



**Universidade de Brasília**  
**Faculdade de Ceilândia**  
**Curso de Graduação em Farmácia**

João Bosco Ferreira da Conceição

**Produção, caracterização e avaliação citotóxica de nanopartículas de ácido poli-láctico contendo tamoxifeno.**

Brasília, 2016



**Universidade de Brasília**  
Faculdade de Ceilândia  
Curso de Graduação em Farmácia

João Bosco Ferreira da Conceição

**Produção, caracterização e avaliação citotóxica de nanopartículas de ácido poli-láctico contendo tamoxifeno.**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia pela Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

**Orientador: Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes**  
**Coorientadora: Profa. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes**

Brasília, 2016

dc744p da Conceição, Joao Bosco Ferreira  
Produção, caracterização e avaliação citotóxica de  
nanopartículas de ácido poli-láctico contendo  
tamoxifeno / Joao Bosco Ferreira da Conceição;  
orientador Anderson de Jesus Gomes; co-orientador  
Claire Nain Lunardi Gomes. -- Brasília, 2016.  
35 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade  
de Brasília, 2016.

1. Nanociência e nanotecnologia aplicada a saúde.  
2. Cancer de mama. 3. Tecnologia farmacêutica. 4.  
Sistema de liberação de fármacos. I. Gomes, Anderson  
de Jesus, orient. II. Gomes, Claire Nain Lunardi, co  
orient. III. Título.

João Bosco Ferreira da Conceição

**Produção, caracterização e avaliação citotóxica de nanopartículas de ácido poli-láctico contendo tamoxifeno.**

---

Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes (Orientador)  
(FCE/Universidade de Brasília)

---

Profa. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes (Coorientadora)  
(FCE/Universidade de Brasília)

Brasília, 2016

João Bosco Ferreira da Conceição

**Produção, caracterização e avaliação citotóxica de nanopartículas de ácido poli-láctico contendo tamoxifeno**

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes (Orientador)  
(FCE/Universidade de Brasília)

---

Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento  
(FCE/Universidade de Brasília)

---

Prof. Dr. Elton Clementino da Silva  
(FCE/Universidade de Brasília)

Brasília, 2016

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado força para enfrentar todas as dificuldades, e que me faz acreditar que tudo é possível.

À minha querida mãezinha, Beth, que com seu amor incondicional, dedicação e apoio sempre me incentivou a ir em busca dos meus anseios, ser persistente e lutar pelas oportunidades.

Aos meus irmãos, Adriana, Rany, Joana e Izaías pelo companheirismo e apoio nos momentos de dificuldade, evidenciando o quanto a união e amor fraterno são armas poderosas para superar as dificuldades impostas pela vida.

À Hellen, que é o meu amor verdadeiro, minha parceira e companheira de todas horas, pela compreensão, apoio e carinho durante todos esses anos.

Ao meu orientador, Anderson de Jesus Gomes, que me acolheu desde a iniciação científica e que, junto com a minha coorientadora, Claire Nain Lunardi Gomes, são exemplos de dedicação e sucesso acadêmico.

Aos membros do grupo de pesquisa Fotoquímica e Saúde pela amizade e por todo conhecimento compartilhado a cada reunião ou nas atividades de laboratório.

À Universidade de Brasília e o seu corpo docente que me proporcionaram acesso com qualidade a um elevado nível conhecimento, possibilitando o meu desenvolvimento pessoal e em aspectos profissionais, sociais e científicos.

Finalmente, o meu muito obrigado a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para conclusão de mais esta importante etapa da minha vida.

## LISTA DE ABREVIATURAS

3T3: Células "3-day Transfer, inoculum  $3 \times 10^5$  cells"  
95% CI: Intervalo de confiança de 95%  
ANOVA: Análise de Variância  
DCM: Diclorometano  
DLS: Espalhamento dinâmico de luz  
D-MEM: "Dullbeco's Modified Eagle Medium"  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
EC<sub>50</sub>: Concentração efetiva mínima  
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético  
FBS: Soro fetal bovino  
FTIR: Infravermelho por transformada de Fourier  
IC<sub>50</sub>: Concentração inibitória mínima  
MCF-7: Células "Michigan Cancer Foundantion-7"  
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura  
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difeniltetrazólio  
NIH: National Institute of Health  
NP: Nanopartículas  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
PBS: Tampão fosfato salino  
PEG: Polietilenoglicol  
pH: Potencial hidrogeniônico  
PLA: Ácido poli-láctico  
PLGA: Ácido poli(láctico-co-glicólico)  
PVA: Álcool polivinílico  
RPM: Rotações por minuto  
SLF: Sistema de liberação de fármacos  
Tmx: Tamoxifeno  
UV-vis: Ultravioleta visível

## RESUMO

Nanopartículas (NP) poliméricas tem sido extensivamente estudadas como um potencial sistema de liberação de fármacos (SLF) para aplicação no tratamento de graves doenças, tal como o câncer. Estes sistemas têm demonstrado boa capacidade em superar problemas relacionados a eficácia e segurança de fármacos disponíveis para uso clínico. Neste estudo, foi desenvolvido nanopartículas de ácido poli-láctico (PLA) contendo tamoxifeno (Tmx) a fim de avaliar e otimizar características físicas, químicas e morfológicas, bem como descrever o perfil de liberação do fármaco e atividade citotóxica *in vitro* sobre células de linhagem de câncer de mama. As NPs PLA-Tmx preparadas pelo método da emulsificação e evaporação do solvente apresentaram diâmetro médio de 220 nm e potencial zeta de +20 mV, além de eficiência de encapsulamento superior a 80%. Análises espectroscópicas demonstraram que o processo de preparo não altera a estrutura do fármaco e que grupos funcionais importantes relacionados ao polímero e ao fármaco são observados no espectro de infravermelho das NPs. A liberação do Tmx se deu de maneira sustentada, liberando aproximadamente 25% do Tmx em dez dias, com uma cinética de liberação segundo o modelo de Korsmeyer-Peppas. O ensaio citotóxico demonstrou que as NPs PLA-Tmx possuem maior capacidade em inibir o crescimento de células MCF-7 que a formulação de Tmx livre e são menos tóxicas a células não cancerígenas, NIH-3T3. As NPs PLA-Tmx apresentaram boa atividade citotóxica sobre o modelo de células cancerígenas e características satisfatórias, sugerindo que as mesmas são um potencial SLF para aplicação como alternativa ao tratamento do câncer de mama.

**Palavras-chave:** Sistemas de liberação, nanopartículas poliméricas, PLA, tamoxifeno, viabilidade celular.



## ABSTRACT

Polymeric nanoparticles (NP) have been widely studied as a potential drug delivery system (DDS) applied to treatment of aggressive diseases, such as cancer. These systems have demonstrated great ability to overcome efficacy and safety-related issues of therapeutic drugs currently available for clinical utilization. In this study, we developed tamoxifen (Tmx) loaded poly-lactic acid (PLA) nanoparticles (PLA-Tmx) to investigate and optimize their physical, chemical and morphological characteristics and describe the *in vitro* drug release profile and cytotoxic effect on breast cancer cells. The PLA-Tmx NP prepared through the emulsification and solvent evaporation method showed average diameter of 220 nm and zeta potential of +20 mV, and Tmx entrapment efficiency greater than 80%. Spectroscopic studies demonstrated that the main chemical characteristic of the drug was maintained after particle preparation process and PLA-Tmx NP FTIR spectra showed peaks related to important functional groups of both polymer and drug. The release profile of Tmx was sustained and prolonged with release of approximately 25% of the drug during ten days, which fitted best to the Korsmeyer-Peppas kinetic model. Cytotoxic assays demonstrated higher ability of the PLA-Tmx formulation to promote growth inhibition of MCF-7 cells than the free Tmx and lower toxicity over non-cancerous cells, NIH-3T3. The PLA nanoparticle containing Tmx displayed good cytotoxic activity on cancer cell model and suitable characteristics. This study demonstrated that this system could work as prospective drug delivery system applied as an alternative in breast cancer treatment.

**Key words:** Drug delivery systems, polymeric nanoparticles, PLA, tamoxifen, cell viability.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efeitos de diferentes parâmetros como velocidade de homogeneização (A), concentração de surfactante (B), volume de solvente (C) e proporção polímero-fármaco (D) no diâmetro e eficiência de encapsulamento de nanopartículas de PLA-Tmx.....21
- Figura 2.** Variações no diâmetro (A) e potencial zeta (B) das nanopartículas de PLA-Tmx em função do tempo e condições de armazenamento (temperatura). .....22
- Figura 3.** Imagens obtidas por MEV das nanopartículas de PLA.....22
- Figura 4.** Perfil de liberação in vitro apresentado pelas nanopartículas de PLA-Tmx a 37 °C (pH ~7,1). Em vermelho, linha de tendência do modelo matemático que melhor se adequou aos dados da liberação (Korsmeyer-Peppas,  $R^2$  0,983). .....23
- Figura 5.** (A) Espectro de absorvância no UV-vis para o Tmx extraído das nanopartículas de PLA. (B) Espectro de FTIR das nanopartículas de PLA carregadas com Tmx e do Tmx puro. ....24
- Figura 6.** Comparação da viabilidade celular de células MCF-7 (A) e NIH 3T3 (B) após tratamento com formulações de Tmx encapsulado em nanopartículas de PLA (NP PLA-Tmx) e Tmx livre. Análise comparativa das médias do efeito inibitório de cada formulação foi realizado a partir do test-t não pareado e test-F para comparação das duas variâncias. ....25
- Figura 7.** Gráfico de regressão não-linear global do efeito das formulações de Tmx Livre e Tmx encapsulando em nanopartículas de PLA sobre células MCF-7 aplicado para determinação do IC<sub>50</sub> das formulações (Concentrações de Tmx: 2,5, 5,0, 10, 15 e 20 µg/mL). ....26

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valor de $R^2$ determinado para cada modelo matemático de cinética de liberação.....	23
---	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Gerais.....	16
3.2 Específicos.....	16
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	17
4.1 Materiais.....	17
4.2 Produção das nanopartículas de PLA contendo Tmx.....	17
4.3 Otimização do método de preparo das nanopartículas de PLA.....	17
4.4 Caracterização da nanopartículas de PLA.....	17
4.4.1 Diâmetro médio e potencial zeta.....	17
4.4.2 Ensaio de estabilidade para definição de condições de armazenamento.....	18
4.4.3 Análise morfológica.....	18
4.4.4 Eficiência de encapsulamento.....	18
4.4.5 Perfil e cinética de liberação do Tmx.....	19
4.4.6 Análises espectroscópicas.....	19
4.5 Avaliação citotóxica.....	19
4.6 Dados e estatísticas.....	20
5. RESULTADOS.....	20
5.1 Otimização do diâmetro e eficiência de encapsulamento.....	20
5.2 Potencial Zeta e perfil de estabilidade.....	21
5.3 Morfologia.....	22
5.4 Perfil de liberação <i>in vitro</i> e cinética de liberação do Tmx.....	23
5.5 Análises de interação PLA-Tmx.....	24
5.6 Citotoxicidade <i>in vitro</i> em células de linhagem cancerígena MCF-7.....	25
6. DISCUSSÃO.....	26
7. CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

## 1. INTRODUÇÃO

Desenvolvimento de sistemas de liberação capazes de aumentar propriedades terapêuticas de fármacos tem sido visto como um prospectivo avanço para as ciências médicas nos últimos anos<sup>1,2</sup>. Nano e micropartículas poliméricas são extensivamente estudadas como veículos para transporte de drogas terapêuticas, conferindo aumento de biodisponibilidade dos fármacos a elas associados e potencial redução de efeitos adversos relacionados à terapia<sup>3</sup>. Tais vantagens são garantidas mediante a capacidade desses sistemas em liberar o fármaco de maneira controlada e/ou sustentada e ainda com entrega do fármaco preferencialmente na região afetada pela doença, evitando que outras áreas saudáveis do corpo entrem em contato com fármaco, o que muitas vezes é a causa raiz de eventos adversos relacionados a medicamentos<sup>4,5,6,7</sup>.

O método de produção utilizado para obtenção de sistemas de liberação de fármacos (SLF) baseados em nanopartículas é fundamental na garantia de características que façam das nanopartículas um dispositivo terapêutico de elevada eficiência. Vários métodos de preparo estão descritos na literatura, e a definição do método mais apropriado deve considerar as propriedades físicas e químicas peculiares de cada um dos materiais utilizados na fabricação do sistema<sup>8,9</sup>. Cada método de preparo disponível possui variáveis que podem ser exploradas a fim de otimizar o processo de obtenção de partículas, aprimorando as principais características a serem avaliadas em relação as propriedades das mesmas<sup>10,11</sup>.

Após a definição do método mais adequado para produção das nanopartículas, o passo seguinte é conduzir a devida caracterização do sistema, de modo a determinar suas propriedades físicas, químicas, morfológicas e espectroscópicas como forma de garantir a qualidade da produção e assegurar que as nanopartículas possuam as propriedades físicas, químicas e morfológicas mínimas para que sejam utilizadas como SLF<sup>12,13,14,15</sup>. Frequentemente, a literatura serve como uma fonte para obtenção de dados que são utilizados como parâmetros de qualidade para avaliação destes sistemas após a produção.

Outro importante aspecto a ser avaliado durante a etapa de caracterização de um SLF é o perfil de liberação do fármaco associado à nanoestrutura. Esta caracterização fornece valiosas informações que podem ser utilizadas para elucidação da cinética envolvida durante o processo de liberação do fármaco, bem

como aspectos para distinção da liberação como controlada e/ou sustentada<sup>14,16,17</sup>. Associado a esse parâmetro está a avaliação do potencial citotóxico do sistema, determinação que é realizada a partir de estudos de viabilidade celular<sup>18</sup>. Para tanto, são utilizadas linhagens celulares como modelos teciduais da doença alvo que se almeja tratar com esses sistemas. A partir destes estudos, podem ser determinadas a concentração inibitória mínima (IC<sub>50</sub>) ou a concentração efetiva mínima (EC<sub>50</sub>) para efeito em 50% da população estudada, e assim comparar quantitativamente os efeitos das formulações de fármaco encapsulado e não encapsulado nos modelos teciduais estudados<sup>19,20</sup>.

O uso de materiais biodegradáveis para composição da matriz polimérica base das nanopartículas confere vantagens quanto a segurança desses sistemas, uma vez que seus produtos de degradação são naturalmente metabolizados pelo organismo. Dentre os materiais de escolha utilizado para preparação de nanopartículas poliméricas biodegradáveis utilizadas como sistema de liberação de fármacos estão o ácido poli-láctico (PLA) , ácido poli-[láctico-co-glicólico] (PLGA), poli-εCaprolactona (PCL), entre outros<sup>21,22,23,24,25</sup>. A escolha destes polímeros se dá pela boa compatibilidade com tecidos orgânicos e pelo baixo risco de efeitos tóxico associados a degradação destes materiais no organismo, que seguem rotas naturais de metabolização.

É ampla a aplicação de nanopartículas poliméricas desenvolvidas como SLF para o combate ao câncer, com as mais variadas combinações de polímeros e fármacos<sup>26</sup>. O tamoxifeno, fármaco modulador seletivo do receptor de estrogênio, é utilizado para tratamento de câncer de mama avançado ou em metástase, sendo, a mais de vinte anos, a escolha clínica para tratamento desta condição<sup>27</sup>. No Brasil, o tamoxifeno é utilizado em esquema de terapia paliativa e adjuvante de estágios avançados de câncer de mama. No entanto, eventos adversos graves têm sido associados à terapia com tamoxifeno, como por exemplo acidente vascular encefálico, embolia pulmonar e aumento no risco de desenvolvimento de câncer de endométrio. Muitos desses eventos adversos estão correlacionados a baixa biodisponibilidade oral do tamoxifeno, o que exige administração de repetidas doses, elevando os riscos de toxicidade<sup>28,29</sup>.

## 2. JUSTIFICATIVA

A elevada mortalidade causada por doenças com altas taxas de incidência e prevalência, tal como o câncer, vem exigindo uma necessidade cada vez maior de inovações terapêuticas voltadas ao controle e tratamento dessas enfermidades<sup>30</sup>. Câncer é um dos maiores problemas de saúde em todo mundo, sendo um agravo que atinge tanto os países em desenvolvimento como países desenvolvidos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer já é uma das principais causas de mortes no mundo, responsável por mais de 8 milhões de óbitos em 2012<sup>31</sup>. Dentre os tipos de câncer que mais são diagnosticados no mundo está o câncer de mama, sendo este também o tipo mais comum entre os indivíduos do sexo feminino<sup>30,32</sup>. As estratégias terapêuticas atualmente disponíveis para tratamento do câncer de mama estão associadas a graves efeitos adversos, muitas vezes relacionados a alta frequência na administração de doses, que se torna necessária para controle do crescimento do tecido tumoral, além da distribuição da droga em todo organismo atingindo inclusive áreas saudáveis que respondem negativamente a presença do fármaco no organismo<sup>7,33</sup>.

Atualmente, sistemas de liberação baseados em nanopartículas contendo fármacos quimioterápicos têm sido amplamente estudados como dispositivos terapêuticos alternativos dotados de elevada eficácia no combate a estes tipos de agravos de saúde. O objetivo de tais dispositivos é conduzir as moléculas do fármaco ao tecido doente, evitando outras regiões saudáveis do corpo e, assim, diminuir a ocorrência de potenciais efeitos indesejáveis<sup>34</sup>. Estes dispositivos podem ainda ser desenvolvidos de forma a proporcionar uma liberação sustentada do fármaco, aumentando significativamente a potência do agente terapêutico e reduzindo o número de doses necessárias para manter as concentrações plasmáticas necessárias para efeito terapêutico adequado<sup>29,35</sup>.

Considerando a importância clínica do câncer e o cenário atual de estratégias terapêuticas disponíveis para tratamento desta enfermidade, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos que sejam capazes de reduzir efeitos colaterais e proporcionar aumento na eficácia de agentes terapêuticos utilizados na prática clínica, com potencial de redução dos efeitos adversos, proporcionaria meios para melhor controle e combate ao câncer, aumentando a qualidade de vida de pacientes sob tratamento oncológico.

### **3. OBJETIVOS**

#### *3.1 Gerais*

O objetivo geral deste estudo é desenvolver um sistema de liberação de fármaco baseado em nanopartículas poliméricas de PLA, associando a este sistema o fármaco anticancerígeno tamoxifeno (Tmx), para aplicação como alternativa terapêutica no tratamento do câncer de mama.

#### *3.2 Específicos*

- Aprimorar um método de produção de nanopartículas poliméricas baseadas em PLA;
- Caracterizar o sistema de liberação quanto a aspectos físicos, químicos e morfológicos;
- Determinar o perfil de liberação do fármaco associado às nanopartículas, bem como o modelo cinético de liberação adotado pelo sistema
- Determinar o perfil de citotoxicidade do sistema em células de linhagem cancerígena e não cancerígena;



## 4. MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 *Materiais*

Ácido poli-láctico (MM ~60.000), Álcool polivinílico PVA (13-23 kDa, 87-89% hidrolizado), azul de tripan, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difeniltetrazólio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), tamoxifeno (lote 030M1727), tampão fosfato (PBS) e tripsina-EDTA obtidos da Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, EUA). Diclorometano obtido da Dinâmica® (Diadema, SP, Brasil) e Merck® (Frankfurt, Alemanha), meio Dullbeco's Modified Eagle Medium (D-MEM) e soro fetal bovino (FBS) com mistura de antibióticos obtidos da Gibco® (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY, EUA), células MCF-7 (ATCC® HTB-22™), Células NIH 3T3 (ATCC® CRL-1658™)

### 4.2 *Produção das nanopartículas de PLA contendo Tmx*

As nanopartículas de PLA, tanto carregadas com Tmx como vazias, foram produzidas por meio do método da emulsificação e evaporação do solvente. Brevemente, uma solução de PLA em diclorometano, ou PLA e Tmx no caso de preparação de partículas carregadas com fármaco, foi adicionada a uma fase aquosa contendo PVA a 2% sob agitação vigorosa a 14000 rpm em banho de gelo. Em seguida, o diclorometano foi eliminado por evaporação a temperatura ambiente com agitação magnética. O volume restante foi centrifugado e em seguida as partículas obtidas foram lavadas com água destilada, por três vezes. Após lavagem, as partículas foram resuspensas em tampão Hank's e estocadas sob refrigeração.

### 4.3 *Otimização do método de preparo das nanopartículas de PLA*

As variáveis velocidade de homogeneização, concentração de PVA, volume de solvente e proporção polímero fármaco foram analisadas e controladas a fim de aperfeiçoar o método de preparo das nanopartículas de PLA. Em seguida foram determinadas condições ideais de produção de partículas com boas características para sistema de liberação de fármacos.

### 4.4 *Caracterização da nanopartículas de PLA*

#### 4.4.1 *Diâmetro médio e potencial zeta*

O diâmetro hidrodinâmico médio e a distribuição de tamanho das nanopartículas foram determinados por meio de espalhamento dinâmico de luz (DLS)

utilizando o instrumento Malvern Zeta-Sizer Nanoseries ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Para tanto, 20  $\mu\text{L}$  da suspensão de nanopartículas foram resuspensas em 1,5 mL de água ultrapura em uma cubeta de análise. A determinação do diâmetro foi realizada a 25 °C em ângulos de espalhamento de 90° e 180°. Uma alíquota de 1 mL da suspensão utilizada na determinação do diâmetro foi transferida a uma cubeta eletroforética para determinação do potencial zeta, utilizando o ZetaPlus™ no modo de análise de potencial zeta.

#### *4.4.2 Ensaio de estabilidade para definição de condições de armazenamento*

A estabilidade das nanopartículas de PLA carregadas com Tmx, em meio aquoso pH 7,1  $\pm$  2, foi acompanhada por três meses em duas diferentes condições de armazenamento, 25  $\pm$  2 °C e 4  $\pm$  2 °C. Alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 1, 2 e 3 meses e foram analisadas variações no diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta.

#### *4.4.3 Análise morfológica*

Uma alíquota de 1 mL das nanopartículas foi coletada após o procedimento de preparo para performance da análise morfológica, a qual foi realizada com auxílio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Uma nova alíquota de 30  $\mu\text{L}$  desta amostra foi depositado sobre uma lamínula, a qual foi mantida em dessecador sob pressão reduzida e temperatura ambiente por 24h. Após desidratação, a lamínula foi instalada em suporte de alumínio (stub) e em seguida as amostras foram metalizadas com revestimento de uma fina camada de ouro (50 nm) em atmosfera de argônio. As amostras foram analisadas e fotografadas nos aumentos entre 500 e 2000 vezes em microscópio eletrônico de varredura FEI™ Quanta 250 (Hillsboro, OR, EUA), operando a 10 kV no modo de detecção tradicional (SE1 Detector).

#### *4.4.4 Eficiência de encapsulamento*

A taxa de associação de fármaco à matriz polimérica da nanopartícula (eficiência de encapsulamento) foi determinada por meio de espectrofotometria na região do UV-vis (U-3900H, Hitachi, Japão). As nanopartículas de PLA contendo Tmx (5 mg) foram solubilizadas em 1 mL de diclorometano, vortexadas por 30 minutos e centrifugadas a 14000rpm durante 10 minutos para extração do fármaco associado à nanopartícula. Uma alíquota do sobrenadante foi então submetida a espectrofotometria no UV-vis e o Tmx extraído analisado no comprimento de onda de 281 nm e quantificado de acordo com curva de calibração previamente validada. A eficiência de encapsulamento foi definida como a razão, em percentagem, da

quantidade de Tmx associado a nanopartícula pela quantidade inicial de Tmx utilizada para produção das partículas.

#### *4.4.5 Perfil e cinética de liberação do Tmx*

Para determinação do perfil de liberação, alíquotas de 100 µL de nanopartículas suspensas em PBS (pH = 7,1) foram mantidas em banho com temperatura controlada a 37 °C ± 2 °C. A quantidade de Tmx liberado da formulação foi analisado em período de incubação pré definidos (0h, 6h, 12h, 24h, 48h, 3d, 4d, 5d ... 10d) com auxílio de espectrofotometria na região do UV-vis e curva de calibração previamente validada, para quantificação do Tmx liberado no período. A cinética de liberação do Tmx das nanopartículas de PLA foi elucidada por meio de modelos matemáticos como ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas.

#### *4.4.6 Análises espectroscópicas*

Interações entre o polímero e o fármaco foram estudadas a partir de espectrofotometria no UV-vis e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Amostras de Tmx puro e Tmx extraído das nanopartículas (extração realizada conforme descrito no item 4.4.4) foram analisadas por espectrofotometria na região do UV-vis. Amostras de Tmx puro e de nanopartículas de PLA contendo Tmx foram analisadas em um espectrômetro de infravermelho FT (IRPrestige-21, Shimadzu, Japão). Os espectros (UV-vis e FTIR) foram comparados entre si a fim de obter dados de possíveis alterações estruturais e interações após o processo de produção das nanopartículas.

#### *4.5 Avaliação citotóxica*

Células MCF-7, de linhagem tumoral (mama), foram mantidas em cultura em meio D-MEM, acrescido de 10% de FBS e 1% de antibiótico em estufa umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Foram também utilizadas células não-tumorais, NIH 3T3, originadas de fibroblastos imortalizados. Uma quantidade de 4x10<sup>3</sup> células por cm<sup>2</sup> foi semeada em placa de poliestireno de 96 poços e mantidas em condição de cultura celular. As células foram tratadas com formulações de Tmx livre (em PBS) e Tmx associado às nanopartículas de PLA nas concentrações de 2,5, 5, 10, 15 e 20 µg/mL. A análise da viabilidade celular após o tratamento foi realizada pelo método colorimétrico de MTT, o qual é baseado na redução do reagente MTT em cristais de formazan. Os cristais de formazan foram quantificados por espectrofotometria, no comprimento de onda de 595 nm, após solubilização com DMSO. O ensaio de MTT

foi realizado após 24h e 48h de incubação. A determinação do  $IC_{50} \pm$  Erro Padrão para as formulações foi realizada por meio de regressão não-linear global baseada nos dados da curva de dose resposta obtida no ensaio de citotoxicidade.

#### 4.6 *Dados e estatísticas*

Os resultados apresentados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Quando aplicável, os dados foram analisados por regressão multivariada e teste t-student para comparações múltiplas, além análise de variância (ANOVA). Valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio dos softwares GraphPad Prism® 5.03 e Microsoft® Excel 2013.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 *Otimização do diâmetro e eficiência de encapsulamento*

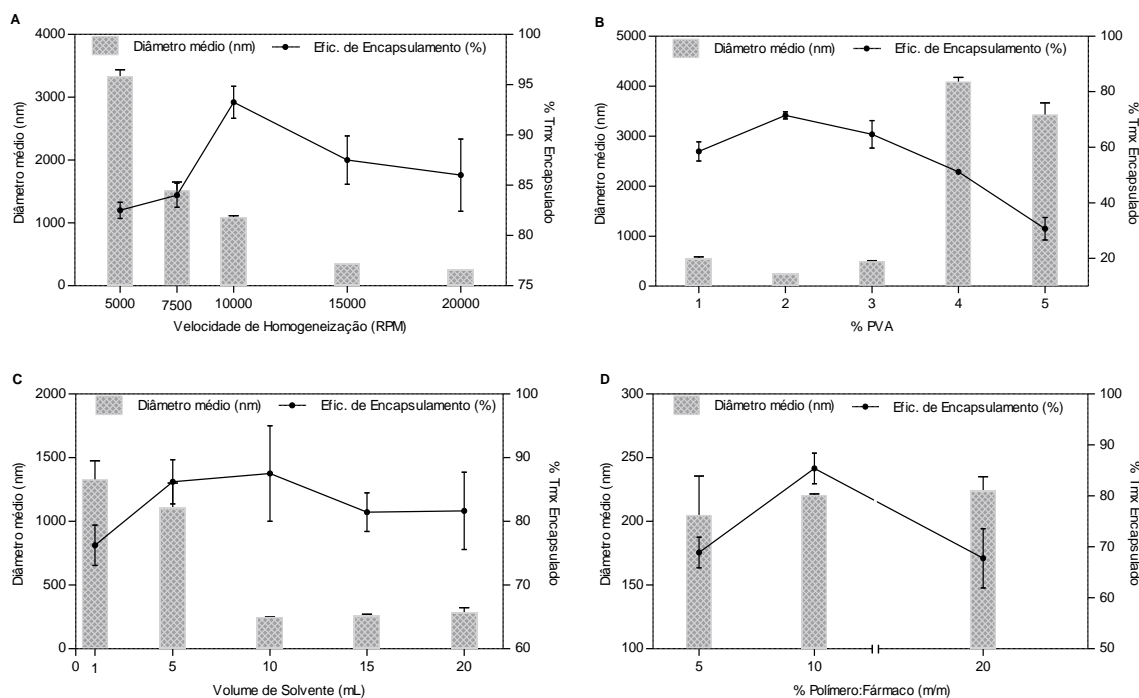
As análises quantitativas do Tmx foram realizadas utilizando a seguinte equação da reta:  $Abs\ UV-vis = 0,0459[Tmx] - 0,0925$  ( $R^2:0,99$ ), obtida da curva de calibração validada para este estudo em espectrofotometria no UV-vis. Aspectos como velocidade de homogeneização, concentração de surfactante (PVA), volume de solvente e a razão entre polímero e fármaco foram controladas a fim de otimizar as características de diâmetro médio, potencial zeta e eficiência de encapsulamento das nanopartículas de PLA contendo Tmx.

A velocidade de homogeneização aplicada durante a formação da emulsão no preparo das nanopartículas foi variada entre 5000 e 20000 rpm, enquanto os demais parâmetros foram mantidos a uma constante. Os resultados obtidos demonstram que quanto mais alta a velocidade de homogeneização aplicada, menor é o diâmetro das nanopartículas. Uma velocidade de homogeneização de 20000 rpm é ideal para obtenção de nanopartículas com diâmetro médio de  $246 \pm 1,5$  nm e eficiência de encapsulamento de 86% (Figura 1A).

Variação na concentração de PVA também foi avaliada com o objetivo de otimizar o processo de produção das nanopartículas. Foi utilizado PVA nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5% (m/v), e as melhores características de diâmetro e eficiência de encapsulamento foram obtidas com PVA a 2%, que resultou na obtenção de nanopartículas PLA-Tmx com diâmetro médio de  $238,6 \pm 8,7$  nm e eficiência de encapsulamento 71,4% (Figura 1B).

O impacto do volume de solvente, utilizado na preparação da fase orgânica da emulsão, no diâmetro e eficiência de encapsulamento das nanopartículas PLA-Tmx também foi estudado. Uma vez que essa variação influencia a viscosidade da solução aquosa, existe um potencial efeito nas características das nanopartículas obtidas. De acordo com o apresentado na Figura 1C, o volume ótimo para solubilização da quantidade de polímero e fármaco utilizado neste estudo é 10 mL, gerando uma solução de 0,1% de polímero. O diâmetro médio das nanopartículas de PLA-Tmx obtido com a solução orgânica preparada nestas condições foi de  $245,5 \pm 3,0$  nm e eficiência de encapsulamento igual 80,5%.

Três proporções diferentes entre o polímero e o fármaco (5, 10 e 20%) foram analisadas a fim de observar o impacto na eficiência de encapsulamento do método de preparo. A proporção de 10% polímero-fármaco (m/m) foi considerada ótima neste estudo, pois proporcionou a obtenção de nanopartículas de PLA-Tmx com eficiência de encapsulamento de  $85,4 \pm 3,0\%$  (Figura 1D). A variável proporção polímero-fármaco não afetou o diâmetro das nanopartículas ( $p > 0,05$ ).

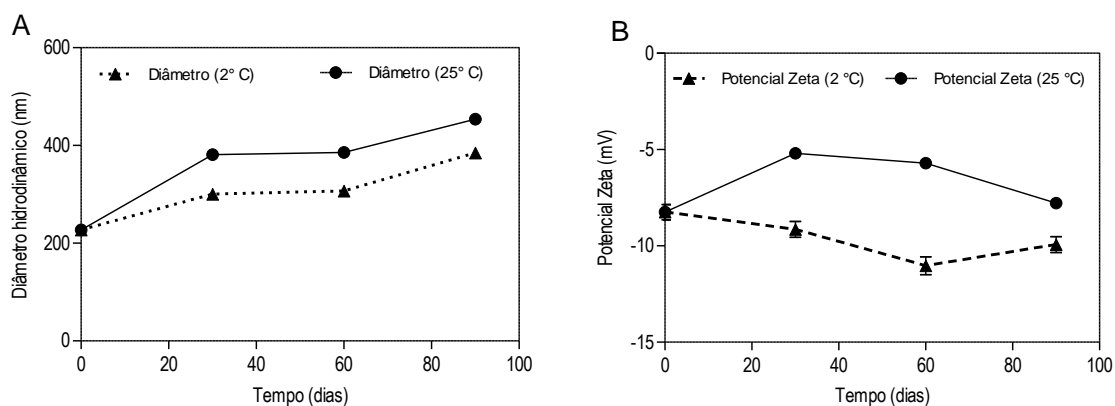


**Figura 1.** Efeitos de diferentes parâmetros como velocidade de homogeneização (A), concentração de surfactante (B), volume de solvente (C) e proporção polímero-fármaco (D) no diâmetro e eficiência de encapsulamento de nanopartículas de PLA-Tmx

## 5.2 Potencial Zeta e perfil de estabilidade

As nanopartículas preparadas neste estudo apresentaram valores referente a carga superficial (potencial zeta) de  $+20,2$  mV  $\pm$  0,4 mV. Ensaio parcial de

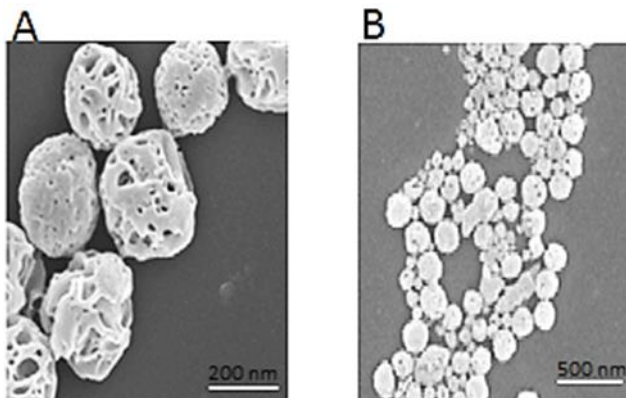
estabilidade, realizado para determinar condições ideais de armazenamento, demonstraram que partículas acondicionadas em ambiente refrigerado (entre 2 e 8 °C) apresentaram menor variação de características físicas tais como diâmetro e potencial zeta, ao passo que partículas acondicionadas em temperatura ambiente apresentaram variações mais acentuadas quanto a esses aspectos (Figura 2). Desta forma, acondicionamento em baixas temperaturas é o mais adequado para este sistema.



**Figura 2.** Variações no diâmetro (A) e potencial zeta (B) das nanopartículas de PLA-Tmx em função do tempo e condições de armazenamento (temperatura).

### 5.3 Morfologia

A Figura 3 apresenta imagens obtidas através de MEV e demonstram que as nanopartículas preparadas com PLA apresentam formato esférico e regular e estão dispostas isoladamente. Partículas regulares e em formato esférico são mais facilmente transportadas na corrente sanguínea, pois enfrentam menos resistência ao fluxo. As imagens também indicam baixa tendência a aglomeração das partículas, representado pela disposição isolada das mesmas.



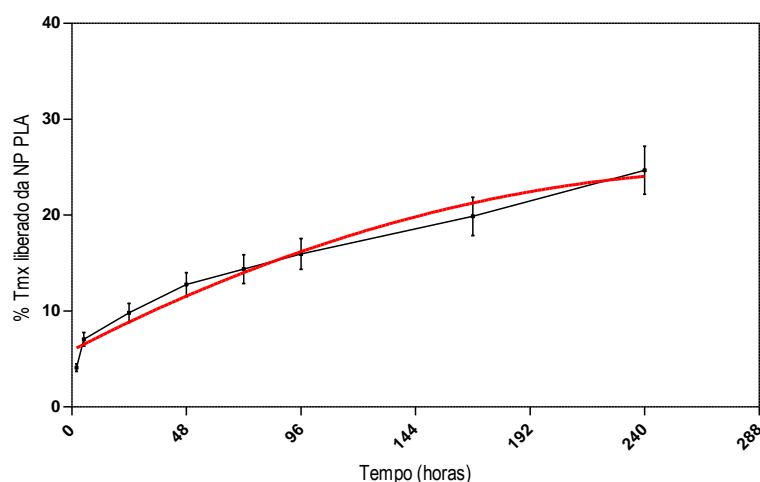
**Figura 3.** Imagens obtidas por MEV das nanopartículas de PLA

#### 5.4 Perfil de liberação *in vitro* e cinética de liberação do Tmx

O perfil de liberação apresentado pelo sistema indica que o Tmx dissocia-se da matriz das nanopartículas de maneira sustentada e controlada durante um período de pelo menos 10 dias (Figura 4). Uma liberação inicial de cerca de 10% ( $9,81\% \pm 0,1\%$ ) do fármaco é observada já nas primeiras 24 horas, caracterizando um discreto efeito de liberação imediata (*Burst*). Ao final do período estudado, as nanopartículas de PLA-Tmx promoveram a liberação de aproximadamente 25% ( $24,68\% \pm 2,5\%$ ) do fármaco encapsulado. A cinética de liberação do Tmx foi analisada utilizando quatro modelos matemáticos aplicados para determinação da cinética de liberação de fármacos. São eles Zero Ordem, Primeira Ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas. O modelo de Korsmeyer-Peppas foi o que demonstrou maior adequação aos dados de perfil de liberação demonstrado pelas nanopartículas de PLA-Tmx, de acordo com o valor de  $R^2$  observado para cada modelo quando correlacionados aos dados do perfil de liberação (Tabela 1). O sistema apresentou ainda expoente de liberação,  $n$ , igual a 0,37, o qual foi determinado com base na aplicação do modelo semi-empírico segundo Korsmeyer-Peppas<sup>36</sup>.

**Tabela 1.** Valor de  $R^2$  determinado para cada modelo matemático de cinética de liberação

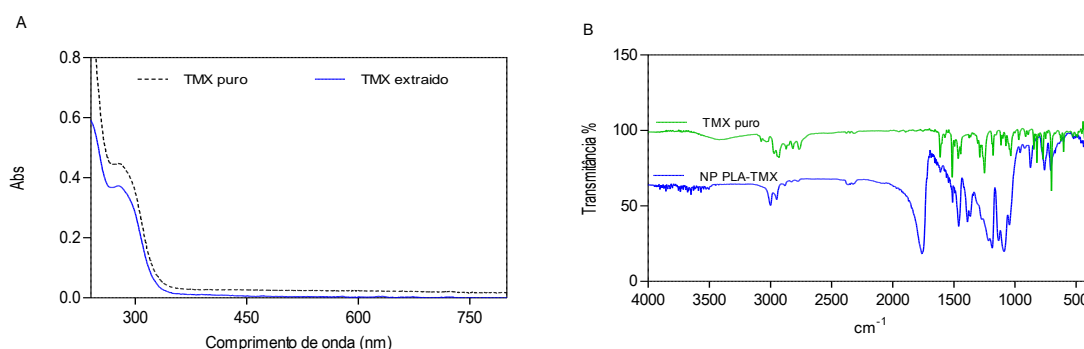
Formulação	$R^2$ Ordem Zero	$R^2$ 1a Ordem	$R^2$ Higuchi	$R^2$ Korsmeyer- Peppas
NP PLA-Tmx	0.869	0.719	0.969	0.983



**Figura 4.** Perfil de liberação *in vitro* apresentado pelas nanopartículas de PLA-Tmx a 37 °C (pH ~7,1). Em vermelho, linha de tendência do modelo matemático que melhor se adequou aos dados da liberação (Korsmeyer-Peppas,  $R^2$  0,983).

### 5.5 Análises de interação PLA-Tmx

Os espectros de absorvância na região do UV-vis do Tmx extraído das nanopartículas de PLA (Figura 5A) demonstram que a molécula do Tmx não sofre alteração estrutural suficiente durante o processo de produção das nanopartículas que possa resultar em modificação nas propriedades espectroscópicas do composto. Com base nos dados obtidos a partir de análises dos espectros de FTIR das nanopartículas de PLA-Tmx (Figura 5B), é possível inferir que o processo de nanoencapsulamento não altera as propriedades químicas do fármaco. Picos associados tanto ao Tmx como ao PLA podem ser observados no espectro de infravermelho apresentado na Figura 4B. Esses picos estão relacionados a importantes grupos funcionais nesses compostos. Interações físicas fracas e o processo de produção das nanopartículas podem causar algumas variações de picos nos espectros do polímero e/ou do fármaco.



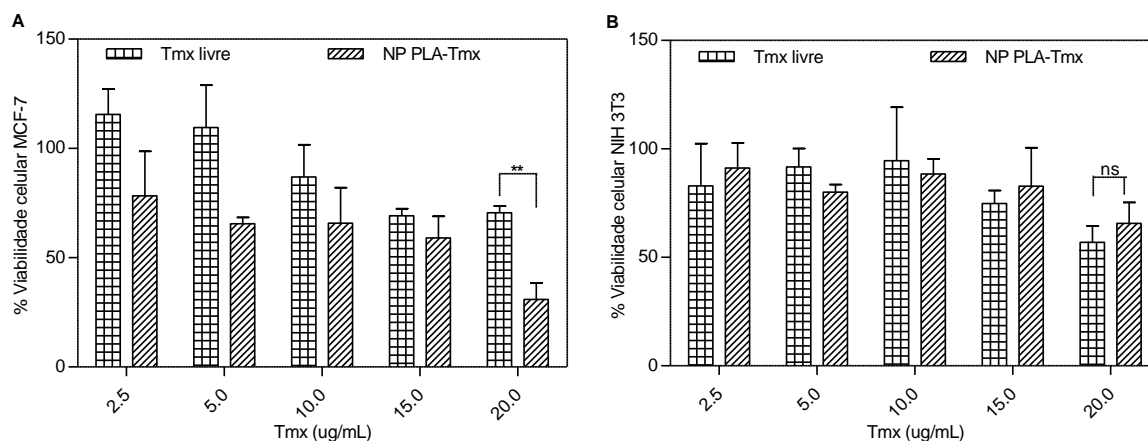
**Figura 5.** (A) Espectro de absorvância no UV-vis para o Tmx extraído das nanopartículas de PLA. (B) Espectro de FTIR das nanopartículas de PLA carregadas com Tmx e do Tmx puro.

O espectro de infravermelho das nanopartículas de PLA-Tmx apresentam bandas em  $3643\text{ cm}^{-1}$  devido um alongamento vibracional C=O, em  $3402\text{ cm}^{-1}$  devido a um anel benzênico, em  $2960\text{ cm}^{-1}$  devido a um estiramento =C-H, em  $2941\text{ cm}^{-1}$  associado a um estiramento assimétrico (CH<sub>2</sub>), em  $1753\text{ cm}^{-1}$  devido a um estiramento CO (grupamento cetônico), em  $1647\text{ cm}^{-1}$  relacionado ao grupamento amina (dobramento N-H), em  $1508$  e  $1437\text{ cm}^{-1}$  devido a um estiramento C=C em anel, em  $1386\text{ cm}^{-1}$  devido a dobramento CH<sub>3</sub>, em  $1157\text{ cm}^{-1}$  devido a um estiramento C-N, em  $1091\text{ cm}^{-1}$  devido a um grupamento vinil, em  $1049\text{ cm}^{-1}$  devido a um grupo amino (estiramento C-N), em  $925\text{ cm}^{-1}$  responsável por alceno, em  $752$  e  $704\text{ cm}^{-1}$  devido a anel fenólico substituído e rotação CH<sub>2</sub>, respectivamente.



### 5.6 Citotoxicidade *in vitro* em células de linhagem cancerígena MCF-7

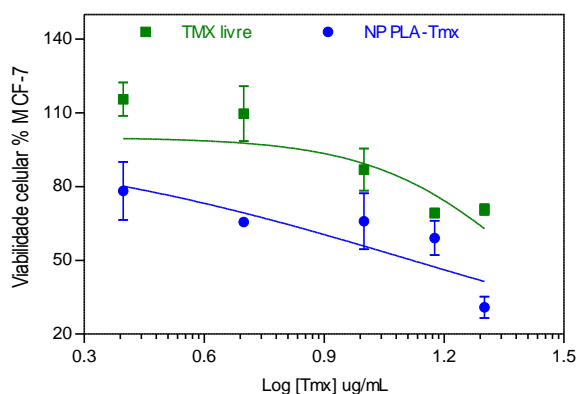
O perfil citotóxico da formulação de Tmx encapsulado em nanopartículas de PLA e do Tmx livre foram analisadas por meio de ensaio de MTT utilizando células de linhagem cancerígena (MCF-7) e não cancerígena (NIH 3T3). Os resultados obtidos a partir deste estudo demonstram que a formulação de Tmx associado a nanopartículas possui capacidade superior a do Tmx livre em inibir o crescimento de células MCF-7 (Figura 6A). A nanoformulação contendo Tmx também apresentou menor toxicidade sobre células NIH 3T3 que o fármaco livre (Figura 6B). O IC<sub>50</sub>, que representa a menor concentração necessária para inibir a viabilidade celular em 50%, foi também determinado por meio de regressão não-linear global da curva de viabilidade tanto para a forma livre do Tmx como para as nanopartículas de PLA-Tmx. As nanopartículas PLA-Tmx apresentaram um IC<sub>50</sub> de 13,19 µg/mL ± 1,26, enquanto que o IC<sub>50</sub> da formulação de Tmx livre foi de 25,11 µg/mL ± 1,33 (Figura 7). Análise estatística comparativa entre os dados de citotoxicidade das duas formulações sobre as células MCF-7 demonstrou haver diferença estatisticamente significativa entre as médias dos dois conjuntos de dados ( $p=0,04$ ; 95% CI da diferença: 1,7 – 59,1). Quanto a análise da variância, as formulações não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,7$ ).



**Figura 6.** Comparação da viabilidade celular de células MCF-7 (A) e NIH 3T3 (B) após tratamento com formulações de Tmx encapsulado em nanopartículas de PLA (NP PLA-Tmx) e Tmx livre. Análise comparativa das médias do efeito inibitório de cada formulação foi realizado a partir do test-t não pareado e test-F para comparação das duas variâncias.

Em relação a toxicidade sobre as células NIH 3T3 (Figura 6B), as formulações apresentaram efeitos tóxicos semelhante, exceto na concentração mais alta (20 µg/mL) onde as nanopartículas PLA-Tmx foram menos tóxicas do que o Tmx livre. No entanto, a análise estatística comparativa entre os dados de citotoxicidade das duas

formulações sobre essa linhagem celular resultou num valor de  $p > 0,05$  ( $p = 0,85$ ), demonstrando não haver diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos dois conjuntos de dados (95% CI da diferença: -20,1 – 17,1). Também não foi observado diferença estatística significativa na análise de variância entre os dois conjuntos de dados ( $p = 0,43$ ). Vale ressaltar que o ensaio de MTT foi realizado após 24 horas de iniciado o tratamento e que, de acordo com o perfil de liberação apresentado pela formulação (Figura 4), apenas cerca de 10% do fármaco é liberado nesse período. É interessante a realização do ensaio por um período mais prolongado de tempo, a fim de melhor avaliar o efeito citotóxico das nanopartículas de PLA-Tmx sobre a viabilidade de células de linhagem cancerígena e não cancerígenas, explorando o perfil de liberação de Tmx apresentando pelo sistema. Contudo, nossos resultados indicam que a formulação possui potencial para aumentar a eficácia de fármacos aplicados no combate ao câncer.



**Figura 7.** Gráfico de regressão não-linear global do efeito das formulações de Tmx Livre e Tmx encapsulando em nanopartículas de PLA sobre células MCF-7 aplicado para determinação do  $IC_{50}$  das formulações (Concentrações de Tmx: 2,5, 5,0, 10, 15 e 20  $\mu\text{g/mL}$ ).

## 6. DISCUSSÃO

O método de emulsificação e evaporação do solvente proporcionou a obtenção de partículas com diâmetro nanométrico e com distribuição monomodal, além de elevada taxa de associação do fármaco, representado pela eficiência de encapsulamento apresentada. Determinados aspectos devem ser considerados para garantir o controle sobre as características de diâmetro, carga superficial e eficiência de encapsulamento. Algumas dessas variáveis são velocidade de homogeneização

durante a etapa de preparo da emulsão, concentração de surfactante, concentração do polímero e proporção entre polímero e fármaco<sup>37,38,39,40</sup>.

O processo de homogeneização é uma etapa crítica para a formação de nanopartículas com diâmetro desejável, quando aplicado o procedimento de emulsificação e evaporação do solvente. Ela fornece a energia necessária para a quebra das gotículas formada durante a misturas das fases interna e externa da emulsão<sup>40</sup>, dando origem as nanopartículas. Portanto, quanto maior a energia fornecida ao sistema menor será o diâmetro das partículas, como foi observado no estudo de impacto da velocidade de homogeneização sobre o diâmetro médio das nanopartículas de PLA-Tmx.

PVA foi utilizado como surfactante na fase aquosa da emulsão preparada. Sua função é estabilizar a emulsão, promovendo controle na formação de partículas com tamanho submicrométrico. A capacidade do PVA em conduzir interações hidrofóbicas resulta na ocorrência de afinidades químicas com a fase oleosa da emulsão. Tais aspectos fazem do PVA um surfactante apropriado para o uso como estabilizador em emulsões óleo/água<sup>15</sup>. O PVA possui ainda características antiagregante que promovem a formação de uma barreira estérica na superfície das nanopartículas formadas durante o processo de produção, limitando a coalescência entre as partículas formadas, contribuindo para uniformidade e estabilização das nanopartículas preparadas<sup>15,41</sup>.

A concentração do polímero tem influência direta na viscosidade da fase orgânica da emulsão. Dessa forma, polímero em elevadas concentrações aumentam a viscosidade da solução, que por sua vez contribui para a agregação das partículas. Esta agregação ocorre como resultado de emulsificação e estabilização inadequada causadas pela resistência criada pela elevada viscosidade da solução durante o processo de homogeneização<sup>37,42</sup>. Portanto, o uso de quantidade elevada de polímero ou volume insuficiente de solvente leva ao aumento no diâmetro das nanopartículas. Uma concentração ótima de 10 mg/mL de PLA foi observada neste estudo, com obtenção de partículas com diâmetro médio ~245 nm. Em relação a proporção entre o PLA e Tmx na solução orgânica, uma proporção ótima de 10% (m/m) foi observada, que resultou numa eficiência de encapsulamento de ~85%. Foi observado uma característica de saturação de pontos de ligação do fármaco à matriz polimérica, onde

a adição de fármaco acima deste limite não resulta em aumento na taxa de associação do fármaco às nanopartículas.

O potencial zeta fornece informações a respeito do potencial eletrostático na superfície das nanopartículas. Este parâmetro é utilizado como indicativo de características de estabilidade das partículas quando mantidas em suspensão. De acordo com dados disponíveis na literatura, um valor absoluto de potencial zeta acima de 30 mV sugerem que as nanopartículas são estáveis quando mantidas em soluções, pois são capazes de se manter em suspensão, evitando aglomerações, devido a forças eletrostáticas repulsivas entre as partículas<sup>12,14,43,44</sup>. Portanto, de acordo com o valor de potencial zeta apresentado pelas nanopartículas de PLA-Tmx (~20 mV) e pela análise da estabilidade realizada em duas condições ambientais, recomenda-se que as nanopartículas de PLA-Tmx devem ser estocadas com quantidade mínima de líquido, em temperatura refrigerada, ou liofilizadas.

As características morfológicas apresentadas pelas nanopartículas PLA, obtidas por meio de MEV, associadas ao diâmetro submicrométrico, demonstram que este sistema apresenta aspectos adequados para administração intravenosa, pois sofrem menos resistência no transporte através da corrente sanguínea, sendo menos susceptíveis a causarem irritação e/ou desconforto durante o uso e aplicação<sup>5</sup>. A adequabilidade de administração por via oral ainda necessita investigação. Um ponto de corte de aproximadamente 380 nm tem sido reportado como limite mínimo do diâmetro das fenestras que dão acesso a vários tipos de tecidos tumorais<sup>41,45,46</sup>. Dessa forma, um sistema de liberação de fármaco baseado em nanopartículas contendo agentes terapêuticos utilizado para tratamento do câncer deve apresentar diâmetro inferior a este limite para alcançar o tecido tumoral com sucesso. O sistema de nanopartículas de PLA-Tmx preparado neste estudo possui características que atendem a esses requerimentos.

O perfil de liberação *in vitro* do Tmx liberado pelas nanopartículas de PLA foi caracterizado por um efeito de liberação imediata relativamente discreto seguido por uma liberação mais sustentada no decorrer do estudo. O efeito de liberação imediata, ou efeito *Burst*, geralmente acontece em decorrência da liberação das moléculas de fármaco ligadas a superfície da partícula, ao passo que a liberação sustentada está associada ao processo de difusão das moléculas do fármacos através da matriz polimérica da nanopartícula ou ainda devido a erosão/degradação da matriz

polimérica<sup>14,47</sup>. Este comportamento caracteriza duas taxas de liberação com vantagens distintas. O efeito de liberação imediata é interessante quando uma ação rápida do fármaco é necessária, enquanto que a liberação prolongada/sustentada tem importância quando há necessidade de manutenção do efeito do fármaco por períodos prolongados. A cinética de liberação do Tmx das nanopartículas de PLA melhor se adequou ao modelo de Korsmeyer-Peppas, e o expoente de liberação,  $n$ , igual a 0,37 sugere que a liberação do Tmx segue um mecanismo de difusão Fickiana. Métodos de regressão para determinação do valor de  $R$  são a estratégia mais utilizada para avaliação da adequação de modelos matemáticos de cinética de liberação. O melhor modelo é definido como base naquele que apresentar o maior valor ajustado do coeficiente de correlação ( $R^2$ )<sup>48</sup>. O expoente de liberação é utilizado como uma ferramenta para determinação do mecanismo de difusão que mais se adequa aos dados do perfil de liberação apresentados por um SLF. De acordo com esta regra, um valor de  $n \leq 0,43$  sugere que o processo de liberação do fármaco segue um modelo de difusão Fickiana, enquanto que  $n$  com valor entre 0,43 e 0,85 indica um mecanismo de difusão não-Fickiana conhecido como mecanismo de transporte anômalo. Valores de  $n \geq 0,85$  sugerem que a liberação do fármaco é predominantemente relacionada a um processo de relaxamento polimérico<sup>36,49,50</sup>.

A integridade da molécula do Tmx após o processo de preparo das nanopartículas foi analisado por espectrofotometria na região do UV-vis, no qual não foram observadas diferenças nas propriedades espectroscópicas do Tmx removido da nanopartícula de PLA. Portanto, o método de preparo utilizado não compromete a integridade da molécula do fármaco durante a preparação do sistema nanoparticulado. As interações entre o fármaco e o polímero foram analisadas utilizando espectroscopia no infravermelho<sup>51</sup>. As discretas mudanças de alguns picos observadas nos espectros da nanoformulação podem ter originado em decorrência da formação de interações fracas como pontes de hidrogênio forças de van der Waals, interações dipolo-dipolo, etc, que podem ter ocorrido durante a formação esférica das nanopartículas. Os espectros referentes a formulação de nanopartículas sem Tmx apresentou picos similares ao espectro das nanopartículas PLA-Tmx, sugerindo que a distribuição do fármaco no sistema ocorre predominantemente na estrutura interna das partículas mais do que na superfície<sup>49</sup>.

O estudo de citotoxicidade *in vitro* foi conduzido a fim de determinar o perfil citotóxico da formulação de Tmx associado a nanopartículas de PLA, comparando a uma formulação de Tmx livre, sobre células de linhagem de câncer de mama, MCF-7, por meio de ensaio de MTT. Ambas as formulações foram capazes de inibir em certo grau o crescimento dessas células. No entanto, as nanopartículas PLA-Tmx demonstraram maior capacidade para inibir o crescimento de células MCF-7 do que a formulação de Tmx livre, com diferença estatisticamente significativa entre as médias dos dois conjuntos de dados. O IC<sub>50</sub> determinado para as duas formulações fornece meios para avaliação quantitativa da diferença do efeito entre as duas formulações sobre as células de linhagem cancerígena. As nanopartículas PLA-Tmx apresentaram IC<sub>50</sub> aproximadamente duas vezes superior ao demonstrado pela formulação de Tmx livre. Aspectos como liberação sustentada de Tmx, aumento na solubilidade do fármaco, facilitação do transporte da molécula do fármaco para o interior da célula e funcionamento como reservatório do fármaco, protegendo a molécula de possível degradação no espaço intersticial são algumas das vantagens que as nanopartículas agregam aos agentes terapêuticos associados a ela, e que estão relacionadas com aumento em sua eficácia<sup>17,47,52</sup>. Outro aspecto observado neste estudo foi o perfil de citotoxicidade concentração-dependente apresentado pela formulação de Tmx livre comparada a um perfil de citotoxicidade não somente concentração-dependente, mas também tempo-dependente apresentado pelas nanopartículas de PLA-Tmx. O efeito citotóxico em células de linhagem não-cancerígenas (NIH 3T3) apresentou maiores diferenças entre as duas formulações nas concentrações mais elevadas, onde a formulação de Tmx livre demonstrou-se mais tóxica que a nanoformulação de Tmx. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os conjuntos de dados das duas formulações sobre esta linhagem celular. A ausência de efeito citotóxico sobre estas células se dá pelo fato das mesmas não expressarem receptores de estrogênio, que é o alvo de ação do tamoxifeno. Esse modelo celular foi utilizado nesse estudo para simulação de potenciais efeitos tóxicos das formulações em tecidos não tumorais, com a finalidade de elucidar prováveis riscos de efeitos adversos relacionados às formulações.

## **7. CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O método de emulsificação e evaporação de solvente é um procedimento relativamente simples e demonstrou-se eficiente para obtenção de nanopartículas com propriedades adequadas de diâmetro médio (inclusive distribuição de tamanho), eficiência de encapsulamento, além de características morfológicas apropriadas para uso como um sistema de liberação de fármacos.

O perfil de liberação demonstrado pelas nanopartículas PLA-Tmx reforça seu potencial como dispositivo terapêutico de elevada eficiência, uma vez que possui um mecanismo capaz de promover liberação localizada e sustentada do fármaco. Tais características tem potencial para reduzir a necessidade de frequentes administrações de doses de medicamento, cuja a finalidade é manter uma concentração terapêutica estável para combate à doença no corpo, e assim limitar a ocorrência de eventos adversos graves relacionados a distribuição sistêmica do fármaco. Ao reduzir essa necessidade, os sistemas baseados em nanopartículas conferem segurança e elevam a eficácia da terapia medicamentosa.

A capacidade citotóxica sobre células MCF-7 apresentadas pelas nanopartículas PLA-Tmx é um bom indicativo do potencial terapêutico do sistema, que apresentou-se mais eficaz em controlar o crescimento dessa linhagem celular que a formulação livre do fármaco, demonstrando que a associação do Tmx à nanopartícula não só mantém seu efeito inibitório sobre células cancerígenas como melhora tal efeito. Dessa forma, as nanopartículas PLA-Tmx desenvolvidas neste estudo são um prospectivo e funcional sistema biodegradável de liberação de fármacos com aplicabilidade como alternativa para o tratamento do câncer de mama.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ANSARI, C. *et al.* Development of novel tumor-targeted theranostic nanoparticles activated by membrane-type matrix metalloproteinases for combined cancer magnetic resonance imaging and therapy. **Small**, v. 10, n. 3, p. 566-575, 417, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3946335/pdf/nihms534525.pdf> >.
- 2 ZOLATA, H.; ABBASI DAVANI, F.; AFARIDEH, H. Synthesis, characterization and theranostic evaluation of Indium-111 labeled multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Nucl Med Biol**, v. 42, n. 2, p. 164-170, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25311750> >.
- 3 DE OLIVEIRA, J. F. *et al.* Therapeutic potential of biodegradable microparticles containing *Punica granatum* L. (pomegranate) in murine model of asthma. **Inflamm Res**, v. 62, n. 11, p. 971-980, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23979691> >.
- 4 KEMPEN, P. J. *et al.* Theranostic mesoporous silica nanoparticles biodegrade after pro-survival drug delivery and ultrasound/magnetic resonance imaging of stem cells. **Theranostics**, v. 5, n. 6, p. 631-642, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25825602> >.
- 5 MASOOD, F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 60, p. 569-578, 2016. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493115305981> >.
- 6 COATES, A. *et al.* On the receiving end--patient perception of the side-effects of cancer chemotherapy. **Eur J Cancer Clin Oncol**, v. 19, n. 2, p. 203-208, 1983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6681766> >.
- 7 WANG, H. *et al.* Nanoparticle systems reduce systemic toxicity in cancer treatment. **Nanomedicine (Lond)**, v. 11, n. 2, p. 103-106, 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26653177> >.
- 8 LOPES, M. *et al.* Preparation methods and applications behind alginate-based particles. **Expert Opin Drug Deliv**, p. 1-14, 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27492462> >.
- 9 GALINDO-RODRIGUEZ, S. A. *et al.* Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles. **Eur J Pharm Sci**, v. 25, n. 4-5, p. 357-367, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15916889> >.
- 10 GHASEMIAN, E.; MOTAGHIAN, P.; VATANARA, A. D-optimal Design for Preparation and Optimization of Fast Dissolving Bosentan Nanosuspension. **Adv Pharm Bull**, v. 6, n. 2, p. 211-218, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4961979/pdf/apb-6-211.pdf> >.
- 11 SOARES, P. I. *et al.* Towards the development of multifunctional chitosan-based iron oxide nanoparticles: Optimization and modelling of doxorubicin release. **Carbohydr Polym**, v. 153, p. 212-221, 2016. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861716309079> >.
- 12 GOMES, A. J. *et al.* Characterization of PLGA microparticles as a drug carrier for 3-ethoxycarbonyl-2h-benzofuro[3,2-f]-1-benzopyran-2-one. Ultrastructural study of cellular uptake and intracellular distribution. **Drug Deliv**, v. 13, n. 6, p. 447-454, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17002973> >.
- 13 RAY, S.; GHOSH RAY, S.; MANDAL, S. Development of bicalutamide-loaded PLGA nanoparticles: preparation, characterization and in-vitro evaluation for the treatment of prostate



- cancer. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, p. 1-11, 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27327352> >.
- 14 YUAN, Z.; GU, X. Preparation, characterization, and in vivo study of rhein-loaded poly(lactico-glycolic acid) nanoparticles for oral delivery. **Drug Des Devel Ther**, v. 9, p. 2301-2309, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25960633> >.
- 15 GALINDO-RODRIGUEZ, S. *et al.* Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharm Res**, v. 21, n. 8, p. 1428-1439, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15359578> >.
- 16 CHEN, H. *et al.* Surface modification of PLGA nanoparticles with biotinylated chitosan for the sustained in vitro release and the enhanced cytotoxicity of epirubicin. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 138, p. 1-9, 2016. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776515303179> >.
- 17 PEREZ, E. *et al.* Tamoxifen-loaded nanoparticles based on a novel mixture of biodegradable polyesters: characterization and in vitro evaluation as sustained release systems. **J Microencapsul**, v. 29, n. 4, p. 309-322, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22251238> >.
- 18 MUSAZZI, U. M. *et al.* Resveratrol-loaded nanocarriers: formulation, optimization, characterization and in vitro toxicity on cochlear cells. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 118, p. 234-242, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24816150> >.
- 19 CHENG, L. *et al.* Construction and evaluation of PAMAM-DOX conjugates with superior tumor recognition and intracellular acid-triggered drug release properties. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 136, p. 37-45, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26360738> >.
- 20 ESFANDYARI-MANESH, M. *et al.* Paclitaxel molecularly imprinted polymer-PEG-folate nanoparticles for targeting anticancer delivery: Characterization and cellular cytotoxicity. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 62, p. 626-633, 2016. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116300583> >.
- 21 BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Production of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles for extended controlled drug release of haloperidol. **J Microencapsul**, v. 22, n. 7, p. 773-785, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16421087> >.
- 22 HU, K. *et al.* Lactoferrin-conjugated PEG-PLA nanoparticles with improved brain delivery: in vitro and in vivo evaluations. **J Control Release**, v. 134, n. 1, p. 55-61, 2009. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365908006809> >.
- 23 SHEN, T. W. *et al.* Distribution and Cellular Uptake of PEGylated Polymeric Particles in the Lung Towards Cell-Specific Targeted Delivery. **Pharm Res**, v. 32, n. 10, p. 3248-3260, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26002743> >.
- 24 VIVEK, R. *et al.* Multifunctional HER2-antibody conjugated polymeric nanocarrier-based drug delivery system for multi-drug-resistant breast cancer therapy. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 6, n. 9, p. 6469-6480, 2014. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/am406012g> >.
- 25 ULERY, B. D.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. **Journal of polymer science. Part B, Polymer physics**, v. 49, n. 12, p. 832-864, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3136871/> >.

- 26 BREWER, E.; COLEMAN, J.; LOWMAN, A. Emerging Technologies of Polymeric Nanoparticles in Cancer Drug Delivery. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, p. 1-10, 2011. Disponível em: < <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2011/408675/> >.
- 27 O'REGAN, R. M.; JORDAN, V. C. The evolution of tamoxifen therapy in breast cancer: selective oestrogen-receptor modulators and downregulators. **Lancet Oncol.**, v. 3, n. 4, p. 207-214, 2002. Disponível em: < [http://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(02\)00711-8/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(02)00711-8/abstract) >.
- 28 BRASIL. **Fomulário Terapêutico Nacional 2010: Rename 2010**. Brasília/DF: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Ministério da Saúde: 1135 p. 2010.
- 29 SHIN, S. C.; CHOI, J. S. Effects of epigallocatechin gallate on the oral bioavailability and pharmacokinetics of tamoxifen and its main metabolite, 4-hydroxytamoxifen, in rats. **Anticancer Drugs**, v. 20, p. 584-588, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19491656> >.
- 30 TERRASSE, V.; GAUDIN, N. **Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer - WHO 2013.
- 31 WHO. Cancer - Fact Sheet. Fev 2015 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> >.
- 32 FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int. J. Cancer**, v. 136, p. E359-E386, 2015. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.29210/abstract> >.
- 33 MILATA, J. L.; OTTE, J. L.; CARPENTER, J. S. Oral Endocrine Therapy Nonadherence, Adverse Effects, Decisional Support, and Decisional Needs in Women With Breast Cancer. **Cancer Nurs**, 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27532743> >.
- 34 KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776509004111> >.
- 35 KUMARI, A.; KUMAR, V.; YADAV, S. K. Plant extract synthesized PLA nanoparticles for controlled and sustained release of quercetin: a green approach. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41230, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844443> >.
- 36 SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Mathematical modeling of controlled drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 48, n. 2-3, p. 137-138, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369078> >.
- 37 PANDEY, S. K. *et al.* Therapeutic efficacy and toxicity of tamoxifen loaded PLA nanoparticles for breast cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 309-319, 2015. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813014005455> >.
- 38 SCHADLICH, A. *et al.* Tumor Accumulation of NIR Fluorescent PEGPLA Nanoparticles: Impact of Particle Size and Human Xenograft Tumor Model. **ACS Nano**, v. 5, n. 11, p. 8710-8720, 2011. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/nn2026353> >.
- 39 CHAWLA, J. S.; AMIJI, M. M. Cellular uptake and concentrations of tamoxifen upon administration in poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles. **AAPS PharmSci**, v. 5, n. 1, p. E3, 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12713275> >.

- 40 BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. **Int J Pharm**, v. 336, n. 2, p. 367-375, 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517306010428> >.
- 41 ALTMAYER, C. *et al.* Tamoxifen-loaded poly(L-lactide) nanoparticles: Development, characterization and in vitro evaluation of cytotoxicity. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 60, p. 135-142, 2016. Disponível em: < [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26706516](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26706516) >.
- 42 EL FAGUI, A.; AMIEL, C. PLA nanoparticles coated with a beta-cyclodextrin polymer shell: preparation, characterization and release kinetics of a hydrophobic compound. **Int J Pharm**, v. 436, n. 1-2, p. 644-651, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22863751> >.
- 43 MEISSNER, T.; POTTHOFF, A.; RICHTER, V. Physico-chemical characterization in the light of toxicological effects. **Inhal Toxicol**, v. 21 Suppl 1, p. 35-39, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19558232> >.
- 44 BRIGGER, I. *et al.* Tamoxifen encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. A new antiestrogen formulation. **Int J Pharm**, v. 214, n. 1-2, p. 37-42, 2001. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517300006281> >.
- 45 BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54, n. 5, p. 631-651, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204596> >.
- 46 VAUTHIER, C. *et al.* Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. **J Control Release**, v. 93, n. 2, p. 151-160, 2003. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365903003936> >.
- 47 HE, X. *et al.* Cytotoxicity of Paclitaxel in biodegradable self-assembled core-shell poly(lactide-co-glycolide ethylene oxide fumarate) nanoparticles. **Pharm Res**, v. 25, n. 7, p. 1552-1562, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18196205> >.
- 48 SHAIKH, H. K.; KSHIRSAGAR, R. V.; PATIL, S. G. Mathematical models for drug release characterization: A review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 04, p. 324-338, 2015.
- 49 MAJI, R. *et al.* Preparation and characterization of Tamoxifen citrate loaded nanoparticles for breast cancer therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2014, n. 9, p. 3107-3118, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25028549> >.
- 50 LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Modified release of drug delivery systems: hydrophilic polymers. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-93322005000200003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322005000200003) >.
- 51 LAKKADWALA, S. *et al.* Physico-chemical characterisation, cytotoxic activity, and biocompatibility studies of tamoxifen-loaded solid lipid nanoparticles prepared via a temperature-modulated solidification method. **J Microencapsul**, v. 31, n. 6, p. 590-599, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24697190> >.
- 52 JAGADEESH, H. G.; V, K. D. Tamoxifen loaded poly ( $\epsilon$ Caprolactone) based injectable microspheres for breast cancer. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 2, n. 4, p. 189-195, 2010. Disponível em: < <http://www.ijppsjournal.com/Vol2Issue4/796.pdf> >.