

**THAYSA KSIASKIEWCZ KARAM**

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA  
DE NANOPARTÍCULAS DE BLENDS DE PLA-PEG CONTENDO ÁLCOOL  
PERÍLICO.**

**GUARAPUAVA  
2015**

**THAYSA KSIASKIEWCZ KARAM**

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA  
DE NANOPARTÍCULAS DE BLENDA DE PLA-PEG CONTENDO ÁLCOOL  
PERÍLICO.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa.

**Orientador:** Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

**GUARAPUAVA  
2015**

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

K18o Karam, Thaysa Ksiaskiewicz  
Obtenção, caracterização físico-química e avaliação biológica de nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo álcool perílico / Thaysa Ksiaskiewicz Karam. -- Guarapuava, 2015  
xvi, 96 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, 2015

Orientador: Najeh Maissar Khalil  
Banca examinadora: Najeh Maissar Khalil, Celso Vataru Nakamura, Priscileila Colerato Ferrari

Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Câncer. 3. Álcool perílico. 4. Nanopartículas poliméricas. 5. PLA. 6. PEG. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Welington e Maria do Carmo, e aos meus irmãos, Eduardo e Ricardo, pelo amor incondicional por mim, pelo incentivo, paciência e apoio em todas as minhas decisões.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”*

(Marthin Luther King)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar força e sabedoria durante toda minha vida, não permitindo que eu desanimasse em certas situações.

À meus pais e meus irmãos que sempre me apoiaram e me deram suporte nessa trajetória, tanto nos momentos bons quanto nos momentos ruins. Obrigada por me proporcionarem oportunidades que fizeram eu cumprir mais essa etapa.

A minha grande companheirinha Molly (*in memorian*), que sempre esteve comigo, sempre me deu tanto amor e carinho.

Aos demais familiares e amigos, pela preocupação, pelas orações e incentivo, em especial à minha avó Helena (*in memorian*), que mesmo sem entender ao certo, sempre me apoiou, ajudou e rezou por mim.

Ao meu namorado, Emmanuel Damiani da Silva, por sempre me incentivar, ajudar e apoiar, pela paciência e compreensão quando estive ausente. Obrigada pelo amor, carinho e por sempre estar ao meu lado me dando forças e me escutando, eu devo muito à você!

Ao meu orientador Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil e a Prof. Dr. Rubiana Mara Mainardes pela oportunidade, confiança e pela dedicação e ensinamentos repassados durante estes quase seis anos em que pude fazer parte da equipe do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica. Obrigada pelo convívio e pelas oportunidades que contribuíram para a minha vida, tanto pessoal quanto profissional.

À Prof. Dr. Tânia Tominaga por todo ensinamento repassado, pela confiança depositada e pela ajuda no meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Romano por sempre ser gentil e disponibilizar o uso do Laboratório de Fisiologia e Toxicologia Reprodutiva – UNICENTRO.

Ao Programa e ao corpo docente de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura por gentilmente disponibilizar o Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos – UEM, assim como à Mychelle Vianna pelo auxílio na realização das análises de microscopia de transmissão eletrônica.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Policiano Almeida por disponibilizar o uso do Laboratório de Pesquisa em Ciências Interfaciais – UNICENTRO, e ao Matheus Felipe Viante por sempre me auxiliar nas análises do potencial zeta.

Ao Departamento de Química – UNICENTRO, pela disponibilização do equipamento de espectroscopia na região do Infravermelho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Yoshimitsu Miyahara por permitir a utilização do equipamento de calorimetria exploratória diferencial, e ao seu aluno Paulo Henrique Gonsalves pelo auxílio nas análises.

À Prof. Dr. Erysa Castro por disponibilizar e auxiliar nas análises no difratômetro de raios – X.

Às minhas amigas, Aline, Diani, Daniele, Fernanda, Leizi, e Luciana, pelos momentos vividos desde a graduação e que se intensificaram no mestrado. Obrigada à todas pelo apoio e ajuda.

Em especial a Lori, por todos os momentos compartilhados, tanto os ruins como os bons, tanto os momentos profissionais como os pessoais. Obrigada pela amizade, lealdade e companheirismo durante todos esses anos.

Aos meus amigos, Daniel, Luciana C. e Lígia, obrigada pela amizade e companheirismo, por serem essas pessoas tão especiais e iluminadas. Sou muita grata a Deus por ter conhecido vocês.

À Ariane e Ísis, minhas queridas IC's, obrigada pelo carinho e por toda ajuda que vocês me deram. Vocês são meninas muito especiais.

À Clescila, Débora e Juliana obrigada por toda ajuda e amizade.

À Jociani por toda ajuda concedida durante a realização desse trabalho, obrigada por tudo, sou muito grata à você. Obrigada pela tua amizade.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Nanotecnologia, obrigada por todos os momentos de convivência, sejam eles de preocupação ou descontração. Cada um, de alguma maneira, foi presente e especial em minha vida.

À Andreza e a Dayane pela amizade, e por se fazerem tão presentes, mesmo distantes. Vocês são muito importantes para mim.

Aos que não me referi, mas que de alguma maneira me auxiliaram durante esse período.

À CAPES pelo auxílio com a bolsa de estudos.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar. Mas  
o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

(Madre Teresa de Calcutá)

## RESUMO

O álcool perílico (POH) é um monoterpene proveniente do limoneno, encontrado em óleos essenciais de diversas plantas e frutos cítricos, que vem sendo cada vez mais estudado por apresentar promissoras atividades contra diversos tumores, como de mama, pulmão, gliomas, entre outros. Apesar de apresentar ótimos resultados clínicos, o POH apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de múltiplas doses durante o dia e os efeitos colaterais, principalmente relacionados ao trato gastrointestinal. O presente trabalho objetivou o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas, com a intenção de proporcionar uma liberação controlada, a qual possa reduzir a toxicidade e a necessidade de múltiplas doses. A fase móvel do método desenvolvido foi constituída de ACN:água (80:20 v/v), com um fluxo de 1mL/min com detecção em 210 nm. O método desenvolvido apresentou todos os parâmetros necessários de acordo com as recomendações vigentes. A porcentagem de eficiência de encapsulação das nanopartículas foi de 54,61%, sendo que as nanopartículas apresentaram um tamanho de 229,46 nm, com uma distribuição de tamanho homogênea e forma esférica. O potencial zeta obtido foi de - 21 mV. As análises físico-químicas (raio-x, espectroscopia na região do infravermelho e calorimetria diferencial exploratória) demonstraram que o processo de nanoencapsulação resultou em um sistema amorfo. Com o estudo de estabilidade foi possível determinar que a melhor condição de armazenamento das nanopartículas é sob refrigeração (8°C), na qual as nanopartículas mantiveram-se estáveis pelo período avaliado de três meses. As nanopartículas de POH liberaram aproximadamente 30% em 168 h, com o perfil cinético de liberação determinado como de segunda ordem, com uma liberação realizada por meio da difusão do POH. No teste de citotoxicidade frente às hemácias, tanto o POH não encapsulado quanto as nanopartículas de PLA – PEG contendo POH, não apresentaram efeitos citotóxicos frente ao modelo testado. As células HEp-2 apresentaram 60% de viabilidade celular na presença das nanopartículas de POH, em 96h. Com os ensaios realizados foi possível concluir que o sistema nanoestruturado contendo POH foi obtido com sucesso, o qual apresenta potencial para aplicação em tratamentos frente a tumores.

**Palavras-chave:** Câncer; Álcool perílico; Nanopartículas poliméricas; PLA; PEG.



## ABSTRACT

Perillyl alcohol (POH) is a monoterpene coming from limonene, found in essential oils of many plants and citrus fruits, and is being increasingly studied by presenting promising activity against several tumors, such as breast, lung, gliomas, among others. Spite of presenting excellent clinical results, the POH presents some drawbacks: necessity of multiple doses during the day and the side effects, mainly related to the gastrointestinal tract. This study aimed to the development of polymeric nanoparticles, with the intention of providing a controlled release that can reduce the toxicity and the need for multiple doses. The mobile phase was composed of ACN: water (80:20 v / v), with a flow 1mL/min and with detection at 210nm. The method developed showed all the necessary parameters according to current recommendations. The percentage of encapsulation efficiency of nanoparticles was 54,61%, with a size of 229,46 nm, with a homogeneous size distribution and spherical shape. Zeta potential was obtained of -21 mV. The physicochemical analyzes (x-ray, infrared spectrophotometer and differential scanning calorimetry) showed that the process of nanoencapsulation formed an amorphous system. With the stability study it was determined that better of nanoparticles storage condition is under refrigeration (8 ° C), in which nanoparticles remained stable at study period of three months. POH nanoparticles released approximately 30% at 168 h, with the release kinect profile determined as second order with a release performed through the diffusion the POH. In the cytotoxicity test against the erythrocytes, both unencapsulated POH as the nanoparticles blends of PLA - PEG containing POH not showed cytotoxic effects against this tested model. HEp-2 cells showed 60% cell viability in the presence of POH nanoparticles, in 96 hours. With the tests conducted it was concluded that the nanostructured system containing POH was successfully obtained, which has a potential for application in treatments against tumors.

**Keywords:** Cancer; Perillyl alcohol; Polymeric nanoparticles; PLA; PEG.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Estimativa da incidência de novos casos de câncer para 2014. ....	18
<b>Figura 2.</b> Fases de desenvolvimento do tumor.....	20
<b>Figura 3.</b> Esquema do a) Ciclo de replicação celular e da b) ação dos agentes neoplásicos sobre o ciclo. ....	22
<b>Figura 4.</b> Estrutura do limoneno. ....	25
<b>Figura 5.</b> Estrutura do POH. ....	26
<b>Figura 6.</b> Transformação do Limoneno em POH pela ação da enzima limoneno-7 monooxigenase. ....	27
<b>Figura 7.</b> Representação da distribuição da aplicação da nanotecnologia por área.	29
<b>Figura 8.</b> Estrutura química do poli (L-ácido láctico) – PLA.....	32
<b>Figura 9.</b> Estrutura química do polietilenoglicol – PEG.....	33
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática de nanocápsula e nanoesfera. Em a) Fármaco retido no núcleo oleoso, b) Fármaco adsorvido na superfície polimérica, c) Fármaco disperso na matriz polimérica e em d) fármaco adsorvido à superfície da matriz polimérica. ....	33
<b>Figura 11.</b> Cromatograma de absorvância (AU) em função do tempo (minutos) do POH (30 µg/mL) em ACN:água (40:60, v/v). Fase móvel ACN:água (80:20, v/v), em 210 nm. ....	51
<b>Figura 12.</b> Curva analítica do POH em ACN:água (40:60, v/v). Fase móvel ACN:água (80:20, v/v) em 210nm (n=3). $A = 7,79 \cdot 10^4 \cdot [\text{POH}] + 1,44 \cdot 10^5$ , $r=0,9997$ . ....	52
<b>Figura 13.</b> Cromatograma de absorvância (AU) do sobrenadante de uma nanopartícula vazia em ACN:água (40:60, v/v). Fase móvel: ACN:água (80:20, v/v), 210 nm. ....	55

<b>Figura 14.</b> Cromatograma de absorvância (AU) do sobrenadante de uma nanopartícula contendo POH em ACN:água (40:60, v/v). Fase móvel: ACN:água (80:20, v/v), 210 nm. ....	56
<b>Figura 15.</b> Cromatograma de absorvância (AU) de uma amostra de PBS 10 mM, pH=7,4, na ausência de POH, em ACN:água (40:60, v/v). Fase móvel: ACN:água (80:20, v/v), 210 nm. ....	57
<b>Figura 16.</b> Cromatograma de absorvância (AU) do sobrenadante contendo POH e PBS 10 mM, pH=7,4, em ACN:água (40:60, v/v). Fase móvel: ACN:água (80:20, v/v), 210 nm. ....	57
<b>Figura 17.</b> Curva analítica para LD e LQ do POH em ACN:água (40:60, v/v). Fase móvel ACN:água (80:20, v/v) em 210nm (n=3). $r=0,998$ . ....	59
<b>Figura 18.</b> Distribuição do tamanho de uma amostra representativa das nanopartículas de blenda de PLA-PEG contendo POH. Diâmetro médio de 215,3 nm e índice de polidispersão de 0,073, perfil monomodal, n=3. ....	61
<b>Figura 19.</b> Espectros na região do infravermelho: a) POH, b) Nanopartícula vazia (PLA-PEG) e c) Nanopartícula contendo POH. ....	64
<b>Figura 20.</b> Difrátogramas obtidos por DRX: a) Nanopartícula vazia (PLA-PEG) e b) Nanopartícula contendo POH. ....	66
<b>Figura 21.</b> Termogramas obtidos por DSC: a) Nanopartícula vazia (PLA-PEG) e b) Nanopartícula contendo POH. ....	68
<b>Figura 22.</b> Microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de bendas de PLA-PEG contendo POH. ....	69
<b>Figura 23.</b> Diâmetro médio das nanopartículas de bendas de PLA-PEG contendo POH em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento, n=3. ..	70
<b>Figura 24.</b> Índice de polidispersão das nanopartículas de bendas de PLA-PEG contendo POH em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento, n=3. ....	71

<b>Figura 25.</b> Potencial zeta das nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento, n=3. ..	72
<b>Figura 26.</b> Teor de fármaco das nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento, n=3. ..	73
<b>Figura 27.</b> Porcentagem de liberação cumulada <i>in vitro</i> do POH a partir das nanopartículas de blendas de PLA-PEG em solução de PBS 10 mM, pH=7,4 à 37 °C. ....	75
<b>Figura 28.</b> Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de blendas de PLA-PEG, na presença e na ausência de POH sobre hemácias. Concentração do POH de 80 µg/mL. ....	77
<b>Figura 29.</b> Porcentagem de viabilidade celular das concentrações de POH encapsulado e não encapsulado sobre HEp-2, em a) 72 h e em b) 96 h.....	79
<b>Figura 30.</b> Fotos do ensaio com as células HEp-2, incubadas por 96 h. a) Controle apenas com meio b) Controle com etanol c) Controle de nanopartículas vazias d) POH livre e) Nanopartículas contendo POH. ....	80

## LISTAS DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Característica/Função das fases do ciclo celular. ....	21
<b>Tabela 2.</b> Classificação dos terpenos segundo número de unidades isoprênicas. ....	24
<b>Tabela 3.</b> Características dos polímeros. ....	31
<b>Tabela 4.</b> Sistemas carreadores no mercado em 2012. ....	36
<b>Tabela 5.</b> Condições cromatográficas utilizadas na quantificação do POH. ....	50
<b>Tabela 6.</b> DPR da análise de precisão intra-corridas das amostras padrão de POH, n=5. ....	53
<b>Tabela 7.</b> DPR das análises de precisão inter-corridas das amostras padrão de POH, n=5. ....	53
<b>Tabela 8.</b> Porcentagem de recuperação e DPR das análises da exatidão para amostras de POH, n=5. ....	54
<b>Tabela 9.</b> Porcentagem de recuperação e DPR das análises da robustez, n=5. ....	58
<b>Tabela 10.</b> Potencial zeta das nanopartículas de blendas de PLA-PEG na ausência e presença de POH, n=3, expressos em média $\pm$ DP. ....	62
<b>Tabela 11.</b> Análise cinética de liberação do POH a partir de nanopartículas de blendas de PLA-PEG em tampão PBS (10 mM, pH=7,4). ....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCM	Diclorometano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DRP	Desvio padrão relativo
DRX	Difração de raio X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EE%	Eficiência de encapsulação
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio
mV	Milivolts
PBS	Tampão fosfato de sódio
PEG	Polietilenoglicol
PLA	Poli (DL-ácido láctico)
PLGA	Ácido poli(lático-co-glicólico)
POH	Álcool perílico
PVA	Álcool polivilínico
r	Coeficiente de correlação
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
TG	Termogravimetria

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
1.1. Câncer .....	18
1.2. Produtos naturais.....	23
1.3. Álcool perfílico .....	26
1.4. Nanotecnologia Farmacêutica .....	29
1.4.1. Nanopartículas poliméricas .....	31
1.4.2. Aplicação das nanopartículas no tratamento do câncer.....	35
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	37
2.1. Objetivos gerais .....	37
2.2. Objetivos específicos.....	37
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
3.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para determinação de POH em nanopartículas .....	38
3.1.1. Preparação das soluções padrão e amostra.....	38
3.1.2. Condições Cromatográficas .....	38
3.1.3. Validação do método cromatográfico .....	39
3.1.3.1. Linearidade .....	39
3.1.3.2. Precisão .....	39
3.1.3.3. Exatidão .....	40
3.1.3.4. Especificidade .....	40
3.1.3.5. Robustez .....	40
3.1.3.6. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	41

3.2. Obtenção de nanopartículas contendo POH .....	41
3.3. Caracterização físico-química das nanopartículas .....	42
3.3.1. Determinação da eficiência de encapsulação .....	42
3.3.2. Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão .....	43
3.3.3. Potencial zeta.....	43
3.3.4. Espectroscopia da região do infravermelho (IV) .....	43
3.3.5. Difração de Raios X (DRX) .....	44
3.3.6. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	44
3.3.7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	44
3.4. Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo POH.....	44
3.5. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> .....	45
3.6. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA-PEG contendo POH sobre hemácias .....	46
3.7. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA-PEG contendo POH sobre a linhagem tumoral Hep-2. ....	47
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
4.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para determinação de POH em nanopartículas .....	50
4.1.1. Condições Cromatográficas .....	50
4.1.2. Validação do método cromatográfico .....	52
4.1.2.1. Linearidade .....	52
4.1.2.2. Precisão .....	53
4.1.2.3. Exatidão .....	54
4.1.2.4. Especificidade .....	54



4.1.2.5. Robustez .....	58
4.1.2.6. Limites de detecção (LD) e quantificação (LD) .....	58
4.2. Obtenção de nanopartículas contendo POH .....	59
4.3. Caracterização físico-química das nanopartículas .....	60
4.3.1. Determinação da eficiência de encapsulação .....	60
4.3.2. Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão .....	60
4.3.3. Potencial zeta.....	62
4.3.4. Espectroscopia da região do infravermelho (IV) .....	63
4.3.5. Difração de Raios X (DRX) .....	65
4.3.6. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	67
4.3.7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	68
4.4. Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo POH.....	70
4.5. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> .....	74
4.6. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA-PEG contendo POH sobre hemácias .....	76
4.7. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA-PEG contendo POH sobre linhagem tumoral .....	78
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>84</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>85</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>96</b>
7.1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos .....	96

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

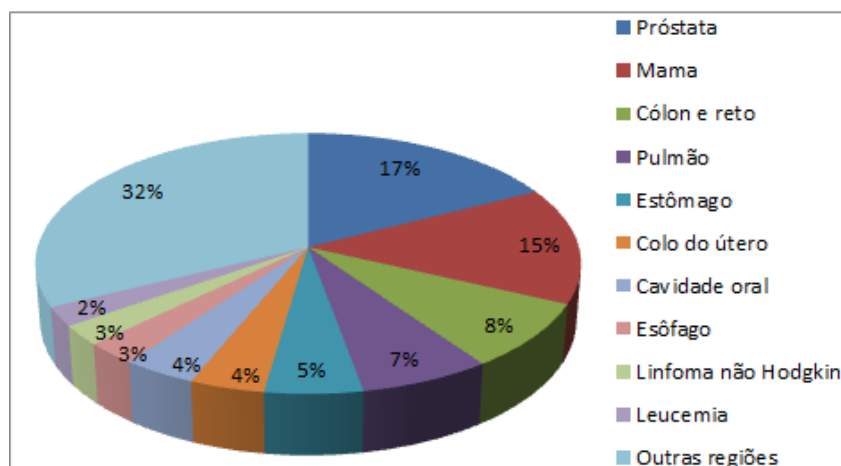
### 1.1. Câncer

Na antiguidade, egípcios, persas e indianos já se referiam ao câncer como sendo um tumor maligno, porém a escola de medicina de Hipócrates definiu a doença como sendo um tumor duro, gerada por um desequilíbrio dos fluídos corpóreos, que muitas vezes reaparecia depois de eliminado (TEIXEIRA & FONSECA, 2007). Com o passar dos anos foi possível adquirir maior conhecimento sobre o assunto, porém atualmente o câncer é uma das principais causas de morte, sendo considerado um problema de saúde pública mundial (WHO, 2014).

No ano de 2012 foram registrados 14,1 milhões de novos casos de câncer, 8,2 milhões de mortes e mais de 30 milhões de pessoas vivendo com algum tipo de câncer no mundo todo (IARC, 2014). A Organização Mundial da Saúde, estima que em 2030 esses números possam duplicar, com ocorrência de 27 milhões de casos incidentes, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas com câncer (INCa, 2014; WHO, 2014).

No Brasil a taxa de mortalidade devido ao câncer subiu de 7,9% para 15%, em um curto período de tempo de 30 anos. O Instituto Nacional de Câncer realizou uma estimativa que em 2014, o número de novos casos possam chegar à quase 400 mil, sendo que os tipos com maior incidência serão o câncer de próstata (17%) e o câncer de mama (15%), conforme a Figura 1 (INCa, 2014).

**Figura 1.** Estimativa da incidência de novos casos de câncer para 2014.



(INCa, 2014)

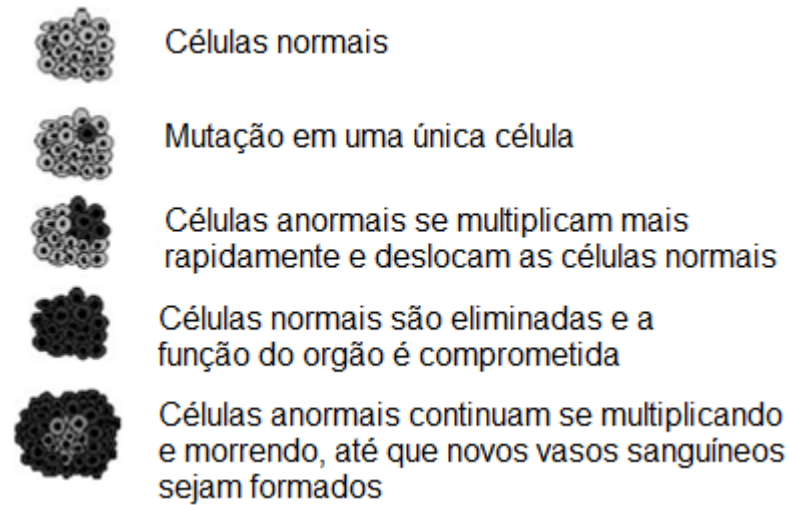
O câncer, denominado neoplasia ou tumor maligno, é definido atualmente como uma doença causada pela divisão desordenada de células anormais, que se propagam e possuem a capacidade de invadir demais tecidos, por meio do sangue e/ou sistema linfático (CANCER RESEARCH, 2014; RANG *et al.*, 2004). Porém, o câncer apresenta-se na forma de quase 200 tipos diferentes, os quais correspondem aos diferentes sistemas de células do corpo (NCI, 2014).

O desenvolvimento de um tumor pode iniciar apenas com uma célula neoplásica, a qual é rodeada por células normais. Nessa célula podem ocorrer alterações genéticas, como nos:

- Proto-oncogenes: responsáveis por codificar proteínas essenciais ao crescimento e diferenciação celular, quando são alterados transformam-se em oncogenes, que podem ocasionar a oncogênese e o crescimento descontrolado;
- Genes supressores: responsáveis por inibir o processo de divisão e diferenciação das células que sofreram mutação, dessa forma, quando são alterados, a divisão torna-se descontrolada;
- Genes que regulam a apoptose: responsáveis por ocasionar a morte de células danificadas e que não foram reparadas. Quando tornam-se inativos, essas células não são eliminadas como deveriam ser;
- Genes que regulam o reparo do DNA danificado: se alterados, influenciam na capacidade de regenerar erros ocasionados ao DNA durante a divisão celular (FILHO *et al.*, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Com a multiplicação acelerada dessa célula anormal, ocorrerá a formação de uma massa tumoral que capta os nutrientes disponíveis, deixando o tecido sadio com insuficiência nutricional. Dessa forma o tumor deslocará as células normais até atingirem o tamanho máximo limitado pela difusão de nutrientes. As células periféricas do tumor terão um melhor acesso aos nutrientes disponíveis, dessa forma continuarão a se proliferar, porém as células do interior do tumor irão formar um núcleo necrótico. Quando a taxa de proliferação se igualar a taxa de morte celular, o tumor estará no seu tamanho máximo, e esse ciclo continuará até que novos vasos sanguíneos se formem para fornecer nutrientes necessários para a expansão do mesmo (Figura 2) (BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2004).

**Figura 2.** Fases de desenvolvimento do tumor.



(Adaptado de BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2004)

O comportamento alterado das células anormais, o qual leva ao processo de invasão, pode ser explicado baseando-se na própria formação do tumor, pois a multiplicação celular constante faz com que haja formação de novos vasos para fornecimento de nutrientes para essas células, e isso faz com que a massa do tumor maligno adquira capacidade de invadir tecidos vizinhos, o que também pode acarretar na entrada na circulação sanguínea ou vasos linfáticos (metástase), disseminando assim essas células para órgãos/tecidos distantes (GUYTON & HALL, 1997; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os motivos pelos quais acontecem essas modificações e acarretam em células anormais ainda não estão bem elucidados, mas sabe-se que as neoplasias surgem devido mutações genéticas espontâneas ou induzidas por agentes patogênicos, químicos, físicos, entre outros (FERRARI & TORRES, 2002). Entre os fatores considerados mais relevantes por sua prevalência, difusão e possibilidade de prevenção, podem ser citados: o fumo, exposição à radiação solar direta, radiação ionizante, incluindo a energia nuclear utilizada em ambiente industrial, médico e bélico. Também incluem os vírus e outros agentes biológicos, compostos químicos, dieta consumida diariamente, os hábitos alimentares gerais e a ingestão regular de álcool etílico e seus derivados (IARC, 2014).

Para o tratamento do câncer podem ser utilizadas algumas técnicas, como a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, muitas vezes podendo-as utilizar de forma associada. Esses tratamentos se baseiam na tentativa de destruir as células anormais ou de impedir que haja replicação das mesmas.

A intervenção cirúrgica remove os tumores com eficácia, desde que não existam metástases. A radioterapia ocorre por meio da ação de radiações ionizantes, que podem ser eletromagnéticas (raios X ou gama) e particulada (partículas  $\alpha$  e  $\beta$ , prótons e nêutrons). Pela radiação ocorre a eliminação do tecido neoplásico, ocorrendo danos ao DNA das células neoplásicas, porém essa radiação também atinge os tecidos normais, causando reação inflamatória no local e alguns danos, mas nesse caso as células normais conseguem se recuperar de forma mais eficiente que as células anormais (CANCER RESEARCH, 2014).

Muitas vezes a radioterapia é um tratamento auxiliar à quimioterapia, tratamento mais utilizado na clínica médica. A quimioterapia consiste na administração de fármacos com potencial de reduzir ou impedir o crescimento das células cancerosas, podendo ser utilizado apenas um quimioterápico ou a combinação de diferentes quimioterápicos no tratamento (DOS SANTOS *et al.*, 2001).

O tratamento quimioterápico possui limitações, uma vez que os quimioterápicos não são seletivos para células tumorais, pois não possuem atividade específica sobre o poder invasivo, a perda da diferenciação ou na tendência do tumor sofrer metástases (JAIN & JAIN, 2008). Os principais quimioterápicos agem no ciclo celular, sendo que este é constituído pelas fases  $G_0$ ,  $G_1$ , S,  $G_2$  e M. As principais características e funções de cada fase encontram-se na Tabela 1 (ALMEIDA *et al.*, 2005).

**Tabela 1.** Característica/Função das fases do ciclo celular.

<b>Fase</b>	<b>Característica/Função</b>
$G_0$	Ausência de replicação e com atividade nuclear baixa
$G_1$	Preparação da célula para multiplicação, produção de constituintes celulares essenciais para a nova célula e preparação para a síntese de DNA
S	Síntese do DNA
$G_2$	Síntese dos componentes para a mitose
M	Produção do fuso mitótico

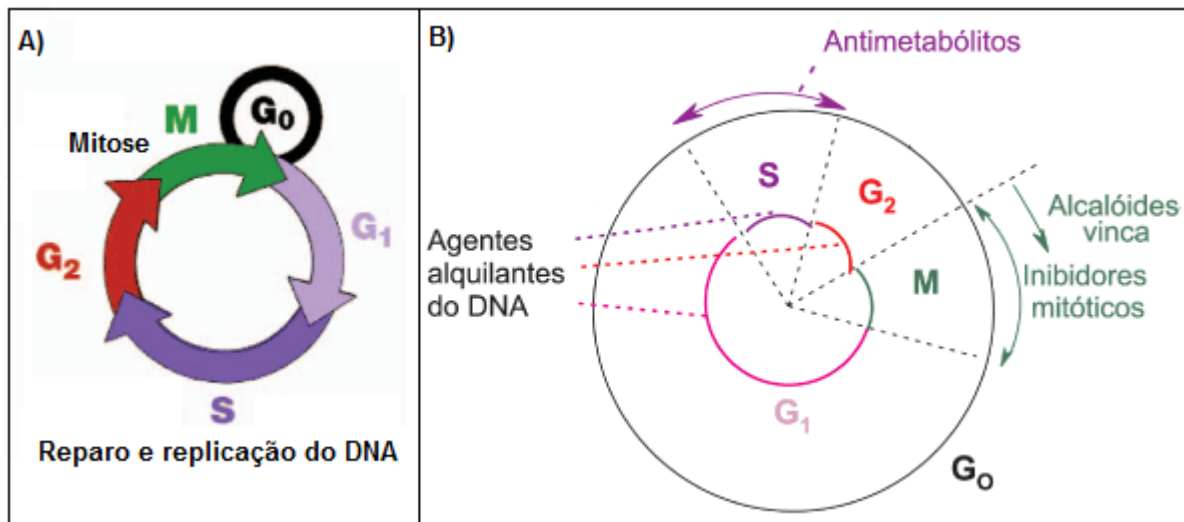
(ALMEIDA *et al.*, 2005)

Entre os principais quimioterápicos podem ser citados os seguintes:

- Agentes alquilantes: capazes de formarem ligações covalente com o DNA, impedindo que haja replicação;
- Agentes antimetabólitos: interferem na síntese de RNA e DNA, ou alteram a síntese das bases púricas e pirimidínicas endógenas;
- Agentes inibidores de topoisomerasas: inibem a atividade da topoisomerase, impedindo o relaxamento do DNA, que ocorre durante a replicação e transcrição, causando a quebra do DNA;
- Agentes de derivados vegetais: como por exemplo os alcalóides da vinca, que interferem na formação dos fusos mitóticos (CUNHA & LEHMANN, 2003; RANG *et al.*, 2004).

Os quimioterápicos citados agem de maneiras diferentes, porém todos possuem sua atividade em uma das fases do ciclo celular. Na Figura 3a há um esquema do ciclo celular e em 3b está mostrando em que fase do ciclo cada quimioterápico age (ALMEIDA *et al.*, 2005).

**Figura 3.** Esquema do a) Ciclo de replicação celular e da b) ação dos agentes neoplásicos sobre o ciclo.



(Adaptado de ALMEIDA *et al.*, 2005)

Em uma célula normal, após o final do ciclo (Fase M), ocorre a separação da célula mãe, formando duas células filhas, retornando para a fase G<sub>0</sub>. Em contrapartida, a célula tumoral não finaliza o ciclo de replicação celular, não retorna para fase G<sub>0</sub>, passando direto para a fase G<sub>1</sub> (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os quimioterápicos que acabam bloqueando a fase S do ciclo celular, desencadeiam a apoptose das células neoplásicas, afetando também as células normais, sendo essa uma das causas dos efeitos tóxicos de alguns quimioterápicos (WORKMAN & KAYE, 2002). Outra causa dos efeitos tóxicos é a dificuldade de atingir a concentração terapêutica necessária do fármaco no sítio do tumor pelo período de tempo desejado (CHAWLA & AMIJI, 2002).

Pelo fato de existirem tantos efeitos indesejáveis com o uso dos quimioterápicos, torna-se interessante a busca por novos compostos e novas abordagens terapêuticas, visando uma maior seletividade para o tecido neoplásico (SHARMAN, ALLEN & VAN LIER, 1999), auxiliando dessa forma na busca por uma qualidade de vida melhor dos pacientes que possuem alguma neoplasia. É inerente que com uma melhor eficácia do tratamento, onde a eliminação das células tumorais afete o mínimo possível as células saudáveis, haverá uma adesão maior dos pacientes aos tratamentos (BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2004).

## **1.2. Produtos naturais**

O uso de plantas, ervas, fungos e sementes, como medicamentos, é descrito muito antes da medicina moderna. Há relatos que desde a antiguidade, quando era realizado uma cirurgia para retirada de câncer, os médicos recomendavam também o uso de produtos naturais, em especial o uso de plantas (NOBILI *et al.*, 2009).

Dados de uso de plantas de forma étnico – farmacológico contribuíram muito no desenvolvimento de formulários e farmacopéias, e também auxiliaram no desenvolvimento de novos medicamentos. A primeira publicação sobre a utilização de plantas para o tratamento do câncer ocorreu em 1967, a qual apresentou mais de 3000 espécies, as quais tinham sido relatadas no uso do tratamento de neoplasias (GRAHAM *et al.*, 2000).

Dessa forma, o desempenho de produtos naturais contra o câncer é muito relevante, sendo que vários potenciais agentes anticancerígenos estão sendo usados ou estudados para esse fim, com intuito de melhoria de estratégias quimioterápicas, onde os efeitos indesejáveis sejam minimizados, com consequente melhora na sobrevivência dos pacientes (BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2004; NOBILI *et al.*, 2009).

Existem muitos programas promovidos por instituições que incentivam a

descoberta e triagem de novas drogas com potencial quimioterápico, com ênfase nos produtos naturais. Há muito desenvolvimento nessa categoria, com novas bases tecnológicas, como a síntese e alto rendimento (NCI, 2014). Dessa maneira, os produtos naturais tornaram-se alvos de pesquisas a todo instante, isso deve-se ao fato de possuírem um amplo espectro de atividades biológicas. Despertando assim um grande interesse de pesquisadores que possuem um foco na prevenção e tratamento de tumores (NEWMAN & CRAGG, 2007; HURYN & WIPF, 2008).

Dentre muitos produtos naturais que são estudados atualmente, um grupo que vêm chamando atenção são os terpenos, pois os mesmos apresentam muitas atividades biológicas descritas, como ação antifúngica e antibacteriana (MESA-ARANGO *et al.*, 2009) e include atividades antitumorais (BAKKALI *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2005).

Os terpenos são hidrocarbonetos e componentes voláteis dos óleos essenciais, que estão presentes em muitas plantas, sendo uma classe de metabólitos secundários com uma grande gama de variedade estrutural. Os terpenos são formados pela fusão de unidades isoprênicas, as quais são formadas por cinco carbonos ( $C_5H_8$ )<sub>n</sub>, sendo classificados de acordo com o número dessas unidades, como pode ser visualizado na Tabela 2 (JAKIEMIU, 2008; MCGARVEY E CROTEAU, 1995).

**Tabela 2.** Classificação dos terpenos segundo número de unidades isoprênicas.

<b>Classificação</b>	<b>Nº unidades isoprênicas</b>
Hemiterpenos	Uma unidade
Monoterpenos	Duas unidades
Sesquiterpenos	Três unidades
Diterpenos	Quatro unidades
Politerpenóides	Mais de quatro unidades

(JAKIEMIU, 2008; MCGARVEY E CROTEAU, 1995)

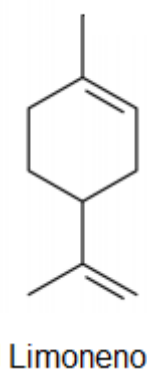
Os monoterpenos são compostos por apenas duas unidades isoprênicas, podendo se apresentar na forma monocíclica, bicíclica ou acíclica. Os mesmos são derivados da via de síntese do mevalonato das plantas, constituindo os componentes primários de óleos essenciais, eles possuem uma baixa massa



molecular e geralmente apresentam a característica de serem voláteis. Os monoterpenos têm sido empregados em diversas áreas, como em indústrias de perfumes, fragrâncias, na culinária e na produção de especiarias, sendo conhecidos hoje mais de 1000 monoterpenos (HUDES *et al.*, 2000; GOUL, 1997). Desse grupo destaca-se o limoneno, por apresentar potenciais atividades biológicas, incluindo atividade quimiopreventiva e quimioterápica contra alguns tipos de câncer (CERDA *et al.*, 1999).

O limoneno (4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno), apresentado na Figura 4, é o monoterpeno monocíclico mais simples, fazendo parte da estrutura de mais de 300 vegetais, é encontrado em óleos de frutos cítricos, como laranja e limão, e em outras plantas. O limoneno é formado pela ciclização de geranilpirofosfato, em uma reação catalisada por limoneno-sintase (CROWELL, 1999), servindo como um precursor para uma série de outros monoterpenos monocíclicos oxigenados (MCGARVEY E CROTEAU, 1995; HUDES, 2000).

**Figura 4.** Estrutura do limoneno.



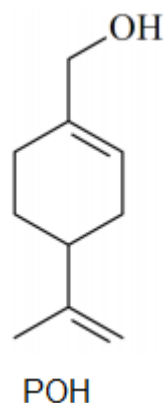
O limoneno possui eficácia na prevenção e no tratamento do câncer, apresentando atividade nos estágios de iniciação e progressão da carcinogênese (CHOW *et al.*, 2002). Foi demonstrado que o limoneno consegue inibir a via de sinalização requerida para o crescimento, proliferação celular e apoptose (GELB *et al.*, 1995; NAKADA *et al.*, 2007). As atividades antitumorais do limoneno já foram demonstradas em alguns tipos de câncer, como o câncer de mama, de pâncreas, entre outros (GOUL, 1997). Alguns estudos que relataram promissora atuação do limoneno como um antitumoral, apresentaram problemas em relação a alta dosagem

necessária para obter os efeitos anticarcinogênicos (1000 mg/Kg/dia e 1200 mg/Kg/dia). Dessa forma outros monoterpenos derivados do limoneno começaram a ser pesquisados, em especial o álcool perílico (POH) (BOIK, 2001; CROWELL *et al.*, 1994).

### 1.3. Álcool perílico

O álcool perílico (POH), chamado também de p-menta-1,8-dieno-7-ol, Figura 5, é um monoterpeno monocíclico hidroxilado do limoneno, formado pela condensação de duas unidades isoprênicas. O POH é encontrado em óleos essenciais de diversas plantas e frutos cítricos, incluindo hortelã, cerejas, lavandas, capim-limão, sementes de aipo, gengibre, sálvia e entre outros (STEARNS *et al.*, 2004; YERUVA *et al.*, 2007).

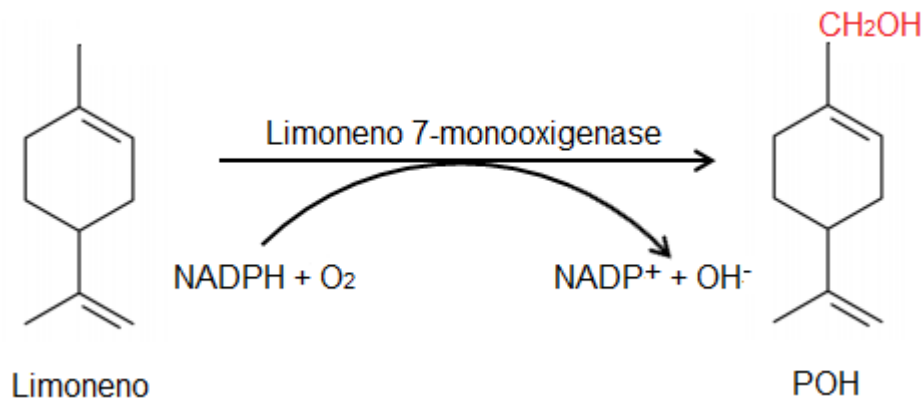
**Figura 5.** Estrutura do POH.



O POH é oriundo de uma rota onde ocorre a substituição do componente metila do limoneno, por meio da ação enzimática da 7 – monooxigenase (Figura 6). Há relatos na literatura que essa biotransformação do limoneno ao POH pode ocorrer por diferentes meios, sendo eles:

- Leveduras;
- Fungos filamentosos: *Penicillium digitatum*, *Aspergillus cellulosa* (NOMA *et al.*, 1992), *Mortierella minutíssima* (TRYTEK & FIEDUREK, 2005);
- Bactérias: *Pseudomonas* (DHAVALIKAR & BHATTACHARYYA, 1966), *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas putida* (JUNIOR & POSTORE, 2007).

**Figura 6.** Biotransformação do limoneno em POH pela ação da enzima limoneno-7 monooxigenase.



(Adaptado de OLIVEIRA, 2010)

Estudos foram realizados sobre o limoneno e o POH, e com isso foi verificado que o limoneno e o POH se comportavam de maneiras semelhantes, em relação a sua metabolização, tanto em ratos como em humanos. Porém em relação a atividades testadas sobre proliferação celular, o POH se mostrou mais eficaz. Dessa forma o POH começou a ser visado como um bom candidato para tratamentos terapêuticos para o câncer (CROWELL *et al.*, 1994).

Muitos são os estudos que foram e estão sendo conduzidos a respeito das atividades do POH, o mesmo já se mostrou muito eficaz frente a diversos tipos de tumores, agindo na inibição de alguns estágios da carcinogênese e com propriedades preventivas contra alguns tipos de câncer (JUNIOR & POSTORE, 2007; STEARNS *et al.*, 2004). Existem relatos, onde o POH previne tumores de fígado, mama e pulmão. E também é relatado que com o uso do POH é possível promover redução no nível de rejeição em casos de transplantes (YERUVA *et al.*, 2007).

Muitas são as atividades antitumorais descritas a respeito do POH, como por exemplo, ele apresenta atividade antitumoral em tumores de pulmão, cólon, fígado, pâncreas, mama, adenocarcinoma (YERUVA *et al.*, 2007; ELEGBEDE *et al.*, 2003; WISEMAN *et al.*, 2007), cerebrais (YURI *et al.*, 2004; FONSECA *et al.*, 2007), células leucêmicas (CLARK *et al.*, 2002), e também apresentou eficácia clínica em gliomas malignos (FONSECA *et al.*, 2007).

O POH apresenta atividades na inibição de proliferação de células tumorais de glioblastoma multiforme (FONSECA *et al.*, 2007), de pulmão (XU *et al.*, 2004), de

mama (YURI *et al.*, 2004), de fígado (MILLS *et al.*, 1995) e de células de pele (BARTHELMAN *et al.*, 1998).

Os mecanismos exatos para explicar as atividades do POH ainda não foram bem elucidadas, porém já foram descritos algumas de suas atividades frente às células tumorais, como:

- Causar parada do ciclo celular na fase  $G_0 / G_1$  (YERUVA *et al.*, 2007);
- Regular a expressão de genes (YERUVA *et al.*, 2007);
- Induzir apoptose (STEARNS *et al.*, 2004; YERUVA *et al.*, 2007);
- Inibição da fosforilação da quinase ERK (*extracellular regulated kinase*) (FONSECA *et al.*, 2007);
- Inibição da angiogênese (LOUTRARI *et al.*, 2004; FONSECA *et al.*, 2007);
- Inibir metástase em células de glia (BALASSIANO *et al.*, 2002);
- Inibir enzimas de prenilação (GELB *et al.*, 1995);
- Alterar citoesqueleto em células de adenocarcinoma (CERDA *et al.*, 1999);
- Inibição da reparação do DNA (YERUVA *et al.*, 2007).

Já existem estudos clínicos que estão em testes de fases I e II, com ensaios de administração oral do POH para pacientes com tumores sólidos, variando de 3 a 4 doses diárias, com administração de até 11g/dia (AZZOLI *et al.*, 2003; BAILEY *et al.*, 2004; FONSECA *et al.*, 2003; FONSECA, 2003; STEARNS *et al.*, 2004; YERUVA *et al.*, 2007). Porém em todos os estudos foram relatados efeitos colaterais, envolvendo o trato gastrointestinal (com náuseas, vômitos, diarreia e refluxo gastroesofágico), fadiga e hipocalcemia (MORGAN-MEADOWS *et al.*, 2003; STEARNS *et al.*, 2004).

Devido aos resultados e efeitos colaterais obtidos, um grupo de pesquisa realizou um estudo clínico de fase I e II com a administração do POH na forma inalatória, em pacientes com gliomas malignos, sendo que os resultados obtidos sugerem uma atividade antitumoral interessante nos casos de pacientes portadores de gliomas recidivante, além da redução dos efeitos colaterais, pois apenas houveram algumas reclamações nas primeiras inalações, de cefaléia e ardência nas vias aéreas superiores (FONSECA *et al.*, 2007).

As buscas por melhores formas de administração do POH estão sendo investigadas, uma vez que essa substância se mostrou tão promissora. Outra alternativa que poderia melhorar essas condições, tanto da adesão ao tratamento

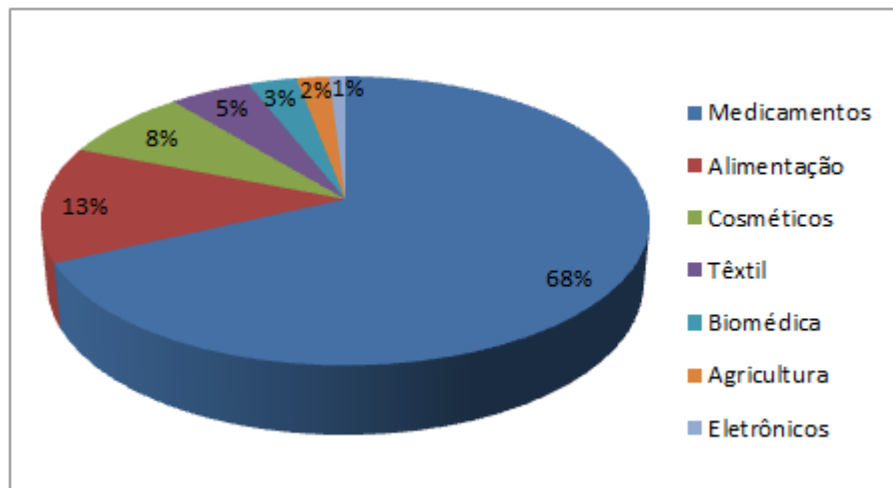
como a eficácia, é a incorporação do POH a nanotecnologia farmacêutica, pois assim as doses administradas poderiam ser reduzidas, assim como os efeitos colaterais.

#### 1.4. Nanotecnologia Farmacêutica

Nanotecnologia é considerada uma tecnologia que possui o objetivo de desenvolver novos sistemas funcionais que se encontrem em escala nanométrica (inferiores a 1  $\mu\text{m}$ ), à nível de átomos e moléculas, melhorando ou criando novas características com as modificações realizadas, sejam elas físico-químicas ou biológicas (SAFARI & ZARNEGAR, 2014).

O conceito de nanotecnologia foi introduzido em 1960, por Richard Feynman, a partir disso a nanotecnologia começou a ganhar destaque em diversas áreas. As pesquisas incluindo a nanotecnologia estão envolvidas no avanço de áreas como engenharia, química, física, robótica, biologia, medicina e entre outras. Na Figura 7 é possível verificar a distribuição dos campos onde é mais aplicada a nanotecnologia, sendo observado claramente que a maior área de concentração está relacionada aos medicamentos (SAFARI & ZARNEGAR, 2014; MARTINS *et al.*, 2014).

**Figura 7.** Representação da distribuição da aplicação da nanotecnologia por área.



(Adaptado de MARTINS *et al.*, 2014)

Como pode ser observado, a maior parte da utilização da nanotecnologia está relacionada aos medicamentos, sendo que muitos dos resultados obtidos são oriundos da área farmacêutica. Nessa área o foco dos estudos está concentrado no

desenvolvimento de nanocarreadores, utilizados tanto para cosméticos como para medicamentos (ZANETTI-RAMOS & CRECZYNSKI, 2008).

Quando um medicamento é utilizado, espera-se dele algumas características, por exemplo, que o mesmo alcance as concentrações adequadas nos tecidos, com uma atividade terapêutica efetiva por um longo período, e que não apresente toxicidade para os demais tecidos. Porém essas características são muito difíceis de serem encontradas em um mesmo medicamento, dessa forma a nanotecnologia farmacêutica vem surgindo como uma esperança para alcançar essas características (MOURA *et al.*, 2008).

Entre as tecnologias empregadas com os fármacos, a nanoencapsulação pode ser citada como uma das mais interessantes e promissoras, pois permite tanto a utilização de materiais líquidos como sólidos. De uma maneira geral, a nanoencapsulação busca uma liberação controlada e com direcionamento do fármaco para determinados grupos de células, e que os sistemas possam carrear quantidades adequadas de fármaco para o local desejado, reduzindo os efeitos colaterais sobre outros tecidos, o que auxilia na adesão dos tratamentos pelos pacientes (ARAKI, 2007; SAFARI & ZARNEGAR, 2014).

Os sistemas de nanocarreadores que estão sendo desenvolvidos oferecem muitas vantagens, quando comparadas aos sistemas convencionais, como por exemplo, possuem:

- Maior eficácia terapêutica;
- Liberação progressiva e controlada do fármaco;
- Diminuição da toxicidade;
- Maior tempo de permanência do fármaco na circulação;
- Administração segura e conveniente;
- Direcionamento a alvos específicos e
- Possível incorporação tanto de substâncias hidrofílicas como lipofílicas (SILVA, 2012).

Os sistemas que se destacam nessa área são chamados de carreadores coloidais, os quais se apresentam de forma interessante para administração intravenosa de fármacos lipofílicos, e também para administração via oral e cutânea. Dentro desse sistema estão inclusos: nanoemulsões, nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas e complexos lipídicos. As nanopartículas (nanoesferas ou nanocápsulas)

destacam-se dos demais tipos devido aos seus potenciais terapêuticos e por sua maior estabilidade, tanto em fluídos biológicos quanto na questão de armazenamento (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007).

#### 1.4.1. Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas podem ser definidas como sendo sistemas carreadores de fármacos, que apresentam um tamanho menor que 1000 nm, sendo compostas de polímeros e copolímeros biodegradáveis ou bioestáveis. As nanopartículas poliméricas possuem grande destaque principalmente pelas características que os polímeros apresentam, colaborando com o potencial de carreamento de fármacos (SAFARI & ZARNEGAR, 2014).

Os polímeros são macromoléculas compostas de moléculas pequenas ligadas umas às outras para formar estruturas lineares, ramificadas e/ou ligações cruzadas, que podem formar partículas poliméricas capazes de conter substâncias no seu interior. Os polímeros que são utilizados na área da nanotecnologia farmacêutica, com intuito de carrear fármacos, devem apresentar algumas características especiais, tanto químicas, quanto mecânicas e biológicas, como apresentado na Tabela 3 (ANGELOVA & HUNKELER, 1999; SAFARI & ZARNEGAR, 2014).

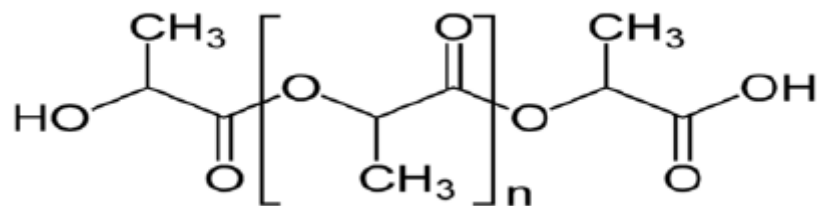
**Tabela 3.** Características dos polímeros.

<b>Química</b>	Ausência de interação entre polímero e fármaco
	Solubilidade em vários solventes
	Vida útil economicamente aceitável
<b>Biológica</b>	Ser biodegradável (via enzimática, química ou microbiana)
	Proteger o fármaco <i>in vivo</i> contra possíveis degradações
	Levar a substância contida em seu interior até o alvo desejado
	Facilitar a penetração celular do fármaco
<b>Mecânica</b>	Liberar o fármaco de maneira controlada, prolongando sua ação
	Versatilidade estrutural de aplicação
	Apresentar capacidade de ser moldado e/ou deformado
	Resistência mecânica para atender às necessidades de aplicações

(ANGELOVA & HUNKELER, 1999; SAFARI & ZARNEGAR, 2014)

Os polímeros podem ser de origem natural, semi-sintética ou sintética. Dentre os sintéticos destacam-se os poliésteres, como o poli (L-ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PLG) e seus copolímeros, como o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA). O PLA, Figura 8, é um polímero comumente utilizado por apresentar boas características, sendo biodegradável e não apresentando subprodutos tóxicos. É obtido por meio do ácido láctico, apresenta isômeros opticamente ativos (D e L) ou uma mistura racêmica dos mesmos (NAJAFI *et al.*, 2012). Quando ocorre a degradação do PLA, é gerado ácido láctico, o qual é metabolizado em piruvato pela lactato desidrogenase, o que leva a sua eliminação via ciclo de Krebs, em forma de dióxido de carbono e água (BRANNON-PEPPAS, 1995).

**Figura 8.** Estrutura química do poli (L-ácido láctico) – PLA



n = número de unidades formadoras

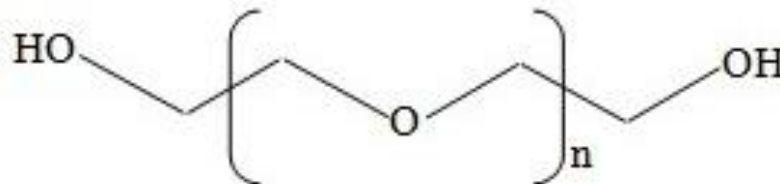
Também pode ser utilizado a adição de polímeros hidrofílicos às superfícies das nanopartículas, essa adição está sendo empregada com a finalidade de reduzir a adsorção de proteínas plasmática, e evitar que ocorra uma rápida remoção da circulação sanguínea após administração intravenosa (OWENS III & PEPPAS, 2006). E entre os polímeros utilizados com intuito de fazer com que as nanopartículas permaneçam por mais tempo na circulação, podem ser citados o polietilenoglicol (PEG), poli (vinilpirrolidona) (PVP), estreptavidina, poli-L-lisina (PLL), polietilenos (KUMARI *et al.*, 2010).

Dentre os polímeros acima citados, o PEG (Figura 9) é o que vem sendo mais utilizado, sendo o mesmo um polímero aniônico que apresenta cadeias hidrofílicas flexíveis, com capacidade de interagir com a superfície das nanopartículas de modo a formar uma barreira estérica (CANAL *et al.*, 2010). O PEG apresenta solubilidade aquosa, baixa imunogenicidade e antigenicidade, e as nanopartículas que contém o PEG podem ser denominadas furtivas, pois a presença do PEG faz com que não



haja reconhecimento pelo sistema fagocítico mononuclear, o que promove um maior tempo de circulação sanguínea, e acarreta em uma liberação em locais específicos (GREF *et al.*, 1995; MAINARDES *et al.*, 2010).

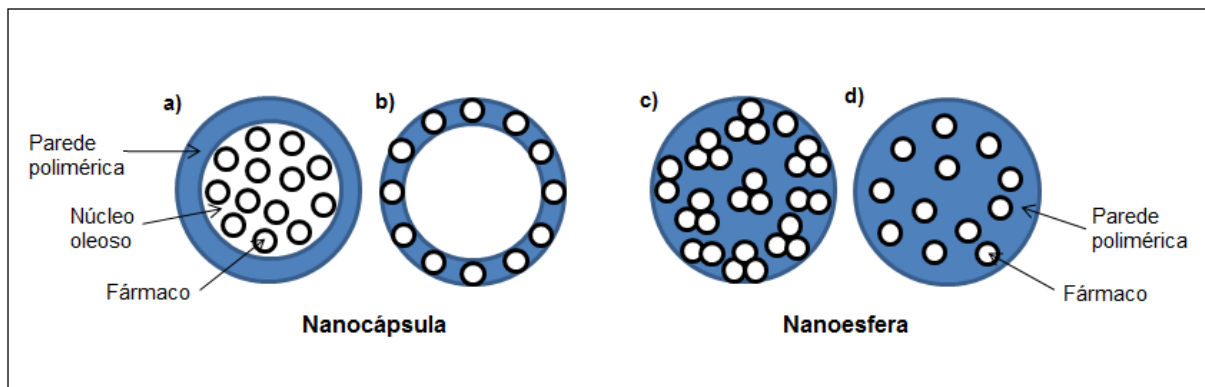
**Figura 9.** Estrutura química do polietilenoglicol – PEG



n = número de unidades formadoras

As nanopartículas podem ser divididas em duas classes, sendo elas as nanocápsulas e as nanoesferas, que são diferenciadas de acordo com a sua organização estrutural e a sua composição, conforme é demonstrado na Figura 10. As nanocápsulas são sistemas vesiculares em que há um núcleo oleoso rodeado por uma membrana polimérica, sendo que o fármaco pode estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas são sistemas matriciais em que o fármaco é fisicamente aprisionado na matriz, ou uniformemente adsorvido na estrutura polimérica (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

**Figura 10.** Representação esquemática de nanocápsula e nanoesfera. Em a) Fármaco retido no núcleo oleoso, b) Fármaco adsorvido na superfície polimérica, c) Fármaco disperso na matriz polimérica e em d) fármaco adsorvido à superfície da matriz polimérica.



(Adptado de SCHAFFAZICK *et al.*, 2003)

Os métodos descritos na literatura para preparação das nanopartículas poliméricas podem ser divididos em duas classes principais: métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilato de alquila) ou na

precipitação de polímeros pré-formados (PLA, PLGA) (LEGRAND *et al.*, 1999). A polimerização apresenta a desvantagem de poder apresentar moléculas residuais que possam causar toxicidade, sendo então o método de escolha o que utiliza os polímeros pré-formados, pois não há presença de solvente no produto final (REIS *et al.*, 2006).

Um dos métodos que faz parte da classe que utiliza os polímeros pré-formados é a emulsificação/evaporação do solvente, sendo essa a primeira técnica descrita para obtenção de nanopartículas e a mais amplamente utilizada (VANDERHOFF *et al.*, 1979). Essa técnica possui uma grande vantagem, pois é possível realizar a encapsulação tanto de fármacos hidrofílicos, pela emulsão dupla água-em-óleo-em-água (A/O/A), quanto de fármacos hidrofóbicos, por meio da emulsão simples óleo-em-água (O/A) (HANS & LOWMAN, 2002; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Porém, independente do método que for utilizado para obtenção das nanopartículas, os produtos formados ficam em forma de suspensões coloidais aquosas, e dependendo do tempo de armazenamento pode ocorrer agregação das nanopartículas no meio, podendo acarretar em problemas de estabilidade química dos componentes da formulação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Para realizar a caracterização físico-química das nanopartículas são necessárias determinações de diversos parâmetros, os quais são muito importantes para avaliação da estabilidade das formulações (LEGRAND *et al.*, 1999). Um conjunto de técnicas associadas permite que seja realizado uma boa caracterização das nanopartículas, sendo comumente empregadas as seguintes técnicas:

- Análise morfológica: microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Distribuição de tamanho: espectroscopia de correlação de fótons;
- Caracterização da superfície das nanopartículas: potencial zeta;
- Determinação da concentração de fármaco associado;
- Separação baseada em ultracentrifugação: previsão da cinética de liberação (LEGRAND *et al.*, 1999).
- Avaliação se o fármaco está associado a nanoestrutura: calorimetria diferencial exploratória (DSC), termogravimetria (TG), difração de raio-x

(DRX) e espectroscopia na região do infravermelho (IV) (COUVREUR *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

#### **1.4.2. Aplicação das nanopartículas no tratamento do câncer**

No âmbito da nanomedicina, um dos campos mais promissores na utilização das nanopartículas está relacionado ao carregamento em especial de fármacos anticancerígenos. Dessa forma a nanotecnologia vêm ganhando destaque na área oncológica, pois a mesma surge como uma nova opção para a cura da doença ou no reparo de tecidos danificados. As possíveis aplicações da nanotecnologia nessa área podem envolver:

- Prevenção e controle do câncer;
- Detecção precoce do câncer;
- Melhoria nas técnicas de imagem, para uma localização mais exata do tumor;
- Carreamento de medicamentos eficazes para lugares específicos;
- Controle da disseminação de células cancerígenas (ALEXIS *et al.*, 2008).

A esperança por resultados melhores utilizando a nanotecnologia tem um foco nas melhores condições de tratamentos contra o câncer, pois com a manutenção dos níveis do fármaco pode ocorrer a redução das doses, com conseqüente redução dos efeitos colaterais que ocorrem nos tratamentos convencionais, otimizando dessa maneira a utilização e a adesão do paciente ao tratamento (BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2004).

Assim as nanopartículas poliméricas estão se apresentando como um dos mais eficazes modelos de nanocarreadores para quimioterápicos, pois elas podem possuir uma superfície funcional para células cancerígenas e um sistema que permite aumentar o tempo de meia vida do fármaco (ALEXIS *et al.*, 2008).

Em 2012 já estavam no mercado algumas formulações carregando quimioterápicos, que demonstram ser mais eficazes que os fármacos livres, mas grande parte eram os lipossomas, conforme pode ser observado nos dados da Tabela 4. Existem muitas formulações que já encontram-se em fases de estudos clínicos, inclusive muitas de nanopartículas poliméricas (EGUSQUIAGUIRRE *et al.*, 2012).

**Tabela 4.** Sistemas carreadores no mercado em 2012.

<b>Nanocarreador</b>	<b>Nome</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Indicação</b>
Lipossomas	Doxil®	Doxorrubicina	Câncer cerebral, câncer de ovário, sarcoma de kaposi
	Myocet®	Doxorrubicina	Câncer cerebral
	DaunoXome®	Daunorrubicina	Sarcoma de kaposi
	DepoCyt®	Citarabina	Leucemia, Meningite linfomatosa, glioblastoma
Nanopartículas Poliméricas	Abraxane®	Paclitaxel	Câncer cerebral
Micelas poliméricas	Genexol – PM ®	Paclitaxel	Câncer cerebral

(Adaptado de EGUSQUIAGUIRRE *et al.*, 2012)

No entanto, ainda existem muitos desafios e barreiras para serem superadas para alcançar a formulação ideal, em termos de seletividade e segurança. Pois mesmo com muitas pesquisas e desenvolvimento em nanotecnologia, apenas alguns sistemas de liberação de nanopartículas foram aprovados e estão disponíveis para o tratamento do câncer. Portanto, uma investigação mais aprofundada no campo da nanotecnologia e no campo do estudo da própria doença em si, é necessário para realizar formulações capazes de atingir tecidos tumorais em concentrações adequadas e conseguir uma formulação realmente seletiva, que consiga destruir apenas as células cancerosas, sem prejudicar os tecidos saudáveis (ACHARYA & SAHOO, 2011; EGUSQUIAGUIRRE *et al.*, 2012).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade citotóxica *in vitro* de nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH.

### 2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para análise quantitativa do POH em nanopartículas de blendas de PLA-PEG;
- Produzir nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH pelo método de simples emulsão-evaporação do solvente;
- Determinar a eficiência de encapsulação do POH nas nanopartículas;
- Realizar a caracterização físico-química das nanopartículas;
- Avaliar a estabilidade das nanopartículas de blendas de PLA – PEG contendo POH;
- Determinar o perfil de liberação do fármaco *in vitro*;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* das nanopartículas de blendas de PLA – PEG contendo POH sobre eritrócitos;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* das nanopartículas de blendas de PLA – PEG contendo POH sobre a linhagem tumoral HEp-2.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para determinação de POH em nanopartículas**

Com o objetivo de padronizar um método de quantificação do POH, foi desenvolvida uma metodologia analítica pelo aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) – Waters® Alliance acoplado à um detector de Arranjo de Fotodiodo (PDA) e coluna fase reversa C18 (125 mm X 4mm) de tamanho de partícula 5 µm – LiChrospher®, atendendo as exigências preconizadas na Resolução nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e as recomendações da *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005).

##### **3.1.1. Preparação das soluções padrão e amostra**

Uma solução estoque de POH (Sigma – Aldrich®) de 1mg/mL (pesado em Balança analítica M214A – Tecnal®) foi preparada em mistura de acetonitrila grau HPLC - J.T. Baker® (ACN):água ultrapura - sistema Milli-Q Gradiente Millipore®, resistividade de 18,2 MΩ/cm (40:60, v/v), sendo realizadas diluições posteriores para se obter seis soluções padrão (10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL). A partir de outra solução estoque (1mg/mL) foram obtidas seis soluções padrão (0,4, 0,6, 0,8, 1, e 2 µg/mL), para determinar o limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD). Os padrões e as amostras foram filtrados com membranas de acetato de celulose 0,22 µm e PTFE 0,45 µm, Millipore®.

##### **3.1.2. Condições Cromatográficas**

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando o modo isocrático. A fase móvel foi composta por ACN e água (80:20, v/v) em fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção de amostra foi de 100 µL e o comprimento de onda de detecção foi de 210 nm. O tempo de corrida do método foi de 2,5 min e todos os experimentos foram realizados a 30°C.

### 3.1.3. Validação do método cromatográfico

A validação do método analítico de quantificação de POH por CLAE, foi realizada seguindo alguns parâmetros, sendo eles: linearidade, precisão, exatidão, especificidade, robustez, LQ e LD.

#### 3.1.3.1. Linearidade

Para a linearidade foram preparadas seis concentrações padrão de POH (10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL) em ACN:água (40:60, v/v), em triplicata, as quais constituíram a curva analítica para a análise. Assim, a linearidade do método foi determinada com base no cálculo de regressão linear, empregando mínimos quadrados, onde os valores correspondentes da área sob a curva foram utilizados para o cálculo da equação da reta e do coeficiente de correlação (r).

#### 3.1.3.2. Precisão

A capacidade de um método de obter os resultados dos testes individuais aproximados, quando realizados várias vezes de uma mesma amostra e nas mesmas condições, é chamado de precisão. É possível comprovar a precisão por dois métodos: intra-corrída (repetibilidade) e inter-corrída (precisão intermediária).

A precisão intra-corrída foi realizada com três concentrações padrão (10, 30 e 60 µg/mL) em quintuplicata, avaliadas em um mesmo dia e em curto espaço de tempo entre as leituras. E a precisão inter-corrída foi realizada da mesma forma, com três concentrações padrão (10, 30 e 60 µg/mL) em quintuplicata, porém, em três dias diferentes. A precisão do método foi verificada pelo percentual coeficiente de variação (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR), seguindo a seguinte equação:

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100$$

Equação 1.

Onde:

DP, desvio padrão

CMD, concentração média determinada

### 3.1.3.3. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos nas análises com os valores verdadeiros, sendo expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (porcentagem de recuperação das médias). Foram preparadas três concentrações padrão (10, 30 e 60 µg/mL), em quintuplicata. Após as análises foi realizado os cálculos correspondentes a porcentagem de recuperação para cada concentração, pela seguinte equação:

$$\text{Exatidão} = (\text{CME} / \text{CT}) \times 100$$

Equação 2.

Onde:

CME, concentração média experimental

CT, concentração teórica

### 3.1.3.4. Especificidade

A especificidade é determinada como uma característica que o método analítico possui em não permitir que componentes da formulação interfiram na determinação do analito. Dessa maneira, a especificidade foi avaliada com os possíveis interferentes, o álcool polivinílico (PVA; Sigma®) e o tampão fosfato de sódio (PBS) pH=7,4 (Fosfato de sódio dibásico heptahidratado P.A. - Vetec®; Fosfato de sódio monobásico anidro P.A. - Vetec®; Cloreto de sódio - Vetec®).

Foram realizadas análises de amostras contendo os possíveis interferentes, e verificado o cromatograma e tempo de retenção, comparando-os com os das amostras de POH.

### 3.1.3.5. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. E para testar a capacidade do método analítico desenvolvido em ser robusto, as seguintes variações foram realizadas: alteração da proporção da



fase móvel (de ACN:água 80:20 para 75:25), alteração do fluxo de vazão da fase móvel (de 1,0 mL/min para 1,05 e 0,95 mL/min), alteração de temperatura da coluna (de 30°C para 25°C).

O resultado foi determinado por meio da porcentagem de recuperação e DPR. Para estas análises foram utilizados os padrões de POH nas concentrações de 10, 30 e 60 µg/mL, em triplicata.

### 3.1.3.6. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD é a menor quantidade de analito que pode ser detectado em uma amostra, não necessariamente sendo quantificado, já o LQ é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão. Para a determinação do LD e LQ foram preparadas concentrações padrão (0,4; 0,6; 0,8; 1 e 2 µg/mL), em triplicata, e construída uma curva analítica. O LD e LQ foram calculados pelas equações 3 e 4 :

$$LD = \sigma/b \times 3,3$$

Equação 3.

$$LQ = \sigma/b \times 10$$

Equação 4.

Onde:

$\sigma$ , desvio padrão médio do intercepto y

b, inclinação da curva analítica ou slope

## 3.2. Obtenção de nanopartículas contendo POH

A técnica utilizada para a obtenção das nanopartículas contendo POH foi a emulsificação/evaporação do solvente, pelo método de emulsão simples óleo em água (O/A) (VANDERHOFF *et al.*, 1979; REIS *et al.*, 2006).

A fase orgânica foi composta por 50 mg de PLA (85-160 MW; Sigma®), 10 mg de PEG 10 kDa (Sigma®) solubilizados em 1 mL de diclorometano (DCM, Fmaia®; Capela de fluxo laminar – Lucadema), e 10 mg de POH também solubilizados em 1 mL de DCM, e a fase aquosa foi composta por 10 mL de PVA 1%. A fase oleosa foi

acrescentada a fase aquosa, onde as fases foram submetidas à emulsificação e redução do tamanho pelo método de sonicação (Dispensor Ultrasônico; Unique®), por 4 minutos à 60 Hz, resultando em uma emulsão óleo em água (O/A). O solvente orgânico foi removido com o auxílio do evaporador rotatório (Tecnal®, Mod. TE 120); acoplado a bomba a vácuo (Tecnal®, Mod. TE 058), à pressão negativa, por 15 min à 37°C. As nanopartículas vazias (sem POH) foram produzidas da mesma forma, com exceção da adição de POH.

A recuperação das nanopartículas foi realizada por meio de ultracentrifugação (Centrífuga refrigerada Hermle - LOBOV® Científica), 14000 rpm à 4°C, e o pellet de nanopartículas resultantes foram lavadas com água purificada, com intuito de remover o tensoativo e o POH não encapsulado. O sobrenadante obtido foi reservado para posterior análise por CLAE. As nanopartículas foram armazenadas em água ou sacarose 5% (D+) Sacarose P.A. - Vetec Química Fina®), refrigeradas à 8°C.

### **3.3. Caracterização físico-química das nanopartículas**

#### **3.3.1. Determinação da eficiência de encapsulação**

A determinação da eficiência de encapsulação (EE%) foi realizada pelo método indireto, o qual quantifica quanto de POH há no sobrenadante resultante do processo de ultracentrifugação/lavagem, pelo método validado por CLAE. Uma alíquota do sobrenadante foi retirada e diluída (1:10), em triplicata, em ACN:água (40:60, v/v) e analisadas. Após as análises a EE% foi determinada pela seguinte equação:

$$EE\% = [(POH\ inicial - POH\ livre) / POH\ inicial] \times 100$$

Equação 5.

Onde:

POH inicial, concentração de POH inicial na formulação

POH livre, concentração de POH no sobrenadante

Os resultados da EE% foram expressos como média e desvio padrão, considerando n=10 amostras.

### **3.3.2. Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão**

Para a determinação do diâmetro médio e o índice de polidispersão foi utilizado a espectroscopia de correlação de fótons ou *Dynamic Light scattering* (Brookhaven 90 Plus®);

Foram preparadas diluições das suspensões das nanopartículas em água purificada (1:20) e as mesmas foram acondicionadas em uma cubeta com tampa. As análises foram realizadas com ângulo de espalhamento de 90°, à 25°C e comprimento de onda do laser de 659 nm. Todos os lotes foram analisados em triplicata. Os resultados do diâmetro médio e do índice de polidispersão foram expressos como média e desvio padrão, com n=10 amostras.

### **3.3.3. Potencial zeta**

As amostras foram preparadas em água purificada, uma alíquota da suspensão das nanopartículas foi diluída em água e acondicionadas em célula eletroforética, sendo então o potencial zeta determinado por meio do aparelho ZetaSizer (ZS - Malvern®). As análises foram realizadas à 25°C em ângulo de 90°. Os valores determinados de potencial zeta foram expressos como média e desvio padrão. A análise foi realizada em triplicata.

### **3.3.4. Espectroscopia da região do infravermelho (IV)**

A caracterização físico-química na região do infravermelho foi realizada do POH livre, do polímero (PLA-PEG) e da nanopartícula contendo o POH. As amostras (POH livre, nanopartículas com e sem POH) foram compactadas com brometo de potássio (KBr), e por meio da compressão em prensa hidráulica foram obtidas pastilhas, as quais foram submetidas à análise no espectrofotômetro na região do infravermelho (Termoelectron Nicolet IR200 FT-IR - Thermo Scientific®) no intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ;

### **3.3.5. Difração de Raios X (DRX)**

Foram realizadas análises de amostra do POH nanoencapsulado, assim como das nanopartículas vazias. A análise foi realizada no difratômetro de Raios X (Bruker – Mod. D2 PHASER), utilizando radiação de  $\text{CuK}\alpha$ ,  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ , com corrente de 10 mA e tensão de 30 kV à temperatura ambiente. Os dados foram digitalizados a partir de  $5^\circ$  para  $60^\circ$  em um ângulo de  $2\theta$ .

### **3.3.6. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

Para análise de DSC foram preparadas amostra do POH nanoencapsulado e dos polímeros (nanopartículas vazias). As amostras foram analisadas no analisador de termogravimetria e calorimetria diferencial exploratória (TA Instruments®, Mod. SDT Q600), sendo que as amostras foram pesadas em cadinho de alumínio (10 mg), seladas e submetidas a aquecimento sob atmosfera de nitrogênio, com variação de 30 - 450 °C, razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  e vazão de gás de arraste de 100mL/min. A célula de DSC foi calibrada antes dos ensaios no eixo de temperatura utilizando padrões de zinco, oxalato de cálcio e safira.

### **3.3.7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

As análises morfológicas das suspensões de nanopartículas contendo POH foram realizadas pela microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizando 80 kV. As suspensões de nanopartículas foram depositadas em suportes de cobre, esperado 1 min, retirado o excesso, e em seguida foram contrastadas negativamente com solução de acetato de uranila a 2% (m/v) por 1 min, e também foi retirado o excesso, esperado secar e realizada a análise.

## **3.4. Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo POH**

As nanopartículas após o preparo foram ressuspensas em água purificada, e em seguida foram aliquotadas e armazenadas à temperatura ambiente, refrigeradas à  $8^\circ\text{C}$  e congeladas à  $-12^\circ\text{C}$ . As amostras foram caracterizadas após o preparo e em intervalos de 7 dias, até completar 3 meses de armazenamento. As análises

consistiram quanto a taxa de liberação do POH das nanopartículas, potencial zeta, diâmetro médio das nanopartículas e índice de polidispersão, assim como as características macroscópicas das formulações. Sendo uma alíquota retirada da suspensão para realizar a mensuração do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta, em seguida as amostras foram centrifugadas à 14000 rpm por 15 min, onde o sobrenadante foi analisado por CLAE para mensurar a porcentagem de liberação do POH, então as nanopartículas foram ressuspensas em água e armazenadas novamente na temperatura pré determinada.

O estudo foi realizado em triplicata e as comparações estatísticas foram realizadas pela ANOVA com 95% de confiança, com pós teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com  $p < 0,05$ .

### **3.5. Determinação do perfil de liberação *in vitro***

As nanopartículas contendo POH foram submetidas ao estudo de liberação *in vitro* pelo método de agitação em shaker, com posterior ultracentrifugação. Amostras contendo 500 µg de POH encapsulado foram diluídas em 1,5 mL de solução tampão PBS 10mM, pH=7,4. As dispersões de nanopartículas em tampão PBS foram incubadas em agitador do tipo shaker à 37°C, sob agitação constante de 150 rpm. Nos tempos pré-determinados (2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 196 h) as dispersões foram ultracentrifugadas por 15 min à 14000 rpm, 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e analisados por CLAE. O precipitado restante foi ressuspenso em 1,5 mL de tampão PBS e retornado à agitação (CASA *et al.*, 2014).

Com os resultados obtidos dos sobrenadantes, foi possível obter a curva do percentual cumulativo de fármaco liberado em função do tempo.

A avaliação matemática do perfil de liberação obtido foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo de ordem zero (Equação 6), de primeira ordem (Equação 7), segunda ordem (Equação 8), Higuchi (Equação 9), além do modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas (Equação 10), por meio do software *MicroMath Scientist*® (RITGER & PEPPAS, 1987).

$$C = kt$$

Equação 6.

$$C = 100 (1 - e^{-kt})$$

Equação 7.

$$C = 100 [1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$$

Equação 8.

$$C = k \sqrt{t}$$

Equação 9.

$$F_t = at^n$$

Equação 10.

Onde:

C, percentual do fármaco dissolvido no tempo t;

k,  $\alpha$  e  $\beta$ , constantes cinéticas de dissolução e

A e B, concentrações iniciais do fármaco que contribuem para os dois momentos de dissolução do fármaco.

$F_t$ , fração do fármaco dissolvido no tempo t;

a, constante que mostra as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica

n, expoente de liberação que indica o mecanismo que essa ocorre.

### **3.6. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA-PEG contendo POH sobre hemácias**

O protocolo de experimento da avaliação de citotoxicidade frente a hemácias humanas foi aprovado pelo Comitê de Ética Humana da Universidade Estadual do Centro-Oeste, sob registro nº 840.169/2014 (Anexo 1).

Foram coletados 5 mL de sangue de três indivíduos voluntários saudáveis, acima de 18 anos. O sangue coletado foi adicionado em tubo de vidro contendo 10  $\mu$ L de heparina sódica (Hipolabor®) e homogeneizado. Em seguida foi centrifugado por 10 min a 2500 rpm, e o plasma resultante descartado. As hemácias foram lavadas, por três vezes, com solução de tampão PBS 10 mM, pH=7,4 acrescidos de glicose (1,08 mg/mL) e os antibióticos penicilina - Sigma-Aldrich® (0,3 mg/mL) e estreptomicina - Sigma-Aldrich® (0,5 mg/mL). Ao final da terceira lavagem as hemácias foram

ressuspensas em PBS 10 mM, pH 7,4 acertando-se o volume globular para 2% (SILVA *et al.*, 2000).

Para o ensaio foi utilizado uma suspensão de hemácias à 2%, e incubadas por 24, 48 e 72 h, a temperatura de 37°C, sob constante homogeneização. Foram realizados controles com água destilada, PBS 10 mM (pH 7,4), etanol (99,5% - Fmaia®) e nanopartícula vazia de PLA-PEG. Foram utilizadas as concentrações finais de 80, 40 e 20 µg/mL, tanto do POH livre como encapsulado.

A citotoxicidade foi avaliada pelo conteúdo de hemoglobina liberado, o qual foi determinado no sobrenadante por meio da medida da absorbância em 540 nm, no leitor de microplacas - Spectra Max 190 – Molecular Devices® (SILVA *et al.*, 2001). A análise foi efetuada em triplicata e os dados foram exibidos em percentual de hemólise, o qual foi calculado de acordo com a equação:

$$\% \text{ Hemólise} = (\text{Abs}_a / \text{Abs}_{cp}) \times 100$$

Equação 11.

Onde:

Abs<sub>a</sub>, absorbância da amostra

Abs<sub>cp</sub>, controle positivo, o qual apresentou 100% de hemólise que no estudo correspondeu a amostra incubada com água destilada.

Comparações estatísticas foram realizadas pela ANOVA, com pós teste Tukey, com 95% de confiança. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com  $p < 0,05$ .

### **3.7. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA-PEG contendo POH sobre a linhagem tumoral Hep-2.**

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas células da linhagem HEp-2 ATCC CCL-23 (contaminante de adenocarcinoma de cérvix), as quais foram mantidas em garrafas de poliestireno em meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove's (Sigma-Aldrich®), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Gibco®), 100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina, em estufa de CO<sub>2</sub> (Quimis®), a 37 °C em atmosfera úmida, contendo 5 % de CO<sub>2</sub>.

Em ambiente estéril (Capela de fluxo laminar vertical - Veco®) e com materiais estéreis (esterilizados em autoclave vertical AV Plus - Phoenix®), foram realizados repiques semanais, utilizando tripsina (Gibco®), para manter a viabilidade celular, de modo que a cada repique uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL foi mantida. A viabilidade celular foi analisada pelo método de exclusão do Azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich®) (HARRISON & RAE, 1997), com contagem em câmara de Neubauer (utilizando o microscópio CX21 - Olympus®), onde a porcentagem de viabilidade celular foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{n}^\circ \text{ células não coradas} / \text{n}^\circ \text{ total de células}) \times 100$$

Equação 12.

Para o ensaio citotóxico foram semeadas  $1 \times 10^4$  células/mL, em placas de 96 poços, e incubadas por 24 h a 37 °C, com 5 % de CO<sub>2</sub>, para adesão celular. Após as 24 h o meio foi removido, sendo adicionado novo meio e as concentrações de POH para serem incubadas. As concentrações finais utilizadas de POH livre e de POH nanoencapsulado foram de 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62 µg/mL. Foram realizados os controles apenas com o meio, controles do solvente (etanol) e controles contendo nanopartículas de blendas de PLA-PEG vazias. As células foram incubadas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h a 37 °C, com 5 % de CO<sub>2</sub>.

Após os tempos de incubação, o meio foi retirado e em seguida adicionado 50 µL de MTT (1mg/mL) (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio - Sigma-Aldrich®), e deixado em incubação por três 3 h. A técnica empregada do MTT baseia-se na sua redução, sendo que o MTT é um corante amarelo que quando reduzido por células com integridade mitocondrial (principalmente a atividade das desidrogenases) se transforma em um composto azul, a formazana. A quantidade de formazan pode ser determinada espectroscopicamente após solubilização em etanol absoluto (DENIZOT & LANG, 1986). Após as três horas de incubação, o MTT foi retirado e foi adicionado 50 µl de etanol, para diluição dos cristais, sendo então adicionados 150 µl de uma mistura de PBS pH=7,4 com álcool isopropílico (Fmaia®), na proporção 1:2. A absorbância proveniente da solução resultante de cada poço da placa foi lida em leitor de placas nos comprimentos de onda de 570 nm e 630 nm.



A leitura dos poços foi realizada em dois comprimentos de onda, para posterior subtração para obtenção do valor real, pois a formazana possui absorção em 570 nm e as células viáveis presentes nos poços causam uma turvação observada em 630 nm. A viabilidade celular foi calculada usando a seguinte equação (MENEZES *et al.*, 2007):

$$\text{Viabilidade (\%)}: (\text{Abs}_a / \text{Abs}_{cp}) \times 100$$

Equação 13.

Onde:

$\text{Abs}_a$ , absorbância da amostra

$\text{Abs}_{cp}$ , absorbância do controle

Comparações estatísticas foram realizadas pela ANOVA com 95% de confiança, com pós teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para determinação de POH em nanopartículas

#### 4.1.1. Condições Cromatográficas

Os parâmetros utilizados para desenvolver e validar o método analítico de quantificação do POH foram baseados na literatura disponível (GUPTA *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2005; HUA *et al.*, 2008; FARAZUDDIN *et al.*, 2012), porém esses parâmetros passaram por sucessivas variações, resultando nas condições cromatográficas descritas na tabela 5.

**Tabela 5.** Condições cromatográficas utilizadas na quantificação do POH.

<b>Característica</b>	<b>Condições cromatográficas</b>
Coluna	C18 (125 mm X 4mm), 5 $\mu$ m
Detecção	UV ( $\lambda$ = 210 nm)
Fluxo	1,0 mL/min
Fase móvel	ACN:água (80:20, v/v)
Volume de injeção	100 $\mu$ L
Temperatura da coluna	30°C
Temperatura da amostra	25°C
Tempo de corrida	2,5 minutos
Tempo de retenção	1,765 minutos

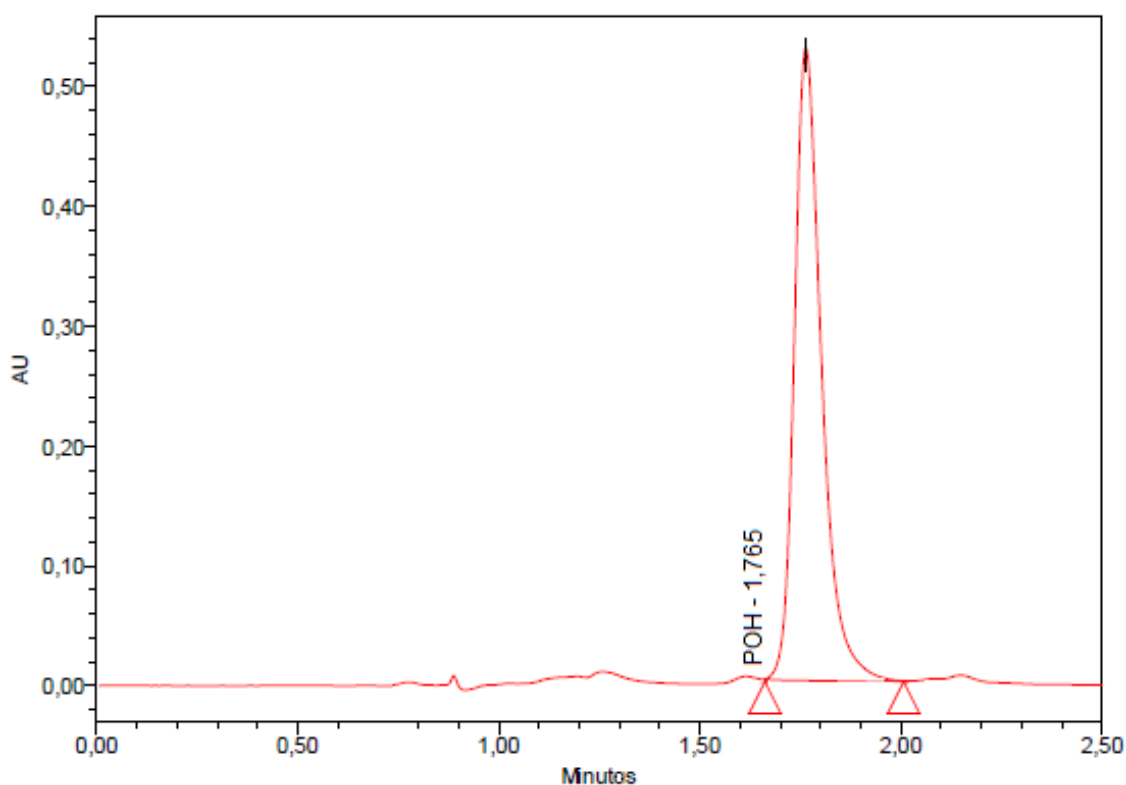
Para definir a constituição da fase móvel foram realizados testes iniciais em modo isocrático com ACN e água (GUPTA *et al.*, 2005; HUA *et al.*, 2008), onde as proporções dos solventes foram variadas, com intuito de encontrar um pico mais regular e simétrico. Dessa forma, os testes iniciais foram realizados com uma proporção de 40:60 (v/v), ACN e água, respectivamente (GUPTA *et al.*, 2004), sendo realizados demais testes variando essas proporções. Com as variações de proporção de ACN e água, foi possível observar que a melhor fase móvel para o POH foi a constituída pela proporção de 80:20 (v/v), ACN e água, respectivamente.

Inicialmente a detecção foi realizada em dois comprimentos de onda, 210 nm e 220 nm (GUPTA *et al.*, 2004; FARAZUDDIN *et al.*, 2012), porém foi observado que no comprimento de onda de 210 nm os picos obtidos eram mais simétricos, sendo então optado por este para prosseguir com as posteriores análises.

O fluxo utilizado na metodologia validada foi de 1 mL/min, o mesmo utilizado em um dos trabalhos encontrados na literatura (HUA *et al.*, 2008), porém difere de outros que sugerem um fluxo de 0,35 mL/min (GUPTA *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2005). O volume de injeção utilizado foi de 100  $\mu$ L, parâmetro esse que também foi diferenciado das outras validações já descritas.

Com as modificações no método analítico foi possível obter um tempo de retenção do POH de 1,765 min, com tempo total da corrida de 2,5 min, sendo que os tempos de retenções encontrados na literatura variam de 7 - 11 min (GUPTA *et al.*, 2004; HUA *et al.*, 2008). As condições cromatográficas definidas mostraram-se satisfatórias, uma vez que foi possível obter um pico simétrico e fino (Figura 11), com tempo de retenção e corrida menores.

**Figura 11.** Cromatograma de absorbância (AU) em função do tempo (minutos) do POH (30  $\mu$ g/mL) em ACN:água (40:60, v/v). Fase móvel ACN:água (80:20, v/v), em 210 nm.



## 4.1.2. Validação do método cromatográfico

### 4.1.2.1. Linearidade

Para a determinação da linearidade foram avaliadas seis concentrações padrões de POH em ACN:água (40:60, v/v): 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL, e por meio do cálculo da equação de regressão linear e o r, pelo método dos mínimos quadrados, a curva analítica obtida foi considerada linear (Figura 12). O r obtido foi de 0,9997 e a equação dada por:

$$A = 7,79 \cdot 10^4 \cdot [\text{POH}] + 1,44 \cdot 10^5$$

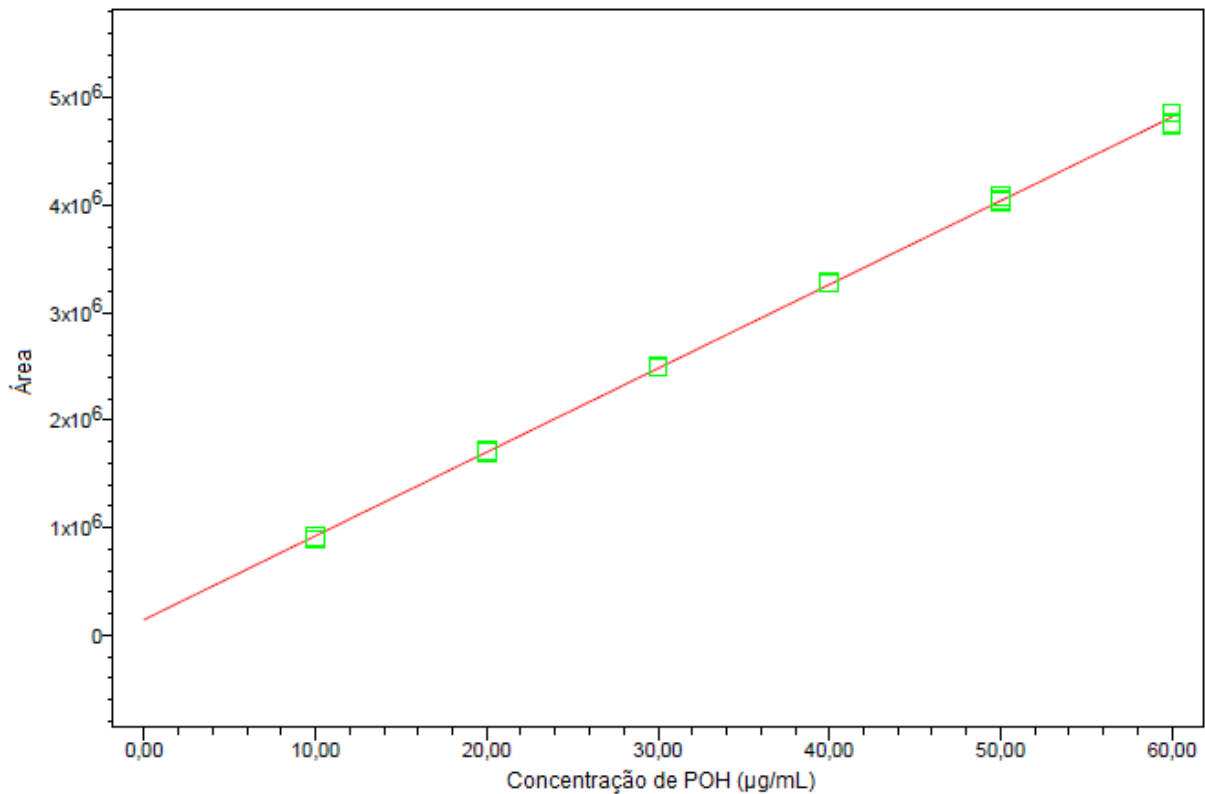
Equação 14.

Onde:

A, área do pico

[POH], concentração da solução de POH em µg/mL

**Figura 12.** Curva analítica do POH em ACN:água (40:60, v/v). Fase móvel ACN:água (80:20, v/v) em 210nm (n=3).  $A = 7,79 \cdot 10^4 \cdot [\text{POH}] + 1,44 \cdot 10^5$ ,  $r=0,9997$ .



O valor de  $r$  é aceitável quando no mínimo esse valor seja de 0,99 (ANVISA, 2003). Assim a linearidade da curva garante a qualidade do método para análise do POH, garantindo uma confiança no uso da equação da reta obtida.

#### 4.1.2.2. Precisão

A precisão é expressa como DPR, sendo uma medida do erro relativo do método. Dessa forma, para a avaliação da precisão foram preparadas as seguintes concentrações: 10, 30 e 60  $\mu\text{g/mL}$ . Para a precisão intra-corridas foram realizadas análises em quintuplicata de cada concentração no mesmo dia, os resultados estão expostos na Tabela 6.

**Tabela 6.** DPR da análise de precisão intra-corridas das amostras padrão de POH,  $n=5$ .

<b>Solução Padrão (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Média <math>\pm</math> DP (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>DPR (%)</b>
10	10,22 $\pm$ 0,15	1,50
30	31,35 $\pm$ 0,99	3,16
60	64,01 $\pm$ 1,97	3,08

Para a avaliação da precisão inter-corridas foram feitas análises com as mesmas concentrações já citadas, porém em três dias diferentes, os resultados estão descritos na Tabela 7.

**Tabela 7.** DPR das análises de precisão inter-corridas das amostras padrão de POH,  $n=5$ .

<b>Solução Padrão (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Média dos dias (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>			<b>Média <math>\pm</math> DP (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>DPR (%)</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		
10	9,43	10,23	9,80	9,82 $\pm$ 0,40	4,06
30	29,90	31,35	30,95	30,73 $\pm$ 0,75	2,44
60	59,30	64,01	60,71	61,34 $\pm$ 2,42	3,94

É preconizado que o DPR para precisões seja inferior à 5% (ANVISA, 2003). Dessa forma, as análises puderam comprovar que o método analítico para POH é

preciso, tanto na precisão intra-corridas como na precisão inter-corridas, pois o maior DPR obtido, entre todas as análises, foi de 4,06%.

#### 4.1.2.3. Exatidão

Para o teste de exatidão foram utilizadas as mesmas amostras do teste de precisão, nas concentrações de 10, 30 e 60  $\mu\text{g/mL}$ . A exatidão foi confirmada pelos cálculos de porcentagem de recuperação e pelo DPR (ANVISA, 2003).

Os resultados expressos na Tabela 8 demonstram a concordância entre os valores reais e teóricos, pois todos os resultados da porcentagem de recuperação ficaram próximos dos valores reais, os quais ficaram entre 97% e 103%, e os valores de DPR mantiveram-se abaixo do limite preconizado de 5%.

**Tabela 8.** Porcentagem de recuperação e DPR das análises da exatidão para amostras de POH, n=5.

<b>Solução Padrão (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>DPR (%)</b>
10	97,94	3,36
30	103,17	2,26
60	101,18	0,58

#### 4.1.2.4. Especificidade

Alguns componentes da formulação, ou de outros testes que necessitem posterior quantificação do POH, podem ser interferentes no momento da leitura, uma vez que podem aparecer picos indesejáveis no mesmo tempo de retenção do POH.

Um possível interferente na quantificação indireta do POH a partir do sobrenadante das nanopartículas é o PVA 1%. Isso pode acontecer pelo fato que o PVA 1% permanece no sobrenadante após a etapa de centrifugação na fase de obtenção das nanopartículas. Sendo que outro possível interferente presente nos ensaios de liberação *in vitro* é o tampão fosfato de sódio 10mM, pH=7,4, pois o mesmo também permanece no sobrenadante após a centrifugação.

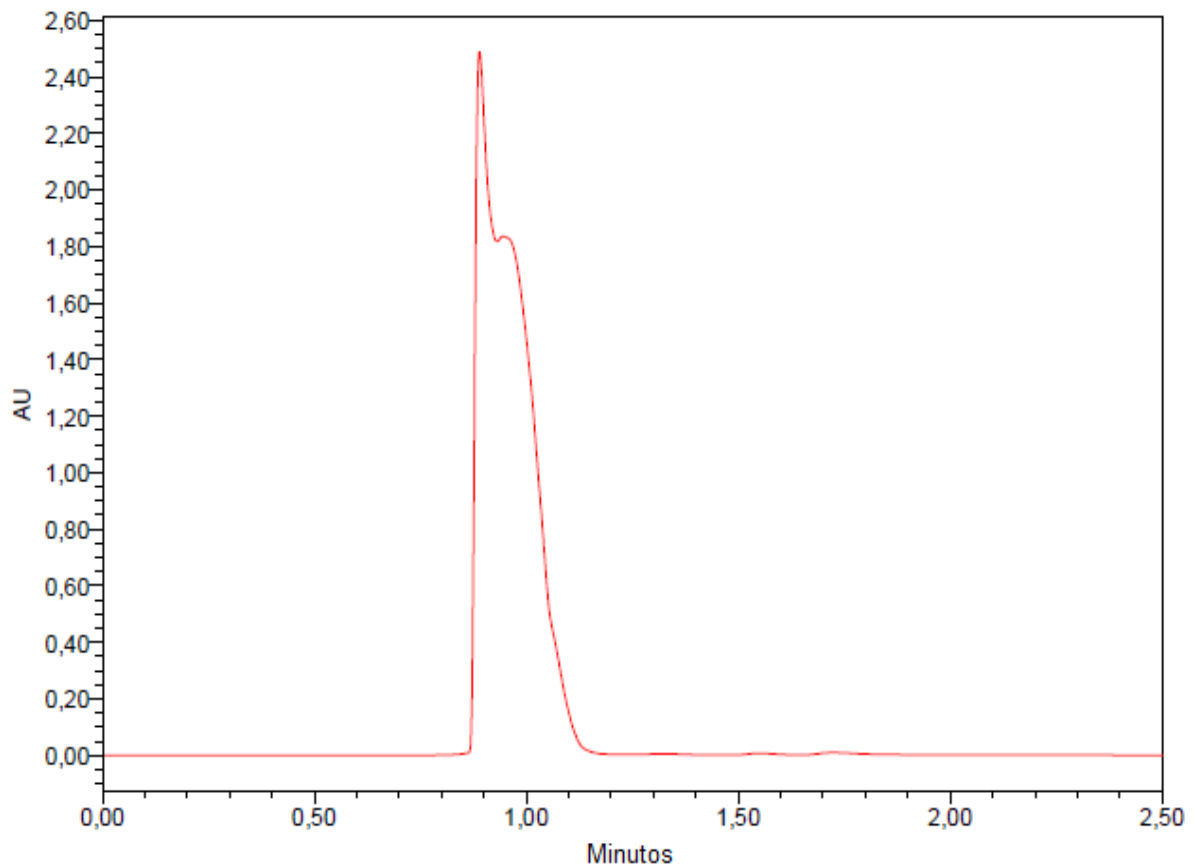
Para eliminar qualquer dúvida sobre possíveis interferências, foi realizado uma análise da especificidade do método analítico desenvolvido. A análise foi

conduzida pela comparação dos cromatogramas de amostras com os cromatogramas dos possíveis interferentes.

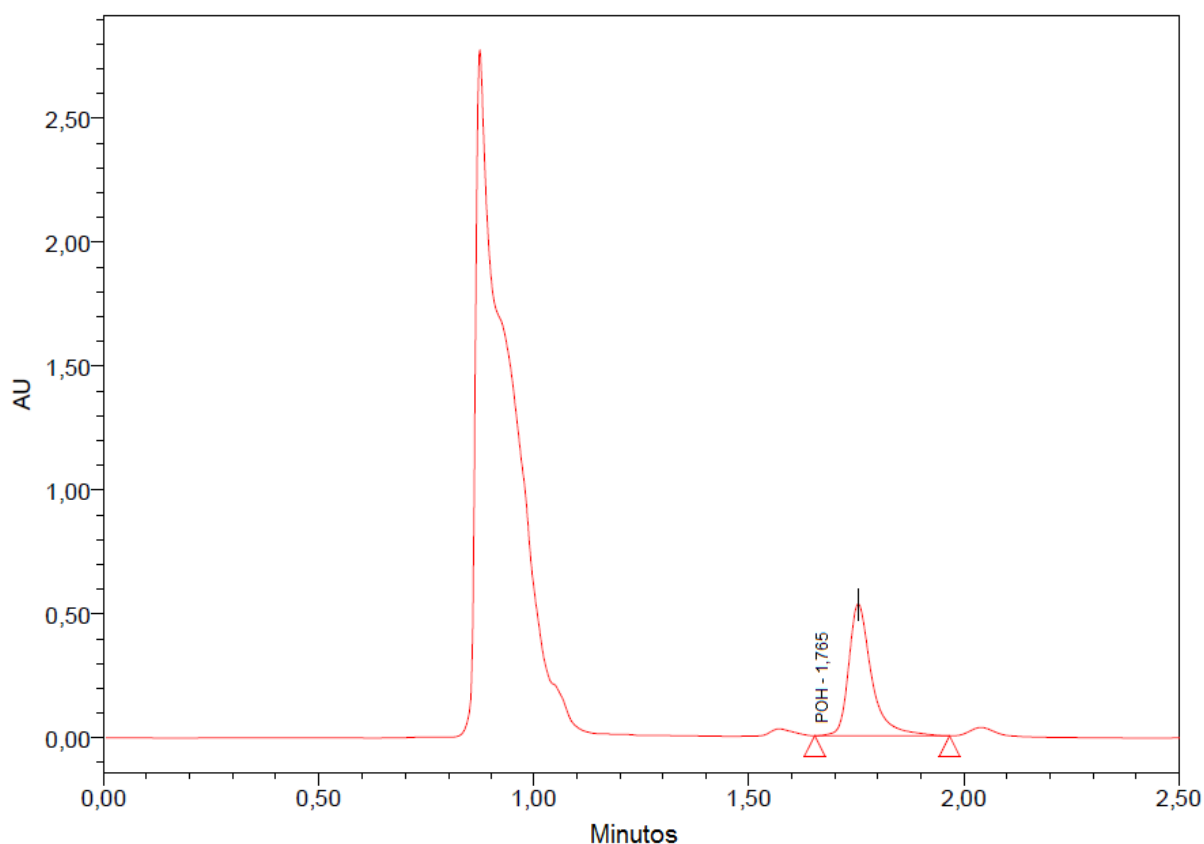
Para análise da possível interferência do PVA foi realizada a leitura por CLAE de nanopartículas vazias, diluído da mesma maneira que as amostras, em ACN:água (40:60 v/v), com intuito de visualizar o cromatograma referente ao PVA 1%. Também foi realizado a leitura de um sobrenadante de nanopartícula contendo POH nas mesmas condições pré-estabelecidas.

O cromatograma de uma amostra de nanopartícula vazia apresentou um pico do PVA 1% em aproximadamente 0,9 min (Figura 13). Na Figura 14 está o cromatograma de uma amostra representativa de sobrenadante de uma nanopartícula contendo POH, onde aparecem dois picos: o primeiro referente ao PVA 1% (~ 0,9 min), e o segundo referente ao POH (~ 1,7 min).

**Figura 13.** Cromatograma de absorbância (AU) do sobrenadante de uma nanopartícula vazia em ACN:água (40:60, v/v). Fase móvel: ACN:água (80:20, v/v), 210 nm.



**Figura 14.** Cromatograma de absorvância (AU) do sobrenadante de uma nanopartícula contendo POH em ACN:água (40:60, v/v). Fase móvel: ACN:água (80:20, v/v), 210 nm.

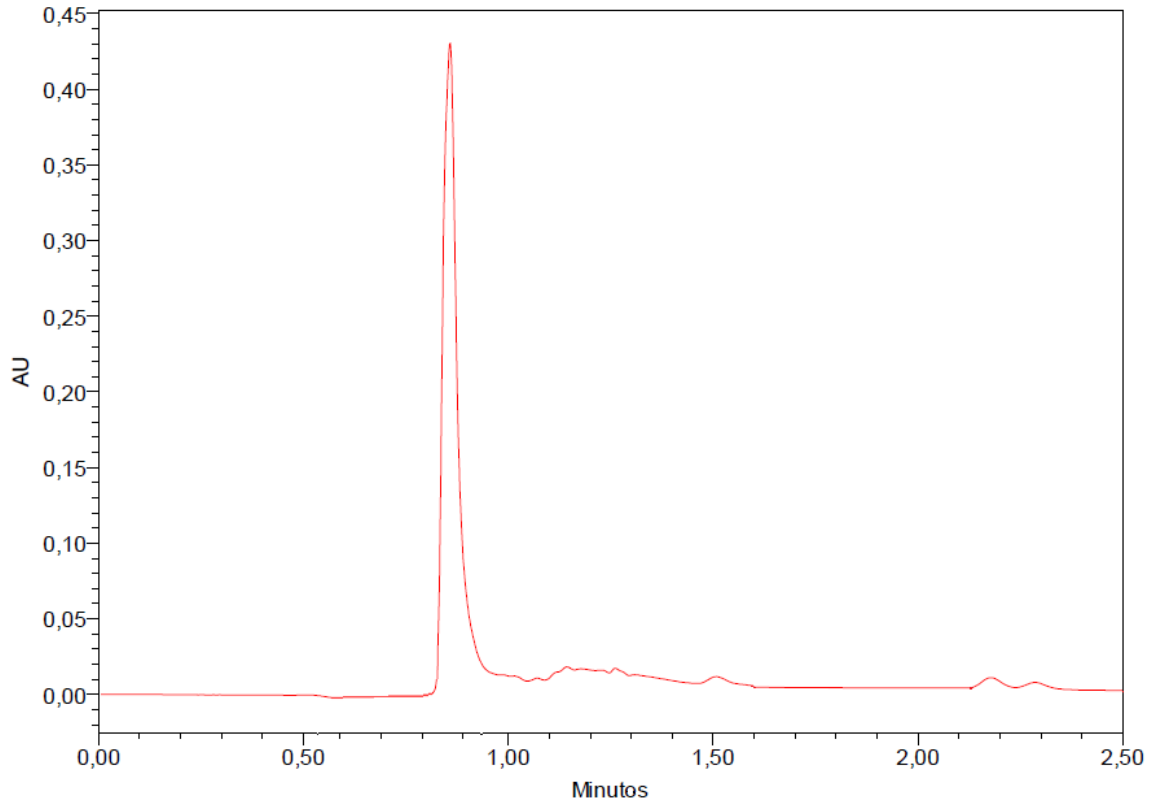


E para analisar se o tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7,4, poderia interferir na quantificação do POH, também foi realizada a leitura por CLAE, sendo que uma amostra contendo apenas o PBS foi diluído da mesma maneira que as demais amostras, em ACN:água (40:60 v/v), com intuito de visualizar o cromatograma referente ao PBS de forma isolada. E em seguida foi realizada a leitura de um sobrenadante de nanopartícula contendo POH em tampão fosfato de sódio, nas mesmas condições pré-estabelecidas.

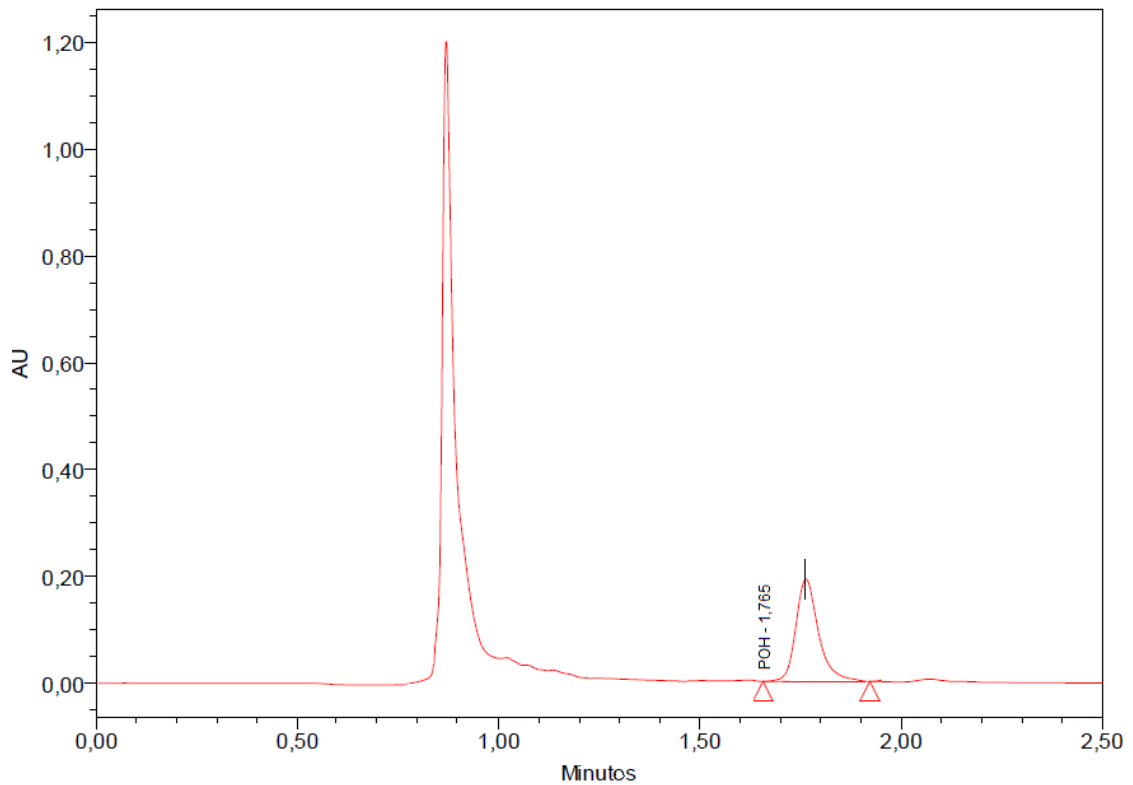
O cromatograma da amostra do tampão fosfato de sódio, na ausência do POH, apresentou um pico referente ao tampão fosfato de sódio em aproximadamente 0,9 min (Figura 15). Sendo que quando foi realizada a leitura da amostra contendo tampão fosfato de sódio e POH, Figura 16, o cromatograma apresentou dois picos: o primeiro referente ao tampão fosfato de sódio (~ 0,9 min), e o segundo referente ao POH (~ 1,7 min).



**Figura 15.** Cromatograma de absorvância (AU) de uma amostra de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7,4, em ACN:água (40:60, v/v). Fase móvel: ACN:água (80:20, v/v), 210 nm.



**Figura 16.** Cromatograma de absorvância (AU) do sobrenadante contendo POH e tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7,4, em ACN:água (40:60, v/v). Fase móvel: ACN:água (80:20, v/v), 210 nm.



Dessa maneira é possível afirmar que tanto o PVA 1% presente na formulação, quanto o tampão fosfato de sódio presente no ensaio *in vitro*, não interferiram na leitura, e posterior quantificação do POH, sendo possível concluir que método analítico desenvolvido é específico para o POH nas condições testadas.

#### 4.1.2.5. Robustez

Para avaliação da robustez algumas variações foram aplicadas em determinados parâmetros, para comprovar que o método é resistente a essas modificações. Foram realizadas análises das seguintes modificações:

- Fluxo: de 1 mL/min para 0,9 e 1,05 mL/min;
- Mudança da fase móvel: de 80:20 v/v para 75:25 v/v e
- Temperatura da coluna: de 30°C para 25°C.

O resultado deste ensaio foi expresso por meio da porcentagem de recuperação e DPR, e está detalhado na Tabela 9.

Todos os parâmetros modificados foram analisados e comprovaram, por meio da porcentagem de recuperação e DPR, que pequenas alterações não influenciam a análise quantitativa do POH, sendo assim o método analítico desenvolvido para quantificar o POH pode ser considerado robusto frente às essas alterações testadas.

**Tabela 9.** Porcentagem de recuperação e DPR das análises da robustez, n=5.

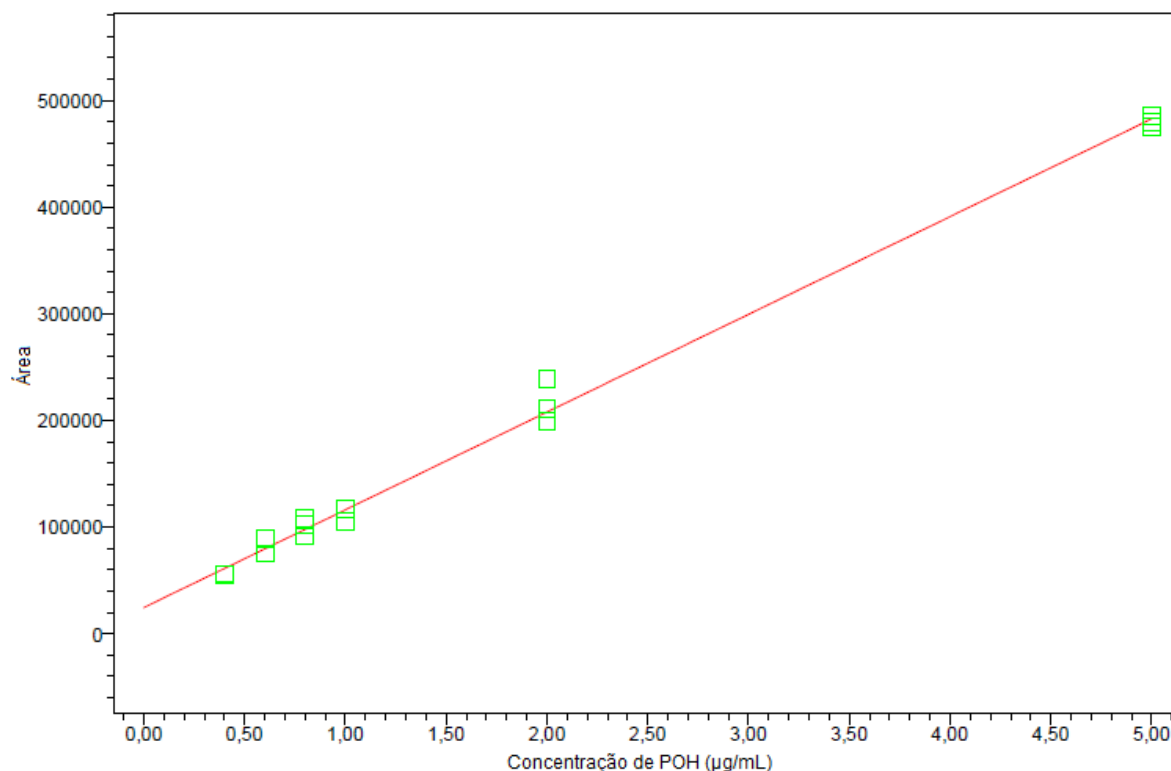
Variações	Recuperação (%) ± DPR		
	10 µg/mL	30 µg/mL	60 µg/mL
Fluxo 0,9 mL/min	99,31 ± 3,14	103,55 ± 1,26	102,47 ± 0,14
Fluxo 1,05 mL/min	96,72 ± 2,97	100,54 ± 1,08	99,45 ± 0,18
Fase móvel (75:25)	98,78 ± 3,14	102,22 ± 1,09	101,20 ± 0,37
Temperatura 25°C	95,77 ± 3,11	100,25 ± 1,84	97,56 ± 0,58

#### 4.1.2.6. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Para determinar o LD e o LQ, foram utilizadas as equações 3 e 4 (item 3.1.3.6), respectivamente, onde foram utilizados o desvio padrão médio e a inclinação de coeficiente angular (*slope*), obtido a partir da regressão linear de uma

curva de calibração específica (0,4; 0,6; 0,8; 1 e 2  $\mu\text{g/mL}$ , Figura 17) na região de baixas concentrações do intervalo previsto (ICH, 2005). Com o valor do  $r$  de 0,998, é possível afirmar que o método foi linear neste intervalo, e o valor determinado para LD foi de 7,29  $\text{ng/mL}$  e para o LQ foi de 22,1  $\text{ng/mL}$ .

**Figura 17.** Curva analítica para LD e LQ do POH em ACN:água (40:60, v/v). Fase móvel ACN:água (80:20, v/v) em 210nm (n=3).  $r=0,998$ .



#### 4.2. Obtenção de nanopartículas contendo POH

O método de emulsificação/evaporação do solvente, pelo método de emulsão simples óleo em água (O/A), foi utilizado para obtenção das nanopartículas contendo POH, pois a metodologia em questão é mais adequada para a incorporação de drogas lipofílicas. A metodologia foi realizada de acordo com o descrito no item 3.2. Nesse método foram utilizados polímeros pré-formados, PLA e PEG 100 kDa, que são mais facilmente controláveis, de maior rendimento e biodegradáveis (SOUTO *et al.*, 2012).

O método de emulsificação/evaporação do solvente demonstrou ser eficaz para a formulação contendo PLA e PEG com incorporação do POH, pois a

porcentagem de encapsulação, assim como o tamanho do diâmetro médio foram satisfatórios. As nanopartículas, quando armazenadas em água, apresentaram aspecto leitoso de cor branca, e quando liofilizadas apresentaram-se como um pó fino e branco.

### **4.3. Caracterização físico-química das nanopartículas**

#### **4.3.1. Determinação da eficiência de encapsulação**

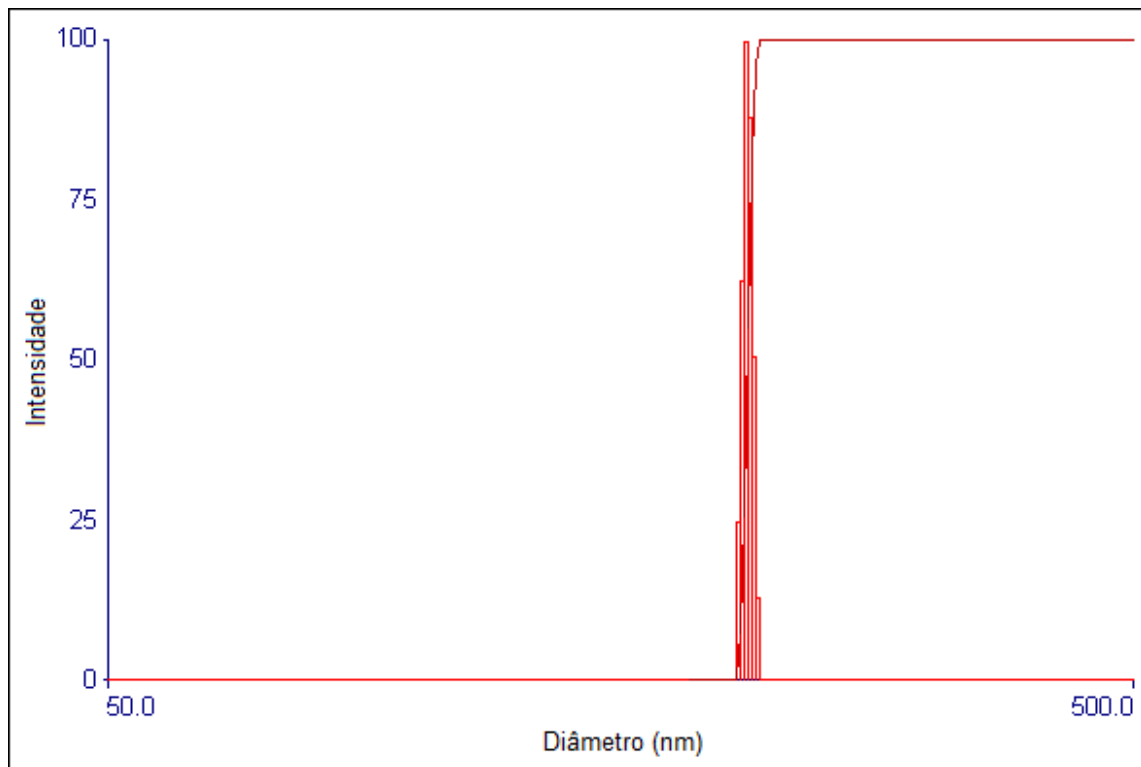
A EE% das nanopartículas contendo POH foram determinadas pelo método indireto, conforme foi descrito no item 3.3.1. A formulação de PLA-PEG obteve uma taxa média de EE% de  $54,61\% \pm 6,99$ , sendo analisadas 10 amostras. O resultado obtido foi semelhante a um estudo em que foram produzidas micropartículas de PLGA contendo POH, onde a porcentagem da taxa de encapsulação obtida foi de  $42,4 \pm 3,5\%$  (FARAZUDDIN *et al.*, 2012). Dessa forma a EE% de mais de 50% obtida na formulação das nanopartículas de PLA-PEG contendo POH foi considerada satisfatória.

#### **4.3.2. Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão**

A determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão foi realizado conforme foi descrito no item 3.3.2. E para realizar a média do diâmetro médio das nanopartículas de PLA-PEG contendo POH foram analisadas 10 amostras. A média obtida de diâmetro médio foi de  $229 \pm 27$  nm, e o índice de polidispersão foi de  $0,083 \pm 0,026$ . De forma geral todos os lotes produzidos apresentaram um perfil monomodal, com um intervalo de distribuição de diâmetro médio reduzido.

Na Figura 18 está apresentado o gráfico de uma amostra representativa das nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH, a qual apresentou um diâmetro médio de 215,3 nm e um índice de polidispersão de 0,073. Essa amostra apresentou um perfil monomodal, onde 100% da distribuição dos diâmetros médios das nanopartículas ficaram no intervalo de 206 à 215,3 nm.

**Figura 18.** Distribuição do tamanho de uma amostra representativa das nanopartículas de blenda de PLA-PEG contendo POH. Diâmetro médio de 215,3 nm e índice de polidispersão de 0,073, perfil monomodal, n=3.



Em geral espera-se que os diâmetros médios das nanopartículas, obtidas por diferentes metodologias, estejam entre 100 e 300 nm (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Sendo esse parâmetro um dos mais importantes para avaliação da qualidade das nanopartículas, assim como para monitorar a estabilidade das formulações (MÜLLER-GOYMANN, 2004). O esperado de formulações de nanopartículas é que as mesmas apresentem uma distribuição monomodal e um baixo índice de polidispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Nesse contexto, as nanopartículas de POH foram obtidas com sucesso, pois o diâmetro médio das formulações ficou em aproximadamente 230 nm, com uma distribuição monomodal e um baixo índice de polidispersão.

O diâmetro médio possui um importante papel na característica e funcionalidade das nanopartículas, em especial no caso de nanopartículas que carregam antitumorais, pois os vasos sanguíneos que permeiam os tecidos tumorais apresentam poros de 300 a 700 nm (LEMBO & CAVALLI, 2010). E a presença do PEG na formulação diminui a interação com proteínas sanguíneas, o que reduz de forma drástica a eliminação precoce pelo sistema fagocítico mononuclear

(MOSQUEIRA *et al.*, 2001). Considerando que as atividades biológicas do POH são voltadas para ações antitumorais, essas características nanométricas e da formulação devem favorecer ainda mais a atividade desse composto.

#### 4.3.3. Potencial zeta

O potencial zeta é o potencial de superfície das partículas, o qual é resultante da interação das cargas de moléculas presentes nas formulações das nanoemulsões. Sendo um parâmetro de grande importância, visto que o potencial zeta pode estar relacionado diretamente com a resposta biológica da substância associada, além de controlar a estabilidade das nanopartículas em suspensões, predizendo estados de dispersão e agregação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; KLANG, BENITA, 1998; HEURTAULT *et al.*, 2003).

As cargas de potencial zeta podem ser atribuídas aos possíveis compostos adsorvidos as nanopartículas, os tensoativos e polímeros utilizados. De uma forma geral, as partículas podem ser consideradas estáveis quando o valor do potencial zeta é próximo de 30 mV, em módulo, pois nessa situação a repulsão eletrostática tende a evitar possíveis agregações da fase interna, enquanto que potenciais próximos a 0 e 5 mV podem produzir o fenômeno de floculação com maior facilidade (NEVES *et al.*, 2013; KLANG, BENITA, 1998).

As análises do potencial zeta das nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH foram realizadas conforme descrito no item 3.3.3., e os resultados obtidos estão expressos na Tabela 10.

**Tabela 10.** Potencial zeta das nanopartículas de blendas de PLA-PEG na ausência e presença de POH, n=3, expressos em média  $\pm$  DP.

Formulação	Potencial zeta (mV)
Nanopartícula vazia	- 21,33 $\pm$ 0,72
Nanopartícula contendo POH	- 20,87 $\pm$ 0,21

É possível verificar que a carga do potencial zeta das nanopartículas foram negativas, fato esse que pode ser explicado pela presença do PLA, o qual apresenta característica de fornecer potencial negativo a interface, devido à presença de

grupamentos carboxílicos nas extremidades da cadeia polimérica (ALLEN, 1994; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O potencial zeta das nanopartículas vazias não apresentaram valores diferentes quando houve a incorporação do POH, os valores foram de - 21,33 e - 20,87 mV, respectivamente.

Apesar das lavagens realizadas para a retirada do tensoativo, no caso o PVA, das formulações, resíduos do mesmo podem ser encontrados, os quais tornam-se adsorvidos sobre a superfície das nanopartículas, ocasionando modificações das propriedades físico-químicas (ESSA *et al.*, 2010). E essa adesão do PVA a superfície pode ocasionar a redução da carga negativa das carboxilas do PLA, sendo que quando há a remoção do solvente orgânico é provável que moléculas do tensoativo interpenetrem no polímero (SAHOO *et al.*, 2002).

A utilização do PEG é uma das estratégias propostas para modificar a distribuição *in vivo* das nanopartículas. Por meio da adsorção desse polímero hidrofílico ocorre a redução da hidrofobicidade da superfície das partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Porém há relatos que o revestimento da superfície das partículas com o PEG também pode acarretar uma redução dos valores do potencial zeta (STOLNIK *et al.*, 1994; JANSEN *et al.*, 1996). Dessa forma, de acordo com o exposto, essas são as possíveis explicações pelas quais o potencial zeta obtido para a formulação de PLA-PEG contendo POH ficou um pouco abaixo do valor considerado o ideal, |30mV|.

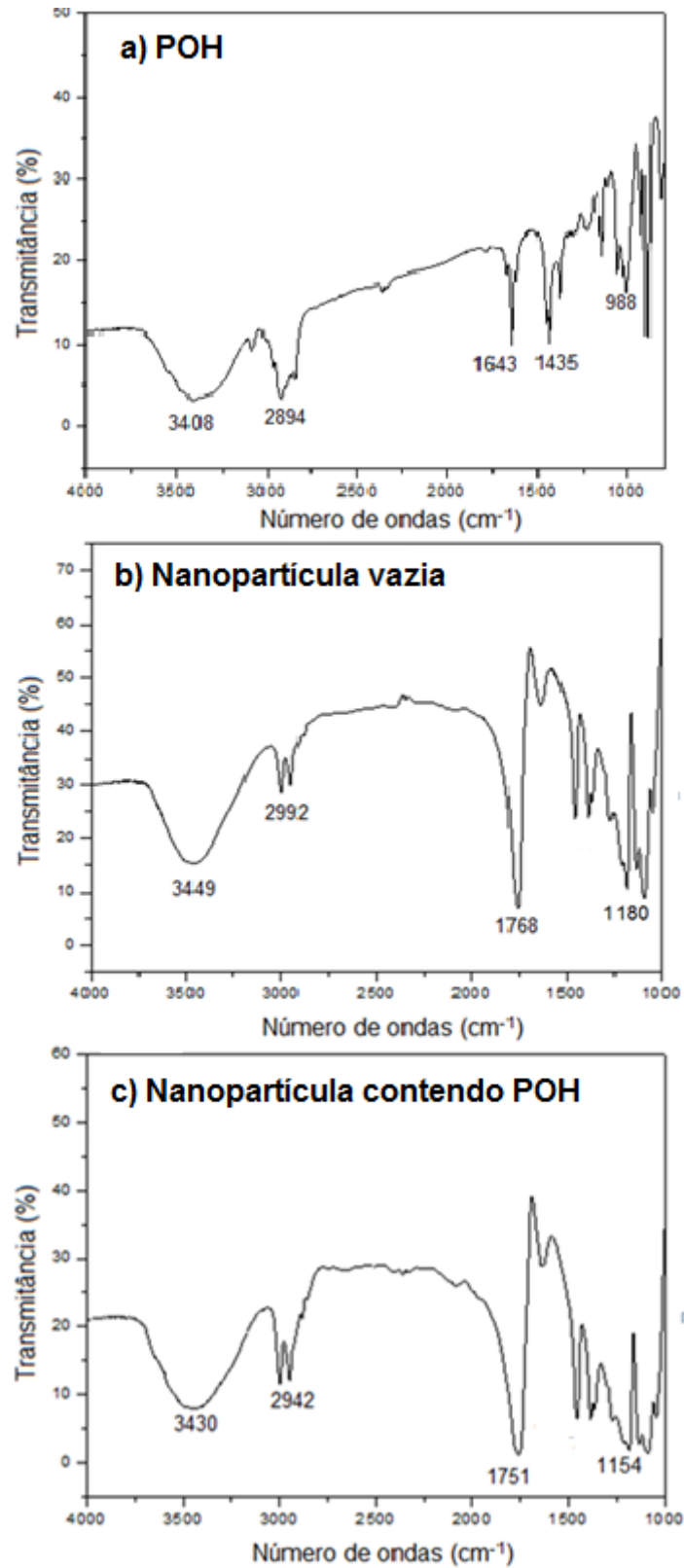
#### **4.3.4. Espectroscopia da região do infravermelho (IV)**

A espectroscopia de absorção na região do IV é uma técnica que permite a identificação de grupos funcionais em uma substância orgânica ou mineral, auxiliando na identificação dos mesmos. A técnica é baseada na mensuração da energia absorvida pela vibração de cada uma das ligações químicas presentes na substância em questão (GULLORY, 1999).

Para nanopartículas a metodologia do IV permite realizar a caracterização por meio da identificação de interações moleculares, pela comparação de deslocamentos, variações de intensidade, alargamento ou aparecimento de novas bandas com um espectro característico da amostra (LOPES & FASCIO, 2004).

Na Figura 19 estão os gráficos referentes análises realizadas das amostras no espectrofotômetro na região do infravermelho.

**Figura 19.** Espectros na região do infravermelho: a) POH, b) Nanopartícula vazia (PLA-PEG) e c) Nanopartícula contendo POH.





O espectro de absorção na região do IV do POH (Figura 19a) apresentou bandas de absorção em  $3408\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação axial de O-H em ligações de hidrogênio do grupo álcool, outra banda em  $1643\text{ cm}^{-1}$  de deformação axial de ligação C=C de alquenos não-conjugados, e em  $1435\text{ cm}^{-1}$  deformação axial de ligação C=C de ciclo-alquenos.

Na Figura 19b estão representadas as bandas características do polímero PLA-PEG, pode-se observar em  $3449\text{ cm}^{-1}$  a banda referente aos grupos hidroxilas presentes tanto no PLA quanto no PEG, e em  $1768\text{ cm}^{-1}$ , referente a ligação C=O de éster do PLA. E próximo a  $1180\text{ cm}^{-1}$ , absorção característica de grupamentos C-O-C de éteres do PEG e como todo composto orgânico que possui cadeia alifática uma banda próxima a  $2992\text{ cm}^{-1}$  referentes ao grupamento C-H presentes no PLA e no PEG.

Na análise do espectro da nanopartícula contendo POH, Figura 19c, observa-se sobreposição das principais bandas do POH com as do polímero PLA-PEG. Em  $3430\text{ cm}^{-1}$  a banda é referente a deformação axial O-H em ligação de hidrogênio do grupamento álcool do POH assim como do polímero, e em  $1751\text{ cm}^{-1}$ , referente a ligação C=O de éster do PLA possivelmente sobrepondo a banda em  $1643\text{ cm}^{-1}$  de deformação axial de ligação C=C de alquenos não-conjugados do POH.

#### 4.3.5. Difração de Raios X (DRX)

A conformação na qual uma substância sólida se encontra é um aspecto importante, a mesma pode se apresentar na forma cristalina e/ou amorfa, e isso implica nas demais características, como por exemplo na solubilidade e velocidade de dissolução (DHIRENDRA *et al.*, 2009).

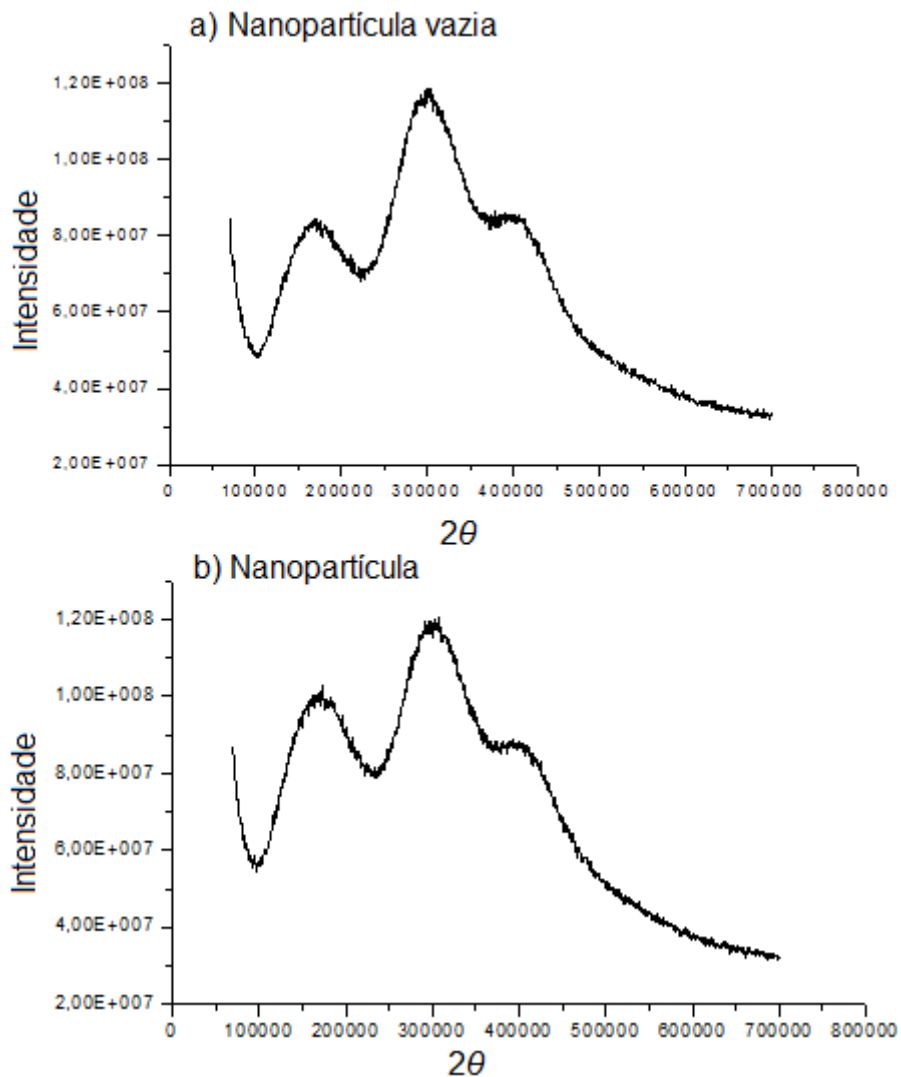
As substâncias cristalinas são moléculas que possuem uma disposição de ordem definida, dependente de energia para desarranjar sua estrutura, sendo que quanto mais forte forem as forças de atração de uma estrutura cristalina, maior será seu ponto de fusão. Já os sólidos amorfos não apresentam essa característica de organização, e também não apresentam as mesmas características do ponto fusão, uma vez que sua organização não necessita da mesma energia que os cristais para desarranjar sua estrutura (VLACK, 1970; BRITAIN, 1999).

A DRX identifica em materiais sólidos as fases cristalinas e amorfas, sendo que as substâncias cristalinas apresentam picos bem definidos, já os compostos

amorfo apresentam-se de forma contrária, sem os picos definidos como os cristalinos (DHIRENDRA *et al.*, 2009; BEYERLEIN *et al.*, 2010).

Os difratogramas obtidos por meio das análises realizadas pela DRx estão apresentados na Figura 20, tanto as nanopartículas de PLA-PEG na presença quanto na ausência do POH.

**Figura 20.** Difratogramas obtidos por DRx: a) Nanopartícula vazia (PLA-PEG) e b) Nanopartícula contendo POH.



De acordo com os difratogramas obtidos das nanopartículas de blendas de PLA-PEG, na presença e ausência de POH (Figura 20), foi possível observar, quanto ao estado de ordenação das amostras, se apresentavam forma cristalina ou amorfa. Ambas as amostras, nanopartícula vazia (ausência de POH) e a nanopartícula contendo o POH, apresentaram-se de forma amorfa. Essas

informações demonstram a formação de um sistema nanoestruturado do POH e do polímero, pois o difratograma da nanopartícula apresentou-se de forma amorfa, a mesma apresentada pelo polímero PLA-PEG.

Obter uma molécula no estado amorfo foi satisfatório, uma vez que suas moléculas estão dispostas de forma aleatória, isso resulta em menor consumo de energia, apresentando uma dissolução mais rápida, diferentemente dos cristais. Outra vantagem de se obter uma substância em estado amorfo é o fato que pode ocorrer o aumento da atividade biológica, porém nesse estado podem acontecer mudanças na estabilidade da substância (RIEKES *et al.*, 2011).

#### **4.3.6. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

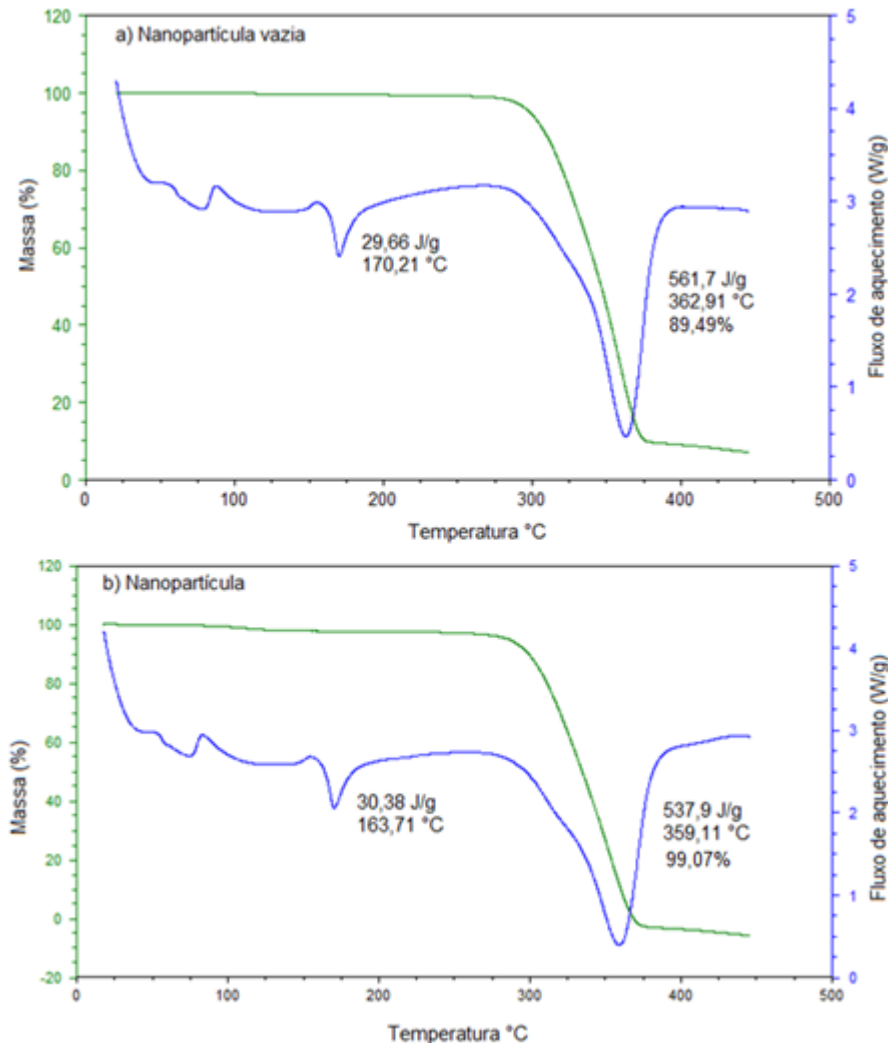
A DSC é empregada para medir a alteração de energia em função da mudança de temperatura, sendo possível realizar análises estruturais, térmico-comportamentais e variações físicas. É aplicada para investigações de mudanças termodinâmicas que ocorram durante o aquecimento da substância (BARKAI *et al.*, 1990).

Dessa forma a técnica de DSC está inserida na lista de ensaios realizados para verificar as características físico-químicas das nanopartículas, sendo empregada para auxiliar em análises que demonstrem as possíveis interações que possam ocorrer entre os polímeros e a droga nas formulações. As observações para tal fim são realizadas por meio de análises de deslocamentos, redução significativa ou desaparecimento de pico na curva de DSC, quando comparados aos perfis dos compostos individualmente (FORD & MANN, 2012; CALVO *et al.*, 1996).

De acordo com os termogramas, é possível visualizar que as curvas de DSC referente ao polímero PLA-PEG (Figura 21a) e a nanopartícula contendo POH (Figura 21b), apresentaram perfis similares. No termograma da nanopartícula vazia contendo apenas o polímero, observou-se um pico endotérmico intenso em 362,91°C referente a decomposição térmica do mesmo, de forma similar o termograma da nanopartícula apresentou um pico relativo a decomposição térmica em 359,11 °C. A ausência de picos no termograma da nanopartícula diferentes dos apresentados na nanopartícula vazia, infere que houve interação entre o POH e o polímero de forma que o sistema demonstra-se amorfo. Essas informações

corroboram com o observado no DRX, onde observou-se formação de um sistema nanoestruturado do POH com o polímero.

**Figura 21.** Termogramas obtidos por DSC: a) Nanopartícula vazia (PLA-PEG) e b) Nanopartícula contendo POH.



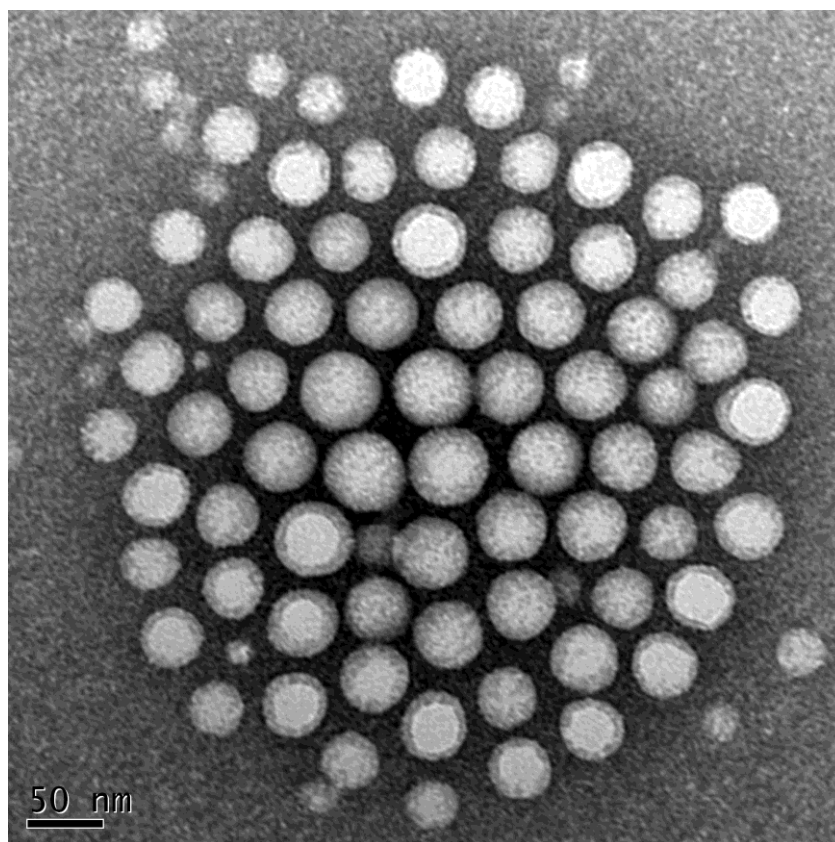
#### 4.3.7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A MET é muito utilizada para análises morfológicas e de tamanho, sendo essa uma das técnicas mais adequadas quando o objetivo é obter imagens diretas das nanopartículas. Podendo inclusive ser realizada a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas a partir dessa técnica (BOOTZ *et al.*, 2004).

A análise das nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH foi realizada por meio da MET e, pela imagem na Figura 22, é possível observar que as

nanopartículas, preparadas pelo método emulsificação/evaporação do solvente, apresentaram forma esférica e com relativa homogeneidade de tamanho, indicando que o método utilizado para a preparação das mesmas foi adequado. Pela MET, as partículas apresentaram diâmetros próximos de 100 nm, bastante inferiores ao diâmetro médio medido pelo equipamento de espalhamento dinâmico da luz (Light Scattering), que foi de 229 nm.

**Figura 22.** Microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH.



Diferenças de tamanho de partículas entre essas duas técnicas já foram observadas em outros estudos. Schaffazick (2006) relata que pelo espalhamento de luz, o diâmetro obtido foi de 306 nm e pela MET foi de 170 nm, enquanto que Hoffmann *et al.* (1997) obteve um diâmetro pelo espalhamento de luz de 243 nm e por meio da MET 161 nm. As diferenças nos valores podem ser pelo fato que os princípios desses métodos são diferentes, onde a microscopia fornece a imagem das partículas secas, de forma isolada, enquanto que a espectroscopia de correlação de fótons considera a camada de hidratação que envolve as partículas,

determinando assim o raio hidrodinâmico dessas partículas em suspensão. (HOFFMANN *et al.*, 1997; COUVREUR *et al.*, 2002).

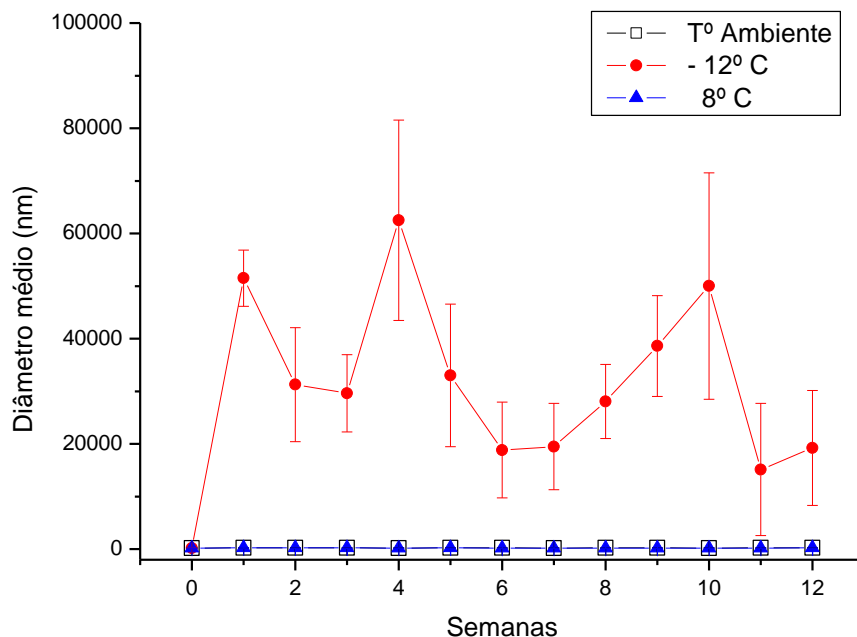
#### 4.4. Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo POH

As nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH ressuspendidas em água, foram submetidas ao ensaio de estabilidade pelo período de 3 meses sob temperatura ambiente, refrigeradas (8°C) e congeladas (-12°C). Ao final dos 3 meses foram avaliadas as características macroscópicas e semanalmente avaliados o diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e o teor de fármaco.

As nanopartículas mantidas à temperatura ambiente e refrigeradas (8°C) mantiveram as mesmas características que as iniciais: coloração branca, homogeneidade e aspecto leitoso. Porém as nanopartículas mantidas congeladas (-12°C) apresentaram separação de fases, precipitado branco e sobrenadante incolor.

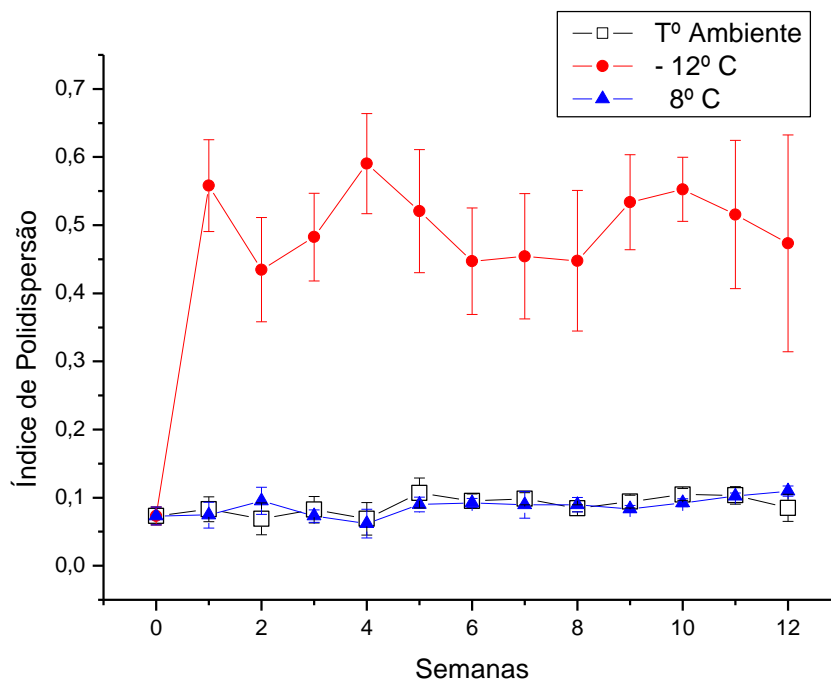
A avaliação do diâmetro médio (Figura 23) demonstrou que em relação ao diâmetro das nanopartículas inicial, as amostras armazenadas sob temperatura ambiente e refrigeradas (8°C) não apresentaram diferenças estatísticas significantes, porém as nanopartículas armazenadas sob congelamento (-12°C) apresentaram diferenças significativas desde a primeira semana de incubação.

**Figura 23.** Diâmetro médio das nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento, n=3.



Em relação ao índice de polidispersão, Figura 24, ocorreu a mesma situação que com o diâmetro médio, pois apenas as nanopartículas armazenadas sob congelamento ( $-12^{\circ}\text{C}$ ) apresentaram diferenças estatísticas significantes, sendo que as nanopartículas nas demais temperaturas não apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas ao valor inicial.

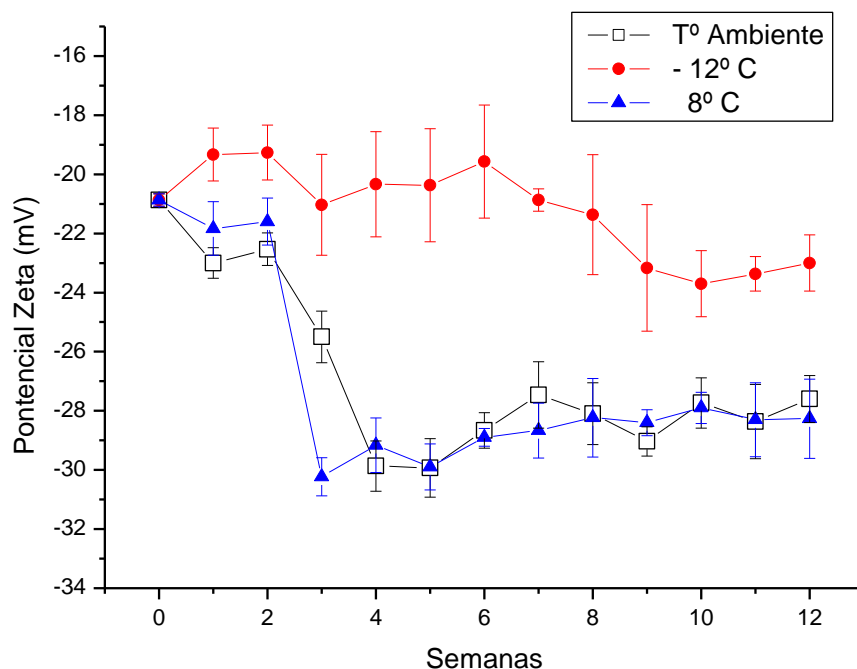
**Figura 24.** Índice de polidispersão das nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento,  $n=3$ .



As suspensões de nanopartículas possuem uma forte tendência de agregação e sedimentação em função do tempo, e para evitar/reduzir essa agregação e sedimentação são utilizados crioprotetores para armazenar essas nanopartículas, os quais são empregados principalmente quando ocorrerá congelamento das mesmas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Dessa forma, pelo fato das nanopartículas não terem sido armazenadas com crioprotetores, é provável que essa seja a causa para as diferenças encontradas tanto nas características macroscópicas, uma vez que apenas as nanopartículas armazenadas sob congelamento ( $-12^{\circ}\text{C}$ ) apresentaram-se sedimentadas, quanto nos valores dos diâmetros médios e índice de polidispersão, os quais se apresentaram bem discrepantes, quando comparados aos valores iniciais.

O potencial zeta também foi avaliado semanalmente e os resultados estão apresentados na Figura 25, sendo possível observar que em todas as temperaturas de armazenamento, as nanopartículas apresentaram variações quando comparado ao potencial zeta mensurado inicialmente. Quando foi realizada a análise estatística as amostras que foram incubadas sob congelamento ( $-12^{\circ}\text{C}$ ) não apresentaram diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ), assim como as amostras das duas primeiras semanas de incubação das demais temperaturas. Já a partir da terceira semana de incubação, tanto as amostras sob temperatura ambiente como as amostras sob refrigeração ( $8^{\circ}\text{C}$ ), apresentaram resultados com diferenças estatísticas significantes. É possível observar que o potencial zeta mensurado logo após a preparação das nanopartículas foi de  $-21,9$  mV, sendo que ao final de 3 meses os potenciais encontrados foram de  $-27,6$ ;  $-23$  e  $-28,2$  mV, para o armazenamento em temperatura ambiente, congelada e refrigerada, respectivamente.

**Figura 25.** Potencial zeta das nanopartículas de blends de PLA-PEG contendo POH em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento,  $n=3$ .



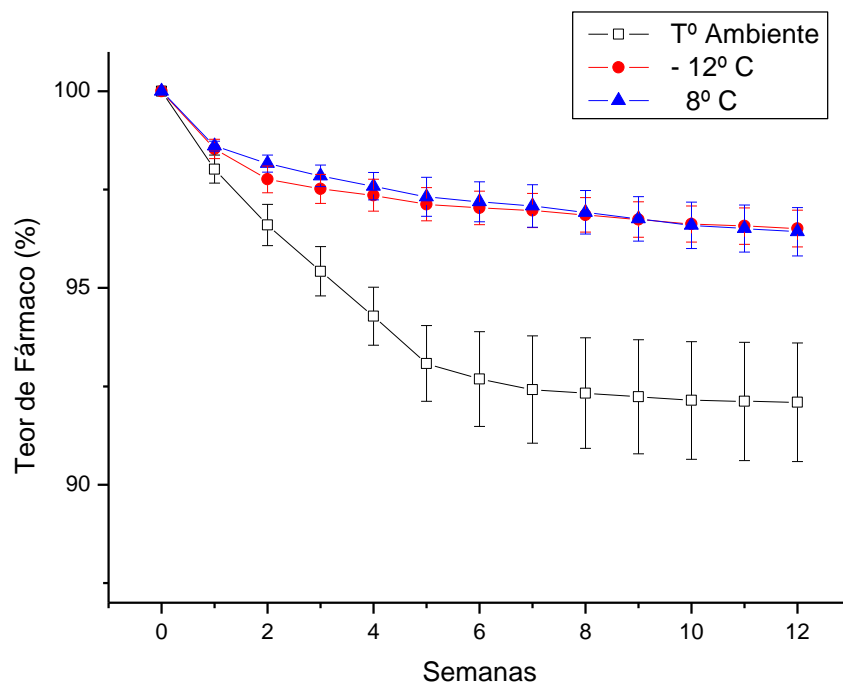
Essa diferença encontrada nos valores obtidos de potencial zeta das nanopartículas armazenadas sob temperatura ambiente e refrigeradas ( $8^{\circ}\text{C}$ ) da inicial, podem ser explicados pela possível retirada de resíduos de PVA ainda



presentes na superfície das nanopartículas (oriundos da etapa de obtenção das nanopartículas) (SAHOO *et al.*, 2002; ESSA *et al.*, 2010), pois para a realização das mensurações de teor do fármaco, foram realizadas centrifugações com posteriores reposições do volume de água, o que pode ter reduzido a quantidade desses resíduos, modificando o potencial zeta. O fato de apenas as nanopartículas armazenadas sob congelamento não terem apresentado diferenças estatísticas do inicial, pode estar relacionado ao fato que as nanopartículas estavam agregadas, como foi relatado nos resultados do diâmetro médio, o que pode ter impedido que ocorressem retiradas significativas dos resíduos de PVA.

O teor de fármaco das nanopartículas foi mensurado utilizando o método validado em CLAE, onde foi realizada a leitura do sobrenadante resultante da ultracentrifugação, sendo então calculado a porcentagem de POH, em relação ao total encapsulado. Na Figura 26 está representada a porcentagem do teor de POH restante nas nanopartículas. É possível observar que a maior taxa de teor de POH, após 3 meses de incubação, foi encontrada nas amostras que foram armazenadas em temperatura ambiente, com um teor total de POH de 7,9%, e o teor liberado nas amostras refrigeradas e congeladas foram semelhantes, sendo de 3,6% e 3,5%, respectivamente.

**Figura 26.** Teor de fármaco das nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento, n=3.



Analisar a estabilidade das nanopartículas é uma etapa fundamental, pois dessa forma é possível prever quanto tempo as mesmas podem ser mantidas armazenadas, assim como quais condições são as melhores para esse armazenamento. Com os resultados obtidos do diâmetro médio e índice de polidispersão, o potencial zeta, teor de fármaco liberado e das características macroscópicas das nanopartículas de PLA-PEG contendo POH, foi possível determinar que a melhor temperatura para armazenamento das nanopartículas em água, na ausência de crioprotetores, foi a refrigerada (8°C), pois essa foi a condição que melhor manteve as nanopartículas estáveis em todos os parâmetros avaliados, garantindo estabilidade à formulação no período de 3 meses em que foi avaliada.

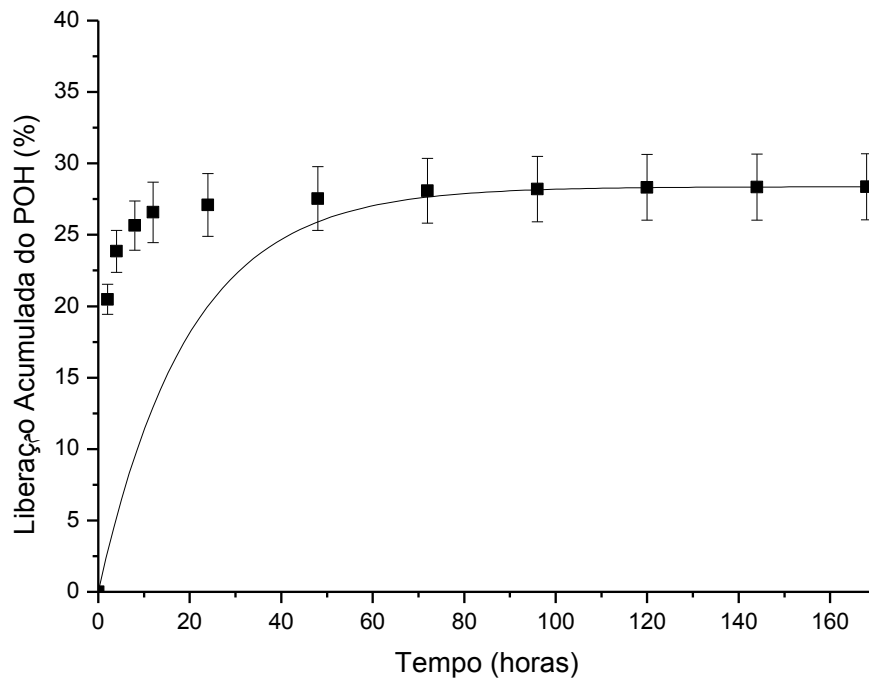
#### **4.5. Determinação do perfil de liberação *in vitro***

O ensaio para determinação do perfil de liberação *in vitro* do POH contido nas nanopartículas de blenda de PLA-PEG foi realizado conforme foi descrito no item 3.5, o qual utilizou como meio receptor de POH o tampão PBS 10 mM, pH=7,4 e foi realizado por meio de ultracentrifugação. Sendo que o perfil de liberação foi determinado pela relação do percentual de liberação em função do tempo.

É possível verificar na Figura 27 que em 2 h a porcentagem de liberação do POH foi de 20,5%, sendo que após essa liberação continuou de forma constante e lenta, e em 168 h apresentou uma taxa de liberação de 28,4%. É possível observar que inicialmente ocorreu uma liberação rápida do POH contido nas nanopartículas de blendas de PLA-PEG, sendo que esse fenômeno é denominado efeito “*burst*”, referente ao POH que pode estar adsorvido a parede das nanopartículas, seguido de uma liberação mais lenta.

O perfil de liberação encontrado foi muito semelhante ao relatado no estudo de Mohammad, o que nas primeiras 12 h ocorreu uma liberação de 17% do POH contido em micropartículas de PLGA, sendo também descrito que ocorreu o efeito “*burst*” inicialmente. Ao final do ensaio, em 168 h, a porcentagem liberada de POH foi de 30%, demonstrando um efeito de liberação prolongada e sustentada (MOHAMMAD *et al.*, 2012).

**Figura 27.** Porcentagem de liberação acumulada *in vitro* do POH a partir das nanopartículas de blendas de PLA-PEG em solução de PBS 10 mM, pH=7,4 à 37 °C.



É muito importante definir a cinética de liberação do fármaco, pois dessa forma é possível elucidar mecanismos que possam influenciar nos efeitos biológicos, relacionados ao comportamento do fármaco quando nanoencapsulado. Porém sabe-se que a liberação de fármacos a partir de formulações poliméricas é dependente de diversos fatores, como por exemplo:

- Dessorção do fármaco da superfície das nanopartículas;
- Difusão do fármaco a partir da matriz;
- Erosão da matriz polimérica;
- Combinação dos processos de difusão e erosão (SCHAFFAZICK *et al.* 2003).

Para definir qual é o modelo matemático mais adequado ao perfil de liberação do POH contido nas nanopartículas de blendas de PLA-PEG, foi analisado o coeficiente de correlação - r (quanto mais próximo de 1 mais ideal) e o critério de seleção de modelo (CSM), o qual é selecionado de acordo com o maior valor obtido, pois demonstra melhor adequação ao modelo. Os dados obtidos estão apresentando na Tabela 11.

**Tabela 11.** Análise cinética de liberação do POH a partir de nanopartículas de blendas de PLA-PEG em tampão PBS (10 mM, pH=7,4).

Modelo	r	CSM	K (h <sup>-1</sup> )
Ordem zero	0,7013	-4,1069	0,2424
Primeira ordem	0,7285	-4,0248	0,0031
Segunda ordem	0,9828	2,655	$\alpha = 3,16 \times 10^{-11} / \beta=0,1916$
Higuchi	0,7013	-4,1069	0,147

r=coeficiente de correlação, CSM = critério de seleção de modelo, k= constante de liberação.

O modelo de liberação que melhor explica o perfil de liberação do POH é o de segunda ordem, pois o mesmo apresentou valores de r e CSM maiores que os demais modelos. O modelo de segunda ordem apresenta duas constantes cinéticas, sendo que a constante  $\alpha$  é relacionada a velocidade de dissolução da etapa rápida, e a constante  $\beta$  diz respeito a etapa lenta de liberação (PEREIRA, et al., 2006).

Para predizer o tipo de mecanismo que ocorre a liberação do fármaco, é utilizado a aplicação do modelo de Korsmeyer-Peppas, o qual utiliza faixas de valores para realizar essa avaliação, sendo que  $n \leq 0,43$  significa que o mecanismo de difusão (transporte Fickniano);  $n \geq 0,85$  o mecanismo de liberação é por meio do relaxamento das cadeias poliméricas e consequente erosão do polímero (transporte não-Fickniano) e  $n$  entre a faixa de 0,43 e 0,85 é a associação entre o mecanismo de difusão e erosão (SIEPMANN & PEPPAS, 2001). Por meio dessa avaliação é possível predizer que o POH é liberado das nanopartículas de blendas de PLA-PEG por meio de difusão, pois o  $n$  obtido foi igual a 0,0552.

#### **4.6. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA-PEG contendo POH sobre hemácias**

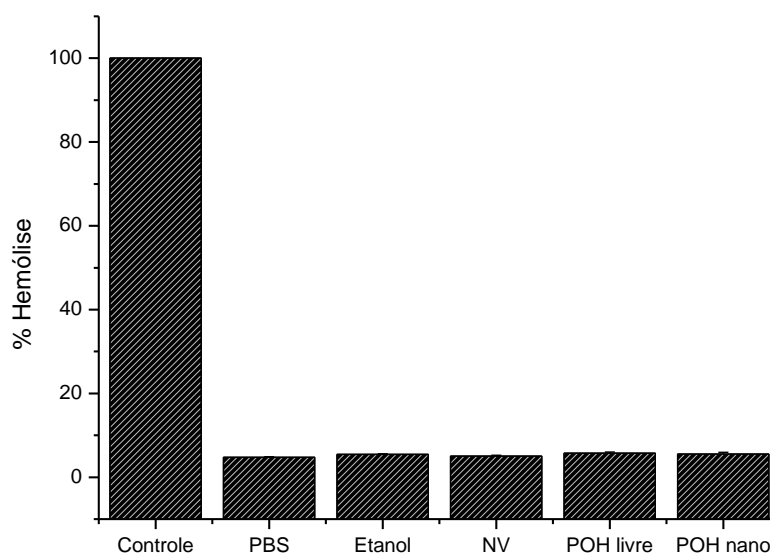
A avaliação da citotoxicidade sobre hemácias foi realizado para verificar se as nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH apresentariam ou não efeito tóxico para esse modelo experimental, visto que hemácias humanas constituem um bom modelo primário para avaliar a permeabilidade e danos causados pela ação das substâncias em estudo (VAN DE VEN *et al.*, 2012).

Quando um fármaco possui elevado grau hemolítico, uma das alternativas para reduzir é utilizar sistemas nanocarreadores, pois dessa maneira é possível obter uma liberação controlada. Um exemplo é a anfotericina B, extremamente hemolítico, que quando carregado em nanopartículas de PLA, o percentual de hemólise foi reduzido em mais de 80% (HANS & LOWMAN, 2002; CASA, *et al.*, 2014).

Não há relatos na literatura sobre o potencial hemolítico do POH na forma não encapsulada, assim foi realizado o ensaio sobre as hemácias com intuito de verificar se o sistema de nanopartículas contendo POH poderiam apresentar efeito citotóxico. Foram realizadas análises estatísticas por meio da ANOVA, com o pós-teste Tukey, com 95% de confiança, sendo que as análises não demonstraram diferenças estatísticas entre as variáveis, com  $p < 0,05$ .

O ensaio foi realizado por 24, 48 e 72 h, sendo que não houve diferença dos resultados entre os tempos de incubação. Em 72 h de incubação o POH livre na maior concentração (80  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentou um percentual de hemólise de apenas 5%, sendo que nas concentrações mais baixas testadas esse percentual foi muito próximo. O controle realizado com tampão PBS também apresentou um percentual próximo à 5%, e as nanopartículas, tanto as vazias quanto as contendo POH, apresentaram um percentual semelhante ao controle (Figura 28).

**Figura 28.** Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de blendas de PLA-PEG, na presença e na ausência de POH, sobre hemácias. POH de 80  $\mu\text{g/mL}$ , incubação de 72 h.



Nota: Tampão Fosfato de sódio (PBS), Nanopartícula vazia (NV), Nanopartícula de PLA-PEG contendo POH (POH Nano).

O resultado obtido corrobora com o que foi relatado no estudo com as nanopartículas de PLGA, no qual também foi verificado um baixo percentual de hemólise, tanto do POH na forma livre quanto com o POH nanoencapsulado (FARAZUDDIN *et al.*, 2012). Esperava-se mesmo que as nanopartículas de blendas de PLA-PEG não se apresentassem de forma citotóxica, uma vez que o PLA é muito utilizado devido as características de possuir uma ótima biocompatibilidade e baixa toxicidade (ESSA *et al.*, 2010), e o PEG é utilizado de forma ampla principalmente pela sua propriedade de possuir baixa imunogenicidade e antigenicidade (JUNG *et al.*, 2009).

#### **4.7. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA-PEG contendo POH sobre linhagem tumoral**

O ensaio de citotoxicidade foi realizado sobre a linhagem de células HEP-2, as quais foram submetidas a incubação com POH livre ou nanoencapsulado (250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62  $\mu\text{g/mL}$ ), pelos tempos pré determinados de 24, 48, 72 e 96 h. O ensaio foi realizado em quadruplicata, sendo os resultados expressos em percentual de viabilidade celular (média  $\pm$  desvio padrão).

Em todos os tempos de incubação os controles do solvente (etanol) e as nanopartículas vazias não apresentaram efeito citotóxico, com um percentual de viabilidade celular próximo a 100%. Os resultados obtidos, referentes as nanopartículas vazias, corroboram com as características descritas que são desejáveis pelos polímeros, em especial a ausência de toxicidade, sendo possível afirmar que os mesmos não possuem influência nos resultados obtidos, em relação a citotoxicidade frente as células testadas (GARLOTTA, 2001).

Nos primeiros tempos, 24 e 48 h, as nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH não apresentaram atividade citotóxica sobre as células tumorais, onde a viabilidade celular em todas as concentrações testadas foram próximas ou iguais à 100%. Enquanto que, em ambos os tempos, o POH livre apresentou na maior concentração (250  $\mu\text{g/mL}$ ) um percentual de viabilidade celular de aproximadamente 10%, e na menor concentração testada (15,62  $\mu\text{g/mL}$ ) o valor foi de aproximadamente 80%.

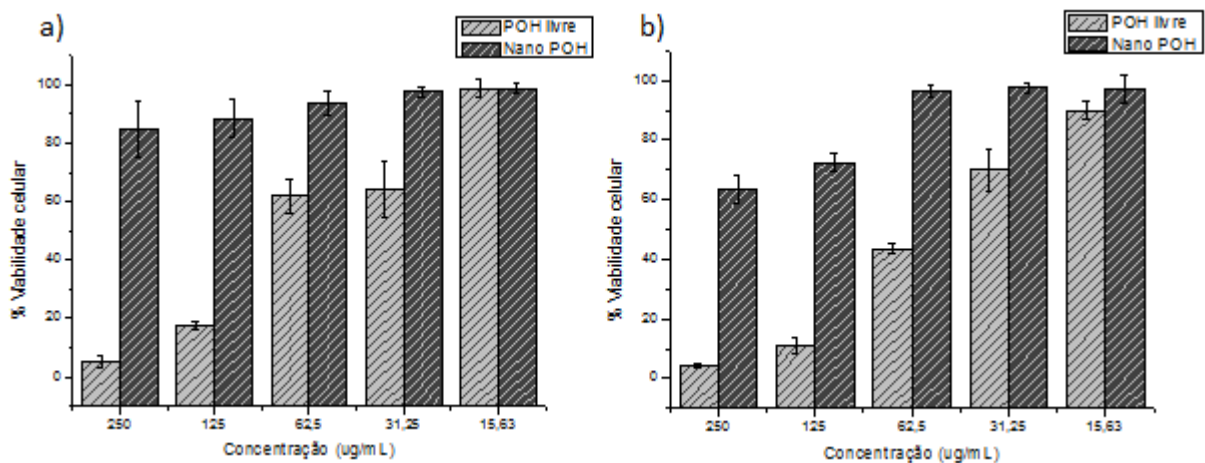
No tempo de 72 h (Figura 29 a) as nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH, na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram uma taxa de 84% de

viabilidade celular, enquanto que o POH livre apresentou 5%. E na concentração de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  as porcentagens de viabilidade celular foram de 88 e 17%, respectivamente, para POH nanoencapsulado e POH livre. Nas demais concentrações contendo as nanopartículas as células apresentaram uma viabilidade próxima a 100%.

No tempo de incubação de 96 h (Figura 29 b), é possível observar que as células incubadas com as nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH, apresentaram uma taxa de viabilidade celular menor em relação aos demais tempos de incubação, onde na concentração de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a porcentagem de viabilidade celular foi de aproximadamente de 60%, e o POH livre na mesma concentração apresentou aproximadamente 4% de células viáveis. Na concentração de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  as nanopartículas contendo POH apresentaram um menor efeito citotóxico, com 72% de células viáveis, e o POH livre nessa mesma concentração apresentou 10% de células viáveis, sendo que nas demais concentrações testadas os valores das viabilidades celulares do POH nanoencapsulado foram próximos de 100%.

A análise estatística foi realizada para 72 e 96 h pela ANOVA, com o pós-teste Tukey, com  $p < 0,05$ , sendo que não houve semelhança estatística entre as mesmas concentrações de POH encapsulado e não encapsulado entre o mesmo tempo.

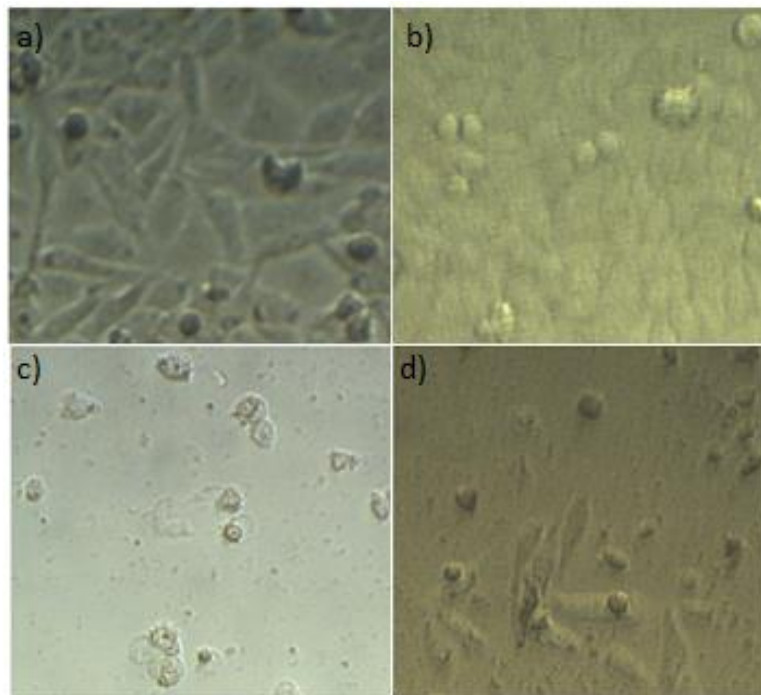
**Figura 29.** Porcentagem de viabilidade celular das concentrações de POH encapsulado e não encapsulado sobre HEP-2, em a) 72 h e em b) 96 h.



a, b, c, d, letras diferentes representam desigualdades estatísticas com índice de significância  $< 0,05$  e letras iguais indicam igualdade estatística.

A Figura 30 corrobora com os dados apresentados na Figura 29 a, onde em a) é o controle com o meio; b) controle com etanol e em c) nanopartículas vazias, sendo possível observar uma camada conflúente de células. Em d) POH livre, onde não há células viáveis, e em e) POH nanoencapsulado, observa-se a presença tanto de células viáveis como de células não viáveis, havendo concordância com o resultado apresentado de 60% de células viáveis.

**Figura 30.** Fotos do ensaio com as células HEP-2, incubadas por 96 h. a) Controle com meio b) Controle de nanopartículas vazias d) POH livre e) Nanopartículas contendo POH.



As nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH apresentaram um percentual citotóxico menor em relação ao POH livre, e esse fato pode ser explicado embasado nos resultados do ensaio de liberação *in vitro* do POH, o qual demonstrou que em 168 h é liberado aproximadamente 30% do POH. Sendo assim essa seria uma possível explicação para a menor taxa de morte celular encontrada na incubação com as nanopartículas sobre a linhagem de células tumorais testada.

Quando as características ideais das nanopartículas são obtidas é possível prever que ocorra uma boa interação com as membranas biológicas, auxiliando a penetração pelas barreiras fisiológicas (BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2004). E nos casos dos tumores, as nanopartículas podem possuir a facilidade de um direcionamento passivo, pois os mesmos apresentam vasos sanguíneos de



forma irregular, com dilatações e grandes fenestrações (SKINNER, *et al.*1990; IYER *et al.*, 2006), que acarretam o aumento do tamanho dos poros, que passam de 10-20 nm para 380-780 nm, e devido a esse fato as nanopartículas são absorvidas com maior seletividade no tumor do que no tecido saudável (PODDUTURI *et al.*, 2013).

Além que, a modulação dos parâmetros farmacocinéticos, como absorção e distribuição das partículas *in vivo*, varia segundo o tipo de polímero utilizado e a composição química da superfície. Uma vez que a variação desses parâmetros pode proporcionar aumento da absorção, melhorar o potencial de distribuição com direcionamento para sítios específicos e assim aumentar o tempo de meia-vida da droga (DESAI *et al.*, 2012). Fato esse que foi comprovado em um estudo *in vivo* com a curcumina, que quando carregada em nanopartículas de PLGA-PEG sua biodisponibilidade foi aumentada em 55 vezes (KHALIL *et al.*, 2013).

Dessa forma, mesmo com uma menor taxa de citotoxicidade das nanopartículas em relação ao POH livre, os resultados obtidos são promissores, uma vez que o desenvolvimento e caracterização das nanopartículas foram realizados de forma satisfatória, onde as nanopartículas apresentaram as características esperadas. É necessário serem realizados demais estudos com outras linhagens tumorais, assim como ensaios *in vivo*, onde será possível visualizar o direcionamento para os tumores, com uma possível melhora na atividade do POH e avaliar a biodisponibilidade do POH.

O desenvolvimento do método analítico para identificação e quantificação do POH foi realizado de forma eficaz. Os parâmetros iniciais foram baseados na literatura (GUPTA *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2005; HUA *et al.*, 2008; FARAZUDDIN *et al.*, 2012), sendo então realizadas modificações, as quais possibilitaram obter um método mais rápido e com menores custos, atendendo de maneira satisfatória todos os pontos que são determinados, de acordo com órgão regulador (ANVISA, 2003), para garantir a qualidade do método analítico desenvolvido, validando dessa forma o método em questão.

Existem muitos estudos sobre o efeito benéfico do POH frente a diversos tipos de tumores, porém na literatura são escassos os relatos sobre o POH incorporado a nanotecnologia farmacêutica, sendo que apenas uma formulação foi encontrada nos bancos de dados disponíveis: o desenvolvimento de micropartículas de PLGA contendo POH (FARAZUDDIN *et al.*, 2012).

As nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH foram produzidas pela técnica de simples emulsificação-evaporação do solvente, da forma semelhante de como as micropartículas de PLGA contendo POH foram produzidas. Sendo que com algumas modificações, assim como a utilização de polímeros diferentes, foi possível obter um diâmetro médio reduzido ao do estudo de comparação, onde as micropartículas de PLGA apresentaram 768 nm e as nanopartículas de PLA-PEG ficaram em torno de 229 nm.

A média da EE% foi de 54,61%, resultado que se mostrou interessante quando comparado a formulação de PLGA que apresentou 42,6%, pois foi possível obter um aumento de mais de 10% da taxa de encapsulação, dessa forma garantindo um melhor rendimento e com redução de custos.

Em relação as características físico-químicas, foi possível verificar com o conjunto de técnicas analisadas, que realmente foi formado um sistema nanoestruturado, o qual apresentou-se de forma amorfa. Foi possível visualizar a homogeneidade da formulação, assim como a forma esférica das nanopartículas.

O potencial zeta é considerado ideal quando encontra-se próximo de  $|30\text{mV}|$ , e para a formulação de PLA-PEG o valor obtido foi próximo ao esperado, sendo de -20,8, resultado esse bem superior ao encontrado nas micropartículas de PLGA, que foi de -7,6.

O ensaio de liberação do POH das nanopartículas resultou em dados semelhantes aos encontrados descritos para as micropartículas de PLGA, sendo que para as nanopartículas de PLA-PEG foi possível obter uma porcentagem de liberação de 28% em 168 h, e as micropartículas de PLGA liberaram 30% em 168 h.

Foi possível certificar que as nanopartículas quando armazenadas de modo refrigerado ( $8^{\circ}\text{C}$ ), continuam apresentando as características iniciais por três meses, com teor de liberação do fármaco muito baixo, inferior à 4%.

E assim como nos ensaios realizados para as micropartículas de PLGA, tanto o POH não encapsulado como as nanopartículas de PLA-PEG, também não apresentaram efeito citotóxico quando foram testadas frente as hemácias.

O ensaio realizado frente as células HEp-2, mostrou que as nanopartículas apresentaram uma atividade citotóxica de 40% em 96 h, na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que o POH livre na mesma concentração apresentou 96%, sendo provável que esse resultado esteja relacionado à liberação lenta do POH das nanopartículas.

De uma forma geral, com todos os resultados obtidos, é possível afirmar que o sistema nanoestruturado de blendas de PLA-PEG contendo POH foi obtido de forma satisfatória, assim como a metodologia analítica validada também foi interessante, uma vez que foi possível reduzir gastos e otimizar o método, o qual foi aplicado para verificar a EE% das nanopartículas.

As nanopartículas apresentaram condições físico-químicas ideais, as quais puderam comprovar a interação entre polímeros e o POH, e também foi possível confirmar a forma esférica e homogeneidade da formulação, por meio das microfotografias. Também foi interessante poder confirmar que as nanopartículas contendo POH apresentaram estabilidade no período de três meses na condição refrigerada. Além das nanopartículas não apresentarem toxicidade, quando testadas frente as células normais, e mantiveram uma atividade moderada frente as células HEp-2.

Demais estudos são necessários para confirmar a eficácia das nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH frente a tumores, em especial estudos *in vivo*, os quais possam realmente comprovar a melhora no tratamento dos tumores, com redução da necessidade de várias doses diárias, e com consequente redução dos efeitos colaterais.

## 5. CONCLUSÕES

- O desenvolvimento e a validação do método analítico por CLAE, com detecção PDA, foi realizado de forma eficaz, com os parâmetros de especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez dentro das normas regentes, permitindo a quantificação do POH das nanopartículas de PLA-PEG contendo POH;
- As nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH foram produzidas com sucesso por meio do método de simples emulsificação-evaporação do solvente;
- A taxa de encapsulação de POH nas nanopartículas foi satisfatório, uma vez que foram superiores a 50%;
- A caracterização físico-química demonstrou que as nanopartículas produzidas apresentaram um diâmetro médio reduzido, com baixo índice de polidispersão. Apresentaram também potencial zeta negativo e característica amorfa;
- Com o estudo de estabilidade no período de 3 meses, foi possível determinar que a melhor temperatura de armazenamento das nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH é a refrigerada (8°C), nas condições testadas;
- O ensaio de liberação das nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH resultou em uma porcentagem de aproximadamente 30% no período de 168 h. E o perfil de liberação cinética do POH foi determinado como sendo de segunda ordem, onde o mesmo apresenta uma liberação rápida, seguida de uma liberação lenta e constante, sendo possível prever que a liberação ocorre por meio de difusão;
- As nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH não apresentaram efeito citotóxico frente a hemácias;
- As nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH apresentaram atividade citotóxica frente as células HEp-2 de 40%, em 96 h.
- Com os resultados obtidos até o momento, pode-se concluir que o sistema formado com as nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo POH apresentam características físico-químicas adequadas, e sem citotoxicidade sobre o modelo experimental testado, com moderada atividade citotóxica frente a linhagem tumoral.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ACHARYA, S., SAHOO, S. K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 170–183, 2011.

ALEXIS, F., RHEEA, J. W., RICHIEB, J. P., RADOVIC-MORENOC, A. F., LANGERC, R., FAROKHZADA, O. C. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, p. 74–85, 2008.

ALLEN, T. M. The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 13, p. 285-309, 1994.

ALMEIDA, V.; LEITÃO, A.; REINA, L.; MONTANARI, C.; DONNICI, C. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

ANGELOVA, N. & HUNKELER, D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. **Trends in Biotechnology**, v.17, p. 409-421, 1999.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília: 02 de julho de 2003.

ARAKI, K. Estratégia supramolecular para a nanotecnologia. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1484-1490, 2007.

AZZOLI CG, MILLER VA, NG KK, KRUG LM, SPRIGGS DR, TONG WP, ET AL. A phase I trial of perillyl alcohol in patients with advanced solid tumors. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 51, p. 493-498, 2003.

BAILEY HH, WILDING G, TUTSCH KD, ARZZOMANIAN RZ, ALBERT D, FEIERABEND C, ET AL. A Phase I trial of perillyl alcohol administered four times daily for 14 days out of 28 days. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 54, p. 368-376, 2004.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils-a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BALASSIANO, I.T.; DE PAULO, S.A.; SILVA, N.H.; CABRAL, M.C.; GIBALDI, D.; BOZZA, M.; DA FONSECA, C.O.; CARVALHO, M.G.C. Effects of perillyl alcohol in glial C6 cell line in vitro and anti-metastatic activity in chorioallantoic membrane model. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 10, p. 785-788, 2002.

BARKAI, A.; PATHAK, Y. V.; BENITA, S. Polyacrylate (Eudragit Retard) Microspheres for Oral Controlled Release of Nifedipine. I. Formulation Design and

Process Optimization. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 16, n. 13, p. 2057-2075, 1990.

BARTHELMAN, M.; CHEN, W.; GENSLER, H.L.; HUANG, C.; DONG, Z.; BOWDEN, G.T. Inhibitory Effects of Perillyl Alcohol on UVB-induced Murine Skin Cancer and AP-1 Transactivation. **Cancer Research**, v. 58, p. 711-716, 1998.

BEYERLEIN, K.R., SOLLA-GULLÓN, J., HERRERO, E., PAILLOUX, F., LEONI, M., SCARDI, P., SNYDER, R.L., ALDAZ, A., FELIU, J.M. Characterization of (1 1 1) surface tailored Pt nanoparticles by electrochemistry and X-ray powder diffraction. **Materials Science and Engineering: A**, v. 528, p. 83-90, 2010.

BOIK, J. Natural compounds in cancer therapy. **1 ed. Oregon Medical Press**. Princeton, Minnesota, U.S.A. 2001.

BOOTZ, A.; VOGEL, V.; SCHUBERT, D.; KREUTER, J. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 369 – 375, 2004.

BRANNON-PEPPAS, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 116, p. 1-9, 1995.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J.O. Nanoparticles and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1649-1659, 2004.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J.; J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 530 -536, 1996.

CANAL, F.; VICENT, M. J.; PASUT, G. SCHIAVON, O. Relevance of folic acid/polymer ratio in targeted PEG–epirubicin conjugates. **Journal of Controlled Release**, v. 146, p. 388–399, 2010.

CANCER RESEARCH UK. Disponível em < <http://www.cancerresearchuk.org/>> Acesso em outubro de 2014.

CASA, D. M.; CARRARO, T. C. M. M., CAMARGO, L. E. A., DALMOLIN, L. F., KHALIL, N. M., MAINARDES, R. M. Poly(L-lactide) Nanoparticles Reduce Amphotericin B Cytotoxicity and Maintain Its In Vitro Antifungal Activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 1-7, 2014.

CERDA, S. R., WILKINSON, J., THORGEIRSDOTTIR, S., BROITMAN, S. A. R-(1)-perillyl alcohol-induced cell cycle changes, altered actin cytoskeleton, and decreased ras and p34cdc2 expression in colonic adenocarcinoma SW480 cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p. 19 –30, 1999.

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

CHOW, H-H.S.; SALAZAR, D.; HAKIM, I.A. Pharmacokinetics of Perillic Acid in Humans after a Single Dose Administration of a Citrus Preparation Rich in d-Limonene Content Cancer Epidemiology. **Biomarkers & Prevention**, v. 11, p. 1472-1476. 2002.

CLARK, S.S.; PERMAN, S.M.; SAHIN, M.B.; JENKINS, G.; ELEGBEDE, J.A. Antileukemia activity of perillyl alcohol (POH): uncoupling apoptosis from G0/ G1 arrest suggests that the primary effect of POH on Bcr/Abl transformed cells is to induce growth arrest. **Leukemia**, v. 16, p. 213–222, 2002.

COUVREUR, P., BARRAT, G., FATTAL, E., LEGRAND, P., VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.19, p. 99-134, 2002.

CROWELL, P. L. Prevention and Therapy of Cancer by Dietary Monoterpenes. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 775 – 778. 1999.

CROWELL, P. L.; REN, Z.; LIN, S.; VEDEJS, E.; GOULD, M. Structure activity relationships among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation. **Biochemical Pharmacology**, v. 47, p. 1404-1415. 1994.

CUNHA K. S.; LEHMANN M. Drogas anticancer e seus efeitos genotóxicos. **Genética toxicológica**, p. 424, 2003.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DESAI, P. P., DATE, A. A., PATRAVALE, V. B. Overcoming poor oral bioavailability using nanoparticle formulations – Opportunities and limitations. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 9, p. 87-95, 2012.

DHAVALIKAR, R.S.; BHATTACHARYYA, P.K. Protein Components of a Cytochrome P-450 Linalool 8-Methyl Hydroxylase. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 3, p. 144 – 157, 1966.

DHIRENDRA, K.; LEWIS, S.; UDUPA, N.; ATIN, K. Solid Dispersions: A Review. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v.22, p. 234-246, 2009.

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

ELEGBEDE, J.A.; FLORES, R.; WANG, R.C. Perillyl alcohol and perillaldehyde induced cell cycle arrest and cell death in BroTo and A549 cells cultured in vitro. **Life Sciences**, v. 73, p. 2831–2840, 2003.

ESSA, S., RABANEL, J. M., HILDGEN, P. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(D, L-lactide) (PLA) based nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, p. 96–106, 2010.

FARAZUDDIN, M.; SHARMA, B.; KHAN, A. A.; JOSHI, B.; OWAIS, M. Anticancer efficacy of perillyl alcohol-bearing PLGA microparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 35–47, 2012.

FERNANDES, J.; DA FONSECA, C.O.; TEIXEIRA, A.; GATTASS, C.R. Perillyl alcohol induces apoptosis in human glioblastoma multiforme cells. **Oncology Reports**, v. 13, p. 943-7, 2005.

FERRARI, C. K. B, TORRES, E. A. F. S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.48, p. 375-82, 2002.

FILHO V.W.; GATTÁS G.J.F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, 2001.

FONSECA CO, Quirico-Santos T, Carvalho MGC. Efeitos do tratamento in vitro do álcool perílico em linhagens de glioblastomas humanos. **Arquivo Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 22, p. 56-62, 2003.

FONSECA, C. O. Efeitos do tratamento in vitro e in vivo do monoterpeno álcool perílico no crescimento e controle da expressão gênica no glioma de alto grau. **Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

FONSECA, C. O.; GATTASS, C. R.; LINDEN, R.; CARVALHO, M. G.; FUTURO, D.; SANTOS, T. T. Estudo exploratório da administração intranasal do monoterpeno álcool perílico em pacientes com glioma recidivante. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 18, p. 7 – 22, 2007.

FORD, J. L., MANN, T. E. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 422–430, 2012.

GARLOTTA, D. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). **Journal of Polymers and the Environment**.v.9, p. 63-84, 2001.

GELB, M.H.; TAMANOIB, F.; YOKOYAMA, K.; GHOMASHCHI, F.; ESSONB, K.; GOULD, M.N. The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol. **Cancer Letters**, v. 91, p. 169-175, 1995.

GOUL, M. N. Cancer Chemoprevention and Therapy by Monoterpenes. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, p. 977 – 979, 1997.



GRAHAM, J. G., QUINN, M. L., FABRICANT, D. S., FARNSWORTH, N. R. Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 347–77, 2000.

GRAF, R., DOMB, A., QUELLEC, P., BLUNK, T., MÜLLER, R. H., VERBAVATZ, J. M., LANGER, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.16, p. 215-233, 1995.

GULLORY, J. K. Generation of Polymorphs, Hydrates, Solvates, and Amorphous Solids. In: **Polymorphism in Pharmaceutical**. BRITTAİN, H.G. Ed. Marcel Dekker, New York, 1999.

GUPTA, A.; MYRDAL, P.B. Development of a perillyl alcohol topical cream formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 373-383, 2004.

GUPTA, A.; STRATTON, P.S; MYRDAL, P.B. An HPLC method for quantitation of perillyl alcohol in a topical pharmaceutical cream formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 447-452, 2005.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v.2, p.147-157, 2007.

GUYTON, A.; HALL, J. C. Controle Genético da Síntese de Proteínas, do Funcionamento e da Reprodução Celular. **Tratado de fisiologia médica**. 9º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.30, 1997.

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

HARRISON, M. A.; RAE, I. F. General techniques of cell culture. New York: **Cambridge University Press**. p. 162, 1997.

HEURTAULT, B., SAULNIER, P., PECH, B., PROUST, J-E., BENOIT, J-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

HOFFMANN, F., CINATL JR. J., KABIC'KOVÁ, H., CINATL, J., KREUTER, J., STIENEKER, F. Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157, p. 189 – 198, 1997.

HUA, H.Y.; ZHAOB, Y.X.; LIUC, L.; YEA, Q.X.; GEA, S.W. High-performance liquid chromatographic and pharmacokinetic analyses of an intravenous submicron emulsion of perillyl alcohol in rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 1201-1205, 2008.

HUDES, G.R.; SZARKA, C.E.; ADAMS, A.; RANGANATHAN, S.; MCCAULEY, R.A.; WEINER, L.M. AND GALLO, J.M. Phase I pharmacokinetic trial of perillyl alcohol

(NSC 641066) in patients with refractory solid malignancies. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 3071- 3080, 2000.

HURYN, D. M.; WIPF, P. Natural product chemistry and anticancer drug discovery. **Cancer Drug Design and Discovery**, p. 107-130, 2008.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Disponível em <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)> Acesso em outubro de 2014.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: Q2B – validation of Analytical procedures: methodology, 2005.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/>> Acesso em outubro de 2014.

IYER, A. K.; KHALED, G.; FANG, J.; MAEDA, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. **Drug Discovery Today**, v. 11, p. 812–818, 2006.

JAIN, A.; JAIN, S.K. In vitro and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, p. 404 – 416, 2008.

JAKIEMIU, E. A. R. UMA CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO DE TOMILHO (*Thymus vulgaris* L.). 2008. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos)** – Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

JANSEN, J.; SONG, X.; BROOKS, D. E. Interfacial thickness of liposomes containing poly(ethylene glycol)-cholesterol from electrophoresis. **Biophysical Journal**, v. 70, p. 313 – 320, 1996.

JUNG, S.H.; LIM, D.H.; JUNG, S.H.; LEE, J.E.; JEONG, K.; SEONG, H.; SHIN, B.C. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their in vitro and in vivo characteristics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 313-320, 2009.

JUNIOR, M. R. M. & PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v. 30, p. 1 – 10, 2007.

KHALIL, N.M.; NASCIMENTO, T.C.; CASA, D.M.; DALMOLIN, L.F.; MATTOS, A.C.; HOSS, I.; ROMANO, M.A.; MAINARDES, R.M. Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.101, p.353-360, 2012.

KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsion as colloidal drug carries for intravenous administration. In: (Ed.). Submicron emulsions in drug targeting and delivery Harwood academic publishers, p.119-146, 1998.

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.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. S.T.P. **Pharma sciences**, v. 9, n.5. p. 411-418, 1999.

LEMBO D.; CAVALLI R. Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs. **Antiviral chemistry & chemotherapy**, v. 21, p.53-70, 2000.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, vol. 27, n.4, p. 670-673, 2004.

LOUTRARI, H.; HATZIAPOSTOLOU, M.; SKOURIDOU, V.; PAPADIMITRIOU, E.; ROUSSOS, C.; KOLISIS, F.N.; PAPAPETROPOULOS, A. Perillyl alcohol is an angiogenesis inhibitor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, p. 568-575, 2004.

MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M.; GREMIÃO, M. P. D. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, p.266-271, 2010.

MARTINS, I. M.; BARREIRO, M. F.; COELHO, M.; RODRIGUES, A. E. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 245, p. 191 – 200, 2014.

MCGARVEY, D.J. AND CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, p. 1015-26, 1995.

MENEZES, P.F.C.; BAGNATO, V.S.; JOHNKE, R.M.; BONNERUP, C.; SIBATA, C.H.; ALLISON, R.R.; PERUSSI, J.R.. Photodynamic therapy for Photogem and Photofrin using different light wavelengths in 375 human melanoma cells. **Laser Physics Letters**, v. 4, 7, p. 546-551, 2007.

MESA-ARANGO, A. C. MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 878-884, 2009.

MILLS, J.J.; CHARI, R.S.; BOYER, I.J.; GOULD, M.N.; JIRTLE, R.L. Induction of Apoptosis in Liver Tumors by the Monoterpene Perillyl Alcohol. **Cancer Research**, v. 55, p. 979-983, 1985.

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

MORGAN-MEADOWS S, DUBEY S, GOULD M, TUTSCH K, MARNOCHA R, ARZZOMANIN R, ET AL. Phase II trial of perillyl alcohol in patients with metastatic colorectal cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 52, p. 361-366, 2003.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON O. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**, v. 22, p. 2967-2979, 2001.

MOURA, M.R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 312, p. 477- 483, 2008.

MULLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical Characterization of Colloid Drug Delivery Systems such as Reverse Micelles, Vesicles, Liquid Crystals and Nanoparticles for Topical Administration. **Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals**, v. 58, p. 343-346, 2004.

NAJAFI, N., HEUZEY, M.C., CARREAU, P.J., WOOD-ADAMS, P.M. Control of thermal degradation of polylactide (PLA)-clay nanocomposites using chain extenders. **Polymer Degradation and Stability**. v. 97, p. 554-565, 2012.

NAKADA, M.; NAKADA, S.; DEMUTH, T.; TRAN, N.L.; HOELZINGER, D.B.; BERENS, M.E. Molecular targets of glioma invasion. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 458-78, 2007.

NCI. National Cancer Institute: at the national institutes of health. Disponível em <<http://www.cancer.gov/>> Acesso em abril de 2013.

NEVES, A. R.; LÚCIO, M.; MARTINS, S.; LIMA, J. L.; REIS, S. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p.177-187, 2013.

NEWMAN, D.J. & CRAGG, C.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461–77, 2007.

NOBILI, S.; LIPPIB, D.; WITORTC, E.; DONNINIC, M.; BAUSI, L.; MINIA, E.; CAPACCIOLIC, S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 365–378, 2009.

NOMA, Y.; YAMASAKI, S.; ASAKAWA, Y. Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus cellulosa*. **Phytochemistry**, v.31, p. 2725 – 2727, 1992.

OLIVEIRA, M. M. J. Atividade Antitumoral Do Álcool E Ácido Perílico Em Células De Leucemia Mielóide Crônica E Glioblastoma Multiforme. 2010. **Dissertação (Mestrado em Neurociências)** – Programa de Pós Graduação em Neurociências – Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2010.

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

PEREIRA, M. R.; CRUZ, L.; RÉ, M. I.; GUTERRES, S. S. Micropartículas Secas contendo Fármaco Modelo Lipofílico Preparadas a partir de Suspensão Aquosa: Estudo de Formulação. **Acta Farmacêutica Bonaerense**. v. 25, n. 2, p. 198-205, 2006.

PODDUTURI, V. P.; MAGAÑA, I. B.; O'NEA, D. P.; DEROSA, P. A. Simulation of transport and extravasation of nanoparticles in tumors which exhibit enhanced permeability and retention effect. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 112, n. 1, p. 58–68, 2013.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Quimioterapia do Cancer. In: **Farmacologia**. 5a Edicao, Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; VEIGA, A. J. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.

RIEKES, M. K.; BARBOZA, F. M. ; VECCHIA, D. D.; BOHATCH. M. JR.; FARAGO, P.V.; FERNANDES, D; SILVA, M. A. S.; STULZER, H. K. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly(3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p. 962–968, 2011.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 37-42, 1987.

SAFARI, J. & ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p. 85-99, 2014.

SAHOO, S. K., PANYAM, J., PRABHA, S., LABHASETWAR, V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide coglycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. **Journal of Controlled Release**. v. 82, p.105–114, 2002.

SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A terapia nutricional com vitaminas e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303–308, 2001.

SCHAFFAZICK, S. R. Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melatonina. 2006. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)** – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.

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

SHARMAN, W.M.; ALLEN, C.M.; VAN LIER, J.E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discovery Today**, v. 4, p. 507 – 517, 1999.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 139-157, 2001.

SILVA, M. M. C.; MADEIRA, V.M.C.; ALMEIDA, L.M.; CUSTODIO, J.B.A. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. **Biochimica et biophysica Acta**, v. 1464, p. 49-61, 2000.

SILVA, M. M. C.; MADEIRA, V. M. C.; ALMEIDA, L. M.; CUSTODIO, J. B. A. Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocyte membrane and induction of permeabilization and subsequent hemolysis. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 612-615, 2001.

SILVA, R. L. Sistema de liberação controlada de quitosana contendo antígeno capsular VI de Salmonella Typhi. 2012. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará. Belém, 2012.

SKINNER, S.; TUTON, P. J. M.; O'BRIEN, P. E. Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. **Cancer Research**, v. 50, p. 2411–2417, 1990.

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

SOUTO, E.B; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados – Parte II. **Polímeros**, vol. 22, p. 101-106, 2012.

STEARNS, V.; COOP, A.; SINGH, B.; GALLAGHER, A.; YAMAUCHI, H.; LIEBERMAN, R.; PENNANEN, M.; TROCK, B.; HAYES, D. F.; ELLIS, M. J. A Pilot Surrogate End Point Biomarker Trial of Perillyl Alcohol in Breast Neoplasia. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 7583–7591, 2004.

STOLNIK, S.; DUNN, S. E.; GARNETT, M. C.; DAVIES, M. C.; COOMBES, A. G. A.; TAYLOR, D. C.; IRVING, M. P.; PURKISS, S. C.; TADROSS, T. F.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Surface modification of poly(lactide-co-glycolide)nanospheres by biodegradable poly(lactide)-poly(ethylene glycol) copolymers. **Pharmaceutical Research**, v. 11, p. 1800- 1808, 1994.

TEIXEIRA, L. A., FONSECA, C. M. O. 2007. De Doença desconhecida a problema de saúde pública: o INCA e o controle do Câncer no Brasil / Luiz Antonio Teixeira; Cristina M. O. Fonseca. - Rio de Janeiro: **Ministério da Saúde**, 2007.

TRYTEK, M. & FIEDUREK, J. A novel psychrotrophic fungus, *Mortierella minutissima*, for D-limonene biotransformation. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 149 – 153, 2005.

VAN DE VEN, H.; PAULUSSEN, C.; FEIJENS, P. B.; MATHEEUSSEN, A.; ROMBAUT, P.; KAYAERT, P.; et al. PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome. **Journal of Controlled Release**, v.161, p. 795-803, 2012.

VANDERHOFF. J. W.; EL ASSER, M. S.; UGELSTAD, J. Polymer emulsification process. **US Patent 4**, 177, 1979.

VLACK, V.H.L. Arranjos Atômicos. In:**Princípios de Ciência dos Materiais**. São Paulo, Ed. Edgard Blucher Ltda, Cap.3, p.45-75 1970.

WHO. World Health Organization. Disponível em <<http://www.who.int/en/>> Acesso em outubro de 2014.

WISEMAN, D.A.; WERNER, S.R.; Crowell, P.L. Cell Cycle Arrest by the Isoprenoids Perillyl Alcohol, Geraniol, and Farnesol Is Mediated by p21Cip1 and p27Kip1 in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, p. 1163–1170, 2007.

WORKMAN, P.; KAYE, S. B. Cancer therapeutics. A Trends Guide with eleven reviews on various new potential approaches to the development of anticancer drugs. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, p. 1-73, 2002.

XU, M.; FLOYD, H.S.; GRETH, S.M.; CHANG, W-C.L.; LOHMAN, K.; STOYANOVA, R.; KUCERA, G.L.; KUTE, T.E.; WILLINGHAM, M.C.; MILLER, M.S. Perillyl alcohol-mediated inhibition of lung cancer cell line proliferation: potential mechanisms for its chemotherapeutic effects. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, p. 232–246, 2004.

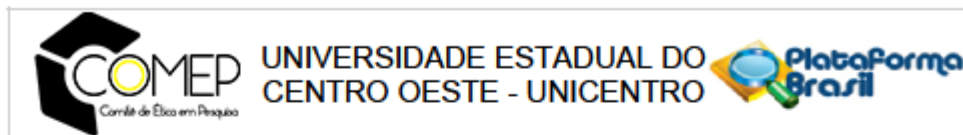
YERUVA, L.; PIERRE, J. K.; ELEGBEDE, A.; WANG, C. R.; CARPER, S. W. Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. **Cancer Letters**, v. 257, p. 216–226, 2007.

YURI, T.; DANBARA, N.; TSUJITA-KYUTOKU, M.; KIYOZUKA, Y.; SENZAKI, H.; SHIKATA, N.; KANZAKI, H.; TSUBURA, A. Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 84, p. 251–260, 2004.

ZANETTI-RAMOS, B. G.; CRECZYNSKI, T. B. O desenvolvimento da nanotecnologia: Cenário mundial e nacional de investimento. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 89, p. 95 - 101, 2008.

## 7. ANEXOS

### 7.1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de álcool perílico, tamoxifeno e de curcumina.

**Pesquisador:** Loriangela Marcell Dalposso

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 36390714.0.0000.0106

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 840.169

**Data da Relatoria:** 20/10/2014

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se da apreciação do projeto de pesquisa intitulado Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de álcool perílico, tamoxifeno e de curcumina., de interesse e responsabilidade do(a) proponente Loriangela Marcell Dalposso.

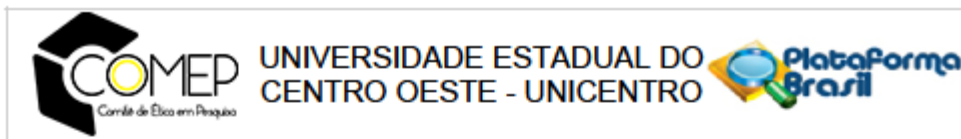
Entre os compostos amplamente estudados para o tratamento do câncer, podemos citar o tamoxifeno e a curcumina. Porém essas substâncias possuem limitações como efeitos colaterais e baixa biodisponibilidade, respectivamente. Pedroso et al., (2013), demonstraram uma diminuição da toxicidade sobre células normais e uma potencialização do efeito do tamoxifeno sobre células tumorais quando associado com a curcumina.

Assim a associação desses compostos seria uma estratégia promissora para o tratamento do câncer. O álcool perílico um constituinte do óleo essencial do d-limoneno, também está sendo estudado sobre linhagens tumorais, apresentando bons resultados. A nanotecnologia pode ser utilizada para melhorar as características desses compostos tendo um grande potencial para diminuir a toxicidade do tamoxifeno e melhorar a biodisponibilidade da curcumina, além de proporcionar uma liberação controlada em um menor número de doses.

O sangue total será coletado, de três indivíduos voluntários sadios recrutados no laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, em tubo com 10 ml de heparina, o qual será centrifugado a 4°C,

**Endereço:** Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)  
**Bairro:** Vila Carlí **CEP:** 85.040-080  
**UF:** PR **Município:** GUARAPUAVA  
**Telefone:** (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep\_unicentro@yahoo.com.br





Continuação do Parecer: 840.169

(1200g por 5 min), retirando-se o plasma. Em seguida serão realizadas às análises de atividade citotóxica.

**Objetivo da Pesquisa:**

Associar a curcumina e o CTAM em nanopartículas com finalidade de reduzir a toxicidade sobre hemácias e leucócitos polimorfonucleares (LPMN). Avaliar a toxicidade de nanopartículas contendo POH sobre hemácias.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** Utilizando de maneira correta as técnicas de biossegurança, as chances de contaminação são mínimas. O voluntário sentirá apenas um pequeno desconforto pela introdução da agulha. No caso da formação de hematoma ou abscesso cutâneo, o pesquisador tomará todas as providências para minimizar os efeitos da picada. Não envolve riscos para a saúde física ou psicológica. Será coletado aproximadamente 5 mL de sangue de cada participante.

**Benefícios:** O desenvolvimento de nanopartículas de CTAM e curcumina é benéfico, pois pode ser capaz de reduzir os efeitos tóxicos do CTAM sobre células normais e ampliar a atividade antitumoral da curcumina e do CTAM em células tumorais. As nanopartículas podem também aumentar os efeitos benéficos do POH, sem efeitos prejudiciais as células normais.

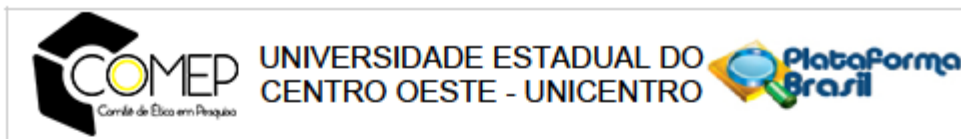
**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta tema relevante, os objetivos são bem definidos e condizentes ao título e a metodologia está bem descrita. Participarão da coleta de sangue 3 indivíduos saudáveis. A pesquisa apresenta orçamento de R\$73,00 que será financiado pela própria pesquisadora. A coleta de dados está prevista para 21/11/2014 à 22/11/2014.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- (1) Folha de rosto: Apresenta assinatura da pesquisadora responsável, e do vice-chefe do departamento de farmácia da UNICENTRO.
- (2) Carta de anuência: Apresenta autorização para utilização do laboratório de nanotecnologia farmacêutica da UNICENTRO, com assinatura do coordenador.
- (3) TCLE: Se apresenta em forma de convite.
- (4) Cronograma: Adequado.
- (5) Orçamento: Completo e com financiamento próprio.
- (6) Projeto completo: Adequado.

**Endereço:** Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)  
**Bairro:** Vila Carlí **CEP:** 85.040-080  
**UF:** PR **Município:** GUARAPUAVA  
**Telefone:** (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep\_unicentro@yahoo.com.br



Continuação do Parecer: 840.169

(7) Instrumento para coleta dos dados: Não se aplica.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

PARECER APROVADO: a presente pesquisa está em conformidade com a Resolução 466/2012.

A vigência da pesquisa é de: 21/11/2014 à 12/12/2014.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

PROJETO APROVADO

Em atendimento à Resolução CNS/MS- 466/2012, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório parcial assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa e relatório final em até trinta dias após o término da pesquisa.

Qualquer alteração no projeto deverá ser encaminhada para análise deste comitê.

GUARAPUAVA, 21 de Outubro de 2014

---

**Assinado por:**  
**Tatiane Baratieri**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)  
 Bairro: Vila Carlí CEP: 85.040-080  
 UF: PR **Município:** GUARAPUAVA  
**Telefone:** (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep\_unicentro@yahoo.com.br