapeutic use. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 37, p. 451–490, 1989.

BURT, H.M. et al. Development of copolymers of poly(D,L-lactide) and methoxypolyethylene glycol as micellar carriers of paclitaxel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 16, p. 16–171, 1999.

CAO, N.; FENG, S. Doxorubicin conjugated to D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS): Conjugation chemistry, characterization, in vitro and in vivo evaluation. **Biomaterials**, v. 29, p. 3856–3865, 2008.

CARSTENS, M.G. et al. Pharmaceutical micelles: combining longevity, stability and stimuli sensitivity. In: TORCHILIN, V. **Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers**, New York: Springer, 2008. p. 263–308. (Fundamental Biomedical Technologies, v. 4).

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCAR, 2001. 77p.

CAVALLARO, G. et al. Poly(hydroxyethylaspartamide) derivatives as colloidal drug carrier systems. **Journal of Controlled Release**, v. 89, p. 285–295, 2003.

CAVALLARO, G. et al. Tamoxifen-loaded polymeric micelles: preparation, physico-chemical characterization and in vitro evaluation studies. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, p. 1028–1038, 2004.

CHANG, X.Z. et al. Identification of the functional role of peroxiredoxin 6 in the progression of the breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 9, R76, 2007.

CHAWLA, J.S.; AMIJI, M.M. Biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, p. 127 – 138, 2002.

CHIARADIA, M.C. **Desenvolvimento, validação e aplicação de métodos para análise multirresidual de agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM e CLUE-DAD.** 2009. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009. 119p.

CHO, Y.W. et al. Hydrotropic agents for study of *in vitro* paclitaxel release from polymeric micelles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 249–257, 2004.

CHOPRA, R. The Indian scene. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 18, p. 106S–111S, 2001.

COHEN, I. Endometrial pathologies associated with postmenopausal tamoxifen treatment. **Gynecologic Oncology**, v. 94, p. 256–266, 2004.

CROY, S.R.; KWON, G.S. Polymeric micelles for drug delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, p. 4669–4684, 2006.

CUZICK, T. et al. Overview of the main outcomes in breast cancer prevention trials. **The Lancet**, v. 361, p. 296–300, 2003.

DANCKWERTS, A.; FASSIHI, M. Implantable controlled release drug delivery systems: a review. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 17, n. 11, p. 1465–1502, 1991.

DE LIMA, G.R. et al. Effects of low dose tamoxifen on normal breast tissue from premenopausal women. **European Journal of Cancer**, v. 39, p. 891–898, 2003.

DENG, C. et al. Biodegradable polymeric micelles for targeted and controlled anticancer drug delivery: Promises, progress and prospect. **Nano Today**, v. 7, 467—480, 2012.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. **The Lancet**, v. 356, p. 1687—1717, 2005.

FABIAN, C. et al. Clinical pharmacology of tamoxifen in patients with breast cancer: correlation with clinical data. **Cancer**, v. 48, p. 876—882, 1981.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3, p. 136—151, 2011.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 161—171, 2005a.

_____. Nanovector therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**., v. 9, p. 343—346, 2005b.

FISCHER, J.P. et al. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, p. 1652—1662, 2005.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 16, p. 10931—10934, 1992.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. **Curso de manipulação de animais de laboratório**. Salvador, BA, 2008. Disponível em: <http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf>. Acesso em: 04/2009.

GALLICCHIO, L. et al. Medication use, tamoxifen (TAM), and TAM metabolite concentrations in women with breast cancer. **Cancer Letters**, v. 211, p. 57–67, 2004.

GILL, K.K.; NAZZAL, S.; KADDOUMI, A. Paclitaxel loaded PEG5000–DSPE micelles as pulmonary delivery platform: formulation characterization, tissue distribution, plasma pharmacokinetics, and toxicological evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 276–284, 2011.

_____. Mixed micelles of PEG2000-DSPE and vitamin-E TPGS for concurrent delivery of paclitaxel and parthenolide: Enhanced chemosensitization and antitumor efficacy against non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 64–71, 2012.

GOSS, P.E. et al. Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: update findings from NCIC CTG MA.17. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, p. 1262–1271, 2005.

HARADA, Y. et al. Effects of organic solvents on drug incorporation into polymeric carriers and morphological analyses of drug-incorporated polymeric micelles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, p. 271–280, 2011.

HINATYSZYN, J.H. et al. Drug delivery systems for the future. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 48, n. 5, p.247–254, 1994.

HOLMGREN, L.; O'REILLY, M.S.; FOLKMAN, J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. **Nature Medicine**, v. 1, n. 2, p. 149–153, 1995.

HUSSEINI, G.A.; PITT, W.G. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1137–1152, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2008**: Incidência de Câncer no Brasil. Brasília, DF, 2007. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=336>. Acesso em: 07/2010.

_____. **Estimativa 2010**: Incidência de Câncer no Brasil. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tabela_estados.asp&UF=BR>Acesso em: 08/2010.

_____. **Estimativa 2012**: Incidência de Câncer no Brasil. Brasília, DF, 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=BR>>. Acesso em: 03/2012.

_____. **O que é câncer?** Brasília, DF, 2013a. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 01/2013.

_____. **Tipos de câncer – mama**. Brasília, DF, 2013b. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em 01/2013.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008 – Rev. 04 – Jul/2011. Brasília, DF, 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 04/2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of analytical procedures**: text and methodology Q2(R1). Current Step 4 version, 2005.

JAIN, R.K. Transport of molecules, particles and cells in solid tumors. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 1, p. 241–263, 1999.

_____. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 149–168, 2001.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2008. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 58, p. 71–96, 2008.

JONES, M.C.; LEROUX, J.C. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.48, p. 101–111, 1999.

JORDAN, V.C. et al. The apoptotic action of estrogen following exhaustive antihormonal therapy: a new clinical treatment strategy. **Breast**, v. 14, p. 624–630, 2005.

KARATHANASIS, E. et al. Multifunctional nanocarriers for mammographic quantification of tumor dosing and prognosis of breast cancer therapy. **Biomaterials**, v. 29, p. 4815–4822, 2008.

KATAOKA, K. et al. Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 24, p. 199–132, 1993.

KATRAGADDA, U. et al. Multi-drug delivery to tumor cells via micellar nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, p. 281–286, 2011.

KIM, S.C. et al. *In vivo* evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. **Journal of Controlled Release**, v. 72, p. 191–202, 2001.

KIM, T.Y. et al. Phase I and pharmacokinetic study of Genexol PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignances. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 11, p. 3708–3716, 2004.

KOO, O.M.; RUBINSTEIN, I; ONYUKSEL, H. Camptothecin in sterically stabilized phospholipid micelles: a novel nanomedicine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, p. 77–84, 2005.

KORPINEN, R.; FARDIM, P. Extração de lignina de biomassa de madeira mediante uma solução hidrotrópica. **O Papel**, v. 70, n. 5, p. 69–82, 2009.

KOUDELKA, S. et al. Liposomes with high encapsulation capacity for paclitaxel: preparation, characterization and *in vivo* anticancer effect. **Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 2309–2319, 2010.

KWON, G.S. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.20, p. 357–403, 2003.

LARAUS, J.; COOPER, J. Absorption, testing and clinical evaluation of oral prolonged action drug. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 215–232, 1961.

LASIC, D.D. Mixed micelles in drug delivery. **Nature**, v. 355, p. 279–280, 1992.

LAVASANIFAR, A.; SAMUEL, J.; KWON, G.S. Micelles self-assembled from poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl stearate L-aspartamide) by a solvent evaporation method: effect on the solubilization and haemolytic activity of amphotericin B. **Journal of Controlled Release**, v. 77, p. 155–160, 2001.

LEE, K.S. Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 108, p. 241–250, 2008.

LI, C.; WALLACE, S. Polymer-drug conjugates: recent development in clinical oncology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 886–898, 2008.

LIEBERMAN, H.A.; LACHMAN, L.; SCHARTZ, J.B. **Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 332–335, 559–45.

LIM, W.T. Phase I pharmacokinetic study of a weekly liposomal paclitaxel formulation (Genexol PM) in patients with solid tumors. **Annals of Oncology**, v. 21, p. 382–88, 2010.

LUKYANOV, A.N.; GAO, Z.; TORCHILIN, V.P. Micelles from polyethylene glycol/phosphatidylethanolamine conjugates for tumor drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 91, n. 1–2, p. 97–102, 2003.

LUKYANOV, A.N.; TORCHILIN, V.P. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1273–1289, 2004.

MacCALLUM, J. et al. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of tamoxifen and its major metabolites in plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 678, p. 317–23, 1996.

MAEDA, H.; SEYMOUR, L.W.; MIYAMOTO, Y. Conjugates of anticancer agents and polymers: advantages of macromolecular therapeutics in vivo. **Bioconjugate Chemistry**, v. 3, n. 5, p. 351–362, 1992.

MAEDA, H. et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **Journal of Controlled Release**, v. 65, n. 1–2, p. 271–284, 2000.

MAEDA, H. et al. Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 319–328, 2003.

MATSUMARA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer Research**, v. 46, p. 6387–6392, 1986.

MALVERN, 2011. Disponível em: <<http://www.malvern.com/malvern/ondemand.nsf/id/SJES-8HMQ8M>>. Acesso em: 10/2011.

MARSDEN, C.G. et al. A novel in vivo model for the study of human breast cancer metastasis using primary breast tumor-initiating cells from patient biopsies. **BMC Cancer**, v. 12, p. 10, 2012.

MARTÍNEZ, A. et al. Enhanced preclinical efficacy of tamoxifen developed as alginate–cysteine/disulfide bond reduced albumin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, p. 574–581, 2012.

MOLINEUX, G. PEGylation: engineering improved pharmaceuticals for enhanced therapy. **Cancer Treatment Reviews**, v. 28, p. 13–16, 2002.

MU, L.; ELBAYOUMI, T.A.; TORCHILIN, V.P. Mixed micelles made of poly(ethylene glycol)-phosphatidylethanolamine conjugate and D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate as pharmaceutical nanocarriers for camptothecin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 306, p. 142–149, 2005.

MURANISHI, S. Absorption enhancers. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 7, p. 1–33, 1990.

NAKAMURA, E. et al. A polymeric micelle MRI contrast agent with changeable relaxivity. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 3, p. 325 – 333, 2006.

NAKANISHI, S. et al. Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. **Journal of Controlled Release**, v. 74, n. 1–3, p. 295–302, 2001.

NAVES, M.M.V.; QUINTANILHA, M.I.G.D.; INUMARU, L.E. Nutrição e prevenção de câncer: evidências, metas de Saúde Pública e recomendações individuais. **Nutrição em Pauta**, v. 16, p. 40–45, 2008.

NEVEN, P.; VERGOTE, I. Guidelines for monitoring patients taking tamoxifen treatment. **Drug Safety**, v. 22, p. 1–11, 2000.

_____. Tamoxifen, screening and new oestrogen receptor modulators. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 15, p. 365–380, 2001.

NETZ, D.J.A. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo* de um sistema polimérico implantável contendo 17-b-estradiol**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), 2004 – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. 205p.

OKUDA, T. et al. Enhanced *in vivo* antitumor efficacy of fenretinide encapsulated in polymeric micelles. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 373, p. 100–106, 2009.

OLIVEIRA, S.S.M. **Preparação e caracterização *in vitro* de micropartículas de heparina fracionada potencialmente aplicáveis ao tratamento da trombose venosa profunda**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2009 – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009. 82p.

O'REGAN, R.M.; JORDAN, V.C. The evolution of tamoxifen therapy in breast cancer: selective oestrogenic-receptor modulators and down-regulators. **The Lancet Oncology**, v. 3, p. 207–214, 2002.

ORIVE, G. et al. Micro and nano drug delivery systems in cancer therapy. **Cancer Therapy**, v. 3, p. 131–138, 2005.

OWENS, D.E.; PEPPAS, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 93–102, 2006.

PALMERO, E.I. et al. Clinical characterization and risk profile of individuals seeking genetic counseling for hereditary breast cancer in Brazil. **Journal of Genetic Counseling**, v. 16, n. 3, p. 363–371, 2007.

PANG, D.C. Advances in drug delivery. **Pharmaceutical Technology**, v.32, p. 62–68, 1998.

PARK, J.H. et al. Cooperative nanomaterial system to sensitize target, and treat tumors. **Proceedings of the Natural Academy of Science of the United States of America**, v. 107, p. 981–986, 2010.

PASCHOAL, J.A.R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190–1198, 2008.

PEYRADE, F. et al. Age-related difference in tamoxifen disposition. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 59, p. 401–410, 1996.

PIERRE, M.B.R. et al. Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and *in vitro* permeation study. **BMC Dermatology**, v. 1, n. 5, 2001.

PORTER, P. “Westernizing” women’s risks? Breast cancer in lower-income countries. **New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 213–216, 2008.

PRAÇA, F.S.G. et al. Validation of alternative apparatus for *in vitro* dissolution test of semisolid dosage forms. In: 3º Simpósio Internacional de Pós-Graduação e Pesquisa (SINPOSPq), 2008, Ribeirão Preto – SP.

PRASAD, Y.V.R. et al. Enhanced intestinal absorption of vancomycin with labrasol and D- α -tocopheryl PEG 1000 succinate in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 181–190, 2003.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

SADOQI, M. et al. Investigation of the micellar properties of the tocopheryl polyethylene glycol succinate surfactants TPGS 400 and TPGS 1000 by steady state fluorometry. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 333, p. 585–589, 2009.

SANT, M. et al. Breast cancer carcinoma survival in Europe and the United States. **Cancer**, v. 100, p. 715–722, 2004.

SATOH, T. et al. Encapsulation of synthetic retinoids Am80 and LE540 into polymeric micelles and the retinoids’ release control. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n. 3, p. 187–195, 2009.

SAWANT, R.R.; TORCHILIN, V.P. Enhanced cytotoxicity of TATp-bearing paclitaxel-loaded micelles *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 374, n. 1–2, p. 114–118, 2009.

SEZGIN, Z.; YÜKSEL, N.; BAYKARA, T. Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 261–268, 2006.

SIBATA, M.N. **Micelas de longo tempo de circulação como sistemas de liberação: estudos espectroscópicos, fotofísicos, fotoquímicos e do perfil de liberação *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2004 —. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004. 86p.

SIBATA, M.N. et al. Photophysicals and photochemicals studies of zinc (II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, p. 131–138, 2004.

SHIRAISHI, K. et al. Polyion complex micelle MRI contrast agents from poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lysine) block copolymers having Gd-DOTA; preparations and their control of T1-relaxivities and blood circulation characteristics. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 2, p. 160–167, 2010.

SHIRAISHI, K. et al. Preparation and *in vivo* imaging of PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agents. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n.1, p. 14–20, 2009.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed. New York: John Wiley and Sons, 1997. p. 293-341.

SOPPIMATH, K.S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.

SOUZA, M.C. **Microencapsulação do sulfóxido de albendazol: uma estratégia para otimização da terapia das parasitoses.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2009 – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009. 72p.

STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S.S. Long circulating microparticulate drug carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.16, p. 195–214, 1995.

SUTTON, D. et al. Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 6, p. 1029–1046, 2007.

TANAKA, T. et al. Nanotechnology for breast cancer therapy. **Biomedical Microdevices**, v. 11, p. 49–63, 2009.

TARDELLI, M.A. et al. Avaliação clínica do isoflurano. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 38, p. 277–281, 1988.

TERRY, M.B., et al. Alcohol metabolism, alcohol intake, and breast cancer risk: a sisterset analysis using the Breast Cancer Family Registry. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 106, p. 281–288, 2007.

THE BREAST INTERNATIONAL GROUP (BIG) 1-98 COLLABORATIVE GROUP. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 2747–2757, 2005.

TONG, S.W. et al. Enhanced antitumor efficacy and decreased toxicity by self-associated docetaxel in phospholipid-based micelles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, p. 413–419, 2012.

TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1532–1555, 2006.

TORCHILIN, V.P. PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 235–262, 2002.

TORCHILIN, V.P.; TRUBETSKOY, V.S. Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 141–155, 1995.

VISHNU, P., ROY, V. Safety and Efficacy of *nab*-Paclitaxel in the Treatment of Patients with Breast Cancer. **Breast Cancer**, v. 5, p. 53–65, 2011.

VON HOFF, D.D. et al. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. **Annals of Internal Medicine**, v. 91, p. 710–717, 1979.

VONARBOURG, A. et al. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. **Biomaterials**, v. 27, p. 4356–4373, 2006.

VOSSE, M. et al. Endometrial disorders in 406 breast cancer patients on tamoxifen: the case for less intensive monitoring. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 101, p. 58–63, 2002.

WANG, J.; MONGAYT, D; TORCHILIN, V.P. Polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs: Preparation and anticancer activity in vitro of paclitaxel incorporated into mixed micelles based on poly(ethylene glycol)-lipid conjugate and positively charged lipids. **Journal of Drug Targeting**, v. 13, n. 1, p. 73–80, 2005.

WANG, J.; WANG, Y.; LIANG, W. Delivery of drugs to cell membranes by encapsulation in PEG–PE micelles. **Journal of Controlled Release**, v. 160, p. 637–651, 2012.

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, p. 1–12, 1990.

WATANABE, M. et al. Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of their incorporation and circulation stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 308, p. 183–189, 2006.

WELLS, J.I. Solubility. In: **Pharmaceutical Preformulation: the Physicochemical Properties of Drug Substances**. Ellis Horwood: Chichester, UK, p. 21–85, 1988.

WEMPE, M. F. et al. Inhibiting efflux with novel non-ionic surfactants: Rational design based on vitamin E TPGS. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, p. 93–102, 2009.

WILCZURA-WACHNIK, H. et al. Calorimetric study of the α -tocopherol solubility in reversed AOT micelles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 319, p. 520–525, 2008.

WORKING, P.K.; DAYAN, A.D. Pharmacological – toxicological expert report – CAELYX (stealth liposomal doxorubicin HCl). **Human & Experimental Toxicology**, v. 15, p. 751–85, 1996.

YEZHELYEV, M.V. et al. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. **The Lancet Oncology**, v. 7, n. 8, p. 657–667, 2006.

YOKOYAMA, M. Clinical applications of polymeric micelle carrier systems in chemotherapy and image diagnosis of solid tumors. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 3, n. 4, p. 151– 58, 2011.

YOKOYAMA, M. et al. Introduction of cisplatin into polymeric micelle. **Journal of Controlled Release**, v. 39, p. 351–356, 1996.

ZHANG, X. et al. An investigation of the antitumour activity and biodistribution of polymeric micellar paclitaxel. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 40, p. 81–86, 1997.

ANEXO

ANEXO A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.647.53.5) intitulado "Micelas de Longo Tempo de Circulação Contendo Tamoxifeno como Sistema Nanocarreador para Otimização da Terapia do Câncer de Mama", de autoria de **Marina Claro de Souza** e de **Juliana Maldonado Marchetti**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 02.09.2009.

Ribeirão Preto, 2 de setembro de 2009

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro