UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo tamoxifeno:
preparação, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo***

Samantha Sant' Anna Marotta de Oliveira

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo tamoxifeno:
preparação, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo***

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: Samantha Sant' Anna Marotta
de Oliveira**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Maldonado
Marchetti**

Ribeirão Preto
2014

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.

Oliveira, Samantha Sant' Anna Marotta de.

Nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo tamoxifeno: preparação, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo*. Ribeirão Preto, 2014.

100p.: 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. Nanopartículas poliméricas.
2. Tamoxifeno.
3. Estudos *in vitro* e *in vivo*.
4. PLA-PEG.
5. Nanoprecipitação.
6. Câncer de mama.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Samantha Sant' Anna Marotta de Oliveira

"Nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo tamoxifeno: preparação, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo*"

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

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Juliana Maldonado Marchetti, pela orientação, dedicação, confiança, amizade, exemplo profissional e contribuição científica ao longo da realização deste trabalho.

À Dr^a. Marina Claro de Souza, grande amiga, pela parceria, colaboração e revisão deste trabalho. Obrigada pela amizade, apoio, incentivo, minuciosa revisão e valiosa contribuição em todos os trabalhos. Obrigada também por todo o auxílio, sem medir esforços, nos momentos difíceis que passei. A você, minha eterna gratidão e admiração.

Aos pós-graduandos do laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FCFRP-USP. M.Sc. Josimar O. Eloy pela importante contribuição nesta Tese e artigos científicos, bem como sua colaboração na execução de experimentos. M.Sc. Juliana Palma Abriatta Barcelos, pela colaboração na execução de experimentos da fase final, pela amizade, carinho e incentivo.

Ao farmacêutico José Orestes Del Ciampo, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, pela contribuição e pelas análises de tamanho das partículas. Ao biólogo Henrique Diniz pelas análises de calorimetria diferencial exploratória e análise termogravimétrica. À Dr^a. Fabíola Garcia, especialista de laboratório. Aos três, agradeço pela amizade e por todas as contribuições diretas e indiretas ao meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto S. Santana, da FCFRP-USP, por disponibilizar o 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^a. Dr^a. Vera Lucia Lanchote, da FCFRP-USP, pelos esclarecimentos sobre análise de amostras biológicas e por ter fornecido gentilmente o padrão interno utilizado no método bioanalítico.

Ao Dr. Rodrigo Silva, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia de Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos colegas que passaram pelo laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FCFRP-USP, Aline Carollo, Danielle Mano, Érika Oliveira, Fábiana Rossetti, Fabiana Oliveira, Fabiana Vicentini, Fernando Frizzon, Fernando Topan, Gilsane Moraes, Juliana Saraiva, Lívia Borgheti, Lívia Depieri, Mayara Trevisani, Nathália Rocha, Patrícia Campos, Raquel Petrilli, Renata Porto,

Thaís Abelha e Wagner Couto, pela amizade, incentivo respeito e por tornarem o ambiente de trabalho agradável e acolhedor.

À Prof^a. Dr^a. Cristiane Masetto de Gaitani pela excelente orientação no Estágio Supervisionado em Docência, pelo carinho e incentivo.

À Seção de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, especialmente à Prof^a. Dr^a. Maria José V. Fonseca e à Prof^a. Dr^a. Mônica Tallarico Pupo, à chefe da seção Rosana Florêncio, aos secretários Eleni Angeli Passos e Rafael Braga Poggi, pela disponibilidade e excelente atendimento.

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

Agradecimentos especiais

Ao Daniel Sabino de Oliveira, meu marido, amor e companheiro de todas as horas. Agradeço por toda a paciência e dedicação. Agradeço por entender minha ausência para que eu terminasse esta Tese e por cuidar muito bem do nosso filhinho Joaquim. Agradeço por me ajudar a trabalhar melhor, a viver melhor, sempre com muito amor e carinho. Você é parte muito importante desta conquista.

Aos meus pais Sãozinha e Baião pelo amor incondicional, por se empenharem tanto em me proporcionar uma educação de qualidade e por nunca me deixarem desanimar. Minha mãe, por largar tudo para estar presente, me auxiliando quando mais precisei. À minha avó Elza (*in memoriam*) por todo carinho com que me acompanhou, sempre rezando por mim e enchendo de alegria a minha vida. Aos meus irmãos Giuliano e Sarah pela força e companheirismo e que, mesmo distantes, eu sempre pude contar. À minha tia Aparecida que acompanhou todas as etapas não só desta conquista, mas de toda a minha vida. Aos meus sogros Gilberto e Mirinha pelo apoio e incentivo.

A todos os familiares e amigos que sempre torceram por mim.

Obrigada meu Deus, que com seu amor infinito me deu a oportunidade de mudar meus valores, enxergando que o amor e a família são o que realmente importam nesta vida, que o trabalho é importante e deve ser um ponto de equilíbrio. Obrigada por mais esta conquista!

"Quando tudo nos parece dar errado, acontecem
coisas boas que não teriam acontecido se tudo
tivesse dado certo."

(Renato Russo)

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	01
1.1. Câncer de mama	01
1.2. Tratamento do câncer de mama	05
1.2.1. Tamoxifeno.....	07
1.3. Sistemas de liberação de fármacos e tratamento do câncer.....	09
1.4. Nanopartículas poliméricas	14
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Matérias-primas, reagentes e solventes.....	21
3.2. Equipamentos	22
3.3. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação do tamoxifeno nas nanopartículas e estudos <i>in vitro</i>	23
3.3.1. Método utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	23
3.3.1.1. Condições de análise	23
3.3.1.2. Validação analítica	24
3.3.2. Método utilizando espectrofotometria UV-vis	26
3.3.2.1. Condições de análise	27
3.3.2.2. Validação analítica	27
3.4. Preparação das nanopartículas.....	29
3.4.1. Determinação da eficiência de encapsulação e rendimento do processo....	33
3.5. Caracterização morfológica e físico-química das nanopartículas.....	34
3.5.1. Análise do tamanho e distribuição de tamanho das partículas.....	34
3.5.2. Análise do potencial zeta.....	34

3.5.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	34
3.5.4. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (IV-TF)	35
3.5.5. Calorimetria diferencial exploratória (DSC)	35
3.6. Caracterização físico-química do fármaco	35
3.6.1. Determinação do coeficiente de partilha octanol/água ($k_{o/a}$) do tamoxifeno.....	36
3.6.2. Solubilidade em água	37
3.6.3. Solubilidade em solução tampão.....	37
3.7. Estudos de liberação <i>in vitro</i> do tamoxifeno a partir das nanopartículas.....	38
3.8. Avaliação <i>in vivo</i> da concentração plasmática do tamoxifeno e N-desmetiltamoxifeno a partir das nanopartículas	39
3.8.1. Desenvolvimento do método bioanalítico para a quantificação do tamoxifeno e N-desmetiltamoxifeno em plasma.....	41
3.8.1.1. Condições de análise	41
3.8.1.2. Processo de purificação/extração do tamoxifeno	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação do tamoxifeno nas nanopartículas e estudos <i>in vitro</i>	43
4.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	43
4.1.1.1. Validação analítica	44
4.1.2. Espectrofotometria UV-vis.....	49
4.1.2.1. Validação analítica	50
4.2. Preparação e caracterização das nanopartículas de PLA e PLA-PEG	53
4.2.1. Obtenção das nanopartículas de PLA, determinação da eficiência de encapsulação, rendimento do processo e análise do tamanho e distribuição de tamanho das partículas	55
4.2.2. Obtenção das nanopartículas de PLA-PEG, determinação da eficiência de encapsulação e análise do tamanho e distribuição de tamanho das partículas.....	62
4.2.3. Análise do potencial zeta.....	65
4.2.4. Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	67

4.2.5. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (IV-TF).....	69
4.2.6. Calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	71
4.3. Caracterização físico-química do tamoxifeno.....	73
4.3.1. Determinação do coeficiente de partilha octanol/água ($k_{o/a}$) do tamoxifeno.....	73
4.3.2. Solubilidade do tamoxifeno	74
4.4. Estudos de liberação <i>in vitro</i>	74
4.5. Avaliação da concentração plasmática do tamoxifeno e N-desmetiltamoxifeno a partir das nanopartículas, em modelo animal	77
4.5.1. Processo de purificação/extração e desenvolvimento do método bioanalítico para a quantificação do tamoxifeno e N-desmetiltamoxifeno em plasma.....	78
 5. CONCLUSÕES	 82
 6. REFERÊNCIAS.....	 84
 ANEXO.....	 100
Anexo A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais ...	100

RESUMO

OLIVEIRA, S.S.M. **Nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo tamoxifeno: preparação, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo***. 2014. 100f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O câncer de mama constitui o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, representando uma das principais causas de morte. O tamoxifeno é um fármaco antiestrogênico utilizado para o tratamento deste tipo de câncer desde 1971 e ainda é o mais utilizado nos casos de tumores mamários que expressam receptores de estrógeno. Apesar de apresentar resultados significativamente positivos, seu efeito antiestrogênico não se restringe apenas ao sítio tumoral causando, com isso, efeitos colaterais graves que podem deixar sequelas. A proposta deste trabalho foi desenvolver sistemas de liberação nanoparticulados à base de PLA e PLA-PEG para veiculação do tamoxifeno, como uma estratégia para o potencial aumento da segurança e da eficácia deste fármaco através de um possível direcionamento passivo ao sítio de ação, devido à permeabilidade vascular aumentada destas regiões tumorais. As nanopartículas foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação e apresentaram diâmetro médio inferior a 200 nm para a maioria das formulações. Foram avaliados três estabilizantes, o poloxamer 407, o poloxamer 188 e o polissorbato 80, este último proporcionou maior eficiência de encapsulação, 86,7% e 100%, nas nanopartículas de PLA e PLA-PEG, respectivamente. Quanto à composição das nanopartículas de PLA-PEG, o polímero utilizado inicialmente (PLA(1000)-PEG(750)) apresentou distribuição de tamanho heterogênea, perfil multimodal e alto índice de polidispersividade. Assim, este polímero foi substituído pelo PLA(5000)-PEG(1000), que apresentou distribuição de tamanho uniforme, perfil monomodal e baixo índice de polidispersividade. A caracterização por microscopia eletrônica de varredura comprovou a homogeneidade no tamanho de partícula, mostrando seu formato esférico. As análises de espectrofotometria no infravermelho e calorimetria diferencial exploratória sugeriram que não ocorreu nenhum tipo de interação ou reação entre o fármaco e os demais componentes das formulações. Dois métodos analíticos para a determinação do tamoxifeno foram validados com sucesso por CLAE e espectroscopia UV-vis. O perfil de liberação *in vitro* do tamoxifeno a partir das nanopartículas de PLA apresentou característica sustentada e alcançou 50% em 180 h, tendo sido totalmente liberado após 288 h. Já as nanopartículas de PLA(5000)-PEG(1000) liberaram apenas 16,9% do fármaco após 216 h. A liberação do fármaco a partir das nanopartículas foi muito mais lenta comparada ao tamoxifeno não encapsulado, evidenciando a vantagem da incorporação do fármaco em nanopartículas compostas por PLA e PLA-PEG. No estudo do perfil de concentração plasmática em ratas Wistar, não foi possível detectar o fármaco e seu principal metabólito pelo método por CLAE desenvolvido, sugerindo que os sistemas nanoparticulados tenham extravasado rapidamente para os órgãos.

Palavras-chave: Nanopartículas poliméricas, PLA, PLA-PEG, tamoxifeno, câncer de mama, estudos *in vitro* e *in vivo*.

ABSTRACT

OLIVEIRA, S.S.M. **PLA and PLA-PEG nanoparticles containing tamoxifeno: preparation, characterization and *in vitro* and *in vivo* evaluation.** 2014. 100f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Breast cancer is the second most frequent type of cancer in the world and it is the most common among women, representing a major cause of death. Tamoxifen is an antiestrogen drug used in the treatment of this type of cancer since 1971 and it is the most employed drug in the treatment of breast cancer subtypes that expresses estrogen receptors. Despite presenting significantly positive results, its antiestrogen effect is not restricted to the tumour site, causing, as consequence, severe side effects. The purpose of this work was to develop nanostructured drug delivery systems based on PLA and PLA-PEG loaded with tamoxifen, as a strategy to potentially increase the safety and efficacy of this drug through a possible passive accumulation the site of action, due to the enhanced vascular permeability of tumour sites. Nanoparticles were prepared by the nanoprecipitation technique and presented average diameter smaller than 200 nm for the majority of the formulations. Three stabilizing adjuvants were analysed, poloxamer 407, poloxamer 188 and polysorbate 80 and the last one yielded the highest encapsulation efficiency, 86.7% and 100%, for the PLA and PLA-PEG nanoparticles, respectively. Regarding the PLA-PEG nanoparticles composition, the first polymer employed was (PLA(1000)-PEG(750)), which presented heterogeneous particle size distribution, multimodal profile and high polydispersity index. So, it was replaced by PLA(5000)-PEG(1000), which exhibited uniform particle size distribution, monomodal profile and low polydispersity index. The characterization by scanning electron microscopy confirmed the homogeneity of particles size, evidencing their spherical shape. Infrared spectrophotometry and differential scanning calorimetry analysis suggested that any interaction or reaction had occurred between the drug and the other components of the formulations. Two analytical methods for tamoxifen quantification were successfully validated by HPLC and UV-vis spectroscopy. *In vitro* tamoxifen release profile from PLA nanoparticles presented sustained release and reached 50% in 180 h, being completely released after 288 h, whereas PLA(5000)-PEG(1000) nanoparticles released only 16.9% of tamoxifen after 216 h. Drug release from nanoparticles was much slower compared to the non-encapsulated tamoxifen, showing the advantage of nanoparticles composed of PLA and PLA-PEG. In the plasmatic concentration profile study carried out in Wistar rats, it was not possible to detect tamoxifen or its main metabolite by the HPLC method, suggesting that nanoparticles quickly extravasated to organs.

Key-words: Polymeric nanoparticles, PLA, PLA-PEG, tamoxifen, breast cancer, *in vitro* and *in vivo* studies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química do tamoxifeno e seus metabólitos N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno	08
Figura 2.	Classificação de nanopartículas segundo a organização estrutural (nanocápsula e nanoesfera)	15
Figura 3.	Nanopartícula convencional <i>versus</i> nanopartícula furtiva.....	18
Figura 4.	Aparato adaptado utilizado no estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i> do tamoxifeno e dissolução do tamoxifeno não encapsulado: tubo de PVC fixado à haste do aparato de cesta, envolvido por membrana de diálise na outra extremidade	38
Figura 5.	Coleta de sangue efetuada por punção cardíaca em animal anestesiado por via inalatória	40
Figura 6.	Cromatograma do tamoxifeno em metanol, concentração $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, tempo de retenção de 7,2 min	44
Figura 7.	Curva analítica do tamoxifeno em metanol, na faixa de concentração entre $0,1$ e $200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, obtida para avaliação da linearidade do método empregando CLAE	46
Figura 8.	Curva analítica do tamoxifeno em metanol, na faixa de concentração entre $0,25$ e $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (faixa de trabalho), obtida por CLAE	47
Figura 9.	Espectro de varredura do tamoxifeno em metanol ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) na faixa de 190 a 390 nm, resolução de 1 nm	50
Figura 10.	Curva analítica do tamoxifeno base em metanol, na faixa de concentração entre $0,25$ e $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, realizada em espectrofotômetro ($\lambda = 273 \text{ nm}$)	51
Figura 11.	Gráfico representativo da relação entre a eficiência de encapsulação e a proporção tamoxifeno/PLA no processo de nanoprecipitação.....	58
Figura 12.	Representação gráfica da distribuição de tamanho das nanopartículas de PLA contendo tamoxifeno, proporção fármaco/polímero 1:20. (A) Formulação PLA-07 utilizando poloxamer 407 como estabilizante; diâmetro médio: 95,4 nm (IPd = 0,231); eficiência de encapsulação: 50,15%. (B) Formulação PLA-13 utilizando poloxamer 188 como estabilizante; diâmetro médio: 138 nm (IPd = 0,298); eficiência de encapsulação: 27,5%. (C) Formulação PLA-13 utilizando polissorbato 80 como estabilizante; diâmetro médio: 76,2 nm (IPd = 0,231); eficiência de encapsulação: 86,7%	61

- Figura 13.** Representação gráfica da distribuição de tamanho das nanopartículas de PLA-PEG contendo tamoxifeno, proporção fármaco/polímero 1:10. (A) Formulação PLA/PEG-04 utilizando poloxamer 407 como estabilizante; diâmetro médio: 503 nm (IPd = 0,693); eficiência de encapsulação: 89%. Pico 1: 15,9 nm (42,5%); pico 2: 111 nm (35,5%); pico 3: 459 nm (22,0%). (B) Formulação PLA/PEG-08 utilizando polissorbato 80 como estabilizante; eficiência de encapsulação: 95,1%. Pico 1: 19,2 nm (47,1%); pico 2: 363 nm (50,8%); pico 4: 5560 nm (2,1%)..... 63
- Figura 14.** Representação gráfica da distribuição de tamanho das nanopartículas de PLA-PEG contendo tamoxifeno, utilizando PLA(5000)-PEG(1000) e polissorbato 80 como estabilizante (formulação PLA/PEG-11), proporção fármaco/polímero 1:10. Diâmetro médio: 104 nm (IPd = 0,172); eficiência de encapsulação: 100,0%..... 64
- Figura 15.** Fotomicrografias de (A) tamoxifeno não encapsulado; aumento de 150 x e 1.500 x (20 KV); (B) nanopartículas de PLA (PLA-19); aumento de 25.000 x e 70.000 x (20 KV); (C) nanopartículas de PLA(5000)-PEG(1000) contendo tamoxifeno (PLA/PEG-11); aumento de 10.000 x e 30.000 x (20 KV)..... 68
- Figura 16.** Espectros de absorção no infravermelho das nanopartículas de PLA contendo tamoxifeno, utilizando como estabilizante: (A) poloxamer 188 (formulação PLA-11), (B) poloxamer 407 (formulação PLA-05), (C) polissorbato 80 (formulação PLA-18)..... 70
- Figura 17.** Curvas obtidas na análise térmica por DSC das nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo tamoxifeno: (A) PLA-11, (B) PLA-05, (C) PLA-18 e (D) PLA/PEG-11..... 72
- Figura 18.** Perfil de liberação *in vitro* do tamoxifeno a partir de nanopartículas de PLA e nanopartículas de PLA(5000)-PEG(1000), proporção fármaco/ polímero (1:10), e dissolução do tamoxifeno não encapsulado..... 76
- Figura 19.** Cromatograma do tamoxifeno ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) (C) e N-desmetiltamoxifeno ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) (B), após etapa de extração em plasma, utilizando flurazepam como padrão interno (A) 79
- Figura 20.** Curva analítica do tamoxifeno (A) e N-desmetiltamoxifeno (B), na faixa de 0,25 a $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, após processo de extração em plasma, obtida por CLAE..... 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Variáveis do processo de preparação das nanopartículas obtidas pelo método de nanoprecipitação	30
Tabela 2 -	Formulações de nanopartículas de PLA contendo tamoxifeno preparadas pela técnica de nanoprecipitação	31
Tabela 3 -	Formulações de nanopartículas de PLA(1000)-PEG(750) contendo tamoxifeno preparadas pela técnica de nanoprecipitação .	32
Tabela 4 -	Formulações de nanopartículas de PLA(5000)-PEG(1000) contendo tamoxifeno preparadas pela técnica de nanoprecipitação .	32
Tabela 5 -	Delineamento experimental utilizado na determinação da concentração plasmática do tamoxifeno e seu principal metabólito, N-desmetiltamoxifeno, em ratas Wistar	39
Tabela 6 -	Resultados obtidos na avaliação da precisão e exatidão intra- e inter-ensaio, expressas por CV (%) e E (%), respectivamente, para a análise do tamoxifeno utilizando CLAE	47
Tabela 7 -	Resultados da linearidade (r), precisão (CV) e exatidão (E) obtidos no ensaio de robustez do método utilizando CLAE (n = 3).....	48
Tabela 8 -	Resultados obtidos na avaliação da precisão e exatidão intra e interensaio, expressas por CV (%) e Rec (%), respectivamente, para a análise do tamoxifeno base por espectrofotometria ($\lambda = 273 \text{ nm}$).....	51
Tabela 9 -	Resultados da linearidade (r), precisão (CV) e exatidão (Rec) obtidos no ensaio de robustez do método utilizando espectrofotometria ($\lambda = 273 \text{ nm}$; n = 6).....	52
Tabela 10 -	Formulações preliminares de nanopartículas de PLA isentas de fármaco preparadas pela técnica de nanoprecipitação, utilizando poloxamer 407 (0,5%) como estabilizante	54
Tabela 11 -	Eficiência de encapsulação das nanopartículas de PLA contendo tamoxifeno preparadas pelo método de nanoprecipitação	57
Tabela 12 -	Distribuição do tamanho de diferentes preparações de nanopartículas de PLA, representada pelo diâmetro médio (nm) e pelo índice de polidispersividade (IPd)	60
Tabela 13 -	Potencial zeta das nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo ou não tamoxifeno, preparadas utilizando-se diferentes estabilizantes	66
Tabela 14 -	Coeficiente de partilha $K_{O/A}$ do tamoxifeno	73
Tabela 15 -	Solubilidade do tamoxifeno base em diversas soluções tampão aquosas	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área sob a curva
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Conc.	Concentração
CV	Coeficiente de variação
DP	Desvio padrão
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i> (calorimetria diferencial exploratória)
E	Exatidão
EE	Eficiência de encapsulação
EPR	Efeito de permeação e retenção vascular
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IARC	Agência Internacional para Pesquisa de Câncer
ICH	<i>International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPd	Índice de polidispersividade
IV-TF	Espectroscopia na região do infravermelho-transformada de Fourier
K _{O/A}	Coeficiente de partição octanol/água
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m	Massa
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

MSREs	Moduladores seletivos do receptor de estrógeno
N-DMT	N-desmetiltamoxifeno
NPs	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEG	Polietilenoglicol
PI	Padrão interno
PLA	Polímero do ácido láctico
PLA-PEG	Polímero do ácido láctico peguado
r	Coeficiente de correlação linear
R	Rendimento
RE	Receptor de estrógeno
Rec.	Recuperação
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
Sol.	Solvente
$T_{1/2}$	Tempo de meia-vida de eliminação
TEA	Trietilamina
T_g	Temperatura de transição vítrea
TMX	Tamoxifeno
US	Banho ultrassônico
UV-vis	Ultravioleta - visível
Vol.	Volume
λ	Comprimento de onda

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. CÂNCER DE MAMA

O câncer é caracterizado pelo crescimento rápido e desordenado de células em uma determinada área do corpo e, genericamente, seu termo constitui um conjunto de mais de 100 neoplasias, incluindo tumores malignos de vários órgãos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009; 2014). Embora existam muitos tipos de câncer, o tratamento deve ser específico para cada tipo. O câncer de pulmão e o de mama, por exemplo, crescem em ritmos diferentes e respondem de maneira distinta aos tratamentos. Além disso, o tumor pode se romper e as células cancerígenas migrarem para outras partes do corpo através dos sistemas circulatório e/ou linfático, ocasionando o câncer metastático (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Desde 2003, as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade. Segundo o relatório World Cancer Report 2008, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde (IARC/OMS), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos (BRASIL, 2009).

O incentivo à pesquisa na área de oncologia é relevante, pois se estima um aumento de 50% no número de novos casos de câncer até 2020 e o dobro do número de mortes. No Brasil, esse desafio é maior, pois a sobrevida varia de 2 a 4 anos, enquanto nos países desenvolvidos esse índice sobe para 12 a 16 anos. Como prioridades identificadas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), associado à Secretaria de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), estão os cânceres de alta prevalência e possibilidade de intervenção e resolução efetivas, como também aspectos relativos ao processo de evolução da doença para tumores de colo do útero, mama, próstata, pulmão, colo retal e neoplasias hematológicas (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009; TANAKA et al., 2009).

Os tratamentos do câncer concentram-se na administração sistêmica de agentes quimio e radioterápicos e são, frequentemente, pouco eficazes, devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência do tumor e aos efeitos colaterais gerados pela baixa seletividade do fármaco contra as células tumorais, atingindo também tecidos saudáveis (PARK et al., 2010; MARTÍNEZ et al., 2012; SOUZA, 2013). Diversas pesquisas têm focado em utilizar características distintas de células tumorais e a permeabilidade vascular alterada em torno dessas células para liberar quimioterápicos, terapia gênica e outros agentes ativos, direta e seletivamente nos tecidos cancerosos. Tais estudos concentram-se, principalmente, em lipossomas, pró-fármacos, polímeros conjugados, micelas, dendrímeros e nanopartículas poliméricas (BETANCOURT; DOIRON; BRANNON-PEPPAS, 2006).

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, representando uma das principais causas de morte (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009; CHANG et al., 2007; YANG et al., 2013). É relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente. Além disso, esta patologia está associada a efeitos psicológicos negativos da mulher, afetando sua percepção da sexualidade e de sua imagem pessoal (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2007; 2012).

As estatísticas indicam um aumento na incidência das neoplasias mamárias tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento. Em 2007, foram diagnosticados cerca de 4,4 milhões de novos casos em todo mundo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012). A Europa Ocidental apresenta a maior incidência (96/100 mil) e as menores taxas são encontradas na África Central e na Ásia Oriental (27/100 mil) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2014). 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 o de mama, pulmões e brônquios e cólon e reto. Somente o câncer de mama foi responsável por 26% dos novos casos detectados, correspondendo a 182.460 pacientes (JEMAL et al., 2008). A estimativa para 2013 era de 234.580 casos novos de câncer de mama invasivo, com 40.030 óbitos (SENKUS; CARDOSO; PAGANI, 2014). No Brasil, o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres, respondendo por 22% dos novos casos a cada ano (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2007;

2011). Esse tipo de câncer é o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste (71,18/100 mil), Sul (70,98/100 mil), Centro-Oeste (51,30/100 mil) e Nordeste (36,74/100 mil). Na região Norte é o segundo mais incidente (21,29/100 mil) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2014). Em 2010, foram registrados 12.852 mortes, sendo 147 homens e 12.705 mulheres. Para o ano de 2014, a estimativa do INCA é que surjam 57.120 novos casos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011).

Desde 1990, verifica-se um aumento de 1,5% ao ano no surgimento de novos casos, atribuído principalmente a mudanças no estilo de vida e alterações na vida reprodutiva das mulheres, sendo considerados como fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, tais como: menarca precoce, nuliparidade ou redução no número de filhos, primeira gestação a termo em idade mais avançada (especialmente acima dos 30 anos), uso de medicamentos anticoncepcionais, sedentarismo, hábitos alimentares inadequados, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2007; BRAY; McCARRON; PARKIN, 2004; PORTER, 2008). Além desses, a idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco. A incidência aumenta rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, de forma mais lenta (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2007; 2012). Estudos recentes comprovam que a exposição à radiação ionizante, mesmo em baixas doses, aumenta o risco de desenvolver câncer de mama, particularmente durante a puberdade. Ao contrário do câncer do colo do útero, o câncer de mama encontra-se relacionado ao processo de urbanização da sociedade, evidenciando maior risco de adoecimento entre mulheres com elevado status sócio-econômico. Fatores genéticos também estão associados ao risco aumentado de desenvolvimento de câncer de mama, de modo que mulheres que apresentam mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* têm 85% de chance de desenvolver câncer de mama antes dos 70 anos de idade (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009; SOUZA, 2013).

Alguns estudos apontam uma relação entre a idade e os dois tipos principais de câncer de mama: o primeiro tipo ocorre na pré-menopausa e é caracterizado por ser mais agressivo e receptor de estrógeno (RE) negativo; o segundo ocorre na pós-menopausa e está associado com características indolentes e, principalmente, por ser RE-positivo. Há também variações morfológicas relacionadas ao RE, como os

carcinomas medulares em RE-negativos e os carcinomas tubulares e lobulares em RE-positivos. Com relação aos carcinomas medulares, pode-se dizer, ainda, que estão associados às mutações no gene *BRCA1* e são mais frequentes em populações de baixo risco, como as mulheres orientais. Por outro lado, os carcinomas tubulares e lobulares têm associação com as mutações do gene *BRCA2* e são mais comuns em populações de alto risco, como as mulheres ocidentais (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2007).

A sobrevida média após cinco anos desde o diagnóstico, em países desenvolvidos, apresentou um discreto aumento nos últimos anos, cerca de 85% (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011; 2014). Apesar das técnicas diagnósticas atuais possibilitarem a detecção do câncer de mama no estágio inicial, permitindo um tratamento menos agressivo e aumentando consideravelmente a sobrevida do paciente, verifica-se que muitos casos ainda são diagnosticados em estágios mais avançados (estágios III e IV). Nestes casos, o câncer já pode ter sido disseminado para outros órgãos por metástase e menos de 15% sobrevivem por mais de cinco anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009). Nos países em desenvolvimento, as consequências desta patologia são ainda mais severas em virtude do menor acesso da população a informações quanto à prevenção da doença, bem como aos instrumentos de diagnóstico e ao tratamento adequado (ANDERSON et al., 2007). Consequentemente, nestes países, a sobrevida média diminui para cerca de 50-60% após cinco anos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011).

O surgimento de metástases é responsável pela grande maioria dos óbitos, devido ao alto grau de malignidade que estes tumores apresentam (CHANG et al., 2007; SOUZA, 2013). Nesta fase, onde o tumor migra para outros órgãos, a taxa de mortalidade sobe para 70% (MARSDEN, 2012). As metástases podem permanecer latentes ou indetectáveis por um período de meses ou anos e agravar o quadro através de recorrência do tumor primário ou afetando novos tecidos e órgãos distantes (ALLAN et al., 2006; SOUZA, 2013).

Apesar dos avanços significativos no diagnóstico e detecção desta patologia, ainda há uma grande carência de terapias mais efetivas para o combate às formas mais invasivas da doença, especialmente aquelas com elevada incidência de metástases (YANG et al., 2013), onde o desenvolvimento de novas tecnologias é

necessário e relevante. O câncer de mama é o segmento da medicina que apresenta a maior quantidade de sistemas de liberação já em uso devido à grande evolução que tais sistemas são capazes de proporcionar no combate desta doença, como, por exemplo, o aumento da eficácia e a redução dos efeitos colaterais (TANAKA et al., 2009).

1.2. TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença heterogênea caracterizada pela desregulação de múltiplas vias celulares, morfologia alterada e sensibilidade a vários tratamentos (SENKUS; CARDOSO; PAGANI, 2014). Para seu tratamento estão disponíveis cinco principais tipos de intervenção, que incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e imunoterapia (YANG et al., 2013). O tratamento primário é a cirurgia para remoção da massa tumoral. O tipo de cirurgia, por exemplo, mastectomia parcial *versus* mastectomia total, com a remoção dos gânglios linfáticos de regiões adjacentes, depende da localização do tumor e tamanho, dentre outros fatores (TANAKA et al., 2009; YANG et al., 2013). A radioterapia utiliza raios de alta energia para destruir as células cancerosas, sendo, frequentemente, usada em conjunto com a mastectomia com o objetivo de eliminar células cancerosas ocultas, podendo também ser usada antes da cirurgia para diminuir o tumor. A quimioterapia é baseada em terapias citotóxicas. Como exemplos de fármacos disponíveis para a quimioterapia do câncer da mama estão mostardas nitrogenadas, ciclofosfamida, ifosfamida, tiotepa, metotrexato, fluouracil, vimblastina, paclitaxel, docetaxel, etoposide e teniposide. A terapia hormonal, compreendendo fármacos como caproato de hidroxiprogesterona, dietilestilbestrol, propionato de testosterona e tamoxifeno, bem como a imunoterapia, também são bastante utilizadas (LIMA NETO et al., 2006; YANG et al., 2013). Além disso, uma melhor compreensão da biologia do câncer de mama está impulsionando pesquisas em tratamentos direcionados para moléculas específicas, resultando em melhores resultados (SENKUS; CARDOSO; PAGANI, 2014).

Habitualmente, diferentes estratégias de tratamento são usadas em combinação. A escolha do tratamento depende de vários fatores como estágio em

que se encontra a doença, localização, tamanho, tipo do tumor (hormônio dependente ou não) e o nível de receptores do fator de crescimento epidermal humano (NER-2/*neu*) presentes no tecido tumoral. A idade, o estado de saúde, se a mulher encontra-se na menopausa ou não também são importantes fatores para a definição da terapia mais adequada (TANAKA et al., 2009; YANG et al., 2013).

Mais da metade dos tumores mamários apresentam receptores hormonais. Por isso, a maioria dos medicamentos utilizados atualmente é hormonal, incluindo os moduladores seletivos do receptor de estrógeno (MSREs) e os inibidores de aromatase (AAPRO, 2001; SOUZA, 2013; TANAKA et al., 2009). Os receptores de estrógeno são encontrados em cerca de 75% do total de carcinomas mamários diagnosticados, onde a terapia hormonal vem provando ser eficaz na redução do risco de reincidência do tumor mamário. Estes receptores regulam o crescimento das células mamárias em resposta ao estrógeno. Portanto, moduladores seletivos, como tamoxifeno, raloxifeno e arzoxifeno, são capazes de antagonizar a ativação de tais receptores, reduzindo o crescimento da massa tumoral (AAPRO, 2001; SOUZA, 2013). Pesquisas mostraram que o uso do tamoxifeno por cinco anos, como adjuvante ao tratamento, foi capaz de reduzir a mortalidade anual em aproximadamente 31% das pacientes com este tipo de tumor (EARLY BREAST CANCER TRIALISTIS, 2005).

O tratamento medicamentoso do câncer de mama é habitualmente realizado pelas vias intravenosa e oral. A eficácia do tratamento depende da capacidade do fármaco em transpor as diversas barreiras para atingir a massa tumoral em concentrações terapêuticas. Isto inclui barreiras físicas (pele e trato gastrointestinal), barreiras fisiológicas (mecanismos celulares de extrusão de fármacos) e barreiras biofísicas (arquitetura vascular tumoral e gradientes de pressão intersticial) (FERRARI, 2005a, b).

Os fármacos antineoplásicos utilizados atualmente apresentam limitações devido aos elevados índices de efeitos colaterais. O tratamento da maior parte dos tumores, incluindo os carcinomas mamários, é realizado através de associações de agentes antineoplásicos, que podem potencializar a ação terapêutica, aumentando a eficácia do tratamento. Porém, seus efeitos colaterais também serão agravados ainda mais, às vezes ocasionando sequelas. Os principais efeitos colaterais são causados pela morte celular em órgãos e tecidos saudáveis, devido à não especificidade da maioria dos

fármacos utilizados atualmente. Dentre eles, estão o enfraquecimento dos ossos, os danos no sistema gastrointestinal e a alopecia. Danos inerentes especificamente às moléculas de determinados fármacos também são muito frequentes (TANAKA et al., 2009; SOUZA et al., 2013), como, por exemplo, falência cardíaca congestiva irreversível causada pela doxorrubicina (VON HOFF et al., 1979).

1.2.1. TAMOXIFENO

O tamoxifeno ($\{2-[4-(1,2\text{-difenil-but-1-enil})\text{-fenoxy}]\text{-etil}\}\text{-dimetil-amina}$) é um fármaco supressor de estrógeno utilizado como tratamento do câncer de mama desde 1971 e continua sendo o mais empregado nos casos de tumores mamários RE-positivos (GOSS et al., 2005; HOSKINS; CAREY; MCLEOD, 2009). Pertence ao grupo dos compostos trifeniletilênicos e é derivado do mesmo núcleo estilbeno que o dietilestilbestrol (LIMA NETO et al., 2006). Os compostos desse grupo possuem várias atividades estrogênicas e antiestrogênicas.

No câncer de mama, o estrógeno induz a proliferação celular do tumor estimulando progressão da doença (YANG et al., 2013). O tamoxifeno compete com o estrógeno na ligação ao RE que estimula a divisão celular na oncogênese, deslocando-o (YANG et al., 2013), sendo considerado o fármaco padrão no tratamento hormonal do câncer de mama metastático. Além disso, seu uso como adjuvante no período pós-operatório está associado a um ganho significativo, tanto em sobrevida livre de doença, quanto em sobrevida global, para as mulheres com tumores que apresentam receptores hormonais positivos (SAAD et al., 2002). Este fármaco é indicado no tratamento de câncer de mama após mastectomia total ou parcial e também durante o tratamento radioterápico, sendo, ainda, o único fármaco mundialmente aprovado para a prevenção da doença em mulheres dos grupos de maior risco (O'REGAN; JORDAN, 2002; SOUZA, 2013).

O tamoxifeno é uma base fraca ($pK_a = 8,8$) com baixa solubilidade em água. Comercialmente, o tamoxifeno base é convertido no sal citrato como uma forma de aumentar a solubilidade em água e sua eficácia. O isômero *Z* do tamoxifeno é biologicamente ativo, e o isômero *E* possui atividade biológica limitada. Após a administração oral, mais de 50% do tamoxifeno é convertido em dois metabólitos

principais, o 4-hidroxitamoxifeno e o N-desmetiltamoxifeno (Figura 1). O 4-hidroxitamoxifeno apresenta atividade biológica semelhante à do tamoxifeno e é eliminado rapidamente, tendo uma meia-vida ligeiramente mais longa do que o tamoxifeno. Já o N-desmetiltamoxifeno possui atividade biológica reduzida em relação ao tamoxifeno, mas apresenta meia-vida de dias (BUCHANAN et al., 2007).

Figura 1. Estrutura química do tamoxifeno e seus metabólitos N-desmetiltamoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno (BRENTANI; FELDMAN, 1995).

A dose utilizada do tamoxifeno é de 0,4 a 0,8 mg kg⁻¹ por via oral (na forma de citrato), uma ou duas vezes ao dia. Após administração oral, é extensivamente metabolizado no fígado, acompanhado da excreção biliar de seus metabólitos (BUCKLEY; GOA, 1989). Sua meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) após administração oral

é de 7 a 14 horas (FABIAN et al., 1981). Apesar de apresentar resultados significativamente positivos no tratamento do câncer de mama, o efeito antiestrogênico do tamoxifeno não se restringe apenas ao sítio tumoral. Este fármaco apresenta ação agonista em determinados tecidos, como o endometrial, aumentando significativamente o risco de desenvolvimento de cânceres de útero (2 a 7 vezes) e hepático (metabolismo lipoprotéico associado ao câncer hepático e esteatose), e apresenta ação antagonista na mama. Outros efeitos colaterais incluem embolia pulmonar, trombose venosa profunda e distúrbios oculares, como retinopatia e opacidade corneal (DE LIMA et al., 2003; SILVA et al., 2005; SOUZA, 2013). Distúrbios uterinos benignos, como hiperplasias e pólipos, também ocorrem em cerca de 40 a 50% das mulheres no período pós-menopausa que fazem uso do tamoxifeno (NEVAN; VERGOTE, 2000; 2001; VOSSE et al., 2002).

Além disso, alguns pacientes tratados com tamoxifeno por longo período podem desenvolver resistência ao medicamento. Neste caso, a associação com outra classe de fármacos, como inibidores da aromatase, é necessária (JORDAN et al., 2005). Porém, os inibidores de aromatase também apresentam uma série de efeitos colaterais relevantes, tais como aumento significativo no número de fraturas, nos níveis séricos de colesterol e no número de distúrbios cardíacos severos, especialmente em pacientes no período pós-menopausa (JORDAN et al., 2005; THE BREAST INTERNATIONAL GROUP, 2005). Assim, a substituição de um medicamento antiestrogênico por um inibidor de aromatase não apresenta vantagens com relação à redução de efeitos colaterais.

A maior parte dos efeitos colaterais importantes associados ao uso do tamoxifeno é considerada dose dependente (PEYRADE et al., 1996). Por isso, a preparação de um sistema para liberação modificada do fármaco que permita a veiculação de doses mais baixas com a mesma efetividade é, sem dúvida, uma estratégia promissora para o aumento da segurança e da eficácia do tamoxifeno.

1.3. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS E TRATAMENTO DO CÂNCER

Atualmente, o fator limitante na quimioterapia do câncer é a falta de seletividade dos fármacos para células neoplásicas. Geralmente, células de

proliferação rápida, tais como as da medula óssea ou do trato gastrointestinal são afetados pela ação citotóxica desses fármacos. Isso resulta em um estreito índice terapêutico da maioria compostos anticâncer. Além disso, o surgimento de células resistentes durante a quimioterapia pode exigir a utilização de doses mais elevadas ou a elaboração de protocolos de combinação de fármacos diferentes, o que pode contribuir para aumentar a toxicidade do tratamento.

Os desafios atuais de pesquisadores de todo o mundo na área oncológica incluem o aumento da eficácia dos tratamentos quimioterápicos e a redução dos efeitos colaterais graves e frequentes que limitam a utilização dos fármacos antineoplásicos. Estas pesquisas têm recebido incentivo e altos investimentos por partes dos setores público e privado.

O desenvolvimento de novos fármacos capazes de atuar especificamente sobre o processo tumoral constitui uma estratégia importante para alcançar este objetivo (ASLAN et al., 2013; LI; WALLACE, 2008). Contudo, o desenvolvimento de um novo medicamento é um processo que demanda grandes investimentos financeiros e um longo período de pesquisa. Atualmente, mais de 20% do faturamento de indústrias farmacêuticas de inovação (cerca de US\$ 40 bilhões) é investido no desenvolvimento de novos medicamentos. Segundo dados do Tufts Centre for the Study of Drug Development (EUA), são necessários cerca de US\$ 900 milhões e 15 anos até o lançamento de um novo fármaco. Em média, a cada 10 mil novas moléculas analisadas, somente uma torna-se um medicamento comercializado (FEBRAFARMA, 2007; SELAN et al., 2007).

As áreas voltadas às pesquisas tecnológicas têm buscado desenvolver novas formas de administração e absorção de fármacos, bem como meios de aumentar seu tempo de ação, fazendo com que a eficácia do medicamento seja maximizada e seus efeitos colaterais minimizados. Uma estratégia de grande relevância para atingir estes objetivos consiste no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada para fármacos já consolidados no mercado. Esses sistemas incluem conjugados de fármacos-polímeros solúveis, micelas poliméricas, micro/nanopartículas, lipossomas, dentre outros (VARGAS et al., 2005).

O efeito de fármacos veiculados em diferentes formas farmacêuticas pode ser bastante distinto (ASLAN et al., 2013; DANCKWERTS; FASSIHI, 1991). Assim, durante o desenvolvimento de um sistema de liberação deve-se considerar: (i) a via

de administração; (ii) a dose total a ser administrada; (iii) as propriedades físico-químicas do fármaco (solubilidade, estabilidade, potência, tamanho molecular, difusividade, coeficiente de partição (pKa); (iv) as características farmacocinéticas (absorção, tempo de meia-vida de eliminação, distribuição corporal, metabolismo); (v) a duração da ação necessária e (vi) o tipo de patologia (aguda, crônica) (ALLEN JÚNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Os sistemas de liberação sustentada de fármacos têm sido muito pesquisados, uma vez que apresentam vantagens sobre formulações convencionais, permitindo: (i) manter os níveis terapêuticos adequados com um mínimo de flutuação; (ii) prever e reproduzir os níveis de liberação; (iii) prolongar o tempo de ação de fármacos com baixo tempo de meia-vida de eliminação; (iv) reduzir os efeitos colaterais e a frequência de dosagem; (v) otimizar a terapia e melhorar a aceitação e a adesão ao tratamento pelo paciente (DANCKWERTS; FASSIHI, 1991). O desenvolvimento de estratégias capazes de manter a duração da atividade terapêutica com o máximo de segurança e eficácia é de grande interesse e tem sido utilizado para melhorar a terapia de muitas patologias (BOTTINI; DAVANE; CORRIGAN, 1984; HNATYSZYN et al., 1994; LIEBERMAN; LACHMAN; SCHATZ, 1990; PANG, 1998).

Os sistemas de liberação de dimensões nanométricas tornam-se cada vez mais importantes no tratamento e diagnóstico do câncer (ASLAN et al., 2013; KARATHANASIS, 2008). Estes sistemas possibilitam maior concentração dos agentes antineoplásicos no sítio tumoral, aumentando o índice terapêutico e melhorando o balanço entre eficácia e toxicidade destes fármacos (ASLAN et al., 2013; SINHA et al., 2006; TANAKA et al., 2009).

Nanocarreadores, tais como as nanopartículas poliméricas, são promissores para solucionar os problemas relacionados à perda de especificidade dos quimioterápicos convencionais (MARTÍNEZ et al., 2012). A possibilidade de direcionar o fármaco para o sítio tumoral permite a redução da interação e a toxicidade em tecidos saudáveis, contribuindo, desta maneira, para uma diminuição significativa dos efeitos colaterais e o consequente aumento na adesão ao tratamento pelos pacientes (ASLAN et al., 2013; EGUSQUIAGUIRRE et al., 2012; KARATHANASIS, 2008; LI; WALLACE, 2008; YEZHELYEV et al., 2006).

Uma das estratégias para a liberação sítio-específica de um fármaco é baseada no efeito de permeação e retenção vascular aumentado (EPR) encontrado nos tecidos tumorais sólidos (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011; MAEDA; SEYMOUR; MIYAMOTO, 1992; MAEDA et al., 2000; 2003; MATSUMARA; MAEDA, 1986; SOUZA, 2013). Grande parte dos tumores sólidos apresenta características patofisiológicas que não são observadas em tecidos e órgãos normais. A complexa rede microvascular tumoral é composta por microvasos imaturos com hipervascularização, arquitetura vascular anormal, com aumento da permeabilidade do endotélio vascular e redução da capacidade de drenagem linfática (JAIN, 1999). Partículas nanométricas tendem a acumular-se preferencialmente nos tumores sólidos por transporte convectivo passivo (ASLAN et al., 2013; JAIN, 2001; MATSUMARA; MAEDA, 1986; MRSNYER, 2006; SINHA et al., 2006). O endotélio dos tecidos tumorais é mais permeável a estruturas de dimensões nanométricas comparados aos tecidos saudáveis, pois, devido à sua exposição aos fatores de crescimento endotelial e de permeabilidade vascular, é bastante desordenado, o que permite o extravasamento de uma concentração maior de nanopartículas para o interior desses tecidos neoplásicos (MATTOS, 2013). Devido a suas dimensões reduzidas (< 200 nm), estes sistemas nanoparticulados podem acumular-se passivamente no interior da massa tumoral através de microtúbulos presentes no epitélio dos vasos sanguíneos anormais do tumor (ASLAN et al., 2013; SINHA et al., 2006; TANAKA et al., 2009).

Nanocarreadores podem também ser formulados para liberar o fármaco, por direcionamento ativo, utilizando ligantes que aumentam potencialmente a captação tumoral resultando em maior eficácia antitumoral. O desenho racional de nanopartículas desempenha um papel crítico, uma vez que características físicas e estruturais, tais como tamanho, carga, forma e características da superfície podem afetar a biodistribuição, farmacocinética, internalização e segurança dos medicamentos (ASLAN et al., 2013). A veiculação de um fármaco em um sistema nanoparticulado também pode levar à redução do *clearance* renal e hepático, além de reduzir o reconhecimento pelo sistema imunológico, alterando, desta forma, as propriedades farmacocinéticas e a biodistribuição do fármaco (ORIVE et al., 2005).

Muitos medicamentos à base de nanocarreadores contendo quimioterápicos encontram-se em diferentes estágios de estudo clínico e outros já se encontram

disponíveis comercialmente (SWAMI et al., 2012). Entre os sistemas nanoestruturados contendo doxorubicina, o Doxil[®] (lipossomas de doxorubicina) foi o primeiro a obter a aprovação da FDA (*Food and Drug Administration*) para uso clínico. O Myocet[®] (complexo de doxorubicina-citrato encapsulado em lipossomas) e o Caelyx[®] (cloridrato de doxorubicina lipossomal peguilado) também obtiveram aprovação da FDA (SWAMI et al., 2012), sendo este último aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2011.

Outro exemplo de medicamento nanoestruturado disponível comercialmente para o tratamento do câncer é o Abraxane[®] (Abraxis Bioscience), composto por nanopartículas de albumina ligada ao paclitaxel (SOUZA, 2013; VISHNU; ROY, 2011). O paclitaxel é um fármaco citotóxico de primeira escolha para o tratamento de carcinomas mamários metastáticos e carcinomas ovarianos em estágio avançado, sendo altamente eficaz (ALLOUACHE et al., 2005; SOUZA et al, 2013). Entretanto, possui alta lipofilicidade e baixo índice terapêutico. Sua formulação convencional (Taxol[®]) apresenta hipersensibilidade, devido à utilização de altas concentrações de Cremophor EL[®] (óleo de mamona polietoxilado), além do álcool etílico desidratado, necessários para a solubilização do fármaco (LI et al., 1998). O Abraxane[®] 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 (SOUZA, 2013; VISHNU; ROY, 2011). Outro sistema relevante e aprovado na Coreia do Sul é composto de nanopartículas de ácido poli-L-lático peguilado para liberação do paclitaxel (Genexol[®]-PM, Samyang) e está em estudo clínico fase II nos EUA para tratamento do câncer pancreático metastático (SWAMI et al., 2012).

Daunoxome[®], também aprovado pela FDA, é um nanocarreador liposomal contendo daunorrubicina, formulado para maximizar a seletividade do fármaco em tumores sólidos *in situ*. Ao mesmo tempo em que o sistema de liberação protege o fármaco encapsulado da degradação química e enzimática na circulação, diminui as ligações proteicas e a absorção pelos tecidos normais. O mecanismo específico de liberação do fármaco em tumores sólidos ainda não é conhecido. Contudo, acredita-se que seja uma função da permeabilidade aumentada da vasculatura do tumor. Em

estudos com animais, a daunorrubicina acumulou-se em tumores numa extensão maior quando administrada como Daunoxome[®] do que quando administrada como formulação convencional. Uma vez dentro do sítio tumoral, a daunorrubicina é liberada aos poucos, exercendo sua atividade antineoplásica (SWAMI et al., 2012).

Dentre outros exemplos encontrados na literatura, estão os sistemas micelares. Micelas poliméricas demonstraram aumentar o acúmulo de fármaco no sítio alvo e/ou reduzir efeitos adversos. Como exemplo, NK911 (Fase I, Nippon Kayaku) e NK105 (Fase II, Nano Carrier) utilizam o copolímero ácido poli-aspartico peguilado para carrear e proteger os fármacos antineoplásicos doxorrubicina e paclitaxel, respectivamente. O NK105 tem se mostrado capaz de reduzir efeitos adversos do paclitaxel, como neurotoxicidade, mielossupressão e reações alérgicas. Micelas poliméricas de ácido poli-glutâmico peguilado contendo cisplatina, NC-6004 (Nano Carrier), estão sendo avaliadas (Fases I/II) e têm demonstrado liberação sustentada, acúmulo do fármaco nas células tumorais e redução da nefrotoxicidade e neurotoxicidade provenientes da cisplatina (SWAMI et al., 2012).

1.4. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanopartículas são partículas coloidais com dimensão da ordem de nanômetros (10^{-9} m), na faixa de 10 – 1000 nm de diâmetro (DILNAWAZ et al., 2010; OLIVEIRA, 2009; RANADE; HOLLINGER, 2004). Este termo pode se referir a dois tipos de estruturas nanoesferas e nanocápsulas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (Figura 2). As nanoesferas são caracterizadas como sistemas matriciais, onde o fármaco está homogeneamente disperso no interior de uma matriz polimérica ou cerosa, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido. Já as nanocápsulas constituem sistemas reservatórios, ou seja, são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (ANDRÉO-FILHO; OLIVEIRA, 1999; OLIVEIRA, 2009; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Figura 2. Classificação de nanopartículas segundo a organização estrutural (nanocápsula e nanoesfera). Fonte: Kumari et al. (2010), adaptada.

Nanopartículas poliméricas constituem um sistema de liberação versátil potencialmente capaz de atravessar barreiras fisiológicas e direcionar fármacos para sítios específicos ou compartimentos intracelulares por direcionamento passivo ou ativo (DILNAWAZ et al., 2010). São amplamente utilizadas nas áreas farmacêutica e cosmética como veículos para liberação modificada de uma grande variedade de compostos. Estas apresentam vantagens em relação a outros sistemas, como os lipossomas, devido à maior estabilidade físico-química, tanto nos fluidos biológicos quanto durante a armazenagem, e à capacidade de encapsulação, dependendo do método de preparação utilizado (COUVREUR et al., 2002; OLIVEIRA, 2009; SCHAFFAZICK et al., 2003; SHARMA; SHARMA, 1997).

As nanopartículas possuem a capacidade de extravasamento passivo para o interstício de tumores sólidos, com a liberação do fármaco nos locais específicos, devido ao efeito EPR. Consequentemente, a exposição aos tecidos saudáveis e aos efeitos tóxicos é reduzida (MATTOS, 2013; SWAMI et al., 2012). Embora a função

primária do aumento da permeabilidade vascular seja garantir o suprimento de nutrientes e oxigênio para o rápido desenvolvimento da massa tumoral, o efeito EPR é uma característica fundamental para o direcionamento e distribuição das nanopartículas no organismo (SOUZA, 2013).

Nanopartículas poliméricas podem ser preparadas por várias técnicas, de acordo com a aplicação e tipo de fármaco a ser encapsulado (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). A técnica ideal de nanoencapsulação deve ser simples, reprodutível, rápida e de fácil transposição à escala industrial (KISSEL et al., 2006). Muitos fármacos têm sido encapsulados por diferentes técnicas, que englobam processos químicos, físico-químicos, ou mecânicos. Os processos físico-químicos compreendem a coacervação simples, a coacervação complexa, a nanoprecipitação e a evaporação do solvente após emulsificação. Os químicos compreendem a condensação ou a polimerização interfacial e a geleificação. Já os mecânicos referem-se, geralmente, aos processos industriais de nanoencapsulação, tal como o nano-spray drying (DILNAWAZ et al., 2010; QUINTANAR-GUERRERO, 1998).

A encapsulação pode ocorrer de duas maneiras: (i) o fármaco é incorporado ao polímero durante a preparação das partículas; (ii) o fármaco é adsorvido ao polímero após a preparação da partícula, ou seja, as partículas são imersas em uma solução contendo o fármaco (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; SOPPIMATH et al., 2001). Na escolha do processo de nanoencapsulação devem ser considerados: (i) rendimento adequado das nanopartículas (partículas livres de aglomeração); (ii) taxa de encapsulação do fármaco; (iii) reprodutibilidade do perfil de liberação; e (iv) habilidade de modificar as taxas de liberação *in vitro* através da variação de parâmetros no processo durante o preparo das partículas. É necessário, ainda, que estas partículas sejam preparadas com polímeros que, além de apresentarem propriedades capazes de modular a liberação do fármaco, apresentem também biocompatibilidade (FREITAS; MARCHETTI, 2005; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; OLIVEIRA, 2009; SOPPIMATH et al., 2001).

Uma grande variedade de polímeros biodegradáveis de origem natural ou sintética pode ser utilizada em sistemas de liberação modificada, entretanto, poucos são biocompatíveis e aplicáveis à administração por via intravenosa (JAIN, 1999). A biodegradabilidade dos polímeros tem recebido atenção especial por prevenir a

toxicidade crônica, gerada, principalmente, após a administração parenteral (FREITAS; MARCHETTI, 2005). O ácido poli (D,L-lático) (PLA) é um polímero amplamente empregado na preparação de nanopartículas devido às suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade. Em meio fisiológico, o PLA sofre hidrólise, liberando ácido lático, que é eliminado do organismo via ciclo de Krebs, na forma de dióxido de carbono e água. Entretanto, nanopartículas poliméricas convencionais, quando administradas por via intravenosa, são rapidamente removidas da circulação sanguínea pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM), representado principalmente pelas células de Kupffer do fígado e macrófagos do baço. A rápida remoção das partículas da circulação sanguínea tem limitado o alcance de concentrações efetivas de fármacos em outros sítios no corpo humano, apesar deste fenômeno ter sido vantajosamente empregado no tratamento de infecções intracelulares no fígado e baço (GREF et al., 2000; MOSQUEIRA et al., 2001; SIBATA et al., 2004).

As causas principais do efeito de opsonização, ou eliminação das nanopartículas pelo SFM, são a polaridade da superfície, a presença de cadeias longas e o tamanho das partículas. O PLA possui característica hidrofóbica, o que torna a superfície da nanopartícula acessível à opsonização e posterior fagocitose (MAINARDES, 2007). Neste sentido, a modificação das características superficiais das nanopartículas, seja pela adsorção ou ligação covalente de polímeros hidrofílicos na superfície das mesmas, como a conjugação com polietilenoglicóis (“peguilação”), tem demonstrado ser uma estratégia promissora para a obtenção de nanocarreadores furtivos. A presença da cobertura hidrofílica na superfície promove estabilização estérea que repele as proteínas plasmáticas, impedindo o fenômeno de opsonização e a captura pelas células fagocitárias (Figura 3) (ALEXIS et al., 2008; CHAWLA; AMIJI, 2002; GREF et al., 2000; GUTERRES et al., 2010; MOSQUEIRA et al., 2001; SIBATA et al., 2004).

Figura 3. Nanopartícula convencional *versus* nanopartícula furtiva (Fonte: GUTERRES et al., 2010 modificada)

O desempenho das nanopartículas *in vivo* é influenciado por características morfológicas, físico-químicas da superfície e massa molecular. A barreira estérea criada pela modificação na superfície das nanopartículas reduz o *clearance* pelos macrófagos circulantes do fígado e possibilita o efeito de aumento no tempo de circulação sanguínea (CHAWLA; AMIJI, 2002; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). O polietilenoglicol (PEG) tem mostrado ser particularmente efetivo como estabilizador estéreo, provavelmente devido à sua alta hidrofília, flexibilidade das cadeias, neutralidade elétrica e ausência de grupos funcionais, os quais previnem interações com componentes biológicos *in vivo* (GREF et al., 1995; MAINARDES, 2007). O emprego de nanopartículas furtivas como carreadoras para o tamoxifeno, além de permitir a manutenção da forma ativa da molécula, aumentaria o seu tempo de permanência na circulação sistêmica, fazendo com que uma maior concentração atingisse os tecidos tumorais.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi desenvolver nanopartículas poliméricas de PLA e PLA-PEG contendo tamoxifeno para administração por via endovenosa, bem como caracterizar e avaliar o perfil de liberação *in vitro* e *in vivo* em modelo animal.

Os objetivos específicos foram:

- Desenvolvimento e validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação do tamoxifeno nas nanopartículas e nos estudos de solubilidade e liberação *in vitro*;
- Desenvolvimento e validação do método analítico por espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-vis), para a determinação da eficiência de encapsulação;
- Preparação de nanopartículas de PLA e PLA-PEG pela técnica de nanoprecipitação;
- Determinação da eficiência de encapsulação frente às diferentes concentrações do fármaco, estabilizantes e polímeros utilizados;
- Caracterização morfológica e físico-química dos sistemas nanoparticulados obtidos, através das análises de tamanho e distribuição de tamanho das partículas por espalhamento dinâmico de luz laser, potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria diferencial exploratória (*differential scanning calorimetry* - DSC) e espectroscopia na região do infravermelho-transformada de Fourier (IV-TF);
- Determinação do coeficiente de solubilidade e do coeficiente de partilha octanol/água do fármaco;
- Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanopartículas de PLA e PLA-PEG;

- Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação do tamoxifeno e seu principal metabólito, N-desmetiltamoxifeno, para avaliação da concentração plasmática em ratas da linhagem Wistar;
- Estudo do perfil de concentração plasmática do tamoxifeno, a partir das nanopartículas de PLA e PLA-PEG desenvolvidas, em modelo animal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATÉRIAS-PRIMAS, REAGENTES E SOLVENTES

- Acetona, P.A., lote 124619, Synth (Brasil)
- Acetonitrila, grau cromatográfico, lote H13C63, J.T. Baker (EUA)
- Ácido poli (D,L-lático) (PLA) (Resomer[®] R208), lote 260316, Boehringer Ingelheim (Alemanha)
- Clorofórmio, grau cromatográfico, lote H41C20, J.T.Baker (México)
- Diclorometano, P.A., lote 31167, Dinâmica (Brasil)
- Fosfato de sódio dibásico, P.A., lote 117738, Synth (Brasil)
- Fosfato de sódio monobásico monoidratado, P.A., lote 91107, Synth (Brasil);
- Heparina 5000 UI/mL (Hepamax-S[®]), lote 1204069, Blau Farmacêutica (Brasil)
- Isoflurano 1,0 mL mL⁻¹ (Forane[®]), lote 02837QA, Abbott (Argentina)
- Lauril sulfato de sódio, 031/1208423/033-22, Ely Martins, (Brasil)
- Metanol, grau cromatográfico, lote H39E08, J.T.Backer (EUA)
- Metanol, grau cromatográfico, lote C5093, Burdick & Jackson (EUA)
- N-desmetiltamoxifeno, lote 080M4747V, Sigma-Aldrich (EUA)
- N-Octanol (álcool N-octílico), P.A., lote 33709, Dinâmica (Brasil)
- PLA(1000)-PEG(750) [*Poly(ethylene glycol)-block-poly(lactide methyl ether)*], lote 07627JH, Sigma-Aldrich (EUA)
- PLA(5000)-PEG(1000) [*PEG(1000)-b-PLA(5000) diblock polymer*], Polysciences, 630588, (EUA)
- Polissorbato 80 (Tween[®] 80), USP, lote: 83971, Synth (Brasil)
- Poloxamer 188 (Lutrol[®] F68), lote WPOD583B, BASF (Alemanha)
- Poloxamer 407 (Lutro[®] F127), lote WPHY615B, BASF (Alemanha)
- Tamoxifeno base livre, 99%, lote T5648-1G, Sigma-Aldrich (EUA)
- Trietilamina 99%, lote 10209190, Sigma-Aldrich (EUA)

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
- Calorímetro exploratório diferencial Shimadzu (Japão), modelo DSC-50
- Calorímetro exploratório diferencial PerkinElmer (USA), modelo Jade DSC
- Centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5810R
- Contensor de acrílico EB 285P Insight (45 x 52 x 205 mm)
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu, composto por bomba peristáltica modelo LC-10AD, detector de UV-Vis modelo SPD-10A e integrador modelo C-R6A
- Degaseificador Shimadzu, modelo DGU – 2A
- Dissolutor Hanson Research, modelo SR8-Plus
- Espectrofotômetro FT-IR Shimadzu, modelo IR-Prestige 21
- Espectrofotômetro UV-Vis Femto, modelo 800 XI
- Evaporador rotativo Ika Werker, modelo RV 05-ST
- Homogeneizador tipo vórtex Ika Werker, modelo MS1
- Liofilizador Liobrás, modelo 101
- Metalizador Bal-Tec, modelo SCD 050 Sputter Coater
- Microscópio eletrônico de varredura Zeiss, modelo EVO 50
- Placa de agitação magnética com aquecimento Fisatom, modelo 752A
- Placa de agitação magnética Marte, modelo MAG 15
- Potenciômetro Digimed, modelo DM-20
- Sistema de ultrapurificação de água Millipore Corporation, modelo Milli-Q Plus

3.3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO TAMOXIFENO NAS NANOPARTÍCULAS E ESTUDOS *IN VITRO*

Neste trabalho, foram desenvolvidos e validados dois métodos analíticos para a quantificação do tamoxifeno: por CLAE e espectrofotometria UV-vis. Ambos os métodos foram validados com base nas diretrizes da ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003) e nas recomendações da *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005), com base no método de padronização externa. Os parâmetros avaliados foram: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez.

3.3.1. MÉTODO UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

3.3.1.1. Condições de análise

As análises cromatográficas foram baseadas no método descrito por MacCallum et al. (1996). Como fase estacionária, utilizou-se uma coluna cromatográfica C₁₈ Gemini[®] (Phenomenex) (250 x 4,60 mm; 5 µm; 110 Å), protegida por coluna de guarda de mesma composição. Os parâmetros cromatográficos selecionados foram: fase móvel composta de solução aquosa de trietilamina 1,0% (pH 9,0) e metanol (89:11, v/v) (degaseificada por borbulhamento de gás hélio por 20 minutos); vazão de 1,2 mL min⁻¹; volume de injeção 20 µL; detecção realizada na faixa do ultravioleta (UV), no comprimento de onda (λ) de 265 nm; temperatura de análise 25 ± 0,5°C.

Para a construção da curva analítica, primeiramente, foi preparada uma solução estoque de tamoxifeno na concentração de 50,0 µg mL⁻¹, pesando-se 5,0 mg do fármaco, e diluindo-o em 100 mL de metanol, utilizando balão volumétrico. As demais soluções-padrão foram preparadas a partir de diluições desta nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 20,0 µg mL⁻¹, no mesmo solvente. Estas

amostras foram analisadas quantitativamente por CLAE e o gráfico foi construído relacionando as concentrações do tamoxifeno no eixo das abscissas (x) e os valores de área obtidos (mAUUV) no eixo das ordenadas (y).

3.3.1.2. Validação analítica

- Linearidade

A avaliação da linearidade do método analítico foi realizada mediante a análise de três curvas preparadas a partir de diluições da solução estoque de tamoxifeno em 10 concentrações diferentes, variando de 0,10 a 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os gráficos foram construídos conforme descrito anteriormente. A proporcionalidade entre a concentração e a resposta foi verificada mediante o cálculo da inclinação da reta, do coeficiente de correlação linear (r) e da equação da reta (intersecção com o eixo y, coeficiente angular, soma residual dos mínimos quadrados). Considerou-se o coeficiente de correlação linear mínimo aceitável de 0,99.

- Seletividade

A seletividade do método foi avaliada para identificar possíveis interferentes da formulação nas respostas obtidas. Dessa forma, foram analisados todos os componentes da formulação das nanopartículas de PLA e PLA-PEG, utilizando-se nanopartículas inertes rompidas em acetona (2,5 mg/10 mL) e banho de ultrassom por 15 minutos, adicionando-se concentrações conhecidas do fármaco. As amostras foram filtradas através de membrana de 0,45 μm de porosidade antes da análise.

- Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método analítico foram verificadas por análises inter e intra-ensaios. A exatidão e a precisão intra-ensaios (repetitividade) foram determinadas realizando-se 10 análises de cada concentração (0,25; 5,0 e 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), no mesmo

dia. Já a exatidão e a precisão intermediária foram determinadas utilizando as mesmas concentrações analisadas em triplicata, em cinco dias consecutivos.

A precisão do método foi verificada através das dispersões das respostas obtidas com relação aos valores médios e foram expressas como coeficiente de variação (CV):

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

onde:

S = desvio padrão

$\bar{X}$ = média dos valores obtidos

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

Para os cálculos da exatidão (E) foram utilizadas as medidas das concentrações obtidas nos estudos intra e inter-ensaios e a concentração real presente na amostra, segundo a fórmula:

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

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

- Faixa de trabalho

A faixa de trabalho do método foi determinada considerando-se a faixa de concentração que apresentou resultados satisfatórios para linearidade, precisão e exatidão, assim como sua adequabilidade à aplicação pretendida.

- Limites de quantificação e detecção

O limite de quantificação (LQ) foi considerado como a menor concentração para a qual a resposta apresentou precisão e exatidão dentro dos níveis de aceitação previamente estipulados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

O limite de detecção (LD) foi determinado utilizando a relação de três vezes o ruído da linha de base (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003) e foi calculado por meio da fórmula:

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

onde:

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

IC = inclinação da curva analítica

- Robustez

Para a avaliação da robustez do método, as análises foram submetidas a variações nas condições analíticas. Os parâmetros analisados foram variação da vazão de fase móvel (1,0; 1,2; 1,4 mL min⁻¹), da proporção entre trietilamina 1% e metanol na mesma (9:91; 11:89; 13:87, v/v) e da concentração de trietilamina na fase aquosa (0,8; 1,0; 1,2%).

3.3.2. MÉTODO UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

O método utilizando espectrofotometria UV-vis foi desenvolvido e validado como alternativa para a quantificação do tamoxifeno nas nanopartículas, para avaliação da eficiência de encapsulação, por ser mais rápido, de menor custo e igualmente eficaz para a finalidade pretendida (OLIVEIRA, 2009).

3.3.2.1. Condições de análise

Assim como na técnica de CLAE, foi preparada uma solução estoque de tamoxifeno em metanol na concentração de $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. As demais soluções-padrão foram preparadas a partir de diluições desta nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. As leituras foram realizadas utilizando cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico. O comprimento de onda foi determinado em 273 nm, a partir de uma varredura do tamoxifeno em metanol ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) na faixa de 190 a 500 nm, com resolução de 1 nm. O gráfico foi construído relacionando as concentrações do fármaco no eixo das abscissas e os valores das absorvâncias no eixo das ordenadas.

3.3.2.2. Validação analítica

- Linearidade

Esta análise foi realizada mediante a confecção de seis curvas independentes, preparadas a partir de diluições da solução estoque do tamoxifeno em nove concentrações diferentes, variando de 0,25 a $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os gráficos foram construídos conforme descrito anteriormente. A proporcionalidade entre a concentração e a resposta foi verificada mediante o cálculo da inclinação da reta, do coeficiente de correlação linear e da equação da reta (intersecção com o eixo y, coeficiente angular, soma residual dos mínimos quadrados). Considerou-se o coeficiente de correlação linear mínimo aceitável 0,99.

- Seletividade

Foram analisados todos os componentes da formulação das nanopartículas PLA e PLA-PEG. Para isto, 2,5 mg de nanopartículas inertes foram rompidas em 10 mL de acetonitrila, utilizando banho de ultrassom por 15 minutos e filtração através de membrana de $0,45 \mu\text{m}$ de porosidade. Após este processo, foram adicionadas concentrações conhecidas de tamoxifeno (0,5; 5,0 e $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), em triplicata, e analisadas em espectrofotômetro. A seletividade também foi avaliada utilizando

acetonitrila como solvente do fármaco padrão nas mesmas concentrações da curva analítica, em triplicata. Os brancos foram preparados da mesma forma para cada análise, excetuando-se a adição do fármaco.

- Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão foram determinadas através da fortificação das nanopartículas inertes, rompidas em acetonitrila (1:4 m/v), obtidas conforme ensaio de seletividade. Para isto, foram adicionadas concentrações conhecidas (0,5; 5,0 e 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no meio. Para as análises da exatidão e precisão intra-ensaios (repetitividade), foram realizadas 10 leituras (soluções independentes) no mesmo dia. Já a exatidão e a precisão intermediária foram determinadas utilizando as mesmas concentrações em triplicata (soluções independentes), em cinco dias consecutivos. A precisão do método foi verificada conforme descrito para a validação do método utilizando CLAE. Considerou-se como aceitável $\text{CV} < 5\%$. Já a exatidão foi verificada através da recuperação (Rec-%) do fármaco adicionado. A concentração real presente na amostra foi calculada segundo a fórmula:

$$R = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor teórico}} \times 100$$

Considerou-se como aceitável $90 < R < 110 \%$.

- Faixa de trabalho

A faixa de trabalho foi determinada conforme descrito para o método utilizando CLAE (item 3.3.1.2).

- Robustez

Para a avaliação da robustez do método, as análises foram submetidas a variações na temperatura das soluções (4 e 25°C), substituição do solvente metanol por acetonitrila e dois analistas diferentes.

3.4. PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas foram preparadas por nanoprecipitação baseando-se no método proposto por Fessi et al. (1989). Esta técnica consiste basicamente no gotejamento de uma fase orgânica contendo solvente volátil miscível em água, fármaco e polímero, em uma solução aquosa contendo ou não tensoativo, sob agitação moderada constante. O polímero, em contato com a solução aquosa, precipita juntamente com o fármaco formando as nanopartículas. O solvente orgânico é posteriormente eliminado por evaporação. Neste trabalho, foram desenvolvidas nanopartículas de PLA e PLA-PEG.

Para a obtenção da fase orgânica (FO), o polímero (PLA, PLA(1000)-PEG(750) ou PLA(5000)-PEG(1000)) e o fármaco foram solubilizados em acetona e homogeneizados com o auxílio de banho de ultrassom por 10 minutos. A fase aquosa (FA) foi composta por uma solução contendo um tensoativo (poloxamer 188, poloxamer 407 ou polissorbato 80). Após a dissolução dos componentes de ambas as fases, a fase orgânica foi adicionada lentamente sob a fase aquosa com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. A suspensão resultante foi mantida sob agitação a 300 rpm, com auxílio de agitador mecânico em capela de exaustão, e temperatura ambiente controlada ($25,0 \pm 1^{\circ}\text{C}$), durante um período de 24 horas, para total evaporação do solvente. As variações no processo (Tabela 1) foram estudadas visando à obtenção de nanopartículas com distribuição de tamanho regular e não agregadas, com morfologia e tamanho adequados à via de administração pretendida ($< 200\text{ nm}$), considerando-se, ainda, a eficiência de encapsulação.

Tabela 1 - Variáveis do processo de preparação das nanopartículas obtidas a partir do método de nanoprecipitação.

Etapas do processo	Variáveis
Fase orgânica	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proporção fármaco / polímero (1:5; 1:10; 1:20 m/m) ▪ Polímero (PLA; PLA(1000)-PEG(750); PLA(5000)-PEG(1000)). ▪ Volume e tipo do solvente (acetona; acetona + diclorometano) ▪ Proporção FO / FA (1:2; 1:3 v/v)
Fase aquosa	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tensoativo (poloxamer 407; poloxamer 188; polissorbato 80) ▪ Concentração do tensoativo (0 a 5,0 mg mL⁻¹)
Separação	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Centrifugação ▪ Filtração

O método de purificação das nanopartículas em suspensão obtidas foi avaliado, utilizando centrifugação, filtração e ambos. A separação por meio de centrifugação foi realizada com rotação de 20,800 x g (14.000 rpm), a 8°C, por 40 minutos. O precipitado foi ressuspenso em água e novamente centrifugado, por mais dois ciclos, para a remoção dos resíduos de tensoativo. Já a filtração, após a obtenção das nanopartículas, foi realizada utilizando filtros de seringa com membranas de 0,45 µm de porosidade e, em seguida, de 0,20 µm. Este processo de filtração retém o fármaco não encapsulado, excesso de polímero, agregados e impurezas, e possibilita a passagem pelos poros das nanopartículas com diâmetros menores que 200 nm (característica adequada à via de administração pretendida). Após o processo de separação, as nanopartículas foram congeladas e submetidas ao processo de liofilização para secagem e estabilização.

As formulações de nanopartículas utilizando diferentes polímeros estão apresentadas nas Tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2 - Formulações de nanopartículas de PLA contendo tamoxifeno preparadas pela técnica de nanoprecipitação.

FORM.	TMX (mg)	Proporção fármaco/polímero (m/m)	Solvente orgânico	Vol. sol. orgânico (mL)	Vol. fase aquosa (mL)	Tensoativo	Conc. tensoativo (mg mL ⁻¹)
PLA-01	10	1:10	Acetona	20	40	Poloxamer 407	5,0
PLA-02	5	1:20		20	40		5,0
PLA-03	20	1:5		20	40		5,0
PLA-04	10	1:10		20	40		2,5
PLA-05	10	1:10		20	40		1,25
PLA-06	20	1:5		20	40		1,25
PLA-07	5	1:20		20	40		1,25
PLA-08	10	1:10	Acetona	20	40	Poloxamer 188	1,25
PLA-09	10	1:10		20	40		2,0
PLA-10	10	1:10		20	40		2,5
PLA-11	10	1:10		20	40		5,0
PLA-12	20	1:5		20	40		5,0
PLA-13	5	1:20		20	40		5,0
PLA-14	10	1:10	Acetona	20	40	Polissorbato 80	1,0
PLA-15	10	1:10		20	40		2,0
PLA-16	20	1:5		20	40		2,0
PLA-17	5	1:20		20	40		2,0
PLA-18	10	1:10		20	40		4,0
PLA-19	5	1:20		20	40		4,0
PLA-20	10	1:10		20	40		5,0

Tabela 3 - Formulações de nanopartículas de PLA(1000)-PEG(750) contendo tamoxifeno preparadas pela técnica de nanoprecipitação.

FORM.	TMX (mg)	Proporção fármaco/polímero (m/m)	Solvente orgânico	Vol. sol. orgânico (mL)	Vol. fase aquosa (mL)	Tensoativo	Conc. tensoativo (mg mL ⁻¹)
PLA/PEG-01	10	1:10	Acetona	20	40	Poloxamer 188	1,25
PLA/PEG-02	10	1:5		15	40		1,25
PLA/PEG-03	10	1:10	Acetona	20	40	Poloxamer 407	1,25
PLA/PEG-04	5	1:20		20	40		1,25
PLA/PEG-05	10	1:10		20	40		2,5
PLA/PEG-06	10	1:10	Acetona	20	40	-	-
PLA/PEG-07	10	1:10		20	40	Polissorbato 80	2,0
PLA/PEG-08	10	1:10		20	40		4,0

Tabela 4 - Formulações de nanopartículas de PLA(5000)-PEG(1000) contendo tamoxifeno preparadas pela técnica de nanoprecipitação.

FORM.	TMX (mg)	Proporção fármaco/polímero (m/m)	Solvente orgânico	Vol. sol. orgânico (mL)	Vol. fase aquosa (mL)	Tensoativo	Conc. tensoativo (mg mL ⁻¹)
PLA/PEG-08	10	1:10	Acetona	20	40	-	-
PLA/PEG-09	10	1:10		20	40	Poloxamer 188	2,5
PLA/PEG-10	10	1:10		20	40	Poloxamer 407	1,25
PLA/PEG-11	10	1:10		20	40	Polissorbato 80	2,5
PLA/PEG-12	10	1:10		10	20		2,5

3.4.1. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E RENDIMENTO DO PROCESSO

A determinação da eficiência de encapsulação (EE%) foi realizada pelo método direto, que consiste no rompimento das nanopartículas em um solvente onde o polímero e o fármaco são solúveis. A quantificação do tamoxifeno foi realizada tanto pela técnica de espectrofotometria UV-vis quanto por CLAE.

Neste ensaio, 250 µL da suspensão de nanopartículas contendo tamoxifeno foram transferidos para um balão volumétrico (5 mL), completando-se o volume com acetonitrila. A solução foi submetida à agitação em banho de ultrassom por 5 minutos, e, posteriormente, filtrada através de membrana de 0,45 µm de porosidade. Quando realizadas leituras das amostras por espectrofotometria UV-vis, o branco foi preparado a partir da solução de nanopartículas sem o fármaco, da mesma forma. A concentração do tamoxifeno foi calculada utilizando a equação da curva analítica e a concentração teórica foi obtida com base na massa do fármaco adicionado, em relação ao volume final da suspensão (após a evaporação da fase orgânica). A eficiência de encapsulação (EE%) foi obtida em porcentagem através da fórmula:

$$EE (\%) = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

O rendimento do processo (R%) foi calculado com base na quantidade em massa de nanopartículas liofilizadas em relação à quantidade de fármaco, polímero e tensoativo utilizados no processo de preparação. O tensoativo foi considerado apenas no processo de separação por filtração, onde não foi eliminado. O cálculo foi realizado utilizando-se a equação:

$$R\% = \frac{\text{massa obtida de nanopartículas liofilizadas}}{\text{massa teórica (fármaco + polímero + tensoativo)}} \times 100$$

3.5. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

3.5.1. ANÁLISE DO TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS

O tamanho de partícula foi determinado por dispersão de luz (*light scattering*), utilizando temperatura controlada de 25°C. A suspensão de nanopartículas foi diluída na proporção de 1:100 (v/v) em água ultrapurificada e inserida na câmara de análise, com o auxílio de uma cubeta. Foram obtidas medidas do diâmetro interno das partículas, bem como a distribuição, representada pelo índice de polidispersividade (IPd).

3.5.2. ANÁLISE DO POTENCIAL ZETA

A determinação do potencial zeta (ζ) foi realizada para todas as formulações através da mobilidade em temperatura controlada de 25°C. Para isto, as nanopartículas em suspensão foram diluídas na proporção de 1:10 (v/v) em água ultrapurificada e transferidas para a cubeta de análise.

3.5.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Previamente, uma pequena quantidade de nanopartículas liofilizadas foi pulverizada em fita dupla face de carbono aderida a um suporte de alumínio, retirando-se o excesso com fluxo de ar. Para as nanopartículas em suspensão, uma alíquota de 10 µL da formulação foi aplicada sobre uma lâmina de vidro aderida a um suporte de alumínio, com o auxílio de uma micropipeta, e a água foi evaporada em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras receberam recobrimento com uma camada de ouro por 100 segundos. As análises por MEV foram realizadas utilizando voltagem entre 10,00 e 25,00 KV.

3.5.4. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (IV-TF)

Esta análise foi utilizada para averiguar possíveis interações moleculares ocorridas entre o tamoxifeno, polímeros e estabilizantes. Assim, amostras do fármaco, polímeros, tensoativos, nanopartículas contendo o tamoxifeno e nanopartículas isentas de fármaco foram analisados separadamente.

Cada amostra foi triturada em gral de vidro, adicionando-se brometo de potássio (KBr) anidro para a produção de uma pastilha translúcida, por meio de compressão, em prensa hidráulica com punção único, utilizando pressão de 6 Kgf cm⁻². As análises foram realizadas utilizando velocidade de 0,2 cm min⁻¹, no intervalo de número de onda de 4000 – 400 cm⁻¹ e resolução de 2 cm⁻¹.

3.5.5. CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC)

As amostras foram trituradas em gral de vidro até a obtenção de um pó homogêneo e alíquotas (5 mg) foram pesadas em cadinhos de alumínio. Foi realizada uma varredura na faixa de 30 – 330°C, com taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹, e vazão de 100 mL min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio. A célula de DSC foi calibrada, antes dos ensaios, utilizando índio (99,9%) e n-octadecano como padrões de referência

3.6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO TAMOXIFENO

Antes da realização dos estudos de liberação *in vitro* do tamoxifeno foram efetuados alguns ensaios de caracterização físico-química do fármaco, de modo que as condições empregadas no estudo pudessem ser selecionadas racionalmente, bem como para estabelecer comparações entre o comportamento do fármaco encapsulado e não encapsulado. A quantificação do fármaco nestes ensaios foi realizada por CLAE, empregando-se as condições descritas no item 3.3.1.

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

O coeficiente de partilha do tamoxifeno foi determinado com base nos trabalhos de Netz (2003) e Wells (1988). Primeiramente, foi realizada a saturação do octanol (50 mL) utilizando o mesmo volume de água. A mistura foi agitada a 300 rpm por 12 horas. Após repouso de 5 minutos, o octanol foi separado da água com o auxílio de um funil de separação e centrifugado a $265 \times g$ (2.500 rpm) por 10 minutos. A água remanescente foi retirada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.

A fase aquosa contendo o fármaco foi preparada através da adição de um excesso de tamoxifeno (equivalente a, aproximadamente, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$) em água, utilizando agitação magnética de 300 rpm por 30 minutos e mantida a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, em banho termostatzado. O experimento foi realizado em triplicata. As soluções contendo o fármaco foram filtradas através de membrana de $0,45 \mu\text{m}$ de porosidade para a retirada do precipitado e analisadas por CLAE, determinando-se a concentração de tamoxifeno na fase aquosa antes da partilha.

Para a determinação do $K_{O/A}$, 10 mL da solução de tamoxifeno foram adicionados em 10 mL do octanol saturado. A mistura foi agitada por 30 minutos (300 rpm), a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e, em seguida, transferida para funil de separação. Após um repouso de 5 minutos, a fase aquosa foi coletada e centrifugada a $265 \times g$ (2.500 rpm) por 10 minutos.

Após a separação da fase aquosa, realizou-se a etapa de extração do fármaco, onde a 0,5 mL desta solução foram adicionados 3 mL de clorofórmio, homogeneizou-se em vórtex por 1 minuto, e centrifugou-se a $371 \times g$ (3.500 rpm) por 15 minutos para a separação das fases. A fase aquosa foi desprezada e o clorofórmio foi transferido para tubo cônico e evaporado com o auxílio de ar comprimido. O resíduo seco foi ressuspenso em $100 \mu\text{L}$ de metanol, sob agitação magnética a 2500 rpm por 20 segundos e submetido à análise por CLAE.

A concentração do tamoxifeno na fase aquosa foi quantificada antes (C_1) e após a partilha (C_2), e o coeficiente de partilha octanol/água ($K_{O/A}$) foi determinado segundo a equação (Wells, 1988):

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

A etapa de extração do fármaco em clorofórmio foi também realizada para a determinação do fármaco antes da partilha, para avaliar a recuperação da mesma ($n = 6$) e os resultados foram comparados com os obtidos pela análise direta, descrita acima.

3.6.2. SOLUBILIDADE EM ÁGUA

Para a determinação da solubilidade do tamoxifeno em água, foi adicionado excesso do fármaco (10,0 mg) em 10 mL de água, e submetido a agitação magnética (300 rpm) até o equilíbrio (24 e 48 horas). A amostra foi filtrada através de membrana de 0,45 μm de porosidade e analisada por CLAE para determinação da quantidade dissolvida. As determinações foram realizadas em triplicata.

3.6.3. SOLUBILIDADE EM SOLUÇÃO TAMPÃO

Para verificar o meio de dissolução mais apropriado para o estudo de liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanopartículas, foi verificada a solubilidade do fármaco em tampão aquoso, contendo ou não tensoativo, após 24 e 48 horas, conforme procedimento descrito no item 3.6.2. As amostras foram diluídas na proporção de 1:1 (v/v) em fase móvel antes da análise por CLAE. Os meios avaliados foram:

- Tampão fosfato de sódio pH 7,4
- Tampão fosfato de sódio pH 7,4 + lauril sulfato de sódio 0,5%
- Tampão fosfato salino 10 mmol L⁻¹ (PBS) pH 7,4
- Tampão fosfato salino 10 mmol L⁻¹ (PBS) pH 7,4 + poloxamer 407 0,5%
- Tampão fosfato salino 10 mmol L⁻¹ (PBS) pH 7,4 + polissorbato 80 0,5%

3.7. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO TAMOXIFENO A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS

As análises foram realizadas em dissolutor utilizando mini-cubas com capacidade para 150 mL e aparato adaptado composto por um cilindro de cloreto de polivinila (PVC), envolto por uma membrana de diálise de acetato de celulose em uma das extremidades e fixado em haste de cesta pela outra extremidade (Figura 4). Os experimentos foram conduzidos a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ($n = 6$), empregando como meio receptor uma solução tampão fosfato 100 mmol L^{-1} acrescida de lauril sulfato de sódio 0,5%, no volume de 80 mL, mantendo-se agitação constante (150 rpm). O ensaio foi realizado sob condições *sink*, de modo que a concentração do soluto não alcançasse mais do que 10% da sua solubilidade máxima, sendo a concentração do fármaco no meio receptor de, aproximadamente, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Primeiramente, foi avaliada a dissolução do fármaco no meio receptor e o volume coletado foi de 1,0 mL e repostado com o meio de dissolução fresco, nos tempos de amostragem 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24; 36; 48; 96; 192 horas. Posteriormente, a avaliação do perfil de liberação *in vitro* foi realizada nas mesmas condições e coletadas em intervalos pré-estabelecidos. As amostras coletadas foram filtradas ($0,45 \mu\text{m}$) e analisadas por CLAE (método descrito no item 3.3.1).

Figura 4. Aparato adaptado utilizado no estudo do perfil de liberação *in vitro* do tamoxifeno e dissolução do tamoxifeno não encapsulado: tubo de PVC fixado à haste do aparato de cesta, envolvido por membrana de diálise na outra extremidade (Fonte: SOUZA, 2013, adaptado).

3.8. AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DO TAMOXIFENO E N-DESMETILTAMOXIFENO A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS

Este estudo foi realizado com aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto (protocolo nº 09.1.636.53.3).

A concentração de tamoxifeno e N-desmetiltamoxifeno, seu principal metabólito, foi avaliada no plasma de ratas Wistar com peso entre 150 e 200 g, a partir das formulações de nanopartículas de PLA e PLA-PEG. Os animais foram acondicionados no laboratório de experimentação animal 24 horas antes do início da aplicação das formulações para ambientação, em gaiolas coletivas com dimensões de 34 x 41 x 16 cm (03 animais/caixa), temperatura ambiente controlada de 22°C ($\pm$ 2°C), iluminação controlada automaticamente com ciclos claro/escuro (12 horas), alimentados com ração e água fresca *ad libitum*.

Os animais foram divididos em quatro grupos, conforme detalhado na Tabela 5. Cada grupo foi subdividido em dois com o objetivo de alternar as coletas de sangue para garantir a sobrevivência dos animais às várias coletas de sangue com necessidade de anestesia.

Tabela 5 - Delineamento experimental utilizado na determinação da concentração plasmática do tamoxifeno e seu principal metabólito, N-desmetiltamoxifeno, em ratas Wistar

Grupo	Nº de animais	Tratamento
1	6 (n = 3)	Nanopartículas inertes PLA (PLA-18in)
2	6 (n = 3)	Nanopartículas inertes PLA(5000)-PEG(1000) (PLA/PEG-11in)
3	12 (n = 6)	Nanopartículas de PLA contendo tamoxifeno (PLA-18)
4	12 (n = 6)	Nanopartículas de PLA(5000)-PEG(1000) contendo tamoxifeno (PLA/PEG-11)

A administração das formulações foi realizada pela via endovenosa, através da veia lateral da cauda, dilatada previamente em água morna (40 – 50°C) por 30 segundos. Os animais foram transferidos individualmente para um contensor e

receberam 300 μ L da formulação correspondente utilizando agulha de 26 gauge x $\frac{1}{2}$ ". Após a administração, foram recolocados nas caixas.

As coletas de sangue foram efetuadas por punção cardíaca (Figura 5) em tempos pré-determinados (0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24; 36 e 48 horas após a aplicação) utilizando agulha de 22 gauge x $1\frac{1}{4}$ ", retirando 300 μ L. Os animais foram anestesiados por via inalatória utilizando o isoflurano, com manutenção da oxigenação. Após a coleta do sangue, o anestésico foi retirado e os animais foram observados durante a recuperação dos sinais vitais (respiração e batimentos cardíacos). No final do experimento, os animais foram sacrificados em ambiente saturado com o próprio anestésico, confirmando-se o óbito pela ausência de reflexos, movimentos respiratórios e batimentos cardíacos (BRASIL, 2008). As amostras coletadas foram transferidas para tubos cônicos tipo *Eppendorf* heparinizados (30 μ L) e centrifugadas (15 minutos; 4500 rpm/477 x g; 8°C). O plasma foi separado e armazenado a -18°C.

Figura 5. Coleta de sangue efetuada por punção cardíaca em animal anestesiado por via inalatória.

3.8.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO TAMOXIFENO E N-DESMETILTAMOXIFENO EM PLASMA

3.8.1.1. Condições de análise

A determinação do tamoxifeno e seu principal metabólito no plasma foi realizada por CLAE, utilizando coluna cromatográfica C₁₈ Gemini[®] (Phenomenex) (4,6 x 250 mm, 5 µm, 110 Å), protegida por 2 colunas de guarda de mesma composição, e fase móvel composta por metanol e solução de trietilamina (TEA) 1% (85:15, v/v). As condições de análise foram: vazão 1,0 mL min⁻¹; volume de injeção 20 µL; detecção por UV-Vis em 265 nm e temperatura ambiente controlada 25°C. Para este estudo, foi realizada a técnica da padronização interna, de acordo com as diretrizes da ANVISA para métodos bioanalíticos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012), e utilizando o flurazepam como padrão interno (BRONISCER, 2000; SOUZA, 2013). Soluções de tamoxifeno e N-desmetiltamoxifeno foram preparadas nas concentrações 0,25; 0,5; 1,0; 5,0 10,0 e 25,0 µg mL⁻¹ em metanol, para a obtenção da curva analítica.

3.8.1.2. Processo de purificação/extração do tamoxifeno

O desenvolvimento do método de extração do tamoxifeno a partir das amostras de plasma teve como ponto de partida o trabalho descrito por Broniscer e colaboradores (2000), empregando metanol e uma mistura composta por hexano e álcool isoamílico (98,5:1,5 v/v) para extração e purificação das amostras. Diversas proporções entre amostra de plasma e metanol foram avaliadas, bem como os tempos de agitação, de modo a otimizar o processo, garantindo a maior taxa de recuperação possível. Foi avaliada, ainda, a utilização de acetoneitrila em substituição ao metanol, objetivando aumentar a taxa de recuperação.

A curva de calibração foi preparada utilizando 150 µL de plasma extraído de ratas Wistar, 150 µL da solução padrão em metanol para cada concentração, 15 µL da solução de padrão interno (45 µg mL⁻¹, em metanol) e 135 µL de metanol,

agitação em vórtex (1 minuto) e centrifugação a 2500 rpm (265 x g)/10 minutos a 10 °C. O sobrenadante foi coletado, adicionado a 1,0 mL de solução composta por hexano e álcool isoamílico (98,5:1,5 v/v) e agitado por 5 minutos em vórtex. Após repouso para separação das fases, a fase contendo hexano/álcool isoamílico foi coletada e submetida a fluxo de ar comprimido em temperatura ambiente (25 °C) para evaporação dos solventes. O resíduo obtido, contendo o fármaco e o metabólito, foi diluído em 100 µL de metanol e analisado por CLAE ($n = 3$). As curvas analíticas do tamoxifeno e do N-desmetiltamoxifeno foram construídas 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 ($r > 0,99$). A recuperação dos analitos foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos para cada concentração após a extração com as soluções padrão preparadas em metanol.

Quanto às amostras de plasma, a 150 µL de cada uma delas foram adicionados 15 µL da solução de padrão interno e 285 µL de metanol. A partir deste ponto, foi realizado o mesmo procedimento descrito para a extração/purificação das soluções padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO TAMOXIFENO NAS NANOPARTÍCULAS E ESTUDOS *IN VITRO*

O desenvolvimento e validação de método analítico para a quantificação de fármacos são etapas imprescindíveis no delineamento de novas formas farmacêuticas. A validação garante a confiabilidade dos resultados e eficiência do método desenvolvido e é capaz de detectar erros do procedimento analítico (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; VELLOSO et al., 2009). As agências regulatórias possuem diretrizes para guiar os processos de validação, visando à obtenção de dados claros e objetivos que comprovem que um método analítico é adequado para o uso proposto (CHIARADIA, 2009; SOUZA, 2013).

4.1.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A CLAE é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel líquida e a fase estacionária contida em uma coluna. A maioria das análises farmacêuticas está baseada no método de separação por partição, entretanto, as separações também podem ser realizadas por adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo da fase estacionária utilizada (OLIVEIRA, 2009; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Para a análise do tamoxifeno foi escolhida a CLAE de fase reversa, considerada de primeira escolha para a análise da maioria das amostras contendo fármacos, por ser uma técnica estável, eficiente e reprodutível. Este sistema utiliza fases estacionárias apolares e fases móveis polares. O tempo de retenção na coluna, caracterizado pela afinidade de uma substância pela fase estacionária, é determinado pela polaridade da fase móvel, composta basicamente por água ou tampão, com adição de algum modificador orgânico (geralmente metanol ou

acetonitrila). Contudo, as características do soluto também influenciam na sua retenção, de acordo com sua característica polar ou apolar. De maneira geral, na cromatografia de fase reversa o tempo de retenção diminui à medida que se aumenta a proporção do solvente orgânico na fase móvel (OLIVEIRA, 2009). O cromatograma obtido com as condições descritas no item 3.3.1. está representado na Figura 6, onde o tempo de retenção para o tamoxifeno foi de 7,2 min.

Figura 6. Cromatograma do tamoxifeno em metanol, concentração $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, tempo de retenção de 7,2 min.

4.1.1.1. Validação analítica

- Seletividade

A seletividade avalia o grau de interferência de outros componentes da formulação como outro(s) princípio(s) ativo(s), excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar presentes. Este parâmetro garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for garantida, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão comprometidas (RIBANI et al., 2004).

Uma das formas de avaliação da seletividade, e a utilizada neste estudo, é a comparação da formulação isenta do fármaco e a formulação adicionada com o fármaco (padrão analítico), sendo que os demais componentes da amostra não devem eluir no tempo de retenção da substância de interesse (ICH, 1995; 2005; RIBANI et al. 2004).

A seletividade foi determinada pela comparação entre os resultados obtidos a partir de amostras não contaminadas (nanopartículas inertes) e os obtidos a partir das nanopartículas adicionadas de quantidade conhecida de fármaco. Outros compostos como meio de dissolução utilizado no estudo de solubilidade e de liberação *in vitro* como soluções contendo tensoativos, soluções tampão, acetona, acetonitrila, metanol também foram avaliados. Os resultados obtidos demonstraram que a resposta não foi afetada pelas matérias-primas e solventes utilizados.

- Linearidade

A linearidade de um método analítico refere-se à proporcionalidade entre a concentração do analito e a resposta obtida, dentro de uma determinada faixa de aplicação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; RIBANI et al., 2004). Para sua determinação, é necessário a construção de uma curva analítica correlacionando a concentração do analito e o sinal medido (neste caso, área ou altura do pico cromatográfico), utilizando, pelo menos, cinco concentrações diferentes do mesmo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; SOUZA, 2013).

Neste trabalho, a linearidade foi avaliada na faixa de concentração de tamoxifeno entre 0,1 a 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados mostraram que valores de $r > 0,99$ neste intervalo (Figura 7).

Figura 7. Curva analítica do tamoxifeno em metanol, na faixa de concentração entre 0,1 e 200,0 µg mL⁻¹, obtida para avaliação da linearidade do método empregando CLAE.

- Precisão e exatidão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003), podendo ser determinada através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2007; RIBANI, 2004). Já a exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É considerada dentro de certos limites, em um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão) (RIBANI et al. 2004).

Foram avaliadas a precisão intermediária (ou precisão interensaios) e a repetitividade (ou precisão intraensaio). Os resultados mostraram CV abaixo de 5%. Para o estudo de exatidão, onde foram avaliadas a exatidão intra e interensaios, os desvios com relação ao valor nominal (E) ficaram abaixo de 10% (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados obtidos na avaliação da precisão e exatidão intra e interensaios, expressas por CV (%) e E (%), respectivamente, para a análise do tamoxifeno utilizando CLAE.

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

- Faixa de aplicação

Considerando os resultados obtidos na avaliação de linearidade, precisão e exatidão, bem como a aplicação do método, determinou-se como faixa de aplicação o intervalo compreendido de 0,25 a 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 8).

Figura 8. Curva analítica do tamoxifeno em metanol, na faixa de concentração entre 0,25 e 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (faixa de trabalho), obtida por CLAE.

- Robustez

Robustez de um método indica a capacidade da técnica desenvolvida em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, bem como sua confiabilidade durante o uso (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). As modificações realizadas para a análise da robustez não provocaram variações nos resultados além dos limites estabelecidos com relação à linearidade, precisão e exatidão para o intervalo de concentração avaliado (Tabela 7). Assim, o método mostrou-se robusto frente às variações realizadas.

Tabela 7 - Resultados da linearidade (r), precisão (CV) e exatidão (E) obtidos no ensaio de robustez do método utilizando CLAE (n = 3).

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		0,25		2,5		20,0	
Parâmetros	r	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)
Vazão (mL min^{-1})	1,0	0,9990	1,56	1,08	1,68	-0,68	1,50
	1,2	1,0000	2,40	8,36	0,77	-1,82	0,98
	1,4	1,0000	2,29	9,74	1,13	-2,16	0,68
Proporção TEA ¹ :MeOH ²	9:91	1,0000	0,20	-7,80	0,11	-1,37	0,54
	11:89	1,0000	2,40	8,36	0,77	-1,82	0,98
	13:87	1,0000	2,58	2,62	0,47	-2,65	1,73
% TEA	0,8	1,0000	1,85	-5,52	1,07	-3,13	1,43
	1,0	1,0000	2,40	8,36	0,77	-1,82	0,98
	1,2	1,0000	1,22	9,72	0,90	-5,75	0,51

¹TEA= trietilamina; ²MeOH= metanol

- Limite de quantificação e limite de detecção

O limite de quantificação é definido como a menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis, utilizando as condições analíticas determinadas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). O limite de quantificação do método por CLAE 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, ou seja, que o método consegue diferenciar confiavelmente do ruído. 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; SOUZA, 2013). O limite de detecção obtido para este método foi de $0,032 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os resultados apresentados mostraram que o método desenvolvido é adequado para determinar o tamoxifeno nas nanopartículas, bem como nos estudos do perfil de dissolução e liberação *in vitro*, conforme proposto inicialmente.

4.1.2. ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

O método mais utilizado para análise de fármacos é a CLAE usando detector UV-vis, contudo, técnicas cromatográficas são demoradas, possuem custos mais elevados e exigem treinamento complexo. Assim, a espectrofotometria UV-Vis possui vantagens com relação à CLAE devido à sua simplicidade, confiabilidade e baixo custo, além do que permite medidas diretas para muitos fármacos (OLIVEIRA; SOUZA; MARCHETTI, 2010). Esta técnica foi validada para auxiliar na etapa de quantificação do fármaco durante o desenvolvimento das nanopartículas de PLA e PLA-PEG (cálculo da eficiência de encapsulação), de uma forma simples e rápida.

A varredura do tamoxifeno em metanol, realizada na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, possibilitou a determinação do melhor comprimento de onda. O λ escolhido foi 273 nm, pois ultrapassa a faixa crítica de absorção dos solventes e matérias-primas utilizados (Figura 9).

Figura 9. Espectro de varredura do tamoxifeno em metanol ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) na faixa de 190 a 390 nm, resolução de 1 nm.

4.1.2.1. Validação analítica

- Seletividade

Foi determinada pela comparação entre os resultados obtidos a partir de amostras da solução padrão em metanol e os obtidos a partir da adição do fármaco no meio contendo as nanopartículas inertes rompidas em acetonitrila. A curva analítica do tamoxifeno preparada em acetonitrila também foi comparada com a curva padrão em metanol. Os resultados obtidos demonstraram que a resposta não foi afetada pelas matérias-primas e solventes utilizados.

- Linearidade

A linearidade do método espectrofotométrico, determinada na faixa de concentração de $0,25$ a $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, demonstrou que as respostas obtidas foram diretamente proporcionais à concentração da amostra, sendo que o valor obtido foi de $0,9999$ (Figura 10).

Figura 10. Curva analítica do tamoxifeno em metanol, na faixa de concentração entre 0,25 e 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, realizada em espectrofotômetro ($\lambda = 273 \text{ nm}$).

Precisão e exatidão

Os resultados dos estudos de precisão intermediária (ou precisão inter-ensaios) e repetitividade (ou precisão intra-ensaio) mostraram que todos os valores de CV ficaram abaixo de 5% (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados obtidos na avaliação da precisão e exatidão intra e interensaio, expressas por CV (%) e Rec (%), respectivamente, para a análise do tamoxifeno base por espectrofotometria ($\lambda = 273 \text{ nm}$).

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,50		5,0		20,0	
Parâmetros	CV (%)	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)
Intraensaio (n = 10)	3,51	103,90	4,76	101,17	3,07	-103,10
Interensaios (n = 3/ 5 dias)	2,92	101,63	1,46	100,16	0,91	103,07

- Faixa de aplicação

Considerando os resultados obtidos na avaliação de linearidade, precisão e exatidão, bem como a aplicação do método, determinou-se como faixa de aplicação o intervalo compreendido de 0,5 a 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

- Robustez

As modificações realizadas para a análise da robustez não provocaram variações significativas nos resultados com relação à linearidade, precisão e à exatidão para o intervalo de concentração avaliado (Tabela 09). O método mostrou-se robusto frente parâmetros avaliados.

Tabela 9 - Resultados da linearidade (r), precisão (CV) e exatidão (Rec) obtidos no ensaio de robustez do método utilizando espectrofotometria ($\lambda = 273 \text{ nm}$; $n = 6$).

Concentração teórica (µg mL ⁻¹)			0,5		2,5		20,0	
Parâmetros		r	CV (%)	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)	CV (%)	Rec (%)
Temperatura	25°C	0,9994	3,33	103,32	3,26	99,13	2,34	98,38
	4°C	0,9993	3,85	98,03	2,99	97,29	1,47	97,45
Metanol (diferentes marcas)	I	0,9994	3,33	103,32	3,26	99,13	2,34	98,38
	II	0,9989	2,97	101,86	1,99	98,07	1,30	101,22
Analistas diferentes	A	0,9994	3,33	103,32	3,26	99,13	2,34	98,38
	B	0,9988	9,98	97,81	3,87	98,45	3,15	103,05

- Limite de quantificação e limite de detecção

O limite de quantificação do método por espectrofotometria UV-vis, considerando-se o menor valor para o qual foram obtidos precisão e exatidão, foi de $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já o limite de detecção obtido para este método, determinado matematicamente, foi de $0,0938 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Verificou-se que o método espectrofotométrico apresentou valores de limite de quantificação e detecção superiores que os apresentados pelo método por CLAE. Assim, o método cromatográfico é o mais indicado entre eles para avaliação de amostras provenientes de estudos de perfil de liberação, onde, especialmente nos primeiros tempos de coleta, a concentração do tamoxifeno pode ser bastante reduzida. Entretanto, para a avaliação da eficiência de encapsulação, onde o tamoxifeno encontra-se em concentrações mais elevadas na amostra, o método de espectrofotometria pode ser empregado com o mesmo grau de confiança e

eficiência que o método por CLAE, permitindo a obtenção de resultados mais rapidamente e com custo reduzido.

4.2. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA E PLA-PEG

Na escolha do processo de micro/nanoencapsulação devem ser considerados fatores que contribuam para o sucesso do sistema, tais como alta eficiência de encapsulação e alto rendimento do processo (SOPPIMATH et al., 2001). Entretanto, a seleção de uma técnica depende essencialmente das características físico-químicas do fármaco e, além disso, a escolha do polímero é fundamental para uma encapsulação adequada (OLIVEIRA, 2009). Para a administração parenteral, a utilização de polímeros biodegradáveis é essencial (CHORNY et al., 2002; NECKEL; LEMOS-SENNA, 2005; OLIVEIRA, 2009).

Na nanoprecipitação, método introduzido por Fessi et al. (1989), a formação de partículas baseia-se na precipitação e solidificação subsequente do polímero na interface de um solvente e um não-solvente. Assim, o processo é, frequentemente, denominado deposição interfacial ou deslocamento do solvente. O polímero é dissolvido em um solvente orgânico (ou mistura de solventes) miscível em água e adicionado a uma solução aquosa, na qual o solvente orgânico é difundido. A formação das partículas é espontânea, pois o polímero precipita no meio aquoso. De acordo com Quintanar-Guerrero e colaboradores (1998), o efeito Marangoni é indicado para explicar o processo: o fluxo de solvente, difusão e tensões superficiais na interface de solvente orgânico e fase aquosa causam turbulências, que formam pequenas gotículas contendo o polímero. Posteriormente, como o solvente se difunde a partir das gotículas, o polímero precipita e o solvente orgânico é então evaporado. Tensoativos ou estabilizantes são bastante utilizados no processo para controlar o tamanho das gotículas e as propriedades de superfície ou, ainda, assegurar a estabilidade da dispersão de nanopartículas, especialmente durante os estágios iniciais da precipitação (HIRSJÄRVI, 2008). Além de eficaz, este processo, comparado ao de emulsificação/evaporação do solvente, bastante utilizado na preparação de micro e nanopartículas, é eficaz, econômico, mais simples de ser

executado, mais fácil de ser transposto para a escala industrial e os solventes utilizados possuem menor toxicidade. O tamanho das nanopartículas preparadas por nanoprecipitação varia normalmente de 100 a 500 nm (FESSI et al., 1989; HIRSJÄRVI, 2008; LEGRAND et al., 2007). O tamanho das partículas deve ser rigorosamente controlado em formulações destinadas a administração endovenosa, mantendo-se na faixa submicrônica para evitar a oclusão dos capilares, pois o diâmetro estimado dos menores capilares sanguíneos é de 4 - 7 μm . Neste caso, dada a reduzida dimensão requerida para as partículas, a esterilização pode ser convenientemente realizada por meio de filtração esterilizante (CHORNY et al., 2002).

As formulações preliminares foram preparadas sem o fármaco, para verificar a influência do volume do solvente orgânico (acetona) em relação ao da solução aquosa e também à quantidade do polímero utilizado (PLA) na formação das nanopartículas. Para as formulações utilizando o PLA, a adição de tensoativo (poloxamer 407 0,5%) na fase aquosa foi necessária para evitar a formação de aglomerados de polímero na superfície da dispersão e, conseqüentemente, aumentar o rendimento do processo. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Formulações preliminares de nanopartículas de PLA isentas de fármaco preparadas pela técnica de nanoprecipitação, utilizando poloxamer 407 (0,5%) como estabilizante.

Quantidade de PLA (mg)	Volume do não solvente (mL)	Volume do solvente (mL)	Formação de grumos	Diâmetro médio (nm)*	IPd*
200	15	30	+++	219	0,085
100	15	30	+	163	0,108
100	15	40	-	158	0,114
100	20	30	-	225	0,227
100	20	40	-	90,1	0,192
100	19+1 ^(a)	40	-	144	0,091
200	20	40	+++	214	0,351
100	20	40 ^(b)	+++++	-	1,000

Legenda: Não solvente = fase orgânica composta de acetona /Solvente = fase aquosa contendo poloxamer 407 0,5% / (a) 19 mL acetona + 1mL diclorometano / (b) Água sem adição de tensoativo.

*Após filtração.

Como pode ser observado, as melhores formulações com relação ao diâmetro médio pretendido (< 200 nm) e a não formação de grumos foram obtidas utilizando-se a concentração de $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de polímero na fase orgânica ($100 \text{ mg}/20 \text{ mL}$) e a proporção de 1:2 (v/v) de acetona/água. Esta mesma proporção também foi utilizada com sucesso por Fessi et al. (1998) e Zili, Sfar e Fessi. (2005) na preparação de nanocápsulas de PLA e poli- ϵ -caprolactona, respectivamente. Tong et al. (2011) avaliaram o efeito do solvente sobre a formação de nanopartículas de PLA contendo paclitaxel, utilizando a água como não solvente. As nanopartículas obtidas tiveram tamanho médio inferior a 200 nm. A utilização da acetona foi vantajosa pela rápida remoção por evaporação, devido à sua volatilidade, além de ser mais adequada para a preparação de nanopartículas em maior escala.

Em seguida, foram preparadas formulações de nanopartículas de PLA e de PLA-PEG contendo tamoxifeno, buscando a obtenção de partículas esféricas, regulares, não agregadas, com distribuição de tamanho médio inferior a 200 nm e elevada taxa de encapsulação do fármaco.

4.2.1. OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA, DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO, RENDIMENTO DO PROCESSO E ANÁLISE DO TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS

Para as formulações utilizando o PLA, a adição de tensoativo na fase aquosa foi fundamental para evitar a formação de aglomerados de polímero na superfície da dispersão, bem como para alcançar uma melhor eficiência de encapsulação. A utilização de tensoativos em uma formulação de nanopartículas impede a agregação após o preparo e durante o armazenamento por promoverem a estabilização física e/ou química da suspensão (SANTOS, 2011). As formulações iniciais contendo o fármaco foram preparadas utilizando o poloxamer 407 como estabilizante, variando de $1,25$ a $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$. A maior eficiência de encapsulação (50,15%) foi obtida para a formulação PLA-07 quando utilizado na concentração de $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ e proporção fármaco/polímero (1:20). Em seguida, foi testado o poloxamer 188 nas mesmas concentrações e as formulações apresentaram baixa taxa de encapsulação do

fármaco (máxima de 27,5% utilizando 5,0 mg mL⁻¹ e proporção fármaco/polímero (1:20) (PLA-13) (Tabela 11).

Apesar da maioria das nanopartículas de fármacos lipofílicos obtidas por nanoprecipitação resultarem em uma elevada eficiência de encapsulação, alguns trabalhos relatam uma baixa encapsulação do tamoxifeno. Nos estudos de Memisoglu-Bilensoy et al. (2005), a porcentagem de tamoxifeno em nanopartículas de β -CDC6 (β -ciclodextrina anfifílica modificada) variou de 29 a 47% e não houve diferença significativa entre nanocápsulas e nanoesferas. Chawla e Amiji (2002) obtiveram encapsulação máxima de 64% para nanopartículas preparadas com poli(ϵ -caprolactona), utilizando proporção de (1:20) fármaco/polímero e poloxamer 188 como estabilizante.

Diante da baixa eficiência de encapsulação, o poloxamer foi substituído pelo polissorbato 80. Este tensoativo tem sido amplamente utilizado na preparação de nanopartículas para aplicações biomédicas com excelentes resultados (BLOUZA et al., 2006; DEEPAK et al., 2009; SOUZA, 2011; ZHANG; FENG, 2006; ZILI; SFAR; FESSI, 2005). Houve aumento na encapsulação do fármaco, alcançando valores superiores a 80% (formulações PLA-17 a PLA-20). A Tabela 11 mostra que o aumento na concentração do polissorbato 80 na fase aquosa foi acompanhado por um aumento significativo na eficiência de encapsulação do tamoxifeno até a concentração de 4,0 mg mL⁻¹. Acima desta concentração este aumento foi de apenas 2,7%. Por proporcionar eficiência de encapsulação do tamoxifeno mais elevada, o polissorbato 80 foi o estabilizante de escolha. Além disso, é aprovado pela FDA para uso em formas farmacêuticas de administração endovenosa (MARGULIS-GOSHEN; KAMYSHNY; MAGDASSI, 2009) e tem sido bastante utilizado em formulações para administração parenteral para melhorar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água (STRICKLEY, 2004).

Tabela 11 - Eficiência de encapsulação das nanopartículas de PLA contendo tamoxifeno preparadas pelo método de nanoprecipitação.

Formulação	Tensoativo	Proporção fármaco/ polímero (m/m)	Concentração do tensoativo (mg mL ⁻¹)	EE (%)
PLA-01	Poloxamer 407	1:10	5,0	22,0
PLA-02		1:20	5,0	27,7
PLA-03		1:5	5,0	4,8
PLA-04		1:10	2,5	27,7
PLA-05		1:10	1,25	45,4
PLA-06		1:5	1,25	7,6
PLA-07		1:20	1,25	50,15
PLA-08	Poloxamer 188	1:10	1,25	-
PLA-09		1:10	2,0	6,6
PLA-10		1:10	2,5	14,3
PLA-11		1:10	5,0	22,7
PLA-12		1:5	5,0	4,9
PLA-13		1:20	5,0	27,5
PLA-14	Polissorbato 80	1:10	1,0	35,4
PLA-15		1:10	2,0	60,7
PLA-16		1:5	2,0	19,7
PLA-17		1:20	2,0	86,7
PLA-18		1:10	4,0	80,2
PLA-19		1:20	4,0	85,9
PLA-20		1:10	5,0	82,4

Observou-se que aumentando a concentração de poloxamer 188 e polissorbato 80, a porcentagem do tamoxifeno nas nanopartículas também aumentou. Entretanto, o aumento da concentração do poloxamer 407 levou a uma diminuição da encapsulação do fármaco. Concentrações menores que 1,25 mg mL⁻¹ de poloxamer 407 e a não utilização de tensoativos também foram avaliadas, porém houve formação de agregados de PLA nas formulações. A proporção fármaco/polímero também influenciou a eficiência de encapsulação. Para todos os estabilizantes avaliados, a quantidade de fármaco encapsulada aumentou drasticamente quando diminuiu de 1:5 para 1:10 a proporção de tamoxifeno/PLA (Figura 11).

Figura 11. Gráfico representativo da relação entre a eficiência de encapsulação e a proporção tamoxifeno/PLA no processo de nanoprecipitação.

A etapa de separação e purificação foi o parâmetro que mais afetou o rendimento do processo de obtenção das nanopartículas. O processo de lavagem das nanopartículas com água ultrapurificada para a retirada do tensoativo, excesso de fármaco e polímero não se mostrou adequado quando utilizado isoladamente. Utilizando centrifugação com rotação de $477 \times g$ (4.500 rpm) por 1 hora, o rendimento foi menor que 10%. Já utilizando rotação de $20.800 \times g$ (14.000 rpm), o rendimento máximo obtido foi de, aproximadamente, 27%, muito baixo diante do custo elevado das formulações e do impacto ambiental que o descarte inadequado dos componentes da formulação e nanopartículas não recuperadas poderia gerar. A avaliação da eficiência de encapsulação também foi prejudicada pela centrifugação, pois o fármaco não encapsulado, insolúvel em água, também precipitou. Diante disso, optou-se pelo processo de filtração, onde foram testadas membranas com porosidade de 0,45 e 0,20 μm , alcançando rendimento de 87%. A etapa de filtração dispensou a centrifugação, pois o fármaco não encapsulado ficou retido nos filtros, enquanto as nanopartículas de interesse com diâmetro médio inferior a 200 nm atravessaram os poros da membrana filtrante. Estes dados foram comprovados experimentalmente, comparando a filtração com a combinação da purificação por centrifugação e filtração.

Após a administração de um medicamento, a forma farmacêutica deve liberar o fármaco a uma velocidade ideal. Para isso, diversos fatores devem ser ajustados incluindo o tamanho de partícula. A medida de uma partícula é baseada na forma hipoteticamente esférica, denominada diâmetro equivalente da partícula. A escolha do método de análise do tamanho de partícula deve ser determinada pelas propriedades das partículas e pelo tipo de informação que se procura sobre a distribuição. O tamanho das partículas obtidas depende da técnica de encapsulação bem como de algumas variáveis empregadas para o método utilizado. As formulações devem apresentar distribuição de tamanho com perfil monomodal, uma característica importante que indica uma distribuição uniforme do tamanho, com baixo IPd (AULTON, 2005).

O diâmetro médio das nanopartículas foi determinado pela técnica de espalhamento de luz, também conhecida por espectroscopia de correlação fotônica. Esta técnica é baseada no movimento browniano, ou seja, no movimento aleatório das partículas sob o impacto das moléculas do solvente sobre a sua superfície. A frequência e a amplitude deste movimento estão relacionadas com o tamanho da partícula e a viscosidade do solvente. Quanto menor a partícula, maior será a resposta, em função do aumento do movimento browniano (MALVERN, 2011).

A maioria das formulações preparadas com PLA apresentou distribuição de tamanho média inferior a 200 nm, o que confirma que a nanoprecipitação é uma técnica adequada para os propósitos deste trabalho. A Tabela 12 apresenta os valores de distribuição de tamanho com os respectivos índices de polidispersividade (IPd). Com base nestes resultados, observou-se que o tamanho de partícula aumentou, principalmente, com a diminuição na proporção fármaco/polímero, exceto quando foi utilizado o polissorbato 80 como estabilizante, onde o tamanho não foi afetado por este parâmetro. Um aumento na concentração do PLA também contribuiu para um aumento no tamanho das partículas. A Figura 12 mostra os gráficos de distribuição de tamanho das nanopartículas que obtiveram as melhores eficiências de encapsulação e diâmetro médio menor que 200 nm, para os diferentes estabilizantes avaliados.

Tabela 12 - Distribuição do tamanho de diferentes preparações de nanopartículas de PLA, representada pelo diâmetro médio (nm) e pelo índice de polidispersividade (IPd).

Formulação	Tensoativo	Proporção fármaco/ polímero (m/m)	Concentração do tensoativo (mg mL ⁻¹)	Diâmetro médio (nm)	IPd
PLA-01	Poloxamer 407	1:10	5,0	96,1	0,199
PLA-02		1:20	5,0	82,3	0,192
PLA-03		1:5	5,0	117	0,225
PLA-04		1:10	2,5	118	0,340
PLA-05		1:10	1,25	122	0,181
PLA-06		1:5	1,25	645	0,713
PLA-07		1:20	1,25	95,4	0,231
PLA-08	Poloxamer 188	1:10	1,25	-----	1
PLA-09		1:10	2,0	-----	1
PLA-10		1:10	2,5	239	0,170
PLA-11		1:10	5,0	141	0,200
PLA-12		1:5	5,0	164	0,324
PLA-13		1:20	5,0	138	0,298
PLA-14		1:10	1,0	215	0,329
PLA-15	Polissorbato 80	1:10	2,0	96,7	0,297
PLA-16		1:5	2,0	97,1	0,340
PLA-17		1:20	2,0	76,2	0,170
PLA-18		1:10	4,0	117	0,163
PLA-19		1:20	4,0	76,2	0,170
PLA-20		1:10	5,0	191	0,206

Figura 12. Representação gráfica da distribuição de tamanho das nanopartículas de PLA contendo tamoxifeno, proporção fármaco/polímero 1:20. (A) Formulação PLA-07 utilizando poloxamer 407 como estabilizante; diâmetro médio: 95,4 nm ($IPd = 0,231$); eficiência de encapsulação: 50,15%. (B) Formulação PLA-13 utilizando poloxamer 188 como estabilizante; diâmetro médio: 138 nm ($IPd = 0,298$); eficiência de encapsulação: 27,5%. (C) Formulação PLA-13 utilizando polissorbato 80 como estabilizante; diâmetro médio: 76,2 nm ($IPd = 0,231$); eficiência de encapsulação: 86,7%.

4.2.2. OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA-PEG, DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E ANÁLISE DO TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS

As nanopartículas à base de PLA-PEG foram preparadas inicialmente com o polímero PLA(1000)-PEG(750), utilizando o poloxamer 407 como estabilizante (1,25 e 2,5 mg mL⁻¹) e proporção de fármaco/polímero (1:10) (Tabela 12). Os resultados para a eficiência de encapsulação foram de 80,5 e 78,7%, respectivamente. Já com a utilização de fármaco/polímero na proporção de (1:20), a taxa de fármaco encapsulado aumentou para 89,0%. As formulações preparadas com polissorbato 80 alcançaram eficiência de encapsulação de 95,1% (PLA/PEG-08). Nanopartículas preparadas na ausência do estabilizante apresentaram menor eficiência de encapsulação do tamoxifeno (58,6%) e não formaram aglomerados de polímero. Isso pode ser explicado pela característica hidrofílica apresentada pela cadeia de PEG conjugada, a qual deixa o sistema mais estável e impede a precipitação do PLA antes que a nanopartícula se forme através da difusão do solvente orgânico para o meio aquoso (GOVENDER et al., 2000a,b). A Figura 13 ilustra a distribuição de tamanho de partículas das formulações PLA/PEG-04 e PLA/PEG-07.

Figura 13. Representação gráfica da distribuição de tamanho das nanopartículas de PLA-PEG contendo tamoxifeno, proporção fármaco/polímero 1:10. (A) Formulação PLA/PEG-04 utilizando poloxamer 407 como estabilizante; diâmetro médio: 503 nm ($IPd = 0,693$); eficiência de encapsulação: 89%. Pico 1: 15,9 nm (42,5%); pico 2: 111 nm (35,5%); pico 3: 459 nm (22,0%). (B) Formulação PLA/PEG-08 utilizando polissorbato 80 como estabilizante; eficiência de encapsulação: 95,1%. Pico 1: 19,2 nm (47,1%); pico 2: 363 nm (50,8%); pico 4: 5560 nm (2,1%).

Apesar de apresentarem elevada taxa de encapsulação do tamoxifeno, as nanopartículas preparadas com PLA(1000)-PEG(750) exibiram distribuição de tamanho de partícula bastante variável e não reprodutível, com alto índice de polidispersividade e perfil polimodal, ou seja, duas ou mais populações para todas as formulações (PLA/PEG-01 a PLA/PEG-07, Tabela 12).

Diante dos resultados da distribuição de tamanho de partícula, optou-se pela substituição deste polímero pelo PLA(5000)-PEG(1000). Este polímero possibilitou a obtenção de nanopartículas de tamanhos regulares, exibindo perfil monomodal (Figura 14). A eficiência de encapsulação do fármaco alcançou 100% utilizando

polissorbato 80 ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$), enquanto na ausência do estabilizante esta taxa foi de 78,9%.

Figura 14. Representação gráfica da distribuição de tamanho das nanopartículas de PLA-PEG contendo tamoxifeno, utilizando PLA(5000)-PEG(1000) e polissorbato 80 como estabilizante (formulação PLA/PEG-11), proporção fármaco/polímero (1:10). Diâmetro médio: 104 nm (IPd = 0,172); eficiência de encapsulação: 100,0%.

As características das nanopartículas de um copolímero dibloco, como o PLA-PEG, podem ser alteradas de acordo com as cadeias hidrofílicas e hidrofóbicas do polímero (BEN-SHABAT; KUMAR; DOMB, 2006). De acordo com Stolnik, Illum e Davis (1995), dependendo da composição e da massa molecular do PLA-PEG, podem ser obtidas tanto estruturas dinâmicas, como micelas, quanto estruturas sólidas como nanopartículas. Quando a cadeia de PEG é maior que a de PLA a formação de estruturas tipo micelas é favorecida. Para a obtenção de estruturas sólidas (nanopartículas) a porção hidrofóbica deve estar em maior proporção. Isso pode explicar a formação de partículas com populações de diferentes tamanhos nas preparações que foram utilizados o PLA(1000):PEG(750) onde a razão PLA/PEG de 1,33 permitiu tanto a formação de estruturas com diâmetro compatível com o de micelas, quanto de nanopartículas. Quando esta razão foi aumentada para 5, utilizando o PLA(5000)-PEG(1000), ocorreu somente a formação de partículas com distribuição de tamanho uniforme e diâmetro médio característico de nanopartículas.

4.2.3. ANÁLISE DO POTENCIAL ZETA

O potencial zeta reflete o potencial elétrico das superfícies das partículas, o qual é influenciado pela carga de seus componentes, como polímero, fármaco e tensoativos (COUVREUR et al., 2002). Valores mais elevados de potencial zeta (positivos ou negativos) indicam suspensões de nanopartículas mais estáveis devido à força de repulsão gerada entre as partículas, prevenindo a agregação (HANS; LOWMAN, 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003). A determinação do potencial zeta constitui uma importante estratégia na caracterização de suspensões de nanopartículas e partículas coloidais e está relacionada com a estabilidade das mesmas, podendo ter relação com a resposta biológica do fármaco encapsulado (SCHAFFAZICK et al., 2003). Não há uma técnica satisfatória para determinar a carga de superfície de nanopartículas em meio líquido. O mais comum é a determinação do potencial elétrico presente na camada difusa ao redor da superfície da partícula.

Nanopartículas possuem carga eletrostática superficial devido à presença de grupamentos químicos do polímero em sua superfície ou à adsorção de íons ou de outras moléculas ionizáveis do meio de dispersão aquoso, sendo que sua intensidade exerce influência na estabilidade física da preparação (FERREIRA, 2007; SCHAFFAZICK et al., 2003). Fosfolipídeos, poloxamers e polímeros são os principais componentes capazes de influenciar o potencial zeta das nanopartículas. Poliésteres, tais como o PLA, conferem potencial negativo à interface das mesmas devido à presença de grupos carboxílicos. Já os tensoativos não-iônicos como poloxamers e polissorbato tendem a reduzir o valor absoluto do potencial zeta (SCHAFFAZICK et al., 2003).

As nanopartículas preparadas com PLA e PLA-PEG apresentaram potencial zeta negativo para as formulações inertes. Entretanto, valores positivos foram observados para as mesmas formulações contendo o tamoxifeno (Tabela 13). A forte carga residual positiva na superfície das nanopartículas contendo tamoxifeno pode ser explicada pela localização de fármaco na superfície. Como o tamoxifeno é uma base fraca (pK_a 8,85) era esperado que o fármaco estivesse carregado positivamente na suspensão de nanopartículas (CHAWLA; AMIJI, 2002), a qual apresenta pH ácido. Resultados semelhantes também foram reportados por alguns

outros trabalhos. Shenoy e Amiji (2005) encontraram potencial zeta positivo em suspensões de nanopartículas de PEO-PPO-PEO (óxido de polietileno - óxido de polipropileno - óxido de polietileno) contendo tamoxifeno (+19,7 e +23,3 mV), utilizando o poloxamer 188 como estabilizante, enquanto as nanopartículas controle apresentaram potencial zeta negativo (-17,9 e -27,7 mV). Em outro trabalho, nanopartículas de poli(ε)-caprolactona com adsorção ou não de PEO apresentaram carga superficial negativa, porém, a encapsulação do tamoxifeno modificou a carga superficial para positiva (CHAWLA; AMIJI, 2002). Nanoesferas e nanocápsulas de β-CDC6 (β-ciclodextrina anfifílica) preparadas por nanoprecipitação também obtiveram resultados semelhantes, quanto à inversão de carga, utilizando citrato de tamoxifeno. Os valores do potencial zeta para as nanocápsulas e nanoesferas inertes variaram entre -10 a +10 mV. Contudo, quando fármaco foi incorporado às nanopartículas os valores variaram entre +12 a +16 mV (MEMISOGLU-BILENSOY et al., 2005). Carga superficial positiva é desejável, pois promove a interação das nanopartículas com as células, aumentando a velocidade e a extensão de internalização (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; SHENOY; AMIJI, 2005).

Tabela 13 - Potencial zeta das nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo ou não tamoxifeno, preparadas utilizando-se diferentes estabilizantes.

Formulação	Potencial Zeta (mV) ± D.P.
Nps PLA inertes	-33,6 ± 9,8
Nps PLA (poloxamer 407) contendo tamoxifeno	+30,9 ± 7,6
Nps PLA (poloxamer 188) contendo tamoxifeno	+34,6 ± 5,2
Nps PLA (polissorbato 80) contendo tamoxifeno	+27,8 ± 6,0
Nps PLA(1000)-PEG(750) inertes	-22,1 ± 7,3
Nps PLA(1000)-PEG(750) (poloxamer 407) contendo tamoxifeno	+22,1 ± 7,3
Nps PLA(1000)-PEG(750) (polissorbato 80) contendo tamoxifeno	+10,5 ± 5,8
Nps PLA(1000)-PEG(750) contendo tamoxifeno	+20,2 ± 4,5
Nps PLA(5000)-PEG(1000) (polissorbato 80) contendo tamoxifeno	+32,0 ± 4,5

Nps = nanopartículas / D.P.= desvio padrão

4.2.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a obtenção de informações estruturais e químicas de diversas amostras. Esta técnica consiste em um sistema pelo qual um feixe de elétrons é emitido por uma fonte, geralmente um filamento de tungstênio, sendo colimado por lentes eletromagnéticas para um ponto ou região da amostra (O'CONNORS; SEXTON, 1992). O revestimento da amostra com ouro, por meio de um processo de aspersão conhecido como metalização, originando um filme com alguns nanômetros de espessura, é necessário para conferir característica condutora ao material analisado (AUTON, 2005).

Em um processo espontâneo de formação de nanopartículas, como a nanoprecipitação, o tamanho de partícula depende de uma ação combinada entre variáveis como a viscosidade da fase orgânica (polímero), estabilizantes, propriedades do solvente e propriedades do polímero (massa molecular, capacidade de precipitar e cristalizar), etc. (HYVÖNEN et al., 2005). No processo de nanoprecipitação, quando a fase interna (contendo o fármaco, o polímero e o solvente miscível na fase externa) é adicionada à fase externa (água e estabilizante), pequenas gotículas são formadas de forma espontânea (FESSI et al., 1989; HYVÖNEN et al., 2005). O solvente se difunde para a fase aquosa e evapora, originando as nanopartículas. Macroscopicamente, o tamoxifeno adquirido apresentava-se na forma de pó fino, mas microscopicamente pode-se observar cristais grosseiros insolúveis em água ($< 0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$), com tamanho muito maior e variável do que as nanopartículas obtidas por nanoprecipitação. Experimentalmente, através da MEV, estes dados foram comprovados. A Figura 15 apresenta fotomicrografias do tamoxifeno não encapsulado, nanopartículas de PLA e de PLA(5000)-PEG(1000) contendo tamoxifeno. As imagens mostram nanopartículas esféricas, com superfície regular e não agregadas. Não foram observados cristais do fármaco no exterior das mesmas.

(A)

(B)

(C)

Figura 15. Fotomicrografias de (A) tamoxifeno não encapsulado; aumento de 150 x e 1.500 x (20 KV); (B) nanopartículas de PLA (PLA-19); aumento de 25.000 x e 70.000 x (20 KV); (C) nanopartículas de PLA(5000)-PEG(1000) contendo tamoxifeno (PLA/PEG-11); aumento de 10.000 x e 30.000 x (20 KV).

4.2.5. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (IV-TF)

A IV-TF 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 presentes nas formulações foram analisados separadamente, além das formulações contendo ou não tamoxifeno. Os resultados (Figura 17) demonstram que os espectros de absorção de luz na região do infravermelho referentes às formulações correspondem à sobreposição dos espectros de seus componentes, sugerindo não ter havido interações ou reações.

A molécula do tamoxifeno (Figura 1) possui poucas possibilidades de interação, pois não apresenta grupamentos capazes de realizar interações fortes, tais como pontes de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Sua molécula 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. Além disso, ainda possui um grupamento amina trissustituído de baixa reatividade. A molécula de tamoxifeno encontra-se encapsulada nas nanopartículas, protegida pela porção apolar de seus constituintes, reduzindo ainda mais as possibilidades de interação molecular. Pode-se observar nos espectros, que para as nanopartículas contendo o fármaco, predomina a banda localizada em torno de 3300 cm^{-1} , referente à vibração da ligação O-H. Destaca-se, por outro lado, que as bandas relativas ao tamoxifeno são fracamente identificáveis na formulação, em função da reduzida porcentagem de fármaco.

Devido à baixa concentração do tamoxifeno nas nanopartículas de todas as formulações e composição qualitativa equivalente, os espectros apresentam as mesmas bandas de absorção, como verificado.

Figura 16. Espectros de absorção no infravermelho das nanopartículas de PLA contendo tamoxifeno, formulação: (A) PLA-11, (B) PLA-05, (C) PLA-18

4.2.6. CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC)

Os métodos termoanalíticos, tais como DSC, têm sido bastante utilizados para a investigação de interações entre fármacos e polímeros em sistemas nanoparticulados. Com a utilização do DSC, é possível obter informações sobre a morfologia do polímero cristalino, bem como o estado de dispersão sólida ou molecular do fármaco associado a estes sistemas poliméricos. Esta técnica também tem sido utilizada para analisar interações intermoleculares entre fármacos e adjuvantes e investigar reações químicas, como polimerização, despolimerização e degradação (SCHAFFAZICK, 2003).

A caracterização do estado físico do tamoxifeno associado às nanopartículas de PLA indicou que o fármaco está disperso molecularmente na matriz polimérica. De acordo a Figura 16, o tamoxifeno não encapsulado apresentou pico endotérmico que corresponde ao ponto de fusão (97°C), que indica sua natureza cristalina. O PLA exibiu um evento endotérmico (55°C) característico de pico de relaxação que segue a transição vítrea. A curva das nanopartículas contendo o fármaco mostra o evento de entalpia de relaxação das nanopartículas inertes (52°C). Entretanto, a presença do estabilizante nas formulações avaliadas foi responsável pelo pequeno deslocamento do pico de entalpia das nanopartículas inertes, em relação ao polímero (PLA). A análise por DSC não detectou estrutura cristalina do fármaco encapsulado, pois apresentou ausência do pico endotérmico do tamoxifeno. O fármaco pode ter sido incorporado às nanopartículas na forma amorfa ou cristalina desordenada na presença do tensoativo e o processo de encapsulação não afetou a estrutura do polímero, já que a matriz apresenta o mesmo valor para a entalpia de relaxação. Resultados semelhantes com outros fármacos hidrofóbicos encapsulado utilizando PLA ou PLGA foram obtidos por outros autores (MAINARDES; GREMIÃO; EVANGELISTA, 2006; VENIER-JULIENNE; BENOIT, 1996). Análises complementares por espectroscopia no infravermelho sugeriram ausência de reações químicas entre o tamoxifeno e o polímero.

Figura 17. Curvas obtidas na análise térmica por DSC das nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo tamoxifeno: (A) PLA-11, (B) PLA-05, (C) PLA-18 e (D) PLA/PEG-11.

Os resultados das análises utilizando DSC mostraram os eventos relacionados à fusão do fármaco e à temperatura de transição vítrea dos polímeros utilizados. O pico do fármaco não foi evidenciado nas nanopartículas devido ao fato deste apresentar-se disperso na matriz polimérica e em baixa concentração (Figura 16). O deslocamento relativo à transição vítrea pode ser devido à interação fármaco/polímero. Entretanto, devido à baixa reatividade do fármaco (conforme descrito no item 4.2.5.), a ocorrência de interações é pouco provável.

4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO TAMOXIFENO

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

A avaliação do coeficiente de partilha permite determinar a lipofilicidade de um fármaco. O propósito inicial foi realizar o estudo de partilha utilizando tampão fosfato pH 7,4 como fase aquosa, porém a solubilidade neste meio se mostrou limitada ($0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$) comparada à solubilidade em água a 37°C ($0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados obtidos para o $K_{O/A}$ (Tabela 14) indicam que o tamoxifeno migrou totalmente para o meio orgânico, não sendo detectado na fase aquosa.

Tabela 14 - Coeficiente de partilha $K_{O/A}$ do tamoxifeno

Coeficiente de partilha	C_1 ($\mu\text{g/mL}$)	C_2 ($\mu\text{g/mL}$)	K	Log K
$K_{O/A}$	$0,50 \pm 0,05$	0,0	∞	-

$K_{O/A}$ = coeficientes de partilha óleo/água a 37°C

C_1 = concentração tamoxifeno base livre antes da partilha

C_2 = concentração do tamoxifeno base livre após a partilha

4.3.2. SOLUBILIDADE DO TAMOXIFENO

O tamoxifeno é praticamente insolúvel em água (< 0,01% a 20°C). Por isso, comercialmente é convertido no sal citrato como uma forma de aumentar a solubilidade em água e sua eficácia (BUCHANAN et al., 2007). Os resultados dos testes de solubilidade em água mostraram que o método por CLAE não apresentou sensibilidade suficiente para a quantificação do fármaco, mostrando ser menor que 0,20 µg mL⁻¹. O resultado dos testes de solubilidade do tamoxifeno em solução tampão e tampão com a adição de tensoativos está apresentado na Tabela 15, onde fica evidente que o meio de dissolução ideal para os futuros ensaios *in vitro* do perfil de liberação é o tampão fosfato de sódio pH 7,4 com a adição de lauril sulfato de sódio 0,5%.

Tabela 15 - Solubilidade do tamoxifeno em diversas soluções tampão aquosas

Solução tampão	Tensoativo	Solubilidade 24 h (µg mL ⁻¹)	Solubilidade 48 h (µg mL ⁻¹)	CV (%)
PBS pH 7,4	-	< 0,25	< 0,25	-
PBS pH 7,4	Poloxamer 407 0,5%	9,50	9,99	2,50
PBS pH 7,4	Polissorbato 80 0,5%	114,90	99,05	7,41
Fosfato de sódio pH 7,4	-	< 0,25	< 0,25	-
Fosfato de sódio pH 7,4	LSS 0,5%	200,97	214,75	3,31

Legenda: PBS= tampão fosfato salino / LSS= lauril sulfato de sódio

4.4. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Os ensaios de liberação *in vitro* são de grande importância no desenvolvimento de medicamentos, pois fornecem informações relevantes para a execução de etapas posteriores, como os estudos pré-clínicos, reduzindo o número de amostras necessárias para os testes *in vivo* (OLIVEIRA, 2009; SOPPIMATH et al., 2001; GORDON et al., 1995). O delineamento dos experimentos deve ser criterioso para que possa garantir a veracidade dos resultados obtidos. Deverão ser considerados a temperatura, o sistema de agitação para homogeneização do meio,

o próprio meio de dissolução, levando-se em consideração o pH e a isotonicidade (OLIVEIRA, 2009; RICCI-JÚNIOR et al., 2005).

Na utilização de sistemas estáticos, o método exige, ainda, que as condições *sink* sejam atendidas, ou seja, que a concentração do fármaco liberado no meio de dissolução não exceda 10% da sua concentração de saturação no meio selecionado (OLIVEIRA, 2009; RICCI-JÚNIOR et al., 2005; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995). Devido à alta lipofilicidade do tamoxifeno e sua limitada solubilidade em meio aquoso, a adição de promotores de solubilidade ao meio de dissolução foi necessária para garantir esta condição (WASHINGTON, 1990). A utilização de tensoativos é uma estratégia bastante empregada para a viabilidade destes estudos e sua escolha é uma etapa importante (AMIDON et al., 1995). Neste estudo, dentre os tensoativos avaliados, o que se mostrou mais adequado foi o lauril sulfato de sódio (LSS) na concentração de 0,5%, por melhor solubilizar o tamoxifeno ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$). O lauril sulfato de sódio também foi utilizado por Chawla e Amiji (2002) no estudo de liberação do tamoxifeno a partir de nanopartículas de poli-(ϵ)-caprolactona, por melhorar a solubilidade deste fármaco e, ainda, prevenir sua adsorção nas superfícies do sistema utilizado.

Muitos métodos têm sido descritos para avaliação do perfil de liberação *in vitro* de fármacos a partir de nanopartículas e outros sistemas baseados em nanotecnologia. Entretanto, os principais inconvenientes são provenientes do tamanho reduzido destes carreadores que dificultam a separação entre fármaco liberado e as nanopartículas. Dentre os métodos experimentais disponíveis para suspensões coloidais, a utilização de membrana de diálise mostra-se adequada para separar rápida e completamente as nanopartículas do meio de liberação (LEO et al., 2004; SOPPIMATH et al., 2001). No entanto, este é um método indireto em que o fármaco é determinado no compartimento externo enquanto é liberado no interior da membrana. A taxa de liberação do fármaco e sua migração para o meio de dissolução são governadas pelo coeficiente de partição do fármaco entre o polímero e o meio aquoso, bem como pela difusão do fármaco através da membrana (LEO et al., 2004; WASHINGTON, 1989; 1990). Por essas razões, a avaliação do fármaco não encapsulado torna-se importante para determinar a influência da membrana.

Neste estudo, foi utilizado um aparato adaptado baseado no trabalho de Praça et al. (2008), visando avaliar e minimizar os efeitos do mesmo no perfil de liberação do

tamoxifeno, bem como verificar o comportamento de dissolução do fármaco no meio de dissolução. O aparato foi composto por um cilindro de PVC envolto por uma membrana de diálise de acetato de celulose em uma das extremidades contendo a formulação e fixado em haste do aparato de cesta pela outra extremidade (Figura 4). Este aparato também foi utilizado por Souza (2013) para avaliação do perfil de liberação do tamoxifeno encapsulado em micelas peguilladas.

A difusão do fármaco não encapsulado foi lenta e incompleta no período avaliado (144 horas), cujo resultado está representado graficamente na Figura 18. O perfil de dissolução do tamoxifeno não encapsulado indicou que apenas 35% do fármaco foram difundidos em 12 horas, alcançando 53% em 24 horas e 70% em 144 horas. A dissolução lenta do fármaco livre pode ser atribuída à sua baixa solubilidade no meio de dissolução.

O perfil de liberação *in vitro* do tamoxifeno a partir das nanopartículas de PLA, usando polissorbato 80 como estabilizante (formulação PLA-18), apresentou característica sustentada e alcançou 50% em 180 horas, tendo sido totalmente liberado após 288 horas. Já as nanopartículas de PLA(5000)-PEG(1000) (formulação PLA/PEG-11) liberaram apenas 16,9% do fármaco após 216 horas (Figura 18).

Figura 18. Perfil de liberação *in vitro* do tamoxifeno a partir de nanopartículas de PLA e nanopartículas de PLA(5000)-PEG(1000), proporção fármaco/polímero (1:10), e dissolução do tamoxifeno não encapsulado.

De modo geral, a liberação do fármaco a partir das nanopartículas foi mais lenta comparada ao tamoxifeno não encapsulado, evidenciando a vantagem da incorporação do fármaco em nanopartículas compostas por PLA e PLA-PEG.

A liberação lenta e incompleta do fármaco observada para as nanopartículas de PLA-PEG pode ser explicada pela afinidade do fármaco lipofílico pelo PLA situado no interior da nanopartícula. O PEG organizado na superfície da nanopartícula forma uma camada hidrofílica que dificulta a liberação do fármaco para o meio de dissolução. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Souza (2013), onde o perfil de liberação de sistemas micelares de longo tempo de circulação contendo tamoxifeno, preparados à base do fosfolípido DSPE-PEG(2000) e do derivado de vitamina E d-alfa-tocoferil polietilenoglicol 1000 succinato (TPGS), demonstrou que apenas cerca de 30% do fármaco foi liberado após 168 horas. O estudo sugere que a baixa taxa de liberação *in vitro* poderia ser um indício de que a maior parte do fármaco se manteria no interior da estrutura micelar durante o período de permanência na corrente sanguínea, favorecendo a chegada do sistema íntegro ao sítio tumoral.

Deve-se ressaltar que, idealmente, no tratamento do câncer localizado com o uso de sistemas de liberação, deseja-se que o fármaco mantenha-se encapsulado durante a circulação plasmática e seja liberado na região tumoral pelo efeito do aumento da permeabilidade vascular (EPR) observado em tumores (YOSHIZAWA et al., 2011), por isso, as nanopartículas de PLA-PEG desenvolvidas neste trabalho podem ser promissoras para aplicação *in vivo*. Além disso, o conceito de utilizar o recobrimento de nanocarreadores com PEG é amplamente descrito por suas vantagens, principalmente por aumentar o tempo de circulação de fármacos (YANG et al., 2007; SOUZA, 2013).

4.5. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DO TAMOXIFENO E N-DESMETILTAMOXIFENO A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS, EM MODELO ANIMAL

As formulações PLA-18 e PLA/PEG-11 inertes e contendo o fármaco foram administradas nos animais distribuídos em quatro grupos experimentais conforme

Tabela 5 (item 3.8) e nenhuma alteração foi observada com relação ao comportamento dos mesmos, no período avaliado.

A escolha do anestésico para a coleta de sangue por via intracardiaca foi baseada na via de administração não invasiva, inalatória, e na possibilidade da rápida recuperação do animal, alcançando efeito anestésico imediato e com rápida eliminação (SOUZA, 2013). O isoflurano possibilitou a rápida recuperação dos animais, necessária para este estudo, devido aos curtos intervalos de coleta. Este é um fármaco habitualmente utilizado de forma exclusiva ou associado a outros fármacos para alcançar a anestesia geral e considerado seguro. Possui baixa taxa de biotransformação (0,2%), apresentando, assim, baixa toxicidade hepática e renal. Esta característica é importante, especialmente para ser utilizado para a avaliação do tamoxifeno, que sofre metabolização no fígado. Além disso, raramente provoca arritmia cardíaca (TARDELLI et al., 1988; SOUZA, 2013). Neste estudo, observou-se que o isoflurano promoveu um aumento da frequência cardíaca nos animais anestesiados, facilitando as coletas de sangue, possibilitando melhor recuperação, uma vez que tornou o processo mais rápido e reduziu o tempo que os animais permaneceram anestesiados.

4.5.1. PROCESSO DE PURIFICAÇÃO/EXTRAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO TAMOXIFENO E N-DESMETILTAMOXIFENO EM PLASMA

De acordo com a ANVISA, sempre que possível, para a determinação de fármacos em matrizes biológicas, como o plasma, deve-se utilizar a CLAE com padronização interna (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012).

Para a determinação de fármacos em matrizes biológicas complexas são necessárias etapas prévias de remoção de impurezas por processo químico. Impurezas presentes nestas amostras podem interferir na análise do fármaco, além de causar danos à coluna cromatográfica e ao equipamento. Neste estudo, a precipitação de proteínas foi realizada com metanol. A recuperação foi avaliada através da comparação dos resultados obtidos para a concentração do tamoxifeno ou N-desmetiltamoxifeno com as concentrações obtidas da curva padrão em

metanol, alcançando 60 a 65%. A acetonitrila também foi avaliada para a precipitação de proteínas e eliminação de impurezas das amostras com o objetivo de aumentar a taxa de recuperação. Apesar do aumento de até 10% do fármaco recuperado, houve também extração de contaminantes que prejudicaram as análises por apresentarem tempo de eluição próximos aos dos analitos.

Os tempos de retenção foram de 12,7 minutos para o tamoxifeno e 10 minutos para o N-desmetiltamoxifeno. O tempo de retenção do padrão interno foi de 4,8 minutos (Figura 19). As curvas analíticas, apresentadas na Figura 20 para o tamoxifeno e N-desmetiltamoxifeno, mostram que o método apresentou linearidade ($r > 0,99$), considerando as áreas do analito/padrão interno. O limite de quantificação foi de $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 19. Cromatograma do tamoxifeno ($5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (C) e N-desmetiltamoxifeno ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) (B), após etapa de extração em plasma, utilizando flurazepam como padrão interno (A).

Figura 20. Curvas analíticas do tamoxifeno (A) e N-desmetiltamoxifeno (B), na faixa de 0,25 a 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, após processo de extração em plasma, obtidas por CLAE.

Analisando as amostras coletadas, não foi possível detectar o tamoxifeno e N-desmetiltamoxifeno no período analisado. As nanopartículas podem ter se acumulado nos órgãos antes do tempo da primeira coleta (30 minutos), e assim a baixa concentração do tamoxifeno no plasma pode não ter sido detectada devido à sensibilidade do método (0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e à recuperação da amostra. O rápido decréscimo da concentração plasmática do tamoxifeno pode ser explicado pela migração para os órgãos em um período curto devido ao tamanho das nanopartículas. Neste caso, uma redução do tempo de circulação das

nanopartículas no plasma poderia contribuir para reduzir os efeitos colaterais sistêmicos severos (SOUZA, 2013). Kim et al. (2001) avaliaram micelas poliméricas contendo paclitaxel e observaram que a AUC da formulação na dose de 50 mg kg⁻¹ foi semelhante à da formulação convencional administrada na dose de 20 mg kg⁻¹. Embora a concentração plasmática da formulação micelar tenha sido inferior à da forma convencional, a concentração do paclitaxel nanoencapsulado em vários órgãos foi superior à do fármaco livre (SOUZA, 2013). O PEG é considerado o padrão-ouro para a estabilização estérica das nanopartículas, porém, estudos com micelas e lipossomas peguilados demonstram ligação destes nanocarreadores às proteínas plasmáticas e perda da propriedade furtiva em quantidade baixa de lipídeo e/ou após administração repetida (CARSTENS, 2007; MOGHIMI; SZE BENI, 2003). Lipka et al. (2010) investigaram a biocinética de nanopartículas peguiladas de ouro comparada a de nanopartículas convencionais, após a administração intravenosa e análise após 1 e 24 horas. Foi observado longo tempo de circulação sanguínea quando foi utilizado PEG de cadeia longa 10 KDa. As nanopartículas peguiladas compostas por cadeia PEG curta (750 Da) e as nanopartículas convencionais acumularam rapidamente nos tecidos e órgãos, principalmente no fígado e baço.

5. CONCLUSÕES

Com base nos métodos empregados e nos resultados obtidos neste estudo, concluiu-se que:

- Os métodos para quantificação do tamoxifeno nas nanopartículas de PLA e PLA-PEG, utilizando CLAE e espectrofotometria UV-vis, e avaliação *in vitro* do perfil de liberação, utilizando CLAE, foram desenvolvidos e validados com sucesso. Ambos os métodos apresentaram sensibilidade semelhante, linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez dentro dos parâmetros avaliados, em acordo com documentos oficiais da ANVISA e ICH.
- A técnica de nanoprecipitação se mostrou adequada para a preparação de nanopartículas com tamanho inferior a 200 nm. Dentre os estabilizantes estudados, o polissorbato 80 foi escolhido por proporcionar maior eficiência de encapsulação. As nanopartículas obtidas foram separadas adequadamente do fármaco não encapsulado por processo de filtração através de membrana com porosidade de 0,22 μm . O processo de separação por centrifugação não se mostrou adequado, pois não foi capaz de separar o fármaco não encapsulado das nanopartículas, gerando erros nos resultados de eficiência de encapsulação. Nanopartículas preparadas com PLA(1000)-PEG(750), apesar de apresentarem alta taxa de eficiência de encapsulação, apresentaram perfil polimodal na distribuição de tamanho de partículas, com alto índice de polidispersividade. Este problema foi resolvido com a substituição do polímero pelo PLA(5000)-PEG(1000), com maior proporção da parte hidrofóbica. As fotomicrografias obtidas por MEV mostraram partículas esféricas e regulares com diâmetro médio compatível com os resultados apresentados por light scattering. O potencial zeta apresentou valores elevados e positivos para as nanopartículas contendo tamoxifeno, desejável para evitar a agregação. Na por DSC, não foi possível observar o pico endotérmico do tamoxifeno encapsulado, devido ao fato deste apresentar-se disperso na matriz polimérica e em baixa concentração. As análises complementares por IV-TF demonstraram que os espectros de absorção de luz

na região do IR referentes às formulações correspondem à sobreposição dos espectros de seus componentes, sugerindo não ter havido interações ou reações nas formulações PLA-05, PLA-11 e PLA-18.

- Os estudos *in vitro* do perfil de liberação do tamoxifeno evidenciaram que o fármaco foi totalmente liberado após 288 horas a partir de nanopartículas de PLA usando polissorbato 80 como estabilizante, diferentemente das nanopartículas preparadas com poloxamer, que apresentaram liberação do fármaco lenta e incompleta, atingindo platô de 20% em 120 horas. Já as nanopartículas de PLA(5000)-PEG(1000) liberaram apenas 16,9% do fármaco após 216 horas, sugerindo afinidade do fármaco lipofílico pela camada interna da partícula e, consequente, dificuldade de atravessar a camada hidrofílica de PEG que forma a camada externa das nanopartículas, ou seja, interações moleculares entre o fármaco e sua porção hidrofóbica, sugerindo uma maior capacidade de manter o tamoxifeno encapsulado até o momento que o sistema atinja o sítio alvo. A liberação do fármaco a partir das nanopartículas foi muito mais lenta comparada ao tamoxifeno não encapsulado, evidenciando a vantagem da incorporação do fármaco em nanopartículas compostas por PLA e PLA-PEG.
- Não foi possível detectar o fármaco e seu principal metabólito com o método bioanalítico utilizado (CLAE) no estudo de perfil de concentração plasmática do tamoxifeno em modelo animal. Isto sugere que a maior parte da formulação tenha extravasado rapidamente para os órgãos em virtude de suas dimensões reduzidas, e a cadeia curta de PEG utilizado (1 kDa).

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.

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, 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.pdf>. Acesso em: 06 jan. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE 899, 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 20 jan. 2010.

ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L.K.; FAROKHZAD, O.C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v.5, n.4, p. 505–515, 2008.

ALLAN, A.L.; VANTYGHM, S.A.; TUCK, A.B.; CHAMBERS, A.F. 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.

ALLEN JÚNIOR, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8 ed., Porto Alegre: Artmed, 2007. 776 p.

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. **What are the risk factors for breast cancer?** USA, 2009. Disponível em: <<http://www.cancer.org>>. Acesso em: 20 abr. 2013.

_____. USA, 2012. Disponível em: <<http://www.cancer.org>>. Acesso em: mar. 2012.

_____. USA, 2014. Disponível em: <<http://www.cancer.org>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

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.

ANDRÉO-FILHO, N.; OLIVEIRA, A.G. **Infarma**, São Paulo, v. 9, p. 18-21, 1999.

ASLAN, B.; OZPOLAT, B.; SOOD, A.K.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Nanotechnology in cancer therapy. **Journal of Drug Targeting**, v.21, n.10, p.904-913, 2013.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed., Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p.

BEN-SHABAT, S.; KUMAR, N.; DOMB, A.J. PEG-PLA Block Copolymer as Potential Drug Carrier: Preparation and Characterization. **Macromolecular Bioscience**, v.6, p. 1019-1025, 2006.

BETANCOURT, T.; DOIRON, A.; BRANNON-PEPPAS, L. Polymeric Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery. In: AMIJI, M.M. **Nanotechnology for Cancer Therapy**. Boca Raton: CRC Press -Taylor & Francis Group, 2006. cap. 12.

BLOUZA, I.L.; CHARCOSSET, C.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, v.325, n.1-2, p.124-131, 2006.

BOTTINI, P.B.; DAVANE, J.G.; CORRIGAN, I. Sustained absorption does not necessarily reduce the systemic availability of propranolol. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, 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: 05 jun. 2012.

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.

BRENTANI, M. M.; FELDMAN, J. Receptores Esteróidicos em Neoplasias Hormônio-Dependentes. In: ABRÃO, F. S. (Ed.). **Tratado de Oncologia Genital e Mamária**. São Paulo: Roca, 1995. cap. 9.

BRONISCHER, 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, mar. 2007. 206p.

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.

CARSTENS, M.G. Self-assembling PEG-oligoesters nanoparticle design for drug delivery. 2007. Tese – Dutch Utrecht University, Netherlands, 2007.

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

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(ϵ -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.

CHORNY, M.; FISHBEIN, I.; DANENBERG, H.D.; GOLOMB, G. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. **Journal of Controlled Release**, v. 83, p. 389-400, 2002.

COUVREUR, P. et al. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

DANCKWERTS, M.; FASSIHI, A. Implantable controlled release drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, 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.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura. Aplicações e preparação de amostras: Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60p.

DEEPAK, V.; PANDIAN, S.B.; KALISHWARALAL, K.; GURUNATHAN, S. Purification, immobilization, and characterization of nattokinase on PHB nanoparticles. **Bioresource Technology**, v.100, n. 24, p. 6644–6646, 2009.

DILNAWAZ, F. et al. Nanotechnology and Drug Delivery. In: Sattler, K.D. (Ed.) **Handbook of Nanophysics: Nanomedicine and Nanorobotics**. CRC Press, p. 27-1-27-19, 2010.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS. 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.

EGUSQUIAGUIRRE, S.P.; IGARTUA, M.; HERNÁNDEZ, R.M.; PEDRAZ, J.L. Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research. **Clinical and Translational Oncology**. v. 14, n.2, p. 83-93, 2012.

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.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA (FEBRAFARMA). **A Indústria Farmacêutica no Brasil**. Brasília, 2007, 2 ed. 25p.

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

FERRARI, M. Nanovector therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 343 – 346, 2005b.

FERREIRA, A.G. **Preparação, caracterização e avaliação da atividade *in vitro* antileucêmica de nanocápsulas de camptotecina convencionais e furtivas**. Dissertação (Mestrado em Farmácia), 2007 – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FREITAS, M.N. et al. Thermal analysis in the osmotic tablets pre-formulation studies. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, p. 905-911, 2007.

FREITAS, M.N.; MARCHETTI, J.M. Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, p. 201-211, 2005.

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: abr. 2009.

GORDON, L.A.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. 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.

GOVENDER, T. et al. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.199, p. 95-110, 2000.

GOVENDER, T. et al. PLA-PEG nanoparticles for site specific delivery: drug incorporation study. **Journal of Controlled Release**, v. 64, p. 318-319, 2000.

GOSS, P.E. 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.

GRAF, R. et al. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.16, p.215-223, 1995.

GRAF, R. et al. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.18, n.3-4, p.301-313, out. 2000.

GUTERRES, S.S. et al. Polymeric Nanocapsules for Drug Delivery. An Overview In: FANUN, M. (Ed.). **Colloids in Drug Delivery**, CRC Press, p.71-98, 2010.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Sciences**, v. 6, p. 319-327, 2002.

HEIDEL, J.D.; DAVIS, M.E. Clinical Developments in Nanotechnology for Cancer Therapy. **Pharmaceutical Research**. v.28, n. 2, p. 187-199, 2011.

HIRSJÄRVI, S. **Preparation and Characterization of Poly(Lactic Acid) Nanoparticles for Pharmaceutical Use**. *Dissertationes bioscientiarum molecularium Universitatis Helsingiensis in Viikki, 2/2008* - Division of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2008. 42 pp.

HNATYSZYN, J.H.; KOSSOVSKY, N.; GELMAN, A.; SPONLER, E. Drug delivery systems for the future. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 48, n. 5, p.247-254, 1994.

HOSKINS, J.M.; CAREY, L.A.; McLEOD, H.L. CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 576-586, 2009.

HYVÖNEN, S.; PELTONEN, L.; KARJALAINEN, M.; HIRVONEN, J. Effect of nanoprecipitation on the physicochemical properties of low molecular weight poly(l-lactic acid) nanoparticles loaded with salbutamol sulphate and beclomethasone dipropionate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, p.269-281, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2007. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=336>. Acesso em: 05 mar. 2009.

_____. **Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2009. 98 p. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>> Acesso em 01 jun. 2010.

_____. **Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 118 p. Disponível em: <http://portal.saude.sp.gov.br/resources/ses/erfil/gestor/homepage/estimativas-de-incidencia-de-cancer2012/estimativas_incidencia_cancer_2012.pdf> Acesso em 01 mar. 2014.

_____. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/>>. Acesso em 05 fev. 2014.

_____. **Tipos de Câncer: mama**. Rio de Janeiro: INCA, 2012. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em 15 ago. 2012.

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/DOQCGCRE8_03.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2013.

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

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

JEMAL, A. et al. Cancer Statistics, 2008. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 58, p.71-96, 2008.

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.

KIIM, 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.

KISSEL, T. et al. Microencapsulation techniques for parenteral depot systems and their application in the pharmaceutical industry. In: BENITA, S. **Microencapsulation: methods and industrial applications**. 2 ed., p. 98-122. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2006, 741p. cap. 14.

KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p.1-18, 2010.

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

LEGRAND, P. et al. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.344, p.33 – 43, 2007.

LEO, E.; BRINA, B.; FORNI, F.; VANDELLI, M.A. *In vitro* evaluation of PLA nanoparticles containing a lipophilic drug in water-soluble or insoluble form. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 133-141, 2004.

LI, C. et al. Complete regression of well-established tumors using a novel water-soluble poly(L-glutamic acid) – paclitaxel conjugate. **Cancer Research**, v. 58, p. 2404 – 2409, 1998.

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.; SCHATZ, J.B. **Pharmaceutical dosage forms: tablets**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 332-335, 559-45.

LIMA NETO, Q.A. et al. Estudo da relação estrutura-atividade quantitativa de dibenzoilmetanos α -substituídos quanto à atividade anticâncer da mama (linhagem celular MCF7). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.52, n.4, p.345-357, 2006.

LIPKA, J. et al. Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. **Biomaterials**, v.31, n.25, p.6574-6581, 2010.

LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LOPES, L.B. et al. Advance directives for hormone administration in replacement therapy and contraception. **Current Topics in Pharmacology**, v.8, n.2, p.335-351, 2003.

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. 317-323, 1996.

MACHADO, S.R.P. **Micropartículas de PLA contendo 17- β -estradiol: preparo, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo***. 2005. 142f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

MACHADO, S.R.P. et al. Preparation and characterization of D,L-PLA loaded 17- β -estradiol valerate by emulsion / evaporation methods. **Journal of Microencapsulation**, v.7, p. 1-11, 2008.

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

MAINARDES, R.M. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), 2007 – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.

MAINARDES, R.M.; GREMIÃO, M.P.D.; EVANGELISTA, R.C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 4, 2006.

MALVERN. Manual <<http://www.malvern.com/malvern/ondemand.nsf/id/SJES-8HMQ8M>> Acesso em 07 jun 2011.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

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.

MARGULIS-GOSHEN, K.; KAMYSHNY, A.; MAGDASSI, S. Applications of Surfactants in Pharmaceutical Dosage Forms. In: ZOLLER, U. **Handbook of Detergents, Part E: Applications (Surfactant Science)**, v.141, p. 455-468. CRC Press: Boca Raton, 2009. cap. 18, 504p.

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.

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

MATTOS, A.C. **Desenvolvimento tecnológico de nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo 5-fluorouracil, avaliação da citotoxicidade sobre células tumorais e farmacocinética pré-clínica**. Dissertação (Mestrado em Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia), 2013 - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

MEMISOGLU-BILENSOY, E. et al. Tamoxifen citrate loaded amphiphilic β -cyclodextrin nanoparticles: *In vitro* characterization and cytotoxicity. **Journal of Controlled Release**, v.104, p. 489-496, 2005.

MOGHIMI, S.M.; SZEBENI, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n.6, p.463-478, 2003.

MOSQUEIRA, V.C.F. et al. Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n.10, p. 1411-1419, 2001.

MRSNYER, R.J. Active Targeting Strategies in Cancer with a Focus on Potential Nanotechnology Applications. In: AMIJI, M.M. **Nanotechnology for Cancer Therapy**. Boca Raton: CRC Press -Taylor & Francis Group, 2006, 840p. Capítulo 3, p. 19-42.

NARASIMHAN, B.; PEPPAS, N.A. Molecular analysis of drug delivery systems controlled by dissolution of polymer carrier. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 86, n.3, p.297- 304, 1997.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What You Need To Know About™ Breast Cancer**, NIH Publication, n. 12-1556, 46p, 2012. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/breast/WYNTK_breast.pdf> Acesso em 20 jan. 2014.

NECKEL, G.L.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de nanocápsulas contendo camptotecina a partir de ácido poli (D,L-lático) e de copolímeros diblocos do ácido poli (D,L-lático) e polietilenoglicol. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.24, n.4, p.504-511, 2005.

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.

NEVAN, 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 & Gynecology**, v. 15, p. 365 – 380, 2001.

O'CONNORS, D.J.; SEXTON, B.A. **Surface Analysis Methods in Materials Science**. Springer, 1992.

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.

OLIVEIRA, S.S.M.; SOUZA, M.C.; MARCHETTI, J.M. Validation of a UV-spectrophotometric method for determination of tamoxifen in PLA nanoparticles. In: XX Congresso Pan-americano de Farmácia e XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-americana, 2010, Porto Alegre - RS.

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.

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.

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

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.

PRISTA, L.N., ALVES, A. C., MORGADO, R.M.R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1995.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMAN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.24: p.1113-1128, 1998.

RANADE, V.V.; HOLLINGER, M.A. **Drug delivery systems**. 2 ed., Boca Raton: CRC Press LLC, 2004.

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

RICCI-JÚNIOR, E.J. et al. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, p. 235 – 244, 2005.

RICCI-JÚNIOR, E.J.; MARCHETTI, J.M. Preparation, characterization, photocytotoxicity assay of PLGA nanoparticles containing zinc (II) phthalocyanine for photodynamic therapy use. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 5, p. 523-528, 2006.

SAAD, E.D.; BROMBERG, S.; KATZ, A.; SIMON, S.D. Inibidores da aromatase no câncer de mama: da doença metastática ao tratamento adjuvante. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 4, p.555-567, 2002.

SANTOS, E.P. **Avaliação de amidos hidrolisados, aniônico e catiônico, como tensoativos nas formulações de nanopartículas poliméricas para aplicação em filtros solares**. 2011. 150f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

SCHAFFAZICK, S. R.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SELAN, B.; KANNEBLEY JÚNIOR, S.; PORTO, G. S. **Relatório setorial sobre inovação tecnológica na indústria farmacêutica brasileira: uma análise a partir dos indicadores de inovação**, Ribeirão Preto: FIPASE, 2007. 79 p. Disponível em: <[http://www.fipase.org.br/imagens/RelatSetFarmaceutica Brasileira.pdf](http://www.fipase.org.br/imagens/RelatSetFarmaceutica%20Brasileira.pdf)> Acesso em: 04 mar. 2013.

SENKUS, E.; CARDOSO, F.; PAGANI, O. Time for more optimism in metastatic breast cancer? **Cancer Treatment Reviews**, v.40, n.2, p.220-228, 2014.

SHARMA, A.; SHARMA, U.S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **The International Journal of Pharmaceutics**, v.154, n. 2, p.123-140, 1997.

SHENOY, D.B.; AMIJI, M.M. Poly(ethylene oxide)-modified poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, p. 261–270, 2005.

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

SILVA, T.C.P. et al. Efeito do tamoxifeno no perfil das proteínas plasmáticas em condição de diabetes mellitus tipo 1. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 20, suppl. 1, 2005.

SINHA, R.; KIM, G.J.; NIE, S.; SHIN, D.M. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 8, 2006.

SINHA, V. R. et al. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1-23, 2004.

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.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticle as delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

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.

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

STRICKLEY, R.G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 201-230, 2004.

SWAMI, A. et al. Nanoparticles for Targeted and Temporally Controlled Drug Delivery. In: SVENSON, S; PRUD'HOMME, R.K. (Eds.) **Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery Applications**. Imaging, Targeting, and Delivery. Springer, 2012.

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.

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, R.; YALA, L.; FAN, T.M.; CHENG, J. The Formulation of Aptamer-Coated Paclitaxel-Polylactide Nanoconjugates and Their Targeting to Cancer Cells. **Biomaterials**, v. 31, n.11, p. 3043-3053, 2010.

VARGAS, A. et al. The use of Drug-Loaded Nanoparticles in Cancer Chemotherapy. In: BENITA, S. (ed.). **Microencapsulation**. Methods and Industrial Applications. Informa Healthcare, 2005. cap. 18.

VELLOSO, F.T. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico em CLAE-UV para a quantificação de ácido retinóico em microcápsulas de alginato e quitosana. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, 2009.

VENIER-JULIENNE, M.C.; BENOIT, J.P. Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 71, n.2, p. 121-128, 1996.

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.

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.

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

_____. Evaluation of the non-sink dialysis method for the measurement of drug release from colloids effect of drug partition. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 56, p. 71-74, 1989.

WELLS, J.I. **Pharmaceutical Preformulation: the physicochemical properties of drug substances**. Ellis Horwood, p. 21-85: Solubility, 1988.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, p. 112-115, 2008.

YANG, G.; NOWSHEEN, S.; AZIZ, K.; GEORGAKILAS, A.G. Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, n. 3, p. 392-404, 2013.

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.

YOSHIZAWA, Y. et al. PEG liposomalization of paclitaxel improved its *in vivo* disposition and anti-tumor efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 412, n. 1-2, p. 132-41, 2011.

ZHANG, Z.; FENG, S. In Vitro investigation on poly(lactide)-Tween 80 copolymer nanoparticles fabricated by dialysis method for chemotherapy. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 4, p. 1139-1146, 2006.

ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.294, n.1-2, p. 261-267, 2005.

ANEXO

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.636.53.3), intitulado "Nanopartículas de PLA-PEG: preparo, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo*", de autoria de **Samantha Sant'Anna Marotta de Oliveira** 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 *ad referendum*.

Ribeirão Preto, 17 de julho de 2009

Presidente da CEUA em exercício
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 4469 – Fax: (16) 3633 7964