



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia**

João Bosco Ferreira da Conceição

Riboflavina associada a nanopartículas de ácido poli-lático carregadas com tamoxifeno e melatonina: Síntese, caracterização físico-química, morfológica e análise citotóxica *in vitro*.

Brasília – DF

2019

João Bosco Ferreira da Conceição

Riboflavina associada a nanopartículas de ácido poli-lático carregadas com tamoxifeno e melatonina: Síntese, caracterização físico-química, morfológica e análise citotóxica *in vitro*.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia

**Orientador:** Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes

Brasília – DF

2019

João Bosco Ferreira da Conceição

Riboflavina associada a nanopartículas de ácido poli-lático carregadas com tamoxifeno e melatonina: Síntese, caracterização físico-química, morfológica e análise citotóxica *in vitro*.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Nanociências e Nanobiotecnologia

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes – UnB/FCE  
Presidente

---

Dr. Diego Juscelino Santos Dias – SEE/DF  
Membro Titular externo

---

Profa. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes – UnB/FCE  
Membro Titular interno

---

Profa. Dra. Lívia Cristina Lira de Sá Barreto – UnB/FCE  
Membro suplente

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre estar me dando força para enfrentar todas as dificuldades, e que me faz crer que tudo é possível.

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

À minha esposa, Hellen, que tem sido minha parceira e companheira de todas horas, pela compreensão, apoio e carinho durante todos esses anos.

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

Ao meu orientador, Anderson de Jesus Gomes, que me acolheu desde a iniciação científica e a Profa. Claire Nain Lunardi Gomes aos quais sou muito grato pela paciência, suporte, atenção, pelos conhecimentos compartilhados (não apenas quanto a temas científicos), vocês têm a minha admiração pois são exemplos de dedicação e sucesso acadêmico.

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

À Universidade de Brasília e o seu corpo docente que desde a graduação tem me proporcionado acesso a um nível ensino de qualidade, possibilitando o meu desenvolvimento pessoal, profissional, social e científico.

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

## Resumo

A nanomedicina vem contribuindo com os avanços no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (SLF) para combate de doenças tais como o câncer. Neste estudo, um SLF baseado em nanopartículas (NP) de PLA funcionalizadas com riboflavina (RBF) contendo tamoxifeno (TMX) e melatonina (MLT) foi desenvolvido e caracterizado *in vitro*. As NP PLA foram preparadas por emulsão seguida de evaporação do solvente. As formulações preparadas apresentaram diâmetro entre 197 e 307 nm, monodisperso e potencial zeta entre 9,0 e 23,0 mV (em módulo), além de formato esférico e regular. Análises espectroscópicas de absorção na região do UV-vis e infravermelho (FTIR) demonstram integridade dos compostos após a processo de preparo e incorporação dos fármacos à matriz polimérica da NP. A eficiência de encapsulamento variou entre 58,6 e 3,5% para o TMX, 36,6 e 6,2% para MLT e 42,1 e 4,2% para o RBF. A liberação dos compostos incorporados se deu de forma sustentada, segundo uma cinética de expressa pelo modelo de Weibull. A formulação de NP foi mais eficaz em promover a morte de células tumorais do que formulações sem NPs. As formulações desenvolvidas se mostraram adequadas para uso com SLF e eficaz para promover a morte de células tumorais.

**Palavras-chave:** Riboflavina; Tamoxifeno; Melatonina; Nanomedicina; Sistemas de Liberação de Medicamentos

## **Abstract**

Nanomedicine has extensively contributed to the development of drug delivery systems (DDS) aimed to treat diseases, such as cancer. In this study, we developed and characterized a DDS based on tamoxifen (TMX) and melatonin (MLT) loaded PLA nanoparticles (NP PLA) functionalized with riboflavin (RBF). NP PLA was prepared by the emulsion solvent evaporation method. The obtained formulations showed hydrodynamic diameter ranging from 197 to 307 nm, monodispersed system and zeta potential ranging from 9.0 to 23.0 mV (module). A regular and spherical shape was also observed. UV-vis and infrared (FTIR) analyses indicated that chemical structure of the compounds were not modified and the drug loaded was present on the NP matrix after the preparation process. Entrapment efficiency varied from 58.6 e 3.5% (TMX), 36.6 e 6.2% (MLT) and 42.1 e 4.2% (RBF) in accordance with the preparation method used. The DDS prepared showed a sustained release of the encapsulated drugs, following a Weibull kinetic model. The NPs were more effective in promote cancer cell death than free drug formulations. As a conclusion, the developed NP formulations show adequate characteristics to be used as a DDS able to combat tumour cells.

**Key words:** Riboflavin; Tamoxifen; Melatonin; Nanomedicine; Drug Delivery System

## Lista de Ilustração

- Figura 1.** Representação esquemática dos métodos de simples emulsificação (A) e dupla emulsificação (B) seguida por evaporação do solvente. Os pontos na figura representam a partículas formadas em cada método ..... 18
- Figura 2.** Estrutura química dos polímeros mais comumente utilizados como matriz para nanopartículas poliméricas biodegradáveis. A) PLA; B) PCL; C) PLGA e D) PEG. .... 19
- Figura 3.** Estrutura química do TMX.....25
- Figura 4.** Estrutura química da melatonina .....27
- Figura 5.** Estrutura química da riboflavina .....28
- Figura 6.** Representação esquemática dos métodos de simples emulsificação (A) e dupla emulsificação (B) seguido por evaporação do solvente utilizados na preparação das nanopartículas de PLA. A: 0,100g de PLA, 0,010g de TMX e 0,005g de MLT solubilizadas em DCM, seguida por adição, gota a gota e em banho de gelo, a uma solução contendo PVA 2,0% sob agitação vigorosa a 15000 rpm; B: 0,005g de RBF solubilizadas em solução aquosa contendo PVA 2,0% e 0,100 g de PLA, 0,010g de TMX e 0,005 g de MLT solubilizadas em DCM, adição da solução aquosa na solução orgânica sob agitação vigorosa formando uma emulsão água/óleo e em seguida adicionando esta emulsão em uma solução de PVA 0,2%, gota a gota sob banho de gelo e agitação a 15000 rpm. C: a emulsão foi então mantida em agitação magnética para evaporação do solvente e após – D – centrifugada para na etapa de lavagem das nanopartículas. Por fim, E – as nanopartículas foram acondicionadas a -20° C.....40
- Figura 7.** Representação esquemática das formulações de nanopartículas de PLA propostas neste estudo. A) NP de PLA vazia, B) NP de PLA contendo tamoxifeno, C) NP de PLA contendo melatonina, D) NP de PLA contendo riboflavina, E) NP de PLA contendo tamoxifeno, melatonina e riboflavina. ....41
- Figura 8.** Efeitos de diferentes parâmetros como velocidade de homogeneização (A), concentração de surfactante (B), volume de solvente (C) e proporção polímero-fármaco (D) no diâmetro e eficiência de encapsulamento de nanopartículas de PLA-TMX.....50
- Figura 9.** Curva de calibração para quantificação de tamoxifeno. Curva obtida a partir dos valores de absorbância em 280 nm. Equação de regressão linear utilizada para quantificação de tamoxifeno em amostras desconhecidas. ....53

<b>Figura 10.</b> Curva de calibração para quantificação de melatonina. Curva obtida a partir dos valores de absorvância em 278 nm. Equação de regressão linear utilizada para quantificação de melatonina em amostras desconhecidas. ....	53
<b>Figura 11.</b> Curva de calibração para quantificação de riboflavina. Curva obtida a partir dos valores de absorvância em 445 nm. Equação de regressão linear utilizada para quantificação de riboflavina em amostras desconhecidas. ....	54
<b>Figura 12.</b> Espectros de absorvância na região do UV-vis para as nanopartículas de PLA A) vazias e nanopartículas de PLA contendo B) Tamoxifeno, C) Melatonina e D) Riboflavina.....	54
<b>Figura 13.</b> Espectros de FTIR dos compostos (A) TMX, (B) MLT, (C) RBF, (D) PLA, (E) NP PLA vazias e (F) NP PLA TMX-MLT-RBF. ....	57
<b>Figura 14.</b> Gráficos de perfil de liberação da formulação de nanopartícula de PLA contendo tamoxifeno, A) perfil de liberação das primeiras 12h de incubação e B) perfil de liberação monitorado por 168h. Condições: Temperatura 37 °C, meio PBS pH 7,4. ....	60
<b>Figura 15.</b> Gráficos de perfil de liberação da formulação de nanopartícula de PLA contendo melatonina, A) perfil de liberação das primeiras 7h de incubação e B) perfil de liberação monitorado por 24h. Condições: Temperatura 37 °C, meio PBS pH 7,4. ....	61
<b>Figura 16.</b> Gráficos de perfil de liberação da formulação de nanopartícula de PLA contendo riboflavina, A) perfil de liberação das primeiras 10h de incubação e B) perfil de liberação monitorado por 168h. Condições: Temperatura 37 °C, meio PBS pH 7,4. ....	62
<b>Figura 17.</b> Comparação da viabilidade celular de células MCF-7 (A) e NIH 3T3 (B) após tratamento com formulações de Tmx encapsulado em nanopartículas de PLA (NP PLA-Tmx) e Tmx livre. Análise comparativa das médias do efeito inibitório de cada formulação.....	65
<b>Figura 18.</b> Imagens de MEV de células MCF-7 tratadas com NP PLA-TMX após 1h (A1), 8h (A2) e 24h (A4) de incubação e tratadas com NP PLA vazias após 1h, 8h e 24h de incubação (B1-B3). A4 e B4 são controles sem tratamento. As setas indicam as nanopartículas nas imagens.....	67



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Sistemas terapêuticos baseados em nanotecnologia desenvolvidos para combate ao câncer de mama.....	23
<b>Tabela 2.</b> Relação das formulações de nanopartículas de PLA preparadas segundo o método de emulsificação simples ou dupla emulsificação, funcionalizadas e não funcionalizadas com riboflavina.....	41
<b>Tabela 3.</b> Modelos matemáticos utilizados para avaliação da cinética de liberação de fármacos das nanopartículas de PLA produzidas. ....	47
<b>Tabela 4.</b> Características de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta para todas as formulações de nanopartículas de PLA produzidas.....	52
<b>Tabela 5.</b> Valores de eficiência de encapsulamento e eficiência de carregamento de fármaco para cada formulação de nanopartícula de PLA preparada. ....	58
<b>Tabela 6.</b> Coeficientes de correlação (R <sup>2</sup> ) dos dados de liberação de cada composto incorporado nas nanopartículas de PLA em relação aos modelos matemáticos estudados, bem como apresentação dos parâmetros das equações de cada modelo, obtidos por meio de regressão linear e não linear.....	64

## Lista de Abreviaturas

C-dots	Carbono dots
DCM	Diclorometano
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> - Espalhamento dinâmico de luz
EE	Eficiência de Encapsulamento
ELS	<i>Electrophoretic Light Scattering</i> - Espalhamento eletroforético de luz
FAD	Flavina Adenina Dinucleotideo
FMN	Flavina Mononucleotideo
FTIR	<i>Fourier Transformed Infrared</i> - Infravermelho por transformada de Fourier
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidermal humano
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MFA	Microscopia de força atômica
MLT	Melatonina
MSRE	Modulador seletivo do receptor de estrogênio
MT1	Receptor de melatonina 1
MT2	Receptor de melatonina 2
NICE	<i>National Institute for Health and Care Excellence</i> (Reino Unido)
NP	Nanopartícula
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBAE	Poli $\beta$ -amino Éster
PBS	Salina tampão fosfato
PCL	Poli- $\epsilon$ -caprolactona
PCS	<i>Photon Correlation Spectroscopy</i> - Espectroscopia de fóton-correlação

PdI	Índice de polidispersão	
PEG	Polietilenoglicol	
PLA	Ácido Poli-Lático	
PLGA	Ácido Poli-Lático-co-Glicólico	
PLL	Poli L-Lisina	
PVA	Álcool Polivinílico	
RE	Receptor de Estrogênio	
RH	Receptor de hormônio	
RP	Receptor de Progesterona	
Rpm	Rotações por minuto	
SER	Sistema Retículo Endotelial	
SPION	<i>Superparamagnetic iron oxide nanoparticle</i> superparamagnéticas de óxido de ferro	- Nanopartículas
SS	<i>Sample and separate</i> - Amostragem e separação	
TE	Taxa de encapsulamento	
TMX	Tamoxifeno	
UV-vis	Ultravioleta/visível	

# Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	14
<b>1.1. Nanotecnologia aplicada a saúde</b> .....	14
<b>1.2. Nanotecnologia e sistemas de liberação de fármacos</b> .....	15
<b>1.3. Nanopartículas poliméricas e biodegradáveis</b> .....	16
<b>1.4. Câncer, câncer de mama e nanomedicina</b> .....	20
<b>1.5. Tamoxifeno.</b> .....	24
<b>1.6. Melatonina.</b> .....	25
<b>1.7. Riboflavina.</b> .....	27
<b>1.8. Métodos aplicados na caracterização de sistemas de liberação de fármacos baseados em nanopartículas</b> .....	28
<i>1.8.1. Métodos utilizados para caracterização físico-química</i> .....	29
<i>1.8.2. Ensaio de perfil e cinética de liberação de agentes terapêuticos</i> .....	32
<i>1.8.3. Métodos aplicados na caracterização morfológica de sistemas nanoparticulados</i> .....	33
<b>2. Justificativa</b> .....	34
<b>3. Objetivos</b> .....	36
<b>3.1. Objetivos Gerais</b> .....	36
<b>3.2. Objetivos Específicos</b> .....	36
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	36
<b>4.1. Materiais</b> .....	36
<b>4.1.1 Reagentes</b> .....	37
<b>4.1.2 Equipamentos</b> .....	38
<b>4.1.3 Soluções</b> .....	38
<b>4.2 Obtenção das nanopartículas de PLA</b> .....	39
<b>4.3 Otimização do método de obtenção das nanopartículas de PLA</b> .....	42
<b>4.4 Caracterização físico-química das nanopartículas PLA</b> .....	42
<b>4.4.1 Diâmetro hidrodinâmico.</b> .....	42
<b>4.4.2 Potencial Zeta.</b> .....	42
<b>4.4.3 Análises Espectroscópicas</b> .....	42
<b>4.4.3.1 Espectroscopia de absorção na região do UV-vis</b> .....	42
<b>4.4.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier</b> .....	43

4.5	Caracterização morfológica das nanopartículas de PLA .....	43
4.6	Eficiência de encapsulamento.....	43
4.7	Perfil de liberação dos fármacos.....	44
4.7.1	Avaliação da cinética e mecanismo de liberação dos compostos incorporados nas nanopartículas de PLA .....	45
4.8	Avaliação citotóxica <i>in vitro</i> das nanopartículas de PLA contendo TMX 47	
4.9	Análises estatística .....	48
5.	Resultados .....	48
5.1	Otimização do método de preparo das nanopartículas de PLA.....	48
5.2	Características físico-químicas das nanopartículas de PLA.....	51
5.2.1	Diâmetro e Potencial Zeta.....	51
5.2.2	Análises espectroscópicas.....	52
5.3	Características morfológicas das nanopartículas de PLA .....	58
5.4	Eficiência de encapsulamento .....	58
5.5	Perfil e cinética de liberação .....	59
	Citotoxicidade celular <i>in vitro</i> das nanopartículas de PLA carregadas com TMX.....	65
5.6	.....	65
6.	Discussão.....	67
7.	Conclusão .....	77
8.	Referências Bibliográficas.....	78

# 1. Introdução

## 1.1. Nanotecnologia aplicada a saúde

As aplicações nanotecnológicas na área da saúde são convencionalmente denominadas nanomedicina, termo que foi oficialmente estabelecido no início da década de 1990, cerca de trinta anos após a predição de Robert P. Feynman quanto ao potencial do mundo nano (FEYNMAN, 1960; KRUKEMEYER *et al.*, 2015). Diversos dispositivos voltados a otimizar os recursos para diagnóstico e farmacoterapia têm sido desenvolvidos explorando os benefícios oriundos desta abordagem nanotecnológica. Dentre os quais, nanopartículas como sistemas de liberação de fármacos desenvolvidas com base em diversos tipos de materiais, nanopartículas com fins teranósticos, nanorobôs – um novo conceito de aplicação da nanotecnologia molecular, lipossomas, quantum dots, nanotubos de carbono, além de diversas outras ferramentas que visam impulsionar o desenvolvimento da medicina terapêutica e diagnóstica (SEIGNEURIC *et al.*, 2010; VENTOLA, 2012a; ROSENBLUM e PEER, 2014; PRASAD *et al.*, 2018).

A nanomedicina aplicada no campo do diagnóstico também vem proporcionado inovações e otimização das técnicas utilizadas nos procedimentos de identificação e caracterização de condições patológicas, conferindo a elas maior sensibilidade e especificidade diagnóstica (VENTOLA, 2012b). Tecnologias de diagnóstico por imagem, como ressonância magnética e tomografia computadorizada, são as que mais têm recebido inovações de pesquisas nanotecnológicas. Os avanços nessa área envolvem o desenvolvimento de agentes de contrastes baseados em nanopartículas paramagnéticas, nanopartículas fluorescentes, radioativas, com densidade eletrônica e ainda nanopartícula de espalhamento de luz, que podem ser utilizadas em uma diversidade de métodos aplicados no diagnóstico por imagem (VENTOLA, 2012b; SOURSOU *et al.*, 2015; DOSEKOVA *et al.*, 2017). O grande potencial associados a estes dispositivos se concentra na possibilidade de desenvolvimento de um único sistema capaz de auxiliar no diagnóstico e ao mesmo tempo tratar a enfermidade que venha a ser identificada, dispositivos estes conhecidos como sistemas teranósticos (BOLOGNESI *et al.*, 2016). John Funkhouser foi o primeiro a utilizar o termo “teranósticos” no ano de 1998 e em 2002, com seu trabalho intitulado “Reinventing pharma: the theranostic revolution”, consolidou o uso do termo e as potenciais aplicações desta nova ferramenta nanotecnológica (FUNKHOUSER, 2002; KELKAR

e REINEKE, 2011). Deste então, diversos trabalhos têm sido publicados descrevendo o desenvolvimento de dispositivos com capacidade terapêutica e diagnóstica para aplicação no combate de doenças tais como o câncer, doenças do sistema cardiovascular, do sistema nervoso central, doenças infecciosas e inúmeras outras patologias (CHOI *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2012; CHEN e HAN, 2013; CHARRON *et al.*, 2015; SOURSOU *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015; BOLOGNESI *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2017).

### **1.2. Nanotecnologia e sistemas de liberação de fármacos**

O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos baseados em nanopartículas tem recebido grande atenção da comunidade científica devido ao seu potencial em melhorar a eficácia e segurança de fármacos disponíveis no mercado. Propriedades associadas à liberação controlada e sustentada de fármacos, proteção das moléculas contra degradação não desejada e capacidade de direcionamento dos agentes terapêuticos a regiões específicas acometidas por estados patológicos são alguns dos principais benefícios do uso de nanopartículas como sistemas carreadores de fármacos (MASOOD, 2016; AFTAB *et al.*, 2018). Nanopartículas são ainda capazes de melhorar a biodisponibilidade de fármacos que apresentam baixa solubilidade, pois ao servirem como um transportador com dimensões submicrométricas e grande área superficial, permite que moléculas com baixa solubilidade em fluidos biológicos sejam facilmente transportadas através das barreiras no organismo, contribuindo, dessa forma, para redução da quantidade de fármaco que deve ser administrada para alcance da eficácia terapêutica (AFTAB *et al.*, 2018; RIZVI e SALEH, 2018).

Diâmetro das partículas, características superficiais e mecanismo de liberação dos agentes terapêuticos associados são três principais características dos sistemas de liberação baseados em nanopartículas que são fatores diretamente relacionados com sucesso ou não do uso dessas formulações como veículos para entrega de fármacos (RIZVI e SALEH, 2018). A importância dessas características na elaboração e na funcionalidade das nanopartículas como sistema de liberação compostos terapêuticos será discutida em mais detalhes adiante. Brevemente, o diâmetro das nanopartículas influencia a maneira como o organismo irá interagir com o sistema nanoparticulado, impactando na fase de distribuição das nanopartículas e na sua habilidade em alcançar os sítios alvos de interesse, além destes, pode influenciar

também em aspectos relacionados à toxicidade e remoção precoce por meio do sistema linfático (PROKOP e DAVIDSON, 2008; BARAR, 2015).

As características superficiais desses nanossistemas podem ser controladas de modo a evitar eliminação antecipada e facilitar o direcionamento das mesmas para as regiões acometidas pela doença a qual se deseja tratar, num processo conhecido como funcionalização, que pode ainda ser explorado para melhorar a estabilidade das nanopartículas após administração (MAURI *et al.*, 2017; MARTELLA *et al.*, 2018). Por fim, as características associadas ao carregamento e liberação dos fármacos associados à matriz que compõe a nanopartícula são fatores cruciais para o sucesso da utilização destes sistemas. Uma série de fatores, tais como pH, temperatura, tipo de matriz utilizada e características de solubilidade dos fármacos carregados podem influenciar o processo de liberação dos agentes terapêuticos, sendo essencial um estudo amplo e completo para garantir a funcionalidade, eficácia e segurança clínica (D'ADDIO *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2017; RIZVI e SALEH, 2018).

Dentre os tipos de sistemas desenvolvidos a partir da nanotecnologia utilizados como carregadores de fármacos podemos citar as nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas baseadas em sílica, nanopartículas plasmônicas, nanopartículas magnéticas, nanoestruturas de carbono e nanoestruturas semicondutoras (CHEN *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2018). As aplicações destes sistemas variam desde o uso para entrega de fármacos anticancerígenos até abordagens que visam combater doenças infecciosas causadas por microrganismos super-resistentes e terapia gênica, além de diversos outros focos terapêuticos (CHEN *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2017; PRASAD *et al.*, 2018).

### **1.3. Nanopartículas poliméricas e biodegradáveis**

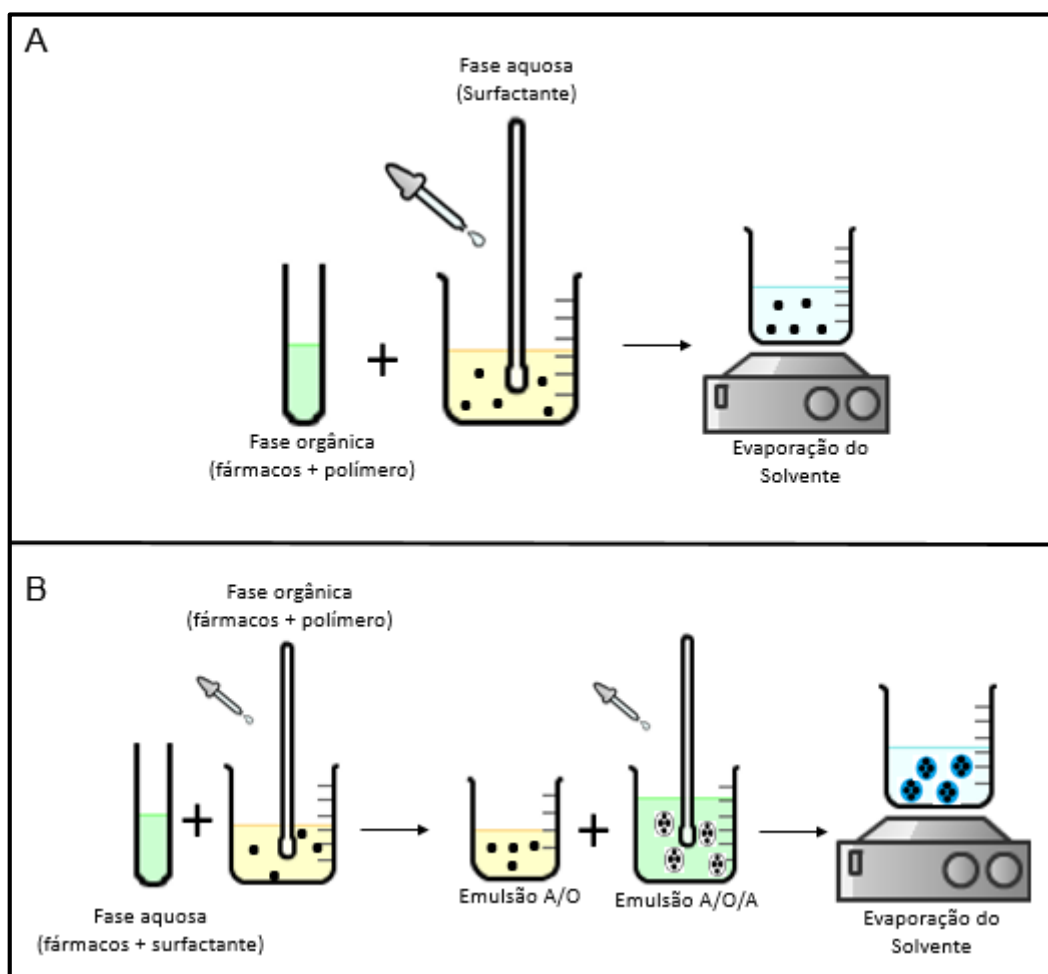
Os tipos de formulações baseadas em nanopartículas poliméricas incluem as micelas poliméricas, capsulas, dendrímeros, entre diversos outros sistemas preparadas com polímeros de origem natural ou sintética (BHARATWAJ *et al.*, 2014; NADIMI *et al.*, 2018; SEZGIN-BAYINDIR *et al.*, 2018). Aspectos relacionados à degradação e compatibilidade desses compostos são fatores que contribuem para o significativo potencial terapêutico que os sistemas de liberação baseados em nanopartículas poliméricas tem demonstrado (CHAN *et al.*, 2010). O sucesso desses sistemas está relacionado à capacidade de direcionar a entrega de fármacos a regiões



específicas do organismo e ainda permite uma liberação sustentada do composto na região alvo, aumentando a eficácia dos compostos terapêuticos ao mesmo tempo que reduz fatores associados à toxicidade e efeitos indesejados (KUMARI *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2016).

As nanopartículas poliméricas são obtidas, em geral, por métodos que envolvem auto arranjo ou a partir da formação de sistemas emulsionados. No método de auto arranjo, interações intra e intermoleculares do polímero utilizado e do polímero com os agentes que serão incorporados regem os processos que culminam na formação das nanopartículas (MOUFFOUK *et al.*, 2015; KARLSSON *et al.*, 2018). Pelo método de emulsificação as nanopartículas são obtidas a partir da preparação de uma emulsão, onde uma fase orgânica é adicionada por gotejamento a uma fase aquosa, num típico processo de formação de emulsão. A fase orgânica, que geralmente contém o polímero dissolvido e fármacos hidrofóbicos, é adicionada a uma fase aquosa contendo um agente surfactante sob agitação vigorosa para constituição das gotículas que darão origem às nanopartículas. Em seguida, o solvente orgânico é eliminado por evaporação, levando a formação das nanopartículas poliméricas (GOMES *et al.*, 2013). Os dois métodos que envolvem a formação de emulsão estão esquematizados na Figura 1.

**Figura 1.** Representação esquemática dos métodos de simples emulsificação (A) e dupla emulsificação (B) seguida por evaporação do solvente. Os pontos na figura representam as partículas formadas em cada método

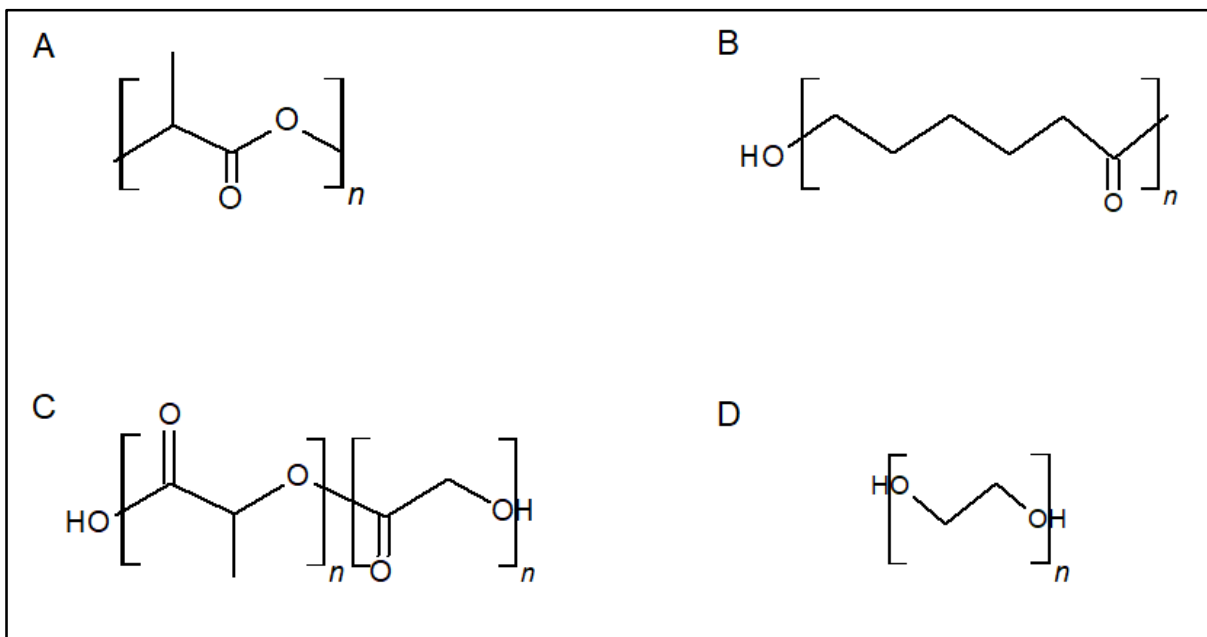


**Fonte:** O próprio autor

Polímeros naturais e sintéticos são utilizados para preparação de nanopartículas poliméricas. Quitosana, dextrana, alginato, gelatina e poli-L-lisina (PLL) são alguns exemplos de polímeros naturais derivados de polissacarídeos ou de base proteica (LIU *et al.*, 2013; KILICARSLAN *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2017). Os polímeros naturais apresentam vantagens associadas a biodegradabilidade, onde enzimas realizam a degradação destes compostos em peptídeos ou oligossacarídeos que são facilmente metabolizados pelo organismo (ULERY *et al.*, 2011). As desvantagens estão associadas à necessidade de processos de purificação, que podem ser onerosos, e a alta variabilidade entre lotes de produtos (ULERY *et al.*, 2011; KARLSSON *et al.*, 2018). Polímeros sintéticos utilizados na fabricação de nanopartículas são, em sua maioria, poliésteres ou açúcares sintéticos. Os poliésteres mais comumente aplicados (Figura 2) são o ácido poli-láctico (PLA),

ácido poli-láctico co-glicólico (PLGA), poli-ε-caprolactona (PCL), este último geralmente associado à polietilenoglicol (PEG) como estratégia para aumentar sua taxa de degradação (KUMARI *et al.*, 2010; GROSSEN *et al.*, 2017). Características associadas à biocompatibilidade destes compostos, bem como de seus produtos de degradação que são naturalmente metabolizados pelo organismo, são as principais vantagens do uso destes polímeros como base para preparação de nanopartículas (KUMARI *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2016; KARLSSON *et al.*, 2018). Os processos envolvidos na degradação destes compostos podem ainda ser explorados para obter o controle da liberação dos agentes incorporados, aumentando assim a eficácia terapêutica dos compostos utilizados (CHEN *et al.*, 2017). Carboidratos sintéticos, tal como a ciclodextrina, também podem ser utilizados como base para preparação de nanopartículas poliméricas. As possibilidades de modificações nas superfícies de partículas preparadas com carboidratos sintéticos oferecem meios para atribuir ao sistema maior especificidade para entrega do fármaco incorporado nas regiões alvo e os produtos gerados com a sua degradação são facilmente processados por vias metabólicas do organismo (ZOKAEI *et al.*, 2018).

**Figura 2.** Estrutura química dos polímeros mais comumente utilizados como matriz para nanopartículas poliméricas biodegradáveis. A) PLA; B) PCL; C) PLGA e D) PEG.



Fonte: O próprio autor (PubChem Sketcher V 2.4)

Outro tipo de polímero sintético utilizado em nanomedicina é o poli- $\beta$ -amino éster (PBAE), que apresenta características relacionadas a baixa toxicidade e elevada taxa de transfeção de material genético, além de permitir a preparação com especificidade para determinados tipos celulares (TZENG *et al.*, 2016). Essas propriedades fazem dos sistemas de liberação baseados em PBAE um potencial dispositivo para terapia gênica que envolve a entrega de genes à células-alvo e no desenvolvimento de alternativas avançadas para tratamento do câncer (TZENG *et al.*, 2016; KARLSSON *et al.*, 2018).

#### **1.4. Câncer, câncer de mama e nanomedicina**

O câncer é hoje a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável por 9,6 milhões de mortes no ano de 2018. É esperado que até o final do século XXI o câncer seja a principal causa de morte e também o principal fator de impedimento do aumento da expectativa de vida em todos os países do mundo. No Brasil, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) publicados em 2015, o câncer figurava como a segunda principal causa de morte prematura (indivíduos com menos de 70 anos de idade) (BRAY *et al.*, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018; 2019). O rápido crescimento observado nas taxas de incidência e mortalidade do câncer estão associados a diversos aspectos, dentre os quais envelhecimento e aumento populacional e modificações na prevalência e distribuição dos fatores de risco para o câncer, que estão intimamente relacionados ao desenvolvimento social e econômico (BRAY *et al.*, 2018).

Dados do GLOBOCAN 2018, trabalho elaborado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) que publica estimativas mundiais de incidência e mortalidade do câncer, demonstram que no ano de 2018, considerando ambos os sexos feminino e masculino, foram 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes associadas ao câncer. Os cânceres de pulmão (11,6%), mama (11,6%) e próstata (7,1%) lideraram a lista de taxa de incidência e os cânceres de pulmão (18,4%), estômago (8,2%), fígado (8,2%) e mama (6,6%) foram os que apresentaram as maiores taxas de mortalidade. No sexo feminino, a incidência é liderada pelo câncer de mama (24,2%), seguida pelo câncer de cólon do reto (9,5%) e pulmão (8,4%) e no sexo masculino a incidência é liderada pelo câncer de pulmão (14,5%), seguida pelo câncer de próstata (13,5%) e de cólon do reto (10,9%). Em se tratando de mortalidade,

o tipo de câncer que mais levou a morte no sexo feminino foi o câncer de mama (15,0%), seguido pelo câncer de pulmão (13,8%) e no sexo masculino o câncer de pulmão foi a principal causa de morte (22,0% dos casos), sendo o câncer de fígado o segundo maior responsável por morte associada ao câncer neste grupo de indivíduos (10,2% dos casos) (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2018).

Como pode ser observado nos dados apresentados acima, o câncer de mama é o tipo de câncer que apresenta a maior taxa de incidência e é também a principal causa de morte por câncer entre as mulheres. A complexidade dessa doença e os variados subtipos existentes são desafios para as abordagens terapêuticas disponíveis para o combate do câncer de mama (TONG *et al.*, 2018). O câncer de mama pode ser classificado em quatro subtipos principais, definidos com base na presença de dois importantes biomarcadores: receptores de hormônio (RH) – receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP) – e níveis elevados do receptor tipo 2 de fator de crescimento epidermal humano (HER2) ou cópias extras do gene *HER2* que codifica esta proteína. Os quatro subtipos de classificação são: luminal A, HER2+, Luminal B e triplo negativo. O subtipo luminal A apresenta presença de RH, sem níveis elevados de HER2 (RH+/HER2-) e o tipo luminal B além de apresentar RH, expressa também níveis elevados de proteína HER2 circulante (RH+/HER2+). Cada um desses subtipos apresenta um prognóstico diferente e possuem uma abordagem terapêutica específica (YERSAL e BARUTCA, 2014; TONG *et al.*, 2018).

O desenvolvimento de moléculas para atuar em novos alvos terapêuticos, bem como de estratégias que visam aumentar a eficácia e segurança de fármacos hoje disponíveis para o combate do câncer de mama são algumas das abordagens que vem sendo desenvolvidas com o objetivo de reduzir a mortalidade e aumentar a qualidade de vida das mulheres que convivem com essa morbidade. A nanomedicina oferece meios para o desenvolvimento de novas táticas terapêuticas para suplantar as principais dificuldades observadas no tratamento convencionalmente utilizado no câncer de mama, tais como limitações de acesso dos fármacos aos sítios onde ocorrem as metástase, degradação antecipada dos agentes quimioterápicos, desenvolvimento de mecanismos de resistência, características do microambiente tumoral que afetam a eficácia dos fármacos anticancerígenos, ação dos agentes farmacoterápicos em regiões saudáveis do corpo, originando efeitos indesejados,

propriedades intrínsecas de alguns fármacos, como baixa solubilidade e estabilidade (WU *et al.*, 2017).

O encapsulamento de fármacos com baixa solubilidade, aumentando assim sua biodisponibilidade e eficácia, o uso de nanocarreadores funcionalizados com agentes direcionadores para tecidos específicos, diminuição das doses necessárias para tratamento, alcançadas por meio de uma liberação local e sustentada promovida por nanocarreadores, que também promovem a proteção do agente terapêutico de degradação antecipada e das condições desfavoráveis do microambiente tumoral que podem afetar a eficácia do fármaco e combinação de multi-fármacos num único sistema de liberação, são algumas das maneiras como sistemas de liberação baseado em nanopartículas podem contribuir para o avanço das abordagens terapêuticas utilizadas no câncer de mama (LEE *et al.*, 2017). Tipos variados de sistemas baseados em nanomedicina têm sido estudados com foco em otimizar a eficácia de anticancerígenos convencionais, estabelecer meios para sobressair a resistência a quimioterápicos apresentadas por alguns tipos de tumores e ainda abordar novas estratégias e sítios de ação para combater o câncer de mama (Tabela 1).

**Tabela 1.** Sistemas terapêuticos baseados em nanotecnologia desenvolvidos para combate ao câncer de mama.

<b>TIPO DE NANOMATERIAL</b>	<b>COMPOSIÇÃO</b>	<b>AÇÃO TERAPÊUTICA</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
<b>NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS</b>	Nanopartículas de PLA e/ou PLGA contendo agentes moduladores do receptor de estrogênio	Liberação controlada e localizada de agentes anticancerígenos.	(HU <i>et al.</i> , 2006; KHUROO <i>et al.</i> , 2014; PANDEY <i>et al.</i> , 2015; ALTMAYER <i>et al.</i> , 2016)
<b>NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS</b>	Dendrímeros carregados com cisplatina	Combater quadros de câncer de mama resistentes à quimioterapia	(XU, X. <i>et al.</i> , 2018)
<b>NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS</b>	Micelas carregadas com taxanos	Liberação controlada e localizada para combater quadros de câncer de mama metastático	(ZHONG <i>et al.</i> , 2017)
<b>NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS</b>	Nanopartículas de base lipídica carregadas com agentes anticancerígenos	Combate a quadros de câncer de mama resistentes à quimioterapia	(GUNEY ESKILER <i>et al.</i> , 2018; XU, W. <i>et al.</i> , 2018)
<b>NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS</b>	Nanopartículas magnéticas e superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) conjugadas com anticancerígenos	Hipertermia localizada com efeito citotóxico e sistema de liberação para combater tumores metastáticos e quimiorresistentes	(PETRYK <i>et al.</i> , 2013; VYAS <i>et al.</i> , 2015; RIVERA-RODRIGUEZ <i>et al.</i> , 2018)
<b>NANOESTRUTURAS DE CARBONO</b>	Nanotubos de carbono e carbono dots (C-dots)	Sistemas para liberação de agentes anticancerígenos em regiões específicas e localizadas	(SHAO <i>et al.</i> , 2013; KONG <i>et al.</i> , 2018)
<b>NANOPARTÍCULAS BASEADAS EM SÍLICA</b>	Nanopartícula de sílica e mesoporos.	Sistema de liberação de agentes anticancerígenos e de agentes para terapia fotodinâmica	(UPPAL <i>et al.</i> , 2011; WANG <i>et al.</i> , 2013; WANG <i>et al.</i> , 2014)

### 1.5. Tamoxifeno.

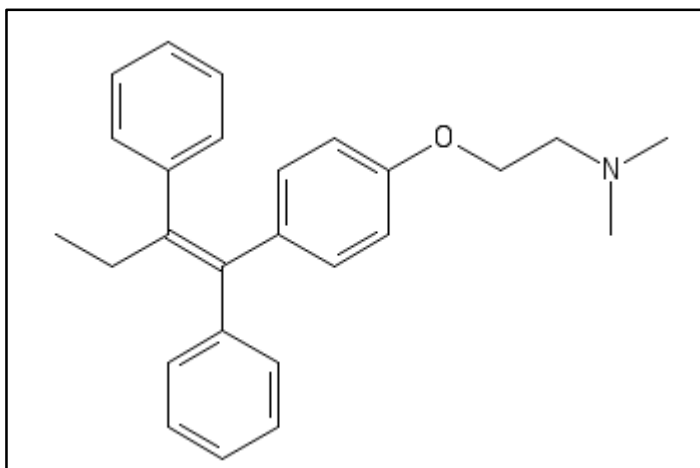
O tamoxifeno (TMX, Figura 3) é um fármaco pertencente à classe dos moduladores seletivos do receptor de estrogênio (MSRE ou SERM, do inglês *Selective Estrogen Receptor Modulators*), sendo um agente não esteroide que compete com o hormônio estrogênio por sítios de ligação no receptor de estrogênio (RE), bloqueando assim as cascatas de sinalização intracelular disparadas por esse hormônio (OSBORNE, 1998). O TMX tem sido utilizado em abordagens terapêuticas para combate ao câncer de mama por quase quatro décadas e hoje desempenha papel essencial em casos avançados e nas estratégias de terapia de adjuvante do câncer de mama (JORDAN, 1988; 1992). Baseado em dados que reportam redução na taxa de mortalidade por câncer de mama em pacientes acometidos pelo subtipo RE+, o *National Institute for Health and Care Excellence* (NICE) do Reino Unido tem adotado medidas quimiopreventivas para indivíduos enquadrados em grupo de risco para desenvolvimento de câncer de mama, que consiste em terapia por cinco anos com TMX ou raloxifeno (NAZARALI e NAROD, 2014; CUZICK *et al.*, 2015).

O mecanismo pelo qual o TMX age e combate a progressão do câncer de mama está relacionado a sua competição com o estrogênio pelo RE. Ao ligar-se a este receptor, o TMX inibe a expressão de genes regulados pelo estrogênio responsáveis pela produção de proteínas que atuam como promotores do crescimento e progressão tumoral, tais como fatores de crescimento e fatores angiogênicos, resultando num bloqueio do ciclo celular e consequente redução da proliferação de células tumorais (JORDAN, 1992).

Apesar do impacto positivo que a introdução do TMX como opção terapêutica para casos avançados e posteriormente como alternativa para terapia adjuvante em caso de câncer de mama, os efeitos adversos associados a terapia com este agente devem ser ponderados. Devido a sua interação com receptores hormonais, um dos principais eventos adversos observados na terapia com tamoxifeno são sintomas de menopausa, principalmente em mulheres que ainda não se encontram nessa fase. Outros eventos adversos associados à terapia com TMX são retinopatia (1%), tromboembolismo (<1%) – incluindo relatos de mortes associadas ao tromboembolismo, e câncer endometrial, sendo este o evento adverso mais grave associado ao uso de TMX (JORDAN, 1992; OSBORNE, 1998).



**Figura 3.** Estrutura química do TMX.



Fonte: O próprio autor (PubChem Sketcher V 2.4)

### 1.6. Melatonina.

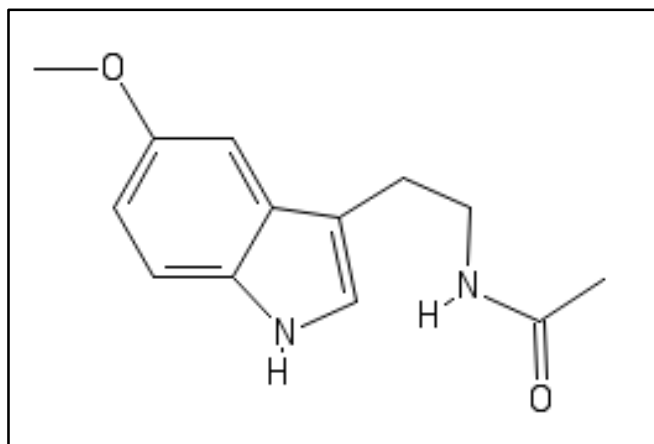
A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio endógeno cuja produção e secreção são reguladas por uma estrutura conhecida como “relógio biológico máster” localizado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo (TORDJMAN *et al.*, 2016). A estrutura molecular da melatonina é apresentada na Figura 4. A secreção de melatonina (MLT) se dá primariamente através da hipófise em resposta a baixa luminosidade do ambiente em que o indivíduo se encontra, tendo seus níveis elevado durante a noite e reduzidos durante o dia (REITER, 1991). Uma das funções mais estudadas da MLT no organismo é controlar o ritmo circadiano do corpo, auxiliando órgãos e sistemas a manter um ritmo metabólico mais apropriado ao período do dia (REITER, 1991; LI *et al.*, 2017). A MLT possui ainda diversas outras funções fisiológicas e bioquímicas que têm sido amplamente investigadas pela comunidade científica.

A ação da melatonina nos mamíferos está associada a quatro principais mecanismos de ação: ligação a proteínas intracelulares (calmodulina); ação antioxidante; ligação a receptores nucleares da família órfãos; e ligação a receptores de melatonina (MT1 e MT2). A interação da melatonina com a calmodulina tem efeitos antiproliferativos e de grande interesse na investigação do seu potencial anticancerígeno. Assim como é o seu efeito antioxidante, que além de ser explorado também como potencial alvo terapêutico para o combate a células tumorais, pode ter benefícios em uma série de outras condições patológicas em que espécies reativas de oxigênio têm relação significativa (EKMEKCIOGLU, 2006). A atuação da MLT em receptores nucleares ainda está pendente de mais pesquisas que possam melhor

elucidar as funções desses receptores e de seus ligantes no organismo. Os receptores MT1 e MT2 estão presentes em diversos tecidos e sistemas do organismo e são responsáveis por dispararem cascatas de sinalização que levam a expressão de proteínas que conduzem ações localizadas e sistêmicas, tais como modulação do tônus vascular, efeitos antiproliferativos, modulação de contrações uterinas e de receptores de hormônios sexuais, regulação da homeostasia ácido/base, entre diversas outras ações em todos os sistemas do organismo (CLAUSTRAT *et al.*, 2005; EKMEKCIOGLU, 2006).

Os efeitos antiproliferativos apresentados pela MLT têm sido explorados como potencial alvo terapêutico para o combate a diversos tipos de cânceres. A MLT tem sido associada a uma redução no risco de câncer de mama, câncer de próstata, câncer de ovário e em alguns tipos de tumores sólidos (LI *et al.*, 2017). Os mecanismos pelos quais a MLT é capaz de combater o câncer são ativação de cascatas que levam a apoptose celular, influência em padrões de metilação do DNA, supressão de angiogênese, aumento na expressão de genes pro-apoptóticos (p53, por exemplo) e atenuação dos níveis de proteínas que possuem ação proliferativa (Her2, p38, MAPK, mTOR, etc.) (MEDIAVILLA *et al.*, 1999; GRANT *et al.*, 2009; CUTANDO *et al.*, 2012; BORIN *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017; GONZALEZ-GONZALEZ *et al.*, 2018). A ação da MLT na modulação do estrogênio é um importante aspecto desse composto como potencial agente anticancerígeno para combate ao câncer de mama. A MLT tem a capacidade de suprimir a síntese de esteroides gonadais, como o estrogênio, sendo ainda capaz de inibir a ação do estrogênio no tecido mamário seja pela diminuição de estrogênio disponível ou ainda por modulação dos receptores de estrogênio no tecido mamário e repressão da atividade de enzimas envolvidas na síntese de estrogênio a partir de compostos como o colesterol ou outros esteroides (aromatases e aldo-ceto-redutases) (COS *et al.*, 2005; HILL *et al.*, 2015). A associação de MLT com agentes moduladores do receptor de estrogênio, tal como o TMX, é uma alternativa potencial para abordagens terapêuticas em estados avançados de câncer de mama (KILLOCK, 2014).

**Figura 4.** Estrutura química da melatonina



Fonte: O próprio autor (PubChem Sketcher V 2.4)

### 1.7. Riboflavina.

A riboflavina (7,8-dimetil-10-ribitil-isoaloxazina, Figura 5) ou vitamina B2 é uma vitamina hidrossolúvel que pode ser encontrada numa variedade diversa de alimentos. Ela desempenha papel importante para o funcionamento do organismo, uma vez que suas formas biologicamente ativas, conhecidas como flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), atuam em diversos processos de redução-oxidação que são essenciais para o metabolismo de células aeróbicas, atuando, principalmente como co-fatores carreadores de elétrons (POWERS, 2003).

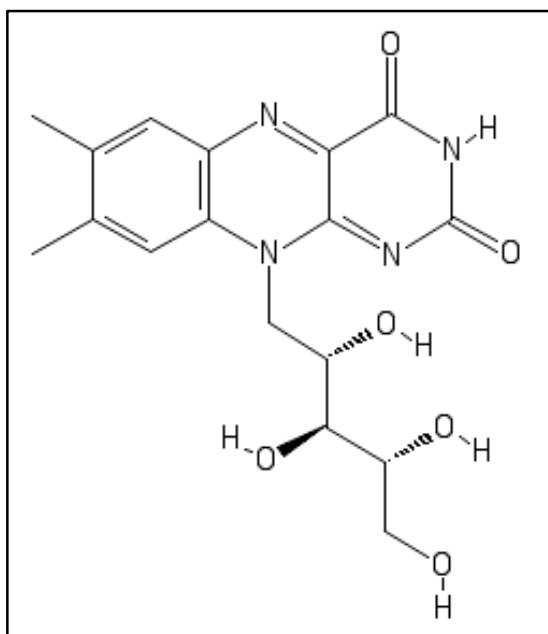
A riboflavina (RBF) se apresenta como agente essencial para o desenvolvimento e crescimento celular, uma vez que a maioria dos processos metabólicos das células envolvem reações redox dependentes de FAD ou FMN como agente co-fatores para essas reações (RIVLIN, 1973; POWERS, 2003).

Células tumorais apresentam elevadas taxas de metabolismo, pois se apresentam em constante e acelerado processo de proliferação, o que requer nutrientes para a manutenção de processos metabólicos a fim de garantir a sobrevivência e o crescimento da massa tumoral. Nessas condições, esses tecidos tendem ainda a apresentar elevada expressão de proteínas carreadoras para os agentes precursores desses co-fatores essenciais para a manutenção desses processos de multiplicação celular (TUTINO *et al.*, 2018).

O mesmo se aplica para a RBF, que é altamente requerida por células em processos proliferativos para garantir níveis adequados de FAD e FMN para suporte nos processos metabólicos (RIVLIN, 1973). Essas propriedades têm sido exploradas

no campo da nanomedicina como forma de utilizar-se dessa necessidade de compostos essenciais para manutenção de processos proliferativos, os aplicando como agentes funcionalizantes de sistemas de liberação de fármacos, de modo que funcionem como um direcionador, utilizando as características de membrana e particularidades metabólicas apresentadas por massas tumorais em proliferação. Com isso é possível garantir que os sistemas de liberação contendo agentes antitumorais se acumulem preferencialmente na região do tumor, promovendo aumento de eficácia e segurança na utilização destes sistemas (JAYAPPAUL *et al.*, 2011; BAREFORD *et al.*, 2013; BEZTSINNA *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2016; TSVETKOVA *et al.*, 2016).

**Figura 5.** Estrutura química da riboflavina



Fonte: O próprio autor (PubChem Sketcher V 2.4)

### **1.8. Métodos aplicados na caracterização de sistemas de liberação de fármacos baseados em nanopartículas**

Estudos descrevendo a produção e caracterização de diversos sistemas baseados em nanotecnologia para serem utilizados como sistema de liberação de fármacos tiveram seu início por volta dos 1970. Desde então as técnicas utilizadas para produção dos sistemas foram se aperfeiçoando, de modo a garantir a reprodutibilidade e estabilidade dos produtos e os métodos aplicados na caracterização dos sistemas também receberam grandes investimentos, no que tange a completa descrição quanto

as principais características dos sistemas elaborados. Por se tratarem de produtos cujo objetivo final é o uso em seres humanos, o conhecimento profundo a respeito das características físicas, químicas e morfológicas desses sistemas torna-se essencial. Agências reguladoras e agências de padronização e normatização têm desenvolvidos procedimentos que descrevem métodos de caracterização a fim de assegurar a qualidade e rastreabilidade das medidas, garantindo assim a eficácia e segurança desses produtos nanotecnológicos.

#### 1.8.1. Métodos utilizados para caracterização físico-química

**Tamanho.** O diâmetro apresentado por sistemas de liberação de agentes terapêuticos baseados em nanopartículas é um parâmetro fundamental na caracterização desses sistemas, uma vez que impacta diretamente na funcionalidade do sistema. Dentre os fatores afetados pelo diâmetro das nanopartículas estão sua distribuição na corrente sanguínea, habilidade para atravessar barreiras teciduais e acumular-se nos tecidos alvos, capacidade de escape do sistema reticulo endotelial e interação nanopartícula - célula alvo (HE *et al.*, 2010; SCHADLICH *et al.*, 2011; KULKARNI e FENG, 2013; CASTER *et al.*, 2017). Um método amplamente aplicado nos estudos para determinação do tamanho de sistemas nanoparticulados é o de espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) também conhecido como espectroscopia de fóton-correlação (PCS, do inglês *Photon Correlation Spectroscopy*) (BARHOUM e LUISA GARCÍA-BETANCOURT, 2018). O fundamento da técnica de DLS está baseado no espalhamento que um feixe de luz monocromática sofre ao encontro de macromoléculas ou partículas dispersas numa solução. As partículas presentes na solução obedecem a um movimento Browniano, ou seja, randômico e dependente do tamanho da partícula (quanto menor o tamanho da partícula, mais rápido é o seu movimento na solução), gerando um espalhamento em diferentes frequências do feixe de luz incidida (STETEFELD *et al.*, 2016; BARHOUM e LUISA GARCÍA-BETANCOURT, 2018). Portanto, o método de DLS realiza análise das flutuações de intensidade do espalhamento do feixe luminoso, proporcionado pelo movimento Browniano das nanopartículas em solução, determinando assim o coeficiente de difusão, parâmetro que permite a obtenção do diâmetro hidrodinâmico (tamanho efetivo) das partículas no meio líquido por meio da utilização da equação de Stokes-Einstein (STETEFELD *et al.*, 2016).

**Potencial zeta.** Características superficiais das nanopartículas também apresentam funções significativas que resultam diretamente na adequação ou não dos sistemas de liberação de fármacos desenvolvidos com base nessa nanotecnologia. O potencial zeta é a representação do potencial de superfície aparente de um sistema particulado, o qual tem correlação com a carga superficial dessas partículas. A importância da determinação do potencial zeta em sistemas nanoparticulados, desenvolvidos para uso como sistemas de liberação de fármacos, está baseado na relação dessa característica com os fenômenos de aglomeração, sedimentação e interação ou complexação com constituintes presente em um meio que podem ocorrer em suspensão de nanopartículas (AYALA *et al.*, 2013; SKOGLUND *et al.*, 2017). Os mecanismos de interação envolvidos no processo célula-nanopartícula, bem como a acumulação das nanopartículas nos tecidos alvos também são influenciados pela carga superficial apresentada pelo sistema nanoparticulado, onde partículas carregadas possuem maior habilidade de acúmulo tecidual e interação celular do que partículas com carga superficial neutra (CHUNG *et al.*, 2010; FROHLICH, 2012; AYALA *et al.*, 2013).

A técnica mais comumente aplicada na determinação do potencial zeta de partículas é a baseada no método de Espalhamento Eletroforético de Luz (ELS, do inglês *Electrophoretic Light Scattering*). Essa técnica permite a determinação do potencial zeta de nanopartículas por meio da aplicação de um campo elétrico a uma suspensão contendo as partículas, induzindo uma eletroforese. As partículas suspensas irão mover-se numa velocidade dependente de sua carga e tamanho, enquanto um feixe de luz dividido em feixe de referência e feixe de excitação, será direcionado à amostra. Ocorre então a recombinação do feixe espalhado e do feixe de referência, produzindo uma frequência diferencial em decorrência do movimento da partícula, a qual é analisada pelo detector de ELS que determina a velocidade eletroforética da partícula e, com base nessa informação e aplicação de um modelo matemático adequado, calcula o potencial zeta aparente das partículas dispersas no meio (DOANE *et al.*, 2012; SKOGLUND *et al.*, 2017; VARENNE *et al.*, 2017). O resultado final da medida é tratado como potencial zeta aparente pois o método realiza uma determinação indireta do potencial de superfície da partícula (VARENNE *et al.*, 2017).

***Espectrofotometria de UV-vis, Fluorescência e Infravermelho (FTIR).*** As técnicas de espectrofotometria têm larga aplicação em diversas linhas de pesquisa que necessitam de uma análise estrutural e molecular dos compostos investigados. A simplicidade de execução e a potencialidade das análises são atributos os quais favorecem para que suas aplicações sejam difundidas entre diversas áreas de pesquisa (NILAPWAR *et al.*, 2011; BARHOUM e LUISA GARCÍA-BETANCOURT, 2018). No campo da nanomedicina, as técnicas de espectrofotometria são essenciais nas etapas de caracterização físico-química dos sistemas nanoparticulados desenvolvidos. Identificação e quantificação de compostos, análises de interação entre os compostos utilizados na fabricação dos sistemas, estudos de estabilidade estrutural e química dos produtos elaborados, ensaios de sensibilidade e fotodegradação, além de auxílio em estudos de liberação são algumas das aplicações que as técnicas fotométricas possuem no campo da nanomedicina (LAKKADWALA *et al.*, 2014; VERISSIMO *et al.*, 2016; HOFFMANN *et al.*, 2018).

O fundamento das técnicas está na interação das moléculas de um composto em solução com a luz incidida nessa amostra, gerando os fenômenos de absorvância, transmitância e refletância da luz incidida, além excitação e emissão de fluorescência ocasionado pelo impacto da luz na estrutura molecular do composto. A espectroscopia de UV-vis é aplicada principalmente para determinações quantitativas e análises qualitativas de interações entre compostos. O fundamento da análise está na diferença entre a intensidade da luz antes de passar através de uma amostra em solução e a intensidade após atravessar a amostra, medindo, assim, a transmitância, que por sua vez é utilizada para determinação da absorvância. Devido as características moleculares e estruturais individuais, cada composto apresenta um perfil peculiar de absorção da luz em termos de região do espectro (comprimento de onda) no qual a luz é absorvida e intensidade da absorção, a qual está diretamente relacionada à concentração do composto na solução, permitindo, dessa forma, utilizar-se desta técnica para análises de identificação e quantificação (NILAPWAR *et al.*, 2011). Da mesma maneira, as propriedades específicas que cada composto tem de interagir com a luz possibilita o uso da mesma em análises de fluorescência, onde um feixe de luz, em comprimento de onda específico (geralmente ultravioleta), é utilizado para excitar as moléculas de um composto, que ao retornar ao seu estado de menor energia emite fluorescência em regiões específicas (geralmente visível) e em

intensidade proporcional a sua concentração no meio, sendo esta também uma técnica útil na identificação qualitativa e até mesmo em análises quantitativa de compostos (BARHOUM e LUISA GARCÍA-BETANCOURT, 2018). A maior limitação desta técnica está no fato de sua aplicação ser limitada a análises de compostos com capacidade de emitirem fluorescência após terem sido excitadas com uma fonte de luz.

Por fim, um outro método de análise baseado em espectrofotometria e com alto poder analítico é a espectrofotometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier Transformed Infrared*). A técnica de FTIR baseia-se na capacidade que a luz infravermelha absorvida tem de causar vibrações moleculares específicas em grupos funcionais, gerando bandas de absorção que são características para esses grupamentos químicos. Os átomos e os tipos de ligações químicas de um determinado grupo são fatores que determinam a frequência vibracional desse grupamento e, conseqüentemente, a peculiaridade de sua respectiva banda de absorção num espectro de FTIR (BERTHOMIEU e HIENERWADEL, 2009). Dada as suas propriedades analíticas, a espectrofotometria de FTIR pode ser utilizada em análises qualitativas para avaliar potenciais interações que levem a modificações estruturais e químicas de compostos, bem como para identificação de compostos específicos em uma mistura ou após um processo de fabricação, com alto grau de especificidade e sensibilidade (BERTHOMIEU e HIENERWADEL, 2009; LAKKADWALA *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2016).

#### 1.8.2. Ensaios de perfil e cinética de liberação de agentes terapêuticos

O estudo dos processos envolvidos na liberação dos agentes terapêuticos de estruturas utilizadas como sistema de liberação de fármacos garante a eficácia e segurança da utilização desses sistemas como potenciais alternativas terapêuticas. A avaliação do perfil de liberação de nanopartículas pode ser realizada por técnicas *in vivo* e *in vitro*, sendo esta última preferida devida a maior facilidade para condução dos experimentos quando comparados aos ensaios *in vivo* (D'SOUZA, 2014). No ramo das ciências farmacêuticas, os ensaios *in vitro* de análise de liberação de fármacos de estruturas sólidas é considerado uma técnica confiável para presumirem o comportamento esperado num modelo *in vivo*, desde que as condições utilizadas para a realização do ensaio sejam controladas e procurem ao máximo simular um modelo



biológico (SUNDARARAJ *et al.*, 2016). Uma série de métodos podem ser utilizados no estudo do perfil de liberação *in vitro* de fármacos incorporados a sistemas de liberação baseados em nanopartículas: diálise reversa, difusão por diálise, amostragem e separação, fluxo contínuo, ultra filtração e centrifugação, são alguns exemplos de métodos aplicados a determinação *in vitro* do perfil de liberação de fármaco incorporados em nanoestruturas(D'SOUZA, 2014). Essas técnicas podem ainda ser combinadas a fim de reduzir o impacto que as deficiências que cada uma tem em isolado pode causar aos resultados do estudo. Os métodos mais comumente aplicados na quantificação dos agentes liberados é a espectrofotometria na região do UV-vis e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (BRANQUINHO *et al.*, 2014). A importância dos estudos de perfil de liberação está na sua capacidade em gerar informações úteis para definição de dosagens e posologia para avaliação das formulações em ensaios clínicos, além de permitir ainda elucidar os mecanismos envolvidos na cinética de liberação dos compostos, contribuindo com informações e detalhes para o contínuo melhoramento científico e avanço no desenvolvimento das formulações.

### *1.8.3. Métodos aplicados na caracterização morfológica de sistemas nanoparticulados*

**Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Transmissão (MET) e Força Atômica (MFA).** As técnicas de microscopia têm proporcionado ao campo da nanomedicina meios para o seu estabelecimento como uma alternativa segura e eficaz para aplicação terapêutica e diagnóstica. Os avanços nas técnicas voltadas para obtenção de imagens a nível atômico, permite a visualização e caracterização dos sistemas nanoparticulados quanto a aspectos morfológicos, de maneira a elucidar os potenciais de interação com sistemas biológicos. Imagens de microscopia eletrônica de varredura e transmissão têm auxiliado no exame detalhado de propriedades estruturais das nanopartículas, podendo inferir informações quanto ao diâmetro, estabilidade, agregação, dispersão e forma (RAY *et al.*, 2016; MANAIA *et al.*, 2017). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um método de imagem que utiliza feixes de elétrons acelerados que realizam uma varredura superficial na amostra. Os elétrons que atingem a amostra interagem com a mesma gerando sinais que refletem detalhes topográficos e de composição atômica dos espécimes

analisados, proporcionando a obtenção de imagens de elevada resolução (LIN *et al.*, 2014). A microscopia eletrônica de transmissão (MET) também é fundamentada na utilização de um feixe de elétrons acelerados. A obtenção das imagens em alta resolução se dá através da transmissão do feixe de elétrons através de um espécime ultrafino da amostra analisada, providenciando informações químicas em detalhes em uma resolução espacial a nível de dimensão atômico (BARHOUM e LUISA GARCÍA-BETANCOURT, 2018). Um método que vem ganhando aceitabilidade e importância dentro do campo das análises morfológicas aplicadas à nanomedicina é a microscopia de força atômica (MFA). Suas vantagens estão relacionadas a habilidade de obtenção de imagens sem causar significativos danos às superfícies dos materiais estudados e, ainda, aplicabilidade em análises de diversos materiais biológicos em fluidos aquosos com capacidade de determinações em escala sub-nanométrica (PAROT *et al.*, 2007). As imagens de MFA são obtidas por meio da varredura que uma sonda realiza na superfície da amostra analisada, utilizando uma ponteira pontiaguda localizada na extremidade de uma estrutura com formato de arco (cantiléver). Forças inter-atômicas entre a amostra e a ponteira são medidas durante o processo de varredura pela probe acoplada à estrutura que forma o cantiléver. Variações dessas forças no decorrer da varredura promovem deformações no cantiléver que são medidas, por sua vez, pela deflexão de um feixe de laser que incide na estrutura. A deflexão do laser é então monitorada por um fotodetector que o converte em sinais elétricos que são utilizados para formação das imagens (TRACHE e MEININGER, 2008).

## **2. Justificativa**

Os elevados índices de incidência do câncer de mama no mundo têm levado cada vez mais indivíduos a necessitar de cuidados de saúde associados à quimioterapia e outras alternativas terapêuticas voltadas para combate do câncer de mama. As medidas farmacológicas tradicionalmente aplicadas para promover a regressão de tumores mamários, geralmente, vêm acompanhada de sérios eventos adversos que causam impacto negativo na qualidade de vida do indivíduo (TAO *et al.*, 2015).

Os principais fatores associados aos eventos adversos sofridos pelos pacientes sob quimioterapia são a distribuição sistêmica do agente terapêutico por todo o

organismo, fazendo com que seu efeito citostático ou citotóxico recaia também sobre tecidos saudáveis do paciente susceptíveis a ação desses fármacos. Além disso, estão associados também as propriedades químicas dos agentes terapêuticos, como baixa solubilidade em meios aquosos e conseqüente reduzidos índices de biodistribuição e biodisponibilidade no organismo, pouca seletividade por tecidos acometidos pela doença e instabilidade frente a presença de enzimas ou outras proteínas a agentes que impactam na atividade farmacológica dos princípios ativos utilizados.

Tais limitações são usualmente superadas através de aumento da quantidade e na frequência de doses a serem administradas, de modo a compensar as perdas relacionadas a degradação ou a limitação em atravessar as barreiras biológicas para alcançar a corrente sanguínea e obter uma distribuição adequada pelo organismo e acúmulo efetivo nos sítios de alvo de ação. Outra alternativa é o uso de adjuvantes, que atuam por meio de redução ou bloqueio de fatores que limitam a ação dos fármacos no organismo (KAYL e MEYERS, 2006). Contudo, essas alternativas são estritamente focadas na garantia da eficácia terapêutica dos medicamentos utilizados, não levando em conta a segurança terapêutica e proporcionando mais riscos para ocorrência de eventos indesejáveis relacionados ao uso dos medicamentos.

Sistemas inteligentes para liberação sustentada de fármacos se estabelecem com alternativas seguras e eficazes para garantir aumento da eficácia terapêutica de diversos fármacos ao passo que permite utilização segura e potencial redução de efeitos adversos. Isso se dá pelo fato de os sistemas de liberação poderem ser projetados para aumentar a solubilidade de fármacos, e conseqüentemente reduzindo a necessidade de doses necessárias para tratamento eficaz, protegem as moléculas do fármacos contra fatores que promovem degradação ou eliminação precoce dos agentes, podem ainda ser funcionalizadas para guiar e concentrar o acúmulo das moléculas do fármacos em regiões específicas e limitadas, evitando uma distribuição sistêmica do fármaco pelo organismo e livrando tecidos saudáveis de efeitos nocivos que esses fármacos podem lhe causar (BRIGGER *et al.*, 2002; HU *et al.*, 2015; SADAT *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2017; AFTAB *et al.*, 2018; MAZUMDAR *et al.*, 2018).

Por fim, o desenvolvimento de sistemas de liberação contendo agentes terapêuticos que possuem efeitos farmacológicos sinérgicos, tal como o TMX e a MLT,

associados a substâncias funcionalizantes capazes de direcionar os carreadores especificamente para as regiões de tecido tumoral, como a RBF, promovendo a liberação sustentada dos fármacos incorporados na região alvo tem grande potencial para a aplicação na terapia do câncer. Seus benefícios trazem segurança e eficácia a terapia farmacológica e promovem melhoria na qualidade de vida dos pacientes submetidos aos esquemas de quimioterapia.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivos Gerais**

O objetivo geral deste estudo é produzir e caracterizar formulações de nanopartículas biodegradáveis de ácido poli-láctico contendo os compostos tamoxifeno, melatonina e riboflavina, este último como agente funcionalizante, e avaliar o perfil e cinética de liberação destes agentes e a eficácia do sistema no tratamento de câncer de mama.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Caracterizar os sistemas quanto as propriedades físico-químicas, definindo suas características de diâmetro hidrodinâmico, carga superficial (potencial zeta), eficiência de encapsulamento e propriedades espectroscópicas das formulações obtidas.
- Caracterizar o sistema quanto as propriedades morfológicas através de microscopia eletrônica de varredura.
- Determinar, com base em modelos matemáticos tradicionais, os mecanismos e a cinética envolvida no processo de liberação dos agentes incorporados às nanopartículas de PLA.
- Avaliar o potencial citotóxico das formulações preparadas em células de linhagem cancerígena e não cancerígena
- Avaliar o perfil de captura celular apresentado por modelos de células alvo, investigando os benefícios do uso de riboflavina como agente funcionalizante para este sistema de liberação.

### **4. Materiais e Métodos**

#### **4.1. Materiais**

#### 4.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nas etapas de preparação e caracterização das nanopartículas de PLA estão listados abaixo:

- Ácido poli-láctico – PLA,  $(C_3H_4O_2)_n$ , massa molar ~60000 g/mol, grau de pureza 99%, obtido da Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, EUA).
- Álcool polivinílico – PVA – hidrolisado (87,0 – 89,0%),  $(C_2H_4O)_x$ , massa molar entre 13000 e 23000 g/mol, obtido da Sigma-Aldrich.
- Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio – MTT,  $(C_{18}H_{16}BrN_5S)$ , massa molar 424,3 g/mol, obtido da Sigma-Aldrich.
- Brometo de Potássio – KBr, massa molar 119,0 g/mol, pureza >99,0%, obtido da Sigma-Aldrich.
- Diclorometano P.A. – DCM,  $CH_2Cl_2$ , massa molar de 84,9 g/mol, pureza >99,0%, obtido da Sigma-Aldrich.
- Dimetilsulfóxido P.A. – DMSO,  $(CH_3)_2SO$ , massa molar de 78,1 g/mol, pureza >99,0%, obtido da Merck® (Darmstadt, Alemanha).
- D-MEM (do inglês, Dulbeco's Modified Eagle's Medium), obtido da Gibco® BRL (Grand Island, NY, EUA).
- Fosfato de sódio dibásico di-hidratado,  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ , massa molar de 178,0 g/mol, pureza > 99,0%, obtido da Vetec Química Fina® (Sigma-Aldrich).
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , massa molecular de 138,0 g/mol, pureza >98,0%, obtido da Vetec Química Fina.
- Glutaraldeído (solução aquosa),  $OHC(CH_2)_3CHO$ , massa molar de 100,1 g/mol, teor 25%, obtido da Sigma-Aldrich.
- Melatonina – MLT,  $C_{13}H_{16}N_2O_2$ , massa molar de 232,3 g/mol, grau de pureza >99,0%, obtido da Sigma-Aldrich.
- Riboflavina (Vitamina B2) – RBF, massa molar de 376,3 g/mol, grau de pureza >99,0%, obtido da Merck.
- Soro fetal bovino – SFB, nível de endotoxinas abaixo de 5,0 unidades/mL e hemoglobina abaixo de 10,0 mg/dL, obtidos da Gibco BRL.
- Tamoxifeno – TMX,  $C_{26}H_{29}NO$ , massa molar 371,5 g/mol, grau de pureza >98,0%, obtido da Sigma-Aldrich.
- Tripsina de pâncreas bovino (pó liofilizado), massa molecular de 24 kDa, 7500 unidades BAEE/mg, obtido da Sigma-Aldrich.

#### **4.1.2 Equipamentos**

A relação abaixo descreve os equipamentos e instrumentos utilizados na preparação e análises de caracterização das nanopartículas de PLA.

- Agitador tipo Vortex, modelo Labdance, IKA®.
- Agitador magnético com aquecimento, modelo RH basic 2, IKA.
- Agitador magnético, modelo Topolino, IKA.
- Balança analítica, modelo AX200, Shimadzu®.
- Centrífuga para microtubos, modelo MiniSpin, Eppendorf®.
- Dispersador ULTRA-TURRAX®, modelo T25 equipado como ferramenta de dispersão S25N-25F, IKA.
- Dispersador ULTRA-TURRAX, modelo T10 equipado com ferramenta de dispersão S10-5G, IKA.
- Espectrofotômetro de fluorescência, modelo F-7000, Hitachi®.
- Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier, modelo IRPrestige-21, Shimadzu.
- Espectrofotômetro para leitura de microplacas, modelo M2, SpectraMax®.
- Espectrofotômetro Ultravioleta/Visível, modelo Lambda™ 25, PerkinElmer®.
- Estufa incubadora CO<sub>2</sub>, modelo 8000 WJ, ThermoScientific®.
- Analisador de tamanho e potencial zeta de partículas, modelo ZetaSizer NANO ZS, Malvern Instruments®.
- Micropipetas automáticas (2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000; µL; 5000 µL), modelo Ecoppette, Capp®.
- Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo FEI™ Quanta 250 FEG, FEI Company

#### **4.1.3 Soluções**

- Solução de PVA 2,0%:

Soluções estoque de PVA na concentração de 2,0% (m/v) foram preparadas por meio da dissolução de 10,0 gramas de PVA em água destilada aquecida a 70 °C e sob agitação magnética. Após completa dissolução da massa de PVA, o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 500 mL, onde foi adicionado 5,0 mL de solução contendo agentes antimicrobianos e em seguida

o volume foi completado para 500 mL. A solução foi estocada em frascos de 50 mL, hermeticamente fechados e acondicionados em ambiente refrigerado.

- Solução tampão fosfato de sódio (PBS):

Solução tampão fosfato (PBS, do inglês *Phosphate buffered saline*) foi preparada a partir da solubilização de 9,0 g de cloreto de sódio, 0,520 g de fosfato de sódio monobásico e 2,3 g de fosfato de sódio dibásico em 1,0 L de água ultrapura para obtenção de uma solução de PBS a 0,1 mol/L e pH 7,4. Após o preparo da solução, o pH da mesma foi medido e ajustado, se necessário, com solução de HCl 0,1 mol/L ou NaOH 0,1 mol/L.

- Solução aquosa de Glutaraldeído 2,5%

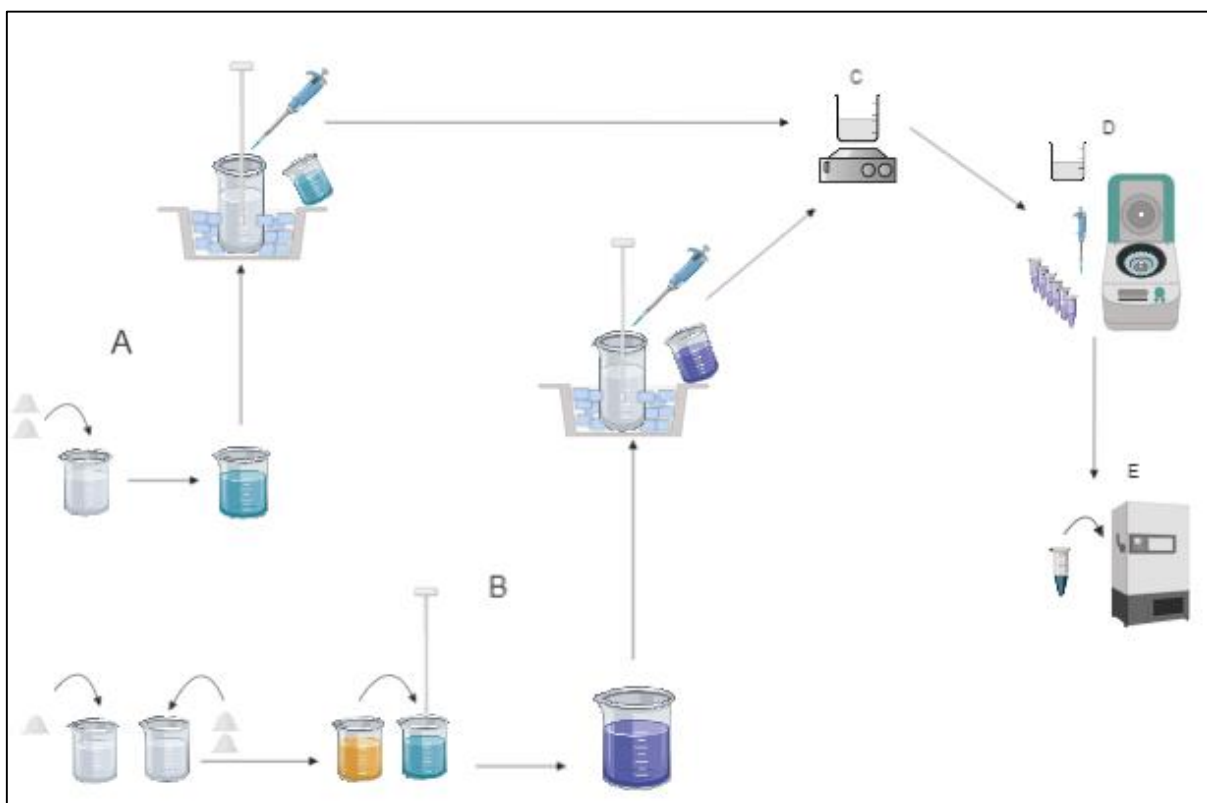
A solução aquosa de glutaraldeído a 2,5% foi preparada a partir da diluição de uma solução de glutaraldeído a 25%. Para tanto, um volume de 10,0 mL da solução de glutaraldeído a 25% foi adicionado a um balão volumétrico e 100,0 mL e o volume do balão completado com água ultrapura. A solução preparada foi estocada em frascos âmbar, hermeticamente fechados e acondicionadas em temperatura refrigerada.

## 4.2 Obtenção das nanopartículas de PLA

Neste trabalho foram utilizados dois métodos na produção das nanopartículas de PLA: emulsificação simples e evaporação do solvente e dupla emulsificação seguida por evaporação do solvente, ambos estão amplamente descritos na literatura científica (NAVA-ARZALUZ *et al.*, 2012; PINON-SEGUNDO *et al.*, 2012). Brevemente, uma solução contendo 100,0 ( $\pm 10$ ) mg de PLA, 10,0 mg TMX e 5,0 mg de MLT foram solubilizados em 5 mL de diclorometano e adicionada, gota a gota e sob agitação vigorosa (15000 rpm em banho de gelo), a 20 mL de uma solução aquosa de PVA a 2,0%, formando uma emulsão óleo/água. Em seguida, esta emulsão foi mantida em agitação magnética a temperatura ambiente por 4 horas para evaporação do solvente e nanoprecipitação das partículas formadas (Figura 6). As nanopartículas funcionalizadas com RBF foram obtidas por meio da dupla emulsificação, na qual 1,0 mL de solução aquosa de PVA 2,0% contendo 5,0 mg/mL de RBF foi adicionada a uma solução orgânica contendo PLA e TMX ou PLA, TMX e MLT em diclorometano, sob agitação vigorosa, formando uma primeira emulsão água/óleo. A dupla emulsificação foi então obtida pela adição desta primeira emulsão à uma segunda

solução aquosa contendo PVA a 0,2%, formando uma segunda emulsão água/óleo/água. Em seguida o diclorometano foi eliminado por meio de agitação magnética em temperatura ambiente por 5 horas (Figura 6). Nanopartículas de PLA vazias foram produzidas segundo o mesmo método, porém sem a adição de TMX, MLT e RBF. Após evaporação do solvente, a solução contendo as formulações de nanopartículas de PLA preparadas em suspensão foram centrifugadas e lavadas com água destilada. O sobrenadante de cada etapa de lavagem foi recolhido e preservado para análise da eficiência de encapsulamento. Após o processo de lavagem, as nanopartículas foram mantidas congeladas a -20 °C.

**Figura 6.** Representação esquemática dos métodos de simples emulsificação (A) e dupla emulsificação (B) seguido por evaporação do solvente utilizados na preparação das nanopartículas de PLA. A: 0,100g de PLA, 0,010g de TMX e 0,005g de MLT solubilizadas em DCM, seguida por adição, gota a gota e em banho de gelo, a uma solução contendo PVA 2,0% sob agitação vigorosa a 15000 rpm; B: 0,005g de RBF solubilizadas em solução aquosa contendo PVA 2,0% e 0,100 g de PLA, 0,010g de TMX e 0,005 g de MLT solubilizadas em DCM, adição da solução aquosa na solução orgânica sob agitação vigorosa formando uma emulsão água/óleo e em seguida adicionando esta emulsão em uma solução de PVA 0,2%, gota a gota sob banho de gelo e agitação a 15000 rpm. C: a emulsão foi então mantida em agitação magnética para evaporação do solvente e após – D – centrifugada para na etapa de lavagem das nanopartículas. Por fim, E – as nanopartículas foram acondicionadas a -20° C



Fonte: O próprio autor

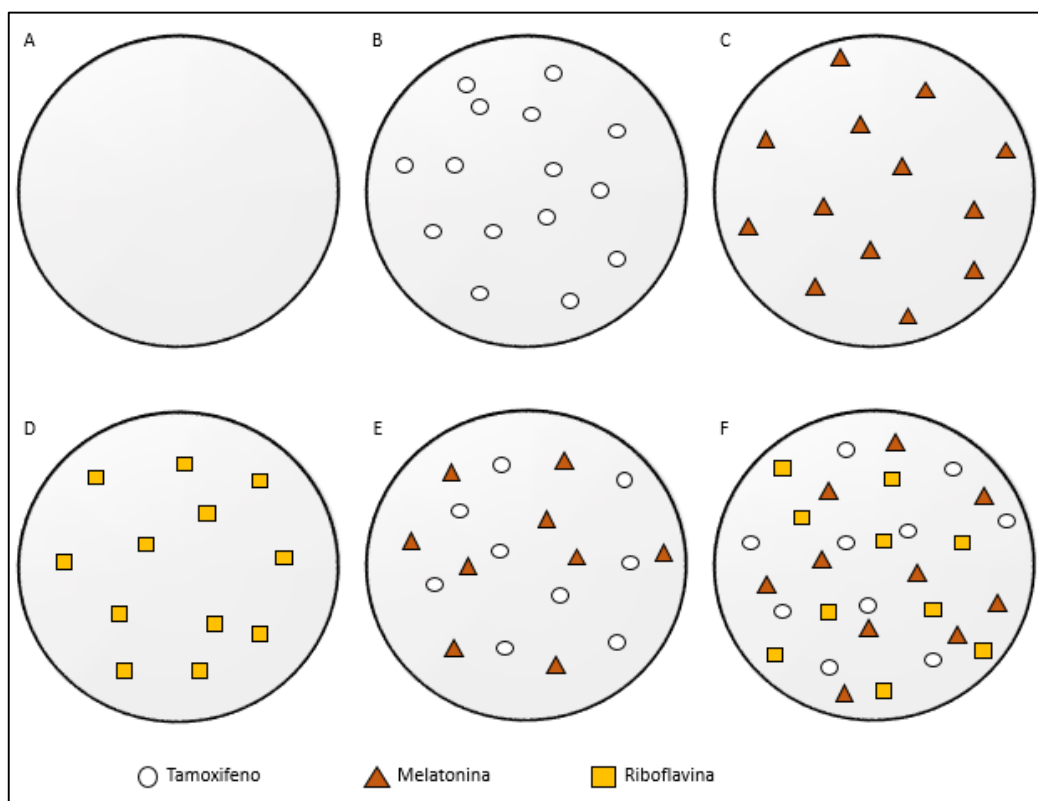


As formulações de nanopartículas de PLA produzidas neste estudo, bem como suas respectivas composições, estão apresentadas na Tabela 1, e a Figura 7 apresenta uma representação esquemática das formulações de nanopartículas propostas neste estudo.

**Tabela 2.** Relação das formulações de nanopartículas de PLA preparadas segundo o método de emulsificação simples ou dupla emulsificação, funcionalizadas e não funcionalizadas com riboflavina

<b>Formulação</b>	<b>Composição</b>
<i>NP PLA Vazias</i>	PLA apenas (vazias)
<i>NP PLA-TMX</i>	NP de PLA carregadas com tamoxifeno
<i>NP PLA-MLT</i>	NP de PLA carregadas com melatonina
<i>NP PLA-RBF</i>	NP de PLA vazias funcionalizadas com riboflavina
<i>NP PLA TMX-MLT</i>	NP de PLA carregadas com tamoxifeno e melatonina
<i>NP PLA TMX-MLT-RBF</i>	NP de PLA carregadas com tamoxifeno e melatonina funcionalizadas com riboflavina

**Figura 7.** Representação esquemática das formulações de nanopartículas de PLA propostas neste estudo. A) NP de PLA vazia, B) NP de PLA contendo tamoxifeno, C) NP de PLA contendo melatonina, D) NP de PLA contendo riboflavina, E) NP de PLA contendo tamoxifeno e melatonina F) NP de PLA contendo tamoxifeno, melatonina e riboflavina.



Fonte: O próprio autor

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

As variáveis velocidade de homogeneização, concentração de PVA, volume de solvente e proporção polímero fármaco foram analisadas e controladas a fim de obter as condições ideais para produção e aperfeiçoar o método de preparo das nanopartículas de PLA. As variáveis foram analisadas de acordo com o impacto no diâmetro hidrodinâmico médio e eficiência de encapsulamento do fármaco tamoxifeno, utilizado como referência para este estudo.

### **4.4 Caracterização físico-química das nanopartículas PLA**

#### **4.4.1 Diâmetro hidrodinâmico.**

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas preparadas foi determinado por meio de espalhamento de dinâmico de luz (DLS). Uma alíquota de 100,0 µL de cada uma das formulações de nanopartículas preparadas foi resuspendida em 1,5 mL de água destilada e em seguida homogeneizada. A distribuição de tamanho e índice de polidispersão (Pdl) foram determinados utilizando o instrumento Zetasizer Nano ZS, a temperatura de 25 °C em ângulos de espalhamento de 173° e 12°. Cada amostra foi analisada em triplicata.

#### **4.4.2 Potencial Zeta**

As medidas de potencial zeta, parâmetro diretamente relacionado a carga e densidade superficial das nanopartículas, foram realizadas utilizando o instrumento Zetasizer Nano ZS. As amostras de nanopartículas (contendo TMX, MLT e funcionalizadas com RBF) foram resuspendidas em 1,0 mL de água ultrapura e transferidas para uma cubeta eletroforética para determinação do potencial zeta. Cada amostra foi analisada em triplicata.

#### **4.4.3 Análises Espectroscópicas**

##### **4.4.3.1 Espectroscopia de absorção na região do UV-vis**

Foram obtidos espectros de absorção na região do UV-vis dos compostos utilizados neste estudo e também das formulações de nanopartículas produzidas. Para a obtenção dos espectros, amostras dos compostos TMX e MLT foram dissolvidas em diclorometano e RBF dissolvida em água purificada, em seguida as amostras foram analisadas no instrumento Lambda<sup>TM</sup> 25 e os dados de absorção utilizados para elaboração de curvas de calibração para os compostos. As curvas de

calibração obtidas foram posteriormente aplicadas nos ensaios de quantificação desses compostos associados às nanopartículas. As análises das formulações de nanopartículas foram realizadas após ressuspensão de uma alíquota em tampão fosfato. Os dados espectroscópicos foram utilizados para análise de interações entre os compostos utilizados na produção de cada formulação de nanopartícula.

#### **4.4.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier**

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada na etapa de investigação de potenciais interações entre a matriz polimérica das nanopartículas e os compostos associados a fim de avaliar possíveis alterações estruturais dos compostos após o processo de preparação das nanopartículas. Foram obtidos espectros de cada uma das formulações de nanopartícula de PLA (TMX, MLT, RBF, TMX-MLT e TMX-MLT-RBF), bem como de cada um dos compostos isolados. Para obtenção dos espectros, aproximadamente 5,0 mg da amostra foi misturado com 200,0 mg de brometo de potássio, a mistura foi macerada para homogeneização e em seguida prensada a 80,0 KN, por 3 minutos, para obtenção de pastilhas. As análises foram realizadas utilizando o instrumento IRPrestige-21, no qual para cada leitura foram realizadas 40 medidas na região entre 400,0 a 4000,0  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4,0  $\text{cm}^{-1}$  no modo de porcentagem de transmitância.

#### **4.5 Caracterização morfológica das nanopartículas de PLA**

A caracterização morfológica das nanopartículas de PLA preparadas foi realizada a partir de microscopia eletrônica de varredura. Para tanto, uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de nanopartícula em suspensão foi depositada sobre uma lamínula suportada por um stub. As amostras foram então mantidas em dessecador por 24 horas e, em seguida, metalizadas com 50 nm de camada de ouro em atmosfera de argônio. As amostras foram analisadas e fotografadas nos aumentos de 500 e 2000 vezes utilizando o microscópio eletrônico de varredura FEI™ Quanta 250, operando a 10 kV no modo de detecção de elétrons secundários (SE1 Detector).

#### **4.6 Eficiência de encapsulamento.**

A eficiência de encapsulamento foi determinada por meio do método indireto, a partir de análises de espectroscopia de UV-vis do sobrenadante recolhido durante a

fase de lavagem, na etapa de preparação das nanopartículas de PLA. O volume total de sobrenadante recolhido foi registrado para cada preparação. Uma alíquota do sobrenadante foi recolhida e analisada por espectrofotometria na região do UV-vis, nos comprimentos de onda respectivos de cada composto investigado (280 nm para o TMX, 278 nm para MLT e 445 nm para RBF). O branco para análises dos sobrenadantes os quais continham uma mistura dos compostos avaliados foi ajustado para minimizar potenciais interferências entre os compostos nas análises de absorção, por meio da adição dos compostos não analisados na amostra branco. As absorbâncias medidas em cada comprimento de onda foram então aplicadas nas curvas de calibração desenvolvidas para cada analito e previamente validada para este método. O perfil de encapsulamento foi expresso como a Eficiência de carregamento (EC) do fármaco em nanopartícula (m/m) e como eficiência de encapsulamento (EE), representados pelas Equação 01 e Equação 02, respectivamente:

**Equação 1.**  $EC (\%) = (massa\ de\ fármaco\ na\ NP \div massa\ total\ de\ NP) \times 100$

**Equação 2.**  $EE (\%) = (massa\ de\ fármaco\ na\ NP \div massa\ total\ de\ fármaco) \times 100$

#### **4.7 Perfil de liberação dos fármacos.**

O estudo de perfil de liberação dos fármacos incorporados nas nanopartículas de PLA foi realizado pelo procedimento de amostragem e separação (SS – do inglês, *sample and separate*), conforme descrito na literatura (NOTHNAGEL e WACKER, 2018). Para tanto, amostras de cada formulação de nanopartículas foram pesadas e transferidas para frascos contendo 5,0 mL de meio composto por tampão PBS. OS frascos contendo a suspensão de nanopartículas foram mantidos em temperatura controlada a 37 °C ( $\pm 2,0$  °C) e em agitação magnética constante. Após períodos definidos de incubação (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias), uma alíquota de 1,5 mL foi recolhida do frasco e centrifugada a 14500 rpm por 10 minutos para separação das nanopartículas do meio contendo o fármaco liberado. O sobrenadante foi então analisado por espectrofotometria na região do UV-vis e cada composto analisado de acordo com a absorbância em comprimentos de ondas específicos (280 nm para o TMX, 278 nm para MLT e 445 nm para RBF) e curva de calibração própria. Após amostragem e separação, um volume igual de tampão fosfato fresco foi utilizando para

repor as nanopartículas removidas ao frasco contendo o meio de liberação para que as condições fossem mantidas durante o estudo.

O perfil de liberação das primeiras 24 horas foi analisado de forma mais detalhada, também por espectrofotometria na região do UV-vis. Para esta fase, uma alíquota da formulação de nanopartícula foi suspensa em 2,0 mL de tampão PBS e transferida para uma cubeta de quartzo, à qual foi adicionado uma barra de agitação. Análises de absorvância em comprimentos de onda específicos de cada composto foram coletadas a cada 100 segundos por um período total de 24 horas, utilizando-se o método TimeScan® do instrumento Lambda™ 25. Os valores de absorvância foram utilizados para determinação da quantidade de fármaco liberado, com base em curvas de calibração previamente validadas no instrumento utilizado e na taxa de encapsulamento apresentada.

#### **4.7.1 Avaliação da cinética de liberação dos compostos incorporados nas nanopartículas de PLA por meio de modelos matemáticos**

Os dados obtidos com o estudo de perfil de liberação das formulações preparadas neste estudo foram analisados de acordo com os principais modelos matemáticos aplicados nos estudos de perfis de dissolução matricial, difusão e liberação de fármacos. Os modelos aplicados foram selecionados com base em seus respectivos conceitos teóricos e de acordo com suas aplicabilidades a sistemas de liberação de fármacos baseados em nanopartículas e micropartículas poliméricas. Ao todo, sete modelos cinéticos diferentes foram selecionados e suas respectivas equações estão apresentadas na Tabela 3.

*Ordem 0.* Modelos de ordem 0 são geralmente aplicados a sistemas cuja a desagregação matricial não contribui para processo de liberação dos fármacos incorporados. As formas farmacêuticas que seguem essa cinética liberam a mesma quantidade de fármacos por unidade de tempo, numa relação que é explicada pela Equação 03.

*1ª Ordem.* A Equação 04 apresenta um modelo de cinética de 1ª Ordem, que se aplica quando o processo de liberação do fármaco depende do tempo, da quantidade de fármaco liberado e da quantidade de fármaco ainda associado à matriz do sistema. Nesse caso, a quantidade de fármaco liberado por unidade de tempo tende a diminuir (COSTA e LOBO, 2001).

*Korsmeyer-Peppas.* O modelo de Korsmeyer-Peppas correlaciona de forma exponencial a quantidade de fármaco liberado de um sistema com o tempo decorrido desde o início do processo de liberação. Esse modelo ainda permite a caracterização do mecanismo de liberação, por meio do expoente de liberação  $n$ . A Equação 05, que representa este modelo, se aplica para processos que envolvem difusão Fickiana e também a modelos que apresentam comportamento anômalo de liberação.

*Higuchi.* A Equação 06 descreve o modelo de Higuchi (simplificado), o qual é utilizado para descrever processos de liberação de fármacos associados a mecanismos de difusão baseados na lei de Fick e dependente do tempo (raiz quadrada do tempo). Este modelo é utilizado, em geral, na descrição dos perfis de liberação de fármacos hidrossolúveis associados a matrizes sólidas (SIEPMANN e PEPPAS, 2011).

*Weibull.* O modelo de Weibull (Equação 07) pode ser aplicado com sucesso a inúmeros tipos de curvas de dissolução e, quando aplicadas para elucidação de processo de liberação de fármacos, expressa a fração de fármaco acumulada em solução em razão do tempo.

*Hixson-Crowell.* O modelo de Hixson-Crowell, representando na Equação 08, correlaciona o processo de liberação de fármacos incorporados em matrizes sólidas com a concentração inicial de fármaco no sistema, a quantidade remanescente de fármaco nesse sistema por unidade de tempo com uma constante que incorpora a relação superfície-volume do sistema de liberação. A aplicação deste modelo a perfis de liberação assume que a taxa de liberação é limitada pela taxa de dissolução das partículas do fármaco e não pela difusão que pode ocorrer através da matriz polimérica do sistema (COSTA e LOBO, 2001).

*Baker-Lonsdale.* A Equação 09 representa o modelo de Baker-Lonsdale, o qual é baseado no modelo de Higuchi e descreve a liberação de fármacos de matrizes esféricas. Esse modelo correlaciona os parâmetros de quantidade de fármaco liberado em uma unidade de tempo, a quantidade estimada liberada num tempo infinito, o coeficiente de difusão, a solubilidade do fármaco na matriz e o raio da matriz esférica do sistema.

**Tabela 3.** Modelos matemáticos utilizados para avaliação da cinética de liberação de fármacos das nanopartículas de PLA produzidas.

NÚMERO DA EQUAÇÃO	NOME DO MODELO	EQUAÇÃO
03	Ordem 0	$Q = K t + Q_0$
04	1ª Ordem	$Q = Q_0 e^{K t}$
05	Korsemeyer-Peppas	$Q = K t^n$
06	Higuchi	$Q = K \sqrt{t}$
07	Weibull	$m = 1 - \exp [-(t)^b/a]$
08	Hixson-Crowell	$Q^{1/3} = K t + Q_0^{1/3}$
09	Baker-Lonsdale	$3/2 [1 - (1 - Q)^{2/3} - Q = K t$

Os parâmetros dos modelos de número 05, 07 e 08 foram calculados a partir de regressão não linear e os parâmetros dos modelos de número 03, 04, 06 e 09 foram obtidos via regressão linear. Q = quantidade de fármaco liberado num determinado período de tempo;  $Q_0$  = valor inicial de Q; t = tempo; K = constante do respectivo modelo; n = expoente de liberação; m = quantidade de fármaco liberado ( $Q = 100\% * m$ ); a = constante de tempo; b = parâmetro de forma (*shape parameter*).

As adequações de cada uma das equações dos modelos estudados foram avaliadas segundo os valores de R<sup>2</sup> obtidos a partir da regressão linear ou não-linear dos dados de liberação dos compostos. Para as análises linear, os dados foram antes transformados para obter uma relação linear entre os dados de liberação. O modelo com melhor adequação foi utilizado para elucidar os mecanismos envolvidos no processo de liberação dos compostos incorporados à matriz polimérica das nanopartículas de PLA.

#### 4.8 Avaliação citotóxica *in vitro* das nanopartículas de PLA contendo TMX

Para condução do ensaio de perfil citotóxico da formulação de nanopartícula de PLA contendo TMX, foram utilizadas células MCF-7, de linhagem tumoral como modelo para o câncer de mama e células de linhagem murina (3T3) como modelo para tecido não tumoral. As células foram mantidas em cultura em meio DMEM, acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico em estufa umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Uma quantidade de 4×10<sup>3</sup> células por cm<sup>2</sup> foram semeadas em placa de poliestireno de 96 poços e mantidas em condição de cultura celular. As células foram tratadas com formulação de TMX livre, nanopartículas de PLA vazias e nanopartículas de PLA contendo TMX em cinco concentrações diferentes. A análise de viabilidade celular após os tratamentos foi realizada pelo

método colorimétrico do MTT (DADRAS *et al.*, 2017), o qual foi conduzido após 24h e 48h de incubação. Regressão linear de Deming foi aplicada na curva de viabilidade para determinação do IC<sub>50</sub> de cada formulação (ALTMAYER *et al.*, 2016). Alterações estruturais nas superfícies das células foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. Após incubação das células com as formulações de nanopartículas em intervalos de tempo específicos (8h e 24h), as mesmas foram lavadas três vezes com 2,0 mL de PBS e, em seguida, fixadas utilizando glutaraldeído 2,5%. Depois de fixadas, as lamínulas contendo as amostras de células com nanopartículas foram enxaguadas com PBS e mantidas em temperatura ambiente para secagem. Em seguida, as lamínulas foram montadas em *stubs*, metalizadas com 50 nm de camada de ouro em atmosfera de argônio e submetidas a análise nos aumentos de 500 e 2000 vezes utilizando o microscópio eletrônico de varredura FEI™ Quanta 250, operando a 10 kV no modo de detecção tradicional (SE1 Detector).

#### **4.9 Análises estatística**

Os experimentos conduzidos neste estudo foram realizados em triplicata e os dados numéricos apresentados como média aritmética das três medidas  $\pm$  desvio padrão. Análises de variância, teste *t Student* e teste de *Turkey* foram aplicados para avaliação das diferenças estatísticas entre grupos, sendo que um valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas GraphPad Prism® Versão 5.03, Microsoft Office Excel® 360 e KinetDS 3.0 Ver. 2010.

## **5. Resultados**

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

Aspectos como velocidade de homogeneização, concentração de surfactante (PVA), volume de solvente e a razão entre polímero e fármaco foram controladas a fim de otimizar as características de diâmetro médio, potencial zeta e eficiência de encapsulamento das nanopartículas de PLA contendo TMX.

A velocidade de homogeneização aplicada durante a formação da emulsão no preparo das nanopartículas foi variada entre 5000 e 20000 rpm, enquanto os demais parâmetros foram mantidos a uma constante. Os resultados obtidos demonstram que quanto mais alta a velocidade de homogeneização aplicada, menor é o diâmetro das



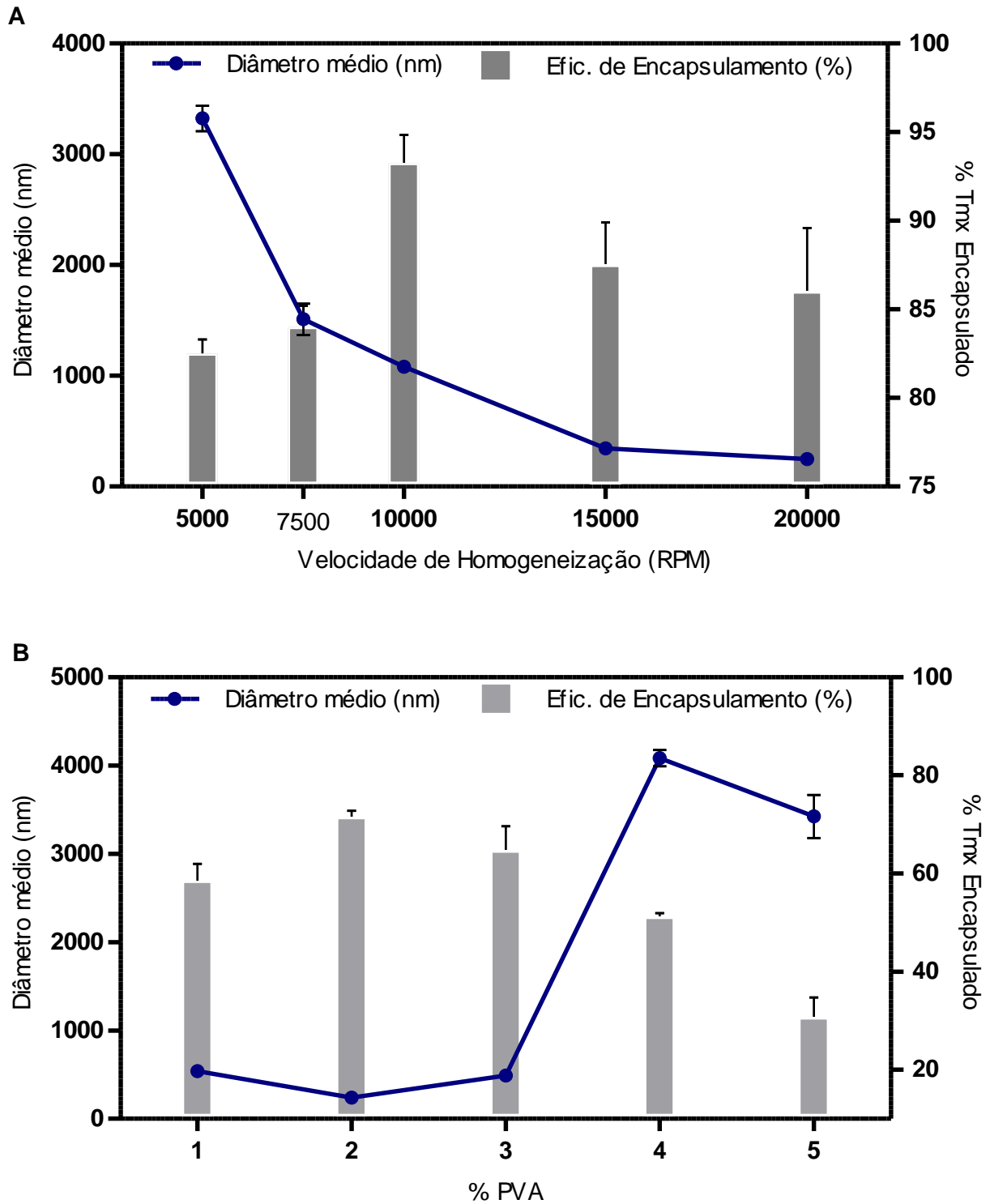
nanopartículas. Uma velocidade de homogeneização de 20000 rpm é ideal para obtenção de nanopartículas com diâmetro médio de  $246 \pm 1,5$  nm e eficiência de encapsulamento de 86% (Figura 8A).

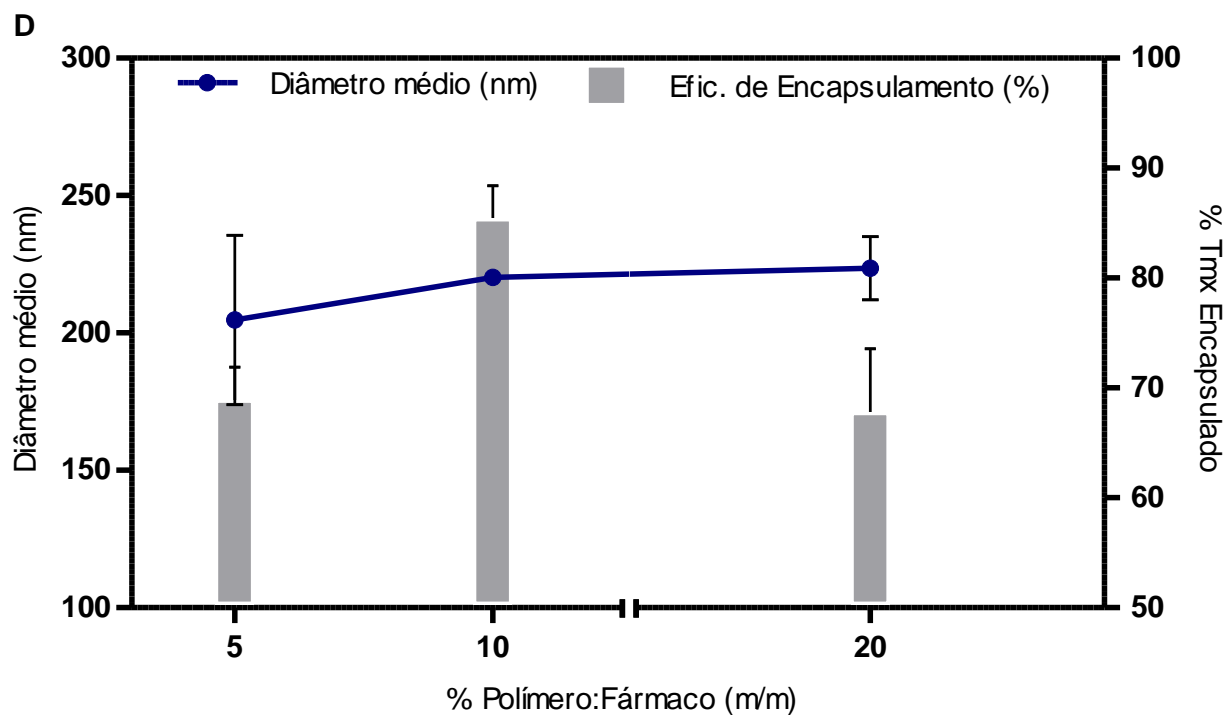
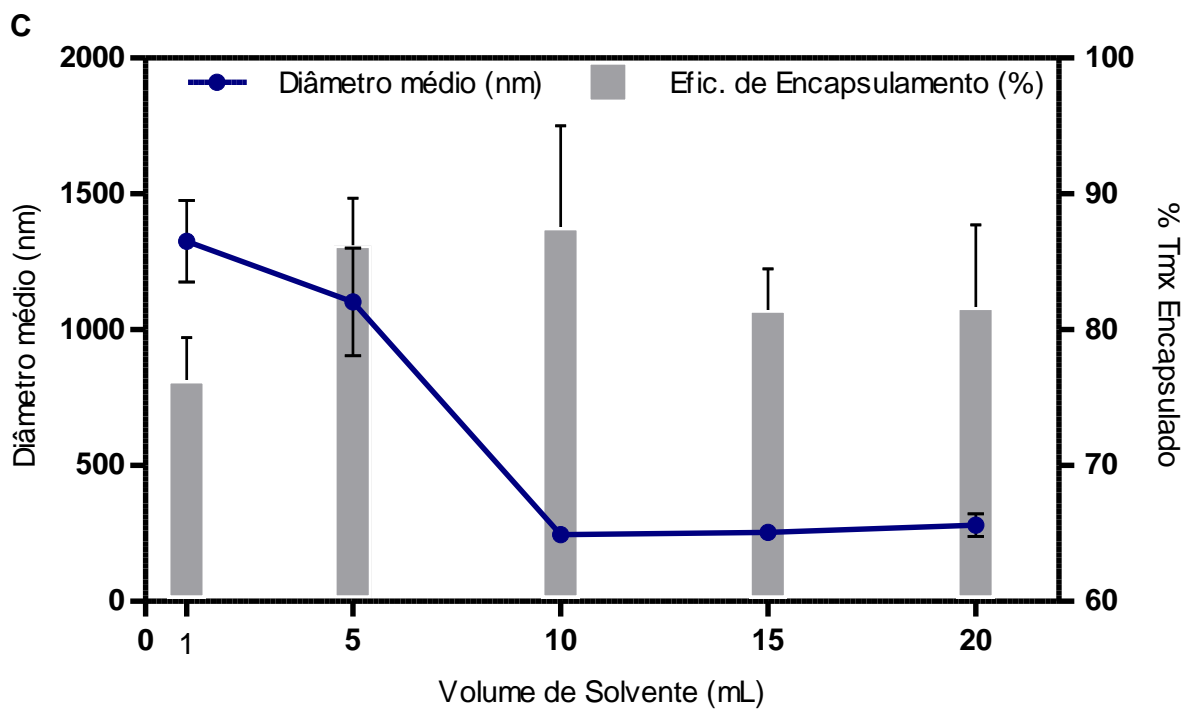
Variação na concentração de PVA também foi avaliada com o objetivo de otimizar o processo de produção das nanopartículas. Foi utilizado PVA nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5% (m/v), e as melhores características de diâmetro e eficiência de encapsulamento foram obtidas com PVA a 2%, que resultou na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

O impacto do volume de solvente, utilizado na preparação da fase orgânica da emulsão, no diâmetro e eficiência de encapsulamento das nanopartículas de PLA também foi estudado. Uma vez que essa variação influencia a viscosidade da solução aquosa, existe um potencial efeito nas características das nanopartículas obtidas. De acordo com o apresentado na Figura 8C, o volume ótimo para solubilização da quantidade de polímero e fármaco foi de 10,0 mL, gerando uma solução de 0,1% de polímero. O diâmetro médio das nanopartículas de PLA obtido com a solução orgânica preparada nestas condições foi de  $245,5 \pm 3,0$  nm e eficiência de encapsulamento igual 80,5%.

Três proporções diferentes entre o polímero e o fármaco (5, 10 e 20%) foram analisadas a fim de observar o impacto na eficiência de encapsulamento do método de preparo. A proporção de 10% polímero-fármaco (m/m) foi considerada ótima neste estudo, pois proporcionou a obtenção de nanopartículas de PLA-Tmx com eficiência de encapsulamento de  $85,4 \pm 3,0\%$  (Figura 8D). A variável proporção polímero-fármaco não afetou o diâmetro das nanopartículas ( $p > 0,05$ ).

**Figura 8.** Efeitos de diferentes parâmetros como velocidade de homogeneização (A), concentração de surfactante (B), volume de solvente (C) e proporção polímero-fármaco (D) no diâmetro e eficiência de encapsulamento de nanopartículas de PLA-TMX





Fonte: O próprio autor

## 5.2 Características físico-químicas das nanopartículas de PLA

### 5.2.1 Diâmetro e Potencial Zeta.

As determinações de diâmetro foram realizadas a partir da técnica de espalhamento dinâmico de luz e o potencial zeta medido por meio da mobilidade eletroforéticas das partículas. A Tabela 4 apresenta as características de diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta das cinco formulações de nanopartículas de PLA preparadas, além de nanopartículas de PLA vazias os resultados de.

**Tabela 4.** Características de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta para todas as formulações de nanopartículas de PLA produzidas.

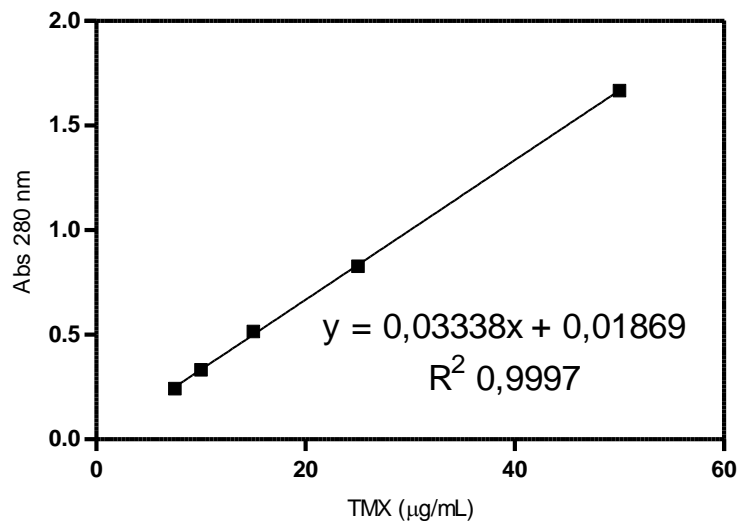
<b>NP PLA</b>	<b>Diâmetro (nm)</b>	<b>Pdl</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
<i>Vazias</i>	242,2 ± 0,30	0,195 ± 0,004	-13,0 ± 0,321
<i>TMX</i>	203,4 ± 3,47	0,126 ± 0,004	9,2 ± 0,364
<i>MLT</i>	202,8 ± 1,22	0,118 ± 0,015	-18,8 ± 1,560
<i>RBF</i>	197,1 ± 3,46	0,183 ± 0,009	-23,2 ± 0,721
<i>TMX-MLT</i>	307,6 ± 5,30	0,162 ± 0,015	-9,4 ± 0,382
<i>TMX-MLT-RBF</i>	245,8 ± 2,15	0,071 ± 0,032	15,6 ± 0,792

Fonte: O próprio autor

### 5.2.2 Análises espectroscópicas

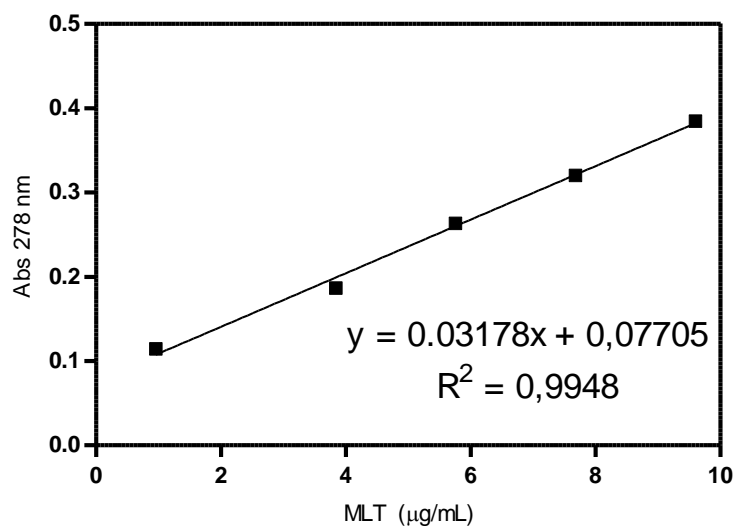
As formulações de nanopartículas de PLA foram analisadas quanto suas propriedades espectroscópicas de absorção luz na região do UV-vis e infravermelho. Tais medidas visam investigar as interações da matriz poliméricas com os compostos em estudo e avaliar possíveis alterações em sua estrutura. Espectroscopia na região do UV-vis também foi utilizada para quantificação dos compostos. As Figuras 9 - 11 apresentam as curvas de calibração obtidas para cada um dos compostos avaliado neste estudo para o método de espectroscopia de absorção na região do UV-vis. Como demonstrado na Figura 12, que apresenta os espectros das nanopartículas de PLA vazias e contendo tamoxifeno, melatonina ou riboflavina, os picos de absorção referente a cada dos compostos incorporados à nanopartícula estão evidentes nos espectros das nanopartículas de PLA carregada com esses agentes. Infere-se, portanto, que o os agentes foram adequadamente incorporados ao sistema nanoparticulado e que suas propriedades espectroscópicas não foram alteradas, mantendo íntegra as suas estruturas químicas.

**Figura 9.** Curva de calibração para quantificação de tamoxifeno. Curva obtida a partir dos valores de absorvância em 280 nm. Equação de regressão linear utilizada para quantificação de tamoxifeno em amostras desconhecidas.



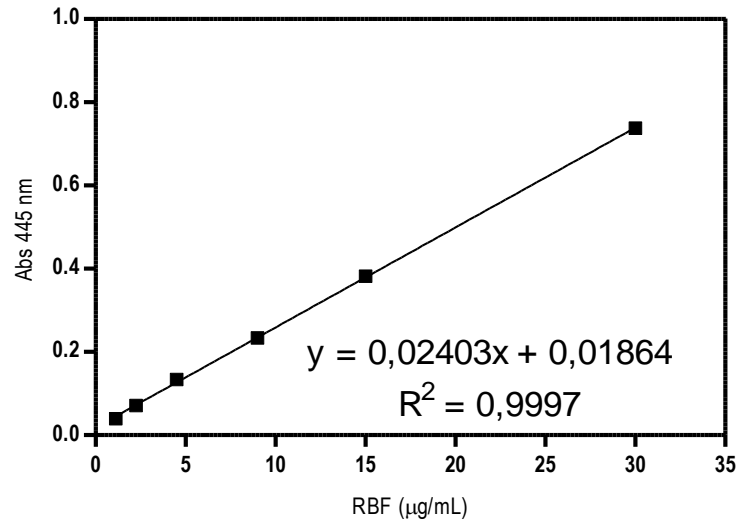
Fonte: O próprio autor

**Figura 10.** Curva de calibração para quantificação de melatonina. Curva obtida a partir dos valores de absorvância em 278 nm. Equação de regressão linear utilizada para quantificação de melatonina em amostras desconhecidas.



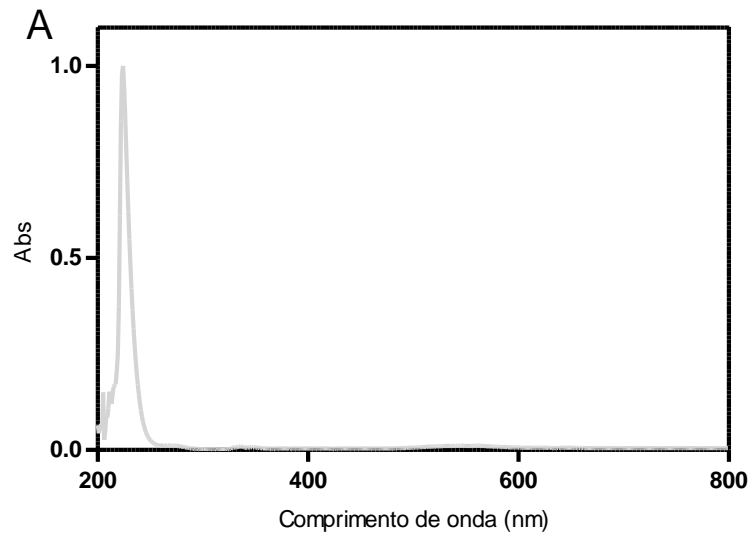
Fonte: O próprio autor

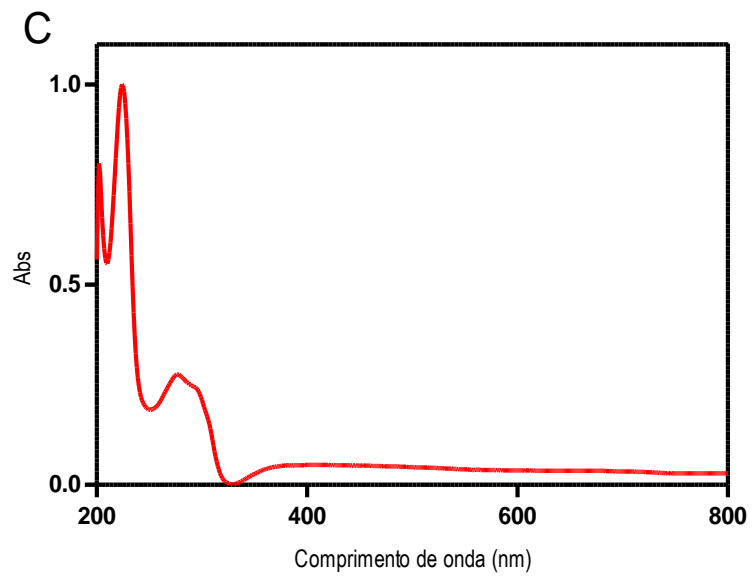
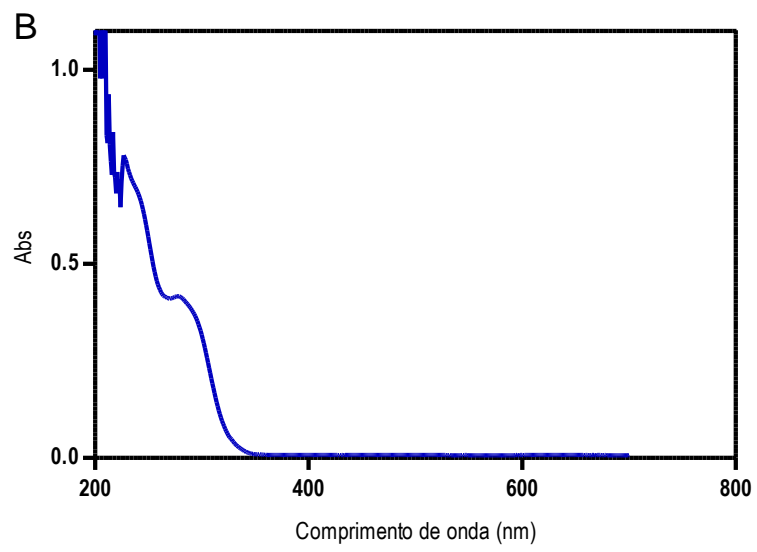
**Figura 11.** Curva de calibração para quantificação de riboflavina. Curva obtida a partir dos valores de absorvância em 445 nm. Equação de regressão linear utilizada para quantificação de riboflavina em amostras desconhecidas.

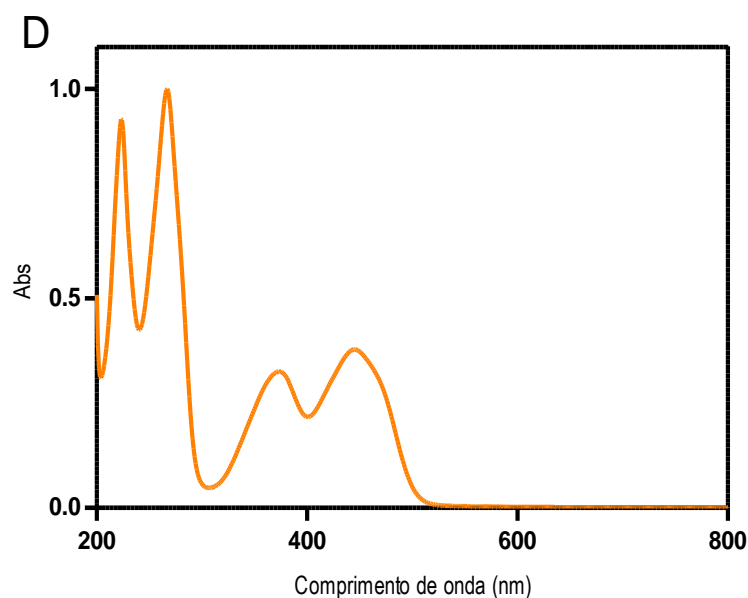


Fonte: O próprio autor

**Figura 12.** Espectros de absorvância na região do UV-vis para as nanopartículas de PLA A) vazias e nanopartículas de PLA contendo B) Tamoxifeno, C) Melatonina e D) Riboflavina.





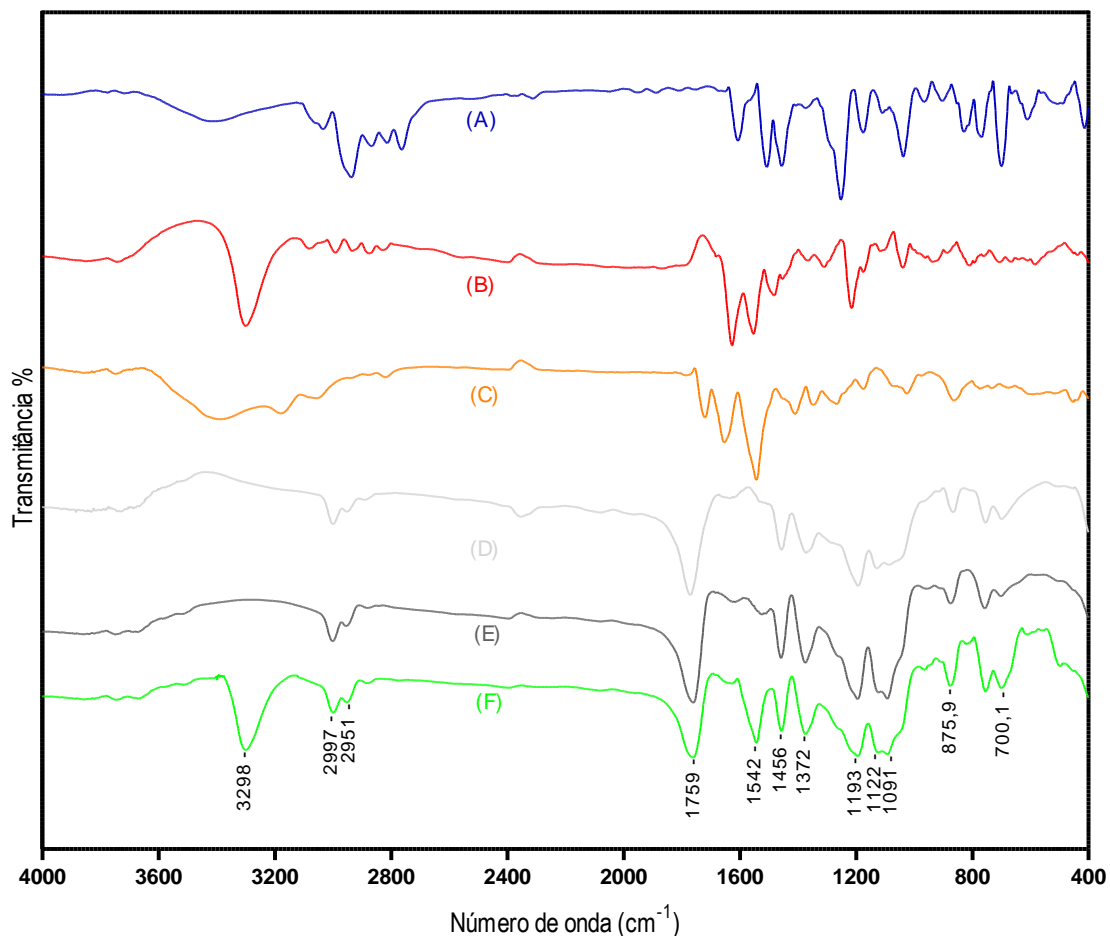


Fonte: O próprio autor

Análises de espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier também foram conduzidas com os materiais isolados e da formulação de nanopartículas de PLA contendo os agentes ativos tamoxifeno e melatonina funcionalizadas com riboflavina. A Figura 13 apresenta os espectros dos compostos (A) TMX, (B) MLT, (C) RBF, (D) PLA, (E) Nanopartículas de PLA vazias e (F) Nanopartículas de PLA contendo TMX e MLT funcionalizadas com RBF. Pode-se inferir que picos específicos de cada um dos compostos podem ser observados também no espectro da formulação de nanopartícula já preparada, indicando a presença desses compostos no produto final, bem como a sua integridade estrutural.



**Figura 13.** Espectros de FTIR dos compostos (A) TMX, (B) MLT, (C) RBF, (D) PLA, (E) NP PLA vazias e (F) NP PLA TMX-MLT-RBF.



Fonte: O próprio autor

Bandas específicas do PLA, como as que ocorrem em 1759, 2951 e 2997  $\text{cm}^{-1}$ , referentes à ligação dupla carbonila (C=O) e grupamentos metila  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente, podem ser observadas nos espectros tanto da nanopartícula vazia como da nanopartícula contendo os agentes ativos e funcionalizadas, sugerindo que as propriedades estruturais do PLA não são alteradas durante o processo de fabricação das nanopartículas. Bandas específicas dos compostos TMX, MLT e RBF também podem ser observadas no espectro da nanoformulação. As bandas 1193, 1122, 1091 e 700,1  $\text{cm}^{-1}$  observadas no espectro das nanopartículas de PLA TMX-MLT-RBF são também específicas do espectro do TMX, sendo referentes ao estiramento de grupamento amina C–N (1193  $\text{cm}^{-1}$ ), estiramentos C–O de grupamentos éster (1122 e 1091  $\text{cm}^{-1}$ ) e deformação angular de ligações C–H monosubstituídos e derivados de benzeno (700,1  $\text{cm}^{-1}$ ). As bandas em 1542, 1456 e

875,9  $\text{cm}^{-1}$  são também observadas no espectro da RBF e se referem, respectivamente, a vibrações de deformação angular C=C aromáticas, de grupamentos metila ( $\text{CH}_2$ ) e de ligação C–H 1,3-bisubstituído. Por fim a banda em 3298  $\text{cm}^{-1}$  é característica de estiramento de grupamentos amins secundárias presente também no espectro da MLT.

### 5.3 Características morfológicas das nanopartículas de PLA

Análise morfológica das formulações de nanopartículas de PLA preparadas foi realizada com auxílio da técnica de MEV. Imagens de MEV para cada uma das formulações apresentam nanopartículas com formato esférico, regulares e dispersas.

### 5.4 Eficiência de encapsulamento

O perfil de encapsulamento é determinado pela eficiência de encapsulamento (EE), que indica a quantidade de fármaco que foi associada à formulação de nanopartícula, tendo como base a quantidade inicial de fármaco inserida na fase de preparação da nanopartícula. Outro aspecto abordado no perfil de encapsulamento é a eficiência de carregamento (EC), ou seja, a proporção de fármaco ou agente funcionalizante contido numa formulação de nanopartícula, representado pela razão entre a massa de fármaco associado à nanopartícula e a massa total de nanopartículas. A Tabela 5 apresenta os valores de EE e EC para cada uma das formulações de nanopartículas de PLA preparadas.

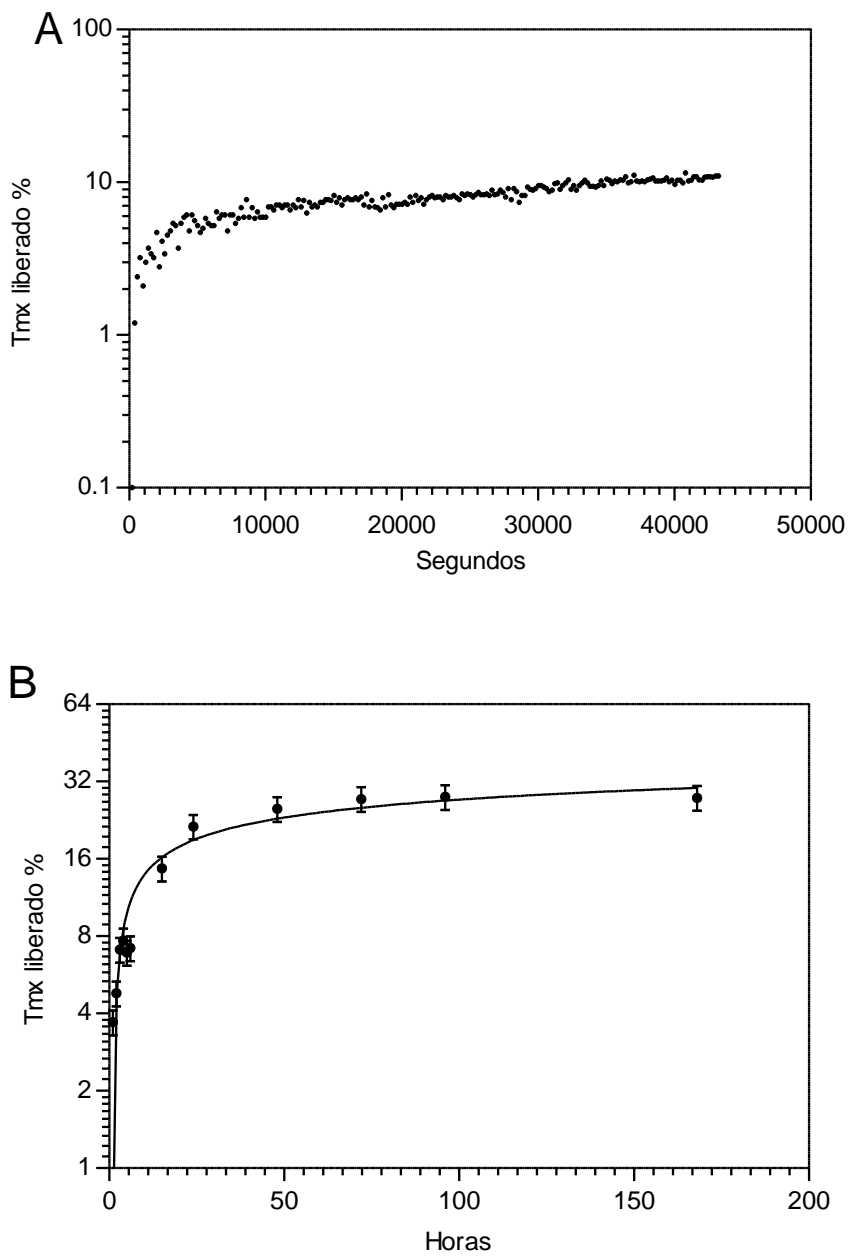
**Tabela 5.** Valores de eficiência de encapsulamento e eficiência de carregamento de fármaco para cada formulação de nanopartícula de PLA preparada.

<b>Formulação</b>	<b>Eficiência de Encapsulamento</b>	<b>Eficiência de carregamento</b>
<i>NP PLA TMX</i>	TMX: 58,6%	TMX: 5,57%
<i>NP PLA MLT</i>	MLT: 13,1%	MLT: 2,18%
<i>NP PLA RBF</i>	RBF: 42,1%	RBF: 7,48%
<i>NP PLA Tmx-MLT</i>	TMX: 46,1%	TMX: 4,52%
	MLT: 36,1%	MLT: 3,41%
<i>NP PLA Tmx-MLT-RBF</i>	TMX: 3,5%	TMX: 0,35%
	MLT: 6,2%	MLT: 0,59%
	RBF: 4,2%	RBF: 0,14%

## **5.5 Perfil e cinética de liberação**

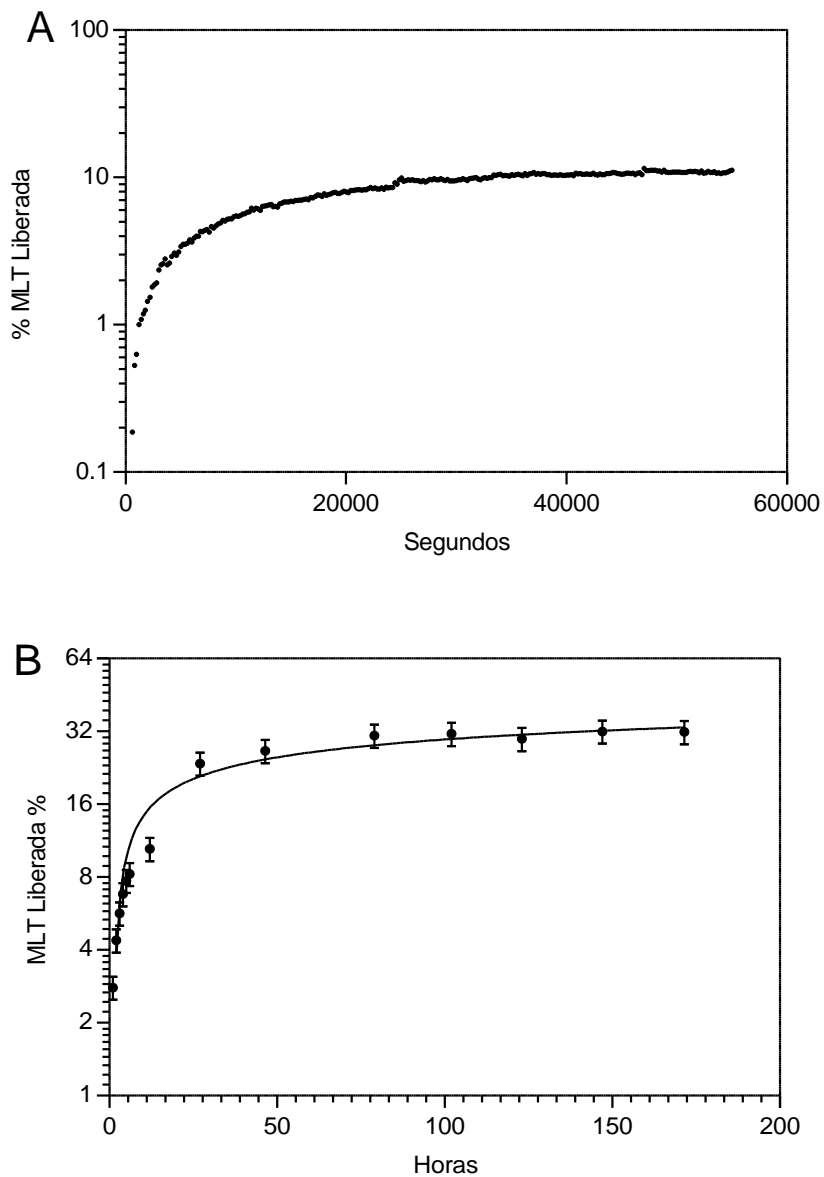
O perfil de liberação de cada uma das formulações preparadas neste estudo foi analisado por meio da técnica de amostragem e separação, com auxílio de espectrofotometria na região do UV-vis para quantificação do fármaco liberado. As figuras 14 - 16 apresentam os perfis de liberação das formulações de nanopartículas de PLA produzidas. Para todos os compostos incorporados à nanopartícula foi observado uma taxa de liberação inicialmente rápida seguida por uma liberação mais sustentada durante o período de acompanhamento da liberação dos agentes incorporados.

**Figura 14.** Figura 14. Gráficos de perfil de liberação da formulação de nanopartícula de PLA contendo tamoxifeno, A) perfil de liberação das primeiras 12h de incubação e B) perfil de liberação monitorado por 168h. Condições: Temperatura 37 °C, meio PBS pH 7,4.



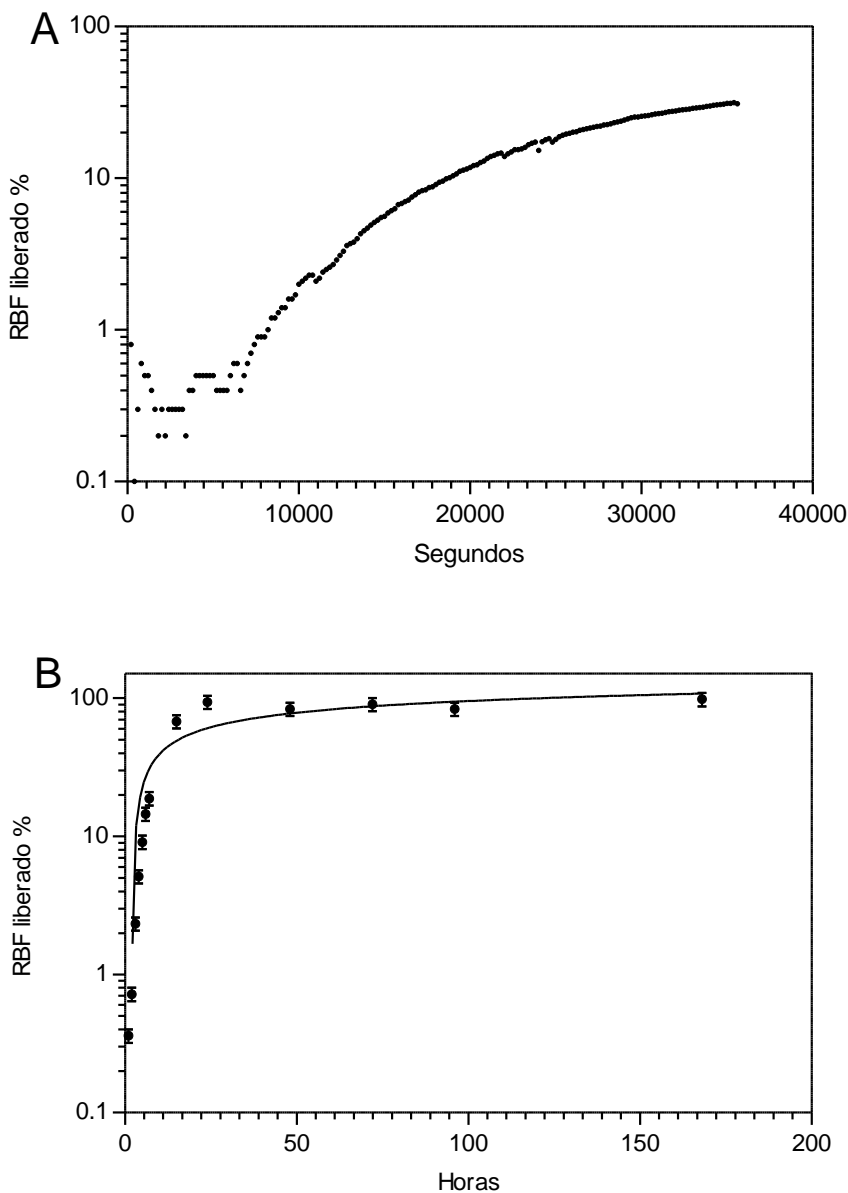
Fonte: O próprio autor

**Figura 15.** Gráficos de perfil de liberação da formulação de nanopartícula de PLA contendo melatonina, A) perfil de liberação das primeiras 7h de incubação e B) perfil de liberação monitorado por 24h. Condições: Temperatura 37 °C, meio PBS pH 7,4.



Fonte: O próprio autor

**Figura 16.** Gráficos de perfil de liberação da formulação de nanopartícula de PLA contendo riboflavina, A) perfil de liberação das primeiras 10h de incubação e B) perfil de liberação monitorado por 168h. Condições: Temperatura 37 °C, meio PBS pH 7,4.



Fonte: O próprio autor

Os dados obtidos com o perfil de liberação para cada uma das formulações estudadas foram utilizados em modelos matemáticos para estudo o perfil de difusão e cinética da liberação do fármaco. A Tabela 6 apresenta os dados de adequação (*fit*) de cada modelo avaliado, representados pelos valores de  $R^2$  obtidos a partir de regressão linear e não linear dos dados de liberação de cada composto. O modelo matemático de Weibull foi o que apresentou maior valor de  $R^2$  e, portanto, melhor

adequação ao perfil de liberação apresentado para os três compostos incorporados nas nanopartículas de PLA. O modelo de Korsmeyer-Peppas foi ainda utilizado para determinação do expoente de liberação  $n$  dos agentes incorporados a nanopartícula de PLA. De acordo os resultados observados na Tabela 6, o expoente de liberação do TMX e MLT foi  $<0,45$ , ao passo que a RBF apresentou um valor de  $n$  entre  $0,45$  e  $0,89$ .

**Tabela 6.** Coeficientes de correlação (R<sup>2</sup>) dos dados de liberação de cada composto incorporado nas nanopartículas de PLA em relação aos modelos matemáticos estudados, bem como apresentação dos parâmetros das equações de cada modelo, obtidos por meio de regressão linear e não linear

MODELO	PARÂMETRO	TMX	MLT	RBF
<b>ORDEM 0</b>	R <sup>2</sup>	0,6751	0,7786	0,6878
<b>1ª ORDEM</b>	R <sup>2</sup>	0,5721	0,6599	0,4290
<b>KORSEMEYER PEPPAS*</b>	K	5,372	4,982	9,675
	n	0,3540	0,3836	0,4815
	R <sup>2</sup>	0,9509	0,9662	0,8439
<b>HIGUCHI</b>	K	3,364	3,186	3,971
	R <sup>2</sup>	0,7115	0,8678	0,2677
<b>WEIBULL*</b>	K	19320	21,200	13,406
	b	0,3979	0,4345	13,568
	R <sup>2</sup>	0,9535	0,9697	0,9117
<b>HIXSON-CROWELL*</b>	K	8,73x10 <sup>-3</sup>	9,32x10 <sup>-3</sup>	2,14x10 <sup>-2</sup>
	Q <sub>0</sub>	8,329	7,746	8,624
	R <sup>2</sup>	0,6118	0,7099	0,5589
<b>BAKER-LONDSALE</b>	K	1,1x10 <sup>-4</sup>	1,3x10 <sup>-4</sup>	2,5x10 <sup>-3</sup>
	R <sup>2</sup>	0,7467	0,8493	0,8930

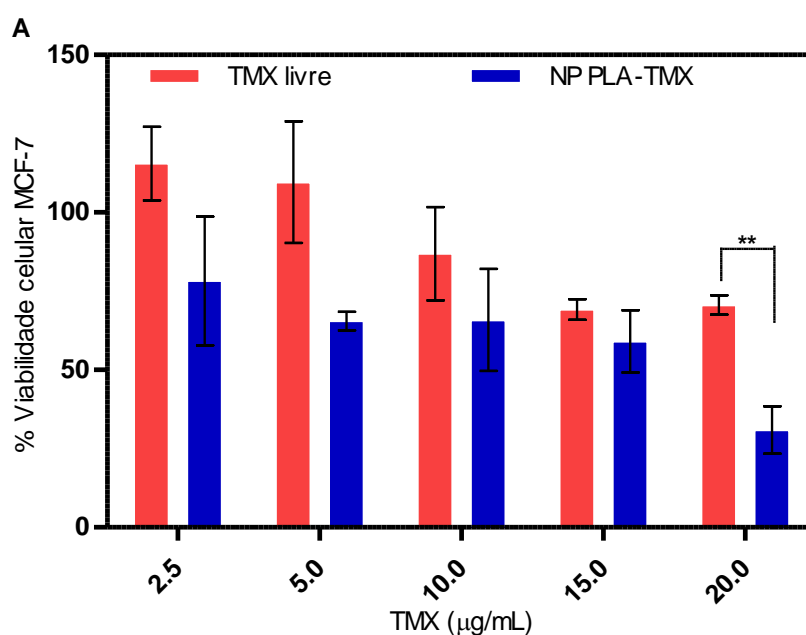
\* Parâmetros obtidos por meio de regressão não linear. Q = quantidade de fármaco liberado num determinado período de tempo; Q<sub>0</sub> = valor inicial de Q; K = constante do respectivo modelo; n = expoente de liberação; b = parâmetro de forma (*shape parameter*).

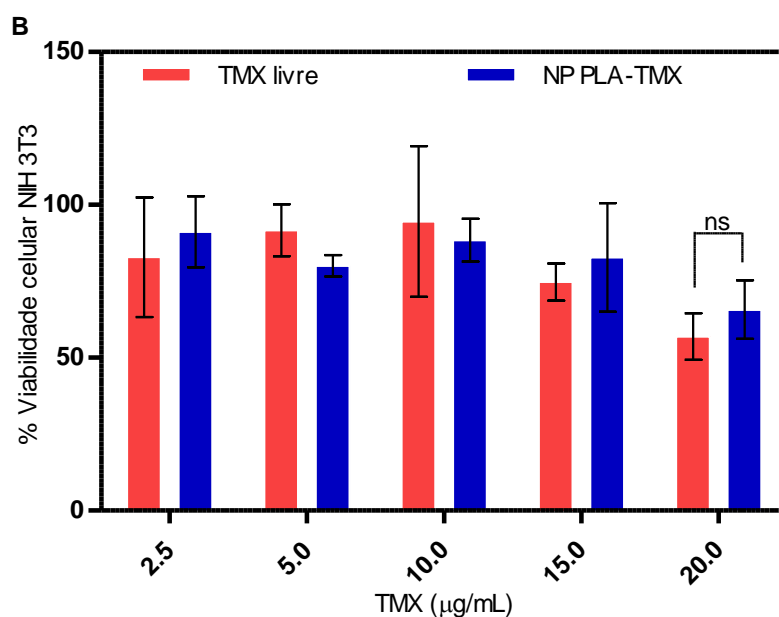


## 5.6 Citotoxicidade celular *in vitro* das nanopartículas de PLA carregadas com TMX

O perfil citotóxico da formulação de TMX encapsulado em nanopartículas de PLA e do TMX livre foram analisadas por meio de ensaio de MTT utilizando células de linhagem cancerígena (MCF-7) e não cancerígena (NIH 3T3). Os resultados obtidos a partir deste estudo demonstram que a formulação de Tmx associado a nanopartículas possui capacidade superior a do TMX livre em inibir o crescimento de células MCF-7 (Figura 17A). A nanoformulação contendo TMX também apresentou menor toxicidade sobre células NIH 3T3 que o fármaco livre (Figura 17B). Análise estatística comparativa entre os dados de citotoxicidade das duas formulações sobre as células MCF-7 demonstrou haver diferença estatisticamente significativa na concentração de 20,0 µg/mL entre as médias dos dois conjuntos de dados ( $p=0,0064$ ). O  $IC_{50}$ , que representa a menor concentração necessária para inibir a viabilidade celular em 50%, foi também determinado por meio de regressão não-linear global da curva de viabilidade tanto para a forma livre do TMX como para as nanopartículas de PLA-Tmx. As nanopartículas PLA-TMX apresentaram um  $IC_{50}$  de  $13,19 \mu\text{g/mL} \pm 1,26$ , enquanto que o  $IC_{50}$  da formulação de TMX livre foi de  $25,11 \mu\text{g/mL} \pm 1,33$ .

**Figura 17.** Comparação da viabilidade celular de células MCF-7 (A) e NIH 3T3 (B) após tratamento com formulações de Tmx encapsulado em nanopartículas de PLA (NP PLA-Tmx) e Tmx livre. Análise comparativa das médias do efeito inibitório de cada formulação



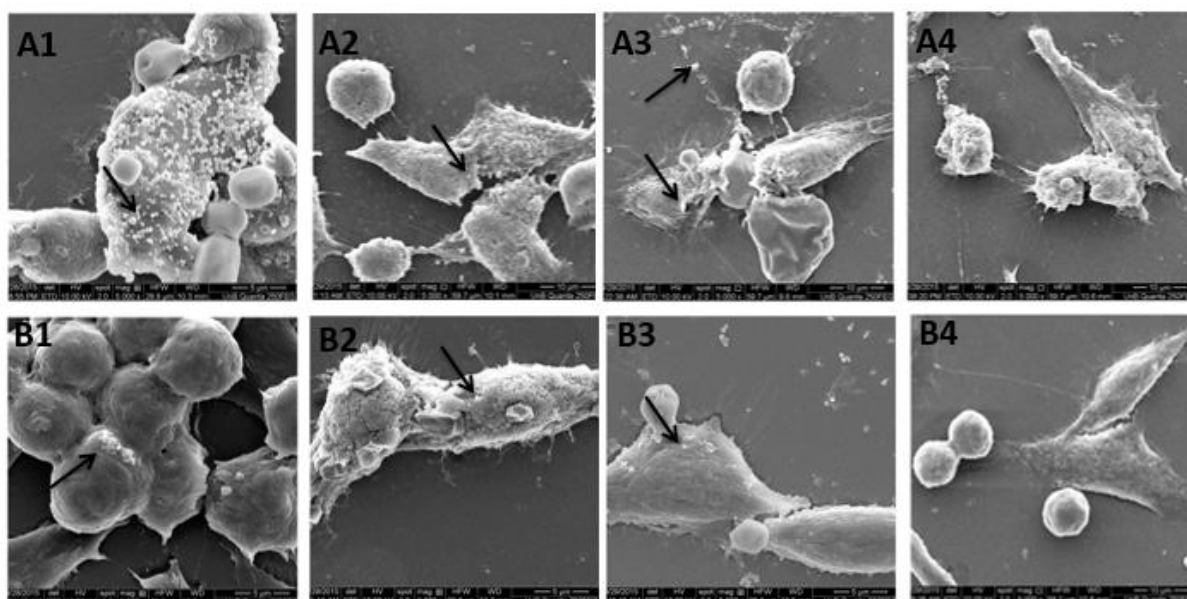


Fonte: O próprio autor

Neste trabalho foi ainda estudado a atuação das formulações de nanopartículas sobre a superfície de células de linhagem cancerígena, a fim de identificar potenciais interações e processo de captura por células alvos e, ainda avaliar, por meio de MEV, os efeitos das nanopartículas de PLA na superfície celular.

A Figura 18 apresenta imagens obtidas por MEV que demonstram a interação das nanopartículas de PLA vazias e contendo TMX com células MCF-7. Nas primeiras horas de incubação é possível observar nanopartículas PLA vazias e PLA-TMX discretamente localizadas na superfície das células MCF-7 (Figura 18-A1). Após 24 horas de incubação é possível observar danos nas membranas celulares das células tratadas com as nanopartículas PLA-TMX, onde corpos apoptóticos aderidos à superfície celular são visualizados (setas Figura 18-A3). Um acúmulo preferencial de nanopartículas carregadas com TMX sobre as células MCF-7 pode ser observado nas imagens, quando comparado ao acúmulo demonstrado por nanopartículas vazias (Figura 18B).

**Figura 18.** Imagens de MEV de células MCF-7 tratadas com NP PLA-TMX após 1h (A1), 8h (A2) e 24h (A4) de incubação e tratadas com NP PLA vazias após 1h, 8h e 24h de incubação (B1-B3). A4 e B4 são controles sem tratamento. As setas indicam as nanopartículas nas imagens.



Fonte: O próprio autor

## 6. Discussão

Para produção das formulações de nanopartículas de PLA realizada neste estudo, dois métodos de síntese foram aplicados considerando as propriedades de solubilidade dos constituintes utilizados, visando aumentar a eficácia da produção e garantir que todos os agentes ativos e funcionalizantes fossem adequadamente incorporados no sistema nanoparticulado. Os métodos de emulsificação simples e dupla emulsificação são amplamente utilizados no campo da nanomedicina para incorporação de diversos compostos a nano e micropartículas de base polimérica (BUDHIAN *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2017; GROSSEN *et al.*, 2017; ALYAFEE *et al.*, 2018). A aplicação da emulsificação simples ou dupla emulsificação dependerá das características hidrofílicas dos compostos os quais se almejam incorporar. Compostos hidrofóbicos interagem mais facilmente com matrizes poliméricas devido à similaridade de suas propriedades de solubilidade, e dessa forma, a aplicação da emulsificação simples para encapsulamento de agentes hidrofóbicos se apresenta como método mais adequado (REIS *et al.*, 2006). Quando se trata de incorporação de compostos hidrofílicos, a baixa interação entre o que se pretende encapsular e a matriz polimérica torna-se um desafio para ao processo de fabricação das partículas. A utilização do método da dupla emulsificação é uma

alternativa para essa situação, pois permite que compostos hidrofílicos sejam encapsulados em nanopartículas de matrizes com características hidrofóbicas (YANG *et al.*, 2011).

O controle sobre as características de diâmetro, carga superficial e eficiência de encapsulamento apresentadas pelo sistema pode ser obtido por meio d manejo de pontos críticos relacionados ao processo de produção das nanopartículas. Algumas dessas variáveis são velocidade de homogeneização durante a etapa de preparo da emulsão, concentração de surfactante, concentração do polímero e proporção entre polímero e fármaco (CHAWLA e AMIJI, 2003; BUDHIAN *et al.*, 2007; SCHADLICH *et al.*, 2011; PANDEY *et al.*, 2015).

O processo de homogeneização é uma etapa crítica para a formação de nanopartículas com diâmetro desejável, quando aplicado o procedimento de emulsificação e evaporação do solvente. Ela fornece a energia necessária para a quebra das gotículas formada durante a misturas das fases interna e externa da emulsão (BUDHIAN *et al.*, 2007), dando origem as nanopartículas. Portanto, quanto maior a energia fornecida ao sistema menor será o diâmetro das partículas, como foi observado no estudo de impacto da velocidade de homogeneização sobre o diâmetro médio das nanopartículas de PLA preparadas.

O PVA, utilizado como surfactante na fase aquosa da emulsão preparada, atua como agente estabilizador da emulsão, sendo crucial para a obtenção de partículas com tamanho submicrométrico. Interações hidrofóbicas carregadas pelo PVA resulta na ocorrência de afinidades químicas da fase oleosa com a fase aquosa da emulsão. Tais aspectos fazem do PVA um surfactante apropriado para o uso como estabilizador em emulsões óleo/água (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004). O PVA é ainda agente antiagregante capaz de promover a formação de uma barreira estérica na superfície das nanopartículas durante o processo de produção, limitando a coalescência entre as partículas formadas, contribuindo para uniformidade e estabilização do sistema (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004; ALTMAYER *et al.*, 2016).

A viscosidade da fase orgânica da emulsão é impactada diretamente pela concentração de polímero. Sendo assim, elevadas quantidades de polímero aumentam a viscosidade da solução, o que contribui para a agregação das partículas. Esta agregação ocorre como resultado de emulsificação e estabilização inadequada causadas pela resistência criada pela elevada viscosidade da solução durante o

processo de homogeneização (EL FAGUI e AMIEL, 2012; PANDEY *et al.*, 2015). Portanto, o uso de quantidade elevada de polímero ou volume insuficiente de solvente leva ao aumento no diâmetro das nanopartículas. Uma concentração ótima de 10 mg/mL de PLA foi observada neste estudo. Em relação a proporção entre PLA e TMX na solução orgânica, uma proporção ótima de 10% (m/m) foi identificada, que resultou numa eficiência de encapsulamento de ~85%. Foi observado uma característica de saturação de pontos de ligação do fármaco à matriz polimérica, onde a adição de fármaco acima deste limite não resulta em aumento na taxa de associação do fármaco às nanopartículas.

Das seis formulações de nanopartículas preparadas neste estudo, quatro foram fabricadas por meio do método da simples emulsificação e evaporação do solvente (NP PLA Vazias, NP PLA TMX, NP PLA MLT e NP PLA TMX-MLT) e as outras duas foram preparadas utilizando o método da dupla emulsificação (NP PLA RBF e NP PLA TMX-MLT-RBF). As propriedades hidrofílicas da RBF foi o fator definidor para aplicação do método da dupla emulsificação nesses casos. São esperadas diferenças quando comparado as propriedades relacionadas ao diâmetro hidrodinâmico de nanopartículas preparadas pela emulsificação simples ou dupla emulsificação (YANG *et al.*, 2011). Contudo, neste estudo observamos que ambos os métodos resultaram em nanopartículas com propriedades de diâmetro muito similares entre si, não sendo observado diferenças significativas entre os diâmetros das formulações (valor de  $p = 0,54$ ). As etapas de mistura das fases e evaporação do solvente são cruciais para determinação do tamanho que as nanopartículas preparadas irão adotar após o processo de emulsificação. Outro fator importante é a concentração e o tipo de agente surfactante utilizado, que influencia diretamente nas propriedades de tamanho das nanopartículas obtidas (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004; NORIEGA-PELAEZ *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2011). O controle dessas condições é essencial para obtenção de nanopartículas com o diâmetro desejado.

O diâmetro das nanopartículas é uma característica fundamental dos sistemas de liberação de fármacos, uma vez que influencia diretamente no perfil de biodistribuição, eliminação, acúmulo e interação das nanopartículas com o tecido alvo (SCHADLICH *et al.*, 2011; KULKARNI e FENG, 2013). Partículas com diâmetro entre 150 e 250 nm apresentam maior capacidade de acúmulo nos tecidos alvos, e maior chance de escape de eliminação antecipada conduzida pelo sistema retículo

endotelial (SRE), constituído principalmente por macrófagos que residem em órgãos como pulmão, baço e fígado e também por fagócitos mononucleares circulantes (SHEAGREN *et al.*, 1967), alcançando assim maior tempo de circulação na corrente sanguínea (WIN e FENG, 2005). Nanopartículas com tamanhos <100 nm ou >300 nm possuem maior dificuldade de escape da eliminação por células do SRE e, conseqüentemente, curto período de circulação com baixa tendência a alcançar e acumular-se nos tecidos alvos (KULKARNI e FENG, 2013). As formulações de nanopartículas preparadas neste estudo possuem características de diâmetro aceitáveis para utilização como sistemas de liberação e fármacos, com potencial de prolongada permanência na circulação, escape de eliminação pelo SRE e ainda habilidade de interação com as células do tecido tumoral.

Outra característica importante que influencia o comportamento das nanopartículas num sistema *in vivo* são as propriedades de superfície da nanopartícula, entre as quais o potencial zeta ou carga superficial. Cargas superficiais elevadas (positivas ou negativas) levam a uma maior captura das nanopartículas por células fagocíticas, devido a interações eletrostáticas entre as partículas e as células fagocíticas, o que pode impactar negativamente no tempo de circulação das nanopartículas na circulação sanguínea (ROSER *et al.*, 1998; HE *et al.*, 2010). Partículas com cargas superficiais correspondente a 40 mV em módulo, chegam a apresentar taxa de captura fagocítica 20% maior do que partículas de mesmo tamanho e carga superficial igual a 15 mV (HE *et al.*, 2010). No que tange ao processo de captura celular em células não fagocíticas, partículas positivamente carregadas apresentam maior afinidade pela membrana negativamente carregada dessas células, favorecendo o processo de interação e internalização das partículas. Nesse caso, quanto maior a carga superficial da partícula maior é a afinidade e interação com a membrana celular, beneficiando o processo de captura (GAO *et al.*, 2005; HE *et al.*, 2010). Das formulações preparadas, duas (NP PLA-TMX e NP PLA-TMX-MLT-RBF) apresentaram carga superficial positiva e as demais apresentaram cargas superficiais negativas, porém com valores abaixo de 25 mV, em módulo. Esses dados sugerem que os sistemas de liberação aqui preparados são adequados e possuem potencial para sobressair do processo de captura e eliminação mediado pelo SRE e ainda capazes de interagir com células não fagocíticas de maneira que o processo de captura por essas seja favorecido.

O potencial zeta é também uma propriedade explorada no sentido de avaliar características de estabilidade do sistema. Quanto maior a carga superficial em módulo, maior é a tendência de repulsão entre as partículas e, conseqüentemente, menor a chance da ocorrência de processos de coalescência, floculação e formação de aglomerados das nanopartículas. Partículas com valor de potencial zeta acima de 30 mV são consideradas fortemente catiônicas (se carga for positiva) ou fortemente aniônicas (se carga for negativa), valores abaixo de 10 mV classificam as partículas como essencialmente neutras (CLOGSTON e PATRI, 2011). Dessa forma, partículas com carga superficial acima de 30 mV em módulo apresentam maior estabilidade e menor tendência a processos de aglomeração, devido à alta repulsão entre as partículas, garantido, assim, maior estabilidade ao sistema.

As técnicas de microscopia auxiliam na caracterização dos sistemas nanoparticulados, pois fornece informações quanto a propriedades topográficas dos sistemas além de permitir confirmar o diâmetro medido e determinar as características de forma e as tendências de agregação. É sabido que o formato esférico e regular das partículas favorece o seu transporte pela corrente sanguínea, permanecendo dessa forma por mais tempo circulando e aumentando a possibilidade de que as mesmas se acumulem nos tecidos alvos.

Uma das mais consolidadas caracterizações realizadas em sistema de liberação de fármacos baseados em nanopartículas são as determinações das propriedades espectroscópicas dos sistemas e dos constituintes utilizado na preparação dos mesmos (MANAIA *et al.*, 2017). A utilização de métodos de espectrofotometria tem contribuído significativamente para o aperfeiçoamento das técnicas de produção e otimização dos produtos nanoparticulados desenvolvidos. A acessibilidade e facilidade de manuseio dos aparatos instrumentais e manipulação das amostras para análise, permitem constante avanço no desenvolvimento científico da área da nanomedicina (FORNAGUERA e SOLANS, 2017). A aplicação dessas metodologias vai desde a quantificação dos compostos associados aos nanomateriais até análises investigacionais das interações entre os compostos utilizados e do impacto do processo de fabricação na estrutura química dos agentes terapêuticos e na matriz das partículas (LIU *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2014). Técnicas de espectrofotometria na região do UV-vis foram aplicadas neste estudo para quantificação e identificação dos agentes ativos incorporados às nanopartículas. Os espectros dos sistemas nanoparticulado

(Figura 12) contendo os compostos TMX, MLT ou RBF incorporados a sua matriz apresenta semelhança significativa com os espectros desses compostos isolados. Um leve deslocamento nos espectros das formulações na região de absorção máxima dos compostos, quando comparados aos seus respectivos espectros padrão, pôde ser observado e isso é devido a diferença do material dispersante utilizado na obtenção dos espectros (DIAS, 2017). As intensidades dos picos de absorção de cada composto nos espectros de cada formulação indicam que não ocorreram alterações estruturais nas moléculas de TMX, MLT ou RBF durante o processo de preparo das nanopartículas e, ainda, que esses compostos permaneceram associados a porção mais superficial das partículas.

A espectrofotometria de FTIR contribui de maneira importante para os estudos de interação entre os compostos utilizados na fabricação dos sistemas nanoparticulados (LAKKADWALA *et al.*, 2014; DING *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2016). As análises conduzidas comparando os espectros dos compostos puros com os espectros da formulação de nanopartículas auxilia na identificação de componentes estruturais essenciais de cada um desses compostos, permitindo avaliar a integridade estrutural e a presença desses agentes no produto final. Bandas específicas do polímero PLA podem ser observadas tanto no espectro da nanopartícula vazia, como no espectro da formulação contendo os agentes TMX, MLT e RBF, podendo inferir que a estrutura do polímero não sofre alterações durante o processo de preparo suficientes para alterar sua estrutura ou modificar grupos funcionais. O mesmo pode ser inferido quanto aos demais componentes do sistema, onde bandas específicas de cada um dos compostos ativos são observadas no espectro da formulação do sistema de liberação produzido. Essas análises garantem que os fármacos estão presentes na formulação e que sua estrutura química permanece inalterada após o processo de produção das nanopartículas. Com isso, é assegurado que o potencial terapêutico dos fármacos incorporados no sistema não é prejudicado pelo processo de produção. É importante ressaltar também as bandas referentes ao composto RBF no espectro da formulação NP PLA TMX-MLT-RBF que indica que o processo utilizado na incorporação deste agente foi eficaz e que a funcionalização do sistema foi alcançada com sucesso.

Além da identificação da presença dos compostos ativos no produto final após a fabricação das nanopartículas, a quantificação desses agentes no sistema é outro



aspecto de importante avaliação nos estudos de caracterização destes sistemas. O método de espectrofotometria de absorção na região do UV-vis oferece uma técnica simples, prática, precisa e segura para execução dos ensaios de quantificação dos compostos de interesse.

O método escolhido para preparo das nanopartículas tem papel importante na eficácia da incorporação dos agentes terapêuticos aos sistemas de liberação de fármacos. Atrelado a isso e conforme discutido anteriormente, as propriedades relacionadas a solubilidade desses compostos também são fatores importantes para a escolha do método mais adequado e sucesso da incorporação aos sistemas de entrega baseados em nanopartículas (YANG *et al.*, 2011). A emulsificação simples é um método adequado e eficiente para o encapsulamento de compostos com características hidrofóbicas, enquanto que a dupla emulsificação é mais recomendada quando se deseja incorporar agentes com caráter hidrofílico em matrizes de perfil lipofílico (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2005). Ambos os métodos foram utilizados no presente estudo para produção das nanopartículas de PLA de diferentes composições. O método da emulsificação simples permitiu a obtenção de elevadas taxas de encapsulamento dos componentes hidrofóbicos, tal efeito já tem sido descrito na literatura e corrobora a eficácia deste método para incorporação de agentes lipofílicos em matrizes poliméricas (NAVA-ARZALUZ *et al.*, 2012). O método da dupla emulsificação, por sua vez, demonstrou taxas de incorporação variadas. Na incorporação do agente RBF, as taxas de encapsulamento encontradas foram relevantes. Contudo, na aplicação do mesmo método para encapsulamento além de RBF, mas também de TMX e MLT, o perfil de encapsulamento foi bem mais baixo. Tal efeito pode estar relacionado a uma migração dos compostos da região matricial para o meio durante a formação da segunda emulsão e também às características lipofílicas do TMX e MLT (LEE *et al.*, 2016).

Outro aspecto que afeta negativamente a taxa de incorporação é a saturação de pontos de ligação no polímero, situação associada a presença em quantidades significativas de três compostos para incorporação adicionados ao método de fabricação do sistema. Mesmo com os baixos índices de incorporação dos compostos, a quantidade de cada um deles identificada no sistema de liberação fabricado é suficiente para os estudos de análise de citotoxicidade e eficácia sobre células tumorais.

A elucidação dos mecanismos envolvidos no processo de liberação dos fármacos incorporados à matriz das nanopartículas para o meio é importante na caracterização dos sistemas de liberação de fármacos, pois fornece informações quanto a cinética do processo de liberação, podendo estimar definições de doses e posologia terapêutica com bases nos dados obtidos. Os principais processos envolvidos na liberação dos compostos incorporados à matriz polimérica das nanopartículas se dá por meio de difusão do composto da matriz para o meio, intumescimento e degradação da matriz polimérica (ARIFIN *et al.*, 2006). No que concerne ao processo de difusão, seus fundamentos podem ser descritos com base na lei de Fick, que estabelece uma relação do tempo de relaxamento do polímero ( $T_R$ ) em relação do tempo de difusão do solvente ( $T_D$ ), sendo o primeiro muito maior que o segundo. Quando esses fatores  $T_R$  e  $T_D$  se tornam similares num meio, o processo de liberação de torna anômalo, assumindo um padrão de difusão não-Fickiano (SHAIKH *et al.*, 2015). Outros fatores como temperatura do meio, pH, solubilidade e estabilidade dos compostos, carga e interações com a matriz também afetam o processo geral de liberação dos fármacos (FU e KAO, 2010).

O perfil de liberação apresentado, com liberação inicial de aproximadamente 10% já nas primeiras horas para os compostos TMX e MLT e de aproximadamente 75% para o composto RBF tem sua relação com a liberação da quantidade de fármaco presente na porção mais superficial da partícula. Particularmente, no caso da RBF, a elevada quantidade liberada já nas primeiras horas também está relacionada ao caráter hidrofílico do composto, que apresenta uma maior tendência a se difundir para o meio aquoso. No caso do TMX e MLT que apresentam características mais lipofílicas, o processo de difusão para o meio tende a ser mais lento, devido a maior afinidade com a matriz polimérica da nanopartícula, sendo portanto, seu processo mais sujeito a intumescimento e degradação da matriz polimérica.

Modelos matemáticos ajudam a determinar, de forma mais objetiva, os processos envolvidos durante a liberação dos compostos da matriz de sistemas nanoparticulados. Eles contribuem para compreensão do processo de cinética de liberação e permitem estudar a influência de fatores característicos da formulação no processo de liberação dos fármacos (BARZEGAR-JALALI *et al.*, 2008). Os dados apresentados na Tabela 6 resumem uma análise dos dados de liberação para cada um dos modelos matemáticos mais utilizados nos estudos de cinética de liberação de

fármacos. Dela inferimos que o modelo de Weibull é o que mais se adequa com os dados de perfil de liberação apresentado pelos compostos incorporados nas nanopartículas de PLA. O modelo de Weibull tem aplicabilidade a quase todos os tipos de curvas de dissolução, incluindo sistemas de liberação rápida ou de perfil estendido (BARZEGAR-JALALI *et al.*, 2008).

O expoente de liberação pode ser estimado por meio da aplicação do modelo de matemático semi-emprático de Korsmeyer-Peppas (Tabela 6). A partir desse modelo é possível determinar a constante  $n$ , que expressa o expoente de liberação apresentado pelo sistema de liberação de fármaco, levando em consideração a sua forma geométrica. Valores de  $n$  igual a 0,5 indicam que o principal mecanismo envolvido no processo de liberação é difusão, valores de  $n > 1,0$  indicam que o processo envolvido na liberação é o intumescimento (ou difusão não-Fickiana) e valores de  $n$  entre 0,5 e 1,0 sugerem um comportamento de liberação anômalo, ou seja, uma mistura de difusão e intumescimento. No caso de formas cilíndricas, os valores de referências são 0,45 e 0,89 ao invés de 0,5 e 1,0, respectivamente (COSTA e LOBO, 2001; LENZI *et al.*, 2016). Na análise do perfil de liberação dos compostos incorporados nas nanopartículas de PLA, foi encontrado valores de  $n$  igual a 0,35, 0,38 e 0,48 para os compostos TMX, MLT e RBF, respectivamente. Os compostos apresentaram valores de  $n$  abaixo de 0,5, não havendo relatos na literatura quanto a valores de  $n$  com esse comportamento para nenhum tipo de sistemas de liberação. Uma possível explicação para este evento pode estar relacionada ao formato do sistema nanoparticulado, onde em situações que o sistema trata-se de partículas com formato esférico podem apresentar valores de  $n$  igual a 0,43 e no casos de sistemas polidispersos, sendo que esses valores podem chegar a 0,30 (PEPPAS, 2014). Em todo caso, admite-se que liberação dos compostos seguiu um processo de liberação anômalo em que diversos mecanismos de migração do fármaco para o meio estiveram envolvidos no processo.

O estudo de citotoxicidade *in vitro* foi conduzido a fim de determinar o perfil citotóxico da formulação de nanopartículas PLA-TMX sobre células de linhagem de câncer de mama, MCF-7. Tanto o TMX livre como o TMX encapsulado em nanopartícula de PLA foram capazes de inibir em certo grau o crescimento dessas células. No entanto, as nanopartículas PLA-Tmx demonstraram maior capacidade para inibir o crescimento de células MCF-7, com diferença estatisticamente

significativa quando comparada a formulação de TMX livre na concentração de 20 µg/mL.

As nanopartículas PLA-TMX apresentaram IC<sub>50</sub> aproximadamente duas vezes superior ao demonstrado pela formulação de TMX livre. Aspectos como liberação sustentada do TMX promovido quando encapsulado à nanopartícula, aumento na solubilidade do fármaco, facilitação do transporte da molécula do fármaco para o interior da célula e ação como reservatório do fármaco, protegendo a molécula de potenciais degradações no meio intersticial são algumas das vantagens que as nanopartículas agregam aos agentes terapêuticos associados a ela, e que estão relacionadas com aumento da eficácia terapêutica de agentes anticancerígenos (HE *et al.*, 2008; JAGADEESH e V, 2010; PEREZ *et al.*, 2012). A formulação de TMX contida no sistema de liberação composto pelas nanopartículas de PLA apresentaram ainda um perfil de citotoxicidade não concentração-dependente e tempo-dependente.

O efeito citotóxico em células de linhagem não-cancerígenas (NIH 3T3) apresentou maiores diferenças entre as duas formulações nas concentrações mais elevadas, onde a formulação de TMX livre demonstrou-se mais tóxica que a nanoformulação PLA-TMX. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os conjuntos de dados das duas formulações sobre esta linhagem celular pra nenhuma das concentrações avaliadas. A ausência de efeito citotóxico sobre estas células se dá pelo fato das mesmas não expressarem receptores de estrogênio, que é o alvo de ação do tamoxifeno. Esse modelo celular foi utilizado nesse estudo para simulação de potenciais efeitos tóxicos das formulações em tecidos não tumorais, com a finalidade de elucidar prováveis riscos de efeitos adversos relacionados às formulações.

A técnica de MEV não permitiu uma determinação precisa do processo de internalização das nanopartículas de PLA carregado pelas células MCF-7. Contudo, a visualização de partículas na superfície das células e ainda um acúmulo preferencial das nanopartículas que continha o composto terapêutico TMX indica a presença de uma interação celular que promove a morte celular em decorrência da ação do fármaco presente na formulação. Com base no tamanho submicrométrico apresentado pelas nanopartículas preparadas neste estudo, é possível inferir que o mecanismo de internalização das partículas se dá por fagocitose inespecífica ou endocitose pela linhagem celular utilizada. (FARAJI e WIPF, 2009; PEREZ *et al.*, 2012).

Os ensaios celulares foram conduzidos apenas com as formulações de nanopartículas de PLA vazias e nanopartículas de PLA-TMX. Embora as formulações contendo os compostos MLT não tenham sido testadas nos ensaios celulares *in vitro*, o efeito sinérgico demonstrado pela MLT quando associada ao TMX (COS *et al.*, 1991; WILSON *et al.*, 1992; BLASK *et al.*, 1997; KILLOCK, 2014) e o fato de a adição da MLT e RBF à formulação de nanopartícula de PLA-TMX não ter promovido variações nas características físico-químicas das formulações indicam que sua presença na formulação não prejudicaria os efeitos citotóxicos observados com a formulação de NP PLA-TMX sobre as células de linhagem cancerígena e, por ser um composto endógeno, também não é passível de risco de associação a eventos adversos em células não tumorais.

## 7. Conclusão

Neste estudo, foi proposto o desenvolvimento de um sistema de liberação de fármaco funcionalizado com RBF contendo os agentes terapêuticos TMX e MLT com a finalidade de ser utilizado na terapia do câncer de mama, como uma alternativa farmacológica com eficácia e segurança superior aos métodos tradicionalmente utilizados no combate a esta doença.

O método de preparo escolhido proporcionou a obtenção de sistemas com tamanho submicrométrico e demonstrou alta capacidade para encapsulamento dos agentes terapêuticos utilizados. A utilização de um método alternativo para atender as características hidrofílicas da RBF não demonstrou causar impacto nas propriedades físico-químicas do sistema, porém reduziu a capacidade de eficiência de encapsulamento dos compostos com caráter lipofílico, efeito já esperado. O método utilizado garantiu ainda a manutenção das propriedades espectroscópicas dos compostos ativos utilizados, não ocasionando alterações estruturais ou moleculares que poderiam alterar as propriedades farmacológicas dos agentes terapêuticos.

A liberação dos compostos incorporados à matriz da nanopartícula apresenta um perfil que garante presença dos agentes terapêuticos na região alvo de maneira sustentada, proporcionado por uma liberação sustentada dos agentes. Elucidar o mecanismo de liberação permite melhor conhecer as propriedades do sistema e, assim, melhor prever o seu funcionamento quando aplicado a um sistema *in vivo*, além de ser uma característica importante para determinação de dose e posologia de

formulações com cunho farmacêutico. O sistema de liberação aqui apresentado atende às exigências necessárias para ser classificado como um sistema de liberação sustentada de agentes terapêuticos.

A citotoxicidade do sistema foi avaliada tendo como modelo uma formulação de nanopartícula de PLA-TMX e uma formulação de nanopartícula de PLA vazia. O efeito citotoxicidade apresentada pela nanopartícula contendo agente terapêutico se mostra mais eficiente do que o uso da formulação do fármaco livre, evidenciado que as características físicas, químicas, morfológicas e de perfil de liberação apresentadas pelo sistema permitem que a aplicação de nanopartículas como sistema de liberação de fármaco contribuem para aumento da eficácia e segurança terapêutica de agentes convencionalmente utilizados em abordagens quimioterápicas e frequentemente associados a efeitos adversos graves que causam desconforto e riscos ao paciente. Uma limitação deste estudo foi a não realização de ensaio de citotoxicidade com as formulações contendo MLT e RBF. Apesar dos efeitos sinérgicos entre MLT e TMX, amplamente descritos na literatura, a necessidade de um estudo de citotoxicidade do sistema contendo os três compostos é importante para determinar o grau de sinergia entre os mesmos e obter informações para definição proporção ótima necessária para atingir eficácia terapêutica máxima do sistema.

As perspectivas futuras são realizar ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* contemplando as formulações de contendo também os compostos MLT e RBF em adição as formulações de nanopartículas PLA-TMX, de modo a atestar a sinergia entre TMX e MLT e avaliar a potencial ação direcionadora da RBF como agente funcionalizante para sistemas de liberação de fármacos aplicados ao combate do câncer.

## 8. Referências Bibliográficas

AFTAB, S.; SHAH, A.; NADHMAN, A.; KURBANOGLU, S.; AYSIL OZKAN, S.; DIONYSIOU, D. D.; SHUKLA, S. S.; AMINABHAVI, T. M. Nanomedicine: An effective tool in cancer therapy. **Int J Pharm**, v. 540, n. 1-2, p. 132-149, Apr 5 2018. ISSN 1873-3476 (Electronic) 0378-5173 (Linking).

ALTMeyer, C.; KARAM, T. K.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Tamoxifen-loaded poly(L-lactide) nanoparticles: Development, characterization and in vitro evaluation of cytotoxicity. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 60, p. 135-142, 2016.

ALYAFEE, Y. A.; ALAAMERY, M.; BAWAZEER, S.; ALMUTAIRI, M. S.; ALGHAMDI, B.; ALOMRAN, N.; SHEEREEN, A.; DAGHESTANI, M.; MASSADEH, S. Preparation of anastrozole loaded PEG-PLA nanoparticles: evaluation of apoptotic response of breast cancer cell lines. **Int J Nanomedicine**, v. 13, p. 199-208, 2018. ISSN 1178-2013 (Electronic)  
1176-9114 (Linking).

ARIFIN, D. Y.; LEE, L. Y.; WANG, C. H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 58, n. 12-13, p. 1274-1325, Nov 30 2006. ISSN 0169-409X (Print)  
0169-409X (Linking).

AYALA, V.; HERRERA, A. P.; LATORRE-ESTEVEZ, M.; TORRES-LUGO, M.; RINALDI, C. Effect of surface charge on the colloidal stability and in vitro uptake of carboxymethyl dextran-coated iron oxide nanoparticles. **J Nanopart Res**, v. 15, n. 8, p. 1874, Aug 1 2013. ISSN 1388-0764 (Print)  
1388-0764.

BARAR, J. Bioimpacts of nanoparticle size: why it matters? **Bioimpacts**, v. 5, n. 3, p. 113-115, 2015. ISSN 2228-5652 (Print)  
2228-5652 (Linking).

BAREFORD, L. M.; AVARITT, B. R.; GHANDEHARI, H.; NAN, A.; SWAAN, P. W. Riboflavin-targeted polymer conjugates for breast tumor delivery. **Pharm Res**, v. 30, n. 7, p. 1799-1812, Jul 2013. ISSN 0724-8741.

BARHOUM, A.; LUISA GARCÍA-BETANCOURT, M. Chapter 10 - Physicochemical characterization of nanomaterials: size, morphology, optical, magnetic, and electrical properties. In: BARHOUM, A. e MAKHLOUF, A. S. H. (Ed.). **Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures**: Elsevier, 2018. p.279-304. ISBN 978-0-323-51254-1.

BARZEGAR-JALALI, M.; ADIBKIA, K.; VALIZADEH, H.; SHADBAD, M. R.; NOKHODCHI, A.; OMIDI, Y.; MOHAMMADI, G.; NEZHADI, S. H.; HASAN, M. Kinetic analysis of drug release from nanoparticles. **J Pharm Pharm Sci**, v. 11, n. 1, p. 167-177, 2008. ISSN 1482-1826.

BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynth Res**, v. 101, n. 2-3, p. 157-170, Aug-Sep 2009. ISSN 1573-5079 (Electronic)  
0166-8595 (Linking).

BEZTSINNA, N.; TSVETKOVA, Y.; BARTNECK, M.; LAMMERS, T.; KIESSLING, F.; BESTEL, I. Amphiphilic Phospholipid-Based Riboflavin Derivatives for Tumor Targeting Nanomedicines. **Bioconjug Chem**, v. 27, n. 9, p. 2048-2061, Sep 21 2016. ISSN 1043-1802.

BHARATWAJ, B.; DIMOVSKI, R.; CONTI, D. S.; DA ROCHA, S. R. Polymeric nanocarriers for transport modulation across the pulmonary epithelium: dendrimers,

polymeric nanoparticles, and their nanoblends. **AAPS J**, v. 16, n. 3, p. 522-538, May 2014. ISSN 1550-7416 (Electronic)  
1550-7416 (Linking).

BLASK, D. E.; WILSON, S. T.; ZALATAN, F. Physiological melatonin inhibition of human breast cancer cell growth in vitro: evidence for a glutathione-mediated pathway. **Cancer Res**, v. 57, n. 10, p. 1909-1914, May 15 1997. ISSN 0008-5472 (Print)  
0008-5472.

BOLOGNESI, M. L.; GANDINI, A.; PRATI, F.; ULIASSI, E. From Companion Diagnostics to Theranostics: A New Avenue for Alzheimer's Disease? **J Med Chem**, v. 59, n. 17, p. 7759-7770, Sep 8 2016. ISSN 1520-4804 (Electronic)  
0022-2623 (Linking).

BORIN, T. F.; ARBAB, A. S.; GELALETI, G. B.; FERREIRA, L. C.; MOSCHETTA, M. G.; JARDIM-PERASSI, B. V.; ISKANDER, A. S.; VARMA, N. R.; SHANKAR, A.; COIMBRA, V. B.; FABRI, V. A.; DE OLIVEIRA, J. G.; ZUCCARI, D. A. Melatonin decreases breast cancer metastasis by modulating Rho-associated kinase protein-1 expression. **J Pineal Res**, v. 60, n. 1, p. 3-15, Jan 2016. ISSN 0742-3098.

BRANQUINHO, R. T.; MOSQUEIRA, V. C.; KANO, E. K.; DE SOUZA, J.; DORIM, D. D.; SAUDE-GUIMARAES, D. A.; DE LANA, M. HPLC-DAD and UV-spectrophotometry for the determination of lychnopholide in nanocapsule dosage form: validation and application to release kinetic study. **J Chromatogr Sci**, v. 52, n. 1, p. 19-26, Jan 2014. ISSN 0021-9665.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov 2018. ISSN 1542-4863 (Electronic)  
0007-9235 (Linking).

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54, n. 5, p. 631-651, Sep 13 2002. ISSN 0169-409X (Print)  
0169-409X (Linking).

BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. **Int J Pharm**, v. 336, n. 2, p. 367-375, May 24 2007. ISSN 0378-5173 (Print)  
0378-5173 (Linking).

CASTER, J. M.; YU, S. K.; PATEL, A. N.; NEWMAN, N. J.; LEE, Z. J.; WARNER, S. B.; WAGNER, K. T.; ROCHE, K. C.; TIAN, X.; MIN, Y.; WANG, A. Z. Effect of particle size on the biodistribution, toxicity, and efficacy of drug-loaded polymeric nanoparticles in chemoradiotherapy. **Nanomedicine**, v. 13, n. 5, p. 1673-1683, Jul 2017. ISSN 1549-9642 (Electronic)  
1549-9634 (Linking).



CHAN, J. M.; VALENCIA, P. M.; ZHANG, L.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Polymeric nanoparticles for drug delivery. **Methods Mol Biol**, v. 624, p. 163-175, 2010. ISSN 1064-3745.

CHARRON, D. M.; CHEN, J.; ZHENG, G. Theranostic lipid nanoparticles for cancer medicine. **Cancer Treat Res**, v. 166, p. 103-127, 2015. ISSN 0927-3042 (Print) 0927-3042 (Linking).

CHAWLA, J. S.; AMIJI, M. M. Cellular uptake and concentrations of tamoxifen upon administration in poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles. **AAPS PharmSci**, v. 5, n. 1, p. E3, 2003. ISSN 1522-1059 (Electronic) 1522-1059 (Linking).

CHEN, G.; HAN, G. Theranostic upconversion nanoparticles (I). **Theranostics**, v. 3, n. 4, p. 289-291, 2013. ISSN 1838-7640 (Electronic) 1838-7640 (Linking).

CHEN, G.; ROY, I.; YANG, C.; PRASAD, P. N. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. **Chem Rev**, v. 116, n. 5, p. 2826-2885, Mar 9 2016. ISSN 1520-6890 (Electronic) 0009-2665 (Linking).

CHEN, W.; PALAZZO, A.; HENNINK, W. E.; KOK, R. J. Effect of Particle Size on Drug Loading and Release Kinetics of Gefitinib-Loaded PLGA Microspheres. v. 14, n. 2, p. 459-467, Feb 6 2017. ISSN 1543-8384.

CHOI, K. Y.; JEON, E. J.; YOON, H. Y.; LEE, B. S.; NA, J. H.; MIN, K. H.; KIM, S. Y.; MYUNG, S. J.; LEE, S.; CHEN, X.; KWON, I. C.; CHOI, K.; JEONG, S. Y.; KIM, K.; PARK, J. H. Theranostic nanoparticles based on PEGylated hyaluronic acid for the diagnosis, therapy and monitoring of colon cancer. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 6186-6193, Sep 2012. ISSN 1878-5905 (Electronic) 0142-9612 (Linking).

CHUNG, Y. I.; KIM, J. C.; KIM, Y. H.; TAE, G.; LEE, S. Y.; KIM, K.; KWON, I. C. The effect of surface functionalization of PLGA nanoparticles by heparin- or chitosan-conjugated Pluronic on tumor targeting. **J Control Release**, v. 143, n. 3, p. 374-382, May 10 2010. ISSN 1873-4995 (Electronic) 0168-3659 (Linking).

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Med Rev**, v. 9, n. 1, p. 11-24, Feb 2005. ISSN 1087-0792 (Print) 1087-0792 (Linking).

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta potential measurement. **Methods Mol Biol**, v. 697, p. 63-70, 2011. ISSN 1064-3745.

COS, S.; BLASK, D. E.; LEMUS-WILSON, A.; HILL, A. B. Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and "estrogen-rescue" of MCF-7 human breast cancer cells in culture. **J Pineal Res**, v. 10, n. 1, p. 36-42, Jan 1991. ISSN 0742-3098 (Print) 0742-3098.

COS, S.; MARTINEZ-CAMPA, C.; MEDIAVILLA, M. D.; SANCHEZ-BARCELO, E. J. Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. **J Pineal Res**, v. 38, n. 2, p. 136-142, Mar 2005. ISSN 0742-3098 (Print) 0742-3098.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123-133, 2001.

CUTANDO, A.; LOPEZ-VALVERDE, A.; ARIAS-SANTIAGO, S.; J, D. E. V.; RG, D. E. D. Role of melatonin in cancer treatment. **Anticancer Res**, v. 32, n. 7, p. 2747-2753, Jul 2012. ISSN 1791-7530 (Electronic) 0250-7005 (Linking).

CUZICK, J.; SESTAK, I.; CAWTHORN, S.; HAMED, H.; HOLLI, K.; HOWELL, A.; FORBES, J. F. Tamoxifen for prevention of breast cancer: extended long-term follow-up of the IBIS-I breast cancer prevention trial. **Lancet Oncol**, v. 16, n. 1, p. 67-75, Jan 2015. ISSN 1470-2045 (Print) 1470-2045.

D'ADDIO, S. M.; BUKARI, A. A.; DAWOUD, M.; BUNJES, H.; RINALDI, C.; PRUD'HOMME, R. K. Determining drug release rates of hydrophobic compounds from nanocarriers. **Philos Trans A Math Phys Eng Sci**, v. 374, n. 2072, Jul 28 2016. ISSN 1364-503X (Print) 1364-503x.

D'SOUZA, S. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. **Advances in Pharmaceutics**, v. 2014, p. 12, 2014.

DADRAS, P.; ATYABI, F.; IRANI, S.; MA'MANI, L.; FOROUMADI, A.; MIRZAIE, Z. H.; EBRAHIMI, M.; DINARVAND, R. Formulation and evaluation of targeted nanoparticles for breast cancer theranostic system. **Eur J Pharm Sci**, v. 97, p. 47-54, Jan 15 2017. ISSN 0928-0987.

DIAS, D. J. S. **Nanopartículas poliméricas contendo clorambucil funcionalizadas com peptídeo direcionador: produção, caracterização e ensaios biológicos com células tumorais**. 2017. 129 Tese (Doutorado). Insituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil.

DING, Y.; ZHENG, J.; XIA, X.; REN, T.; KAN, J. Preparation and characterization of resistant starch type IV nanoparticles through ultrasonication and miniemulsion cross-linking. **Carbohydr Polym**, v. 141, p. 151-159, May 5 2016. ISSN 0144-8617.

DOANE, T. L.; CHUANG, C. H.; HILL, R. J.; BURDA, C. Nanoparticle zeta -potentials. **Acc Chem Res**, v. 45, n. 3, p. 317-326, Mar 20 2012. ISSN 1520-4898 (Electronic) 0001-4842 (Linking).

DOSEKOVA, E.; FILIP, J.; BERTOK, T.; BOTH, P.; KASAK, P.; TKAC, J. Nanotechnology in Glycomics: Applications in Diagnostics, Therapy, Imaging, and

Separation Processes. **Med Res Rev**, v. 37, n. 3, p. 514-626, May 2017. ISSN 1098-1128 (Electronic)  
0198-6325 (Linking).

EKMEKCIOGLU, C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. **Biomed Pharmacother**, v. 60, n. 3, p. 97-108, Apr 2006. ISSN 0753-3322 (Print)  
0753-3322 (Linking).

EL FAGUI, A.; AMIEL, C. PLA nanoparticles coated with a beta-cyclodextrin polymer shell: preparation, characterization and release kinetics of a hydrophobic compound. **Int J Pharm**, v. 436, n. 1-2, p. 644-651, Oct 15 2012. ISSN 1873-3476 (Electronic)  
0378-5173 (Linking).

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorg Med Chem**, v. 17, n. 8, p. 2950-2962, Apr 15 2009. ISSN 1464-3391 (Electronic)  
0968-0896 (Linking).

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M.; PINEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Int J Cancer**, Oct 23 2018. ISSN 1097-0215 (Electronic)  
0020-7136 (Linking).

FEYNMAN, R. P. There's plenty of room at the bottom. **Engineering and Science**, v. 23, n. 5, p. 22-36, 1960. ISSN 0013-7812.

FORNAGUERA, C.; SOLANS, C. Methods for the In Vitro Characterization of Nanomedicines-Biological Component Interaction. **J Pers Med**, v. 7, n. 1, Mar 2017. ISSN 2075-4426 (Print)  
2075-4426.

FROHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 5577-5591, 2012. ISSN 1178-2013 (Electronic)  
1176-9114 (Linking).

FU, Y.; KAO, W. J. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 7, n. 4, p. 429-444, Apr 2010. ISSN 1742-5247 (Print)  
1742-5247.

FUNKHOUSER, J. Reinventing pharma: The theranostic revolution. **Current Drugs Discov**, v. 2, p. 17-19, 2002.

GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharm Res**, v. 21, n. 8, p. 1428-1439, Aug 2004. ISSN 0724-8741 (Print)  
0724-8741 (Linking).

GALINDO-RODRIGUEZ, S. A.; PUEL, F.; BRIANCON, S.; ALLEMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles. **Eur J Pharm Sci**, v. 25, n. 4-5, p. 357-367, Jul-Aug 2005. ISSN 0928-0987 (Print)  
0928-0987 (Linking).

GAO, H.; SHI, W.; FREUND, L. B. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 27, p. 9469-9474, Jul 5 2005. ISSN 0027-8424 (Print)  
0027-8424 (Linking).

GOMES, A. J.; ESPREAFICO, E. M.; TFOUNI, E. trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> and [Ru(NO)(Hedta)] incorporated in PLGA nanoparticles for the delivery of nitric oxide to B16-F10 cells: cytotoxicity and phototoxicity. **Mol Pharm**, v. 10, n. 10, p. 3544-3554, Oct 7 2013. ISSN 1543-8392 (Electronic)  
1543-8384 (Linking).

GONZALEZ-GONZALEZ, A.; MEDIAVILLA, M. D.; SANCHEZ-BARCELO, E. J. Melatonin: A Molecule for Reducing Breast Cancer Risk. **Molecules**, v. 23, n. 2, Feb 6 2018. ISSN 1420-3049.

GRANT, S. G.; MELAN, M. A.; LATIMER, J. J.; WITT-ENDERBY, P. A. Melatonin and breast cancer: cellular mechanisms, clinical studies and future perspectives. **Expert Rev Mol Med**, v. 11, p. e5, Feb 5 2009. ISSN 1462-3994.

GROSSEN, P.; WITZIGMANN, D.; SIEBER, S.; HUWYLER, J. PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application. **J Control Release**, v. 260, p. 46-60, Aug 28 2017. ISSN 1873-4995 (Electronic)  
0168-3659 (Linking).

GUNEY ESKILER, G.; CECENER, G.; DIKMEN, G.; EGELI, U.; TUNCA, B. Solid lipid nanoparticles: Reversal of tamoxifen resistance in breast cancer. **Eur J Pharm Sci**, v. 120, p. 73-88, Jul 30 2018. ISSN 1879-0720 (Electronic)  
0928-0987 (Linking).

HE, C.; HU, Y.; YIN, L.; TANG, C.; YIN, C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3657-3666, May 2010. ISSN 1878-5905 (Electronic)  
0142-9612 (Linking).

HE, X.; MA, J.; MERCADO, A. E.; XU, W.; JABBARI, E. Cytotoxicity of Paclitaxel in biodegradable self-assembled core-shell poly(lactide-co-glycolide ethylene oxide fumarate) nanoparticles. **Pharm Res**, v. 25, n. 7, p. 1552-1562, Jul 2008. ISSN 0724-8741 (Print)  
0724-8741 (Linking).

HILL, S. M.; BELANCIO, V. P.; DAUCHY, R. T.; XIANG, S.; BRIMER, S.; MAO, L.; HAUCH, A.; LUNDBERG, P. W.; SUMMERS, W.; YUAN, L.; FRASCH, T.; BLASK, D. E. Melatonin: an inhibitor of breast cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 22, n. 3, p. R183-204, Jun 2015. ISSN 1351-0088.

HOFFMANN, S.; GORZELANNY, C.; MOERSCHBACHER, B. Physicochemical Characterization of FRET-Labelled Chitosan Nanocapsules and Model Degradation Studies. v. 8, n. 10, Oct 2018. ISSN 2079-4991 (Print) 2079-4991.

HU, F. X.; NEOH, K. G.; KANG, E. T. Synthesis and in vitro anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles. **Biomaterials**, v. 27, n. 33, p. 5725-5733, Nov 2006. ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612 (Linking).

HU, J.; XIE, L.; ZHAO, W.; SUN, M.; LIU, X.; GAO, W. Design of tumor-homing and pH-responsive polypeptide-doxorubicin nanoparticles with enhanced anticancer efficacy and reduced side effects. **Chem Commun (Camb)**, v. 51, n. 57, p. 11405-11408, Jul 21 2015. ISSN 1364-548X (Electronic) 1359-7345 (Linking).

JAGADEESH, H. G.; V, K. D. Tamoxifen loaded poly ( $\epsilon$ Caprolactone) based injectable microspheres for breast cancer. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 2, n. 4, p. 189-195, 2010. ISSN 0975-1491.

JAYAPPAUL, J.; HODENIUS, M.; ARNS, S.; LEDERLE, W.; LAMMERS, T.; COMBA, P.; KIESSLING, F.; GAETJENS, J. FMN-coated fluorescent iron oxide nanoparticles for RCP-mediated targeting and labeling of metabolically active cancer and endothelial cells. **Biomaterials**, v. 32, n. 25, p. 5863-5871, Sep 2011. ISSN 0142-9612.

JORDAN, V. C. Role of tamoxifen in the long-term treatment and prevention of breast cancer. **Oncology (Williston Park)**, v. 2, n. 9, p. 19-28, Sep 1988. ISSN 0890-9091 (Print) 0890-9091 (Linking).

\_\_\_\_\_. The role of tamoxifen in the treatment and prevention of breast cancer. **Curr Probl Cancer**, v. 16, n. 3, p. 129-176, May-Jun 1992. ISSN 0147-0272 (Print) 0147-0272 (Linking).

KARLSSON, J.; VAUGHAN, H. J.; GREEN, J. J. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Therapeutic Cancer Treatments. **Annu Rev Chem Biomol Eng**, v. 9, p. 105-127, Jun 7 2018. ISSN 1947-5438.

KAYL, A. E.; MEYERS, C. A. Side-effects of chemotherapy and quality of life in ovarian and breast cancer patients. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 18, n. 1, p. 24-28, Feb 2006. ISSN 1040-872x.

KELKAR, S. S.; REINEKE, T. M. Theranostics: combining imaging and therapy. **Bioconjug Chem**, v. 22, n. 10, p. 1879-1903, Oct 19 2011. ISSN 1043-1802.

KHUROO, T.; VERMA, D.; TALEGAONKAR, S.; PADHI, S.; PANDA, A. K.; IQBAL, Z. Topotecan-tamoxifen duple PLGA polymeric nanoparticles: investigation of in vitro, in vivo and cellular uptake potential. **Int J Pharm**, v. 473, n. 1-2, p. 384-394, Oct 1 2014. ISSN 1873-3476 (Electronic)

0378-5173 (Linking).

KILICARSLAN, M.; GUMUSTAS, M.; YILDIZ, S.; BAYKARA, T. Preparation and characterization of chitosan-based spray-dried microparticles for the delivery of clindamycin phosphate to periodontal pockets. **Curr Drug Deliv**, v. 11, n. 1, p. 98-111, 2014. ISSN 1567-2018.

KILLOCK, D. Drug therapy: keeping rats in the dark sheds light on tamoxifen resistance. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 11, n. 9, p. 500, Sep 2014. ISSN 1759-4774.

KONG, T.; HAO, L.; WEI, Y.; CAI, X.; ZHU, B. Doxorubicin conjugated carbon dots as a drug delivery system for human breast cancer therapy. **Cell Prolif**, v. 51, n. 5, p. e12488, Oct 2018. ISSN 1365-2184 (Electronic)  
0960-7722 (Linking).

KRUKEMEYER, M. G.; KRENN, V.; HUEBNER, F.; WAGNER, W.; RESCH, R. History and Possible Uses of Nanomedicine Based on Nanoparticles and Nanotechnological Progress. **J Nanomed Nanotechnol**, v. 6, n. 6, p. 1-7, 2015. ISSN 2157-7439.

KULKARNI, S. A.; FENG, S. S. Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. **Pharm Res**, v. 30, n. 10, p. 2512-2522, Oct 2013. ISSN 1573-904X (Electronic)  
0724-8741 (Linking).

KUMAR, S.; BHANJANA, G.; KUMAR, A.; TANEJA, K.; DILBAGHI, N.; KIM, K. H. Synthesis and optimization of ceftriaxone-loaded solid lipid nanocarriers. **Chem Phys Lipids**, v. 200, p. 126-132, Oct 2016. ISSN 1873-2941 (Electronic)  
0009-3084 (Linking).

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.

LAKKADWALA, S.; NGUYEN, S.; LAWRENCE, J.; NAULI, S. M.; NESAMONY, J. Physico-chemical characterisation, cytotoxic activity, and biocompatibility studies of tamoxifen-loaded solid lipid nanoparticles prepared via a temperature-modulated solidification method. **J Microencapsul**, v. 31, n. 6, p. 590-599, 2014. ISSN 1464-5246 (Electronic)  
0265-2048 (Linking).

LEE, B. K.; YUN, Y.; PARK, K. PLA micro- and nano-particles. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 107, p. 176-191, Dec 15 2016. ISSN 0169-409X (Print)  
0169-409x.

LEE, J. J.; SAIFUL YAZAN, L.; CHE ABDULLAH, C. A. A review on current nanomaterials and their drug conjugate for targeted breast cancer treatment. **Int J Nanomedicine**, v. 12, p. 2373-2384, 2017. ISSN 1178-2013 (Electronic)  
1176-9114 (Linking).

LENZI, E. K.; NOVATSKI, A.; FARAGO, P. V.; ALMEIDA, M. A.; ZAWADZKI, S. F.; MENECHINI NETO, R. Diffusion Processes and Drug Release: Capsaicinoids - Loaded Poly (epsilon-caprolactone) Microparticles. **Mol Pharm**, v. 11, n. 6, p. e0157662, 2016. ISSN 1932-6203.

LI, S.; LIU, R.; BEKANA, D.; LAI, Y.; LIU, J. Self-assembly of supramolecular nanotubes/microtubes from 3,5-dimethyl-4-iodopyrazole for plasmonic nanoparticle organization. **Nanoscale**, v. 10, n. 44, p. 20804-20812, Nov 15 2018. ISSN 2040-3372 (Electronic)  
2040-3364 (Linking).

LI, Y.; LI, S.; ZHOU, Y.; MENG, X.; ZHANG, J. J.; XU, D. P.; LI, H. B. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 24, p. 39896-39921, Jun 13 2017. ISSN 1949-2553.

LIN, P. C.; LIN, S.; WANG, P. C.; SRIDHAR, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnol Adv**, v. 32, n. 4, p. 711-726, Jul-Aug 2014. ISSN 1873-1899 (Electronic)  
0734-9750 (Linking).

LIU, C. H.; WU, C. T.; FANG, J. Y. Characterization and formulation optimization of solid lipid nanoparticles in vitamin K1 delivery. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 36, n. 7, p. 751-761, Jul 2010. ISSN 1520-5762 (Electronic)  
0363-9045 (Linking).

LIU, F.; ANTONIOU, J.; LI, Y.; YI, J.; YOKOYAMA, W.; MA, J.; ZHONG, F. Preparation of gelatin films incorporated with tea polyphenol nanoparticles for enhancing controlled-release antioxidant properties. **J Agric Food Chem**, v. 63, n. 15, p. 3987-3995, Apr 22 2015. ISSN 1520-5118 (Electronic)  
0021-8561 (Linking).

LIU, P.; YUE, C.; SHI, B.; GAO, G.; LI, M.; WANG, B.; MA, Y.; CAI, L. Dextran based sensitive theranostic nanoparticles for near-infrared imaging and photothermal therapy in vitro. **Chem Commun (Camb)**, v. 49, n. 55, p. 6143-6145, Jul 14 2013. ISSN 1364-548X (Electronic)  
1359-7345 (Linking).

LOPES, M.; ABRAHIM, B.; VEIGA, F.; SEICA, R.; CABRAL, L. M.; ARNAUD, P.; ANDRADE, J. C.; RIBEIRO, A. J. Preparation methods and applications behind alginate-based particles. **Expert Opin Drug Deliv**, p. 1-14, Aug 5 2016. ISSN 1744-7593 (Electronic)  
1742-5247 (Linking).

MANAIA, E. B.; ABUÇAFY, M. P.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; SILVA, B. L.; OSHIRO JUNIOR, J. A.; CHIAVACCI, L. A. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. **Int J Nanomedicine**, v. 12, p. 4991-5011, 2017. ISSN 1176-9114 (Print)  
1176-9114.

MARTELLA, E.; FERRONI, C.; GUERRINI, A.; BALLESTRI, M.; COLUMBARO, M.; SANTI, S.; SOTGIU, G.; SERRA, M.; DONATI, D. M.; LUCARELLI, E.; VARCHI, G.;

DUCHI, S. Functionalized Keratin as Nanotechnology-Based Drug Delivery System for the Pharmacological Treatment of Osteosarcoma. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 11, Nov 20 2018. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking).

MASOOD, F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 60, p. 569-578, Mar 1 2016. ISSN 1873-0191 (Electronic) 0928-4931 (Linking).

MAURI, E.; PAPA, S.; MASI, M.; VEGLIANESE, P.; ROSSI, F. Novel functionalization strategies to improve drug delivery from polymers. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 14, n. 11, p. 1305-1313, Nov 2017. ISSN 1744-7593 (Electronic) 1742-5247 (Linking).

MAZUMDAR, S.; ITALIYA, K. S.; SHARMA, S.; CHITKARA, D.; MITTAL, A. Effective cellular internalization, cell cycle arrest and improved pharmacokinetics of Tamoxifen by cholesterol based lipopolymeric nanoparticles. **Int J Pharm**, v. 543, n. 1-2, p. 96-106, May 30 2018. ISSN 1873-3476 (Electronic) 0378-5173 (Linking).

MEDIAVILLA, M. D.; COS, S.; SANCHEZ-BARCELO, E. J. Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. **Life Sci**, v. 65, n. 4, p. 415-420, 1999. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205.

MOUFFOUK, F.; SIMAO, T.; DORNELLES, D. F.; LOPES, A. D.; SAU, P.; MARTINS, J.; ABU-SALAH, K. M.; ALROKAYAN, S. A.; ROSA DA COSTA, A. M.; DOS SANTOS, N. R. Self-assembled polymeric nanoparticles as new, smart contrast agents for cancer early detection using magnetic resonance imaging. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 63-76, 2015. ISSN 1178-2013 (Electronic) 1176-9114 (Linking).

NADIMI, A. E.; EBRAHIMIPOUR, S. Y.; AFSHAR, E. G.; FALAHATI-POUR, S. K.; AHMADI, Z.; MOHAMMADINEJAD, R.; MOHAMADI, M. Nano-scale drug delivery systems for antiarrhythmic agents. **Eur J Med Chem**, v. 157, p. 1153-1163, Sep 5 2018. ISSN 1768-3254 (Electronic) 0223-5234 (Linking).

NAVA-ARZALUZ, M. G.; PINON-SEGUNDO, E.; GANEM-RONDERO, A.; LECHUGA-BALLESTEROS, D. Single emulsion-solvent evaporation technique and modifications for the preparation of pharmaceutical polymeric nanoparticles. **Recent Pat Drug Deliv Formul**, v. 6, n. 3, p. 209-223, Dec 2012. ISSN 1872-2113.

NAZARALI, S. A.; NAROD, S. A. Tamoxifen for women at high risk of breast cancer. **Breast Cancer (Dove Med Press)**, v. 6, p. 29-36, 2014. ISSN 1179-1314 (Print) 1179-1314.

NILAPWAR, S. M.; NARDELLI, M.; WESTERHOFF, H. V.; VERMA, M. Absorption spectroscopy. **Methods Enzymol**, v. 500, p. 59-75, 2011. ISSN 0076-6879.



NORIEGA-PELAEZ, E. K.; MENDOZA-MUNOZ, N.; GANEM-QUINTANAR, A.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Optimization of the emulsification and solvent displacement method for the preparation of solid lipid nanoparticles. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 37, n. 2, p. 160-166, Feb 2011. ISSN 1520-5762 (Electronic) 0363-9045 (Linking).

NOTHNAGEL, L.; WACKER, M. G. How to measure release from nanosized carriers? **Eur J Pharm Sci**, v. 120, p. 199-211, Jul 30 2018. ISSN 0928-0987.

OSBORNE, C. K. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. **N Engl J Med**, v. 339, n. 22, p. 1609-1618, Nov 26 1998. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking).

PANDEY, S. K.; GHOSH, S.; MAITI, P.; HALDAR, C. Therapeutic efficacy and toxicity of tamoxifen loaded PLA nanoparticles for breast cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 309-319, 2015.

PAROT, P.; DUFRENE, Y. F.; HINTERDORFER, P.; LE GRIMELLE, C.; NAVAJAS, D.; PELLEQUER, J. L.; SCHEURING, S. Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine. **J Mol Recognit**, v. 20, n. 6, p. 418-431, Nov-Dec 2007. ISSN 0952-3499 (Print) 0952-3499 (Linking).

PEPPAS, N. A. 1. Commentary on an exponential model for the analysis of drug delivery: Original research article: a simple equation for description of solute release: I II. Fickian and non-Fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, 1987. **J Control Release**, v. 190, p. 31-32, Sep 28 2014. ISSN 1873-4995 (Electronic) 0168-3659 (Linking).

PEREZ, E.; BENITO, M.; TEIJON, C.; OLMO, R.; TEIJON, J. M.; BLANCO, M. D. Tamoxifen-loaded nanoparticles based on a novel mixture of biodegradable polyesters: characterization and in vitro evaluation as sustained release systems. **J Microencapsul**, v. 29, n. 4, p. 309-322, 2012. ISSN 1464-5246 (Electronic) 0265-2048 (Linking).

PETRYK, A. A.; GIUSTINI, A. J.; GOTTESMAN, R. E.; TREMBLY, B. S.; HOOPES, P. J. Comparison of magnetic nanoparticle and microwave hyperthermia cancer treatment methodology and treatment effect in a rodent breast cancer model. **Int J Hyperthermia**, v. 29, n. 8, p. 819-827, Dec 2013. ISSN 1464-5157 (Electronic) 0265-6736 (Linking).

PINON-SEGUNDO, E.; NAVA-ARZALUZ, M. G.; LECHUGA-BALLESTEROS, D. Pharmaceutical polymeric nanoparticles prepared by the double emulsion- solvent evaporation technique. **Recent Pat Drug Deliv Formul**, v. 6, n. 3, p. 224-235, Dec 2012. ISSN 1872-2113.

POWERS, H. J. Riboflavin (vitamin B-2) and health. **Am J Clin Nutr**, v. 77, n. 6, p. 1352-1360, Jun 2003. ISSN 0002-9165 (Print)

0002-9165.

PRASAD, M.; LAMBE, U. P.; BRAR, B.; SHAH, I.; J, M.; RANJAN, K.; RAO, R.; KUMAR, S.; MAHANT, S.; KHURANA, S. K.; IQBAL, H. M. N.; DHAMA, K.; MISRI, J.; PRASAD, G. Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world. **Biomed Pharmacother**, v. 97, p. 1521-1537, Jan 2018. ISSN 1950-6007 (Electronic) 0753-3322 (Linking).

PROKOP, A.; DAVIDSON, J. M. Nanovehicular intracellular delivery systems. **J Pharm Sci**, v. 97, n. 9, p. 3518-3590, Sep 2008. ISSN 1520-6017 (Electronic) 0022-3549 (Linking).

RAY, S.; GHOSH RAY, S.; MANDAL, S. Development of bicalutamide-loaded PLGA nanoparticles: preparation, characterization and in-vitro evaluation for the treatment of prostate cancer. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, p. 1-11, Jun 21 2016. ISSN 2169-141X (Electronic) 2169-1401 (Linking).

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, Mar 2006. ISSN 1549-9634.

REITER, R. J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocr Rev**, v. 12, n. 2, p. 151-180, May 1991. ISSN 0163-769X (Print) 0163-769X (Linking).

RIVERA-RODRIGUEZ, A.; CHIU-LAM, A.; MOROZOV, V. M.; ISHOV, A. M.; RINALDI, C. Magnetic nanoparticle hyperthermia potentiates paclitaxel activity in sensitive and resistant breast cancer cells. **Int J Nanomedicine**, v. 13, p. 4771-4779, 2018. ISSN 1178-2013 (Electronic) 1176-9114 (Linking).

RIVLIN, R. S. Riboflavin and cancer: a review. **Cancer Res**, v. 33, n. 9, p. 1977-1986, Sep 1973. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472.

RIZVI, S. A. A.; SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharm J**, v. 26, n. 1, p. 64-70, Jan 2018. ISSN 1319-0164 (Print) 1319-0164 (Linking).

ROSENBLUM, D.; PEER, D. Omics-based nanomedicine: the future of personalized oncology. **Cancer Lett**, v. 352, n. 1, p. 126-136, Sep 28 2014. ISSN 1872-7980 (Electronic) 0304-3835 (Linking).

ROSER, M.; FISCHER, D.; KISSEL, T. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 46, n. 3, p. 255-263, 1998/11/01/ 1998. ISSN 0939-6411.

SADAT, S. M.; SAEIDNIA, S.; NAZARALI, A. J.; HADDADI, A. Nano-pharmaceutical formulations for targeted drug delivery against HER2 in breast cancer. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 15, n. 1, p. 71-86, 2015. ISSN 1568-0096.

SCHADLICH, A.; CAYSA, H.; MUELLER, T.; TENAMBERGEN, F.; ROSE, C.; GOPFERICH, A.; KUNTSCHKE, J.; MADER, K. Tumor Accumulation of NIR Fluorescent PEG PLA Nanoparticles: Impact of Particle Size and Human Xenograft Tumor Model. **ACS Nano**, v. 5, n. 11, p. 8710-8720, 2011.

SEIGNEURIC, R.; MARKEY, L.; NUYTEN, D. S.; DUBERNET, C.; EVELO, C. T.; FINOT, E.; GARRIDO, C. From nanotechnology to nanomedicine: applications to cancer research. **Curr Mol Med**, v. 10, n. 7, p. 640-652, Oct 2010. ISSN 1566-5240.

SEZGIN-BAYINDIR, Z.; ELCIN, A. E.; PARMAKSIZ, M.; ELCIN, Y. M.; YUKSEL, N. Investigations on clonazepam-loaded polymeric micelle-like nanoparticles for safe drug administration during pregnancy. **J Microencapsul**, v. 35, n. 2, p. 149-164, Mar 2018. ISSN 1464-5246 (Electronic)  
0265-2048 (Linking).

SHAIKH, H. K.; KSHIRSAGAR, R. V.; PATIL, S. G. Mathematical models for drug release characterization: A review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 04, p. 324-338, 2015. ISSN 2278-4357.

SHAO, W.; PAUL, A.; ZHAO, B.; LEE, C.; RODES, L.; PRAKASH, S. Carbon nanotube lipid drug approach for targeted delivery of a chemotherapy drug in a human breast cancer xenograft animal model. **Biomaterials**, v. 34, n. 38, p. 10109-10119, Dec 2013. ISSN 1878-5905 (Electronic)  
0142-9612 (Linking).

SHEAGREN, J. N.; BLOCK, J. B.; WOLFF, S. M. Reticuloendothelial system phagocytic function in patients with Hodgkin's disease. **J Clin Invest**, v. 46, n. 5, p. 855-862, May 1967. ISSN 0021-9738 (Print)  
0021-9738.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse. **Int J Pharm**, v. 418, n. 1, p. 6-12, Oct 10 2011. ISSN 1873-3476 (Electronic)  
0378-5173 (Linking).

SINGH, S.; MEHRA, N. K.; JAIN, N. K. Development and Characterization of the Paclitaxel loaded Riboflavin and Thiamine Conjugated Carbon Nanotubes for Cancer Treatment. **Pharm Res**, v. 33, n. 7, p. 1769-1781, Jul 2016. ISSN 0724-8741.

SKOGLUND, S.; HEDBERG, J.; YUNDA, E.; GODYMCHUK, A.; BLOMBERG, E.; ODNEVALL WALLINDER, I. Difficulties and flaws in performing accurate determinations of zeta potentials of metal nanoparticles in complex solutions-Four case studies. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. e0181735, 2017. ISSN 1932-6203 (Electronic)  
1932-6203 (Linking).

SOURSOU, G.; ALEXIOU, A.; ASHRAF, G. M.; SIYAL, A. A.; MUSHTAQ, G.; KAMAL, M. A. Applications of Nanotechnology in Diagnostics and Therapeutics of Alzheimer's and Parkinson's Disease. **Curr Drug Metab**, v. 16, n. 8, p. 705-712, 2015. ISSN 1875-5453 (Electronic)  
1389-2002 (Linking).

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophys Rev**, v. 8, n. 4, p. 409-427, Dec 2016. ISSN 1867-2450 (Print)  
1867-2450 (Linking).

SUN, Y.; WANG, Q.; CHEN, J.; LIU, L.; DING, L.; SHEN, M.; LI, J.; HAN, B.; DUAN, Y. Temperature-Sensitive Gold Nanoparticle-Coated Pluronic-PLL Nanoparticles for Drug Delivery and Chemo-Photothermal Therapy. **Theranostics**, v. 7, n. 18, p. 4424-4444, 2017. ISSN 1838-7640 (Electronic)  
1838-7640 (Linking).

SUNDARARAJ, S. C.; AL-SABBAGH, M.; RABEK, C. L.; DZIUBLA, T. D.; THOMAS, M. V.; PULEO, D. A. Comparison of sequential drug release in vitro and in vivo. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 104, n. 7, p. 1302-1310, Oct 2016. ISSN 1552-4973 (Print)  
1552-4973.

TANG, J.; LOBATTO, M. E.; READ, J. C.; MIESZAWSKA, A. J.; FAYAD, Z. A.; MULDER, W. J. Nanomedical Theranostics in Cardiovascular Disease. **Curr Cardiovasc Imaging Rep**, v. 5, n. 1, p. 19-25, Feb 2012. ISSN 1941-9066 (Print)  
1941-9074 (Linking).

TAO, J. J.; VISVANATHAN, K.; WOLFF, A. C. Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. **Breast**, v. 24 Suppl 2, p. S149-153, Nov 2015. ISSN 1532-3080 (Electronic)  
0960-9776 (Linking).

TONG, C. W. S.; WU, M.; CHO, W. C. S.; TO, K. K. W. Recent Advances in the Treatment of Breast Cancer. **Front Oncol**, v. 8, p. 227, 2018. ISSN 2234-943X (Print)  
2234-943X (Linking).

TORDJMAN, S.; CHOKRON, S.; DELORME, R.; CHARRIER, A.; BELLISSANT, E.; JAAFARI, N.; FOUGEROU, C. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. **Curr Neuropharmacol**, Dec 28 2016. ISSN 1875-6190 (Electronic)  
1570-159X (Linking).

TRACHE, A.; MEININGER, G. A. Atomic force microscopy (AFM). **Curr Protoc Microbiol**, v. Chapter 2, p. Unit 2C.2, Feb 2008.

TSVETKOVA, Y.; BEZTSINNA, N.; JAYAPPAUL, J.; WEILER, M.; ARNS, S.; SHI, Y.; LAMMERS, T.; KIESSLING, F. Refinement of adsorptive coatings for fluorescent riboflavin-receptor-targeted iron oxide nanoparticles. **Contrast Media Mol Imaging**, v. 11, n. 1, p. 47-54, Jan-Feb 2016. ISSN 1555-4309.

TUTINO, V.; DEFRANCESCO, M. L.; TOLOMEO, M.; V, D. E. N.; LORUSSO, D.; PALENI, D.; CARUSO, M. G.; NOTARNICOLA, M.; BARILE, M. The Expression of Riboflavin Transporters in Human Colorectal Cancer. **Anticancer Res**, v. 38, n. 5, p. 2659-2667, May 2018. ISSN 0250-7005.

TZENG, S. Y.; WILSON, D. R.; HANSEN, S. K.; QUINONES-HINOJOSA, A.; GREEN, J. J. Polymeric nanoparticle-based delivery of TRAIL DNA for cancer-specific killing. **Bioeng Transl Med**, v. 1, n. 2, p. 149-159, Jun 2016. ISSN 2380-6761 (Print) 2380-6761 (Linking).

ULERY, B. D.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. **Journal of polymer science. Part B, Polymer physics**, v. 49, n. 12, p. 832-864, 2011. ISSN 0887-6266 1099-0488.

UPPAL, A.; JAIN, B.; GUPTA, P. K.; DAS, K. Photodynamic action of Rose Bengal silica nanoparticle complex on breast and oral cancer cell lines. **Photochem Photobiol**, v. 87, n. 5, p. 1146-1151, Sep-Oct 2011. ISSN 1751-1097 (Electronic) 0031-8655 (Linking).

VARENNE, F.; RUSTIQUE, E.; BOTTON, J.; COTY, J. B.; LANUSSE, G.; AIT LAHCEN, M.; RIO, L.; ZANDANEL, C.; LEMARCHAND, C.; GERMAIN, M.; NEGRI, L.; COUFFIN, A. C.; BARRATT, G.; VAUTHIER, C. Towards quality assessed characterization of nanomaterial: Transfer of validated protocols for size measurement by dynamic light scattering and evaluation of zeta potential by electrophoretic light scattering. **Int J Pharm**, v. 528, n. 1-2, p. 299-311, Aug 7 2017. ISSN 1873-3476 (Electronic) 0378-5173 (Linking).

VENTOLA, C. L. The nanomedicine revolution: part 1: emerging concepts. **P t**, v. 37, n. 9, p. 512-525, Sep 2012a. ISSN 1052-1372 (Print) 1052-1372.

\_\_\_\_\_. The nanomedicine revolution: part 2: current and future clinical applications. **P t**, v. 37, n. 10, p. 582-591, Oct 2012b. ISSN 1052-1372 (Print) 1052-1372.

VERISSIMO, T. V.; SANTOS, N. T.; SILVA, J. R.; AZEVEDO, R. B.; GOMES, A. J.; LUNARDI, C. N. In vitro cytotoxicity and phototoxicity of surface-modified gold nanoparticles associated with neutral red as a potential drug delivery system in phototherapy. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 65, p. 199-204, Aug 1 2016. ISSN 1873-0191 (Electronic) 0928-4931 (Linking).

VYAS, D.; LOPEZ-HISIJOS, N.; GANDHI, S.; EL-DAKDOUKI, M.; BASSON, M. D.; WALSH, M. F.; HUANG, X.; VYAS, A. K.; CHATURVEDI, L. S. Doxorubicin-Hyaluronan Conjugated Super-Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (DOX-HA-SPION) Enhanced Cytoplasmic Uptake of Doxorubicin and Modulated Apoptosis, IL-6 Release and NF-kappaB Activity in Human MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 15, n. 9, p. 6413-6422, Sep 2015. ISSN 1533-4880 (Print)

1533-4880 (Linking).

WANG, D.; HUANG, J.; WANG, X.; YU, Y.; ZHANG, H.; CHEN, Y.; LIU, J.; SUN, Z.; ZOU, H.; SUN, D.; ZHOU, G.; ZHANG, G.; LU, Y.; ZHONG, Y. The eradication of breast cancer cells and stem cells by 8-hydroxyquinoline-loaded hyaluronan modified mesoporous silica nanoparticle-supported lipid bilayers containing docetaxel. **Biomaterials**, v. 34, n. 31, p. 7662-7673, Oct 2013. ISSN 1878-5905 (Electronic) 0142-9612 (Linking).

WANG, H.; YU, J.; LU, X.; HE, X. Nanoparticle systems reduce systemic toxicity in cancer treatment. **Nanomedicine (Lond)**, v. 11, n. 2, p. 103-106, Jan 2016. ISSN 1748-6963 (Electronic) 1743-5889 (Linking).

WANG, X.; TENG, Z.; WANG, H.; WANG, C.; LIU, Y.; TANG, Y.; WU, J.; SUN, J.; WANG, H.; WANG, J.; LU, G. Increasing the cytotoxicity of doxorubicin in breast cancer MCF-7 cells with multidrug resistance using a mesoporous silica nanoparticle drug delivery system. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, n. 4, p. 1337-1347, 2014. ISSN 1936-2625.

WILSON, S. T.; BLASK, D. E.; LEMUS-WILSON, A. M. Melatonin augments the sensitivity of MCF-7 human breast cancer cells to tamoxifen in vitro. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 75, n. 2, p. 669-670, Aug 1992. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972x.

WIN, K. Y.; FENG, S. S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2713-2722, May 2005. ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612 (Linking).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. Geneva, Switzerland, 2018.

\_\_\_\_\_. Cancer - Fact Sheet. 2019.

WU, D.; SI, M.; XUE, H. Y.; WONG, H. L. Nanomedicine applications in the treatment of breast cancer: current state of the art. **Int J Nanomedicine**, v. 12, p. 5879-5892, 2017. ISSN 1178-2013 (Electronic) 1176-9114 (Linking).

XU, W.; BAE, E. J.; LEE, M. K. Enhanced anticancer activity and intracellular uptake of paclitaxel-containing solid lipid nanoparticles in multidrug-resistant breast cancer cells. **Int J Nanomedicine**, v. 13, p. 7549-7563, 2018. ISSN 1178-2013 (Electronic) 1176-9114 (Linking).

XU, X.; LI, Y.; LU, X.; SUN, Y.; LUO, J.; ZHANG, Y. Glutaryl Polyamidoamine Dendrimer for Overcoming Cisplatin-Resistance of Breast Cancer Cells. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 18, n. 10, p. 6732-6739, Oct 1 2018. ISSN 1533-4880 (Print) 1533-4880 (Linking).

YANG, E.; QIAN, W.; CAO, Z.; WANG, L.; BOZEMAN, E. N.; WARD, C.; YANG, B.; SELVARAJ, P.; LIPOWSKA, M.; WANG, Y. A.; MAO, H.; YANG, L. Theranostic nanoparticles carrying doxorubicin attenuate targeting ligand specific antibody responses following systemic delivery. **Theranostics**, v. 5, n. 1, p. 43-61, 2015. ISSN 1838-7640 (Electronic)  
1838-7640 (Linking).

YANG, R.; GAO, R.; LI, F.; HE, H.; TANG, X. The influence of lipid characteristics on the formation, in vitro release, and in vivo absorption of protein-loaded SLN prepared by the double emulsion process. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 37, n. 2, p. 139-148, Feb 2011. ISSN 1520-5762 (Electronic)  
0363-9045 (Linking).

YERSAL, O.; BARUTCA, S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. **World J Clin Oncol**, v. 5, n. 3, p. 412-424, Aug 10 2014. ISSN 2218-4333 (Print)  
2218-4333 (Linking).

ZHAO, K.; LI, D.; SHI, C.; MA, X.; RONG, G.; KANG, H.; WANG, X.; SUN, B. Biodegradable Polymeric Nanoparticles as the Delivery Carrier for Drug. **Curr Drug Deliv**, v. 13, n. 4, p. 494-499, 2016. ISSN 1567-2018.

ZHAO, Z.; YAN, R.; YI, X.; LI, J.; RAO, J.; GUO, Z.; YANG, Y.; LI, W. Bacteria-Activated Theranostic Nanoprobes against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection. v. 11, n. 5, p. 4428-4438, May 23 2017. ISSN 1936-0851.

ZHONG, T.; HE, B.; CAO, H. Q.; TAN, T.; HU, H. Y.; LI, Y. P.; ZHANG, Z. W. Treating breast cancer metastasis with cabazitaxel-loaded polymeric micelles. **Acta Pharmacol Sin**, v. 38, n. 6, p. 924-930, Jun 2017. ISSN 1671-4083.

ZOKAEI, E.; BADOEI-DALFRAD, A.; ANSARI, M.; KARAMI, Z.; ESLAMINEJAD, T.; NEMATOLLAHI-MAHANI, S. N. Therapeutic Potential of DNzyme Loaded on Chitosan/Cyclodextrin Nanoparticle to Recovery of Chemosensitivity in the MCF-7 Cell Line. **Appl Biochem Biotechnol**, Jul 24 2018. ISSN 1559-0291 (Electronic)  
0273-2289 (Linking).