

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

Desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tamoxifeno, revestidas com quitosana e funcionalizadas com Zn^{2+} ou Gd^{3+} para futura aplicação em terapêutica e teranóstica.

JABID ARMANDO LOTERO ALVARADO

PORTO ALEGRE, 2017

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

Desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tamoxifeno, revestidas com quitosana e funcionalizadas com Zn^{2+} ou Gd^{3+} para futura aplicação em terapêutica e teranóstica.

Dissertação apresentada por **Jabid Armando Lotero Alvarado** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Raffin Pohlmann

Porto Alegre, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 12/12/2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Fabiano Severo Rodembusch

Instituto de Química - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Martin Steppe

Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Lotero Alvarado , Jabid Armando

Desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tamoxifeno, revestidas com quitosana e funcionalizadas com Zn²⁺ ou Gd³⁺ para futura aplicação em terapêutica e teranóstica. / Jabid Armando Lotero Alvarado . -- 2017.

137 f.

Orientador: Adriana Pohlmann.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Nanocápsulas multiparede. 2. Tamoxifeno. 3. Câncer de mama. 4. Atividade citotóxica. I. Pohlmann, Adriana, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Síntese de Nano e Micropartículas Aplicadas à Terapêutica do Instituto de Química Orgânica (Laboratório K204), no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Laboratório de Biotecnologia do Câncer, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas, com financiamento da CAPES, CNPq, FAPERGS e INCT. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Adriana Pohlmann, pela oportunidade oferecida e a confiança depositada em mim desde o primeiro dia. Por todos os conhecimentos e conselhos compartilhados e por essa orientação dedicada. É um orgulho fazer parte da sua equipe.

À Prof^a. Dr^a. Silvia Guterres por compartilhar seus conhecimentos conosco e pela contribuição na realização deste projeto.

Aos colegas dos laboratórios 405 e K204 pelos momentos vividos e por cada ajuda oferecida quando mais eu precisei, especialmente a Denise pela amizade.

Ao professor Vladimir Lavayen que sempre ofereceu sua ajuda e aportou seus conhecimentos desinteressadamente e com a melhor das atitudes.

Aos professores Tiago e Fabiana e a todas as pessoas da UFPel que aportaram seus conhecimentos e colaboração para a consecução deste projeto.

À UFRGS por me permitir essa oportunidade que mudou minha vida e me fez uma pessoa com uma visão muito ampla e com uma mentalidade rica em conhecimentos, e que tem vontade de continuar crescendo.

À CAPES que foi o órgão financiador da bolsa de estudos, por confiar em mim e por oferecer essa ajuda que melhorou meu bem-estar aqui no Brasil.

A toda a família Procaps que sempre acreditou em mim e sempre apoiou meu crescimento pessoal e profissional; especialmente a Sandra, Diego e Don Rubén,
¡Muchas Gracias!

A minha família, que é minha razão de viver e que é meu impulso para seguir em frente.

A Tiago, sem teu apoio isso não seria realidade. Só tu sabes o importante que és para mim.

***"A nanotecnologia curará o câncer,
limpará a poluição e aliviará a fome
no mundo."***

(Eric Drexler)

RESUMO

O tamoxifeno é o mais antigo e mais prescrito dos moduladores seletivos do receptor de estrogênio, sendo usado no tratamento e prevenção do câncer de mama positivo para este receptor. No entanto, este fármaco apresenta limitações relacionadas a baixa solubilidade aquosa e pouca seletividade. Para melhorar sua eficácia, este fármaco vem sendo incorporado em diferentes sistemas nanotecnológicos. Desse modo, este trabalho propôs o desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tamoxifeno, revestidas com quitosana e posteriormente funcionalizadas com Zn^{2+} ou Gd^{3+} , visando futuros produtos para terapêutica ou teranóstica, respectivamente. As nanocápsulas foram preparadas mediante a técnica deposição interfacial do polímero pré-formado, empregando poli(ϵ -caprolactona). Foi determinada a concentração de quitosana para a formação das monocamadas completas, assim como também a melhor concentração do íon metálico Gd^{3+} adicionado nas formulações. Estas foram caracterizadas através da determinação do teor de tamoxifeno, eficiência de encapsulação do fármaco, pH, distribuição de diâmetros da partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, potencial de óxido-redução (ORP) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho. A atividade citotóxica *in vitro* também foi realizada. As partículas contendo Zn^{2+} e Gd^{3+} apresentaram um diâmetro hidrodinâmico de 116 nm e 115 nm, respectivamente. Os índices de polidispersão de ambas partículas foram de menos de 0,2; o pH obtido foi de 4,8 para as partículas com Zn^{2+} e de 4,3 para as partículas com Gd^{3+} . O potencial zeta foi de +8,8 mV quando as partículas continham Zn^{2+} e de +11,1 mV para as partículas com Gd^{3+} . Os teores de ambas as formulações foram maiores do que 98%, tendo eficácia de encapsulação superior a 93%. Foi proposto um modelo de distribuição do tamoxifeno na suspensão de nanocápsulas e mediante ORP e análise por espectroscopia no infravermelho as interações do fármaco com os íons metálicos nas nanocápsulas foram determinadas. Ambas as nanoformulações mostraram melhores resultados de citotoxicidade em células de adenocarcinoma mamário de linhagem MCF-7 e MDA-MB-231, quando comparado com o fármaco livre nas concentrações menores (2,5; 5 e 10 μ M).

Palavras-chave: Nanocápsulas multiparede; tamoxifeno; câncer de mama; atividade citotóxica.

ABSTRACT

Tamoxifen is the oldest and most prescribed drug acting as selective estrogen receptor modulator. It is used in the treatment and prevention of estrogen receptor positive breast cancer. However, this drug presents problems related to its low aqueous solubility and low selectivity. To improve its efficacy, this drug has been incorporated into different nanotechnological systems. Thus, this work proposed the development of tamoxifen-loaded lipid-core nanocapsules coated with chitosan and later functionalized with Zn^{2+} or Gd^{3+} , for future use in therapeutics or theranostics, respectively. The nanocapsules were prepared by interfacial deposition of the preformed polymer, using poly (ϵ -caprolactone). The concentration of the chitosan polymer was determined for the formation of the complete monolayers, as well as the best concentration of the metal ion Gd^{3+} added in the formulations. Formulations were characterized by determining the content of tamoxifen, drug encapsulation efficiency, pH, particle diameter distribution, polydispersity index, zeta potential, oxidation-reduction potential and spectroscopy of absorption in the infrared region. *In vitro* cytotoxic activity was also performed. The particles containing Zn^{2+} and Gd^{3+} had hydrodynamic diameters of 116 nm and 115 nm, respectively. The polydispersity indexes of both particles were lower than 0.2; the pH obtained was 4.8 for the particles with Zn^{2+} and 4.3 for the particles with Gd^{3+} . The zeta potential was +8.8 mV for the particles containing Zn^{2+} and +11.1 mV for those with Gd^{3+} . Drug contents assayed for both formulations were higher than 98%, having encapsulation efficiencies higher than 93%. A model of distribution of tamoxifen in the nanocapsule suspension was proposed and, through the determination of the oxidation-reduction potential and infrared band analysis, a chemical structure of the interactions of the drug with the metal ions onto the nanocapsules was designed. Both particles had shown better results of cytotoxicity in mammary adenocarcinoma cells MCF-7 and MDA-MB-231, when compared to the free tamoxifen in the lower concentrations (2,5; 5 e 10 μ M).

Keywords: Multi-wall nanocapsules; tamoxifen; breast cancer; cytotoxic activity.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química do tamoxifeno.	34
Figura 2. Representação gráfica da estrutura MCMN funcionalizada com os íons metálicos Zn^{2+} ou Fe^{2+} (Adaptado de Bender <i>et al.</i> , 2014)	37
Figura 3. Representação gráfica obtida por difração laser da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNC; b) LNCQ _{0,1} ; c) LNCQ _{0,1} repetição; d) LNCQ _{0,5} ; e) LNCQ _{1,0} ; f) LNCQ _{1,5} ; g) LNCQ _{2,0}	53
Figura 4. Gráfico radar das formulações preliminares	54
Figura 5. Representação gráfica obtida por espalhamento de luz dinâmico da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNC; b) LNCQ 0,5%; c) LNCQ 1,0%; d) LNCQ 1,5%; e) LNCQ 2,0%.	56
Figura 6. Representação gráfica obtida por difração laser da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNC; b) LNCQ 0,5%; c) LNCQ 1,0%; d) LNCQ 1,5%; e) LNCQ 2,0%; f) LNCQ 2,5%.	58
Figura 7. Gráfico radar dos três lotes de formulações revestidas com diferentes concentrações de quitosana.	59
Figura 8. Representação gráfica obtida por espalhamento de luz dinâmico da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNC; b) LNCQ 0,5%; c) LNCQ 1,0%; d) LNCQ 1,5%; e) LNCQ 2,0%; f) LNCQ 2,5%.	61
Figura 9. Função de correlação obtida por espalhamento de luz dinâmico das suspensões de nanocápsulas.	61
Figura 10. Valores individuais de potencial zeta em função da concentração de quitosana nas formulações revestidas com o polímero catiônico.	64
Figura 11. Valores médios de potencial zeta em função da concentração de quitosana nas formulações revestidas com o polímero catiônico.....	65
Figura 12. Representação gráfica obtida por difração laser da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNC _{0,25T} ; b) LNC _{0,50T} ; c) LNC _{1,00T} ; d) LNC _{1,50T} ; e) LNC _{2,00T}	68

Figura 13. Representação gráfica obtida por espalhamento de luz dinâmico da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNC _{0,25T} ; b) LNC _{0,50T} ; c) LNC _{1,00T} ; d) LNC _{1,50T} ; e) LNC _{2,00T}	69
Figura 14. Representação gráfica obtida por difração laser da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNCQ _{0,25T} ; b) LNCQ _{0,50T} ; c) LNCQ _{1,00T} ; d) LNCQ _{1,50T} ; e) LNCQ _{2,00T}	70
Figura 15. Representação gráfica obtida por difração laser da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) MLNC-Zn _{0,25T} ; b) MLNC-Zn _{0,50T} ; c) MLNC-Zn _{1,00T} ; d) MLNC-Zn _{1,50T} ; e) MLNC-Zn _{2,00T}	71
Figura 16. Representação gráfica obtida por espalhamento de luz dinâmico da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNCQ _{0,25T} ; b) LNCQ _{0,50T} ; c) LNCQ _{1,00T} ; d) LNCQ _{1,50T} ; e) LNCQ _{2,00T}	73
Figura 17. Representação gráfica obtida por espalhamento de luz dinâmico da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) MLNC-Zn _{0,25T} ; b) MLNC-Zn _{0,50T} ; c) MLNC-Zn _{1,00T} ; d) MLNC-Zn _{1,50T} ; e) MLNC-Zn _{2,00T}	74
Figura 18. a) Função de correlação obtida por espalhamento de luz dinâmico das suspensões de nanocápsulas LNC; b) Função de correlação obtida por espalhamento de luz dinâmico das suspensões de nanocápsulas LNCQ; c) Função de correlação obtida por espalhamento de luz dinâmico das suspensões de nanocápsulas MLNC-Zn.	77
Figura 19. a) Análise de tamanho de partícula (DLS) e b) Índice de polidispersão (PDI) para as diferentes partículas preparadas com diferentes concentrações de tamoxifeno.	78
Figura 20. Gráfico radar das formulações com diferentes concentrações de tamoxifeno: a) LNC lote 1; b) LNC lote 2; c) LNC lote 3, d) LNCQ lote 1; e) LNCQ lote 2; f) LNCQ lote 3, g) MLNC-Zn lote 1; h) MLNC-Zn lote 2; i) MLNC-Zn lote 3.	79
Figura 21. Análise do potencial zeta para as diferentes partículas preparadas com diferentes concentrações de tamoxifeno.	82
Figura 22. Análise de pH para as diferentes partículas preparadas com diferentes concentrações de tamoxifeno.	82

Figura 23. Representação gráfica obtida por difração laser da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNC _{1,00T} + soluções de ácidos; b) LNC _{2,00T} + soluções de ácidos.	83
Figura 24. Gráfico radar das formulações: a) LNC _{1,00T} + soluções de ácidos; b) LNC _{2,00T} + soluções de ácidos.	84
Figura 25. Fotografia de microscopia óptica da LNC _{1,00T} a) sem luz polarizada 2x, b) com luz polarizada 2X, c) sem luz polarizada 20X, b) com luz polarizada 20X.	85
Figura 26. Fotografia de microscopia óptica da LNCQ _{1,00T} a) sem luz polarizada 2X, b) com luz polarizada 2X, c) sem luz polarizada 20X, b) com luz polarizada 20X.	86
Figura 27. Fotografia de microscopia óptica da MLNC-Zn _{1,00T} a) sem luz polarizada 2X, b) com luz polarizada 2X, c) sem luz polarizada 20X, b) com luz polarizada 20X.	87
Figura 28. Perfil granulométrico das formulações contendo gadolínio (n=3) analisadas por difratometria de laser: a) MLNC-Gd _{12,5} , b) MLNC-Gd _{25,0} , c) MLNC-Gd _{50,0} ; d) MLNC-Gd _{100,0}	89
Figura 29. Gráfico radar das formulações com diferentes concentrações de tamoxifeno: a) MLNC-Gd lote 1; b) MLNC-Gd lote 2; c) MLNC-Gd lote 3.	90
Figura 30. Perfil granulométrico das formulações contendo gadolínio (n=3) analisadas por DLS: a) MLNC-Gd _{12,5} , b) MLNC-Gd _{25,0} , c) MLNC-Gd _{50,0} , d) MLNC-Gd _{100,0}	91
Figura 31. Distribuição de potencial zeta das formulações contendo diferentes concentrações de gadolínio: a) MLNC-Gd _{12,5} , b) MLNC-Gd _{25,0} , c) MLNC-Gd _{50,0} , d) MLNC-Gd _{100,0}	93
Figura 32. Fotografia de microscopia óptica da MLNC-Gd _{25,0} a) sem luz polarizada 2X, b) com luz polarizada 2X, c) sem luz polarizada 20X, b) com luz polarizada 20X....	94
Figura 33. Curva média de calibração do tamoxifeno por CLAE.	95
Figura 34. Fotografia de microscopia óptica do filtro usado como branco a) com luz polarizada 20X; b) sem luz polarizada 20X.	98
Figura 35. Fotografia de microscopia óptica do filtro após o processo de ultrafiltração-centrifugação da formulação LNC a) com luz polarizada 20X; b) sem luz polarizada 20X.	99

Figura 36. Fotografia de microscopia óptica do ultrafiltrado obtido do processo de ultrafiltração-centrifugação da formulação LNC a) com luz polarizada 20X; b) sem luz polarizada 20X.	100
Figura 37. Análise por ultrafiltração centrifugação das suspensões de nanocápsulas de tamoxifeno na presença de solvente metanol.....	102
Figura 38. Espectro de infravermelho das diferentes amostras na região 3000 - 2800 cm^{-1}	107
Figura 39. Espectro de infravermelho das diferentes amostras na região 1470 - 1449 cm^{-1}	108
Figura 40. Derivada do espectro de infravermelho das diferentes amostras na região 1640 - 1660 cm^{-1}	110
Figura 41. Estrutura de ligação do Zn^{2+} com o tamoxifeno	111
Figura 42. Estrutura de ligação do Gd^{3+} com o anel benzênico de dois moléculas de tamoxifeno.....	111
Figura 43. Estruturas supramoleculares das nanocápsulas a) MLNC- $\text{Zn}_{1,00\text{T}}$ b) MLNC- Gd_{25}	113
Figura 44. Efeito antiproliferativo dos diferentes tratamentos sobre o crescimento de células de câncer de mama MCF-7 (n=3).	116
Figura 45. Efeito antiproliferativo dos diferentes tratamentos sobre o crescimento de células de câncer de mama MDA-MB-231(n=3).	118

Lista de Tabelas

Tabela 1. Caracterização inicial de tamanho de partícula das suspensões de nanocápsulas por diferentes técnicas.	57
Tabela 2. Caracterização inicial de tamanho de partícula das suspensões de nanocápsulas por diferentes técnicas.	62
Tabela 3. Valores de Potencial Zeta e pH para as suspensões de nanocápsulas. ..	63
Tabela 4. Caracterização inicial de tamanho de partícula das suspensões de nanocápsulas com Tamoxifeno por diferentes técnicas.	75
Tabela 5. Valores de Potencial Zeta e pH para as suspensões de nanocápsulas LNC.	80
Tabela 6. Valores de Potencial Zeta e pH para as suspensões de nanocápsulas LNCQ.....	81
Tabela 7. Valores de Potencial Zeta e pH para as suspensões de nanocápsulas MLNC-Zn.....	81
Tabela 8. Análise de diâmetro por difração laser e espalhamento de luz dinâmica para as formulações teste de gadolínio.....	92
Tabela 9. Valores de Potencial Zeta e pH para as suspensões de nanocápsulas MLNC contendo gadolínio.	92
Tabela 10. Quantificação do tamoxifeno nas formulações de nanocápsulas.	96
Tabela 11. Concentração de tamoxifeno no ultrafiltrado das suspensões de nanocápsulas	97
Tabela 12. Concentração de tamoxifeno no ultrafiltrado das suspensões de nanocápsulas e eficiência de encapsulação	97
Tabela 13. Concentração de tamoxifeno no ultrafiltrado das suspensões de nanocápsulas.	101
Tabela 14. Concentração de tamoxifeno no ultrafiltrado das formulações de nanocápsulas, empregando solução de ácido acético 10%.	102
Tabela 15. Proposta de distribuição do tamoxifeno nas formulações de nanocápsulas	104

Tabela 16. Resultados de potencial óxido-redução para as formulações de nanocápsulas	105
Tabela 17. IC50 em μM dos diferentes tratamentos sobre o crescimento de células da linhagem MCF-7	117
Tabela 18. IC50 em μM dos diferentes tratamentos sobre o crescimento de células da linhagem MDA-MB-231 após os diferentes tempos de tratamentos.....	119

Lista de Abreviaturas

ATR	Espectroscopia de refletância total atenuada (<i>attenuated total reflectance</i>)
DD	Grau de desacetilação (<i>Degree of desacetylation</i>)
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
ER	Receptor de estrogênio (<i>Estrogen receptor</i>)
HER2	Receptor de crescimento epidermal humano tipo 2 (<i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i>)
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
IC ₅₀	Concentração em que os tratamentos induzem 50% de inibição do crescimento celular
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
LD	Limite de detecção
LNC	Nanocápsula de núcleo lipídico
LNCQ	Nanocápsula de núcleo lipídico revestida com quitosana
LQ	Limite de quantificação
MLNC	Nanocápsulas multiparede (<i>Metal Complex Multi-wall Nanocapsules</i>)
MLNC-Zn	Nanocápsulas multiparede complexadas com zinco
MLNC-Gd	Nanocápsulas multiparede complexadas com gadolínio
MTT	{brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}
ORP	Potencial óxido-redução (<i>Oxidation-reduction potential</i>)
PBS	Tampão fosfato salino (Phosphate buffered saline)
PCL	Poli(ε-caprolactona)
PCS	Espectroscopia de correlação de fótons (<i>Photon Correlation Spectroscopy</i>)
PDI	Índice de polidispersão (<i>Polydispersity index</i>)
PR	Receptor de progesterona (<i>Progesterone Receptor</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SSA	Área e superfície específica (<i>Specific surface area</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS	29
2.1	<i>OBJETIVO GERAL</i>	29
2.2	<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	29
3	REVISÃO NA LITERATURA	31
3.1	<i>O CÂNCER</i>	31
3.1.1	O tecido tumoral	31
3.1.2	O câncer de mama	32
3.2	<i>TAMOXIFENO: CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS E QUÍMICAS</i>	33
3.3	<i>ÍONS METÁLICOS</i>	34
3.3.1	Zinco	34
3.3.2	Gadólínio	35
3.4	<i>A NANOTECNOLOGIA E O CÂNCER</i>	35
3.4.1	Tipos de nanocarreadores e o seu emprego na terapêutica	35
3.4.2	Nanopartículas Teranósticas	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	<i>MATERIAIS</i>	39
4.1.1	Matérias Primas	39
4.1.2	Aparelhos e equipamentos	40
4.2	<i>MÉTODOS</i>	41
4.2.1	Obtenção das nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) e estudos de pré-formulação com quitosana	41
4.2.2	Estudos de pré-formulação com tamoxifeno e funcionalização de superfície das nanocápsulas	42
4.2.3	Caracterização físico-química das nanocápsulas	43
4.2.4	Avaliação das formulações inibindo a proliferação de células com câncer de mama humano	48
4.2.5	Análise Estatística	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	<i>OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE QUITOSANA PARA O REVESTIMENTO DAS NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO (LNC)</i>	51
5.2	<i>ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO COM TAMOXIFENO E FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE DAS NANOCÁPSULAS</i>	67

5.3	<i>DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO GADOLÍNIO</i>	89
5.4	<i>QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO</i>	94
5.4.1	Validação do método de quantificação do tamoxifeno por CLAE.....	94
5.4.2	Teor	95
5.4.3	Eficiência de encapsulação (EE)	96
5.4.4	Distribuição do tamoxifeno nas suspensões de nanocápsulas	100
5.5	<i>DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO (FÁRMACO-ÍON METÁLICO) MEDIANTE ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO E ORP</i>	105
5.6	<i>DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS MCF7 E MDA-MB-231</i> 115	
6	CONCLUSÕES	121
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças crônicas mais recorrentes na atualidade, causando a morte de milhões de pessoas em todo o mundo e sendo considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública. No panorama mundial, dentre os tipos de câncer mais comuns no sexo masculino destacam-se o câncer de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado, enquanto que no sexo feminino os mais comuns são, câncer de mama, colorretal, pulmão, cervical e estômago (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). A prevalência do câncer no Brasil é muito próxima da prevalência mundial, observando-se uma maior frequência em câncer de próstata, pulmão, estômago, cólon e reto e esôfago na população masculina; enquanto que nas mulheres predomina o câncer de mama, seguido pelos cânceres de colo uterino, cólon e reto, pulmão e estômago (RIBEIRO *et al.*, 2005). Estudos demonstram que nesta década, o aumento das taxas de incidência de novos casos de câncer de mama foi significativo quando comparado com outros tipos de cânceres como o de pulmão, os quais diminuíram pela metade (SIEGEL *et al.*, 2017; JEMAL *et al.*, 2012).

Um correto diagnóstico do câncer é essencial para um tratamento adequado e efetivo. O tratamento de cada tipo de câncer em cada paciente deve ser específico e engloba uma ou mais modalidades tais como, cirurgia, radioterapia e quimioterapia (KAMANGAR *et al.*, 2006, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). Um dos agentes mais importantes no tratamento e prevenção do câncer de mama é o tamoxifeno, uma molécula pertencente ao grupo dos moduladores seletivos do receptor estrogênico (SERM). Este fármaco tem efeito antagonista nos receptores de estrogênio (ER), inibindo assim a proliferação de células com câncer por meio de uma modulação da expressão genética (COLE *et al.*, 1971; FISCHER *et al.*, 1998; SINGH *et al.*, 2005 LIM *et al.*, 2005). No entanto, a sua eficácia pode ser limitada por sua baixa solubilidade aquosa e pouca seletividade nos tecidos, afetando assim outros órgãos sadios (GAL *et al.*, 1991). Desta forma, o tamoxifeno vem sendo incorporado em diferentes sistemas poliméricos, destacando-se os sistemas nanoparticulados, que permitem uma liberação controlada e vetorizada do fármaco, tais como nanoemulsão (TAGNE *et al.*, 2007), nanofibras (SAEIDI *et al.*, 2016), nanopartículas lipídicas sólidas (JAVID *et al.*, 2017) e nanocarreadores poliméricos (THAKUR *et al.*,

2016).

A encapsulação de fármacos em nanopartículas poliméricas vêm apresentado um aumento no número de publicações, corroborando-se com o incremento de medicamentos de base nanotecnológica em estudos clínicos e aprovados por diferentes órgãos regulatórios em nível mundial (SADRIEH *et al.*, 2012; TYNER *et al.*, 2015).

O nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido nanocápsulas de núcleo lipídico, sistemas vesiculares submicrométricos preparados por meio de deposição interfacial de poli(ϵ -caprolactona), constituindo uma parede polimérica que contem no núcleo, além do fármaco, uma dispersão de materiais lipofílicos, tais como monoestearato de sorbitano e triglicerídeos cáprico e caprílico e que são estabilizados com um tensoativo (JÄGER *et al.*, 2009). Mais recentemente, foram realizados estudos, determinando a influência da concentração dos materiais da fase orgânica no tamanho final das nanopartículas, estabelecendo assim as concentrações adequadas de cada um dos materiais, garantindo uma distribuição de diâmetros (JORNADA *et al.*, 2012), que poderia oferecer um efeito pronunciado de permeação e retenção em tumores, efeito EPR (TORCHILIN, 2011). Também foi desenvolvida, recentemente, uma nova estratégia de funcionalização de superfície de nanocápsulas de núcleo lipídico (BENDER *et al.*, 2014), empregando zinco (II) ou ferro (II) como íon metálico para a formação de complexos de coordenação entre o revestimento de quitosana na interface nanocápsula-água e um ligante (BENDER *et al.*, 2014; MAYER *et al.*, 2015).

O zinco é um íon metálico presente no organismo e que, por meio das suas propriedades, forma complexos de coordenação estáveis, tendo a capacidade de associação com diversas proteínas, permitindo assim o correto funcionamento delas (VALLEE B, AULD D, 1989; VALLEE B, AULD D, 1990). Estudos recentes em um modelo de câncer de próstata demonstraram que injeções de acetato de zinco (II) têm atividade antineoplásica inibindo, portanto, o crescimento e proliferação de tumores (SHAH *et al.*, 2009).

Atualmente, o uso do gadolínio na detecção e diagnóstico de diferentes tipos de câncer como os de mama, de ovário e de próstata vem aumentando (SLAMON *et al.*, 1987; KONDA *et al.*, 2001; HECKL *et al.*, 2003), mediante a sua utilização como agente de contraste para uma melhor aquisição de dados por ressonância magnética de imagem (RMI) (ZHOU e LU, 2013).

O desenvolvimento de novas nanopartículas poliméricas contendo fármacos e diferentes tipos de metais tem despertado um grande interesse na área farmacêutica pelas propriedades promissoras tanto na terapêutica quanto no diagnóstico (teranóstica), de diferentes tipos de tumores sólidos, incluindo cânceres de ovário, testículo, cabeça, pescoço, reto e não-pequenas células no pulmão (KELLAND, 2007; DUTTA *et al.*, 2016; FRICKER, 2007; YANG *et al.*, 2015). As nanopartículas poliméricas com função teranóstica são aqueles sistemas de liberação que contêm um fármaco, metais que permitem o diagnóstico e tratamento ao mesmo tempo, e ligantes que permitem um efeito vetorizado, não afetando, portanto, tecidos saudáveis (CHEN *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2015).

O uso de nanopartículas poliméricas contendo substâncias inorgânicas para fins de diagnóstico é evidenciado pelo acréscimo de publicações nesta área (HUI *et al.*, 2012; ZOPF *et al.*, 2016). No entanto, a inclusão de espécies inorgânicas, como metais, em formulações farmacêuticas as vezes é questionada pela possível toxicidade (KELLAND, 2007) e pouca biodegradabilidade (KELLAND, 2007; LU *et al.*, 2015) que tais substâncias apresentam no organismo, embora estudos realizados nesta década demonstrem que a manipulação das propriedades físico-químicas de partículas inorgânicas pode influir numa liberação vetorizada e boa eliminação destas (CHOI *et al.*, 2010). Um exemplo da manipulação destas propriedades descreve a utilização de DNA para controlar a liberação e a eliminação biológica de nanopartículas inorgânicas, organizando-as em superestruturas coloidais que interagem com as células e tecidos como uma função do seu desenho, mas, subsequentemente, degrada em blocos que podem escapar da retenção biológica (CHOU *et al.*, 2014).

Tendo em vista o exposto, o objetivo deste estudo foi desenvolver nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tamoxifeno, revestidas com quitosana e complexadas com Zn^{2+} ou Gd^{3+} visando futura aplicação em terapêutica e teranóstica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tamoxifeno revestidas com quitosana e complexadas com Zn^{2+} ou Gd^{3+} visando futura aplicação em terapêutica e teranóstica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudos de pré-formulação para encontrar a melhor concentração de quitosana de 95% desacetilada, que possa oferecer os melhores resultados de diâmetro e potencial zeta;
- Desenvolver estudos de pré-formulação para a obtenção de nanocápsulas multiparede contendo tamoxifeno, a partir da obtenção de nanocápsulas de núcleo lipídico, revestidas com lecitina e quitosana 95% desacetilada, caracterizando as formulações físico-quimicamente quanto à eficiência de encapsulação, teor, potencial zeta, distribuição de diâmetros de partícula, índice de polidispersão e pH;
- Gerar estudos de pré-formulação para a funcionalização de superfície das nanocápsulas multiparede empregando Zn^{2+} ou Gd^{3+} para o estabelecimento das concentrações ótimas e seleção de formulação, caracterizando as formulações físico-quimicamente quanto à eficiência de encapsulação, teor, potencial zeta, distribuição de diâmetros de partícula, índice de polidispersão, pH, ORP e espectroscopia infravermelho;
- Avaliar a eficácia das formulações para inibir a proliferação de células de câncer de mama humano linhagem MCF-7 e MDA-MB-231.

3 REVISÃO NA LITERATURA

3.1 O CÂNCER

O câncer vem sendo alvo de muitas pesquisas há anos devido aos seus altos índices de mortalidade. Segundo a Organização Mundial da Saúde, através do projeto Globocan, em 2012 ocorreram aproximadamente 8,2 milhões de mortes no mundo provocadas por algum tipo de câncer (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012). Dessa forma, muitos pesquisadores vêm aprofundando os conhecimentos a respeito dessas patologias e com isso avanços notáveis foram obtidos no que tange a nossa compreensão da origem e do desenvolvimento do câncer. Adicionalmente, avanços no desenvolvimento de métodos para diagnóstico e tratamento também foram obtidos.

Embora a mortalidade global do câncer esteja apresentando uma queda em suas taxas, essas ainda são consideradas altas, sendo de aproximadamente 20% (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012). Uma das principais razões para esses altos valores está nas atuais terapias disponíveis para tratamento. As preparações farmacêuticas ainda apresentam uma baixa capacidade de vetorização dos agentes antitumorais, os quais acabam por afetar células saudáveis, induzindo efeitos adversos graves (BRIGGER *et al.*, 2012).

3.1.1 O tecido tumoral

O tecido tumoral pode ser dividido em 3 regiões distintas: vascular, intersticial e celular. A parte vascular é a responsável pelo aporte de nutrientes e oxigênio para o desenvolvimento tumoral (angiogênese). Essa região apresenta-se heterogênea, com pontos altamente vascularizados e outros não, sendo por isso possível detectar regiões de necrose e hemorragia (BABAN e SEYMOUR, 1998). Dessa forma, os vasos sanguíneos tumorais acabam por apresentar anormalidades em comparação com aqueles fisiologicamente normais. Entre essas diferenças está uma proporção relativamente alta de proliferação de células endoteliais e uma formação de membrana basal aberrante (RUBIN e CASARETT, 1966; SEYMOUR, 1992). Como resultado dessas anormalidades, as células endoteliais apresentam uma permeabilidade aumentada, a qual se acredita ser regulada por diversos mediadores,

tais como o fator de crescimento do endotélio vascular, a bradiquinina, o óxido nítrico, prostaglandinas e metaloproteinases da matriz (MAEDA, 2001). Estudos têm indicado que o tamanho de poro vascular para vários modelos de tumores varia entre 100 e 780 nm (SHUBIK, 1982; YUAN *et al.*, 1995; UNEZAKI *et al.*, 1996; HOBBS *et al.*, 1998), sendo bastante superior ao encontrado nas células normais, os quais são de aproximadamente 5 a 10 nm (HALEY e FRENKEL, 2008).

Por outro lado, o compartimento intersticial do tumor compõe-se predominantemente por uma rede de colágeno e fibras elásticas, a qual apresenta em sua estrutura reticulada fluidos intersticiais e componentes macromoleculares (hialuronato e proteoglicanos), que formam um gel hidrofílico (JONES e HARRIS, 1998). A região intersticial tumoral ainda se difere de regiões normais por apresentar uma pressão intersticial elevada que gera um fluxo convectivo para fora. Além disso, essas células não apresentam uma rede linfática definida (BABAN e SEYMOUR, 1998; JONES e HARRIS, 1998). Assim, o transporte de antitumorais no interstício será determinado pelas propriedades fisiológicas (isto é, de pressão) e físicas (isto é, composição, estrutura, carga) do interstício, além das propriedades físico-químicas da molécula de fármaco (tamanho, configuração, carga, hidrofobicidade) (JONES e HARRIS, 1998).

3.1.2 O câncer de mama

O câncer de mama é considerado o tipo mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, ficando atrás somente do câncer de pele não melanoma. No Brasil, a cada ano aproximadamente 25% dos novos casos são de câncer de mama. Esse câncer acomete principalmente mulheres entre 35 e 50 anos de idade, e embora seja relativamente raro, ainda pode ocorrer antes dos 35 anos. Em 2013, 14.388 mortes no Brasil foram causadas por essa patologia, sendo que 14.206 foram mulheres e 181 homens (INCA, 2016).

Embora muitos avanços já estejam contribuindo para a redução das mortes por câncer de mama, de 50-70% dos casos não são diagnosticados a tempo. Embora a mamografia seja um exame eficiente para detecção do câncer de mama, isso ocorre porque muitas vezes em um primeiro exame de mamografia o tumor ainda é pequeno, não podendo ser devidamente diagnosticado e diferenciado, por exemplo, de um cisto

mamário (HEYWANG-KÖBRUNNER *et al.*, 1996). Já a ressonância magnética com contraste é uma metodologia eficiente para a detecção de câncer mamário. Diversos estudos já demonstraram que o uso de contraste auxilia na detecção tanto de tumores palpáveis quanto não palpáveis, auxiliando no tratamento precoce do câncer de mama (GILLER *et al.*, 1994; SASLOW *et al.*, 2007; TURNBULL, 2009).

3.2 TAMOXIFENO: CARATERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS E QUÍMICAS

O tamoxifeno é um antineoplásico pertencente ao grupo dos moduladores seletivos do receptor estrogênico (SERM). Tem efeito antagonista nos receptores de estrogênio (ER) nas células mamarias. É usado na prevenção e tratamento do câncer de mama tanto em mulheres pós-menopáusicas, quanto pré-menopáusicas e em homens que apresentam tumor ER positivo. Atualmente vem sendo estudado no tratamento de outros tipos de câncer (CHABNER *et al.*, 1996; FISCHER *et al.*, 1998; NCI, 2016).

O tamoxifeno é rapidamente absorvido após administração por via oral, atingindo concentrações plasmáticas máximas de 4 a 7 horas. A meia vida é cerca de 7 dias, devido à alta ligação a albumina sérica. Esse fármaco é metabolizado pelas isoenzimas do citocromo P-450, mediante N-desmetilação e hidroxilação e sua excreção dá-se principalmente pelas fezes, sendo mínima a excreção pela urina (CHABNER *et al.*, 1996; GRAHAME-SMITH e ARONSON, 2002; BRODY, 2006).

Dentre os efeitos adversos de maior frequência encontram-se os relacionados com ações antiestrogênicas tais como, efeitos gastrointestinais não específicos (náuseas e vômitos) e efeitos no sistema nervoso central (SHUSHAN *et al.* 1996; GRAHAME-SMITH e ARONSON, 2002; HSDB, 2007). Sendo que em raras ocasiões, efeitos adversos tais como irregularidades menstruais, sangramento vaginal, retenção de líquidos entre outros podem ser observados (GRAHAME-SMITH e ARONSON, 2002; CHABNER *et al.*, 1996)

Segundo a classificação biofarmacêutica, o tamoxifeno é considerado uma molécula de classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) (TSRLINC, 2017). Esse fármaco apresenta um peso molecular de 371,52 g/mol e pKa 8,9. (PUBCHEM, 2017) a estrutura química é apresentada na Figura 1.

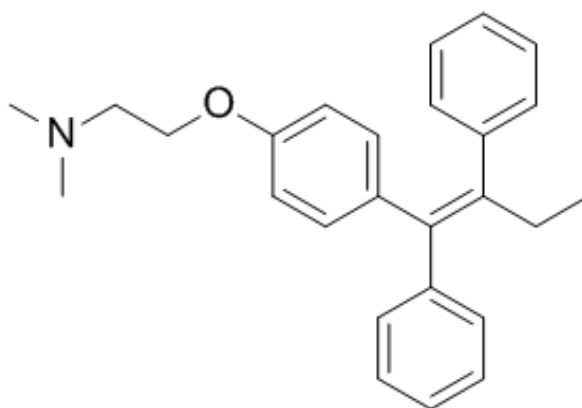


Figura 1. Estrutura química do tamoxifeno.

3.3 ÍONS METÁLICOS

3.3.1 Zinco

O zinco é o primeiro elemento no grupo 12 da tabela periódica, com número atômico de 30. O estado de oxidação deste íon metálico é de +2 (Zn^{2+}). Esse elemento tem um peso molecular de 65,38 g/mol, sendo 419 °C o seu ponto de fusão.

O zinco (Zn^{2+}) é um elemento essencial no organismo que é secretado por diferentes tipos de células e que permite o correto funcionamento de muitas enzimas. Participa no correto funcionamento do sistema imunológico e na síntese do DNA. A deficiência deste íon está relacionada com diferentes tipos de doenças no sangue e de crescimento, entre outras (HMDB, 2017; PUBCHEM, 2017).

Na literatura são encontrados muitos estudos que relacionam os efeitos citotóxicos do zinco em células com câncer de próstata (FRANKLIN *et al.*, 2005; COSTELLO e FRANKLIN, 2006).

3.3.2 Gadolínio

O gadolínio (Gd) é um elemento considerado um metal terra-rara (lantanídeo) e que tem um número atômico de 64 e peso atômico de 157,25 g/mol. O ponto de fusão é de 1312 °C. Na maioria dos seus compostos, o gadolínio adota estados de oxidação de +3 (Gd³⁺) (HMDB, 2017; PUBCHEM, 2017).

O gadolínio é empregado como agente de contraste na ressonância magnética de imagem (RMI), já que uma vez injetado no corpo, permite aumentar a visibilidade de estruturas corporais através da RMI. As doses de gadolínio podem ser baixas como 0,1mmol por quilograma de peso, sendo que concentrações maiores são usadas para vasculaturas finas (LENTSCHIG *et al.*, 1998; MITSUMORI *et al.*, 2014)

3.4 A NANOTECNOLOGIA E O CÂNCER

3.4.1 Tipos de nanocarreadores e o seu emprego na terapêutica

Os nanocarreadores são sistemas coloidais que possuem diâmetros abaixo de 1000 nm, como lipossomas, microemulsão, nanoemulsão, nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas. Nanopartículas poliméricas é o termo técnico que se refere a nanocápsulas e nanoesferas, as quais são carreadores formados por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010) ou uma matriz polimérica (POHLMANN *et al.*, 2007) respectivamente. Entre as principais vantagens da utilização desses sistemas para veiculação de fármacos, destaca-se a redução de efeitos adversos, distribuição seletiva nos tecidos com consequente melhora na resposta farmacológica (POHLMANN *et al.*, 2013).

Em 1989, Fessi e colaboradores propuseram um método de preparação para nanocápsulas baseado na deposição interfacial do polímero pré-formado. Nesse, a obtenção dessas partículas está centrada no uso de polímero biodegradável, um componente oleoso e tensoativos. Em 2009, Jäger e colaboradores descreveram um novo tipo de nanocápsula polimérica denominada nanocápsula de núcleo lipídico (LNC). Estas apresentam como diferencial um núcleo constituído de uma dispersão de monoestearato de sorbitano em triglicerídeos caprílico e cáprico, o que confere

características importantes como aumento da encapsulação e controle da liberação de fármacos (JÄGER *et al.*, 2009).

A partir desses nanodispositivos, o carreamento de fármacos antitumorais ainda pode se dar tanto por um processo ativo quanto passivo. No carreamento passivo o transporte se dá através de fenestrações capilares presentes no tumor por difusão passiva ou por convecção (YUAN, 1998). Como citado anteriormente, os capilares tumorais apresentam uma formação diferente do tecido saudável, apresentando poros com diâmetros entre 100 e 780 nm. Esse fenômeno é chamado de efeito de permeação e retenção melhorada (*enhanced permeability and retention effect*), causada por vasos malformados e por uma baixa drenagem linfática (WANGA e THANOU, 2010). Já a vetorização ativa envolve o carreamento de fármacos a um local específico com base no reconhecimento molecular. Para isso, os dispositivos nanotecnológicos devem ter acoplado um ligante, de modo a que esse possa interagir com o seu receptor no local da célula alvo (SUDIMACK e LEE, 2000; KUKOWSKA-LATALLO *et al.*, 2005).

Em 2012, Bender e colaboradores desenvolveram um tipo diferente de LNC, a qual apresentava adicionalmente em sua composição fosfatidilcolina e quitosana. Essas eram estruturadas a partir de uma superfície polimérica negativamente carregada pela fosfatidilcolina, revestida por uma camada positiva de quitosana. Essas partículas tiveram sua hemocompatibilidade avaliada *in vitro* em sangue humano, demonstrando que apenas altos volumes apresentariam toxicidade.

Em 2014 Bender e colaboradores ainda funcionalizaram essas partículas através da ligação de metais à sua superfície, definindo-a como "Nanocápsulas multiparede complexadas com metal" (MCMN). Essa nova estrutura desenvolvida com apenas uma etapa de síntese apresentou-se totalmente biodegradável. Essas partículas apresentaram diâmetro médio de 130 nm e demonstraram a viabilidade de ligações de metais à sua superfície sem a perda das características nanotecnológicas.

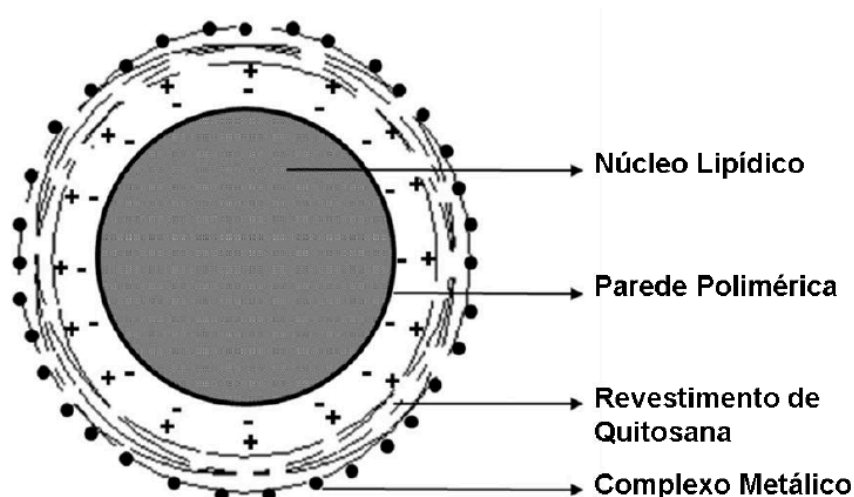


Figura 2. Representação gráfica da estrutura MCMN funcionalizada com os íons metálicos Zn^{2+} ou Fe^{2+} (Adaptado de Bender *et al.*, 2014)

Nosso grupo de pesquisa também demonstrou a versatilidade da funcionalização dessas nanocápsulas tendo desenvolvido formulações contendo laronidase (MAYER *et al.* 2014) e bromelina (OLIVEIRA *et al.* 2016) na interface das nanopartículas.

Poletto e colaboradores (2015) demonstraram que a presença do monoestearato de sorbitano no núcleo reduz a espessura da parede polimérica de poli(ϵ -caprolactona), ficando interpenetrado nela. Além disso, este componente também apresenta uma ação gelificante para os triglicerídeos de cadeia média. Desta forma, as nanocápsulas LNC passaram a ser definidas como um núcleo estruturado por um organogel envolto por uma parede polimérica.

3.4.2 Nanopartículas Teranósticas

Teranóstico é o termo utilizado atualmente para dispositivos farmacêuticos com capacidade simultânea de tratar e diagnosticar uma doença (WARNER, 2004). Em nanotecnologia oncológica isso reflete em um sistema particulado capaz de carrear um antitumoral até o local específico o qual ainda é capaz de auxiliar no diagnóstico e monitoramento da patologia. Essa abordagem é extremamente interessante, uma

vez que combina agentes de contraste para imagem e terapêutica guiada por imagem (SUMER e GAO, 2008).

O diagnóstico por imagem é um procedimento importante que iniciou através do uso do raios-X. Atualmente, associado a esse processo, é bastante comum o uso de algum tipo de agente de contraste, como o gadolínio, para melhorar a definição das imagens produzidas, tornando praticamente todos os métodos de imagem mais precisos, incluindo raios-X, ressonância magnética (RM) e, mais recentemente, ultrassonografia (US). Para ser eficaz, um agente de contraste na ressonância magnética deve exercer um forte efeito local nos tempos de relaxação da água (T1, T2). Além disso, deve apresentar propriedades farmacocinéticas apropriadas não sendo tóxico para o paciente. Uma das técnicas mais eficientes para alterar a relaxação da água é através do uso de um metal paramagnético como o ferro ou o gadolínio em solução (LAUFFER, 1989; CARAVAN *et al.*, 1999). Entretanto a administração direta desses íons é extremamente tóxica, sendo necessário quelar esses metais à um transportador para a administração (CACHERIS *et al.*, 1990).

Em 2000, Reynolds e colaboradores desenvolveram uma nanoesfera contendo em seu interior gadolínio quelado (diâmetro de 120 nm). Nesse estudo as nanopartículas contendo gadolínio (Gd^{3+}) demonstraram capacidade em reduzir os tempos de relaxamento *in vitro* da água, proporcionando um excelente contraste, quando utilizado para a imagem do coração e do trato gastrointestinal em modelo animal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matérias Primas

- Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (Código Aldrich: 440752) (polímero α,ω -dihidroxi funcionalizado; Mn: 10.000 g mol⁻¹, Mw: 14.000g mol⁻¹(Sigma-Aldrich, Brasil);
- Monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) (Código Aldrich: S7010) (Sigma-Aldrich, Brasil);
- Triglicerídeos cáprico e caprílico (Delaware, Brasil);
- Acetona (grau analítico) (Nuclear, Brasil);
- Etanol (grau analítico) (Nuclear, Brasil);
- Lecitina de soja (Lipoid[®] S75) (Lipoid, Alemanha);
- Ácido acético glacial (Tetia, Brasil);
- Tamoxifeno (Código Aldrich: T5648) (Sigma-Aldrich, Brasil);
- Água deionizada (resistividade de 18,2 M Ω), utilizada para preparar todas as soluções aquosas, obtida com um sistema Milipore Direct-Q[®];
- Polissorbato 80[®] (Delaware, Brasil);
- ChitoClear[®] FG95, Quitosana de baixo peso molecular, (MM: \approx 150 kDa, polímero 95% desacetilado, viscosidade 9CP) (Primex, Islândia);
- Acetato de zinco (II) (Código Aldrich: 379786) (Sigma-Aldrich, França);
- Cloreto de gadolínio (III) (Código Aldrich: 439770) (Sigma-Aldrich, Brasil);
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Vitrocell, Brasil);
- Meio Leibovitz L-15 (Vitrocell, Brasil);
- Meio RPMI 1640 (Vitrocell, Brasil);
- Soro fetal bovino (FBS) (Vitrocell, Brasil);
- Células MCF-7 (Banco de células do Rio de Janeiro, Brasil);
- Células MDA-MB-231 (Banco de células do Rio de Janeiro, Brasil);
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Dinâmica, Brasil);
- MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich, USA);
- Solução Tripsina-EDTA (Vitrocell, Brasil)

4.1.2 Aparelhos e equipamentos

- Agitador magnético - Fisaton® Mod. 752A (Brasil);
- Balança analítica APX-200, Denver Instrument (EUA);
- Mastersizer 2000 – Malvern Instruments Ltd. (Reino Unido);
- Zetasizer® Nano ZS – Malvern Instruments Ltd. (Reino Unido);
- Potenciômetro UB-10 – Denver (USA);
- Cromatografia líquida de alta eficiência – Shimadzu LC 20 A (Japão);
- Microscópio óptico Olympus BX41 – Olympus Optical Co. (Japan);
- Placas de cultura celular de 96 poços – SPL Life Sciences Co., Ltd. (Coreia);
- Microscópio Invertido Olympus CKX41– Olympus Optical Co. (Japan);
- Leitor de microplacas MR-96A – Mindray (China);
- Cabina de Fluxo Laminar TROX FLB – TROX do Brasil (Brasil);
- Estufa Revco – Thermo Electron Corporation (USA);
- Infravermelho Perkin Elmer Spectrum BX (ATR) (USA)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção das nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) e estudos de pré-formulação com quitosana

As formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico foram obtidas empregando a técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado pelo deslocamento de solvente, com adaptações (FESSI *et al.*, 1989, VENTURINI *et al.*, 2011, L, BENDER *et al.* 2014, POHLMANN *et al.*, 2013, MAYER *et al.*, 2014). Para isso, uma fase orgânica contendo poli(ϵ -caprolactona) (0,1 g), monoestearato de sorbitano (0,04 g) e triglicerídeos cáprico/caprílico (0,120 g), e acetona (25 mL) foi mantida sob agitação magnética à 40 °C, até solubilização completa dos componentes. Após, uma quantidade de lecitina de soja (0,06 g) foi solubilizada em etanol (4 mL) e essa solução etanólica de lecitina foi adicionada à fase orgânica, e esta, por sua vez, foi injetada através de um funil, em uma solução de polissorbato 80 (0,08 g) em água (50 mL). A suspensão obtida foi mantida sob agitação magnética, na temperatura ambiente e após 10 minutos, foi transferida a um balão de fundo redondo conectado a um evaporador rotativo para eliminar a acetona e o etanol, assim como concentrar a suspensão sob pressão reduzida na temperatura de 40 °C, até atingir um volume pouco abaixo de 10 mL. A suspensão final foi vertida em um balão volumétrico de 10 mL e completado com água ultrapura.

O revestimento das nanocápsulas de núcleo lipídico com quitosana foi realizado usando como referência o trabalho desenvolvido por Bender e colaboradores (2012), para determinar a melhor concentração de solução de quitosana empregada para o revestimento das LNC. Foram preparadas soluções aquosas de quitosana (ChitoClear[®] FG95) nas concentrações de 0,1%, 0,5%, 1,0%, 1,5% 2,0% e 2,5% (peso/volume), empregando ácido acético, nas mesmas concentrações da quitosana, para solubilizar o polímero. Um volume de 1 mL destas soluções foi adicionado, gota a gota, em 9 mL das suspensões de nanocápsulas obtidas, sob agitação magnética moderada e permanecendo assim durante 2 h.

As suspensões de nanocápsulas obtidas foram nomeadas de acordo com a concentração da solução do polímero catiônico usada para o revestimento da cada suspensão: 0,1% (LNCQ_{0,1}); 0,5% (LNCQ_{0,5}); 1,0% (LNCQ_{1,0}); 1,5% (LNCQ_{1,5}); 2,0%

(LNCQ_{2,0}); e 2,5% (LNCQ_{2,5}). Sendo que a formulação sem revestimento e usada como controle foi nomeada como LNC.

4.2.2 Estudos de pré-formulação com tamoxifeno e funcionalização de superfície das nanocápsulas

Após ter sido determinada a melhor concentração de solução de quitosana empregada para o revestimento das nanocápsulas de núcleo lipídico, foram realizadas novas formulações, então incluindo o tamoxifeno com os outros componentes da fase orgânica (antes de ser injetada na fase aquosa) e realizando o procedimento de geral de obtenção das LNC.

Inicialmente foram obtidas suspensões de nanocápsulas sem revestimento que foram nomeadas de acordo com a concentração empregada do fármaco: 0,25 mg/mL (LNC_{0,25T}); 0,50 mg/mL (LNC_{0,50T}); 1,00 mg/mL (LNC_{1,00T}); 1,50 mg/mL (LNC_{1,50T}) e 2,00 mg/mL (LNC_{2,0T}).

Após o revestimento com a solução de quitosana, o nome das suspensões de nanocápsulas foi trocado por LNCQ, mantendo o subíndice correspondente à concentração de tamoxifeno; por exemplo, a formulação LNC_{0,25T} revestida com solução de quitosana foi referenciada como LNCQ_{0,25T}.

A funcionalização da superfície das nanocápsulas foi realizada conforme descrito anteriormente (BENDER *et al.* 2014) e realizando diversas modificações. A todas as formulações, logo após o revestimento com quitosana, lhes foi adicionada lentamente uma solução de Zn²⁺ ou Gd³⁺ sob agitação a 500 rpm.

As suspensões de nanocápsulas funcionalizadas com Zn²⁺ foram preparadas visando uma concentração final de 25 µg/mL deste íon metálico e o nome das suspensões de nanocápsulas foi estabelecido como MLNC-Zn, mantendo o subíndice correspondente à concentração de tamoxifeno; por exemplo, a formulação LNCQ_{0,25T} funcionalizada com Zn²⁺ foi referenciada como MLNC-Zn_{0,25T}.

Novas suspensões de nanocápsulas incluindo o íon metálico Gd³⁺ foram preparadas com a concentração de 1mg/mL de tamoxifeno, escolhida nos estudos de pré-formulação das partículas funcionalizadas com o íon metálico Zn²⁺, sendo então determinada a concentração de Gd³⁺. As suspensões obtidas foram nomeadas de

acordo com a concentração do íon metálico empregada: 12,5 µg/mL (MLNC-Gd_{12,5}); 25,0 µg/mL (MLNC-Gd_{25,0}); 50,0 µg/mL (MLNC-Gd_{50,0}) e 100,0 µg/mL (MLNC-Gd_{100,0}).

4.2.3 Caracterização físico-química das nanocápsulas

As formulações foram caracterizadas de acordo com o teor e a eficiência de encapsulação do fármaco, pH, distribuição de diâmetros da partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, espectroscopia infravermelho e ORP. Os ensaios foram feitos em triplicata, usando três lotes diferentes para cada formulação.

4.2.3.1 Quantificação do fármaco

4.2.3.1.1 Validação do método CLAE para a quantificação do tamoxifeno

O método analítico para a quantificação do tamoxifeno foi validado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise foi realizada usando os parâmetros usados por Cavalli (2011) com adaptações e são apresentados na sequência.

Quadro 1. Parâmetros de análise por CLAE para o tamoxifeno.

Coluna	LiChrospher [®] 100 RP-18 (5 µm)
Fase móvel	Metanol:água:triethylamina (90:9:1 v/v)
Fluxo da fase móvel	1 mL/min
Comprimento de onda	265 nm
Tempo de análise	11 minutos
Tempo de retenção	7 minutos
Volume de injeção	20 µL

Os métodos utilizados foram validados de acordo com os parâmetros propostos na ICH Q2 (R1) (1996) e ANVISA (2017). Os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, exatidão, repetibilidade, precisão intermediária, limite de detecção e limite de quantificação.

Para avaliar a linearidade foram elaboradas três curvas de calibração com 6 níveis de concentração (1 a 30 µg/mL). Foram determinados o coeficiente de correlação (R) e a equação da reta. Para calcular o limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foi usada a relação matemática entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, como sugerido pela norma ICH (1996) e expressado nas equações 1 e 2.

$$LD = \frac{3,33 \times DP}{B}$$

(Equação 1)

$$LQ = \frac{10 \times DP}{B}$$

(Equação 2)

Onde: DP é o desvio padrão da reta de calibração e B é o coeficiente angular da reta de calibração.

A precisão intermediária e repetibilidade foram avaliadas na concentração de 15 µg/mL, realizando oito injeções de diferentes amostras preparadas por dois analistas em dois dias diferentes. O desvio padrão relativo (DPR) foi calculado posteriormente.

A exatidão foi calculada uma vez que a precisão, linearidade e especificidade foram estabelecidas (ICH, 1996).

A determinação da especificidade foi realizada adicionando o tamoxifeno às formulações de nanopartículas contendo todos os ingredientes exceto o fármaco (nanopartículas branca), e este foi posteriormente quantificado.

4.2.3.1.2 Teor

A extração do tamoxifeno das formulações de nanocápsulas foi realizada adicionando uma alíquota 150 µL das formulações em um balão volumétrico, completando um volume final de 10 mL com acetonitrila. Após 10 minutos de sonicação, a solução obtida é filtrada (filtro, Sartorius Stedim, 0,45 µm, Biotech, Alemanha) e é injetada no sistema CLAE para a sua quantificação.

4.2.3.1.3 Eficiência de encapsulação

A técnica utilizada para a determinação da eficiência de encapsulação foi a ultrafiltração-centrifugação (Ultrafree[®], Millipore). 300 µL das formulações foram adicionados na unidade filtrante Ultrafree[®] e centrifugados (4000 RPM, 1180 G por 5 min). O ultrafiltrado é injetado diretamente no equipamento de cromatografia a liquido e o fármaco quantificado conforme descrito acima. Todas as medições foram realizadas em triplicata (n=3). A concentração de fármaco contida nas nanocápsulas foi calculada pela equação seguinte:

$$EE\% = \frac{CT - CL}{CT} \times 100$$

(Equação 3)

Onde CT é a concentração total do tamoxifeno após a extração e CL é a concentração do tamoxifeno no ultrafiltrado (tamoxifeno livre).

4.2.3.1.4 Determinação da distribuição do tamoxifeno nas suspensões de nanocápsulas

A técnica de ultrafiltração-centrifugação foi empregada novamente para propor uma distribuição do tamoxifeno nas suspensões de nanocápsulas. Foram empregadas misturas de suspensões de nanocápsulas com solventes nas proporções de 1:1 para o solvente metanol e de 1:9 para uma solução de ácido acético 10% (suspensão de nanocápsulas:solvente). Posteriormente, as misturas foram adicionadas na unidade filtrante Ultrafree[®] e centrifugados (4000 RPM, 1180 G por 5 min). O ultrafiltrado é injetado diretamente no equipamento de cromatografia a liquido e o fármaco quantificado.

4.2.3.2 Determinação por ponteciometria

4.2.3.2.1 Análise do pH

Os valores do pH foram determinados utilizando o potenciômetro UB-10, previamente calibrado, usando soluções tampão com pH 4,0 e 7,0. A obtenção do pH foi realizada diretamente nas formulações contendo suspensões de nanocápsulas (em triplicata).

4.2.3.2.2 Determinação do potencial óxido-redução (ORP)

Os valores do ORP foram determinados utilizando o potenciômetro UB-10, previamente calibrado, as medições foram realizadas diretamente nas formulações contendo suspensões de nanocápsulas (em triplicata).

4.2.3.3 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanocápsulas

As formulações foram analisadas por difração a laser, cujas as medidas foram realizadas no Mastersizer[®] 2000. As amostras foram colocadas diretamente na unidade de dispersão úmida sem tratamentos prévios (filtração ou centrifugação). O diâmetro médio sob a distribuição de volume ($d_{4,3}$) e o diâmetro mediano da curva em volume cumulativo ($d_{0,5}$) foi determinado empregando-se a Teoria Mie. A distribuição do tamanho foi obtida como valor SPAN. Equação 4

$$Span = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}}$$

(Equação 4)

Onde $d_{0,9}$ e $d_{0,1}$ são os diâmetros do 90% e 10% dos volumes cumulativos, respectivamente.

As formulações de nanocápsulas também foram caracterizadas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons (PCS). As medidas foram realizadas no Zetasizer[®] Nano ZS (Malvern) a 25 °C. As amostras foram diluídas em água MilliQ[®]

para determinação de diâmetro. O diâmetro hidrodinâmico das nanocápsulas foi medido usando a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) no ângulo de 173° na temperatura ambiente, 25 °C. A função de correlação foi analisada pelo método de cumulantes e o algoritmo de CONTIN. O método de cumulantes possibilita a determinação do diâmetro médio hidrodinâmico (z-average) a partir do ajuste da função de autocorrelação (taxa de decaimento médio), assim como a determinação do índice de polidispersão Equação 5.

$$PDI = \frac{\mu_2}{\Gamma^2}$$

(Equação 5)

Onde Γ^2 e μ_2 representam a taxa de decaimento médio e sua variância, respectivamente. O algoritmo de CONTIN fornece o tamanho médio das partículas e a distribuição de tamanho.

Para a determinação de potencial zeta, as formulações foram diluídas em uma solução aquosa de cloreto de sódio 0,01 mol L⁻¹. Em ambos os casos, os meios de diluição foram filtrados em filtro de 0,45 µm antes da análise, porém cada amostra foi analisada diretamente sem filtração ou outro tratamento para evitar seleção da amostra.

Cada análise foi corrida 20 vezes para a determinação do potencial zeta e 10 vezes para a medida do diâmetro. Os valores médios foram obtidos considerando análises por triplicada de lotes. Os valores médios de largura de distribuição do tamanho foram calculados pelo software Dispersion Technology Software, versão 4.00.2002, de Malvern Instruments Ltd.

4.2.3.4 Espectroscopia no infravermelho (ATR)

O espectro de refletância total atenuada (ATR) foi gerado usando um espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum BX. Antes das medições, o espectro do branco (*background*) foi obtido e posteriormente subtraído do espectro das amostras de nanocápsulas. Todas as amostras foram depositadas diretamente no equipamento e analisadas em uma faixa de 4000 a 600 cm⁻¹. Foram realizadas 16 medições (*scans*) para cada amostra, em uma resolução de 2 cm⁻¹.

4.2.4 Avaliação das formulações inibindo a proliferação de células com câncer de mama humano

Os experimentos foram desenvolvidos em parceria com o Laboratório de Biotecnologia do Câncer, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas.

4.2.4.1 Cultivo celular

As células de câncer de mama, linhagem MCF-7 (estrogênio dependente), e MDA-MB-231 (não estrogênio dependente), foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI 1640 e soro fetal bovino (SFB) ao 20% v/v, e foram introduzidas em uma estufa com uma atmosfera contendo 95% de ar umidificado e 5% de CO₂, conservando uma temperatura de 37 °C. As células MDA-MB-231 foram cultivadas no meio Leibovitz L-15, soro fetal bovino (SFB) ao 10% v/v e 0,2 mg/mL de bicarbonato de sódio e cultivadas em uma temperatura de 37 °C. Os experimentos foram realizados com as células em fase logarítmica de crescimento.

4.2.4.2 Determinação da citotoxicidade por MTT

As suspensões de células previamente cultivadas foram preparadas em uma densidade de 2×10^4 células por poço e distribuída em uma placa de cultura de 96 poços. As placas foram incubadas a 37 °C, (95% de umidade e 5% de CO₂ para as MCF-7) por 24 h. Após o meio foi aspirado e substituído por volumes iguais (200 µL por poço) de meio condicionado contendo diferentes concentrações das formulações MLNC-Zn_{1,00T}, MLNC-Gd₂₅ e fármaco livre assim: 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM e 100 µM de tamoxifeno. Nos poços controles foram adicionados 200 µL por poço de meio com uma concentração de DMSO correspondente à utilizada na diluição da solução de 100µM de tamoxifeno durante os períodos de 24, 48 e 72 h. Após a remoção dos materiais experimentais, 100 µL por poço de meio (90%) e MTT (10%) foram adicionados em cada poço e mantido na incubadora por 3 h a 37 °C. Então o meio contendo MTT foi aspirado e 200 µL por poço de DMSO foram adicionados a

cada poço e mantido em agitação por 15 minutos. Subsequentemente, foi medida a absorvância usando um leitor de microplacas com um comprimento de onda de 492 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). A porcentagem de inibição da proliferação celular foi determinada com a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(1 - A^{492} \text{ células tratadas})}{A^{492} \text{ células controle}} \times 100$$

(Equação 7)

4.2.5 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como valores médios \pm desvios-padrão. O método estatístico utilizado para analisar os resultados foi o ANOVA, seguido pelo teste Tukey, quando as diferenças foram consideradas significativas ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE QUITOSANA PARA O REVESTIMENTO DAS NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO (LNC)

As nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) são constituídas por um sistema composto por um núcleo organogel estruturado de monoestearato de sorbitano e triglicerídeos cáprico e caprílico, rodeado por uma parede polimérica de poli(ϵ -caprolactona) e com lecitina na interface pseudofase. O polissacarídeo quitosana foi usado como material de revestimento.

Para a solubilização da quitosana foi necessário um meio ácido que permitisse a protonação dos grupos aminas, causando repulsões eletrostáticas nas cadeias do polímero, gerando assim a solvatação deste polímero. A estratégia empregada foi *layer-by-layer*, que é baseada na interação eletrostática entre os grupos amina (NH_3^+) da quitosana e os grupos fosfato (PO_3) do ácido fosfatídico da lecitina de soja, presente na superfície aniônica das formulações de nanocápsulas (MUCHA, 1997; MOSQUEIRA *et al.*, 2000; CHUAH *et al.*, 2009)

O grau de desacetilação e peso molecular da quitosana, são os principais fatores que influenciam o comportamento e a qualidade do polímero, alterando as propriedades biológicas, físicas e químicas (WU *et al.*, 1976; HWANG e DAMODARAN, 1995). As moléculas de quitosana com maior grau de desacetilação (DD) são mais solúveis e diminuem a formação de agregados em soluções ácidas (MUCHA, 1997). Altos valores de DD aumentam a estabilidade nas cadeias do polímero, já que a quitosana com DD alto possui uma estrutura menos porosa e a repulsão eletrostática entre grupos amina protonados é menor, promovendo assim menor penetração da solução ácida dentro da estrutura polimérica. Essas cadeias se tornam altamente carregadas, o que permite uma conformação alargada dos grupamentos desacetilados, relacionando-se com uma maior flexibilidade o que possibilitaria um maior acoplamento na superfície das nanocápsulas (ERRINGTON *et al.*, 1993; NGUYEN *et al.*, 2008).

Tendo em conta o exposto anteriormente, foi desenhado um novo estudo de pré-formulação para determinar a melhor concentração de uma solução da quitosana ChitoClear[®] FG95 com um grau de desacetilação de 95% (o mais alto grau disponível), que permitisse o melhor revestimento das nanopartículas de núcleo lipídico e usando como referência o trabalho desenvolvido por Bender e colaboradores (2012).

Por meio da observação macrométrica, foi evidenciada que todas as formulações elaboradas se apresentaram homogêneas, com efeito Tyndall¹, indicando a presença das nanoestruturas. Após medir o perfil granulométrico, foi evidenciada uma reprodutibilidade para quase todos os lotes elaborados e demonstrando a presença de população micrométrica somente nas formulações de nanocápsulas contendo uma solução de quitosana a 0,1% (LNCQ_{0,1}). A formulação de nanocápsulas preparadas sem quitosana, assim como as que a continham concentração igual ou superior a 0,5% mostraram um perfil granulométrico (por volume) monomodal com estreita distribuição de tamanhos (SPAN igual a 1) (Figura 3). Os diâmetros médios ponderados por volume (D_{4,3}) foram calculados entre 124 nm e 720 nm (Tabela 1).

¹ Efeito de espalhamento de luz em uma dispersão coloidal.

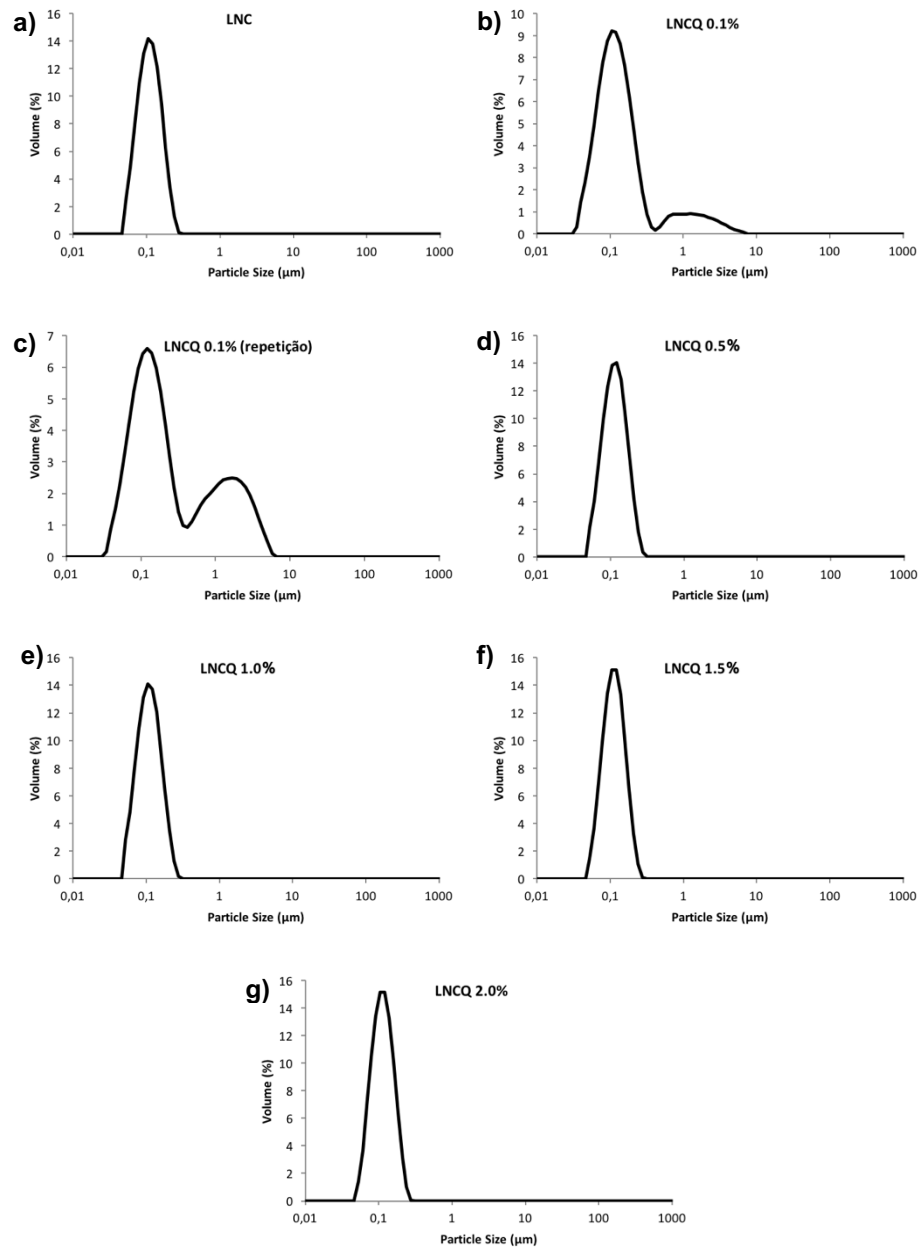


Figura 3. Representação gráfica obtida por difração laser da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNC; b) LNCQ_{0,1}; c) LNCQ_{0,1} repetição; d) LNCQ_{0,5}; e) LNCQ_{1,0}; f) LNCQ_{1,5}; g) LNCQ_{2,0}.

A melhor forma de determinar a presença de população micrométrica em uma suspensão de nanocápsulas mediante a difração de laser é a análise dos valores de $D_{4,3}$ por volume, o qual representa o tamanho médio das partículas, equivalente a uma esfera (MALVERN; JONES, 2003).

Os valores dos diâmetros nos percentis 10, 50 e 90 sob as curvas de distribuição por volume e por número ($d_{0,1}$, $d_{0,5}$, e $d_{0,9}$) são usados na elaboração dos gráficos radar; uma estratégia que permite a caracterização das impressões digitais das formulações de nanocápsulas nos estudos de pré-formulação (BIANCHIN *et al.*, 2015).

A presença de população microscópica nas formulações contendo 0,1% de quitosana mostram perfis polimodais o que é evidenciado no gráfico radar. Enquanto que as formulações elaboradas, sem quitosana e contendo este polímero acima de 0,5% em concentração, mostraram perfis monomodais (Figura 4).

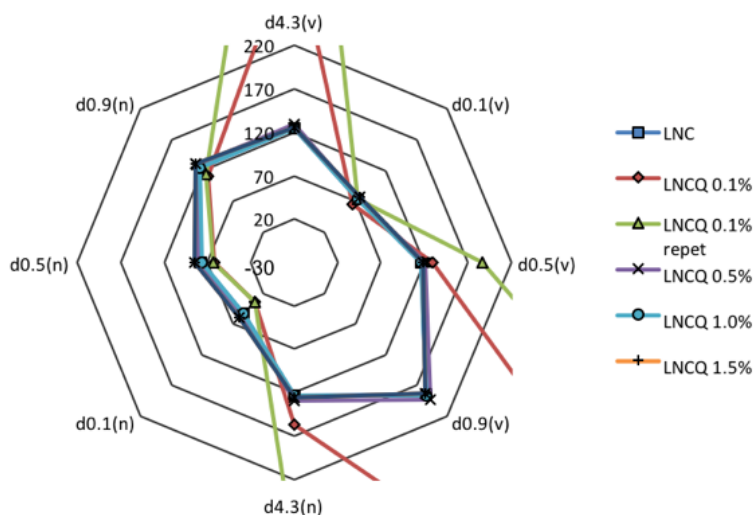


Figura 4. Gráfico radar das formulações preliminares

A área superficial específica (SSA) é a área total das partículas dividido pelo peso total.

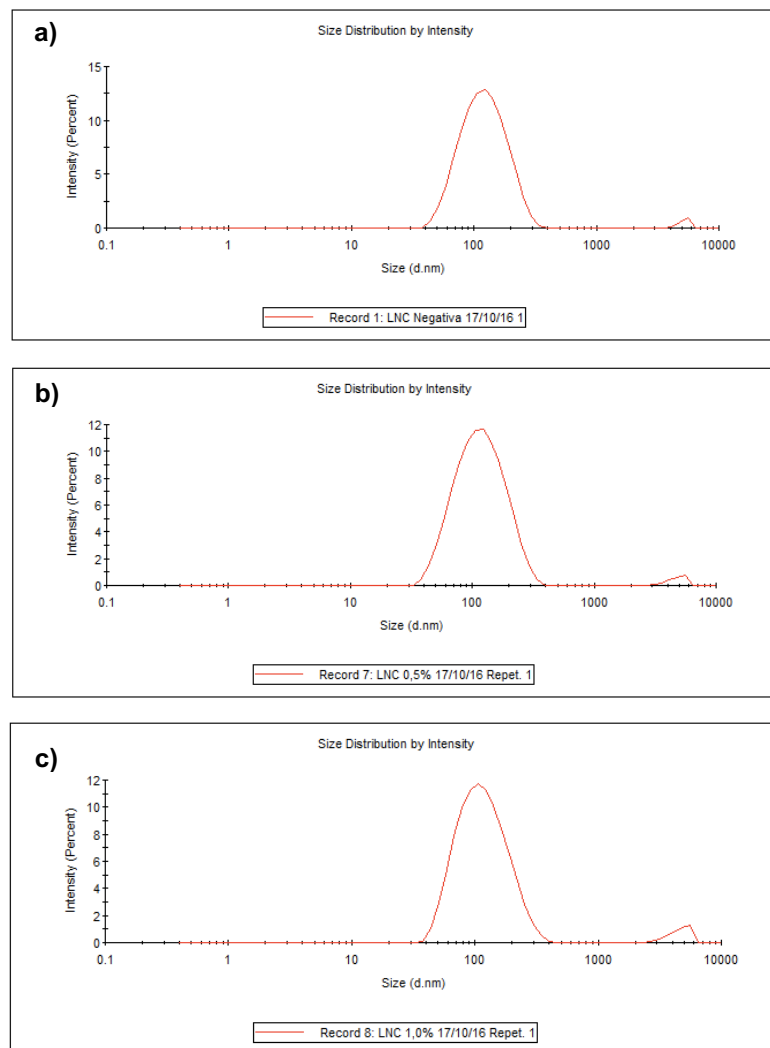
$$SSA = \frac{6 \sum \frac{V_i}{d_i}}{p \sum V_i} = \frac{6}{pD[3,2]}$$

(Equação 8)

Onde V_i é o volume relativo em classe i com diâmetro médio de d_i e p é a densidade de partícula. Para a realização da SSA, é importante que a densidade dos materiais seja definida. Este valor é um cálculo matemático com base no pressuposto de que as partículas são esféricas e não porosas com densidade unitária (Mastersizer Nano

Series, User Manual). Os valores obtidos para a SSA foram de $37,8 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para a LNCQ_{0,1} (formulação com população micrométrica) e de valores próximos a $50,0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para as demais formulações (Tabela 1). Levando em consideração a análise dos todos resultados obtidos na técnica de difração laser, foi descartada a formulação LNCQ_{0,1}, razão pela qual não foi realizada a medição do diâmetro hidrodinâmico das partículas por meio do espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Os resultados obtidos por DLS são apresentados na Figura 5. Os diâmetros médios (z-average) foram determinados entre 108 nm a 114 nm com índices de polidispersão entre 0,2 e 0,3 (Tabela 1).



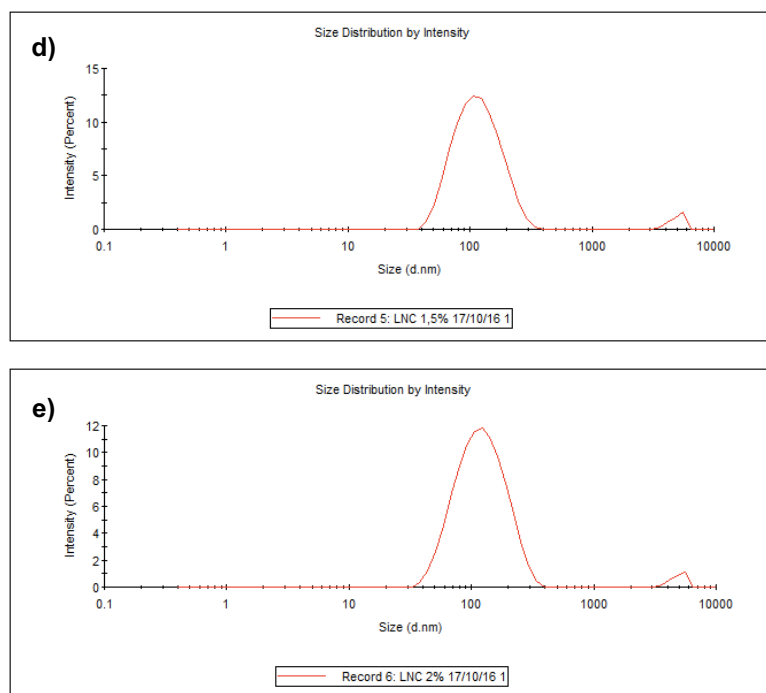


Figura 5. Representação gráfica obtida por espalhamento de luz dinâmico da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNC; b) LNCQ 0,5%; c) LNCQ 1,0%; d) LNCQ 1,5%; e) LNCQ 2,0%.

Cinco novas formulações, totalizando três lotes por cada concentração, foram preparadas, incluindo uma concentração de quitosana a 2,5%, usando soluções de quitosana de 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0% e 2,5% (p/v); cada uma de elas foi mantida sem revestimento e foi nomeada como LNC. O propósito destas novas formulações foi otimizar o revestimento das LNC com a quitosana e determinar a influência da concentração desse polímero nas propriedades físico-químicas e na estabilidade cinética das formulações.

Tabela 1. Caracterização inicial de tamanho de partícula das suspensões de nanocápsulas por diferentes técnicas.

Formulação	Difração de laser*			Espalhamento de luz dinâmico**	
	Diâmetro	SPAN	SSA (m ² /g)	Z-average	Pdl
	D _{4,3} (nm)			diâmetro	
LNC	124	0,971	52,3	114	0,230
LNCQ _{0,1}	343	5,621	52,0	***	***
LNCQ _{0,1} (repetição)	720	11,76	37,8	***	***
LNCQ _{0,5}	129	0,974	52,8	108	0,210
LNCQ _{1,0}	124	0,977	55,0	110	0,244
LNCQ _{1,5}	126	0,898	53,1	113	0,257
LNCQ _{2,0}	126	0,897	53,2	112	0,237

Nota: *Valores obtidos pela análise de volume. **Valores obtidos pela análise de intensidade.

*** Não foi realizado por apresentar pico micrométrico com a técnica de difração de laser.

O perfil granulométrico das formulações e o tamanho das partículas foi medido pela técnica de difração de laser, mostrando uma reprodutibilidade entre os lotes elaborados e demonstrando a ausência de população micrométrica em todas as suspensões de nanocápsulas. Todas as suspensões mostraram um perfil granulométrico (por volume) monomodal com estreita distribuição de tamanho (SPAN igual a 1) (Figura 6). Os diâmetros médios ponderados por volume (D_{4,3}) apresentaram-se entre 126 e 131 nm (Tabela 2), evidenciando-se que após o revestimento das LNC com a quitosana nas concentrações trabalhadas (0,5 % p/v - 2,5 % p/v) não ocorreu precipitação ou aglomeração das nanocápsulas, gerando uma possível população micrométrica. Foi demonstrado que após o revestimento com a quitosana, o diâmetro das nanocápsulas não incrementou, evidenciando-se que a concentração de quitosana não influenciava no tamanho final da partícula ($p < 0,05$), mantendo-se ainda na escala nanométrica (Tabela 2). Também foi observada uma melhor reprodutibilidade intralote para as formulações entre 1,0% e 2,0% (Figura 6).

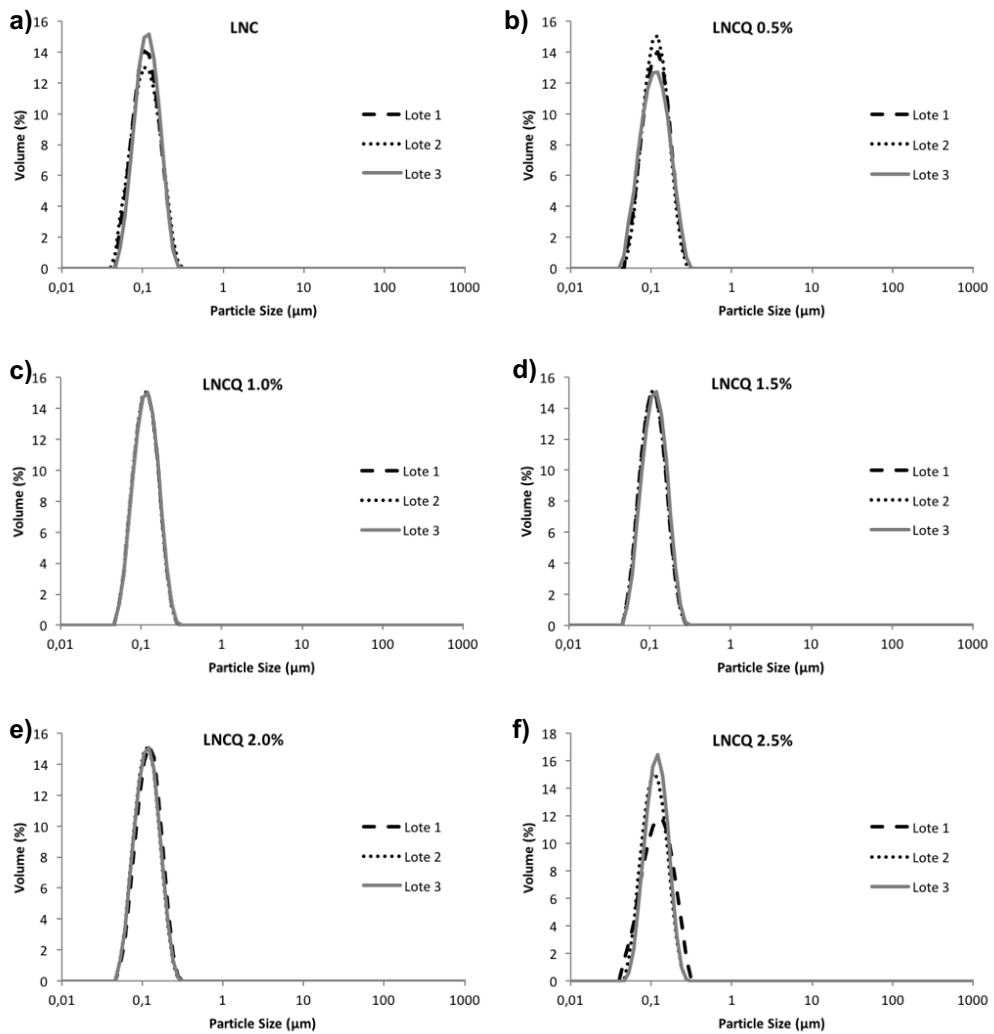


Figura 6. Representação gráfica obtida por difração laser da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNC; b) LNCQ 0,5%; c) LNCQ 1,0%; d) LNCQ 1,5%; e) LNCQ 2,0%; f) LNCQ 2,5%.

Três gráficos radar foram elaborados e analisados para caracterizar formulações de nanocápsulas, mostrando que as formulações têm impressões digitais similares, evidenciando-se um leve deslocamento com as formulações que tem as soluções de quitosana mais concentradas (LNCQ_{2,0} e LNCQ_{2,5}) como também foi descartada a presença de população microscópica nas formulações e conservando perfis monomodais (Figura 7).

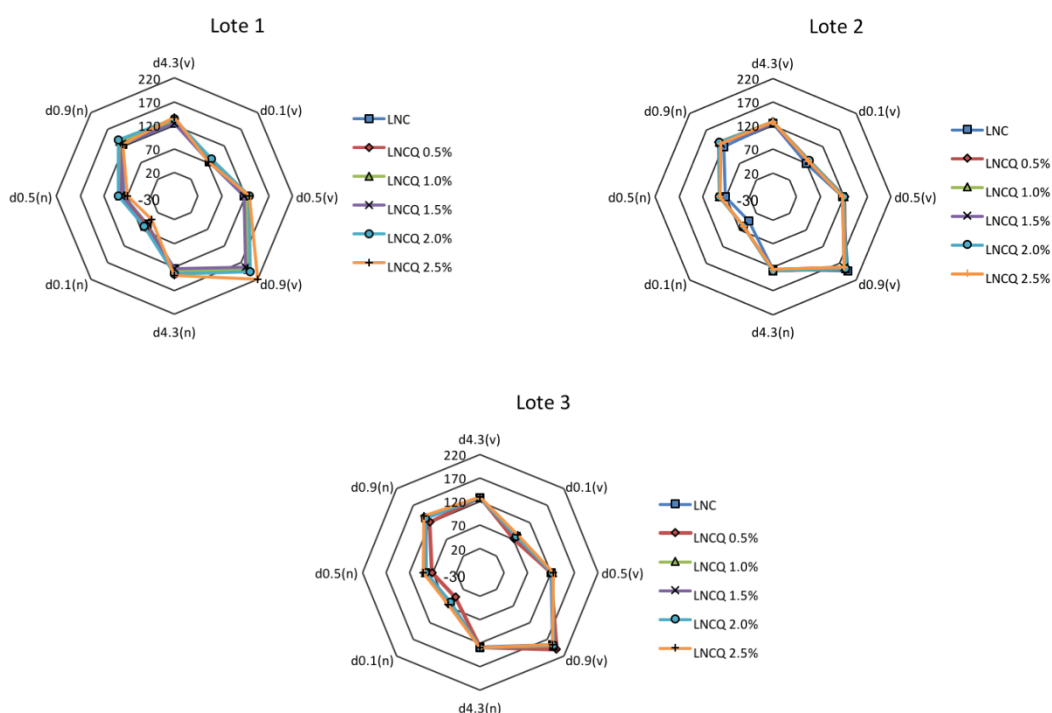
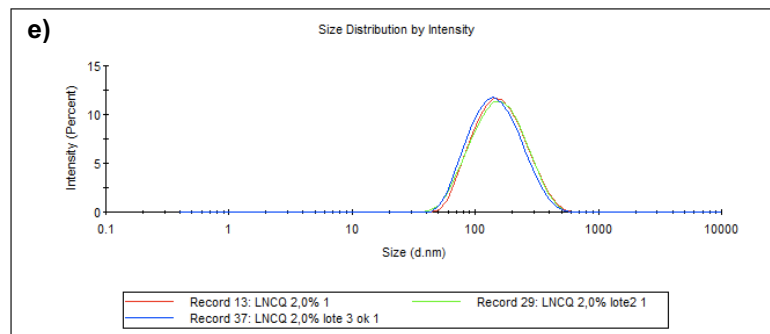
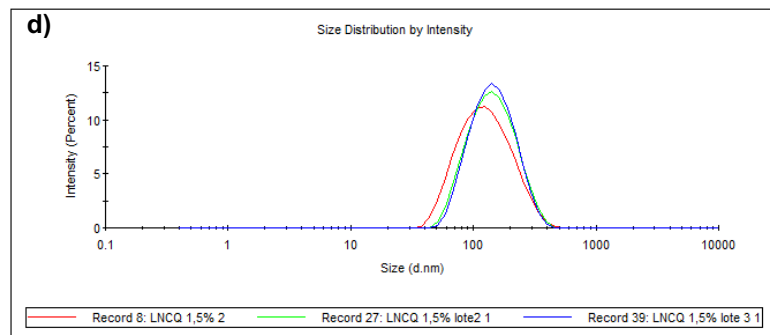
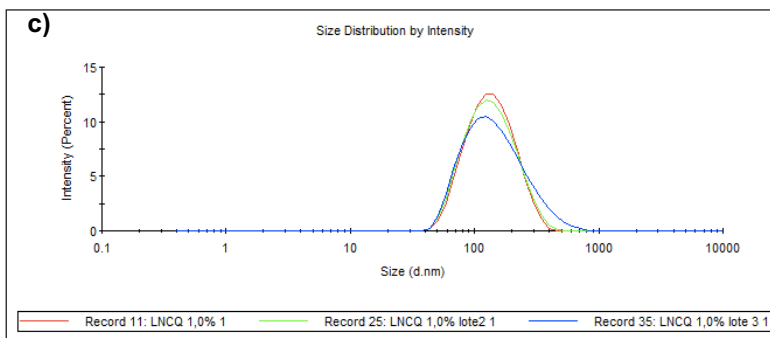
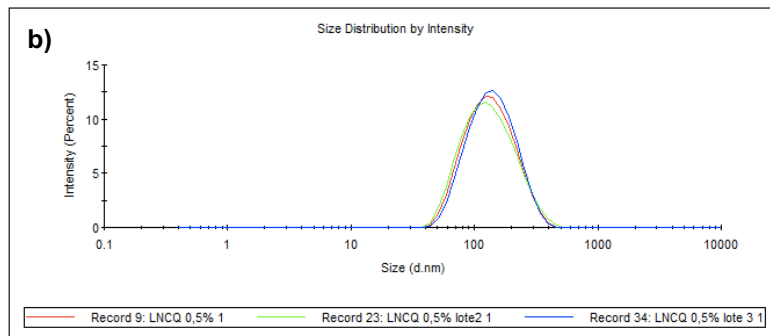
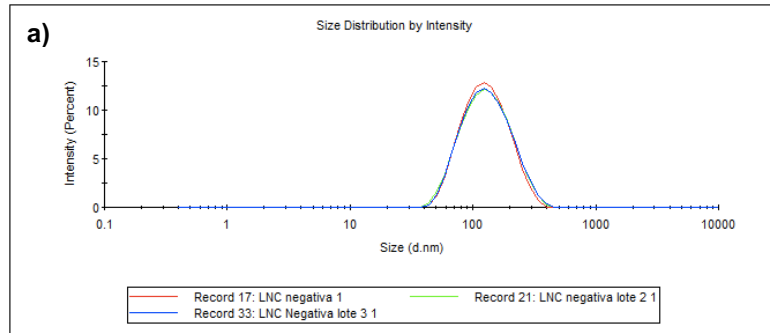


Figura 7. Gráfico radar dos três lotes de formulações revestidas com diferentes concentrações de quitosana.

O diâmetro hidrodinâmico² das nanocápsulas foi determinado usando a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Figura 8), calculado a partir da função de correlação (Figura 9) da intensidade de luz espalhada pelas partículas, demonstrando a ausência de população micrométrica.

O DLS evidenciou diâmetros médios (z-average) de 116 a 142 nm, com índices de polidispersão entre 0,2 e 0,5 (Tabela 2), assemelhando-se aos valores obtidos com a técnica de difração de laser, após o revestimento com a quitosana, e mostrando também um relativo aumento do diâmetro na suspensão com maior concentração de quitosana, porém mantendo-se a homogeneidade nos tamanhos de partícula, ainda na escala nanométrica.

² É o tamanho de uma esfera hipotética que difunde do mesmo jeito que a partícula medida.



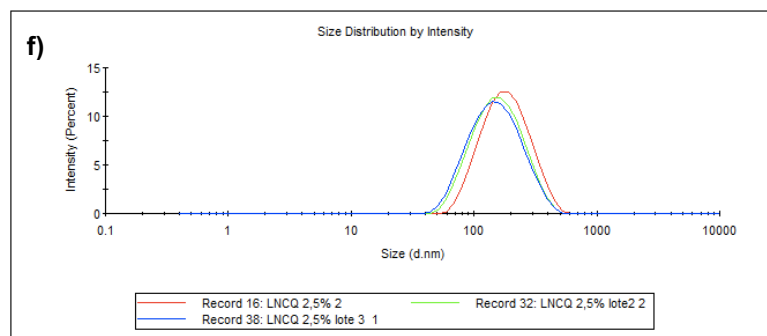


Figura 8. Representação gráfica obtida por espalhamento de luz dinâmico da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNC; b) LNCQ 0,5%; c) LNCQ 1,0%; d) LNCQ 1,5%; e) LNCQ 2,0%; f) LNCQ 2,5%.

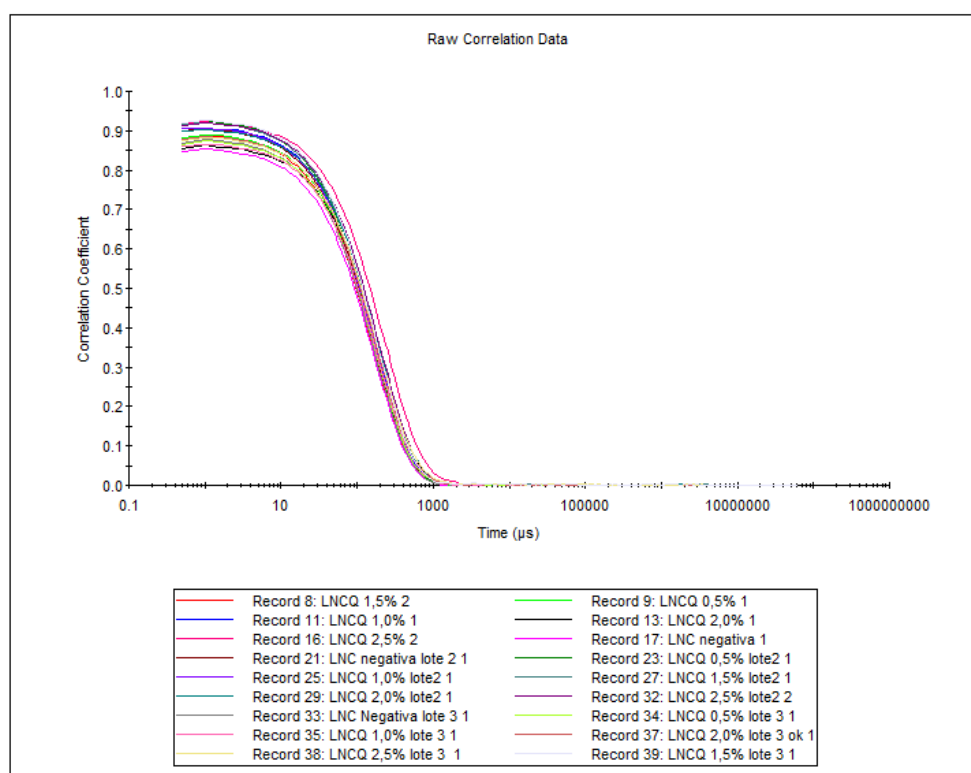


Figura 9. Função de correlação obtida por espalhamento de luz dinâmico das suspensões de nanocápsulas.

Os perfis de distribuição de tamanho por intensidade, mostraram populações monomodais, conservando a reprodutibilidade entre todos os lotes das diferentes formulações, conforme esperado a partir de dados de estudos anteriores (BENDER *et al.*, 2012). Além disso, a análise dos resultados obtidos para a SSA mostrou valores muito próximos entre todas as formulações, corroborando a ausência de população micrométrica (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização inicial de tamanho de partícula das suspensões de nanocápsulas por diferentes técnicas.

Formulação	Difração de laser*			Espalhamento de luz dinâmico**	
	Diâmetro	SPAN	SSA	Z-average	Pdl
	D _{4,3} (nm)				
LNC	126±2	1,0±0,1	51,6±1,2	116±1	0,2±0,0
LNCQ _{0,5}	129±1	1,0±0,1	52,9±0,9	120±0	0,2±0,0
LNCQ _{1,0}	129±0	1,0±0,0	52,2±0,3	122±0	0,2±0,0
LNCQ _{1,5}	126±2	0,9±0,0	53,4±1,0	122±0	0,2±0,0
LNCQ _{2,0}	130±3	1,3±0,5	51,6±1,1	133±0	0,5±0,4
LNCQ _{2,5}	131±6	1,0±0,1	52,3±1,4	142±0	0,2±0,0

Nota: Os valores são mostrados como média ± desvio padrão; n=3. * Valores obtidos pela análise de volume. ** Valores obtidos pela análise de intensidade.

O pH é uma medida da acidez ou alcalinidade de uma solução aquosa. As reações químicas que ocorrem na água dependem da acidez desta; razão pela qual a determinação dos valores do pH foi crucial em nosso estudo, evidenciando-se valores para as LNC de 6,50; sendo que as LNCQ apresentaram valores de pH de 4,66 até 4,92 (Tabela 3). A maior acidez relativa encontrada nas partículas contendo quitosana está relacionada com a presença do ácido acético usado para solubilizar esse polissacarídeo. Sendo evidenciada maior acidez nas formulações com maiores concentrações de soluções de quitosana, isto devido a que foram necessários mais íons para a protonação dos grupos amina presente neste polissacarídeo, sendo necessário o aumento da concentração do ácido acético, incrementando também os íons hidrônio (H₃O⁺) livres em solução.

O potencial zeta é a medida da proporção da repulsão ou atração eletrostática ou de cargas entre partículas. Apesar de ser descrito na literatura que para outros tipos de formulações a estabilidade no sistema coloidal está relacionada com a obtenção de altos valores de potencial zeta, garantindo assim as repulsões das cargas entre as partículas nas formulações. Estudos recentes demonstraram que a presença de surfactantes não-iônicos como o polissorbat 80 permite uma manutenção da estabilidade cinética das nanocápsulas, sem a necessidade de altos valores do

potencial zeta. Essa diferença é atribuída à estabilização que se dá por meio do impedimento estérico, através da interação e ordenamento das cadeias hidrofílicas (DELAZI, 2011; FIEL *et al.*, 2013).

Foram realizadas duas medições de potencial zeta por lote (n=6) de cada uma das concentrações testadas. As LNC mostraram resultados negativos (-11 mV) enquanto as LNCQ um potencial zeta positivo entre 3 e 17 mV (Tabela 3). Os valores negativos de potencial zeta, observados nas LNC, são devido aos oxigênios pertencentes na parte do ácido fosfórico da lecitina de soja, presente na superfície dos sistemas coloidais. Enquanto que a inversão do potencial zeta, observada em todas as LNCQ, é devido as cargas positivas produzidas pela protonação dos grupos aminas da quitosana, por meio da adição do ácido acético usado para solubilizar este polímero.

Os estudos de otimização da concentração de quitosana para o revestimento das capsulas de núcleo lipídico (LNC) revelaram uma importante relação entre os valores de potencial zeta e a concentração da solução de quitosana adicionada às LNC para seu revestimento. Observou-se um incremento dos valores de potencial zeta com o aumento na concentração da solução de quitosana adicionada.

Tabela 3. Valores de Potencial Zeta e pH para as suspensões de nanocápsulas.

Formulação	pH	Potencial Zeta (mV)
LNC	6,50±0,02	-10,53±1,91
LNCQ_{0,5}	4,92±0,05	3,01±1,15
LNCQ_{1,0}	4,77±0,02	8,50±0,80
LNCQ_{1,5}	4,74±0,04	14,18±1,28
LNCQ_{2,0}	4,76±0,03	14,68±1,36
LNCQ_{2,5}	4,66±0,02	16,52±2,92

Relacionando os valores de potencial zeta, usando a equação da reta, evidenciou-se a relação dos resultados de perfil granulométrico por meio de difração de laser, obtidos nos estudos preliminares na concentração de quitosana 0,1 % (p/v); onde mostrou-se a presença de população micrométrica e uma distribuição de tamanho

polimodal, devido a valores do potencial zeta próximos a zero, permitindo assim a diminuição das repulsões entre as partículas suspensas em meios aquosos, gerando fenômenos como floculação ou agregação.

Tendo em conta os perfis granulométricos obtidos por difração de laser e os diâmetros hidrodinâmicos por DLS, não houve diferença significativa entre as formulações, razão pela qual foi necessário plotar os valores do potencial zeta *versus* a concentração de quitosana (duas medições por cada lote), observou-se uma inflexão que deu origem a duas retas (Figura 10). Dessa forma, gerou-se duas equações de retas que foram igualadas, a fim de se determinar o exato ponto de inflexão, o qual corresponderia a concentração ideal de quitosana na formulação, ou seja, a concentração equivalente ao valor ideal de quando os grupos aminas livres da quitosana se ligam completamente às cadeias do ácido fosfórico da lecitina na superfície das nanopartículas. Na realidade o que se observa é uma diminuição da resposta em função do aumento da concentração, ou seja, por mais quitosana que se adicione à formulação, são observadas pequenas alterações para o potencial zeta. Dessa forma, os cálculos indicaram que a concentração média no ponto de inflexão foi de 1,5%.

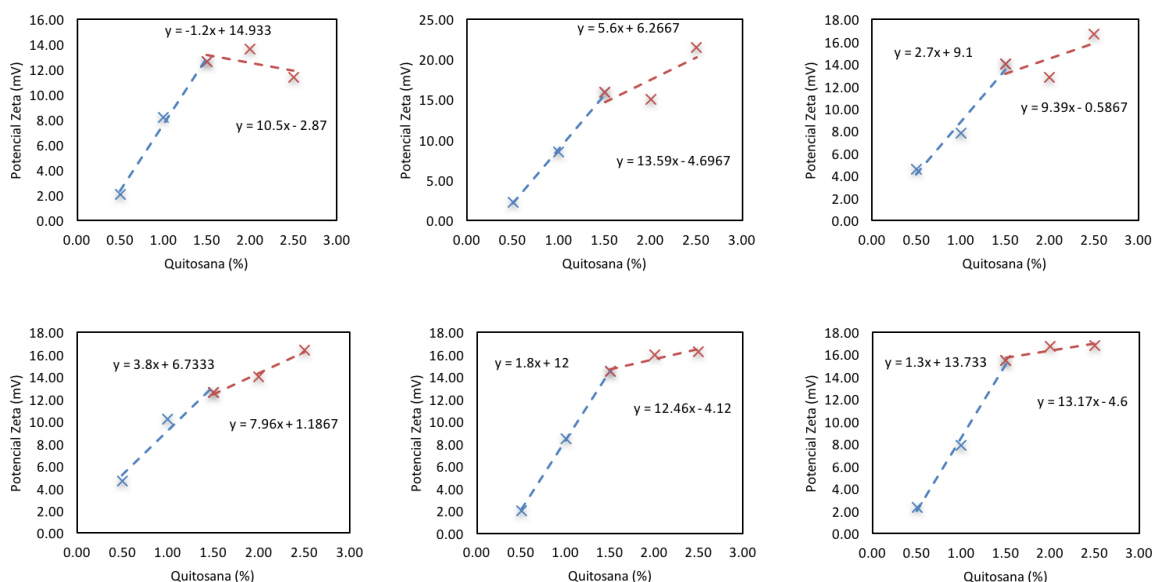


Figura 10. Valores individuais de potencial zeta em função da concentração de quitosana nas formulações revestidas com o polímero catiônico.

Também esses valores foram plotados como a média (Figura 11), corroborando-se os valores obtidos individualmente e obtendo-se um valor geral de 1,5%.

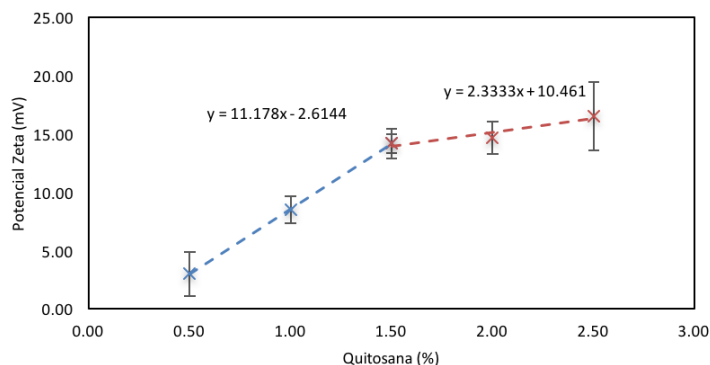


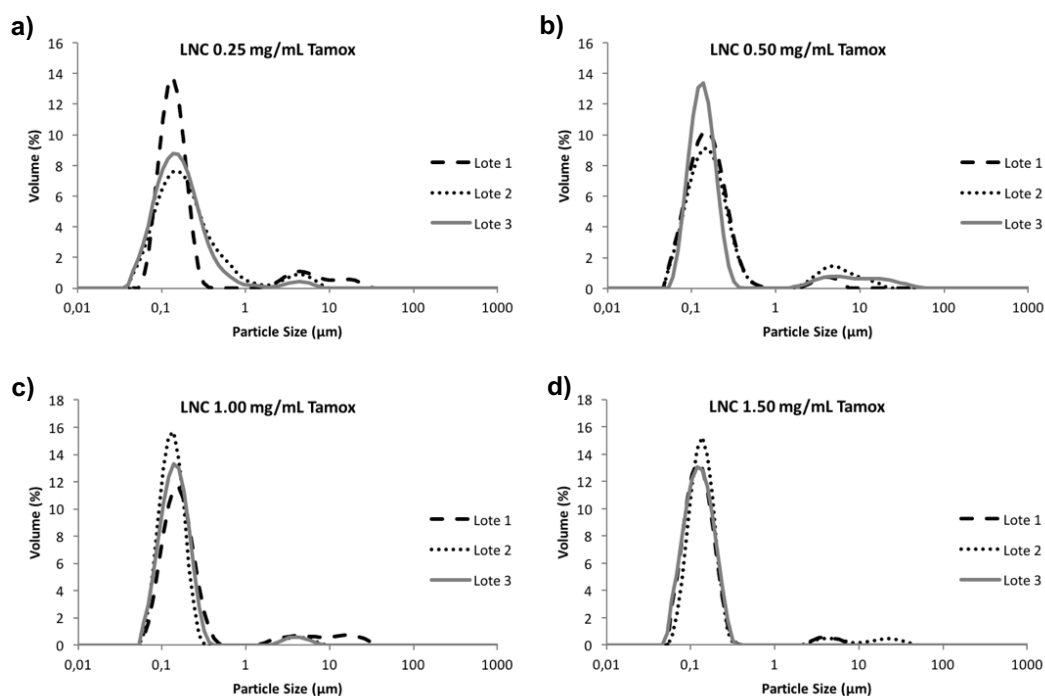
Figura 11. Valores médios de potencial zeta em função da concentração de quitosana nas formulações revestidas com o polímero catiônico.

Por outro lado, foi avaliada a significância estatística ($p < 0,05$) dos valores de potencial zeta para todas suspensões, e foi evidenciado que formulações que apresentaram maior influência no aumento do potencial zeta foram até a LNCQ_{1,5}, a partir dessa concentração não há incremento proporcional do potencial zeta, mostrando ausência de significância estatística. Desta forma foi escolhida a solução de 1,5% de quitosana como a melhor concentração para o revestimento das nanocápsulas de núcleo lipídico; embora essa concentração seja diferente daquela determinada no estudo de Bender e colaboradores (1%), é importante ressaltar que no presente estudo a quitosana utilizada é de baixo peso molecular (ChitoClear[®] FG95), o que poderia explicar a necessidade de maior quantidade deste polímero para conseguir um revestimento total das partículas.

5.2 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO COM TAMOXIFENO E FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE DAS NANOCÁPSULAS

Após estabelecer a solução de quitosana de 1,5% como a concentração necessária para o completo revestimento das nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC), foram preparadas novas formulações empregando cinco concentrações diferentes do fármaco tamoxifeno (0,25 mg/mL - 2,00 mg/mL). A finalidade destas novas formulações foi otimizar a melhor concentração do fármaco nas suspensões de nanocápsulas (LNC, LNCQ e MLNC-Zn) e estabelecer a ingerência da concentração do fármaco no comportamento das formulações.

Considerando os perfis de distribuição granulométrica (Figura 12) obtidos mediante a técnica de difração laser, foi determinado o tamanho das partículas das novas formulações de nanocápsulas contendo tamoxifeno (LNC_{0,25T} – LNC_{2,00T}). Foi evidenciada a presença de partículas na faixa micrométrica, o que foi corroborado com a análise dos diâmetros médios ponderados por volume onde demonstrou um perfil polimodal com diâmetros entre 462 e 626 nm e SPAN acima de 1 para todas as formulações (Tabela 4).



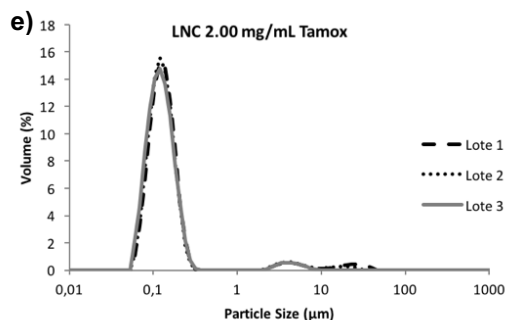


Figura 12. Representação gráfica obtida por difração laser da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNC_{0,25T}; b) LNC_{0,50T}; c) LNC_{1,00T}; d) LNC_{1,50T}; e) LNC_{2,00T}.

Os resultados obtidos para a SSA nas formulações contendo tamoxifeno, mostraram valores baixos, desde $43 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ até $50 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ corroborando o aumento do tamanho das partículas, evidenciando a presença de população micrométrica, provavelmente ocasionada pelo não encapsulamento total do fármaco (Tabela 4).

Para as LNC contendo tamoxifeno, em todas as concentrações estudadas, não foi possível reproduzir os resultados obtidos por Poletto e col. (2015) que determinaram que a presença de monoestearato de sorbitano presente nas nanocápsulas auxilia na estabilização do organogel, evitando o aparecimento de populações micrométricas nas nanocápsulas, por meio do aumento da concentração de saturação do fármaco nas LNC, possivelmente pela interação do fármaco com os grupos funcionais deste tensoativo através de pontes de hidrogênio.

Com a técnica de espalhamento de luz dinâmico (Figura 13) foram evidenciados diâmetros hidrodinâmicos desde 126 até 144 nm com índices de polidispersão de 0,2 (Tabela 4).

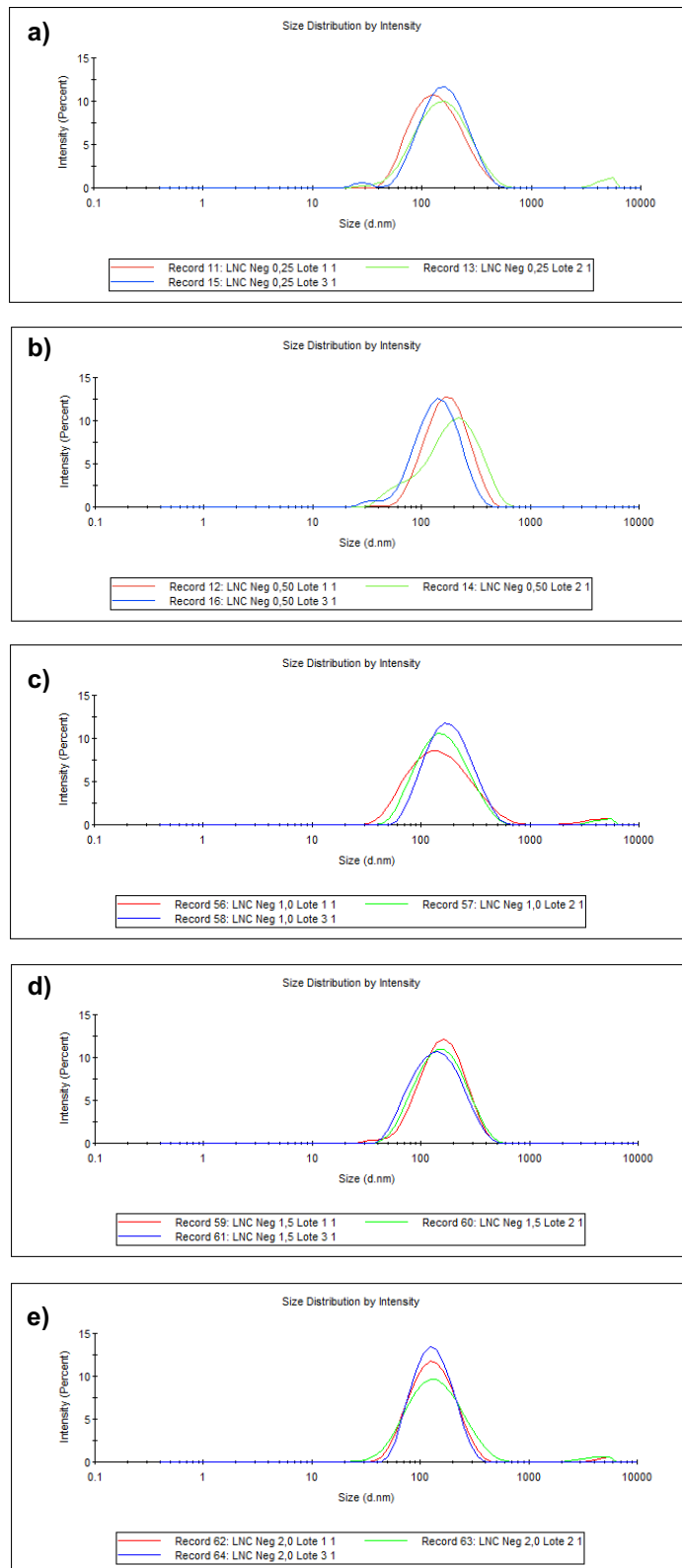


Figura 13. Representação gráfica obtida por espalhamento de luz dinâmico da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNC_{0,25T}; b) LNC_{0,50T}; c) LNC_{1,00T}; d) LNC_{1,50T}; e) LNC_{2,00T}.

Os perfis de distribuição granulométrica para as suspensões de nanocápsulas contendo tamoxifeno nas concentrações estudadas, mais a solução de quitosana 1,5%, LNCQ (Figura 14) e as formulações à que foram acrescentadas o íon metálico zinco, MLNC-Zn (Figura 15) mostraram uma manutenção do tamanho das partículas na faixa nanométrica, apresentando perfis monomodais após o revestimento com quitosana e a complexação com o íon metálico na superfície das nanocápsulas. Os diâmetros médios exibiram valores desde 126 até 135 nm para as LNCQ e 129 nm e 132 nm nas MLNC-Zn, observando-se menor diâmetro nas formulações com maior concentração do fármaco (2,00 mg/mL) tanto para as LNCQ quanto as MLNC-Zn (Tabela 4).

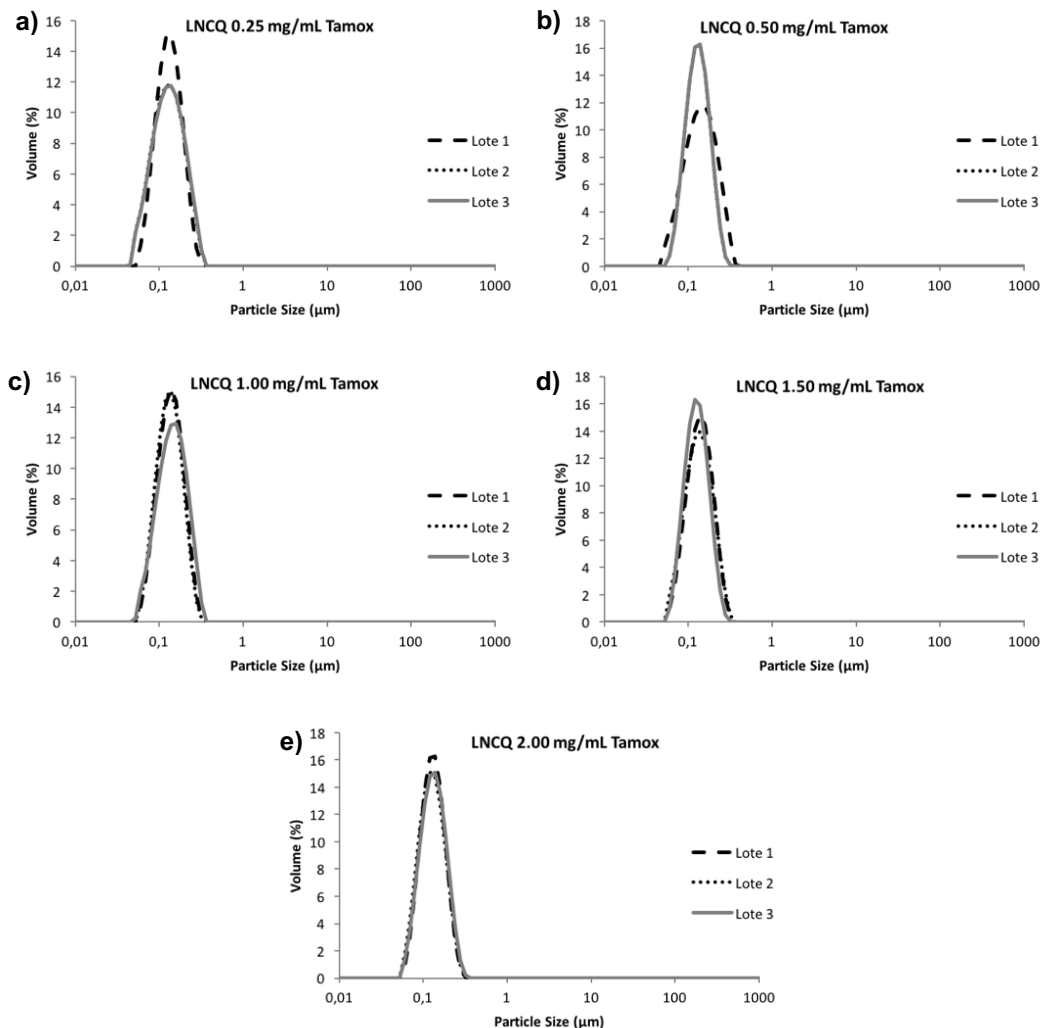


Figura 14. Representação gráfica obtida por difração laser da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNCQ_{0,25T}; b) LNCQ_{0,50T}; c) LNCQ_{1,00T}; d) LNCQ_{1,50T}; e) LNCQ_{2,00T}.

A distribuição de tamanho nestas formulações foi estreita, observando-se valores de SPAN desde 0,9 até 1,1 para as LNCQ e de 0,9 até 1,0 nas MLNC-Zn (Tabela 4), evidenciando-se uma menor distribuição de tamanho para as partículas com maior concentração do fármaco e uma maior distribuição para as partículas com menor concentração do fármaco, demonstrando a influência da concentração do fármaco neste parâmetro.

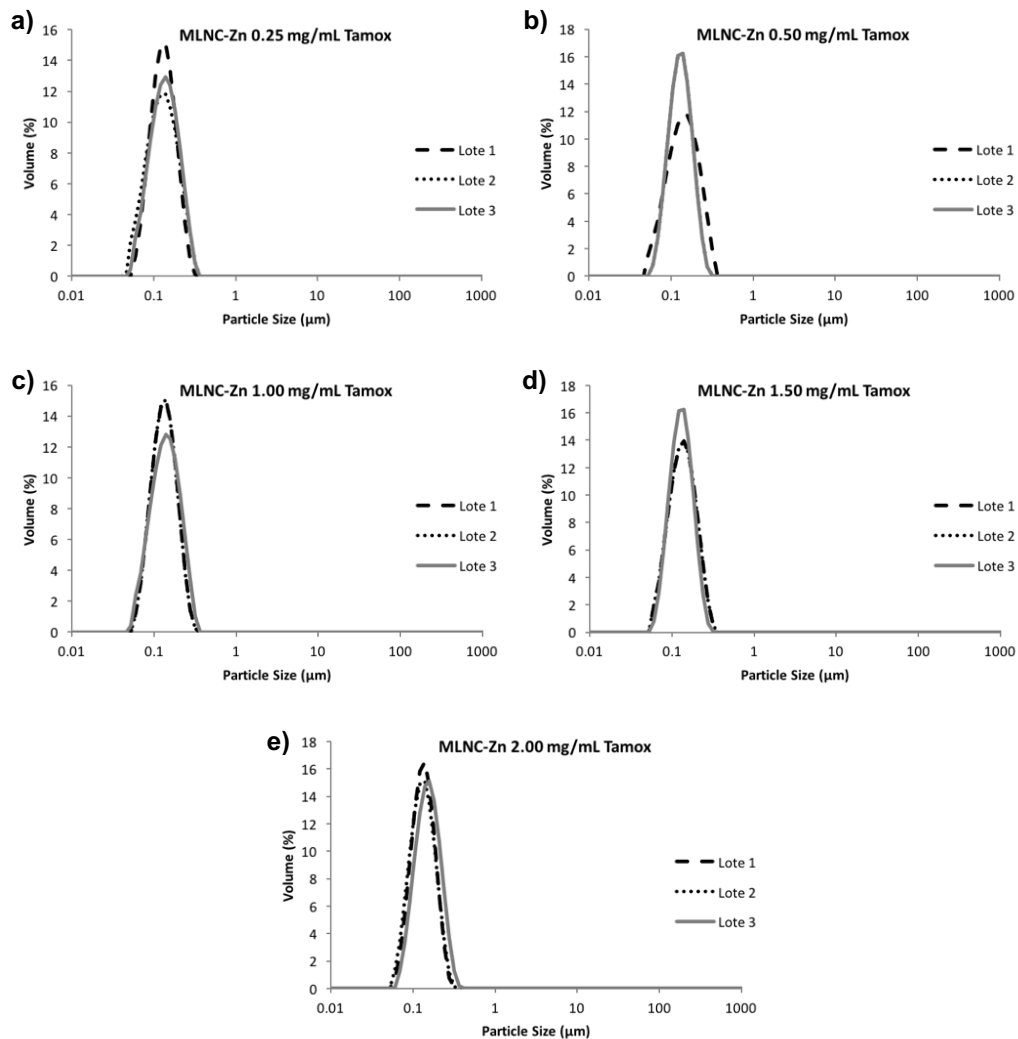


Figura 15. Representação gráfica obtida por difração laser da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) MLNC-Zn_{0,25T}; b) MLNC-Zn_{0,50T}; c) MLNC-Zn_{1,00T}; d) MLNC-Zn_{1,50T}; e) MLNC-Zn_{2,00T}.

Novamente a técnica de espalhamento de luz dinâmico foi empregada para verificar o raio hidrodinâmico das partículas após serem revestidas com quitosana e após a complexação com o zinco (Figura 16 e Figura 17); observando-se valores do diâmetro médio para as LNCQ desde 114 nm até 121 nm, enquanto que para as MLNC-Zn os valores estiveram entre 113 nm e 117 nm (Tabela 4). Desta forma foi determinado que a adição do íon metálico não influenciou significativamente no aumento do diâmetro médio das partículas ($p < 0,05$).

Os índices de polidispersão também apresentaram uma manutenção quando comparados os resultados obtidos para as formulações revestidas com quitosana e as que acrescentavam o zinco. Valores desde 0,12 até 0,17 foram evidenciados para as LNCQ, constatando-se uma diminuição relacionada com o aumento da concentração do tamoxifeno nas suspensões de nanocápsulas. Para as suspensões MLNC-Zn foram percebidos valores similares começando por 0,13 e 0,18 para a formulação com menor concentração do fármaco (Tabela 4).

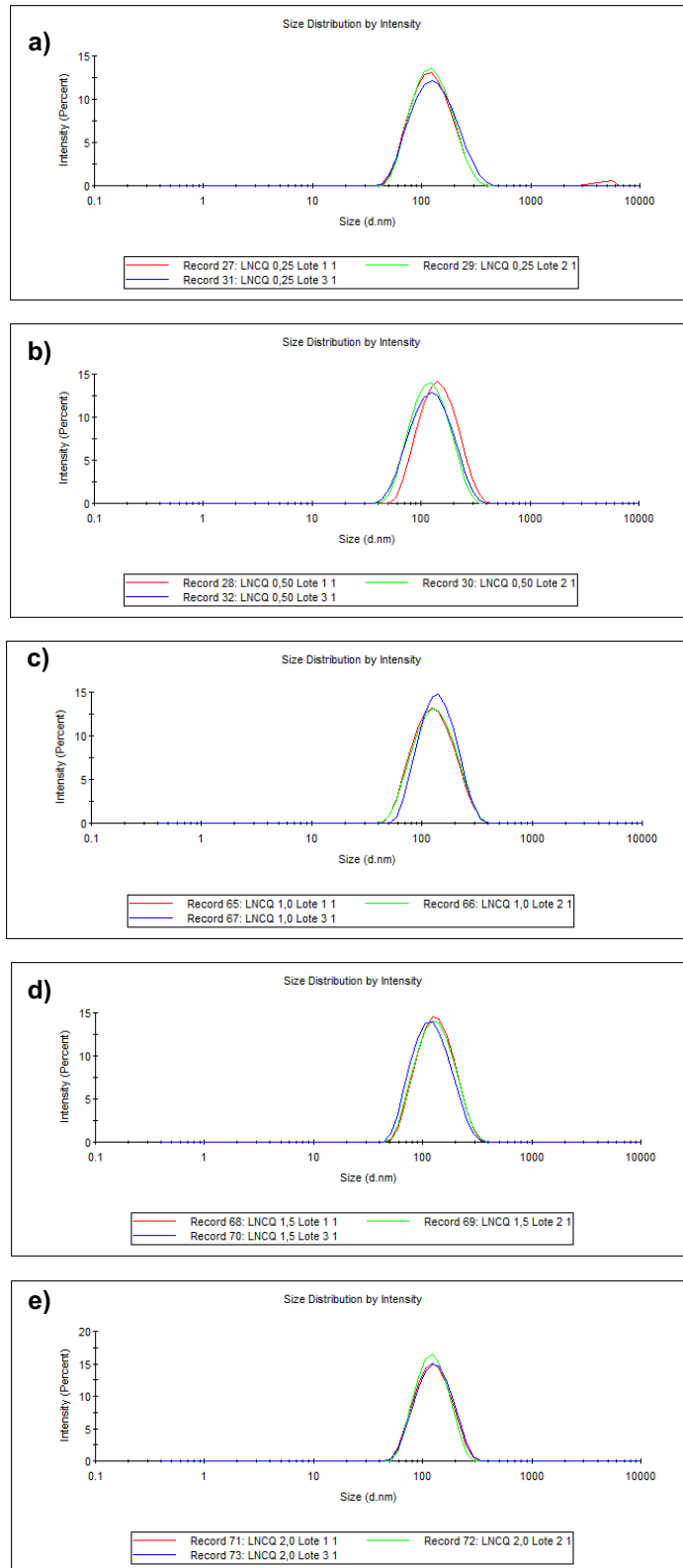


Figura 16. Representação gráfica obtida por espalhamento de luz dinâmico da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNCQ_{0,25T}; b) LNCQ_{0,50T}; c) LNCQ_{1,00T}; d) LNCQ_{1,50T}; e) LNCQ_{2,00T}.

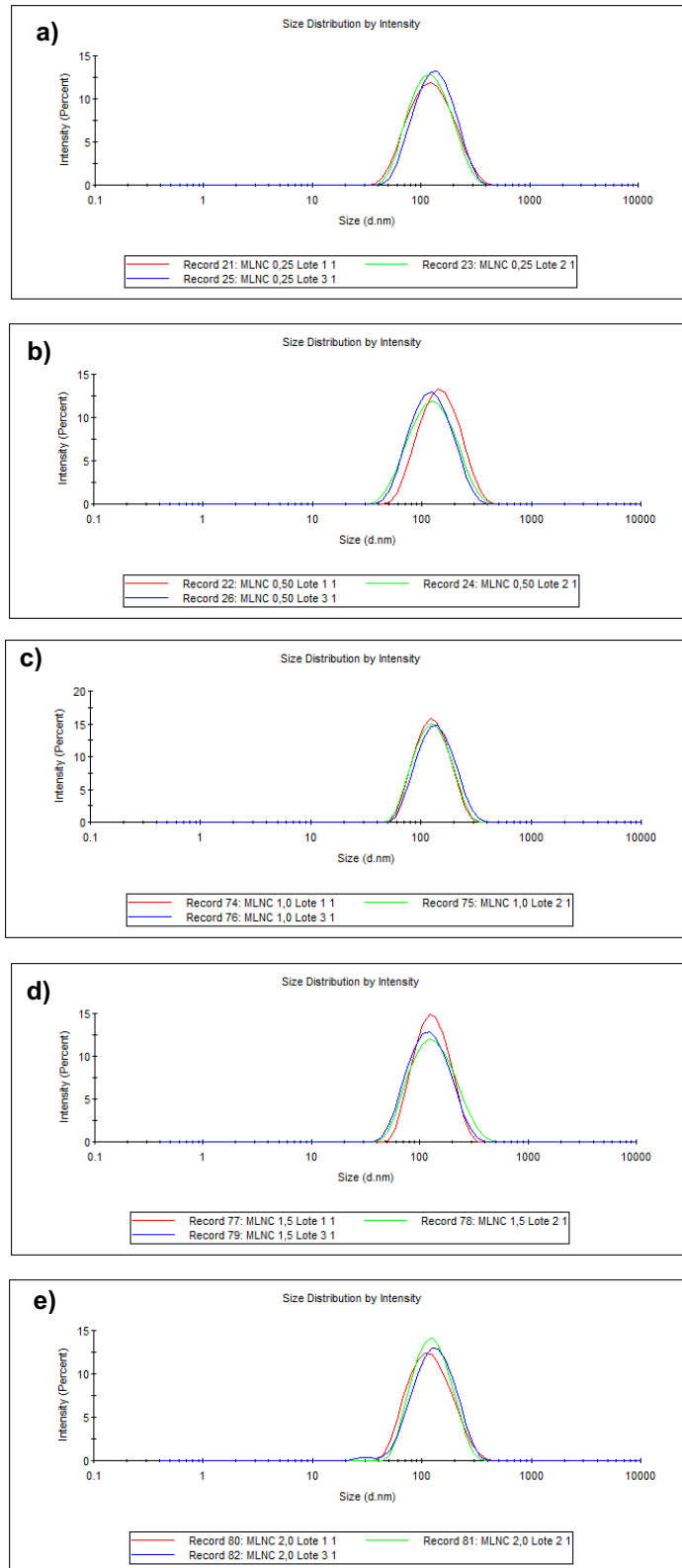


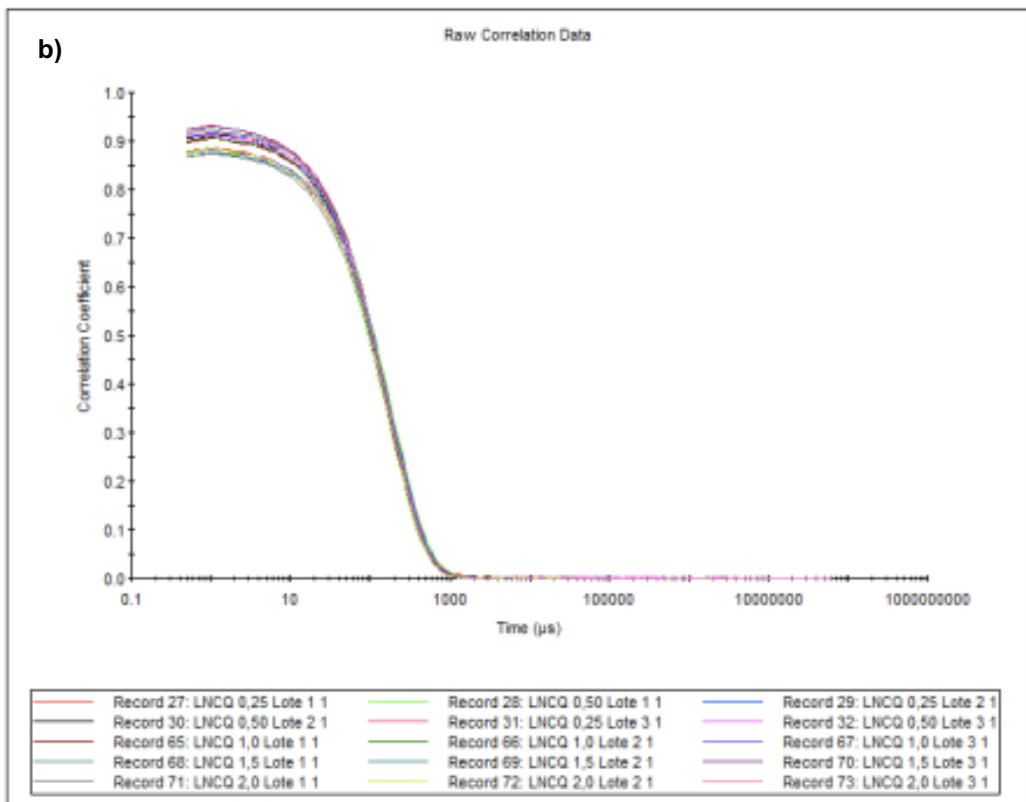
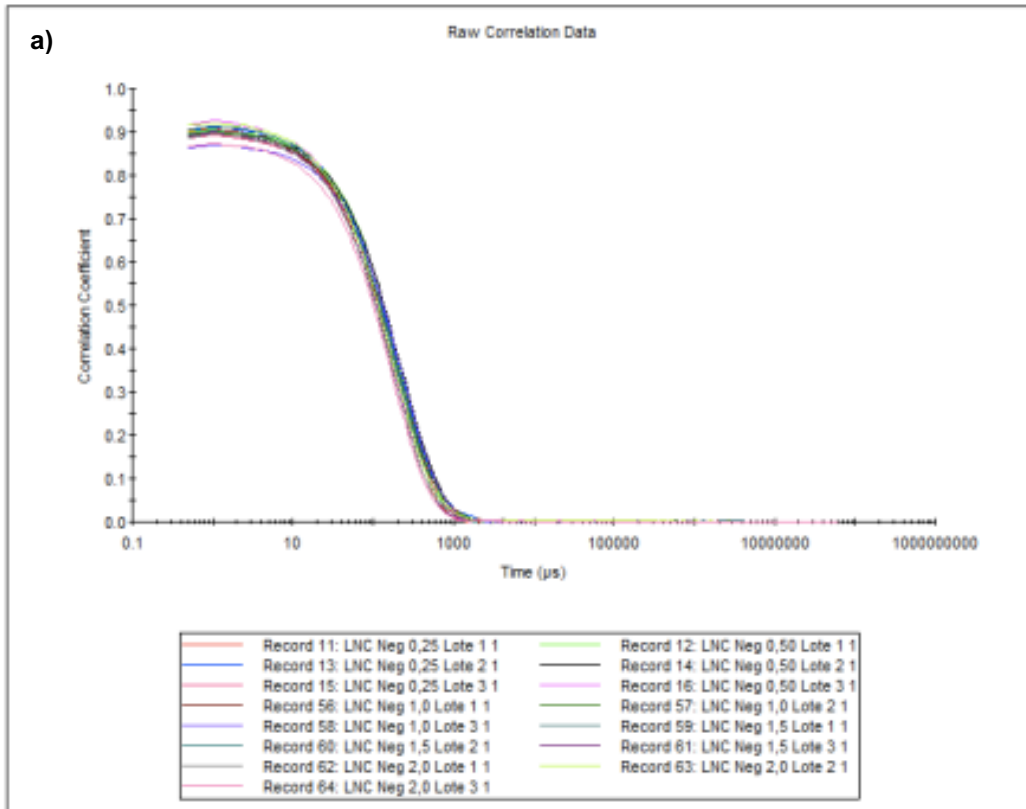
Figura 17. Representação gráfica obtida por espalhamento de luz dinâmico da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) MLNC-Zn_{0,25T}; b) MLNC-Zn_{0,50T}; c) MLNC-Zn_{1,00T}; d) MLNC-Zn_{1,50T}; e) MLNC-Zn_{2,00T}.

Tabela 4. Caracterização inicial de tamanho de partícula das suspensões de nanocápsulas com Tamoxifeno por diferentes técnicas.

Formulação	Difração de laser*			Espalhamento de luz dinâmico**	
	Diâmetro $D_{4,3}$ (nm)	SPAN	SSA (m^2/g)	Z-average diameter	Pdl
LNC _{0,25T}	619±354	10,1±10,3	43,4±2,3	134±11	0,2±0,0
LNC _{0,50T}	934±488	17,9±11,7	42,6±1,8	144±18	0,2±0,1
LNC _{1,00T}	626±499	7,4±9,1	43,7±4,3	144±13	0,2±0,0
LNC _{1,50T}	462±376	1,1±0,0	49,5±3,3	131±8	0,2±0,0
LNC _{2,00T}	589±265	1,0±0,0	49,6±1,6	121±2	0,2±0,1
LNCQ _{0,25T}	128±1	1,1±0,1	54,9±1,8	116±2	0,2±0,0
LNCQ _{0,50T}	131±6	0,9±0,1	52,0±0,4	118±12	0,2±0,0
LNCQ _{1,00T}	135±5	1,0±0,1	50,4±1,0	121±8	0,1±0,0
LNCQ _{1,50T}	130±5	0,9±0,1	51,9±1,6	117±5	0,1±0,0
LNCQ _{2,00T}	126±2	0,9±0,0	52,9±0,8	114±2	0,1±0,0
MLNC-Zn _{0,25T}	130±3	1,0±0,1	53,6±2,0	116±3	0,2±0,0
MLNC-Zn _{0,50T}	131±6	0,9±0,1	52,0±0,4	117±12	0,2±0,0
MLNC-Zn _{1,00T}	132±4	1,0±0,1	51,5±0,4	116±3	0,1±0,0
MLNC-Zn _{1,50T}	130±3	0,9±0,1	51,9±0,4	116±5	0,2±0,0
MLNC-Zn _{2,00T}	129±1	0,9±0,0	51,9±0,5	113±4	0,2±0,0

Nota: Os valores são mostrados como média ± desvio padrão; n=3. * Valores obtidos pela análise de volume. ** Valores obtidos pela análise de intensidade.

A função de correlação para todas as suspensões (LNC, LNCQ e MLNC-Zn) apresentou funções semelhantes, demonstrando a homogeneidade entre as formulações (Figura 18).



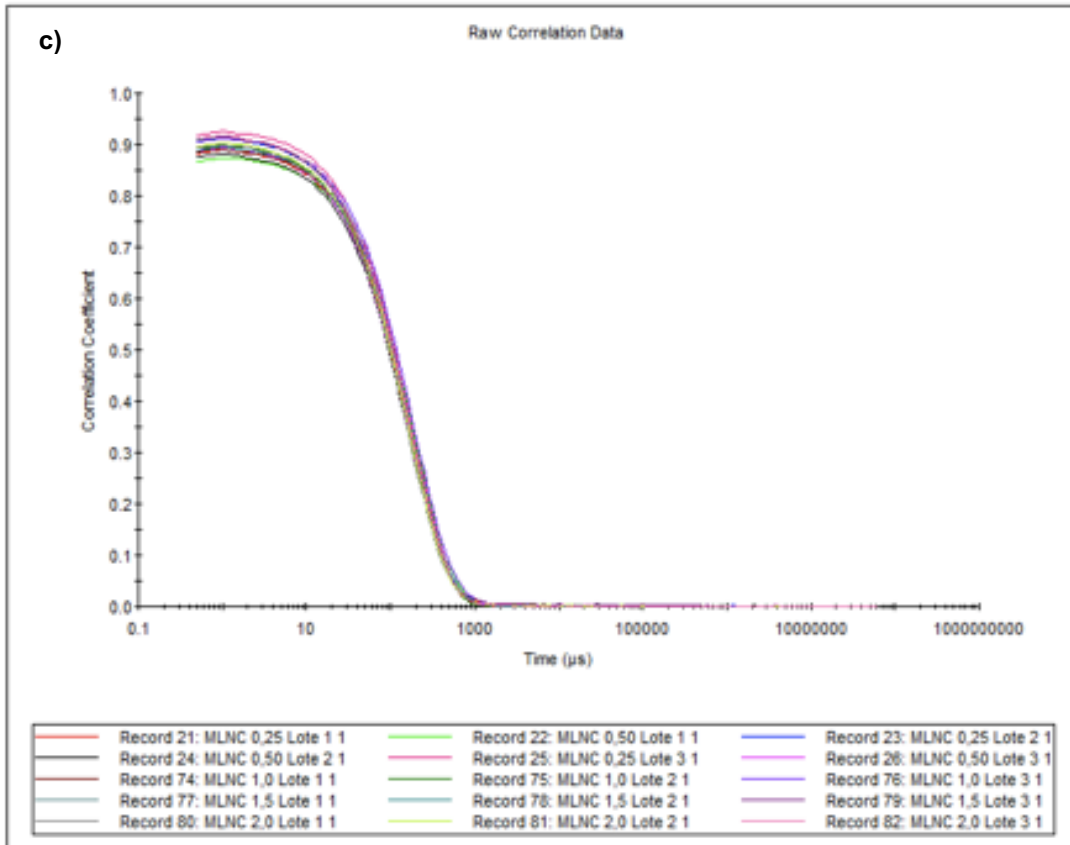


Figura 18. a) Função de correlação obtida por espalhamento de luz dinâmico das suspensões de nanocápsulas LNC; b) Função de correlação obtida por espalhamento de luz dinâmico das suspensões de nanocápsulas LNCQ; c) Função de correlação obtida por espalhamento de luz dinâmico das suspensões de nanocápsulas MLNC-Zn.

Quando comparados os valores médios do diâmetro hidrodinâmico obtido pela técnica de espalhamento de luz dinâmico foi evidenciado que as formulações LNC apresentaram um diâmetro maior que as demais, o que não era esperado uma vez que não apresentam a camada de revestimento (quitosana / íon metálico), quando comparadas com as LNCQ e MLNC-Zn (Figura 19a). Obtendo valores similares para o índice de polidispersão (Figura 19b). Isto possivelmente pela ausência da quitosana, a qual confere uma maior estabilidade no sistema.

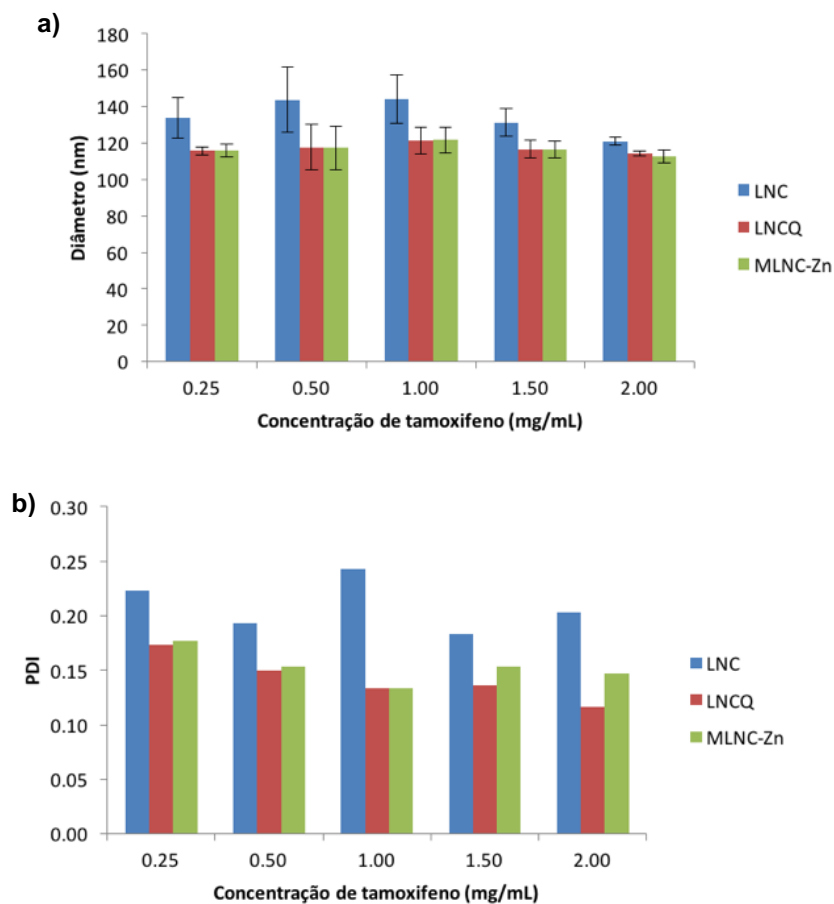


Figura 19. a) Análise de tamanho de partícula (DLS) e b) Índice de polidispersão (PDI) para as diferentes partículas preparadas com diferentes concentrações de tamoxifeno.

Considerando os gráficos radar obtidos para as formulações elaboradas (Figura 20), foi possível ratificar a falta de homogeneidade nas formulações LNC e constatando os perfis monomodais tanto nas LNCQ quanto as MLNC-Zn.

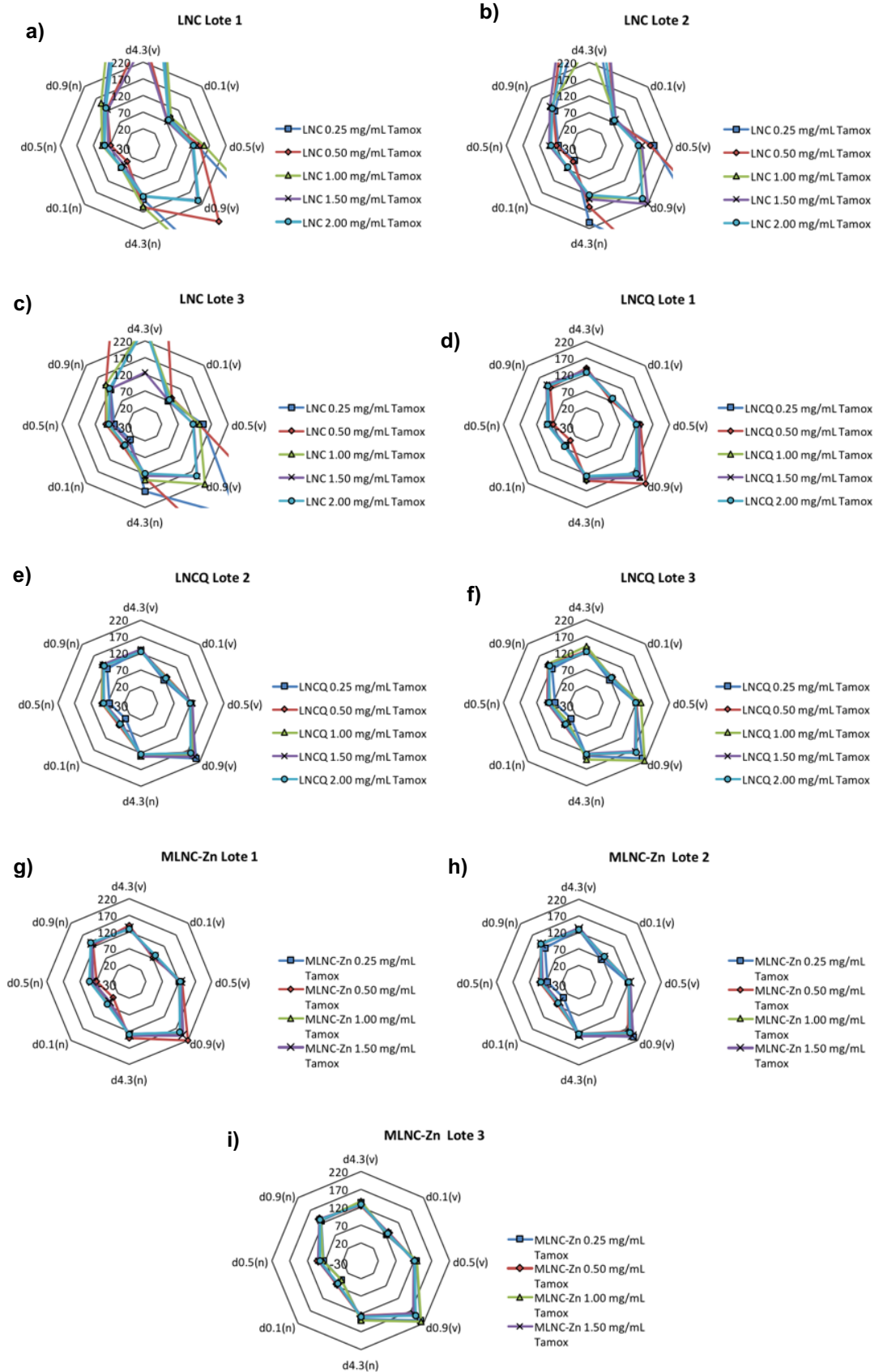


Figura 20. Gráfico radar das formulações com diferentes concentrações de tamoxifeno: a) LNC lote 1; b) LNC lote 2; c) LNC lote 3, d) LNCQ lote 1; e) LNCQ lote 2; f) LNCQ lote 3, g) MLNC-Zn lote 1; h) MLNC-Zn lote 2; i) MLNC-Zn lote 3.

As LNC deveriam apresentar um potencial zeta negativo, conforme o que já havia sido observado para as partículas brancas (ausência de fármaco, dados apresentados na Tabela 3). Contudo, apenas as partículas com concentração de 0,25 mg/mL apresentaram potencial zeta negativo (-5,0 mV), sendo positivo para as demais concentrações, com valores desde 0,9 até 10 mV (Tabela 5). O aumento desses valores foi diretamente proporcional ao aumento da concentração do tamoxifeno nas formulações, mostrando uma inversão dos valores passando de valores ligeiramente negativos até valores positivos. Diante desses resultados, foi gerada a hipótese de que parte do fármaco poderia estar fora das partículas, localizando-se adsorvido à parede polimérica externa ou solúveis na fase externa, permitindo assim, a mudança dos valores do potencial zeta por meio das cargas positivas, obtidas pela doação de elétrons por parte dos grupos metila presentes na molécula de tamoxifeno.

Os valores de pH obtidos para estas formulações também foram aumentando em relação à concentração do fármaco nas suspensões de nanocápsulas, mostrando valores desde pH neutro até básico (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de Potencial Zeta e pH para as suspensões de nanocápsulas LNC.

Formulação	pH	Potencial Zeta (mV)
LNC _{0,25T}	6,96±0,09	-5,0±0,7
LNC _{0,50T}	7,61±0,10	0,9±2,4
LNC _{1,00T}	7,98±0,08	4,0±0,4
LNC _{1,50T}	8,30±0,05	6,1±0,3
LNC _{2,00T}	8,17±0,03	10,1±2,0

Nota: Os valores são mostrados como média ± desvio padrão; n=3.

Para as LNCQ foram observados valores de potencial zeta positivo entre 3,5 e 11,9 mV (Tabela 6), mostrando um aumento destes valores com o incremento da concentração do fármaco. Os valores de pH estiveram entre 4,4 e 4,8 (Tabela 6), evidenciando-se valores de pH muito próximos a partir da concentração 0,50 mg/mL em diante.

Tabela 6. Valores de Potencial Zeta e pH para as suspensões de nanocápsulas LNCQ.

Formulação	pH	Potencial Zeta (mV)
LNCQ _{0,25T}	4,44±0,12	3,5±0,7
LNCQ _{0,50T}	4,79±0,07	4,5±1,4
LNCQ _{1,00T}	4,82±0,04	6,2±0,6
LNCQ _{1,50T}	4,77±0,05	8,1±0,9
LNCQ _{2,00T}	4,82±0,09	11,9±2,7

Nota: Os valores são mostrados como média ± desvio padrão; n=3.

Os valores de potencial zeta obtidos nas MLNC-Zn foram incrementando com o aumento da concentração de tamoxifeno, mostrando valores desde 3,4 até 11,7 mV (Tabela 7). O comportamento dos valores de pH foi similar ao observado nas LNCQ, mostrando valores desde 4,4 até 4,9 (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de Potencial Zeta e pH para as suspensões de nanocápsulas MLNC-Zn.

Formulação	pH	Potencial Zeta (mV)
MLNC-Zn _{0,25T}	4,39±0,07	3,4±1,3
MLNC-Zn _{0,50T}	4,85±0,03	6,0±1,5
MLNC-Zn _{1,00T}	4,82±0,03	8,8±0,8
MLNC-Zn _{1,50T}	4,84±0,02	9,7±0,4
MLNC-Zn _{2,00T}	4,85±0,04	11,7±0,7

Nota: Os valores são mostrados como média ± desvio padrão; n=3.

Comparando os valores de potencial zeta nos diferentes tipos de formulações desenvolvidas, é possível evidenciar que a MLNC-Zn apresenta valores de potencial zeta mais elevados nas concentrações intermediárias, (Figura 21), determinando assim a influencia dos íons na manutenção das cargas na superfície das partículas, aumentando a repulsão entre elas.

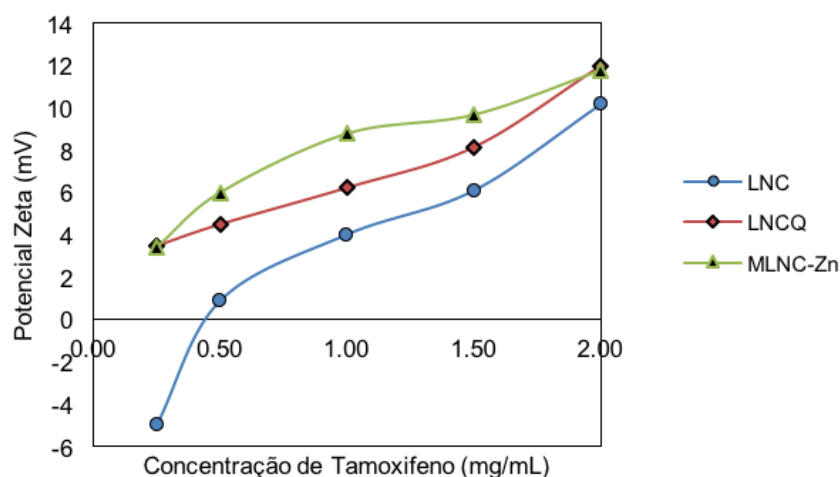


Figura 21. Análise do potencial zeta para as diferentes partículas preparadas com diferentes concentrações de tamoxifeno.

Quando comparados os valores do pH versus as concentrações dos três tipos de formulações, é observada uma diminuição destes valores tanto para as LNCQ quanto para as nanocápsulas MLNC-Zn (Figura 22), relacionado com a presença do ácido acético nestas formulações, permitindo assim uma leve acidez nessas partículas quando comparadas com as LNC. A presença do ácido acético pode estar relacionada com a ausência de população micrométrica nas nanocápsulas revestidas com quitosana, já que poderia estar ocorrendo a solubilização do fármaco livre (micrométrico) por conta da alteração do pH do meio.

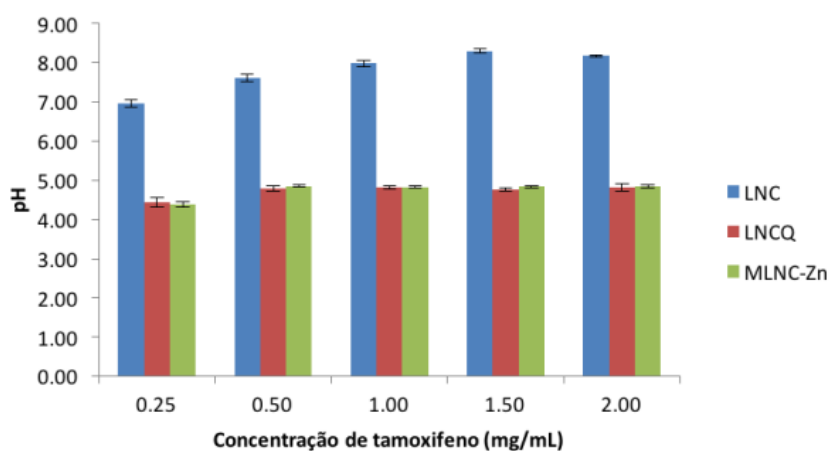


Figura 22. Análise de pH para as diferentes partículas preparadas com diferentes concentrações de tamoxifeno.

Após comparar o comportamento dos três tipos de formulações diferentes (LNC, LCNQ e MLNC-Zn), surgiu a necessidade de determinar os fatores que influenciavam o aparecimento de populações micrométricas nas partículas sem revestimento com quitosana (LNC). Foram planejados testes para determinar se a adição do ácido acético (na mesma concentração usada para a solubilização da quitosana em solução) poderia estar relacionado com o efeito de desaparecimento das populações micrométricas nas suspensões de nanocápsulas ou se era influência do pH ácido, sem importar qual a natureza do ácido adicionado.

As soluções de ácidos adicionadas às LNC continham as seguintes condições:

- Solução de ácido acético 1,5% (v/v): pH 4,21
- Solução de HCl 1,04 mM: pH 4,18

Essas soluções de ácidos foram adicionadas numa proporção de 9:1 (suspensão de nanocápsulas:solução ácida). Foram selecionadas duas formulações contendo tamoxifeno nas concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL para a realização de dos seguintes testes e dessa forma determinar o comportamento das soluções na presença desses dois ácidos. Após a adição das soluções ácidas foi analisado o perfil granulométrico destas suspensões, distinguindo-se um reaparecimento do tamanho das partículas na faixa nanométrica, após a adição do ácido acético, apresentando perfis monomodais, o que não foi possível ser evidenciado posteriormente à adição do ácido clorídrico (Figura 23).

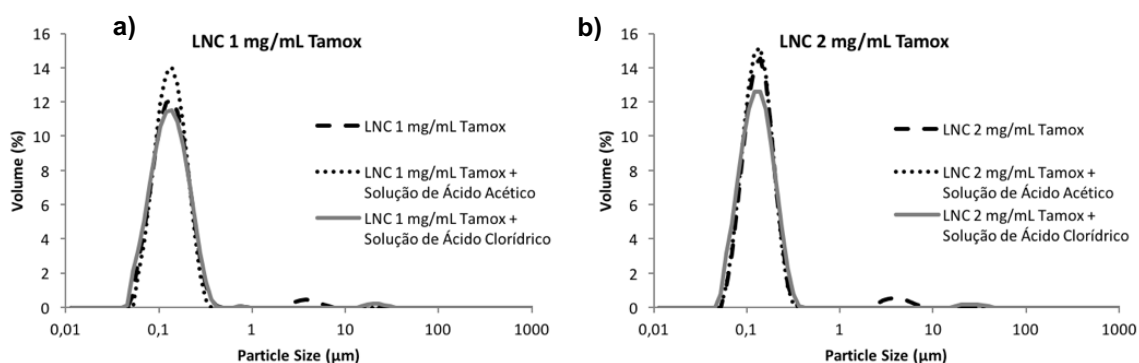


Figura 23. Representação gráfica obtida por difração laser da distribuição granulométrica de suspensões de nanocápsulas: a) LNC_{1,00T} + soluções de ácidos; b) LNC_{2,00T} + soluções de ácidos.

Dois novos gráficos radar foram elaborados para caracterizar as impressões digitais das formulações posterior à adição das soluções de ácidos (Figura 24), constatando de uma forma mais evidente o efeito do ácido acético no desaparecimento da população micrométrica nas LNC contendo tamoxifeno e a falta de efeito positivo por parte do ácido clorídrico.

Conforme pode ser observado nas Figura 24, o desaparecimento da população micrométrica se dá apenas através da adição do ácido acético. Uma hipótese para tal efeito pode estar relacionada a ação do ácido acético como co-solvente, por ser um ácido orgânico, e não à ação de par iônico do ácido clorídrico.

Esse resultado demonstra que o ácido acético age como um solvente para o tamoxifeno, indicando que a adição da quitosana (em ácido acético), pode ser a responsável pela solubilização de fármaco externo à partícula, levando ao desaparecimento da detecção de população com diâmetro micrométrico.

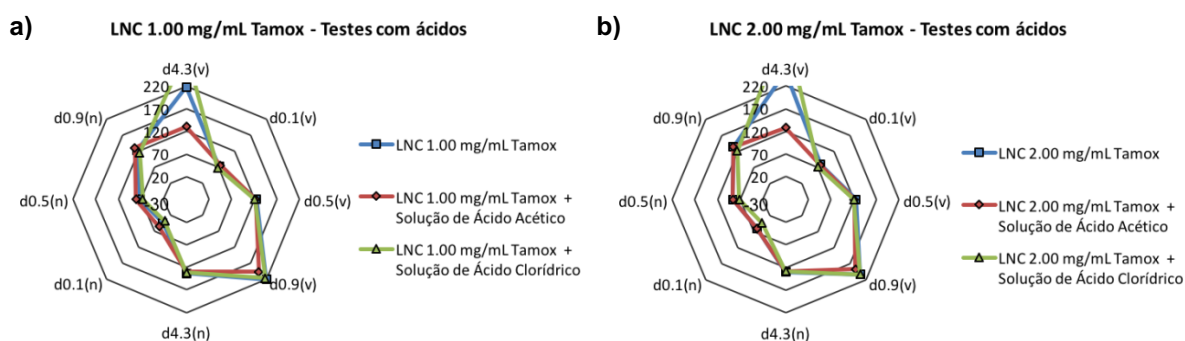


Figura 24. Gráfico radar das formulações: a) LNC_{1,00T} + soluções de ácidos; b) LNC_{2,00T} + soluções de ácidos.

Para determinar a possível presença de cristais de tamoxifeno nas suspensões de nanocápsulas foram realizadas fotografias mediante microscopia óptica com atenuação de luz polarizada. Essa técnica distingue entre partículas amorfas (não refringentes) e partículas cristalinas, aparecendo assim uma imagem luminosa no fundo escuro. Foram realizadas fotografias com luz polarizada e sem a presença desta.

Analisando as fotografias foi evidenciando uma maior presença de cristais na formulação sem quitosana e metais (LNC) (Figura 25). Esses cristais observados têm morfologia de agulha, de tamanho micrométrico e provavelmente sejam os responsáveis do aparecimento de população micrométrica nos análises de diâmetro por difração laser (Tabela 4).

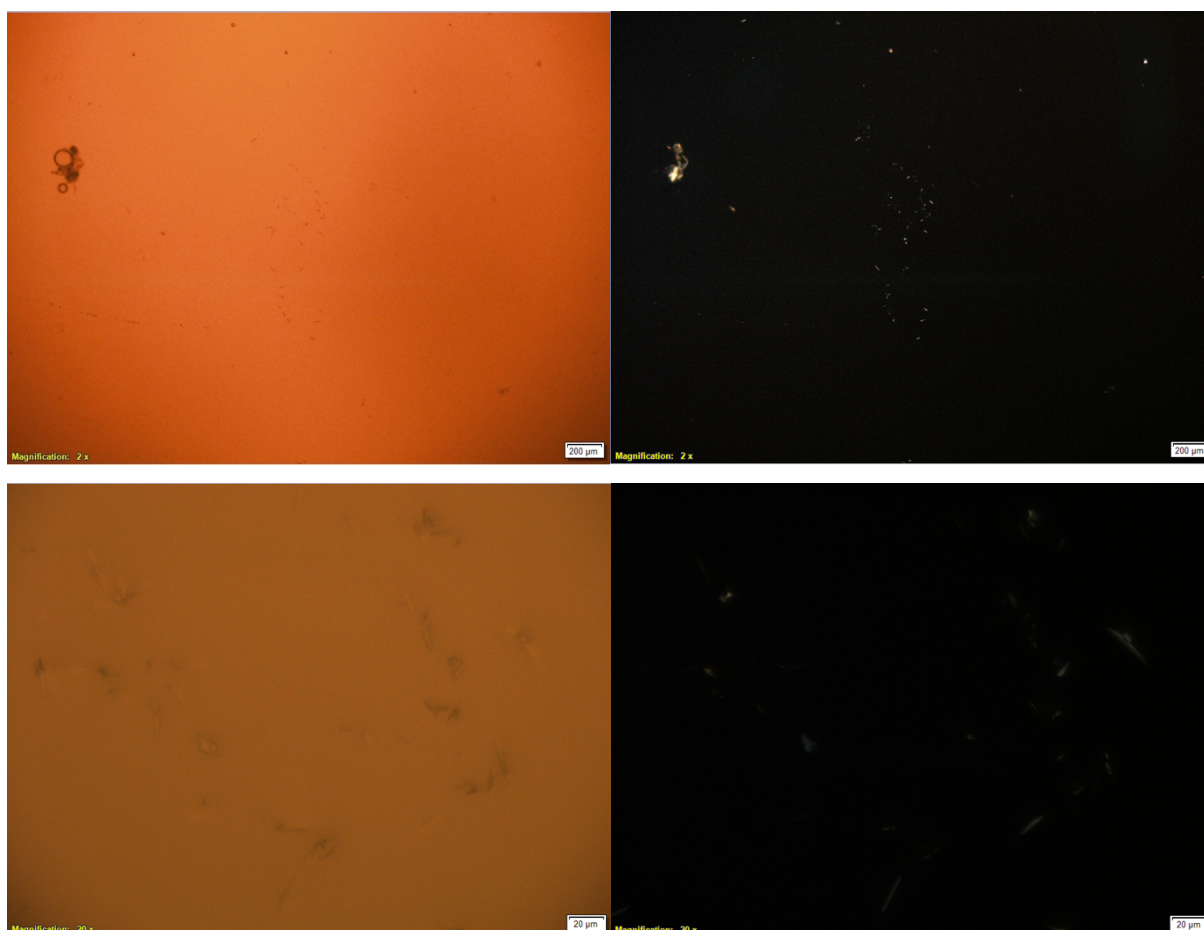


Figura 25. Fotografia de microscopia óptica da LNC_{1,00T} a) sem luz polarizada 2x, b) com luz polarizada 2X, c) sem luz polarizada 20X, b) com luz polarizada 20X.

Já nas fotografias das formulações LNCQ e MLNC-Zn (Figura 26 e Figura 27) foi observada uma pouca presença de cristais, com um tamanho inferior a os observados nas formulações LNC (Figura 25), o qual provavelmente ocorreu devido à solubilização do fármaco externo à partícula.

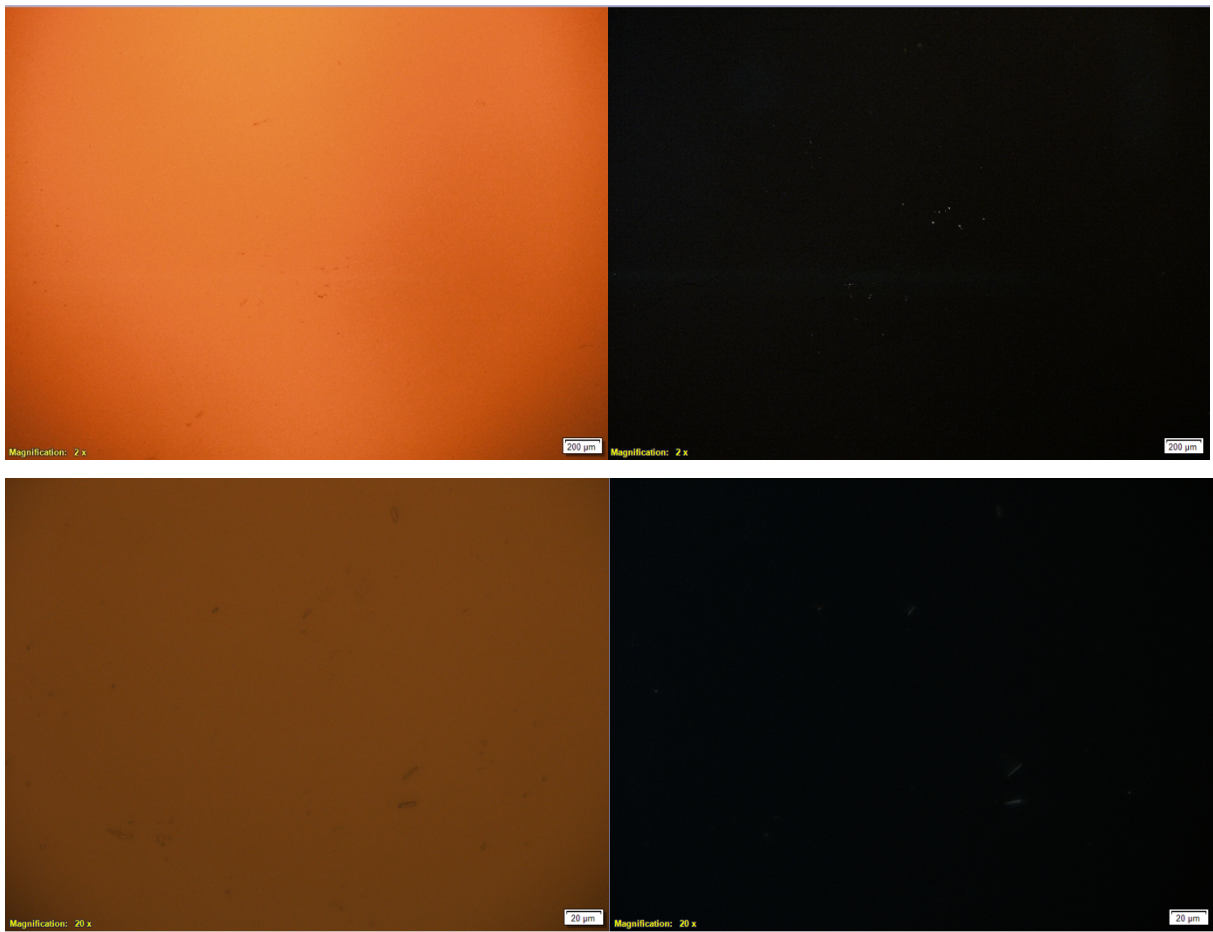


Figura 26. Fotografia de microscopia óptica da LNCQ_{1,00T} a) sem luz polarizada 2X, b) com luz polarizada 2X, c) sem luz polarizada 20X, b) com luz polarizada 20X.

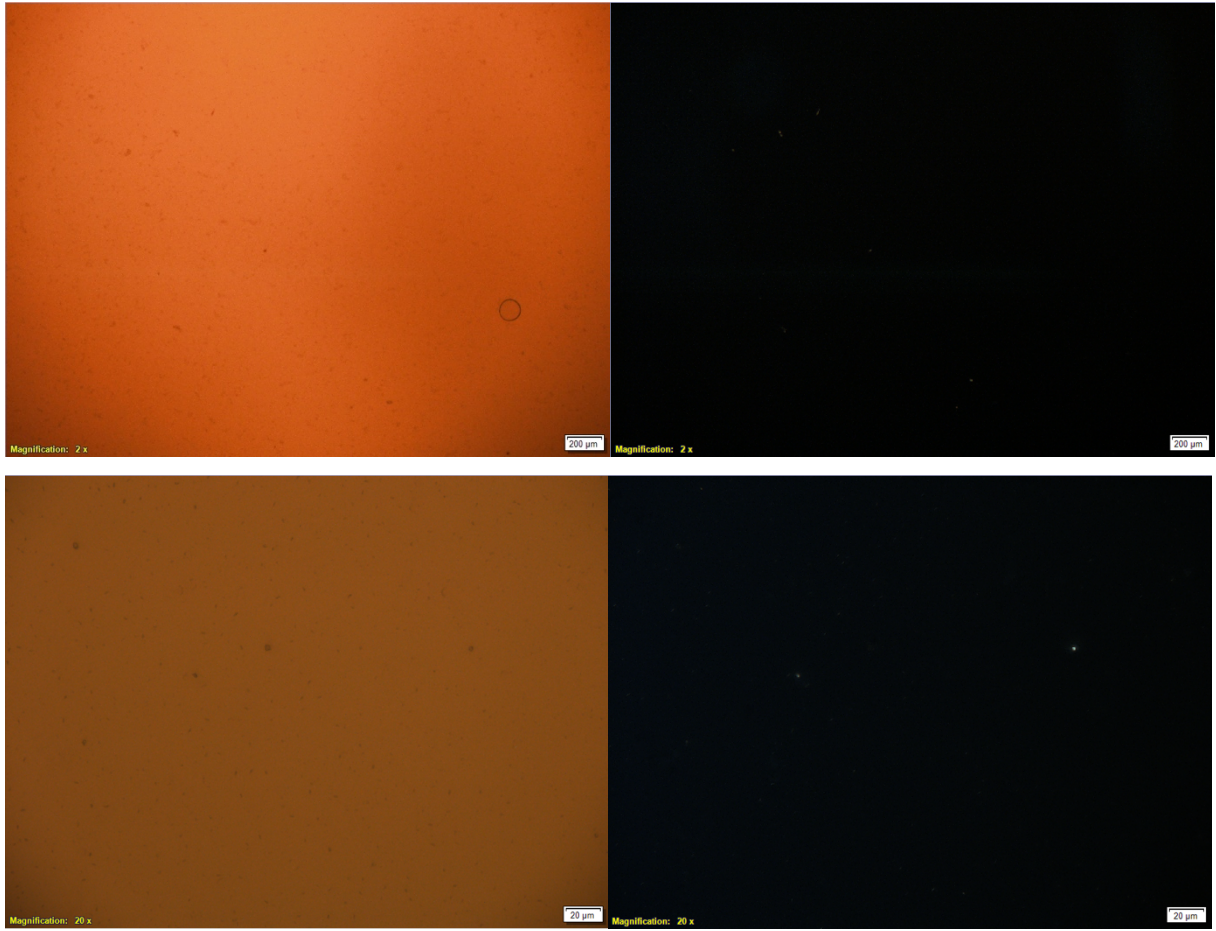


Figura 27. Fotografia de microscopia óptica da MLNC-Zn_{1,00T} a) sem luz polarizada 2X, b) com luz polarizada 2X, c) sem luz polarizada 20X, b) com luz polarizada 20X.

5.3 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO GADOLÍNIO

A etapa de desenvolvimento das MLNC complexadas com gadolínio foi realizada utilizando uma concentração do tamoxifeno de 1mg/mL. Dessa forma, inicialmente foi necessário avaliar qual a quantidade ideal de gadolínio a ser adicionada à formulação de LNCQ, de forma a obter um sistema estável. Sendo assim, quatro concentrações de gadolínio avaliadas (12,5; 25,0; 50,0; e 100,0 $\mu\text{g/mL}$). A Figura 28 apresenta a distribuição de tamanho de partículas e a Tabela 8 apresenta o resultado do diâmetro médio e índice de polidispersão das formulações contendo as diferentes concentrações de gadolínio.

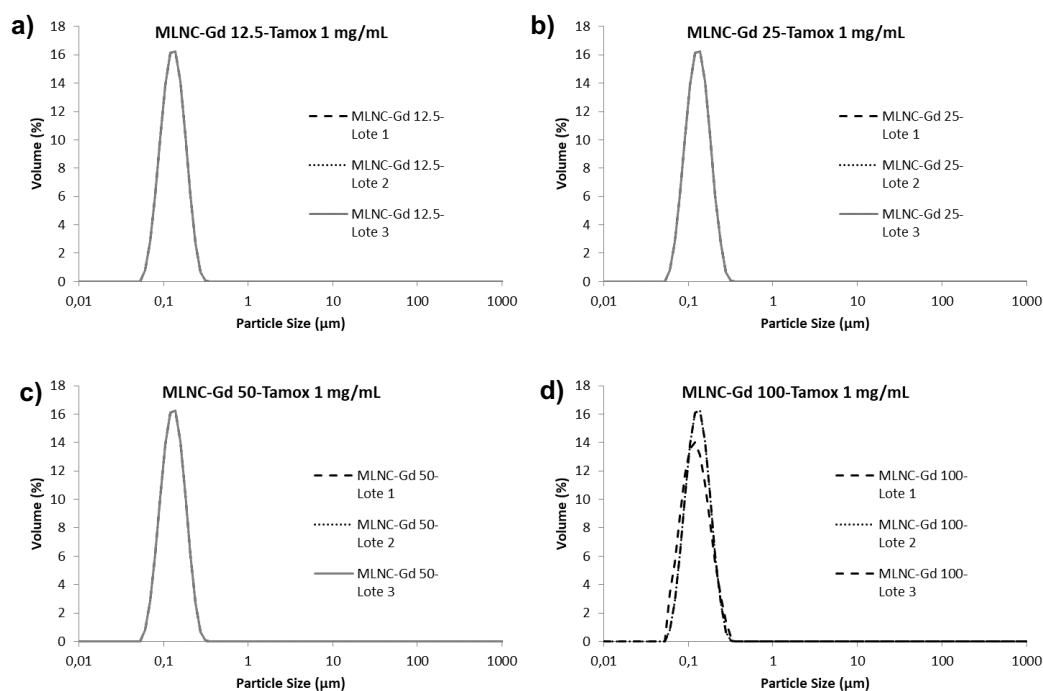


Figura 28. Perfil granulométrico das formulações contendo gadolínio ($n=3$) analisadas por difratometria de laser: a) MLNC-Gd_{12,5}, b) MLNC-Gd_{25,0} c) MLNC-Gd_{50,0}; d) MLNC-Gd_{100,0}.

De acordo com os resultados de diâmetro, todas as formulações apresentaram perfis granulométrico nanométrico, PDI próximo a 0,2, sendo essas características muito similares às partículas contendo zinco como íon metálico de complexação ($p < 0,05$). Todas as concentrações apresentaram perfis granulométricos e diâmetro médio

muito parecidos, o que foi corroborado nos gráficos radar (Figura 29), observando-se uma alta superposição entre eles.

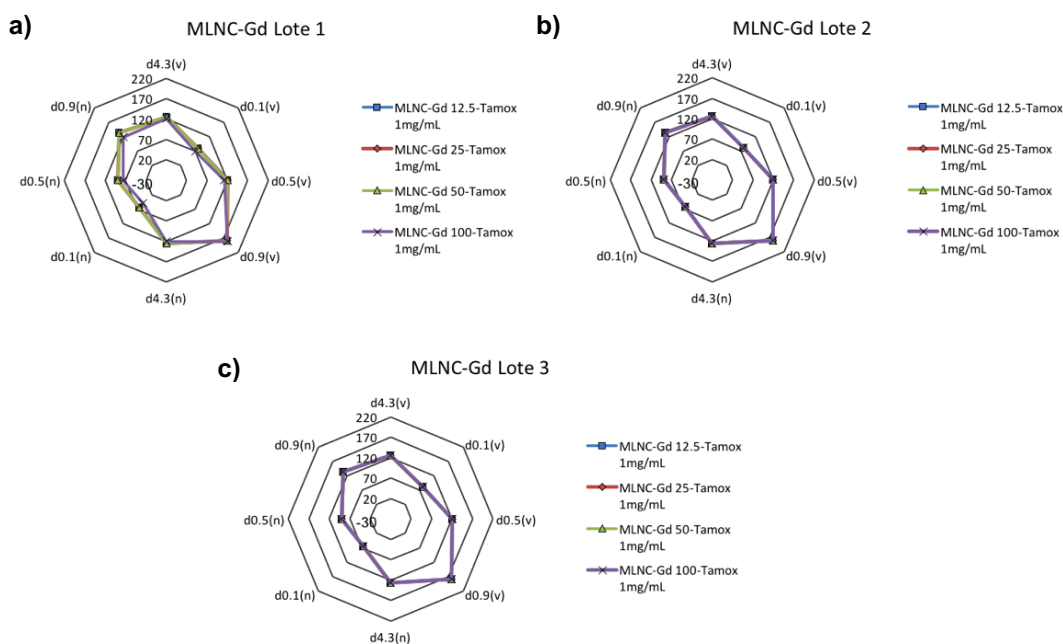


Figura 29. Gráfico radar das formulações com diferentes concentrações de tamoxifeno: a) MLNC-Gd lote 1; b) MLNC-Gd lote 2; c) MLNC-Gd lote 3.

Os resultados do diâmetro obtido por DLS para as formulações contendo gadolínio, também demonstraram uma homogeneidade entre as diferentes concentrações do íon metálico adicionado ($p < 0,05$), sendo similares às partículas contendo zinco como íon metálico de complexação ($p < 0,05$). Os resultados dos diâmetros obtidos podem ser observados na Figura 30 e Tabela 8.

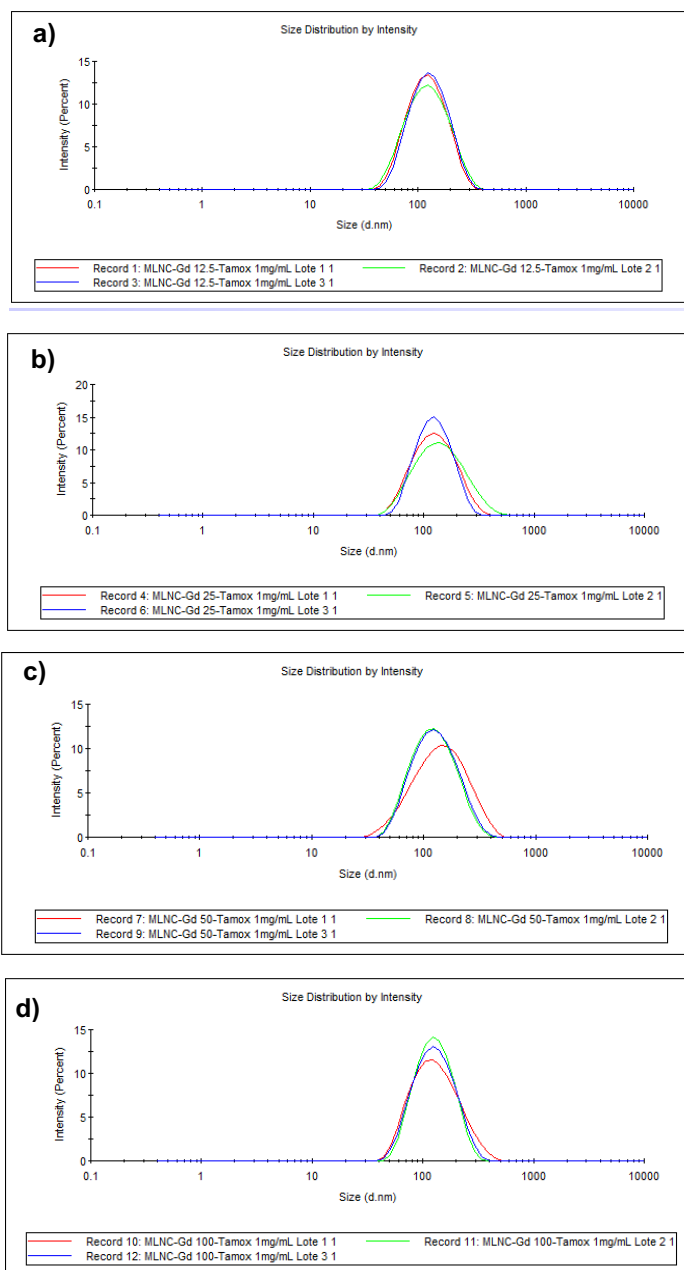


Figura 30. Perfil granulométrico das formulações contendo gadolínio (n=3) analisadas por DLS: a) MLNC-Gd_{12,5}, b) MLNC-Gd_{25,0}, c) MLNC-Gd_{50,0}, d) MLNC-Gd_{100,0}.

Os dados do diâmetro obtidos pelas diferentes técnicas demonstraram semelhança entre os resultados, dificultando a escolha de uma formulação ideal. Procedeu-se então, a análise do perfil de distribuição do potencial zeta e pH a fim de se verificar se algum lote apresentaria indícios de falta de reprodutibilidade. Na Tabela 9 apresenta-se o perfil de distribuição do potencial zeta dos três lotes de cada formulação.

Tabela 8. Análise de diâmetro por difração laser e espalhamento de luz dinâmica para as formulações teste de gadolínio.

Formulação	Difração de laser*			Espalhamento de luz dinâmico**	
	Diâmetro D _{4,3} (nm)	SPAN	SSA (m ² /g)	Z-average	Pdl
MLNC-Gd_{12,5}	126±0	0,8±0,0	52,4±0,0	112±2	0,2±0,0
MLNC-Gd_{25,0}	126±0	0,8±0,0	52,4±0,0	115±4	0,2±0,0
MLNC-Gd_{50,0}	126±0	0,8±0,0	52,4±0,1	117±4	0,2±0,0
MLNC-Gd_{100,0}	124±2	0,9±0,1	53,8±2,0	115±1	0,2±0,0

Tabela 9. Valores de Potencial Zeta e pH para as suspensões de nanocápsulas MLNC contendo gadolínio.

Formulação	pH	Potencial Zeta (mV)
MLNC-Gd_{12,5}	4,25±0,00	10,0±0,6
MLNC-Gd_{25,0}	4,26±0,01	11,1±0,3
MLNC-Gd_{50,0}	4,27±0,01	11,1±0,5
MLNC-Gd_{100,0}	4,28±0,00	10,4±3,0

Os valores de potencial zeta nas diferentes as concentrações de Gd³⁺ não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), sendo então analisados os gráficos obtidos. Como pode ser observado, as duas concentrações mais altas apresentaram uma reprodutibilidade inferior às formulações de menor concentração de gadolínio (Figura 31). Dessa forma elas foram descartadas para a continuidade dos estudos. Como as formulações de concentração mais baixa (MLNC-Gd_{12,5}, e MLNC-Gd_{25,0}) se mostraram reprodutíveis, optou-se por seguir os estudos apenas com a formulação MLNC-Gd_{25,0} (concentração final de Gd³⁺ de 25 µg/mL), por ser a formulação reprodutível com maior concentração de gadolínio.

O pH para as formulações contendo gadolínio (Tabela 9), também apresentou valores similares ($p < 0,05$), demonstrando que variação das concentrações deste íon metálico não influenciou neste parâmetro.

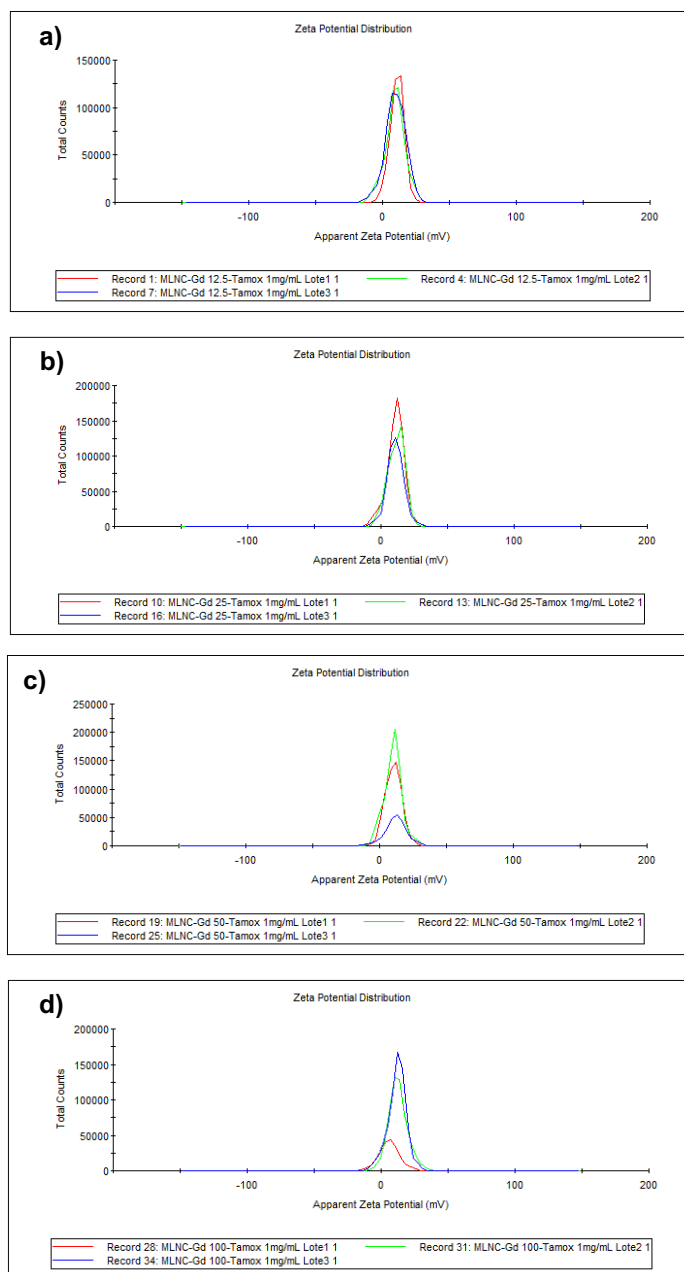


Figura 31. Distribuição de potencial zeta das formulações contendo diferentes concentrações de gadolínio: a) MLNC-Gd_{12,5}, b) MLNC-Gd_{25,0}, c) MLNC-Gd_{50,0}, d) MLNC-Gd_{100,0}.

Estas formulações também foram analisadas mediante microscopia óptica com atenuação de luz polarizada para determinar a estrutura dos possíveis cristais de tamoxifeno presentes nas formulações. As fotografias (Figura 32) pode ser observada presença de alguns cristais, com um tamanho similar a os observados nas formulações contendo zinco (Figura 27).

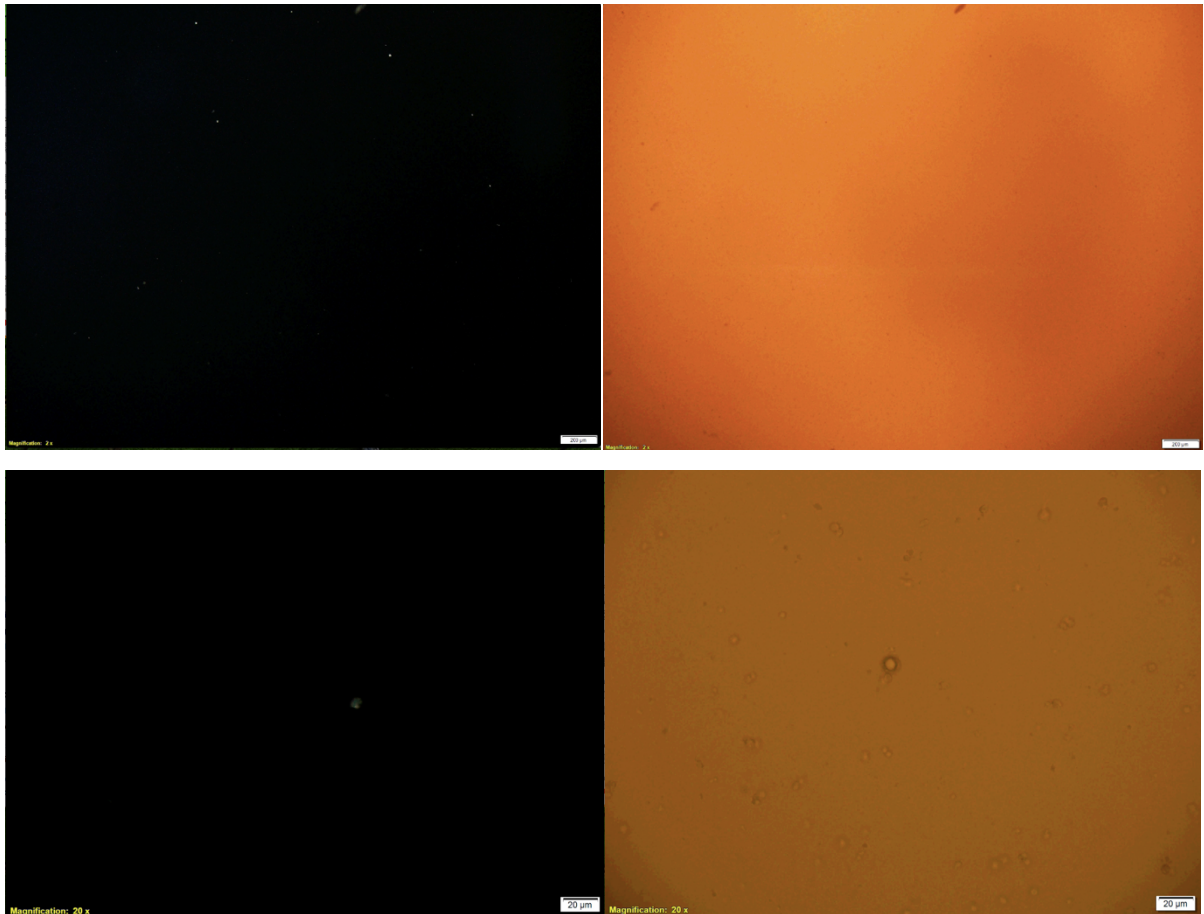


Figura 32. Fotografia de microscopia óptica da MLNC-Gd_{25,0} a) sem luz polarizada 2X, b) com luz polarizada 2X, c) sem luz polarizada 20X, b) com luz polarizada 20X.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO

5.4.1 Validação do método de quantificação do tamoxifeno por CLAE

A validação do método de quantificação do tamoxifeno por CLAE mostrou ser específico (não foram observadas interferências de co-eluição nas medições), mostrando uma linearidade no intervalo de 1 até 30 $\mu\text{g/mL}$, obtendo-se um coeficiente de correlação maior de 0,99 de acordo com o preconizado pela ANVISA (Figura 33).

Com os resultados obtidos nas curvas de linearidade foram calculados os valores para o limite de detecção e o limite de quantificação através das equações 1 e 2, respectivamente. Os valores obtidos foram 0,051 $\mu\text{g/mL}$ para o LD e 0,153 $\mu\text{g/mL}$ para o LQ.

O método foi considerado exato, uma vez que a recuperação no ponto baixo (5 $\mu\text{g/mL}$) foi de 95,7%, no ponto médio (10 $\mu\text{g/mL}$) 95,2% e no ponto alto (20 $\mu\text{g/mL}$) 102,8%. A precisão intradia (repetibilidade) apresentou DPR de 0,97% e a interdia (precisa intermediária, com troca de operador) apresentou DPR de 2,36% demonstrando que o método pode ser considerado preciso.

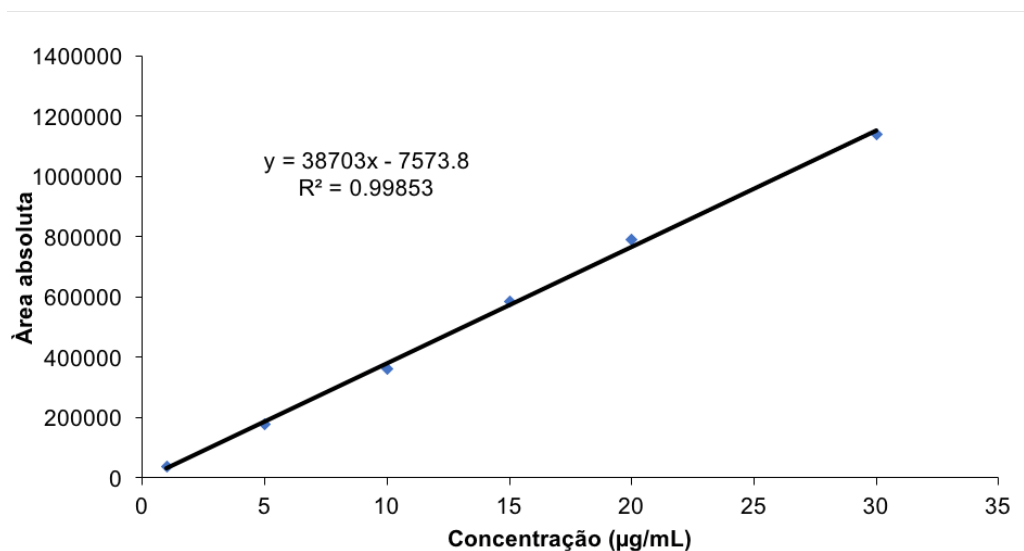


Figura 33. Curva média de calibração do tamoxifeno por CLAE.

5.4.2 Teor

O solvente empregado para a extração do tamoxifeno foi a acetonitrila, permitindo assim a destruição da nanocápsula (WEISS-ANGELI *et al.* 2010).

Para todos os tipos de formulações (contendo 1 mg/mL de tamoxifeno) foram obtidas recuperações desde 98% até 103% (Tabela 10), demonstrando a exatidão em todas as formulações contendo 1 mg/mL de tamoxifeno.

Tabela 10. Quantificação do tamoxifeno nas formulações de nanocápsulas.

Formulação	Conc. Esperada (mg/mL)	Doseamento (mg/mL)	Recuperação (%)
LNC _{1,00T}	1,00	1,03±0,05	103±6
LNCQ _{1,00T}	0,90	0,91±0,06	101±8
MLNC-Zn _{1,00T}	0,88	0,91±0,03	103±4
MLNC-Gd ₂₅	0,88	0,86±0,88	98±9

Nota: Os valores são mostrados como média ± desvio padrão; n=3.

5.4.3 Eficiência de encapsulação (EE)

Para avaliar a eficiência de encapsulação, utilizou-se o método da ultrafiltração centrifugação. Embora esse método seja bastante preciso para informar a quantidade de fármaco encapsulado, ele apresenta parâmetros que devem ser definidos previamente a análise, como: abertura do poro da membrana de ultrafiltração, velocidade de centrifugação. Dessa forma, inicialmente foram realizados testes para determinar os parâmetros mais adequados para a determinação da eficiência de encapsulação do tamoxifeno nas partículas desenvolvidas. As partículas contendo gadolínio não foram empregadas nesses estudos preliminares devido à dificuldade de obtenção desse íon metálico, bem como ao custo do mesmo.

O parâmetro mais relevante analisado para o presente trabalho foi o tamanho de poro da unidade filtrante (Ultrafree[®]) a ser usado. Para isso avaliou-se o uso de 10 KDa, 30 KDa e 100 KDa, usando uma velocidade fixa de centrifugação (1180 g) com tempo fixo de 5 minutos. Para tanto, as amostras foram adicionadas diretamente sobre na unidade filtrante em um volume de 300 µL. Os resultados obtidos são apresentados

na Tabela 11.

Tabela 11. Concentração de tamoxifeno no ultrafiltrado das suspensões de nanocápsulas

Formulação	Tamoxifeno na fase externa (mg/mL)		
	10 KDa	30 KDa	100 KDa
LNC _{1,00T}	0,00	0,00	0,00
LNCQ _{1,00T}	0,02	0,01	0,04
MLNC-Zn _{1,00T}	0,02	0,01	0,03

Pode ser observado que a medida que aumenta o tamanho do poro da unidade filtrante, as concentrações de fármaco também aumentaram. Dessa forma, optou-se por seguir as análises utilizando a membrana de 100 KDa para melhor avaliação das formulações (n=3) e foi incluída a formulação contendo Gd³⁺ (MLNC-Gd₂₅). Os resultados obtidos são apresentados na sequência.

Tabela 12. Concentração de tamoxifeno no ultrafiltrado das suspensões de nanocápsulas e eficiência de encapsulação

Formulação	Media em massa (mg/mL)	Media em Percentual	Eficiência de encapsulação (%)
LNC _{1,00T}	0,02±0,00	1,47±0,28	98±0
LNCQ _{1,00T}	0,07±0,03	5,66±2,39	93±3
MLNC-Zn _{1,00T}	0,02±0,02	2,83±1,85	98±2
MLNC-Gd ₂₅	0,03±0,00	3,27±0,41	96±1

A eficiência de encapsulação de todas as formulações foi superior a 93%, demonstrando que o fármaco se encontra majoritariamente encapsulado e apresentando menos de 6% do fármaco presente na fase externa das nanocápsulas. É possível observar que a maior quantidade de fármaco livre nas suspensões de nanocápsulas é evidenciada nas formulações LNCQ_{1,00T}. Esse resultado era esperado uma vez que essas amostras possuem aproximadamente 0,15% de ácido acético na sua composição final, que pode levar a solubilização de cristais de fármaco externos

à partícula, estando disponíveis para sua quantificação no ultrafiltrado. Além disso, a análise por difratometria de laser já havia demonstrado que essas amostras não possuíam partículas micrométricas. A eficiência de encapsulação das formulações MLNC tanto com o íon metálico Zn^{2+} quanto Gd^{3+} (MLNC- $Zn_{1,00T}$ e MLNC- Gd_{25}) apresentou valores similares, indicando que a presença destes íons metálicos nas formulações estaria influenciando no aumento da eficiência de encapsulação (quando comparado com a LNCQ $_{1,00T}$, que é a suspensão previa à adição dos íons metálicos), possivelmente pela interação dos íons metálicos com o tamoxifeno livre nas suspensões de nanocápsulas. Os valores de EE das partículas com os íons metálicos foi similar aos valores obtidos para as suspensões LNC $_{1,00T}$.

Após a realização dos estudos de eficiência de encapsulação, os filtros usados nas análises e o ultrafiltrado obtido foram explorados por meio de microscopia óptica para determinar a possível presença de cristais retidos nele ou de possíveis interferências nesta técnica, e assim demonstrar a eficiência desta técnica na separação do fármaco livre.

Inicialmente, como branco foi empregado um filtro sem ser usado previamente e desta forma determinar a estrutura destes antes de serem usados nas análises. As fotografias obtidas são apresentadas na sequência.

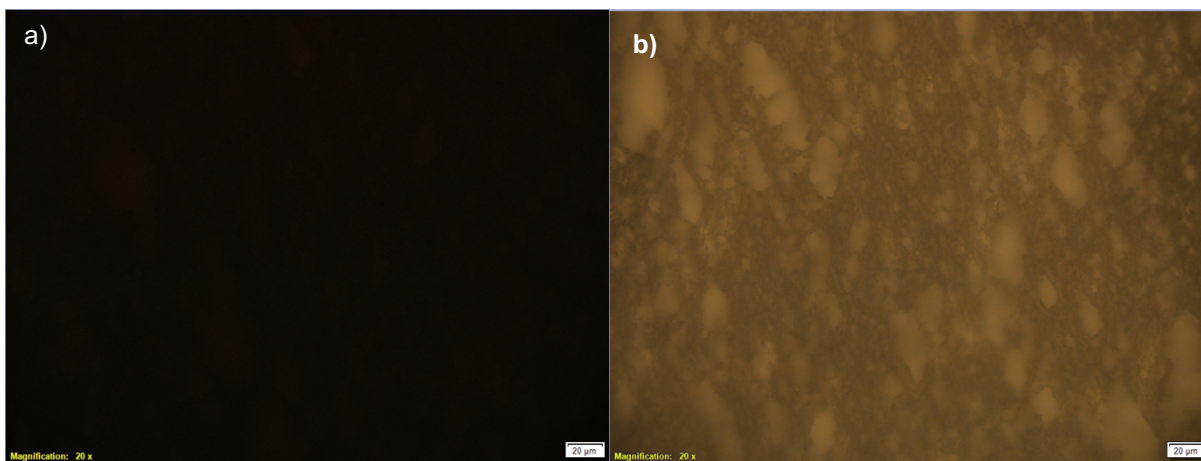


Figura 34. Fotografia de microscopia óptica do filtro usado como branco a) com luz polarizada 20X; b) sem luz polarizada 20X.

Na fotografia sem luz polarizada é evidenciada a estrutura do filtro, mostrando uma alta porosidade, já na luz polarizada pode se ver a ausência de luminosidade, o que já era esperado, devido à ausência de fármaco ou substâncias interferentes presentes.

Posteriormente foi analisado o filtro após o processo de ultrafiltração-centrifugação da formulação LNC. Foi escolhida esta formulação já que ela apresentou partículas na faixa micrométrica, o qual foi relacionado com a presença de cristais de maior tamanho, o que já foi evidenciado na Figura 25. O uso dessa formulação, permitiria verificar o comportamento desses cristais livres nas formulações LNCQ e MLNC-Zn já que nestas foram evidenciados cristais de menor tamanho, o que permitiria uma melhor passagem através da unidade filtrante. As imagens obtidas são apresentadas na sequência.

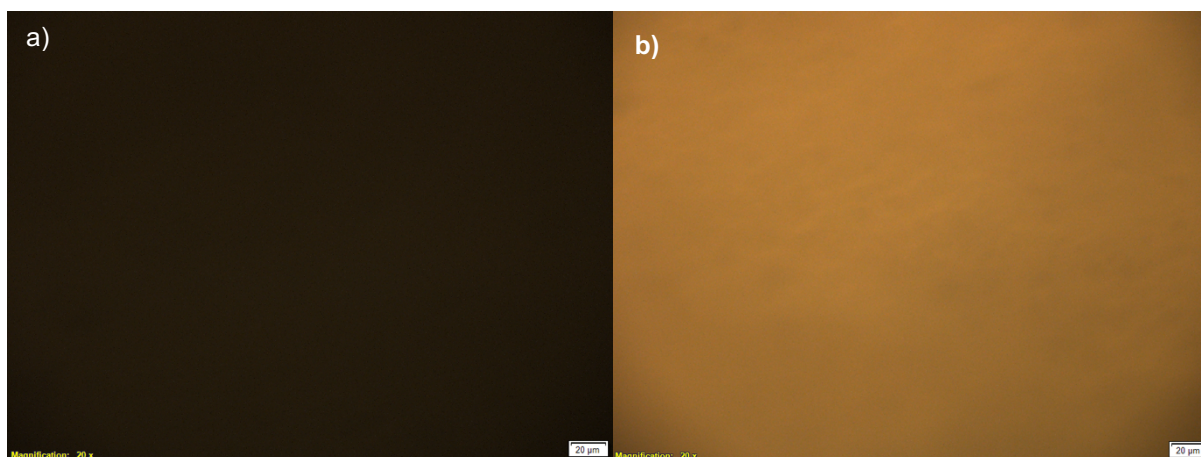


Figura 35. Fotografia de microscopia óptica do filtro após o processo de ultrafiltração-centrifugação da formulação LNC a) com luz polarizada 20X; b) sem luz polarizada 20X.

Na fotografia do filtro após o uso sem luz polarizada é evidenciada que a estrutura porosa do filtro foi preenchida, possivelmente pelas nanocápsulas, ou seja, pela umidade presente na formulação. Na luz polarizada é evidenciada a falta de luminosidade, o que demonstra a ausência de possíveis cristais de tamoxifeno retidos.

Posteriormente foi analisado o ultrafiltrado obtido (Figura 36), evidenciando a presença de cristais, com e sem luz polarizada, o que demonstra a facilidade destas partículas de atravessar os poros de 100 KDa, o que sugere uma alta flexibilidade por parte destes.

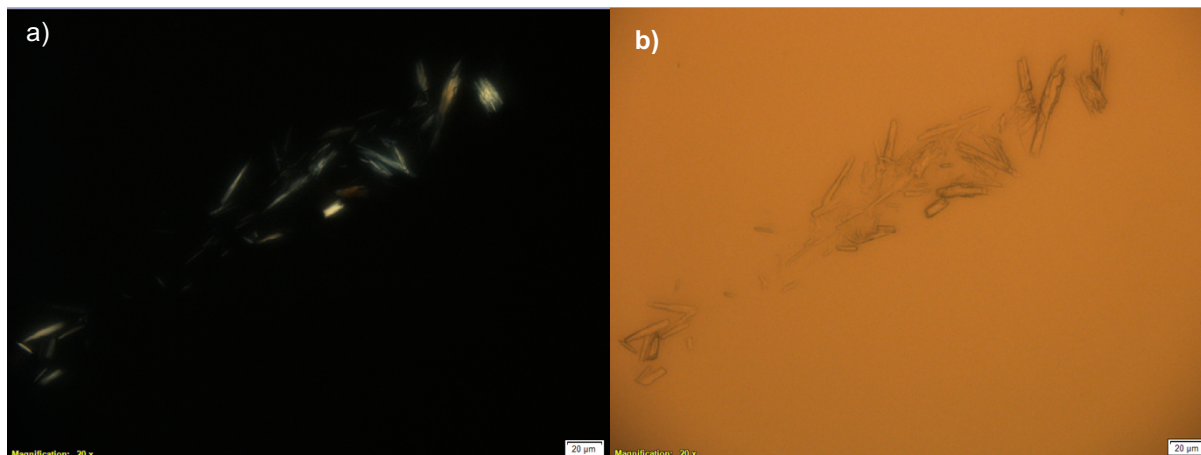


Figura 36. Fotografia de microscopia óptica do ultrafiltrado obtido do processo de ultrafiltração-centrifugação da formulação LNC a) com luz polarizada 20X; b) sem luz polarizada 20X.

A análise dos resultados de microscopia óptica permitiu determinar o comportamento dos cristais de tamoxifeno presentes nas suspensões de nanocápsulas e sua passagem através das unidades filtrantes na determinação da eficiência de encapsulação empregando a técnica de ultrafiltração-centrifugação, permitindo uma ótima interpretação dos resultados obtidos.

5.4.4 Distribuição do tamoxifeno nas suspensões de nanocápsulas

Uma vez estabelecida a eficiência de encapsulação, foi determinada a porcentagem de fármaco livre nas suspensões; estando então, o restante do fármaco encapsulado na partícula, incluindo o fármaco presente no núcleo e o que poderia estar retido na superfície das partículas, o que previamente foi demonstrado com a inversão dos valores de potencial zeta para as partículas LNC_{1,00T}.

Empregando então, o método da ultrafiltração centrifugação, avaliou-se a possibilidade de utilizar a amostra misturada a um solvente que garantisse que todo o fármaco retido na superfície das partículas (incluindo o fármaco livre) estivesse solubilizado, garantindo sua total passagem pela membrana de ultrafiltração. Sendo assim, testou-se uma diluição prévia da amostra com o solvente metanol (1:1). A mistura de suspensão de nanocápsulas com metanol foi realizada e imediatamente colocada na centrifuga. Nos estudos preliminares, foram avaliados os mesmos tamanhos de poro da unidade filtrante (Ultrafree[®]) do que na eficiência de encapsulação (10 KDa, 30 KDa e 100 KDa) já que a presença de solvente talvez

permitisse uma passagem similar do fármaco nos três tamanhos de poro empregados. A velocidade de centrifugação foi de 1180 g com tempo fixo de 5 minutos. Para estes estudos preliminares também não foram empregadas as formulações contendo o íon metálico gadolínio (MLNC-Gd₂₅). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Concentração de tamoxifeno no ultrafiltrado das suspensões de nanocápsulas.

Formulação	Tamoxifeno na fase externa (mg/mL)		
	10 KDa	30 KDa	100 KDa
LNC _{1,00T}	0,08	0,21	0,27
LNCQ _{1,00T}	0,19	0,21	0,28
MLNC-Zn _{1,00T}	0,18	0,20	0,22

Assim como na eficiência de encapsulação o aumento do tamanho de poro de unidade filtrante, permitiu uma maior quantificação do fármaco nas diferentes suspensões de nanocápsulas testadas. Dessa forma, optou-se por seguir as análises utilizando a membrana de 100 KDa para melhor avaliação das formulações.

O emprego de metanol como solvente aumentou significativamente a quantidade do fármaco quantificado (Figura 37), sendo quantificado então 0,28 mg/mL o que corresponde aproximadamente a 30% do fármaco (Tabela 13), gerando uma incógnita ao respeito do uso desse solvente. O metanol usado como solvente talvez esteja alterando as paredes das nanocápsulas LNCQ_{1,00T} e MLNC-Zn_{1,00T}, liberando o conteúdo do núcleo. Isto possivelmente pela presença do ácido acético nessas formulações, que poderia estar permitindo a formação de ligações com o metanol, permitindo assim a passagem deste solvente para o interior das nanocápsulas e liberando o conteúdo, deixando-o assim disponível para sua quantificação.

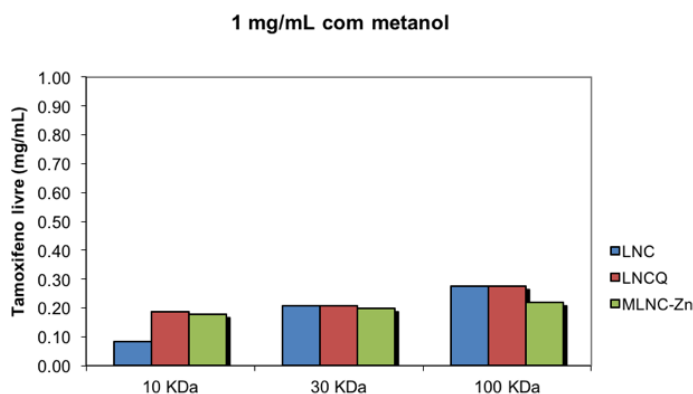


Figura 37. Análise por ultrafiltração centrifugação das suspensões de nanocápsulas de tamoxifeno na presença de solvente metanol.

Esses resultados determinaram a necessidade de um novo solvente que permitisse a separação do tamoxifeno livre sem a possível permeação através das paredes das nanopartículas. Propôs-se o uso de uma diluição prévia da amostra em ácido acético 10% na proporção 1:9 (suspensão de nanocápsulas:ácido acético 10%) para avaliar as suspensões de nanocápsulas, incluindo a formulação MLNC-Gd₂₅ (n=3). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Concentração de tamoxifeno no ultrafiltrado das formulações de nanocápsulas, empregando solução de ácido acético 10%.

Formulação	Media em massa (mg/mL)	Media em Percentual
LNC _{1,00T}	0,21±0,02	18,43±1,24
LNCQ _{1,00T}	0,17±0,02	16,20±1,15
MLNC-Zn _{1,00T}	0,16±0,03	16,81±1,70
MLNC-Gd ₂₅	0,14±0,01	16,39±1,28

Nota: Os valores são mostrados como média ± desvio padrão; n=3.

O resultado dessa análise demonstrou uma porcentagem de tamoxifeno na fase externa variando entre 16 e 18%, tendo os quatro tipos de partículas apresentado concentrações similares de fármaco na fase externa. Contudo, não é possível afirmar

que todo o fármaco quantificado na presença do ácido acético 10% esteja na forma livre, pois parte desse ainda poderia ter sido removido da superfície externa das nanopartículas.

Baseados nos resultados obtidos empregando a técnica de ultrafiltração-centrifugação sem o emprego de solventes (eficiência de encapsulação) e com o emprego da solução de ácido acético 10% foi proposto um modelo de distribuição do tamoxifeno nas suspensões de nanocápsulas. Os valores apresentados na Tabela 15 foram calculados assim:

- Porcentagem de fármaco no núcleo: Obtida usando a Equação 3, sendo CL a concentração do tamoxifeno no ultrafiltrado (tamoxifeno livre) com o emprego da solução de ácido acético 10%.
- Porcentagem de fármaco ligado na superfície: Fármaco quantificado no ultrafiltrado usando a solução de ácido acético 10% - Fármaco quantificado no ultrafiltrado na eficiência de encapsulação.
- Porcentagem de fármaco livre: Fármaco quantificado no ultrafiltrado na eficiência de encapsulação.

Os resultados obtidos evidenciam que para todas as formulações, a porcentagem de tamoxifeno no núcleo foi superior a 81%, indicando que a maior parte do fármaco se encontra no núcleo das nanopartículas; o que evidencia que o restante do fármaco, aproximadamente o 19%, é encontrado fora destas nanocápsulas. Baseados nos resultados obtidos na Tabela 14, foi gerada a hipótese que até 17% do tamoxifeno não encapsulado se encontra ligado na superfície das nanocápsulas, restando 6% dele em forma livre. A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos para cada uma das formulações.

Tabela 15. Proposta de distribuição do tamoxifeno nas formulações de nanocápsulas

Formulação	% de fármaco no núcleo	% de fármaco ligado na superfície	% de fármaco livre
LNC _{1,00T}	81±1	17±1	1±0
LNCQ _{1,00T}	83±1	11±2	6±2
MLNC-Zn _{1,00T}	82±2	14±3	3±1
MLNC-Gd ₂₅	84±1	13±2	3±0

Analisando os resultados obtidos e tendo em conta a superfície das partículas é possível pensar que o tamoxifeno na LNC_{1,00T} esteja interagindo com a lecitina de soja presente na superfície das partículas, o que já foi corroborado com a inversão dos valores do potencial zeta nas formulações com mais de 0,25 mg/mL de tamoxifeno (Tabela 5), demonstrando a afinidade do fármaco com a superfície das nanocápsulas. Quando é adicionada a solução de quitosana (LNCQ_{1,00T}) é evidenciada uma diminuição do fármaco ligado na superfície e um aumento do fármaco livre, o que sugere que o uma pequena fração fármaco é liberada, através da solubilização com o ácido acético ou possivelmente a quitosana esteja competindo com o fármaco para se aderir na superfície das partículas.

Com a adição dos íons metálicos zinco e gadolínio (MLNC-Zn_{1,00T} e MLNC-Gd₂₅) é possível observar um aumento na quantidade do fármaco retida, o que indica que a adição do íon metálico poderia estar influenciando na ligação do tamoxifeno com as superfícies das partículas novamente, diminuindo a quantidade do tamoxifeno livre em suspensão.

5.5 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO (FÁRMACO-ÍON METÁLICO) MEDIANTE ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO E ORP

A determinação do ORP (potencial óxido-redução), indica a capacidade de uma substância para agir como agente oxidante ou redutor de outra substância. Um resultado positivo indica que a substância é um agente oxidante. Quanto maior for o valor obtido, maior a capacidade oxidante. Os valores negativos, por sua vez, indicam que a substância é um agente redutor (AQUAHEALTHPRODUCTS, 2017).

Tabela 16. Resultados de potencial óxido-redução para as formulações de nanocápsulas

Formulações sem tamoxifeno	ORP (mV)	Formulações com tamoxifeno	ORP (mV)
LNC	82,5±0,7	LNC_{1,00T}	-40,6±1,3
LNCQ	126,3±0,3	LNCQ_{1,00T}	84,5±0,6
MLNC-Zn	109,1±0,5	MLNC-Zn_{1,00T}	72,3±0,3
MLNC-Gd	124,8±0,8	MLNC-Gd₂₅	78,7±0,9

Todas as formulações sem fármaco apresentaram valores positivos de ORP, indicando que as partículas são oxidantes. Quando são comparados os valores de ORP obtidos para formulações LNC e LNCQ sem fármaco, é evidenciado um elevado aumento do potencial oxidante após a adição da quitosana, o que já era esperado pois esse polímero é protonado no meio utilizado para sua solubilização. Já na formulação MLNC-Zn é observada uma diminuição dos valores o que era previsível baseados no potencial de redução do zinco que é de -0,76 V, indicando uma complexação deste íon metálico com a quitosana que reveste a superfície das nanocápsulas. Na formulação MLNC-Gd é evidenciada uma diminuição dos valores, embora estes resultados sejam pouco significativos já que o potencial de redução do gadolínio é -2,28 V (redução maior do que para o zinco), indicando uma menor coordenação deste íon metálico com estas formulações.

O íon metálico zinco (Zn^{2+}) coordena melhor nas formulações já que tem um raio iônico menor (0,740 Å) quando comparado com o gadolínio (Gd^{3+}) com um raio iônico de 0,938 Å. Esses resultados também podem ser relacionados com a teoria de o gadolínio é considerado um ácido duro e, portanto, menos polarizável, e o zinco é

considerado um ácido intermediário, tendo polarizabilidade intermediária, permitindo assim uma melhor complexação (PEARSON, 1963).

Nas formulações de LNC contendo o fármaco foi evidenciada uma inversão dos valores de ORP obtidos, indicando que essas formulações podem agir como agente redutor, a razão desta inversão está relacionada com a grande densidade eletrônica da molécula de tamoxifeno devido aos anéis benzênicos, concedendo uma carga negativa aos resultados de ORP. Por sua vez, quando a quitosana é adicionada (LNCQ_{1,00T}), essa densidade de elétrons do tamoxifeno é anulada, o que gera uma inversão dos valores de ORP, indicando a interação entre este polímero e o fármaco.

Quando os íons metálicos são adicionados às formulações contendo quitosana (MLNC-Zn_{1,00T} e MLNC-Gd₂₅), é observada uma diminuição dos valores de ORP quando comparados com as formulações sem fármaco, corroborando-se que a presença do tamoxifeno confere uma melhor complexação de ambos os íons usados.

Para corroborar os resultados obtidos mediante a medição do potencial óxido-redução foram analisadas as bandas obtidas por espectroscopia infravermelho, observando-se a presença de modos vibracionais ativos longitudinais assimétricos e simétricos (νCH_3) a 2962 cm^{-1} e (νCH_3) a 2872 cm^{-1} , respectivamente (Figura 38); estes são apresentados com linhas tracejadas. A linha tracejada perto de 2962 cm^{-1} mostra a presença de um ombro pertencente a um grupo funcional não identificado. É observado um leve deslocamento deste último para números de onda maiores, relacionando-se com o maior grau de empacotamento dos hidrocarbonetos. Assim também, a banda de deformação angular do grupo CH_2 (1453 cm^{-1}) apresenta valores menores de número de onda, que se relaciona à mudança conformacional, além do empacotamento das moléculas (Figura 39). A linha pontilhada mostra a região onde está presente a banda de deformação angular do grupo CH_2 .

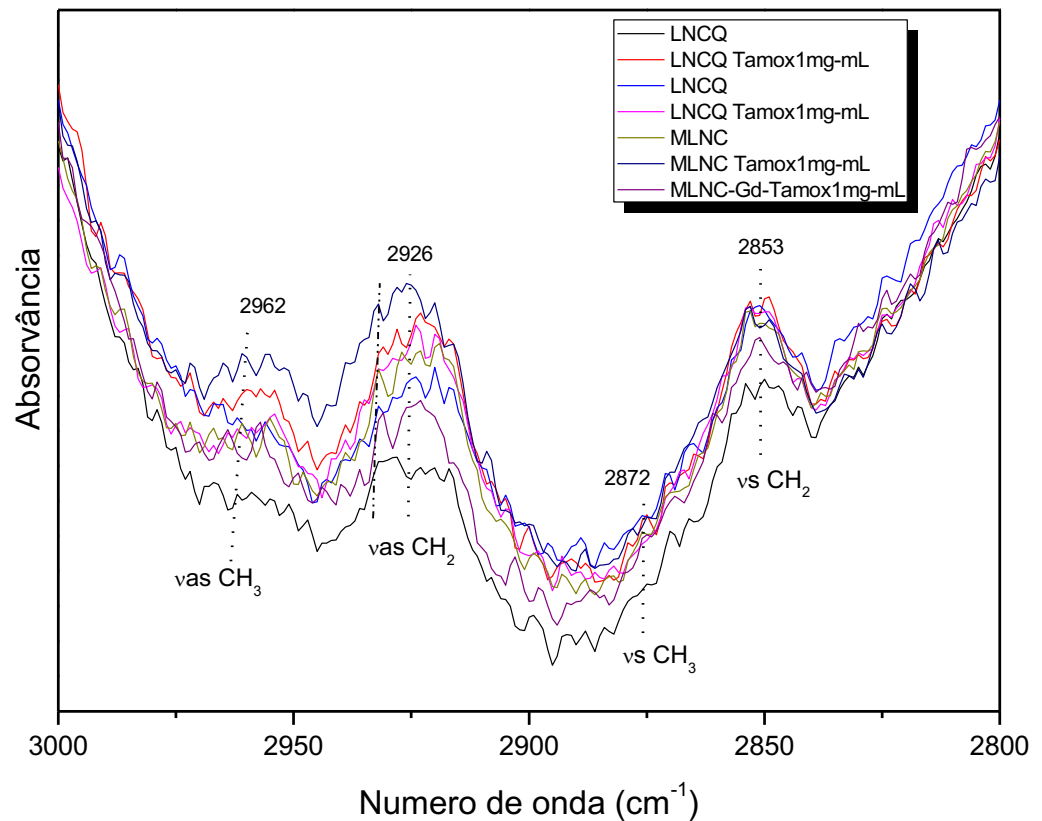


Figura 38. Espectro de infravermelho das diferentes amostras na região 3000 - 2800 cm⁻¹

Falahat e colaboradores (2016) relataram para moléculas lipídicas, que as mudanças para menores valores de comprimento de onda, nas bandas de deformação angular do grupo CH₂ estão associadas a transições de fase do sistema ortorrômbico para fase(s) hexagonal(is) metaestável(is). Assim também, a banda a 1341 cm⁻¹ também está relacionada a conformação *gauche* e a banda 1354 cm⁻¹ com a conformação dupla - *gauche*.

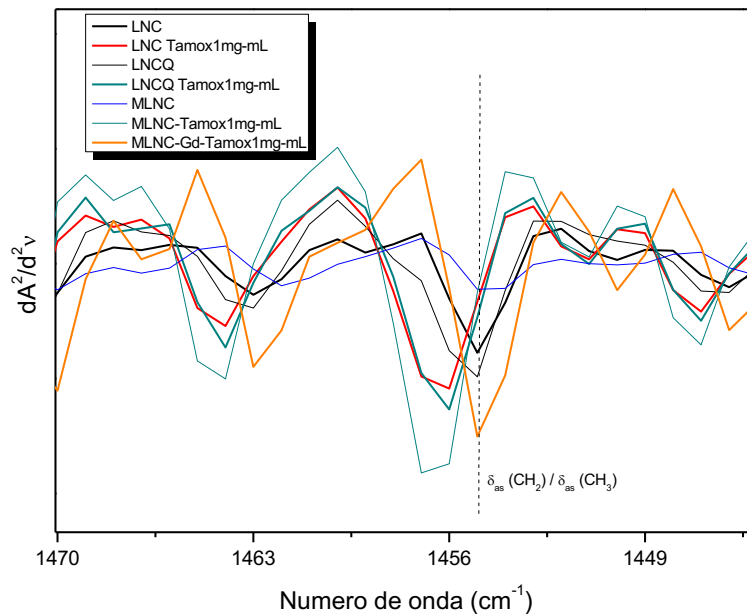


Figura 39. Espectro de infravermelho das diferentes amostras na região 1470 - 1449 cm^{-1}

A análise da segunda derivada é uma técnica que permite a diferenciação entre bandas de absorção próximas (sobrepostas), permitindo assim a identificação de pequenas mudanças que não são possíveis evidenciar no espectro original (RIEPPPO *et al.*, 2012).

Aplicando a função de segunda derivada nas formulações avaliadas, pode ser observado na Figura 40, no intervalo entre 1660 - 1640 cm^{-1} a presença de bandas relacionadas a α -hélice da amida I (1653 cm^{-1}) e a banda da folha- β da amida I (1644 cm^{-1}). As posições destas bandas estão relacionadas ao grau de ligação ponte hidrogênio, e o estado físico do composto (SILVERSTEIN, 2007). Na Figura 40 também pode ser observada a banda a 1653 cm^{-1} que corresponde à formulação LNC, a qual foi utilizada como referência da análise. Na amostra MLNC contendo gadolínio e o fármaco tamoxifeno apresenta um deslocamento a comprimentos de onda menores além de aumento de intensidade. A amostra LNCQ e a LNC contendo tamoxifeno, evidenciam uma diminuição de intensidade, além do deslocamento do número de onda, respectivamente.

Na formulação MLNC contendo o Zn^{2+} sem o fármaco o sinal aumenta ligeiramente, e é deslocado a um valor de comprimento de onda próximo ao da amostra LNC (Figura 40). Este comportamento pode estar relacionado à coordenação do íon metálico Zn^{2+} na formulação.

Entretanto, quando formulação contém o tamoxifeno em combinação com o íon metálico Zn^{2+} (MLNC- $Zn_{1,00T}$), observa-se um deslocamento para comprimento de onda maior na banda a 1453 cm^{-1} . Esse pode estar ocorrendo pelo efeito indutivo do grupo carbonila presente na PCL, TCM, e o monoestearato de sorbitano. Além de isso, o íon Zn^{2+} é considerado um ácido de Pearson de tipo intermediário. Como resultado poderia estar se tendo uma coordenação dele com os oxigênios, como as espécies nitrogenadas, exemplo a quitosana, presente na formulação. Quando é adicionado o íon metálico Gd^{3+} (MLNC- Gd_{25}), ácido de Pearson duro, é observado um aumento na intensidade de banda além de um deslocamento para números de onda menores na banda a 1653 cm^{-1} . Isto pode ser explicado como a possível presença de efeito de ressonância na banda carbonila, do TCM, e PCL. O que poderia produzir coordenação entre o íon metálico, e os anéis benzênicos. No entanto, é conhecido que o íon lantanídeo, Gd^{3+} , pode formar complexos com número de coordenação maior a 6, decorrente do alto valor da relação carga/raio do íon.

Assim também, o pH ácido das formulações, próximo a 4, diminui o grau de complexação do Gd^{3+} com bases duras, como as aminas. Como resultado se poderia esperar que a espécie Gd^{3+} estivesse menos coordenada que o Zn^{2+} , dado que já havia sido observado na análise dos valores de ORP. A banda a 1644 cm^{-1} mostra, na Figura 40, as mesmas conclusões que a banda a 1653 cm^{-1} .

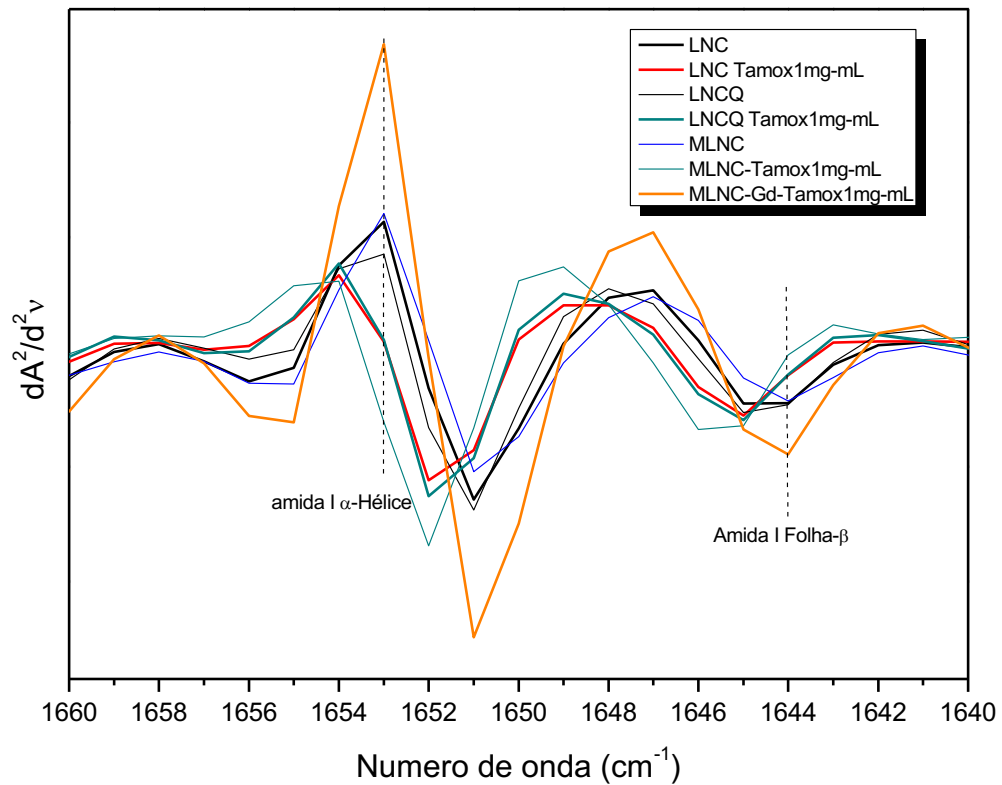


Figura 40. Derivada do espectro de infravermelho das diferentes amostras na região 1640 - 1660 cm^{-1}

Baseados na análise das bandas obtidas com espectroscopia de infravermelho e conferindo com os resultados de ORP são apresentadas as seguintes propostas de estruturas de complexação para o íon metálico Zn^{2+} (Figura 41) e o Gd^{3+} (Figura 42) com o tamoxifeno.

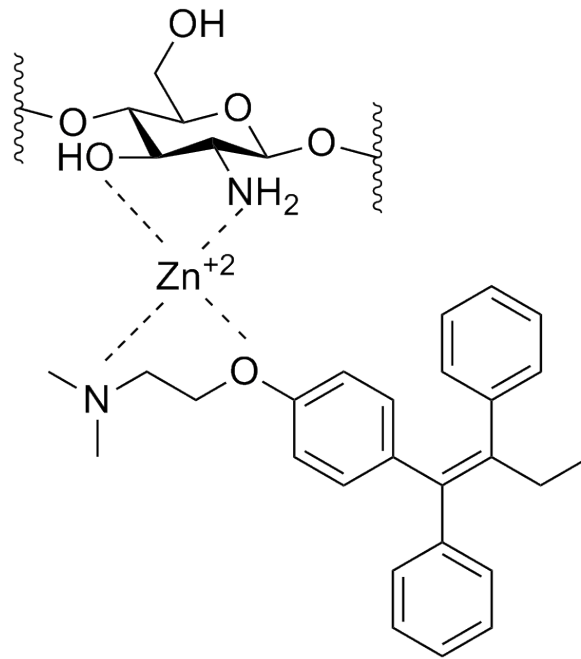


Figura 41. Estrutura de ligação do Zn^{2+} com o tamoxifeno

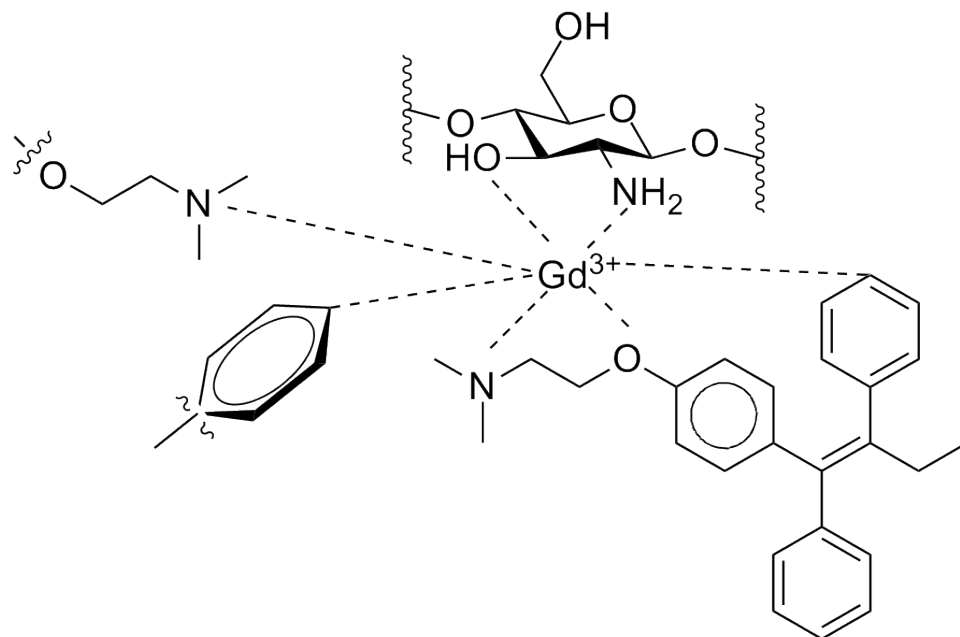


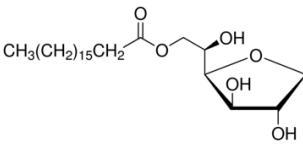

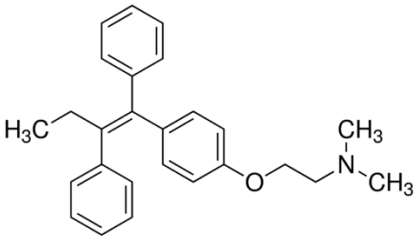

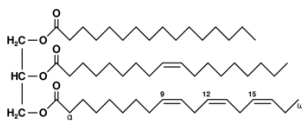

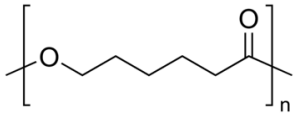

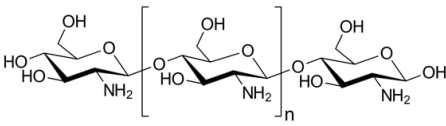

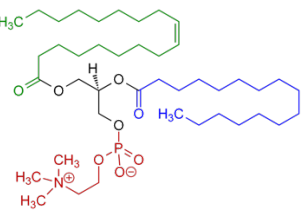



Figura 42. Estrutura de ligação do Gd^{3+} com o anel benzênico de dois moléculas de tamoxifeno.

Na Figura 41 é apresentada uma proposta de estrutura de complexação do íon metálico Zn^{2+} com o fármaco tamoxifeno e a quitosana (tetra-coordenação), mostrando uma estrutura estável.

Na Figura 42 é proposta a estrutura de ligação do íon metálico gadolínio Gd^{3+} onde podem ser observados número de coordenação de 7, relacionando-se com hapticidade de 1 (η^1), mas também especulasse que poderia estar presente uma hapticidade de 3 (η^3), com um número de coordenação maior.

Após serem estabelecidas as possíveis ligações entre nanoestruturas com os íons metálicos, então, foi sugerida uma representação da estrutura supramolecular das nanocápsulas. No quadro 2 são apresentadas, as matérias primas que conformam as nanocápsulas, acompanhadas de uma figura que as representa e que posteriormente farão parte dos gráficos propostos.

Quadro 2. Componentes das nanocápsulas

<p>Monoestearato de sorbitano</p>  <p>$CH_3(CH_2)_{15}CH_2$</p> 	<p>Tamoxifeno</p>  	<p>TCM</p>  
<p>PCL</p>  	<p>Quitosana</p>  	<p>Lecitina</p>  
<p>Zn^{2+}</p> 	<p>Gd^{3+}</p> 	

As estruturas supramoleculares das nanocápsulas de núcleo lipídico, revestidas com quitosana e funcionalizada com os íons metálicos Zn^{2+} ou Gd^{3+} são apresentadas na sequência.

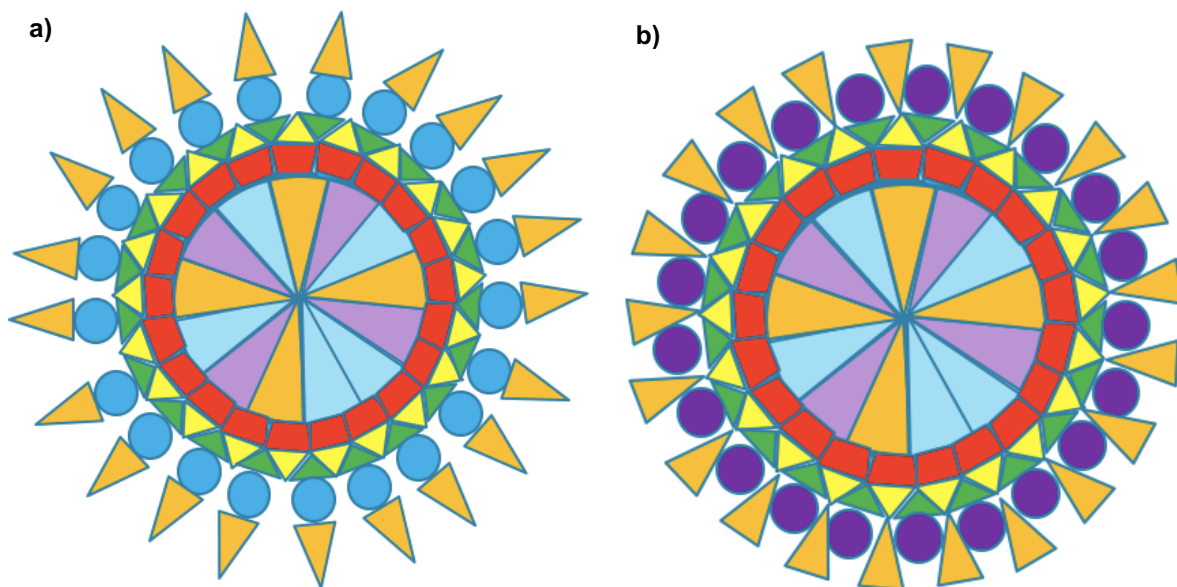


Figura 43. Estruturas supramoleculares das nanocápsulas a) MLNC- $Zn_{1,00T}$ b) MLNC- Gd_{25}

5.6 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS MCF7 E MDA-MB-231

A capacidade antiproliferativa das diferentes formulações: MLNC-Zn_{1,00T}, MLNC-Gd₂₅ e tamoxifeno em sua forma livre foi avaliada através do ensaio colorimétrico de MTT. O ensaio colorimétrico de MTT é um teste de triagem que avalia a atividade metabólica das células através da redução do reagente brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio. Dessa maneira, células viáveis reduzem metabolicamente o sal de MTT, formando os cristais de formazan de coloração azul-púrpura, que se acumulam no interior do citoplasma das células.

Através de leitura de densidade óptica a 492 nm, as diferenças nos valores de absorvância determinaram a porcentagem de células vivas, onde a inibição do crescimento celular foi determinada usando a Equação 7.

Na Figura 44 são apresentados os resultados obtidos através da realização do ensaio colorimétrico de MTT, das diferentes concentrações de tamoxifeno (2,5 a 100 μ M) com os diferentes tratamentos das formulações, após os diferentes tempos testados (24, 48 e 72h), após os diferentes tempos testados para a linhagem MCF-7 (células estrogênio dependente). As letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os grupos de tratamento, enquanto letras minúsculas representam diferenças entre os tempos de tratamento. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

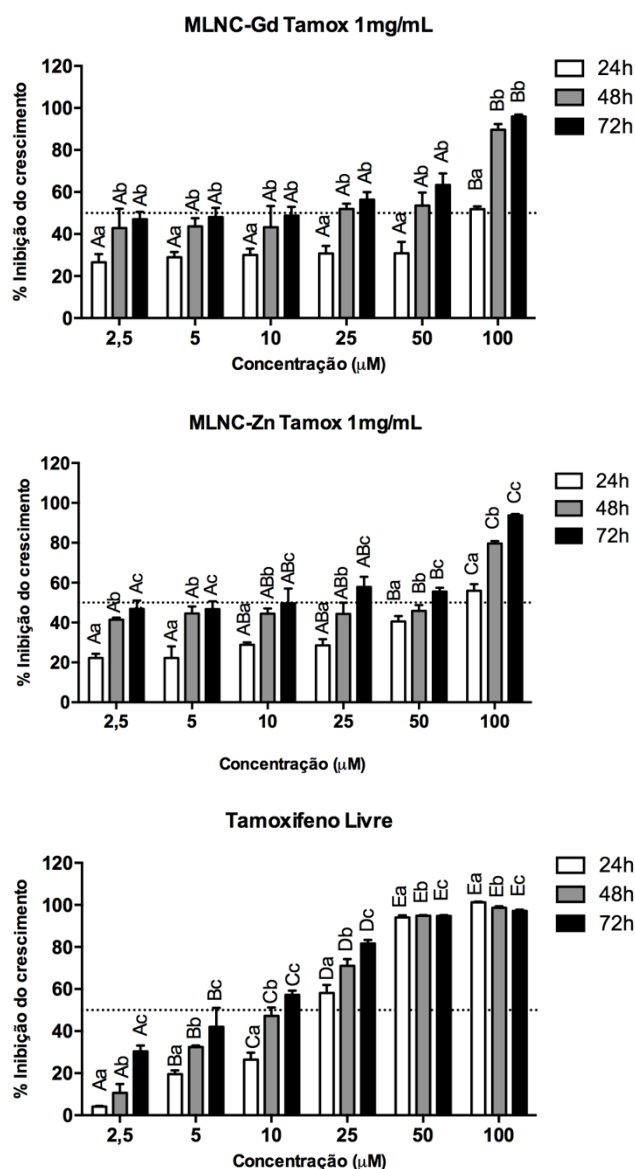


Figura 44. Efeito antiproliferativo dos diferentes tratamentos sobre o crescimento de células de câncer de mama MCF-7 (n=3).

As formulações MLNC-Zn_{1,00T} e MLNC-Gd₂₅ promoveram uma redução similar da viabilidade nas células avaliadas, observando-se curvas exponenciais de resposta para essas nanoformulações e uma linearidade de resposta para o fármaco livre. Para as formulações MLNC-Zn_{1,00T} e o fármaco livre o melhor tempo foi de 72 h, onde a viabilidade celular foi de menor do 50%, indicando que o efeito dependente do tempo de exposição ao tratamento. Para a formulação MLNC-Gd₂₅ o melhor tempo foi de 48 h. Para o fármaco livre, os melhores resultados de atividade citotóxica começaram na concentração de 5 µM, enquanto que para as formulações de nanocápsula esse efeito foi observado na concentração mínima, 2,5 µM.

A partir dos resultados obtidos, o IC₅₀ (concentração em que os tratamentos induzem 50% de inibição do crescimento celular) foi calculado utilizando o *Software GraphPad Prism 6* e os diferentes valores para os diferentes tratamentos representados na Tabela 17.

Tabela 17. IC₅₀ em μM dos diferentes tratamentos sobre o crescimento de células da linhagem MCF-7

Formulação	Tempo		
	24h	48h	72h
MLNC-Zn_{1,00T}	99,6 ± 64,2	16,1 ± 14,0	6,8 ± 5,7
MLNC-Gd₂₅	>100	10,8 ± 9,7	6,5 ± 4,6
Tamoxifeno livre	17,2 ± 2,6	10,3 ± 1,4	6,4 ± 1,2

No tempo de 24 h as nanoformulações apresentam valores de IC₅₀ elevados, o que poderia ter relação desse efeito com a quantidade de fármaco encapsulado. A medida que o fármaco vai sendo liberado do núcleo das nanopartículas começa o efeito nesta linhagem celular; a partir das 48 h esse efeito é intensificado, apresentando um comportamento similar para os dois tipos de formulações e o fármaco livre ($p < 0,05$). Esses resultados demonstram que as suspensões de nanocápsulas mantêm o efeito citotóxico do tamoxifeno e que esse efeito é tempo dependente.

As duas formulações de nanocápsulas MLNC-Zn_{1,00T}, MLNC-Gd₂₅ e o tamoxifeno na sua forma livre também foram testadas nas diferentes concentrações com os diferentes tratamentos das formulações, após os diferentes tempos testados desta vez para a linhagem MDA-MB-231 (células não estrogênio dependente). Estudos já demonstraram o efeito citotóxico do tamoxifeno nesta linhagem celular (LIU *et al.*, 2014). Na Figura 45 são apresentados os resultados obtidos através da realização do ensaio colorimétrico de MTT para este tipo de células.

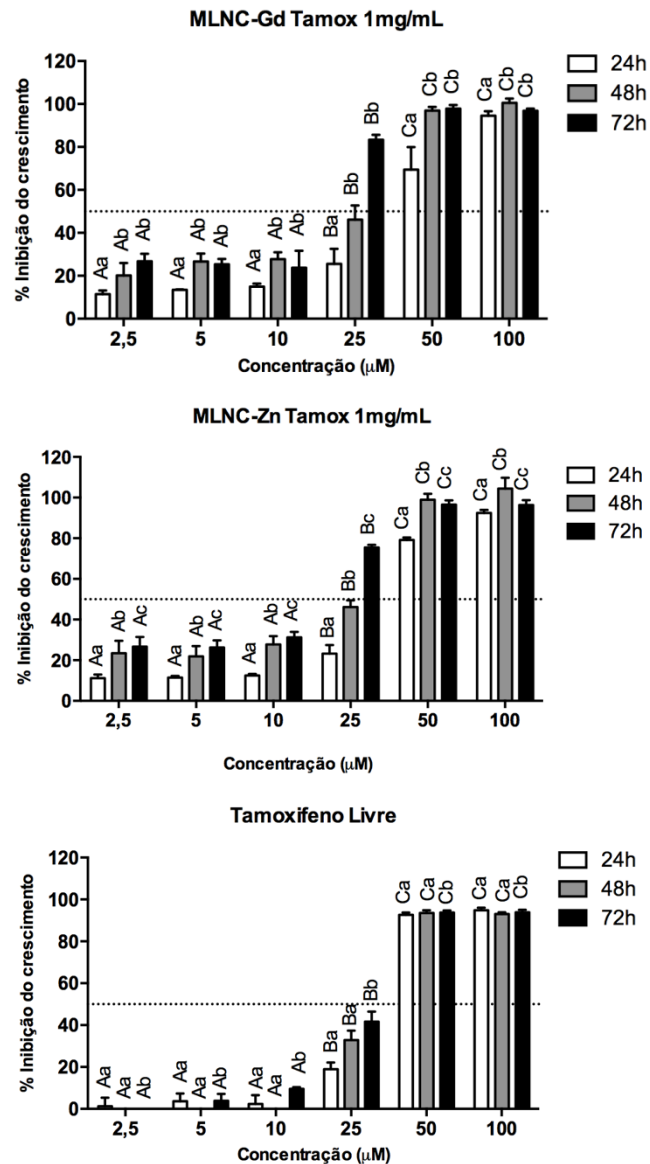


Figura 45. Efeito antiproliferativo dos diferentes tratamentos sobre o crescimento de células de câncer de mama MDA-MB-231(n=3).

Neste tipo de linhagem celular, as formulações MLNC-Zn_{1,00T} e MLNC-Gd₂₅ nas concentrações desde 2.5 μM até 10 μM promoveram uma inibição celular superior a 30% enquanto que o grupo controle de tamoxifeno em sua forma livre promoveu uma inibição inferior a 11%, indicando que o tamoxifeno livre em concentrações menores tem pouco efeito citotóxico para esta linhagem celular. Quando são analisadas as concentrações maiores (25 μM até 100 μM), as nanopartículas complexadas com zinco e gadolínio apresentaram um comportamento similar ao fármaco livre, tendo inibições próximas ao 100%.

O fármaco livre só apresenta efeito citotóxico nas concentrações maiores a 10 μM , enquanto as duas formulações têm essa resposta desde as concentrações mínimas avaliadas (2,5 μM). Cabe ressaltar que os mecanismos de morte celular só podem ser avaliados quando se tem uma inibição próxima a 50%, razão pela qual as concentrações maiores não utilizadas para estas análises.

A melhor concentração para ambas as nanopartículas foi de 2,5 μM , uma vez que as primeiras concentrações não mostraram diferença estatística ($p < 0,05$). Para o tamoxifeno livre, a melhor concentração foi de 10 μM , indicando a necessidade de maior concentração do fármaco livre (quando comparado com as formulações MLNC-Gd₂₅ e MLNC-Zn_{1,00T}) para ser observado um efeito citotóxico.

Para as formulações MLNC-Zn_{1,00T} e o fármaco livre, o melhor tempo de exposição ao tratamento foi de 72 h, onde a viabilidade celular foi menor do 50%. Na formulação MLNC-Gd₂₅ os tempos 48 e 72 h não apresentaram significância estatística ($p < 0,05$), sendo escolhido então o tempo de 48 h para esta formulação, corroborando assim a relação do efeito das formulações com o tempo de exposição da célula ao tratamento.

A partir dos resultados obtidos, o IC₅₀ foi calculado e os diferentes valores para os diferentes tratamentos estão representados na Tabela 18.

Tabela 18. IC₅₀ em μM dos diferentes tratamentos sobre o crescimento de células da linhagem MDA-MB-231 após os diferentes tempos de tratamentos

Formulação	Tempo		
	24h	48h	72h
MLNC-Zn_{1,00T}	34,5 \pm 4,6	16,8 \pm 6,1	11,6 \pm 2,9
MLNC-Gd₂₅	35,2 \pm 7,4	16,4 \pm 5,7	12,3 \pm 3,7
Tamoxifeno livre	32,2 \pm 2,6	28,9 \pm 2,6	26,8 \pm 2,2

No tempo de 24 h as nanoformulações e o fármaco livre apresentam valores de IC₅₀ similares, sendo estatisticamente iguais. A partir das 48 h a redução da viabilidade foi mais intensa, apresentando melhores resultados ($p < 0,05$) para as nanopartículas. No tempo de 72 h de tratamento, o efeito das formulações de nanocápsulas manteve-se superior ao livre, sendo necessária uma quantidade 50% menor de tamoxifeno, superando o fármaco livre nas células MDA-MB-231. Esses

resultados demonstram que as suspensões de nanocápsulas melhoram o efeito citotóxico do tamoxifeno e que o aumento desse efeito é tempo dependente.

Embora os valores de IC_{50} calculados para as células MDA-MB-231 sejam maiores que aqueles apresentados para as células do tipo MCF-7, deve-se levar em consideração a falta de especificidade das células MDA-MB-231 para este tipo de tratamento. Estas células são células do subtipo *Claudin-low*, triplo negativa para os receptores ER, PR e HER2; enquanto que as células MCF-7 são do tipo luminal e são positivas para os receptores ER e PR (NEVE *et al.*, 2006).

6 CONCLUSÕES

Com o presente estudo foi possível a obtenção de sistema homogêneo de nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com a quitosana ChitoClear[®] FG95 e posteriormente funcionalizadas com os íons metálicos Zn²⁺ e Gd³⁺. Estas suspensões de nanocápsulas apresentaram maior efeito citotóxico que o fármaco livre nas concentrações menores, nos dois tipos de células testados, o que é uma vantagem sabendo que as células MDA-MB-231 são negativas aos três tipos de receptores, incluindo o de estrogênio, mediante o qual o tamoxifeno tem seu efeito terapêutico.

A formulação proposta para teranóstica (MLNC-Gd₂₅), apresentou melhores resultados nos dois tipos de células testadas, apresentando um efeito citotóxico em um tempo menor, corroborando a vantagem do uso deste íon metálico nas formulações de nanocápsulas.

Levando em consideração a análise dos resultados obtidos foi possível uma determinação da distribuição do tamoxifeno nas formulações de nanocápsulas, sendo também proposta a estrutura química das ligações fármaco-íon metálico, sugerindo que houve uma complexação de ambos os íons metálicos empregados e que posteriormente permitiu realizar uma proposta da estrutura das nanocápsulas.

Ambas as formulações desenvolvidas foram funcionalizadas com íons metálicos, o que garante a possível aplicação delas tanto na terapêutica (MLNC-Zn_{1,00T}) quanto na teranóstica (MLNC-Gd₂₅). Elas têm um diâmetro inferior a 1000 nm, razão pela qual são consideradas adequadas para estudos posteriores já que elas estão compostas de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, podendo ser usadas por via parenteral, já que carecem de contaminantes micrométricos.

Será proposta a realização de estudos posteriores para determinar o mecanismo de ação citotóxica das nanoformulações e estudos experimentação animal para determinar o comportamento das formulações de nanocápsulas *in vivo*.

Em forma geral o objetivo deste estudo foi atingido, gerando a possibilidade de estudos posteriores e visando a futura aplicação tanto em terapêutica quanto em teranóstica das nanopartículas desenvolvidas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGST, M. S.; DROVER, D. R. Pharmacology of drugs formulated with DepoFoam: a sustained release drug delivery system for parenteral administration using multivesicular liposome technology. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 45, número 12, p. 1153-76, 2006.

(ANVISA) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC No 166, de 24 de julho de 2017. Validação de métodos analíticos. Ministério da Saúde, Brasília, DF, 25 de julho de 2017.

AQUAHEALTHPRODUCTS "Understanding pH and ORP". Disponível em: <http://www.aquahealthproducts.com/understanding-ph-and-orp>. Acesso em: 8 outubro 2017.

BABAN, D. F.; SEYMOUR, L. W. Control of tumor vascular permeability. *Advanced Drug Delivery Review*, v. 34, p. 109–119, 1998.

BENDER, E.; ADORNE, M.; COLOMÉ, L.; ABDALLA, D.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. Hemocompatibility of poly(-caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 426, p. 271–279, 2012.

BENDER, E.; ADORNE, M.; COLOMÉ, L.; GUTERRES, S.; ABDALLA, D.; POHLMANN, A. New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti-LDL(-) -functionalized nanocapsules, *Pharmaceutical Research*, v. 31, p. 2975–2987, 2014.

BIANCHIN, M.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I.; DE OLIVEIRA, C.; CONTRI, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. Radar charts based on particle sizing as an approach to establish the fingerprints of polymeric nanoparticles in aqueous formulations, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 30, p. 180–189, 2015.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 24–36, 2012.

BRODY, T. M. *Farmacologia humana - Minnerman/Wecker*. Tradução da 4a edição. São Paulo: Elsevier, 2006, 724 p.

CACHERIS, W. P.; QUAY, S. C.; ROCKLAGE, S. M. The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes. *Magnetic Resonance Imaging*, v. 8, p. 467-481, 1990.

CARAVAN, P.; ELLISON, J. J.; MCMURRY, T. J.; LAUFFER, R. B. Gadolinium - (III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chemical Reviews*, v. 99, p. 2293-2352, 1999.

CAVALLI, R; BISAZZA, A.; BUSSANO, R.; TROTTA, M.; CIVRA, A.; LEMBO, D.; RANUCCI, E.; FERRUTI, P. Poly(amidoamine)-Cholesterol Conjugate Nanoparticles Obtained by Electrospraying as Novel Tamoxifen Delivery System, *Journal of Drug Delivery*, V. 2011, p. 1-9, 2011.

CHABNER, B. A. et al. Agentes Antineoplásicos. In: HARDMAN, J. G. et al. (Ed.). *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. cap. 51.

CHEN, X.; GAMBHIR, S.; CHEON, J. “Theranostic nanomedicine”, *Accounts of Chemical Research*, v. 44 (10), p. 841–841, 2011.

CHOI, H.; LIU, W.; LIU, F.; NASR, K.; MISRA, P.; BAWENDI, M.; FRANGIONI, J. Design considerations for tumour-targeted nanoparticles, *Nature Nanotechnology*, v. 5 p. 42-47, 2010.

CHOU, L.; ZAGOROVSKY, K.; WARREN, C.; CHAN, W. DNA assembly of nanoparticle superstructures for controlled biological delivery and elimination, *Nature Nanotechnology*, v. 9, p. 148-155, 2014.

CHUAH, A.; KUROIVA, T.; ICHIKAWA, S.; KOBAYASHI, I.; NAKAJUMA, M. Formation of Biocompatible Nanoparticles via the Self-Assembly of Chitosan and Modified Lecithin. *Journal of Food Science*. v. 74(1), p. N1-N8, 2009.

COLE, M.; JONES, C.; TODD I. A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer: An early clinical appraisal of ICI46474. *British Journal of Cancer*, v. 25, p. 270-275, 1971

COLLERY, P.; KEPLER, B.; MADOULET, C.; DESOIZE B. Gallium in cancer treatment, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 42, p. 283–296, 2002.

COSTELLO, L.; FRANKLIN, R. The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. *Molecular Cancer*, v. 5:17, p. 1-13, 2006.

DELAVI, D. Defloculação de suspensões aquosas de argila e sua correlação com caracterizações químicas e de superfície, *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, UFCS*. 2011.

DESAI, N. Challenges in Development of Nanoparticle-Based Therapeutics, *AAPS Journal*, v. 14, No. 2, p. 282-295, 2012.

DUTTA, D.; SAHOO, A.; CHATTOPADHYAY, A.; GHOSH, S. Bimetallic silver nanoparticle–gold nanocluster embedded composite nanoparticles for cancer theranostics, *Journal of Materials Chemistry*, v. 4, p. 793-800, 2016.

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

ENYEDY, E.; DÖMÖTÖR O., VARGA, E.; KISS, T.; TROND, R.; HARTINGER, C.; KEPLER, B. Comparative solution equilibrium studies of anticancer gallium(III) complexes of 8-hydroxyquinoline and hydroxy(thio)pyrone ligands, *Journal of Inorganic Biochemistry* 117, p. 189-197, 2012.

ERRINGTON, N.; HARDING, S.; VÅRUM, K.; ILLUM, L. Hydrodynamic characterization of chitosans varying in degree of acetylation, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 15, p. 113-197, 1993.

FALAHAT, R.; WIRANOWSKA, M.; TOOMEY, R.; ALCANTAR, N. ATR-FTIR analysis of spectral and biochemical changes in glioma cells induced by chlorotoxin. *Vibrational Spectroscopy*, v. 87, p. 164-172, 2016.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.; AMMOURY, N.; BENITA S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, R1-R4, 1989.

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

FIEL, L.; PAESE, K.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. A strategy to estimate the intrinsic flux of a poorly water soluble substance for comparison with its release from lipid-core nanocapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 441, p. 716– 724, 2014.

FISHER, B.; COSTANTINO, J.; WICKERHAM, D.; REDMOND, C.; KAVANAH, M.; CRONIN W.; *et al.* Tamoxifen for prevention of breast cancer: Report of the national surgical adjuvant breast and bowel project P-1 study. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 90, p. 1371-1388, 1998.

FRICKER, S. Metal based drugs: from serendipity to design, *Dalton Transactions*, p. 4903–4917, 2007.

FRANKLIN, R; MILON, B; FENG, P; COSTELLO, L. Zinc and zinc transporter in normal prostate function and the pathogenesis of prostate cancer. *Frontiers in Bioscience: A virtual library of medicine*, v. 10, p. 2230–2239, 2005.

GAL, D.; KOPEL, S.; BASHEVKIN, M.; LEBOWICZ, J.; LEV, R.; TRANCER, L. Oncogenic potential of tamoxifen on endometria of postmenopausal women with breast cancer—preliminary report, *Gynecologic Oncology*, v. 42 p. 120–123, 1991.

GILLER, R.; GUINEBRETIÈRE, J-M.; LUCIDARME, O.; CLUZEL, P.; JANAUD, G.; FINET, J-F.; TARDIVON, A.; MASSELOT, J.; VANEL, D. Nonpalpable breast tumors: diagnosis with contrast-enhanced subtraction dynamic MR imaging. *Radiology*, v. 191, p. 625-631, 1994.

GÓMEZ-RUIZ, S.; GALLEGO, B.; KALUDEROVIĆ, M.; KOMMERA, H. HEY-HAWKINS E, PASCHKE R., KALUDEROVIĆ G., Novel gallium (III) complexes containing phthaloyl derivatives of neutral aminoacids with apoptotic activity in cancer cells, *Journal of Organometallic Chemistry* 694, p. 2191-2197, 2009.

GRAHAME-SMITH, D. G.; ARONSON, J. K. Farmacopéia: tamoxifeno. In: _____. (Aut.). *Tratado de Farmacologia Clínica e Farmacoterapia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 545-546.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, v. 26, número 1, p. 57–64, 2008.

HECKL, S.; PIPKORN, R.; WALDECK, W.; SPRING, H.; JENNE, J.; VON DER LIETH, CW.; CORBAN-WILHELM, H.; DEBUS, J.; BRAUN, K. Intracellular visualization of prostate cancer using magnetic resonance imaging. *Cancer Research*, v. 63, p. 4766-4772, 2003

HEYWANG-KÖBRUNNER, S.; VIEHWEG, P.; HEINIG, A.; KÜCHLER, Ch. Contrast-enhanced MRI of the breast: accuracy, value, controversies, solutions. *European Journal of Radiology*, v. 24, p. 94-108, 1997.

HMDB, Human Metabolome Database, Zinc. Disponível em: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB15532#references>. Acesso em: 4 dezembro 2017.

HMDB, Human Metabolome Database, Gadolinium. Disponível em: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB41899>. Acesso em: 4 dezembro 2017.

HOBBS, S. K.; MONSKY, W. L.; YUAN, F.; ROBERTS, W. G; GRIFFITH, L.; TORCHILIN, V. P.; JAIN, R. K. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, v. 95, p. 4607–4612, 1998.

HSDB, "Tamoxifen". Disponível em: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~HIAMLb:1>. Acesso em: 4 outubro 2017.

HWANG, D.; DAMODARAN, S. Selective precipitation and removal of lipids from cheese whey using chitosan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, p. 33-37, 1995

ICH, International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. 13p, 2005.

INCA, Instituto Nacional do Câncer (Org.). **Câncer de mama**. 2016. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>. Acesso em: 01 abr. 2016.

JÄGER, A.; STEFANI, V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 338, número 1, p. 297, 2007.

JÄGER, E.; VENTURINI, C.G.; POLETTO, F.S.; COLOMÉ, L.M.; JOÃO P. U. POHLMANN, J.P.U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.O.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 5, p. 130–140, 2009.

JAVID, S.; ZIAMAJIDI, N.; FOROUGH, S.; ABBASALIPOURKABIR, R. Effects of Tamoxifen-loaded Solid Lipid Nanoparticles on the Estrogen Receptor- α (ER- α) and Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) Genes Expression in the Endometrial Tissue of Ovariectomized Female Sprague-Dawley Rats, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 96, p. 706-712, 2017.

JEMAL, A.; MA, J.; ROSENBERG, PS.; SIEGEL, R.; ANDERSON, WF. Increasing lung cancer death rates among young women in southern and midwestern states. *Journal of Clinical Oncology*, v. 30 p. 2739-2744, 2012.

JONES, A.; HARRIS, A. L. New developments in angiogenesis: A major mechanism for tumor growth and target for therapy. *Cancer Science*, v. 4, p. 209–217, 1998.

JONES, R. Particle size analysis by laser diffraction: ISO 13320, standard operating procedures, and Mie theory, *American Laboratory*, v. 35, p. 44-47, 2003.

JORNADA, D.S.; FIEL, L.A.; BUENO, K.; GERENT, J.F.; PETZHOLD, C.L.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. *Soft Matter - Royal Society of Chemistry*, v. 8, p. 6646- 6655, 2012.

KAMANGAR, F.; DORES, G.; ANDERSON, W. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World, *Journal of Clinical Oncology*, v. 24, p. 2137-2150, 2006.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy, *Nature Publishing Group*, v. 7, p. 573-584, 2007.

KONDA, S.; AREF, M.; WANG, S.; BRECHBIEL, M.; WIENER, E. Specific targeting of folate-dendrimer MRI contrast agents to the high affinity folate receptor expressed in ovarian tumor xenografts. *Magma*, v. 12, p. 104–113, 2001.

KUKOWSKA-LATALLO, J. F.; CANDIDO, K. A.; ZHENGYI, C.; NIGAVEKAR, S. S.; MAJOROS, I. J.; THOMAS, T. P.; BALOGH, L. P.; KHAN, M. K.; BAKER J. R. Jr. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Research*, v. 65, p. 5317–5324, 2005.

LAUFFER, R. B. Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design. *Chemical Reviews*, v. 87, p. 901-927, 1987.

LENTSCHIG, M; REIMER, P; RAUSCH-LENTSCHIG, U; ALLKEMPER, T; OELERICH, M; LAUB, G. Breath-hold gadolinium-enhanced MR angiography of the major vessels at 1.0 T: Dose-response findings and angiographic correlation. *Radiology*, v. 208 (2) p. 353–357, 1998.

LIU et al. Tamoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A–dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor– negative human breast cancer cell, *Breast Cancer Research*, p.: 16 ,2014

LIM, Y.; DESTA, Z.; FLOCKHART, D.; SKAAR, T. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 55, p. 471–478, 2005

LU, Y.; HU, Q.; LIN, Y.; DENNIS, B.; PACARDO, CHAO W.; WUJIN, S.; FRANCES, S.; LIGLER, DICKEY, M.; ZHEN G, Transformable liquid-metal nanomedicine, *Nature Communications*, p. 1-10, 2015.

MA, P.; XIAO, H.; LI, C.; DAI, Y.; CHENG, Z.; HOU, Z.; LIN, J. Inorganic nanocarriers for platinum drug delivery, *Materials Today*, v. 18, No.10, p. 554-564, 2015.

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

MAYER, F.; ADORNE, M.; BENDER, E.; DE CARVALHO, T.; DILDA A., BECK, R.; GUTERRES, S.; GIUGLIANI, R.; MATTE, U.; POHLMANN, A. Laronidase-Functionalized Multiple-Wall Lipid-Core Nanocapsules: Promising Formulation for a More Effective Treatment of Mucopolysaccharidosis Type I, *Pharmaceutical Research*, v. 32, p. 941-954, 2015.

MITSUMORI, L; BHARGAVA, P; ESSIG, M; MAKI, J. Magnetic Resonance Imaging Using Gadolinium-Based Contrast Agents. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*, v. 23(1) p. 51–69, 2014.

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

MOSQUEIRA, V.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDRAY, H.; PUISIEUX, F.; BARRAT G. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 89, p. 614–626, 2000.

MUCHA, M. Rheological characteristics of semi-dilute chitosan solutions. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 198, p. 471–484, 1997.

NCI, "Tamoxifen Citrate". Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/tamoxifencitrate>. Acesso em: 4 outubro 2017.

NEVE, R.; CHIN, K.; *et al.* A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes" *Cancer Cell*, v. 10, p. 515–527, 2006.

NGUYEN, T.; HEIN, S.; NG C.H. STEVENS W. Molecular stability of chitosan in acid solutions stored at various conditions. *Journal of Applied Polymer Science*, v., 107, p. 2588–2593, 2008.

O'BRIEN, M. E.; WIGLER, N.; INBAR, M.; ROSSO, R.; GRISCHKE, E.; SANTORO, A.; CATANE, R.; KIEBACK D. G.; TOMCZAK, P.; ACKLAND, S. P.; ORLANDI, F.; MELLARS, L.; ALLAND, L.; TENDLER, C.; CAELYX. *Breast Cancer Study Group*.

Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, v. 15, número 3, p. 440-449, 2004.

OERLEMANS, C.; BULT, W.; BOS, M.; STORM, G.; NIJSEN, J. F.; HENNINK W. E. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharmaceutical Research*, volume 27, numero 12, p. 2569-89, 2010.

OLIVEIRA C. *et al.* Bromelain-Functionalized Multiple-Wall Lipid-Core Nanocapsules: Formulation, Chemical Structure and Antiproliferative Effect Against Human Breast Cancer Cells (MCF-7). *Pharmaceutical Research*, v. 34(2) p. 438-452, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) (Org.). Câncer, Media centre, Factsheet N°297, Updated February 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 10 abril 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) (Org.). GLOBOCAN. 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em: 01 abr. 2016.

PEARSON, R. Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of the American Society*, v. 85 (22), p. 3533–3539, 1963.

POHLMANN, A. R.; CRUZ, L.; MEZZALIRA, G.; SOARES, L. U.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Structural model of polymeric nanospheres containing indomethacin ethyl ester and in vivo antiedematogenic activity. *International Journal of Nanotechnology*, v. 4, p. 454-467, 2007.

POHLMANN, A.; FONSECA, F.; PAESE, K.; DETONI, C.; CORADINI, K.; BECK, R.; GUTERRES, S. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery, *Expert Opinion*, v. 10 No. 5, p. 623-638, 2013.

POLETTI, F. S.; DE OLIVEIRA, C. P.; WENDER, H.; REGENT, D.; DONIDA, B.; TEIXEIRA, S. R.; GUTERRES, S. S.; ROSSI-BERGMANN, G.; POHLMANN, A. R. How Sorbitan Monostearate Can Increase Drug-Loading Capacity of Lipid-Core Polymeric Nanocapsules. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 15, p. 827–837, 2015.

POOLE, S. The foam enhancing properties of basic polymers, *International Journal of Food Science and Technology*, v. 24, p. 121-137, 1989.

PUBCHEM, Tamoxifen. Disponível em:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2733526#section=Top>. Acesso em: 04 outubro 2017.

PUBCHEM, Zinc Ion. Disponível em:

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/zinc_ion#section=Top. Acesso em: 4 dezembro 2017.

PUBCHEM, Gadolinium. Disponível em:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gadolinium>. Acesso em: 4 dezembro 2017.

RIBEIRO, M.; DE MOURA, C.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes, *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 51, No. 3, p. 227-234, 2005.

RIEPPÖ, L.; SAARAKKALA, S.; NÄRHI, T.; HELMINEN, H.; JURVELIN, J.; RIEPPÖ, J. Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 20, p. 451-459, 2012.

REYNOLDS, C. H.; ANNAN, N.; BESHAK, K.; HUBER, J. H.; SHABER, S. H.; LENKINSKI, R. E., WORTMAN, J. A. Gadolinium-Loaded Nanoparticles: New Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Journal of the American Chemical Society*, v. 122, p. 8940-8945, 2000.

RUBIN, P.; CASARETT, G. Microcirculation of tumors: I. Anatomy, function, and necrosis. *Clinical Radiology*, v. 17, p. 220–229, 1966.

SASLOW, D.; BOETES, C.; BURKE, W.; HARMS, S.; LEACH, M. O.; . LEHMAN, C. D.; MORRIS, E.; PISANO, E.; SCHNALL, M.; SENER, S.; SMITH, R. A.; WARNER, E.; YAFFE, M.; ANDREWS, K. S.; RUSSELL, C. A. (for the American Cancer Society Breast Cancer Advisory Group). American Cancer Society Guidelines for Breast Screening with MRI as an Adjunct to Mammography, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 57, p. 75–89, 2007.

SAEIDI, Z., ASHJARAN, A.; DABIRSIYAGHI, A. Study of anti-cancer drug release (tamoxifen) of the nanofibers made of polycaprolactone-chitosan, *International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR)*, v. 7, p. 897-906, 2016.

SCHAFFAZICK, S.; GUTERRES, S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos, *Química Nova*, v. 26, No. 5, p. 726-737, 2003.

SEYMOUR, L. W. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 9, p. 135–187, 1998.

SILVERMAN, J. A.; DEITCHER, S. R. Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 71, número 3, p. 555-64, 2013.

SHAH, M.; KRIEDT, C.; LENTS, N.; HOYER, M.; JAMALUDDIN, N.; KLEIN, C.; BALDASSARE, J. Direct intra-tumoral injection of zinc-acetate halts tumor growth in a xenograft model of prostate cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 28, p. 84-94, 2009

SHUBIK, P. Vascularization of tumors: A review. *J. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 103, p. 211–226, 1982.

SHUSHAN, A.; PERETZ, T.; UZIELY.; LEWIN, A.; MOR-YOSEF, S. Ovarian cysts in premenopausal and postmenopausal tamoxifen-treated women with breast cancer. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 174 (1 Pt 1) p. 141–144, 1996.

SIEGEL, R.; MILLER, K; JEMA, A. *Cancer Statistics, 2017*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 67, p. 277–300, 2010.

SINGH, R.; KUMAR, R. Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis, *Journal of Cellular Biochemistry*; v. 96, p. 490-505, 2005.

SILVERSTEIN, R. *Spectrometric identification of organic compounds*. Edição 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.490 p.

SLAMON, D.; CLARK, G.; WONG, S.; LEVIN, W.; ULLRICH, A.; MCGUIRE, W. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, v. 235, p. 177–182, 1987

SUDIMACK, J.; LEE, R. J. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 41, p. 147–162, 2000.

SUMER, B.; GAO, J. Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine*, v. 3, p. 137–140, 2008.

TAGNE, J.; KAKUMANU, S.; ORTIZ, D.; SHEA, T.; NICOLOSI, R. A Nanoemulsion Formulation of Tamoxifen Increases Its Efficacy in a Breast Cancer Cell Line, *Molecular Pharmaceutics*, v. 5, p. 280–286, 2007.

THAKUR, C.; THOTAKURA, N., KUMAR, R.; KUMAR P.; SINGH, B.; CHITKARA, D.; RAZA, K. Chitosan-modified PLGA polymeric nanocarriers with better delivery potential for tamoxifen, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 93, p. 381–389, 2016.

TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 63, p. 131–135, 2011.

TSRLINC, Tamoxifen, Disponível em: <http://www.tsrlinc.net/results.cfm>. Acesso em: 04 outubro 2017.

TURNBULL, W. Dynamic contrast-enhanced MRI in the diagnosis and management of breast cancer. *NMR in Biomedicine*, V. 22, p. 28–39, 2009.

TYNER, K.; ZOU, P.; YANG, X.; ZHANG, H.; CRUZ, C.; LEE, S. Product quality for nanomaterials: current U.S. experience and perspective, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 7, p. 640–654, 2015.

UNEZAKI, S.; MARUYAMA, K.; HOSODA, J.-I.; NAGAE, I.; KOYANAGI, Y.; NAKATA, M.; ISHIDA, O.; IWATSURU, M.; TSUCHIYA, S. Direct measurement of the extravasation of polyethyleneglycol-coated liposomes into solid tumor tissue by in vivo fluorescence microscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 144, p. 11–17, 1996.

YANG, D.; YANG, G.; GAI, S.; HE, F.; AN, G.; DAI, Y.; LV, R.; YANG, P. Au₂₅ cluster functionalized metal–organic nanostructures for magnetically targeted photodynamic/photothermal therapy triggered by single wavelength 808 nm near-infrared light, *Nanoscale*, v. 7, p. 19568–19578, 2015.

YUAN, F.; DELLIAN, M.; FUKUMURA, D.; LEUNING, M.; BERK, D. D.; YORCHILIN, V. P.; JAIN, R. K. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Research*, v. 55, p. 3752–3756, 1995.

YUAN, F. Transvascular drug delivery in solid tumors. *Seminars in Radiation Oncology*, v. 8, p. 164–175, 1998.

VALLEE, B.; AULD, D. Short and long spacer sequences and other structural features of zinc binding sites in zinc enzymes. *FEBS Letters*, v. 257, p. 138–140, 1989.

VALLEE, B.; AULD, D. Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*, v. 29, p. 5647–5659, 1990.

WANGA, M.; THANOU, M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*, v. 62, número 2, p. 90–99, 2010.

WARNER, S. Diagnostics plus therapy = theranostics. *Scientist*, volume 18, p. 38–39, 2004.

WEISS-ANGELI, V.; BOURGEOIS, S.; PELLETIER, J.; GUTERRES, S.; FESSI, H.; BOLZINGER, M. Development of an original method to study drug release from polymeric nanocapsules in the skin, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 62, p. 35-45, 2010.

WU, A.; BOUGH, W.; CONRAD, E.; ALDEN, K. Determination of molecular-weight distribution of chitosan by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 128, p. 87-99, 1976.

ZHOU e LU. Gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance cancer imaging. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 5, p. 1-18, 2013

ZOPF, D.; JATSCHKA, J.; DATHE, A.; JAHR, N.; FRITZSCHE, W.; STRANIK, O. Hyperspectral imaging of plasmon resonances in metallic nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 81, p. 287-293, 2016.