

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

JAQUELINE APARECIDA DUARTE

**NANOEMULSÃO COMO POTENCIAL CARREADOR DA 4-
(CLOROMETIL)-3-NITRO-N-(2-HIDROXIETIL)BENZAMIDA:
DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
PARÂMETROS BIOLÓGICOS *IN VITRO* E *IN VIVO*.**

BELO HORIZONTE- MG

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

JAQUELINE APARECIDA DUARTE

**NANOEMULSÃO COMO POTENCIAL CARREADOR DA 4-(CLOROMETIL)-
3-NITRO-N-(2-HIDROXIETIL)BENZAMIDA: DESENVOLVIMENTO DE
FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOLÓGICOS *IN VITRO*
E *IN VIVO*.**

BELO HORIZONTE- MG

2018

JAQUELINE APARECIDA DUARTE

**NANOEMULSÃO COMO POTENCIAL CARREADOR DA 4-(CLOROMETIL)-
3-NITRO-N-(2-HIDROXIETIL)BENZAMIDA: DESENVOLVIMENTO DE
FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOLÓGICOS *IN VITRO*
E *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Professora Dra. Elaine Amaral Leite,
UFMG

Coorientadora: Professora Dra. Renata Barbosa
de Oliveira, UFMG

Belo Horizonte - MG

D812n Duarte, Jaqueline Aparecida.
Nanoemulsão como potencial carreador da 4-(clorometil)-3-nitro-N-(2-hidroxietil)benzamida: desenvolvimento de formulação e avaliação de parâmetros biológicos *in vitro* e *in vivo* / Jaqueline Aparecida Duarte. – 2018.
100 f. : il.

Orientadora: Elaine Amaral Leite.
Coorientadora: Renata Barbosa de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Câncer – Teses. 2. Tumores – Teses. 3. Nitrocompostos – Teses. 4. Compostos orgânicos – Teses. 5. Nanoemulsões – Teses. 6. Tecnologia farmacêutica – Teses. I. Leite, Elaine Amaral. II. Oliveira, Renata Barbosa de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.994



FOLHA DE APROVAÇÃO

**Nanoemulsão como potencial carreador da
4-(clorometil)-3-nitro-N-(2-hidroxietil)benzamida: desenvolvimento de
formulação e avaliação de parâmetros biológicos in vitro e in vivo**

JAQUELINE APARECIDA DUARTE

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Profa. Elaine Arnica Leite - Orientadora
UFMG


Profa. Renata Barbosa de Oliveira - Coorientadora
UFMG


Profa. Mônica Cristina de Oliveira
UFMG


Prof. Alvaro Dutra de Carvalho Júnior
UFVJM

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ademar e Consolação, por todo amor, dedicação e apoio incondicional. Por sempre acreditarem em mim e darem suporte às minhas escolhas.

À professora Elaine por ser sempre presente, atenciosa e paciente. Pelo exemplo de profissional competente e ética que quero seguir. E por tantos ensinamentos generosamente transmitidos.

À professora Renata, pelos ensinamentos e pela confiança e oportunidade de trabalhar com sua substância.

Ao professor André por ter disponibilizado os recursos do Laboratório de Radioisótopos, pela colaboração nos experimentos e na análise dos resultados *in vivo*.

À Nara por toda ajuda nos experimentos *in vivo*, sempre prestativa e habilidosa.

À Adelaide e ao Batista por todo o auxílio com os animais.

À Professora Elaine Fagundes e ao Jonas, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, pela colaboração no estudo *in vitro*.

Aos demais professores pelos ensinamentos e conselhos dentro e fora das aulas.

A todos os colegas do LTF pela convivência e pelos momentos compartilhados.

A todos que, de alguma maneira, colaboraram para a realização desse trabalho.

E a Deus por todas as bênçãos diárias e por sempre iluminar meu caminho.

RESUMO

O composto nitroaromático 4-(clorometil)-3-nitro-*N*-(2-hidroxi-etil)benzamida (AANC) demonstrou uma promissora atividade antitumoral em tumores sólidos e reduzida toxicidade sistêmica. No entanto, a baixa solubilidade do AANC em meio aquoso representa uma barreira para a administração intravenosa (IV). Diante disso, o objetivo deste estudo foi desenvolver nanoemulsões (NE) contendo AANC a fim de permitir sua administração pela via IV. NE sem e com AANC (NE-AANC 0,2 e 0,4% p/v) foram preparadas pelo método de homogeneização à quente, seguida por ultrasonicação. NE sem AANC teve um diâmetro de 93 ± 4 nm, índice de polidispersão (IP) de $0,25 \pm 0,03$ e potencial zeta de -38 ± 3 mV. A incorporação de AANC aumentou significativamente o diâmetro da gotícula quando a concentração foi aumentada de 0,2 para 0,4% p/v. Contudo, o diâmetro médio das formulações foi inferior a 175 nm e uma estreita distribuição do diâmetro com IP inferior a 0,3 foi obtida. A concentração de AANC nas NE foi cerca de 1,66 e 2,50 mg/mL, para 0,2 e 0,4% p/v, respectivamente. Não houve variação significativa no diâmetro médio da gotícula, PI e valores do potencial zeta as formulações (NE sem e com AANC 0,4% p/v), ao longo de 28 dias de avaliação. No entanto, uma redução significativa da concentração de AANC foi observada após 14 dias de armazenamento. Em seguida, a citotoxicidade da AANC livre e da NE-AANC foi avaliada pelo ensaio de MTT contra células MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano). Os valores de IC_{50} obtidos para AANC livre ($23,9 \pm 3,0$ μ M) e NE-AANC ($24,1 \pm 0,4$ μ M) foram semelhantes, mostrando que a citotoxicidade da AANC não foi afetada pela incorporação na NE. A fim de avaliar o comportamento *in vivo* da AANC livre e NE-AANC, estudos de depuração e de biodistribuição em camundongos Swiss fêmeas foram conduzidos. Um tempo de meia vida similar para AANC livre e NE-AANC foi obtido. Os dados de biodistribuição e as imagens cintilográficas mostraram uma acentuada captação no fígado, rins e intestino e acúmulo significativo na região tumoral. A relação tumor-musculo contralateral foi significativamente maior para NE-AANC sugerindo maior especificidade para a região do tumor. Portanto, a NE pode ser uma boa estratégia para a associação da AANC permitindo sua administração IV.

Palavras-chave: Câncer. Tumores sólidos. Nitrocompostos. Nanoemulsões.

ABSTRACT

Nitroaromatic derivative 4-(chloromethyl)-3-nitro-*N*-(2-hydroxiethyl) benzamide (AANC) showed a promissor antitumor activity in solid tumors and reduced systemic toxicity. However, its low solubility in aqueous medium represents a barrier for intravenous (IV) administration. Thus, the aim of this study was to develop nanoemulsions (NE) loaded with AANC to allow its administration by IV route. NE with and without AANC (0.2 and 0.4% w/v) were prepared by the hot melt homogenization method following by ultra-sonication. NE without AANC had a diameter of 93 ± 4 nm, polydispersity index (PI) of 0.25 ± 0.03 and zeta potential of -38 ± 3 mV. The incorporation of AANC significantly increased the globule diameter, as the concentration was increased from 0.2 to 0.4% w/v. However, the globule mean diameter of the formulations was below 175 nm, and a narrow size distribution with a PI lower than 0.3 was obtained. The concentration of AANC-loaded NE was about 1.66 and 2.50 mg/mL, for 0.2 and 0.4% w/v respectively. There were no significant variation in globule mean diameter, PI, and values zeta potential of the formulations (NE without and with AANC 0.4% w/v) over 28 days of evaluation. However, significant reduction in the AANC concentration was also observed after 14 days of storage. Next, the cytotoxicity of the free AANC and the NE-AANC was evaluated by MTT assay against MDA-MB-231 cells (human breast adenocarcinoma). IC_{50} values obtained for free AANC (23.9 ± 3.0 μ M) and NE-AANC (24.1 ± 0.4 μ M) were similar, showing that the cytotoxicity of AANC was not affected by loading in NE. In order to evaluate the *in vivo* behavior of free AANC and NE-AANC, pharmacokinetic and biodistribution studies in murine experimental models were conducted. Similar half-life time for free AANC and NE-AANC was obtained. Biodistribution data and scintigraphic images showed a pronounced uptake in the liver, kidneys and intestine and significant accumulation in the tumor region. Tumor-to-muscle ratio was significantly higher for NE-AANC than free AANC suggesting greater specificity for the tumor region. Therefore, NE formulation can be a good strategy to the association of the AANC, and to allow its intravenous administration.

Keywords: Cancer. Solid tumors. Nitrocompounds. Nanoemulsions.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – (A) Representação do microambiente do tumor sólido em relação ao vaso sanguíneo, mostrando a presença de áreas com elevada e baixa proliferação celular com presença de células em hipóxia. (B) Gradiente de concentração de oxigênio e valor de pH em relação a proximidade com o vaso sanguíneo.** 19
- Figura 2- Comparação entre o processo redutivo do grupo nitro em um tecido oxigenado e um tecido em hipóxia.** 22
- Figura 3 - Estrutura química da 4-(clorometil)-3-nitro-N-(2-hidroxi-etil)benzamida (AANC).** 23
- Figura 4 – Representação das NE óleo em água (O/A), com destaque para gotícula da NE O/A.** 26
- Figura 5 – Exemplos de ácidos graxos usados como constituintes de fase oleosa de nanoemulsões.** 29
- Figura 6 – (A) Cromatograma obtido para a solução de AANC (12 µg/mL) e (B) Cromatograma obtido para a formulação de nanoemulsão branca.** 53
- Figura 7 - Curva analítica média obtida (concentração de 4,0 a 20,0 µg/mL, fase móvel acetonitrila:água 35:65 v/v, $\lambda = 240$ nm, equipamento Agilent) para doseamento da AANC por CLAE.** 53
- Figura 8 - Solubilidade da AANC em ácido oleico, óleo de sésamo, óleo de soja, TCM e tributirina.** 56
- Figura 9 – Estruturas químicas dos Tweens 60 e 80.** 61

Figura 10 - Resultados do estudo de estabilidade realizado com NE TCM 5% carregados com 0,4% de AANC, armazenados a temperatura de 5 ± 3 °C, ao abrigo da luz, por 28 dias. 67

Figura 11 - Resultados do estudo de estabilidade realizado com NE TCM 5% carregados com 0,4% de AANC, armazenados a temperatura de 5 ± 3 °C, ao abrigo da luz, por 28 dias. 69

Figura 12 - (A) Curvas concentração de AANC-livre versus viabilidade celular e controle positivo com tirapazamina. (B) Curvas concentração de NE-AANC versus viabilidade celular e controle negativo com NE-branca. 71

Figura 13 - Reação da tirapazamina em região de hipóxia. 72

Figura 14 – Dados de estabilidade de marcação *in vitro* dos complexos ^{99m}Tc -AANC-coligantes (A) e ^{99m}Tc -NE-AANC (B) obtidos em salina à temperatura ambiente e plasma de camundongo à 37 °C. 74

Figura 15 – Curva de depuração sanguínea obtida para os complexos ^{99m}Tc -AANC-coligantes e ^{99m}Tc -NE-AANC em animais Swiss sadios. 76

Figura 16 – Perfil de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -AANC-coligantes em animais sadios 30 min, 1 e 4h após a administração. 78

Figura 17 – Perfil de biodistribuição do ^{99m}Tc -AANC-coligantes e do ^{99m}Tc -NE-AANC, após tempos determinados da administração intravenosa, em animais Swiss acometidos pelo tumor sólido de Ehrlich. 79

Figura 18 – Porcentagem de captação no tumor e no músculo obtida após administração intravenosa ^{99m}Tc -AANC-coligantes e do ^{99m}Tc -NE-AANC em animais Swiss acometidos pelo tumor sólido de Ehrlich . 80

Figura 19 – Relação tumor/músculo para os complexos radiomarcados obtida 30 min e 2 horas após a administração. Todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão. * representa diferença significativa entre ^{99m}Tc -AANC-coligantes e do ^{99m}Tc -NE-AANC.

81

Figura 20 – Imagens cintilográficas obtidas 30 min e 2 h após a administração das preparações radiomarcadas em camundongos com tumor de Ehrlich implantado na pata posterior direita (seta). (A) ^{99m}Tc -AANC-coligantes 30 minutos; (B) ^{99m}Tc -AANC-coligantes 2 horas; (C) ^{99m}Tc -NE-AANC 30 minutos; (D) ^{99m}Tc -NE-AANC 2 horas.

83

Figura 21 - Relações alvo/não alvo, obtidas por meio da quantificação das imagens cintilográficas 30 minutos e 2 horas após a administração dos complexos radiomarcados.

84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico na forma de nanoemulsões parenterais.	26
Tabela 2 – Alguns exemplos de desenvolvimento de NE O/A contendo fármacos antitumorais.	28
Tabela 3 – Condições cromatográficas do método analítico para doseamento da AANC.	38
Tabela 4 – Composição das NE brancas contendo 1,5% p/v de óleo (%p/v).	41
Tabela 5 – Composição das NE brancas (%p/v).	42
Tabela 6 – Composição das NE contendo AANC (%p/v).	43
Tabela 7 – Dados da linearidade das diferentes curvas obtidos por análise de regressão linear.	54
Tabela 8 - Resultados da precisão intra-dia e inter-dias obtidos para o método analítico de determinação da AANC por CLAE.	55
Tabela 9 - Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas estimadas para AANC.	58
Tabela 10 – Caracterização físico-química das NE brancas contendo 1% de óleo quanto aos parâmetros de diâmetro médio, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta.	59

Tabela 11 - Caracterização físico-química das NE brancas quanto aos parâmetros de diâmetro médio, índice de polidispersão (IP), potencial zeta. 62

Tabela 12 – Caracterização físico-química das NE TCM quanto aos parâmetros de diâmetro médio, índice de polidispersão (IP), potencial zeta e concentração de AANC associado. 63

Tabela 13 – Caracterização físico-química das NE TCM:Tributirina quanto aos parâmetros de diâmetro médio, índice de polidispersão (IP), potencial zeta e concentração de AANC associado. 65

Tabela 14 - Determinação da CI_{50} em linhagens de células MDA-MB-231 em condições de hipóxia e normoxia. 72

Tabela 15 – Diâmetro médio, IP, potencial zeta e concentração de AANC do complexo ^{99m}Tc -NE-AANC. 75

Tabela 16 - Parâmetros farmacocinéticos para ^{99m}Tc -AANC-coligantes e ^{99m}Tc -NE-AANC. 76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AANC	4-(clorometil)-3-nitro- <i>N</i> -(2-hidroxi-etil)benzamida
^{99m} Tc	Tecnécio-99m
ASC	Área sob a curva
BFGF	Fator de crescimento fibroblástico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DO	Densidade ótica
DP	Desvio padrão
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aumentada
FA	Fase aquosa
FDA	Food and Drug Administration
FO	Fase oleosa
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IP	Índice de polidispersão
LQF	Laboratório de Química Farmacêutica
NE	Nanoemulsão
OMS	Organização mundial de saúde
PBMG	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salino
ROI	Regiões de interesse
T _{1/2}	Tempo de meia vida
TCL	Triglicerídeo de cadeia longa
TCM	Triglicerídeo de cadeia média
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Câncer	17
2.2 Tumores sólidos	18
2.2.1 Tratamentos dos tumores sólidos	20
2.3 Compostos nitroaromáticos	21
2.4 Nanoemulsão como estratégia para a veiculação de fármacos pouco hidrossolúveis	25
2.5 Nanoemulsões radiomarcadas	32
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Material	37
4.2 Revalidação do método analítico	38
4.2.1 Especificidade.....	38
4.2.2 Linearidade.....	39
4.2.3 Precisão.....	39
4.3 Determinação da solubilidade da AANC em diferentes óleos	40
4.4 Cálculo de propriedades físico-químicas da AANC	40
4.5 Desenvolvimento da nanoemulsão	41
4.5.1 Nanoemulsões brancas	41
4.5.1 Nanoemulsões contendo AANC	42
4.6 Caracterização das nanoemulsões	43
4.6.1 Determinação do diâmetro das gotículas	43
4.6.2 Determinação do potencial zeta	43
4.7 Doseamento da AANC	44
4.8 Estudo de estabilidade das NE.....	45
4.9 Avaliação da atividade citotóxica	45
4.10 Procedimento de radiomarcção do AANC livre	46
4.11 Procedimento de radiomarcção da NE	46
4.12 Eficiência da radiomarcção	47

4.13 Estudos de estabilidade da marcação <i>in vitro</i>	48
4.13.1 Estabilidade em solução de NaCl 0,9% (p/v)	48
4.13.2. Estabilidade em plasma de camundongo	48
4.14 Depuração plasmática em animais sadios	48
4.15 Estudo de biodistribuição do complexo ^{99m} Tc-AANC-coligantes em animais sadios	49
4.16 Estudo de biodistribuição das preparações em animais acometidos por tumor sólido de Ehrlich	49
4.16.1 Obtenção do modelo experimental de tumor de Ehrlich	49
4.16.2 Estudo de biodistribuição e imagens cintilográficas	50
4.17 Análise estatística	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Revalidação do método analítico	52
5.2 Determinação da solubilidade do AANC em diferentes óleos	55
5.3 Cálculo de propriedades físico-químicas pelo QikProp	57
5.4 Preparo e otimização de formulações de nanoemulsões brancas	58
5.5 Associação da AANC nas NE	62
5.6 Estudo de estabilidade	66
5.7 Avaliação da atividade citotóxica	70
5.8 Pureza radioquímica e estudos de estabilidade de marcação para ^{99m} Tc-AANC-coligantes e ^{99m} Tc-NE-AANC	73
5.9 Depuração plasmática em animais sadios	75
5.10 Estudo de biodistribuição para complexo ^{99m} Tc-AANC-coligantes em animais sadios	77
5.11 Estudo de biodistribuição das preparações ^{99m} Tc-AANC-coligantes e ^{99m} Tc-NE-AANC em animais acometidos por tumor sólido de Ehrlich	78
5.12 Imagens cintilográficas das preparações ^{99m} Tc-AANC-coligantes e ^{99m} Tc-NE-AANC em animais acometidos por tumor sólido de Ehrlich	82
6 CONCLUSÕES	85
7 PERSPECTIVAS	86
REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um inquestionável problema de saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) são estimados mais de 20 milhões de novos casos até 2025 (WHO, 2017). Apesar dos avanços no tratamento do câncer, esse ainda continua sendo um desafio. A quimioterapia baseada no uso de medicamentos que provocam a morte de células tumorais é o tratamento mais comum no combate ao câncer (INCA 2017). No entanto, a maioria dos tumores são sólidos e apresentam uma divisão celular relativamente lenta com regiões pouco vascularizadas. Nesses casos, a quimioterapia torna-se menos eficaz, pois as regiões de hipóxia dificultam o acesso dos fármacos a esses locais (LOPES et al., 2015).

Vale mencionar que grande parte dos agentes quimioterápicos são pouco seletivos para as células tumorais, apresentam baixo índice terapêutico e são alvo de resistência, limitando consideravelmente sua utilização clínica (MAHATO et al., 2011). Dessa forma, é crescente o estudo de substâncias mais seletivas para o tratamento de tumores sólidos, com destaque para os agentes biorredutíveis, que se tornam substâncias ativas somente após a redução nas células em condições de hipóxia. Exemplos de agentes biorredutíveis são os compostos nitroaromáticos, cuja atuação como pró-fármacos com seletividade para a hipóxia é bem conhecida (BROWN, 2012; LOPES et al., 2015).

Estudos preliminares, utilizando um nitroaromático sintetizado no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG, a 4-(clorometil)-3-nitro-*N*-(2-hidroxietil)benzamida (AANC), demonstraram sua atividade citotóxica significativa *in vitro*, bem como atividade antitumoral *in vivo* em modelos de animais com tumor sólido de Ehrlich (LOPES et al., 2015). Considerando o potencial de utilização dessa substância como novo agente antitumoral, faz-se necessária a sua veiculação até o seu local de ação. No entanto, a AANC apresenta baixa solubilidade aquosa. Neste contexto, uma alternativa para administração intravenosa seria o uso de nanocarreadores.

As nanoemulsões (NE) têm sido utilizadas como carreadores de fármacos com baixa solubilidade em água e apresentam algumas vantagens em comparação a outros nanosistemas, como a facilidade de preparo e o baixo custo (SADURNI et al., 2005). As NE são sistemas heterogêneos nos quais um líquido imiscível (a fase interna) é disperso em outro (a fase externa) na forma de gotículas, na presença de um agente emulsionante que proporciona estabilidade termodinâmica ao sistema. Suas propriedades físico-químicas são influenciadas pela composição quali e quantitativa e pelas condições de preparação, as quais devem ser estritamente controladas, visando a administração por via parenteral e a estabilidade do sistema (BRUXEL et al., 2012).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver NE com diferentes composições quali e quantitativas para carrear a AANC e avaliar as propriedades físico-químicas e biológicas do sistema, no intuito de desenvolver uma formulação promissora que permita sua administração IV no tratamento de tumores sólidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

O câncer é um termo genérico utilizado para definir um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células, que podem invadir tecidos adjacentes, bem como, espalhar-se para outras regiões. O câncer pode afetar praticamente todas as partes do corpo e é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Em 2015, representou o segundo lugar no ranking das causas de morte, com 8,8 milhões de óbitos (WHO, 2017). A incidência de câncer nos países em desenvolvimento aumenta gradativamente. Estima-se que no ano de 2030 existam 21,4 milhões de novos doentes e 13,2 milhões de mortes por câncer no mundo, sendo que o impacto estimado na população dos países em desenvolvimento corresponde a 80% dos novos casos. A explicação para isso está no maior tempo de exposição da população aos fatores carcinogênicos devido à mudança do perfil demográfico, com aumento da expectativa de vida nesses países (INCA, 2017). Portanto, o envelhecimento é um importante fator que influencia no desenvolvimento do câncer, devido ao acúmulo de riscos, combinado com a menor eficiência dos mecanismos de reparação celular decorrentes do aumento da idade.

Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil eram esperados 600.000 novos casos de câncer para o biênio 2016-2017. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma, os tipos mais comuns de tumor maligno que atingem o sexo masculino são os de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral, enquanto no sexo feminino são os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireóide.

Um tumor é classificado como maligno quando, normalmente, as células têm crescimento rápido, delimitação imprecisa, apresentam características distintas do tecido de origem e se disseminam para locais distantes, ocasionando as metástases. Do ponto de vista físico, os tumores malignos podem ser classificados em tumores hematolinfopoéticos e tumores sólidos. Os primeiros

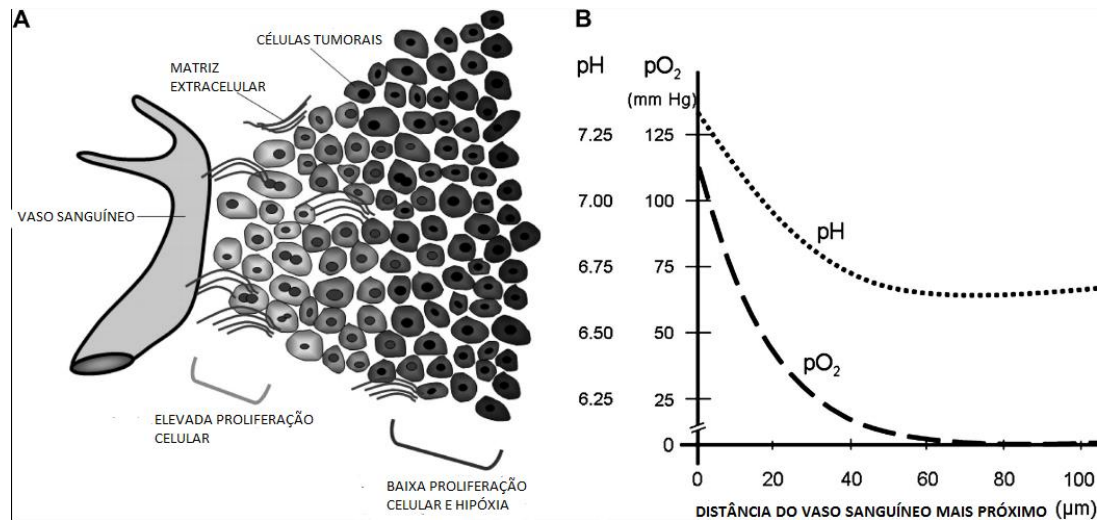
são aqueles originários das células sanguíneas e acometem a medula óssea ou sistema linfático. Já os tumores sólidos englobam todos os outros tipos com exceção dos de origem hematopoética, compreendendo, portanto 85% dos cânceres que acometem o ser humano (INCA, 2017).

2.2 Tumores sólidos

Os tumores sólidos malignos constituem os principais tipos de câncer e são considerados os de tratamento mais difícil. Nesse sentido, conhecer a estrutura, a fisiologia e o crescimento do tumor é fundamental para auxiliar o desenvolvimento de transportadores de substâncias ativas mais eficientes, capazes de ultrapassar as barreiras normais e as decorrentes da patologia tumoral (STEICHEN et al., 2013).

Sabe-se que o tumor se origina de uma célula que sofre uma mutação, a qual leva a interrupção de alguma etapa essencial da via de sinalização apoptótica e resulta na sua proliferação descontrolada. Esses tumores são estruturados de forma heterogênea (Figura 1A) e formados por células cancerosas, fibroblastos e células inflamatórias, que são nutridas por uma rede vascular variável. Nas fases iniciais do crescimento tumoral, a nutrição é realizada por meio da vascularização existente nessa região. No entanto, a expansão do tecido tumoral normalmente não é acompanhada por uma vascularização adequada. Alguns dos vasos sanguíneos pré-existentes são obstruídos ou comprimidos e novos pequenos vasos surgem de forma irregular. Como consequência disso, há regiões bem irrigadas e outras com fluxo sanguíneo reduzido (TRÉDAN et al., 2007). As células localizadas nas áreas mais próximas aos vasos sanguíneos (periferia do tumor) são mais oxigenadas em relação às regiões mais distantes da vascularização, nas quais há uma redução na entrega de nutrientes e de oxigênio. Portanto, as células localizadas no centro do tumor são anóxicas e necróticas, enquanto as células existentes na região intermediária são células em hipóxia, uma vez que, estão situadas em um local com baixa concentração de oxigênio (Figura 1B) (MELLO e LANZMASTER, 2012).

Figura 1 – (A) Representação do microambiente do tumor sólido em relação ao vaso sanguíneo, mostrando a presença de áreas com elevada e baixa proliferação celular com presença de células em hipóxia. (B) Gradiente de concentração de oxigênio (linha tracejada) e valor de pH (linha pontilhada) em relação a proximidade com o vaso sanguíneo.



Adaptado de TRÉDAN et al., 2007.

Outra característica marcante dos tumores sólidos é a presença de um pH extracelular menor do que o pH das células normais, devido a depuração plasmática ineficiente dos metabólitos ácidos das células cancerosas (COMAN et al., 2016; STUBBS, 1999). Especialmente nas microrregiões de hipóxia devido ao reduzido suprimento de glicose e aminoácidos essenciais, as células tumorais usam glicólise para obter a energia necessária para sobreviver e proliferar. A glicólise é uma alternativa eficiente ao metabolismo oxidativo e leva à produção de CO_2 e ácido carbônico, levando ao abaixamento do pH intersticial nas regiões hipóxicas. Esse fato, juntamente com a pressão exercida pelo volume da massa de células em expansão sobre as células vizinhas, leva ao surgimento de um sistema circulatório e linfático deficiente.

Adicionalmente, vale mencionar que os novos vasos sanguíneos formados apresentam pouco músculo liso, tecido pavimentoso epitelial descontínuo, fenestrações de algumas centenas de nanômetros e padrões de ramificação diferentes dos tecidos normais (OLIVEIRA et al., 2012). O endotélio vascular normal apresenta fenestrações com tamanho de 5 a 10 nm, enquanto os

neovasos dos tumores sólidos podem apresentar fenestrações entre 100 e 780 nm, o que permite a penetração de macromoléculas (SHOHDI e ALFAAR, 2013). Aliado a isso, é comum encontrar nessa região níveis elevados de fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), fator de crescimento fibroblástico básico (*basic fibroblast growth factor*, BFGF) e bradicininas, os quais estão envolvidos no aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, recrutamento de células epiteliais e no extravasamento aumentado de macromoléculas pela vasculatura (GACCHE e MESHRAM, 2014). Essas características associadas à falta de um sistema linfático eficiente resultam em um fenômeno chamado efeito de permeabilidade e retenção aumentados (*enhanced permeability and retention* - EPR). Portanto, macromoléculas maiores que 40 KDa são capazes de extravasar seletivamente para o interstício e se acumular nos tecidos tumorais (MAEDA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2012). Esse acúmulo de partículas no interior dos tecidos tumorais também contribui para o aumento da pressão do fluido intersticial, o que prejudica a eliminação de macromoléculas do interior do tumor (CARMELIET e JAIN, 2000). Alguns estudos têm utilizado essa alteração anatomo-fisiopatológica dos tumores sólidos como estratégia para o acúmulo de fármacos nessa região tumoral (VIEIRA e GAMARRA, 2016; NAKAMURA et al., 2015).

2.2.1 Tratamentos dos tumores sólidos

O tratamento do câncer depende do tipo de tumor, estágio e recursos disponíveis, podendo incluir cirurgia, radioterapia ou quimioterapia, sendo, em muitos casos, necessário combinar mais de uma modalidade. A cirurgia é considerada a forma mais eficaz de tratamento, principalmente quando o tumor está em estágio inicial e não apresenta metástase (SPITZNER et al., 2014).

A radioterapia é baseada na geração de radicais ionizantes para destruir células neoplásicas. Devido à presença de células em hipóxia, os tumores sólidos são altamente resistentes à radioterapia (FELS, 2006; LOPES, 2012). Esse fato pode ser explicado pela baixa tensão de oxigênio nessas células.

Como os efeitos causados pela radiação são aumentados pela presença de oxigênio, devido à sua capacidade de reagir com os radicais livres, nas células em hipoxia há uma baixa formação de espécies reativas de oxigênio, como os radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$), hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), o que culmina consequentemente em uma redução da eficácia do tratamento.

A quimioterapia, por sua vez, é baseada na utilização de medicamentos com o propósito de ocasionar a morte das células neoplásicas. A baixa eficiência dessa terapia no tratamento de tumores sólidos se justifica também pela dificuldade de o fármaco atingir às células em hipoxia em concentrações terapêuticas, uma vez que, estão localizadas em regiões pouco vascularizadas (BUSTAMANTE, 2009; INCA, 2017). Além disso, se as células próximas aos vasos sanguíneos são mortas pelo tratamento, o suprimento de nutrientes para as células previamente hipóxicas pode melhorar, permitindo que as mesmas sobrevivam e regenerem o tumor. Outra limitação do tratamento quimioterápico convencional é que as células em hipoxia se dividem lentamente, fazendo com que sejam resistentes aos quimioterápicos que interferem na divisão celular e atuam, principalmente, sobre células de divisão rápida (OLIVEIRA e ALVES, 2002).

Apesar desses inconvenientes, a presença de células em hipoxia é uma característica peculiar dos tumores sólidos, diferenciando-os das células normais e pode ser, portanto, utilizada como uma estratégia para se alcançar maior seletividade. Sabendo-se que a ocorrência de reações de redução é facilitada em uma região hipóxica, pode-se utilizar essa característica como estratégia para o planejamento de agentes biorredutíveis, os quais são relativamente mais seletivos para tratamento de tumores sólidos (MAHATO et al., 2011; OLIVEIRA e ALVES, 2002).

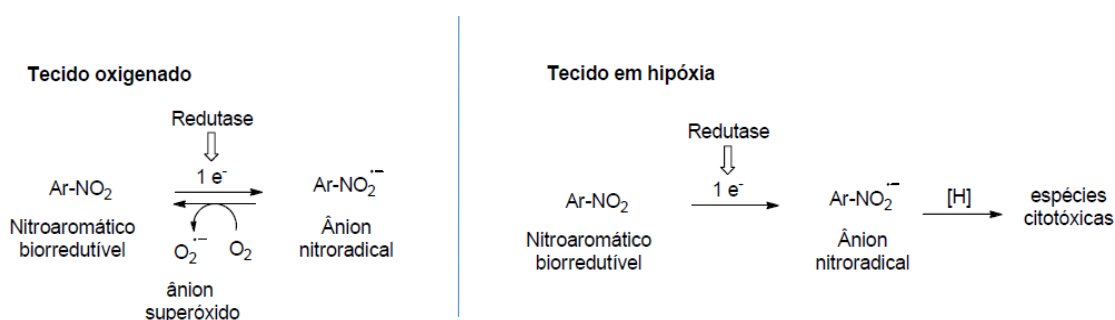
2.3 Compostos nitroaromáticos

Considerando a dificuldade do tratamento dos tumores sólidos com a quimioterapia convencional, é de grande valia o estudo de substâncias que

sejam mais eficazes para tratar esses tumores. Um agente antitumoral promissor deve: i) ser capaz de se difundir pela massa tumoral e atingir as células em hipóxia; ii) atuar em células tumorais que apresentem rápida e baixa divisão celular; iii) apresentar seletividade contra as células tumorais em relação às células não tumorais; iv) apresentar comprovada eficácia antitumoral. Nesse sentido, os compostos nitroaromáticos, os quais são classificados como agentes biorredutíveis tem sido bastante estudados, uma vez que podem ser utilizados como pró-fármacos para tratamento de tumores com células em hipóxia. (LOPES, 2012).

Os derivados nitroaromáticos sofrem redução monoelétrica, que pode ser revertida, em tecidos não tumorais, pelo oxigênio presente no meio. Após sofrerem biorredução, nas células em hipóxia, esses compostos são ativados e exercem sua ação no tecido tumoral, apresentando, assim, maior seletividade por essas regiões. (BUSTAMANTE, 2009). O mecanismo de ação dos nitrocompostos baseia-se na biorredução do grupo nitro com consequente formação de espécies altamente eletrofílicas capazes de alquilar o DNA das células neoplásicas, como demonstrado na Figura 2.

Figura 2- Comparação entre o processo redutivo do grupo nitro em um tecido oxigenado e um tecido em hipóxia.

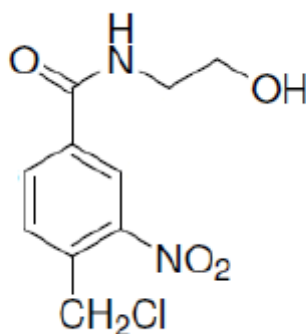


Adaptado de LOPES, 2012.

A capacidade de redução de substâncias nitroaromáticas tem sido largamente estudada por nosso grupo de pesquisa e está relacionada com o seu potencial de redução. A faixa ideal de potencial de redução monoelétrica para a maioria dos compostos nitroaromáticos é de -500 a -200 mV. Compostos com

potencial de redução inferior a -500 mV não são facilmente reduzidos em condições de hipóxia, enquanto aqueles com potencial de redução superior a -200 mV são muito facilmente reduzidos mesmo na presença de oxigênio, o que limita a sua utilização como pró-fármacos ativados em região de hipóxia (OLIVEIRA; ALVES, 2002). Nesse contexto, diversos nitroaromáticos bioativos com potencial para tratamento de tumores sólidos foram sintetizados no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Dentre esses compostos, destaca-se a 4-(clorometil)-3-nitro-*N*-(2-hidroxiethyl)benzamida (AANC), cuja estrutura química está representada na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura química da 4-(clorometil)-3-nitro-*N*-(2-hidroxiethyl)benzamida (AANC).



A AANC é um derivado nitroaromático obtido em quatro etapas, a partir do ácido *p*-tolúico, com rendimentos de 50,9 a 93,0%, conforme descrito por Lopes (2012). É um sólido branco com faixa de fusão entre 133,1 – 134,4 °C, coeficiente de partição (P) igual a 21,33 e log P = 1,33 (SENA, 2013).

Estudos prévios conduzidos por Lopes e colaboradores (2015) avaliaram a atividade citotóxica *in vitro* da AANC em três linhagens de células tumorais humanas: HL60 (leucemia), Jurkat (linfoma) e MCF-7 (tumor de mama). A AANC apresentou atividade significativa com valores de Cl_{50} iguais a $4,7 \pm 0,8 \mu\text{M}$, $18,0 \pm 10 \mu\text{M}$, $70,0 \pm 12,9 \mu\text{M}$ para HL60, Jurkat e MCF-7, respectivamente. Por outro lado, a AANC apresentou baixa citotoxicidade para as células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

A fim de simular o processo de biorredução, necessário para a formação de espécies mais reativas, um estudo *in vivo* foi conduzido em camundongos com tumor sólido de Ehrlich tratados por via intratumoral com a AANC na dose de 30 mg/kg. Os resultados desse estudo demonstraram que a administração da AANC inibiu significativamente o crescimento do tumor sólido em 83,7 % em comparação com o grupo controle. Além disso as análises histopatológica e imuno-histoquímica indicaram redução da taxa de proliferação das células tumorais (LOPES et al., 2015). Amoni (2014), realizou um estudo preliminar de toxicidade aguda da AANC, administrada por via intraperitoneal em camundongos Swiss sadios e os resultados demonstraram sinais tóxicos somente após utilização de doses mais elevadas (80 mg/kg). Dessa forma, em vista dos resultados dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, pode-se observar que a AANC apresenta potencial atividade antitumoral e reduzida toxicidade.

No entanto, a baixa solubilidade da AANC em meio aquoso é um fator limitante para o preparo de formulações farmacêuticas. A fim de viabilizar a administração dessa substância por outras vias, além da intratumoral, Sena (2013) preparou nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) carregadas com AANC, contudo a encapsulação efetiva não foi alcançada. Após o preparo das NLS, grande parte da AANC precipitou na fase aquosa da formulação, sob a forma de pequenos cristais aciculares. Nesse cenário, a busca por alternativas que viabilizem a administração da AANC torna-se necessária.

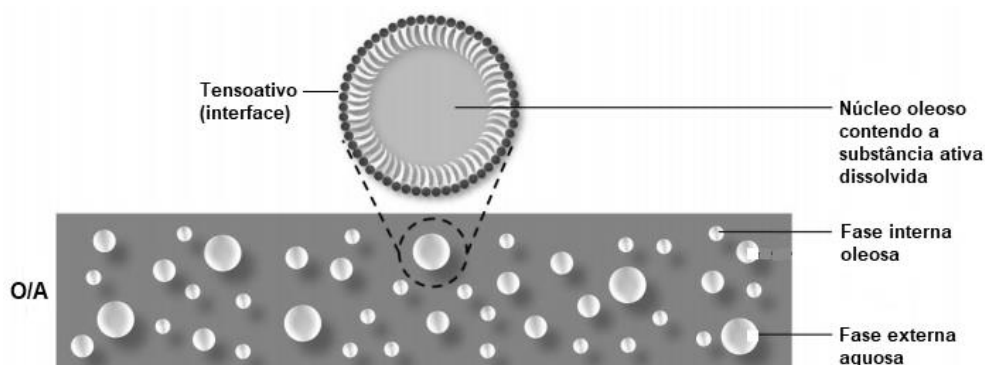
Os sistemas de liberação de fármacos são vistos como estratégias promissoras, uma vez que mediante alterações nas propriedades físico-químicas (tamanho, solubilidade e partição) e biológicas (tempo de meia vida, absorção, distribuição e metabolismo) permitem a veiculação de substâncias pouco solúveis, podendo contornar os problemas das formulações tradicionais e melhorar a eficiência terapêutica.

2.4 Nanoemulsão como estratégia para a veiculação de fármacos pouco hidrossolúveis

Um grande desafio enfrentado na área de desenvolvimento de medicamentos para administração parenteral consiste na solubilização de substâncias bioativas com reduzida hidrossolubilidade. Embora diversas alternativas para contornar esse problema tenham sido descritas tais como alteração de pH, formação de complexos, uso de cossolventes dentre outros, limitações relacionadas aos adjuvantes empregados, à precipitação dos fármacos durante a administração bem como relatos de dor dos pacientes são ainda considerados fatores importantes que limitam do uso destas abordagens (BRUXEL et al., 2012). Neste contexto, carreadores lipídicos nanoestruturados tais como as nanoemulsões (NE) tem sido propostos como estratégias promissoras para contornar esses inconvenientes e permitir a administração parenteral dessas substâncias.

As NE são sistemas heterogêneos nos quais um líquido imiscível é disperso na forma de gotículas em outro líquido e esses são estabilizados pela adição de um componente ou mistura de componentes que possuem propriedades emulsificantes. As emulsões farmacêuticas óleo em água (O/A) (Figura 4) desenvolvidas para administração parenteral apresentam uma fase oleosa (interna) dispersa em uma fase aquosa (externa) na forma de gotículas nanométricas (com até 500 nm) (GUPTA et al., 2016).

Figura 4 – Representação das NE óleo em água (O/A), com destaque para gotícula da NE O/A.



Adaptado de SINGH et al., 2017.

As NE têm sido empregadas há mais de 50 anos como fonte de calorias em nutrição parenteral e, na década de 1970, passaram a ser utilizadas como sistema de liberação de fármacos (HUNG, 2007; SAREEN, 2012). O primeiro medicamento veiculado em uma NE foi o diazepam (ansiolítico e sedativo), um fármaco altamente lipossolúvel e como tal é insolúvel em soluções aquosas, sendo necessária a utilização de co-solventes como propilenoglicol, e etanol para a dissolução do fármaco nas preparações aquosas convencionais (Valium®). No entanto, ocorriam muitos relatos de dor e tromboflebite nos pacientes durante a injeção. O desenvolvimento de uma nanoemulsão, comercialmente disponível sob nome de Diazemuls® (Kabi-Pharmacia), permitiu a redução destes efeitos adversos (MCCLEAN e colaboradores, 1990). Desde então, diversos outros fármacos foram veiculados e são comercializados em NE, como representado na Tabela 1.

Tabela 1 - Medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico na forma de nanoemulsões parenterais.

Fármaco	Nome comercial	Mercado	Indicação
Diazepam	Diazemuls®	Mundial	Sedativo
Alprostadil (Prostaglandina E1)	Liple®	Japão	Inibição de agregação plaquetária, vasodilatador
Clevidipina	Cleviprex®	Reino Unido	Bloqueador de canais de cálcio. Controle da hipertensão
Palmitato de dexametasona	Limethasone®	Japão	Artrite reumatóide
Etomitato	Etomidat-Lipuro®	Europa e Japão	Anestésico
Flurbiprofeno axetil	Lipfen®	Japão	Analgésico
Propofol	Diprivan® Propovan®	Mundial	Anestésico

Adaptado de HÖRMANN e ZIMME, 2016.

As NE também têm sido utilizadas para promover a estabilização de compostos susceptíveis à hidrólise, redução de irritação ou toxicidade de fármacos administrados pela via intravenosa, além de apresentarem, em alguns casos,

potencial para formas de liberação prolongada, e possível direcionamento dos fármacos para determinados órgãos. Uma grande vantagem das NE comparada aos demais sistemas nanoestruturados tem sido associada ao baixo custo e à facilidade de produção utilizando o método de homogeneização de alta pressão, idêntico ao utilizado em emulsões parenterais O/A, já disponível na indústria farmacêutica, o que favorece a produção em grande escala (CHIME et al., 2014; DATE e NAGARSENKER, 2008)

Segundo Sadurni e colaboradores (2005), apesar de serem sistemas termodinamicamente instáveis, as NE são cineticamente estáveis, devido à alta estabilidade coloidal, pequeno tamanho de gotícula e grande área de superfície, o que reduz vários problemas como coalescência, sedimentação e floculação associados a emulsões convencionais.

As NE também são bastante estudadas como veículos para fármacos antitumorais, como pode ser observado na Tabela 2. Devido ao tamanho nanométrico das gotículas, elas podem atingir células tumorais por meio de fenestrações comuns nos neovasos típicos do tecido tumoral (TORCHILIN, 2011). Uma formulação ideal, segundo Constantinides e colaboradores (2004), apresenta segurança de seus componentes, incorpora a dose requerida da substância ativa e permanece estável por um tempo. Diversos componentes (óleos, tensoativos e adjuvantes) podem ser empregados no desenvolvimento de NE de uso parenteral.

A agência norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) aprova o uso de diversos óleos em formulações parenterais, dentre eles os triglicerídeos de cadeia longa (TCL) e os triglicerídeos de cadeia média (TCM). Dependendo da constituição dos ácidos graxos (Figura 5) é possível formar diferentes tipos de triglicerídeos.

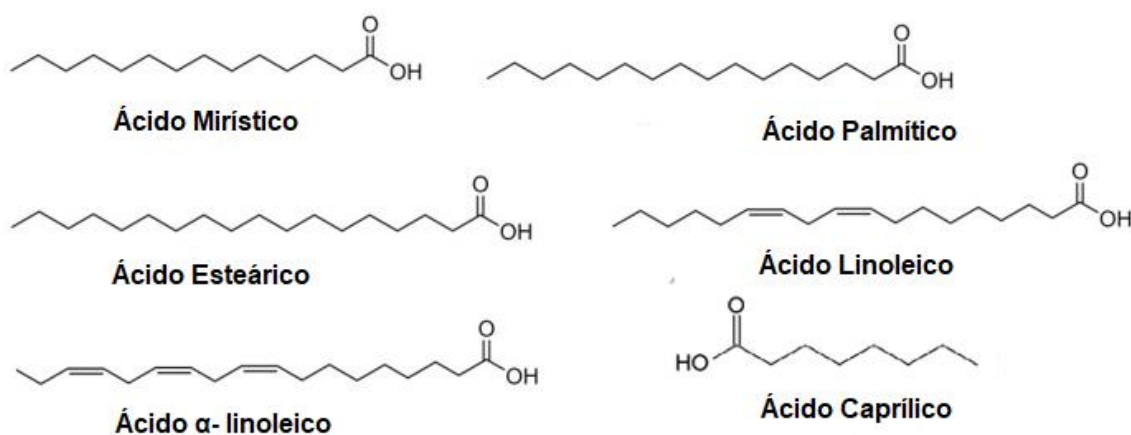
Tabela 2 – Alguns exemplos de desenvolvimento de NE O/A contendo fármacos antitumorais.

Fármaco	Óleo(s)	Tensoativo(s)	Propósito da NE	Referência
Ácido transretinoico	Óleo de soja	Lecitina de ovo + DSPE-PEG + DLPC + DMPC + DPPC + DSPC	Diminuir efeitos adversos	BRUXEL et al., 2012
Aclacinomicina A	Vitamina E	DSPE-PEG + Colesterol	Aumentar seletividade	OHGUCHI et al., 2008
Camptotecina	Óleo de soja	Lecitina de ovo + PEG 400	Melhorar solubilidade	Han et al., 2009
Clorambucil	Óleo de soja	Lecitina de ovo + Colesterol	Melhorar farmacocinética	GANTA et al., 2008
Docetaxel	Ácido oleico e estearilamina	Lecitina de ovo	Melhorar solubilidade e diminuir os efeitos adversos.	SINGH et al., 2017
Etoposido	Óleo de soja	Lecitina de ovo + Colesterol	Melhorar farmacocinética	PATLOLLA e VOBALABOINA, 2005
Fisetina	Óleo de soja, Miglyol 812 e oleato de etila	Labrasol® e Lecitina de ovo	Melhorar farmacocinética e atividade antitumoral	SINGH et al., 2017
Paclitaxel e Ceramida	Óleo de pinha	Lecitina de ovo	Melhorar absorção celular	SINGH et al., 2017
Paclitaxel e Sulforodamina B	Vitamina E	Succinato de tocoferol e polietilenoglicol	Aumentar o tempo de meia vida	SINGH et al., 2017
Teniposido	TCM + Óleo de soja	Lecitina de ovo + Poloxâmero 188 + Tween 80	Melhorar farmacocinética	WANG et al., 2009
Vinorelbina	TCM + Óleo de soja	Lecitina de ovo + Poloxâmero 188 + Tween 80	Diminuir efeitos adversos	BRUXEL et al., 2012
Doxorrubicina	TCM + Óleo de soja	Lecitina de soja	Diminuir efeitos adversos	JIANG et al., 2013
Licobetaína	Óleo de soja	Lecitina de ovo	Melhorar solubilidade	CHEN et al., 2017
Piplartina	Óleo de milho	Twwen 80 + PEG	Melhorar solubilidade	FOFARIA et al., 2016

Os TCL são óleos de origem vegetal, como o óleos de soja, rícino e oliva e possuem ácidos graxos com mais de 12 carbonos em sua estrutura. Por outro lado, os TCM são obtidos por meio de uma reação de esterificação de ácidos

graxos do óleo de coco, principalmente cáprico e caprílico com uma molécula de glicerol (GANTA, 2014). Muitas vezes o uso dos TCM é preferido em função de sua maior miscibilidade em água comparado aos TCL. A capacidade de solubilização de algumas substâncias nesses óleos é dependente do tamanho da cadeia hidrocarbonada, bem como o grau de saturação de suas ligações.

Figura 5 – Exemplos de ácidos graxos usados como constituintes de fase oleosa de nanoemulsões.



A escolha dos agentes emulsionantes é extremamente importante na garantia da estabilidade e do diâmetro do glóbulo da NE. Os agentes tensoativos são moléculas anfifílicas que reduzem a tensão interfacial entre as fases oleosa e aquosa e evitam a agregação de gotículas. Um tensoativo adequado é aquele que reduz a tensão superficial e /ou aumenta a repulsão entre as gotículas. Existe uma grande variedade de tensoativos, mas são restritos os aprovados para uso parenteral. Os mais empregados são lecitinas, polioxipropileno e monooleato de sorbitano etoxilado.

As lecitinas são consideradas tensoativos mais seguros para administração parenteral, uma vez que, são biocompatíveis e biodegradáveis (FLOYD, 1999; MULLER, 2004). As lecitinas podem ser de origem animal (gema de ovo) ou vegetal (soja) e podem apresentar em sua constituição lipídeos com grupamentos carregados negativamente. Segundo Bruxel e colaboradores (2012), essas cargas negativas podem conferir à interface um potencial zeta negativo, permitindo, assim, repulsão eletrostática entre as gotículas dispersas

o que contribui para a estabilidade do sistema. Apesar da preferência por tensoativos de origem natural, os sintéticos são agentes auxiliares importantes para a maior estabilidade da NE e, de maneira geral, aprovados em vários compêndios para uso parenteral. Dentre eles destacam-se os ésteres de ácidos graxos do sorbitano, que são tensoativos não iônicos, do grupo dos Tweens® e Spans® (MARTINI, 2005). Além de influenciar o diâmetro do glóbulo e a estabilidade da NE, a escolha do emulsionante ou mistura de emulsionantes pode determinar a farmacocinética, farmacodinâmica e a toxicidade da formulação (SINGH et al., 2017).

Em relação à fase aquosa, essa pode conter conservantes, reguladores de pH e agentes de tonicidade. A fim de obter a osmolaridade do produto próxima à osmolaridade sanguínea, normalmente, a tonicidade de emulsões é ajustada com glicerol, na concentração de 2,25 - 2,5% (KHACHANE et al., 2015). Outro fator importante é o ajuste do pH, o qual deve estar entre 7 e 7,5; que normalmente ocorre com auxílio de soluções de hidróxido de sódio (NaOH) e/ou ácido clorídrico (HCl). Esse ajuste de pH é justificado para garantir a compatibilidade fisiológica e para prevenir hidrólise de fosfolípidios presentes na NE, o que poderia causar instabilidade no sistema (BRUXEL, 2012; KLANG, 1998). Essa faixa de pH também permite a ionização dos grupamentos fosfato da lecitina, estabilizando melhor a interface. Valores de pH abaixo de 5 resultam em decréscimo da repulsão eletrostática das gotículas, promovendo coalescência e aumento do tamanho das gotículas (FLOYD, 1999). Além disso, a água utilizada para preparo de NE parenteral deve seguir o preconizado nos compêndios oficiais no que diz respeito a água para injetáveis (BRASIL, 2010).

A produção de NE ocorre normalmente em duas etapas: a primeira consiste na produção de uma emulsão grosseira para, em uma segunda etapa, reduzir o diâmetro do glóbulo (BRUXEL et al., 2008). As técnicas de preparo para NE podem ser divididas basicamente em dois métodos: baixa e alta energia. Estão compreendidos no método de baixa energia: a inversão de fases e a emulsificação espontânea. A inversão de fase consiste na conversão de uma emulsão O/A em uma emulsão A/O ou o contrário. Essa inversão de fase

baseia-se na alteração do balanço hidrófilo-lipófilo, mediante mudança drástica de concentração dos constituintes ou de temperatura, que por sua vez, afeta a afinidade do tensoativo, levando à transição de fase (McCLEMENTS, 2012). A emulsificação espontânea consiste em solubilizar a fase interna em um solvente orgânico e após emulsificação, o solvente é removido. Esta última é mais utilizada em escala laboratorial, uma vez que, não requer equipamentos sofisticados e não utiliza altas temperaturas (ANTON e VANDAMME, 2011; KELMANN, 2007).

Os procedimentos de alta energia requerem equipamentos que forneçam energia para romper emulsões grosseiras e formar gotículas de tamanho nanométrico, tais como homogeneizador de alta pressão, microfluidizador e ultrassom. As técnicas de alta energia são muito efetivas na redução do diâmetro das gotículas, mas suas condições de operação podem ser inadequadas para substâncias lábeis, sendo indicados nesses casos, os procedimentos de baixa energia (ALMEIDA, 2008; BRUXEL, 2012; GANTA, 2010, 2014; TADROS, 2004). O dispositivo mais amplamente descrito para obtenção de NE carreadoras de fármacos em escala industrial é o homogeneizador à alta pressão, cujo mecanismo consiste na passagem de uma dispersão grosseira por um orifício, sob pressão elevada, em turbulência intensa, produzindo então uma emulsão com um diâmetro de gotícula nanométrico. A microfluidização baseia-se na utilização de uma bomba que força a passagem da emulsão através de uma série de microcanais, o que também promove a redução das gotículas de tamanho na escala nano. A sonicação, por sua vez, mais utilizada para produção de NE parenterais em escala laboratorial, consiste na aplicação do ultrassom, produzindo ondas interfaciais que rompem gotículas primárias em gotículas de tamanho nano (BRUXEL, 2012; CONSTANTINIDES, 2004; JAFARI, 2008).

As NE parenterais necessitam de ampla avaliação de suas características físico-químicas para garantir sistemas adequados para a administração e entrega de substâncias ativas. Geralmente, a caracterização físico-química avalia distribuição de tamanho das gotículas e carga superficial do sistema,

determinação da concentração da substância ativa associada e liberação dessa substância a partir das NE (MISHRA et al., 2014). Além disso, as NE são sistemas cineticamente estáveis e algumas características iniciais da formulação podem fornecer uma ideia da estabilidade do sistema, como os valores do diâmetro médio das partículas e o potencial zeta. Entretanto, considerando-se que diversos fatores podem alterar a estrutura do sistema ao longo do tempo, as NE apresentam uma pobre estabilidade física com armazenamento a longo prazo (BRUXEL, 2012; DATE e NAGARSENKER, 2008).

O diâmetro pode ser influenciado pela composição quali- e quantitativa das formulações e pelo método de preparo utilizado. Um aumento de 10% na concentração de óleo pode aumentar o diâmetro significativamente (BRUXEL, 2012). O diâmetro das gotículas é uma característica relevante para o efeito EPR, no qual as gotículas com diâmetro compatível com o tamanho das fenestrações dos vasos podem atingir e se acumular no tecido tumoral. Enquanto gotículas com diâmetro maior podem ser reconhecidas mais rapidamente pelo sistema fagocitário mononuclear (SINGH et al., 2017).

Conhecer o potencial zeta também é essencial, uma vez que este parâmetro pode ser usado para prever a estabilidade da formulação. A presença de uma carga na superfície das gotículas gera uma repulsão eletrostática entre elas, prevenindo a ocorrência do processo de agregação o que resulta em maior estabilidade do sistema (BRUXEL et al., 2012; LAOUINI et al., 2012).

2.5 Nanoemulsões radiomarcadas

Segundo Moghimi (2005), os nanocarreadores além de serem usados em tratamentos de doenças para contornar algumas dificuldades associadas à administração de medicamentos convencionais, também tem aplicação em diagnósticos de distúrbios e monitoramento de sistemas biológicos. No campo do diagnóstico e monitoramento de sistemas biológicos, os nanocarreadores radiomarcados surgiram recentemente como agentes potencialmente

promissores, devido à capacidade de gerarem imagens cintilográficas de alta qualidade pela presença de um radionuclídeo (de BARROS et al., 2012). Quando comparada com outras técnicas de imagens, a cintilografia apresenta vantagens por ser uma técnica não invasiva, com maior sensibilidade e capacidade de fornecer imagens quantitativas e em tempo real (KOO, 2006).

O radionuclídeo mais utilizado é o tecnécio-99m (^{99m}Tc), devido às suas adequadas características nucleares e físicas, como meia-vida física curta (aproximadamente 6 horas), decaimento por emissão de radiação gama de baixa energia (140 keV) e praticidade da obtenção do radioisótopo a partir de um sistema gerador (MARQUES et al., 2001; YANG et al., 2003). Na forma de pertecnetato, tal como é obtido do gerador, o ^{99m}Tc é quimicamente estável, no entanto, é um metal de transição da família VII B e tem número atômico 43, podendo existir em nove estados de oxidação (-1 a +7). Deste modo, é capaz de formar complexos entre o metal deficiente de elétrons e átomos ou grupos funcionais capazes de doar pares de elétrons (de BARROS et al., 2012). Segundo Akbar (2016), nos últimos anos, foram realizados progressos substanciais na marcação de nanoestruturas com o ^{99m}Tc , com a síntese de uma variedade de produtos radiomarcados. No entanto, esta síntese é viável desde que sejam utilizados agentes redutores adequados, ligantes altamente específicos, tampão apropriado e pH específico (AKBAR et al., 2016).

Vários estudos farmacocinéticos e de biodistribuição são conduzidos por meio da utilização de radioisótopos, tendo em vista, que apresenta menor custo e maior facilidade no preparo das amostras quando comparados aos estudos que empregam cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), fluorescência ou espectrometria de massas (FERNANDES, 2016). Chhabra e colaboradores (2010), desenvolveram uma NE contendo Benzilato de anlodipino (fármaco para tratamento da hipertensão) radiomarcada com ^{99m}Tc e avaliaram o perfil de biodistribuição do fármaco, a fim de verificar sua biodisponibilidade após administração por via intravenosa. de Campos e colaboradores (2016), desenvolveram uma NE contendo Praziquantel (fármaco contra esquistossomose) e realizaram um estudo de biodistribuição usando o ^{99m}Tc

para verificar se a formulação atinge as regiões acometidas pelos parasitas. Com base nesses dados, tem-se uma possível ferramenta para acompanhar o comportamento *in vivo* de uma nanoemulsão contendo AANC, bem como, obter dados farmacocinéticos e de biodistribuição dessa nanoformulação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a biodistribuição de nanoemulsões contendo a AANC.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar características físico-químicas através do software Qik Prop.
- Avaliar a solubilidade da AANC em diferentes óleos.
- Desenvolver nanoemulsões contendo AANC com diferentes composições quali- e quantitativa.
- Caracterizar as formulações desenvolvidas quanto ao diâmetro médio do glóbulo, índice de polidispersão, potencial zeta e concentração de AANC encapsulada.
- Avaliar a estabilidade da formulação desenvolvida quanto aos parâmetros físico-químicos e concentração de AANC encapsulada.
- Avaliar a citotoxicidade da formulação desenvolvida frente a linhagem celular de câncer de mama (MDA-MB-231) em condições de normoxia e hipoxia.
- Marcar com radioisótopo ^{99m}Tc a AANC livre (^{99m}Tc -AANC-co-ligantes) e a NE contendo AANC (^{99m}Tc -NE-AANC) e avaliar a estabilidade do complexo formado em solução de NaCl 0,9% (p/v) e em plasma de camundongo.
- Avaliar a biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -AANC-co-ligantes em animais Swiss sadios.

- Investigar a biodistribuição do ^{99m}Tc -AANC-co-ligantes e do ^{99m}Tc -NE-AANC em animais Swiss com tumor de Ehrlich.
- Obter imagens cintilográficas utilizando ^{99m}Tc -AANC e ^{99m}Tc -NE-AANC e analisar quantitativamente as imagens cintilográficas por meio da determinação da radioatividade nas regiões de interesse (ROIs).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

A AANC foi sintetizada no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da UFMG; o triglicerídeo de cadeia média (TCM, Crodamol® GTCC) e o Tween® 80 (polissorbato 80) foram fornecidos pela Crodalnc (Edison, EUA); o glicerol foi adquirido da Casa da Química Indústria e Comércio Ltda (São Paulo, Brasil); óleo de sésamo e ácido oléico foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e a lecitina de soja (Lipoid S75®) foi adquirido da LipoidGmbH (Ludwigshafen, Alemanha).

A acetonitrila grau cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi adquirida da JTBacker (México). O tetraidrofurano (THF) grau CLAE foi adquirido da Tedia (Fairfield, Ohio, EUA). A água utilizada em todos os experimentos foi purificada utilizando o equipamento de destilação e deionização Milli-Q® (Millipore, MA, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Para os estudos *in vitro* a linhagem de células MDA-MB-231 foi doada pelo Dr. Marcel Leist, Universidade de Konstanz/Alemanha e mantida em meio DMEM (Sigma Aldrich, EUA), contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO BRL, Grand Island, NY), enriquecido com 1% de solução antibiótica (100UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EUA).

Para os estudos *in vivo*, solução de xilazina (Dopaser® 2%) foi adquirida da HertapeCalier (Juatuba, Brasil). A solução de cloridrato de ketamina (Dopalen® 10%) foi fornecida pela Vetbrands Agroline (Campo Grande, Brasil). O tecnécio-99m foi obtido de um gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (IPEN/Brasil). Os camundongos Swiss foram adquiridos do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG e mantidos sem restrição de água e ração, na sala de experimentação animal do Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Todos os experimentos realizados em

animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo nº 323/2016.

4.2 Revalidação do método analítico

O doseamento da AANC foi realizado por CLAE e as condições cromatográficas empregadas foram semelhantes às descritas por Sena (2013), conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições cromatográficas do método analítico para doseamento da AANC.

Fase Móvel	Acetonitrila:Água (35:65 v/v)
Volume de injeção	20 µL
Fluxo	0,7 mL/min
Detecção	240 nm
Temperatura	25 °C
Coluna	Fase reversa C18 (LichroCar, Merck, Alemanha). 25 cm de comprimento; 4,6 mm de diâmetro interno; tamanho de partícula de 5 µm.
Equipamento	Equipamento Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, EUA) com bomba quaternária G5611A (Santa Clara, EUA), injetor automático G5628A (Santa Clara, EUA) e detector <i>Diode Array Detector</i> G4212B (Santa Clara, EUA).

4.2.1 Especificidade

Para a avaliação da especificidade, 200 µL de NE brancas (sem o fármaco) preparadas com TCM foram transferidos para um balão volumétrico de 10,0 mL que teve seu volume aferido com THF grau CLAE, para romper as gotículas. Em seguida, 6,0 mL dessa preparação foram transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi aferido com fase móvel. A preparação foi então filtrada em membrana Durapore PVDF não estéril com diâmetro de poro de 0,45 µm (Millex HV, JBR610222, Millipore, EUA) e posteriormente injetada no cromatógrafo.

De maneira similar, uma solução de AANC preparada em acetonitrila na concentração de 12,0 µg/mL, foi filtrada em filtro não estéril com diâmetro de poro de 0,45 µm (Millex HV, JBR610222, Millipore, EUA) e também injetada no cromatógrafo.

Os cromatogramas obtidos para a formulação de NE brancas e para a solução de AANC foram sobrepostos a fim de se avaliar a interferência dos constituintes da formulação no tempo de retenção da AANC.

4.2.2 Linearidade

Para determinação da curva analítica foram preparadas, em triplicata, soluções padrão estoque de AANC, pesando-se, quantitativamente, 1,0 mg da substância e transferindo para um balão volumétrico de 25 mL. O volume foi então completado com acetonitrila grau CLAE, obtendo a concentração final de 40 µg/mL. A partir de cada solução estoque, alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mL foram pipetadas e transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL que tiveram o volume completado com fase móvel. Essas diluições resultaram em cinco diferentes concentrações 4,0; 8,0; 12,0; 16,0 e 20,0 µg/mL. Todas as soluções foram filtradas em filtros com poro de 0,45 µm de diâmetro (Millex HV, JBR610222, Millipore, EUA) e, em seguida, analisadas por CLAE. Curvas analíticas foram plotadas para concentração de AANC *versus* a área do pico correspondente e os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear.

4.2.3 Precisão

Para a determinação da precisão intra-dia foram preparadas três soluções de baixa (4,0 µg/mL), média (12,0 µg/mL) e alta (20,0 µg/mL) concentração de AANC. Essas amostras foram filtradas, injetadas no cromatógrafo e as leituras realizadas em triplicatas. Para determinação da precisão inter-dia, um procedimento similar ao descrito anteriormente foi adotado e as análises foram

realizadas em dois dias consecutivos. Os resultados foram expressos pelo DPR % das concentrações médias determinadas (CMD), dado pela fórmula: $DPR \% = DP/CMD \times 100$, onde, DP é o desvio padrão das CMD. A precisão do método foi demonstrada pela obtenção de valores de DPR inferiores a 5% (BRASIL, 2003).

4.3 Determinação da solubilidade da AANC em diferentes óleos

A solubilidade da AANC em diferentes óleos tais como ácido oléico, óleo de soja, triglicerídeos de cadeia média (TCM) e tributirina foi determinada. Inicialmente, em frascos de vidro âmbar foram adicionados 3,0 mg de AANC, e quantidade de óleo suficiente para completar uma massa total de 1 g. Essas misturas foram mantidas sob agitação magnética constante à temperatura ambiente durante 24 h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 120 minutos a 20° C (Himac CF-7D2, Hitach, EUA). Em seguida, alíquotas dos sobrenadantes foram filtradas em membrana de nitrato de celulose não estéril com diâmetro de poro de 1,2 µm (Sartorius StedimBiotech, Alemanha). Posteriormente, 200 µL da amostra filtrada foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL que teve seu volume aferido com THF grau CLAE. Em seguida, 6,0 mL dessa solução foram transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi aferido com fase móvel. As amostras foram então filtradas em filtro 0,45 µm e posteriormente analisadas por CLAE.

4.4 Cálculo de propriedades físico-químicas da AANC

A estrutura química da AANC foi desenhada no Maestro e analisada utilizando o software LigPrep (versão 3.6, Schrödinger, LLC, Nova York, NY, 2015). Algumas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas foram calculadas empregando o modo normal de QikProp, o qual produz descritores relevantes que permitem inferir sobre a absorção, distribuição, metabolização, eliminação e toxicidade de uma substância.

4.5 Desenvolvimento da nanoemulsão

4.5.1 Nanoemulsões brancas

As NE brancas foram preparadas pelo método de homogeneização à quente, seguida por ultrassonicação. As formulações foram produzidas em triplicata na composição quali e quantitativa apresentada nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Composição das NE brancas contendo 1,5% p/v de óleo (%p/v).

NE	TCM			TCM:Tributirina			Tributirina		
	NE1	NE2	NE3	NE4	NE5	NE6	NE7	NE8	NE9
Fase oleosa									
TCM	1,5	1,5	1,5	0,75	0,75	0,75	-	-	-
Tributirina	-	-	-	0,75	0,75	0,75	1,5	1,5	1,5
Colesterol	0,15	-	-	0,15	-	-	0,15	-	-
Lecitina de soja	-	1	1	-	1	1	-	1	1
Tween® 80	1	1	-	1	1	-	1	1	-
Tween® 60	-	-	1	-	-	1	-	-	1
Fase aquosa									
Glicerol	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25
Água Milli-Q® q.s.p.	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Para o preparo dessas formulações, a fase oleosa (FO) e a aquosa (FA), previamente pesadas, foram aquecidas separadamente, até a temperatura de 80-85 °C, em banho maria, sob agitação magnética constante. Após atingir a temperatura, a FA foi vertida lentamente sobre a FO mantendo a agitação magnética por 2 minutos. Posteriormente, a formulação foi submetida à ultrassonicação, usando sonda de titânio (CPX 500 model; 500W, Cole-Parmer Instruments, Vernon Hills, IL, USA), com potência de 21 % de amplitude, por 10 minutos. Em seguida, o pH da formulação foi ajustado com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L ou hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L até obter o

pH final entre 7,0-7,5. Posteriormente, as preparações foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e estocadas à temperatura de 5 ± 3 °C.

Tabela 5 – Composição das NE brancas (%p/v).

Formulações	TCM		TCM:Tributirina	
	5%	10%	5%	10%
Fase oleosa				
TCM	5	10	2,5	5
Tributirina	-	-	2,5	5
Lecitina de soja	1,5	1,5	1,5	1,5
Tween® 80	1,5	3	1,5	3
Fase aquosa				
Glicerol	2,25	2,25	2,25	2,25
Água Milli-Q® q.s.p.	100	100	100	100

4.5.2 Nanoemulsões contendo AANC

As NE contendo AANC foram preparadas, em triplicata, pelo mesmo método descrito no item anterior para as NE brancas. Foram preparadas diferentes formulações, variando a composição quali-quantitativa, conforme apresentado na Tabela 5. Após o preparo e ajuste do pH, as preparações foram então filtradas em membrana de nitrato de celulose não estéril com diâmetro de poro de 1,2 µm (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha), a fim de remover a fração de AANC não encapsulada, insolúvel no meio, e possíveis resíduos de titânio da sonda. Posteriormente, foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e estocadas a temperatura de 5 ± 3 °C.

Tabela 6 – Composição das NE contendo AANC (%p/v).

Formulações	TCM			TCM:Trinutirina		
	5%	5%	10%	5%	5%	10%
Fase oleosa						
AANC	0,2	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4
TCM	5	5	10	2,5	2,5	5
Tributirina	-	-	-	2,5	2,5	5
Lecitina de soja	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Tween® 80	1,5	1,5	3	1,5	1,5	3
Fase aquosa						
Glicerol	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25
Água Milli-Q® q.s.p.	100	100	100	100	100	100

4.6 Caracterização das nanoemulsões

4.6.1 Determinação do diâmetro das gotículas

O diâmetro médio das gotículas e o índice de polidispersão (IP) foram determinados por espalhamento dinâmico da luz utilizando um Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra) a uma temperatura de 25 °C e ângulo fixo de 90°. Para essa determinação, as formulações foram diluídas 100 vezes em água Milli-Q®. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.6.2 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das gotículas foi determinado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz associado à mobilidade eletroforética utilizando o equipamento Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra). As análises também foram realizadas à temperatura ambiente, 25 °C, com ângulo de incidência do laser de 90°. As formulações foram diluídas 100 vezes em água Milli-Q® e as medidas foram realizadas em triplicata.

4.7 Doseamento da AANC

Para a determinação da quantidade de AANC incorporado nas NE foram avaliados três parâmetros: a concentração antes (total) e após a purificação (purificado) em membranas específicas a fim de retirar a fração do AANC que permaneceu insolúvel, e foi analisada também a concentração de AANC na fração aquosa (solúvel), apesar da reduzida solubilidade desse composto em água.

Para quantificação do total de AANC presente nas formulações uma alíquota de 200 μL da formulação não purificada, foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL que teve seu volume aferido com THF grau CLAE, para romper as gotículas. Em seguida, 6,0 mL dessa solução foram transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL que teve seu volume aferido com fase móvel. Após homogeneização, a solução mostrou-se límpida.

Para quantificação do AANC presente na NE após o processo de purificação, 200 μL do filtrado em membrana de nitrato de celulose não estéril com diâmetro de poro de 1,2 μm (Sartorius StedimBiotech, Alemanha), foram pipetados e transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi aferido com THF grau CLAE. Uma alíquota de 6,0 mL dessa solução foi pipetada e transferida para balão volumétrico de 10,0 mL e, novamente, o volume foi aferido com fase móvel. Após homogeneização, as soluções obtidas ficaram límpidas.

Para avaliação da quantidade de AANC que permaneceu solúvel na fase aquosa externa da formulação, 1,0 mL de NE foi transferido para um filtro Amicon Ultra-15 (100 kDa, Amicon®, Danvers, MA, EUA) e submetido a centrifugação à 5000 rpm, durante 30 minutos (Himac CF-7D2, Hitach, EUA). Em seguida, 150 μL do filtrado obtido após a centrifugação foram pipetados e transferidos para balão volumétrico de 5 mL que teve seu volume aferido com fase móvel.

Todas as amostras preparadas foram filtradas em membrana Durapore PVDF não estéril com diâmetro de poro de 0,45 µm (Millex HV, JBR610222, Millipore, EUA) e, em seguida, analisadas por CLAE. A quantidade em miligramas de AANC por mililitro de formulação de cada uma das amostras analisadas por CLAE foi calculada utilizando a curva de calibração previamente construída.

4.8 Estudo de estabilidade das NE

As formulações que apresentaram melhores resultados com relação às propriedades físico-químicas (diâmetro, IP, potencial zeta) e concentração de AANC encapsulado foram selecionadas para o acompanhamento da estabilidade. As NE brancas também foram submetidas a esse estudo para fins de comparação.

Nesse estudo, após preparo, as formulações foram acondicionadas em frasco de vidro âmbar com capacidade de 10 mL e armazenadas à temperatura de 5 ± 3 °C. Em intervalos de tempo predeterminado (0, 7, 14, 21 e 28 dias) após o preparo das NE, uma fração foi retirada para avaliação das propriedades físico-químicas e concentração de AANC encapsulado.

4.9 Avaliação da atividade citotóxica

Esse estudo foi realizado em colaboração com a Professora Elaine Maria de Souza-Fagundes e o doutorando Jonas Pereira Ramos, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Foi utilizada a linhagem de célula tumoral MDA-MB-231 (tumor de mama humano). Em placas de 96 poços, 10.000 células por poço foram pré-incubada *overnight* para estabilização em condições de hipóxia (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ a 37°C) e normoxia (5% CO₂, 95% de ar atmosférico a 37°C). Após estabilização, as células foram tratadas com tirapazamina, AANC livre, NE-AANC e NE branca, empregando-se nove diluições seriadas 1:2, as quais variaram de 200 µM a 0,78125 µM de AANC. Após tratamento as células foram mantidas por 72h em condições de hipóxia e normoxia. A viabilidade celular foi mensurada pela taxa de redução do brometo

de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) à cristais de formazan. Os tratamentos foram avaliados em dois experimentos independentes realizados em triplicata e os resultados expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle, calculados pela seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = [(\text{DO média do tratado}/\text{DO controle}) \times 100].$$

4.10 Procedimento de radiomarcção do AANC livre

Os estudos *in vivo* foram realizados em colaboração com o Professor André Branco de Barros e a mestrandia Nara Pereira, do Laboratório de Radioisotopos da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Uma solução de AANC livre preparada em etanol na concentração de 1 mg/mL foi radiomarcada com ^{99m}Tc por método indireto, utilizando-se coligantes (tricina e EDDA) para estabilizar a ligação do radiotraçador e cloreto estanoso dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como agente redutor. A radiomarcção foi realizada por meio da adição de 300 μL de NaCl 0,9% (p/v), 200 μL da solução de AANC, 20 mg de tricina, 5 mg de EDDA e 200 μL de solução de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em HCl (2,0 mg/mL) em um frasco de penicilina. O pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 0,1 mol/L. O frasco foi levado ao ultrassom até a solubilização de todos os constituintes, em seguida, foi lacrado e com o auxílio de uma seringa foi realizado vácuo. Em seguida, uma alíquota de 0,1 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v) contendo 37 MBq de pertecnetato de sódio foram adicionados ao frasco. Por fim, a solução foi mantida em banho-maria fervente (100 °C), por 15 minutos.

4.11 Procedimento de radiomarcção da NE

A NE foi marcada pelo ^{99m}Tc por método direto, utilizando $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como agente redutor. Em um frasco de penicilina contendo 1,0 mL de formulação, foram adicionados 100 μL de uma solução de cloreto estanoso em HCl 0,25 mol/L (2 mg/mL). O pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 0,1 mol/L. O frasco foi lacrado e foi realizado vácuo como descrito anteriormente. Em

seguida, 0,5 mL de uma solução de NaCl 0,9% (p/v) contendo 37 MBq de pertecnetato de sódio foram adicionados ao frasco, que foi mantido sob agitação, em vórtex, por 2 minutos e, posteriormente, deixado em repouso à temperatura ambiente, por 10 minutos.

4.12 Eficiência da radiomarcagem

As impurezas radioquímicas ($^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$) foram analisadas tanto para a marcação de AANC livre (^{99m}Tc -AANC-coligantes) quanto para a marcação da NE (^{99m}Tc -NE-AANC).

Para a determinação de tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) foi realizada a cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando fitas de sílica gel (TLC-SG, Merck, Darmstadt, Alemanha) e metiletilcetona como fase móvel. Nessa etapa, 5 μL das soluções radiomarcadas foram aplicados na base das fitas que, após eluição, foram levadas a um contador de radiação gama (Perkin Elmer WallacWizard 1470-020 GammaCounter, Perkin Elmer Inc., Waltham, EUA) para determinação da radioatividade. O $^{99m}\text{TcO}_4^-$ migra com a metiletilcetona, enquanto os complexos radiomarcados permanecem no ponto de aplicação.

As soluções de ^{99m}Tc -AANC-co-ligantes e as dispersões de ^{99m}Tc -NE-AANC foram purificadas utilizando um filtro de seringa 0,22 μm . Dessa forma, o tecnécio coloidal ($^{99m}\text{TcO}_2$) retido no filtro foi quantificado pela medida da radioatividade, utilizando o mesmo contador gama descrito anteriormente.

Após quantificação das impurezas ($^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$) inerentes ao processo de marcação radioquímica, foi possível determinar o percentual de AANC livre e de NE-AANC marcados. O rendimento de marcação foi determinado considerando a fórmula abaixo:

$$\% \text{ marcação} = 100 - (\%^{99m}\text{TcO}_2 + \%^{99m}\text{TcO}_4^-)$$

4.13 Estudos de estabilidade da marcação *in vitro*

Foram realizados testes de estabilidade de marcação *in vitro*, tanto para ^{99m}Tc -AANC-coligantes quanto para ^{99m}Tc -NE-AANC, em presença de solução de NaCl 0,9% (p/v) e em plasma de camundongo.

4.13.1 Estabilidade em solução de NaCl 0,9% (p/v)

Após a marcação, os frascos contendo ^{99m}Tc -AANC-co-ligantes e ^{99m}Tc -NE foram mantidos à temperatura ambiente e nos tempos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas alíquotas foram retiradas para a verificação do teor de impurezas utilizando os métodos descritos previamente.

4.13.2. Estabilidade em plasma de camundongo

Após as marcações, 90 μL de cada um dos complexos de ^{99m}Tc -AANC-coligantes e de ^{99m}Tc -NE-AANC foram incubados, separadamente, em 1 mL de plasma de camundongo a 37°C sob agitação. Após os tempos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas alíquotas foram retiradas para a verificação do teor de impurezas.

4.14 Depuração plasmática em animais sadios

Alíquotas de 0,1 mL da solução ^{99m}Tc -AANC-coligantes e da suspensão contendo ^{99m}Tc -NE-AANC foram injetadas pela veia caudal de camundongos Swiss fêmeas (n = 7 animais). Nos tempos de 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 minutos, após a administração dos complexos marcados, foram realizadas incisões na cauda dos animais e o sangue foi coletado (20 μL) em tubos previamente pesados. Os tubos com sangue foram pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade. Uma atividade padrão (dose padrão) contendo a mesma quantidade de radioatividade injetada nos animais foi contada simultaneamente em um tubo separado, a fim de corrigir os cálculos pelo decaimento físico do ^{99m}Tc . Os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de sangue (% DI/g). Os parâmetros

tempo de meia vida $T_{1/2\alpha}$ e $T_{1/2\beta}$ e a área sob a curva (ASC) foram calculados utilizando o software PrismGrapPad (versão 5.0).

4.15 Estudo de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -AANC-coligantes em animais sadios

Foram utilizados 21 camundongos Swiss fêmeas sadios ($25 \pm 2\text{g}$), que foram divididos em três grupos experimentais, correspondentes aos tempos de 0,5; 1 e 4 horas ($n = 7$ animais por tempo). Cada animal recebeu, por via intravenosa, pela veia caudal, 3,7 MBq contendo o complexo ^{99m}Tc -AANC-coligantes. Após os tempos predeterminados os animais foram anestesiados com solução de ketamina (80 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg) e, em seguida, o sangue foi coletado pelo complexo braquial e os animais foram eutanasiados por exsanguinação. Os seguintes órgãos e tecidos foram retirados, pesados e levados ao contador de gama para a medida da radioatividade: fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, intestino delgado, intestino grosso, músculo, tireóide e cérebro. Os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de tecido coletado (%DI/g).

4.16 Estudo de biodistribuição das preparações em animais acometidos por tumor sólido de Ehrlich

4.16.1 Obtenção do modelo experimental de tumor de Ehrlich

Células de tumor ascítico de Ehrlich, derivadas de adenocarcinoma mamário de camundongos e previamente armazenadas em criotubos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram inoculadas no peritônio de dois camundongos Swiss fêmeas ($25 \pm 2\text{g}$). Oito dias após a inoculação, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (15 mg/Kg) e ketamina (80 mg/Kg) e o líquido ascítico contendo as células tumorais foi coletado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Esse líquido foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL e seu volume completado com solução de NaCl 0,9% (p/v). Em seguida, a preparação foi centrifugada a 3000 rpm por 3 minutos, numa temperatura de $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi

desprezado e o pellet contendo as células foi ressuspensionado em solução de NaCl 0,9% (p/v). O procedimento foi repetido até a obtenção de um líquido denso e claro, com o mínimo possível de fibrinas e hemácias. Em seguida, realizou-se a contagem e a determinação da viabilidade celular. A contagem das células tumorais foi realizada com o uso de microscópio óptico utilizando uma câmara de Neubauer e uma solução de azul de Tripán 0,4% (p/v) como corante. As células coradas pelo azul de Tripán foram consideradas inviáveis e as células translúcidas foram consideradas viáveis. Uma suspensão de células viáveis foi então preparada em uma densidade média de $2,5 \times 10^7$ células/mL. Essas células foram implantadas por via subcutânea no flanco direito de camundongos fêmeas em um volume de 0,1 mL/camundongo, totalizando $2,5 \times 10^6$ células. Os animais foram mantidos até que o tumor atingisse um diâmetro médio de 5 mm. Ao atingir o tamanho requerido, os animais foram aleatoriamente distribuídos nos diferentes grupos experimentais e utilizados nos experimentos de biodistribuição.

4.16.2 Estudo de biodistribuição e imagens cintilográficas

Esse estudo foi conduzido após administração da ^{99m}Tc -AANC-coligantes (n=14 animais) e da dispersão ^{99m}Tc -NE-AANC (n=14 animais). Cada grupo de tratamento, foi subdividido em dois grupos (7 animais cada) nos quais cada animal recebeu, pela veia caudal, 3,7 MBq das preparações radiomarcadas. Após 30 min e 2 horas da administração, os animais foram anestesiados com solução de ketamina (80 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg). Em seguida, os animais foram colocados sob uma gama câmara Nuclide™ TH 22, Mediso (Budapeste, Hungria) e mantidos em posição de decúbito ventral para a aquisição das imagens cintilográficas. Uma janela de 20% simétrica foi utilizada para um pico de energia de 140 KeV. As imagens (300.000 contagens) foram obtidas e armazenadas em uma matriz 256 x 256. As imagens foram analisadas determinando-se a radioatividade nas regiões de interesse (ROI) pelo delineamento ao redor da área alvo (tumor) e da área não-alvo (músculo contralateral).

Após a aquisição das imagens, o sangue foi coletado pelo plexo braquial até a eutanásia por exsanguinação. Posteriormente, os seguintes órgãos e tecidos foram retirados: fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, intestino delgado, intestino grosso, músculo, tireóide, cérebro e tumor. Esses órgãos foram pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade, juntamente a um padrão contendo a mesma quantidade de radioatividade injetada nos animais, para corrigir os cálculos pelo decaimento físico do ^{99m}Tc . Os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de tecido (% ID/g).

4.17 Análise estatística

Os valores médios e o desvio-padrão (DP) foram calculados para todos os experimentos descritos anteriormente. Todos os dados foram previamente verificados quanto à normalidade e homocedasticidade da variância utilizando-se os testes de D'Agostino & Pearson e Bartlett, respectivamente. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas utilizando distintas equações. A diferença entre os grupos experimentais foi testada por análise de variância seguida do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas no programa *GraphPadPrism 5.0*, adotando o intervalo de confiança de 95%. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

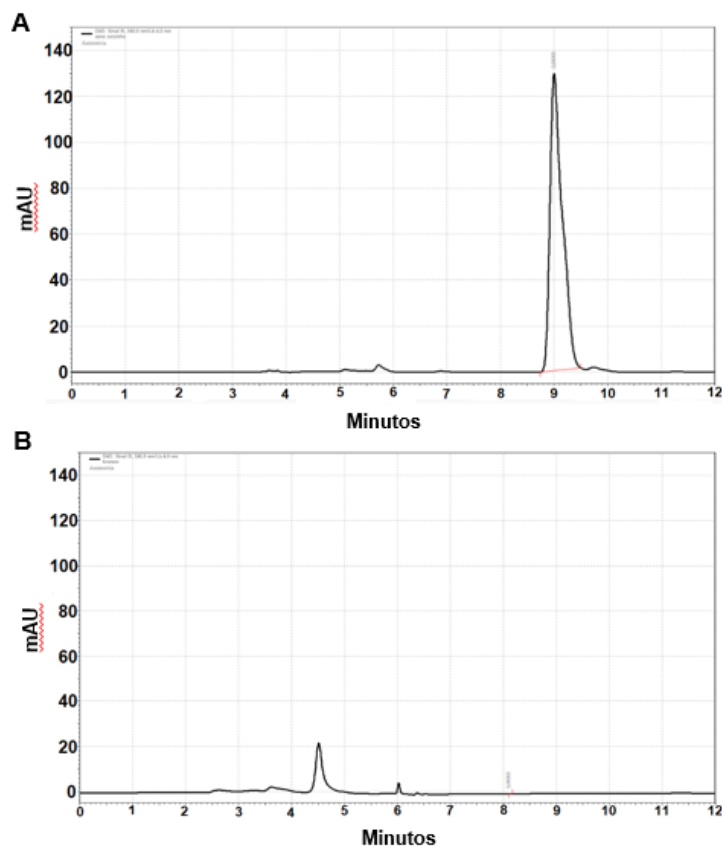
5.1 Revalidação do método analítico

No presente estudo foi utilizado o método de doseamento da AANC por CLAE desenvolvido por Sena (2013). No entanto, como no presente estudo foi utilizado outro cromatógrafo fez-se necessária a revalidação do método segundo normas descritas na Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003). De acordo com a Resolução nº 899, no caso da transferência de equipamentos o método é considerado validado desde que sejam avaliados os parâmetros precisão, especificidade e linearidade.

A fim de comprovar a seletividade do método em identificar a AANC na presença dos componentes da formulação, a especificidade do método foi inicialmente avaliada. Os cromatogramas obtidos a partir de uma solução de AANC (12,0 µg/mL) e da formulação de NE branca estão representado na Figura 6A e Figura 6B, respectivamente. É possível observar que não existe pico na formulação de NE branca interferente no tempo de retenção da AANC. Dessa forma, segundo a Resolução 899 (BRASIL, 2003) a especificidade do método para a quantificação de AANC na presença dos constituintes da formulação foi confirmada.

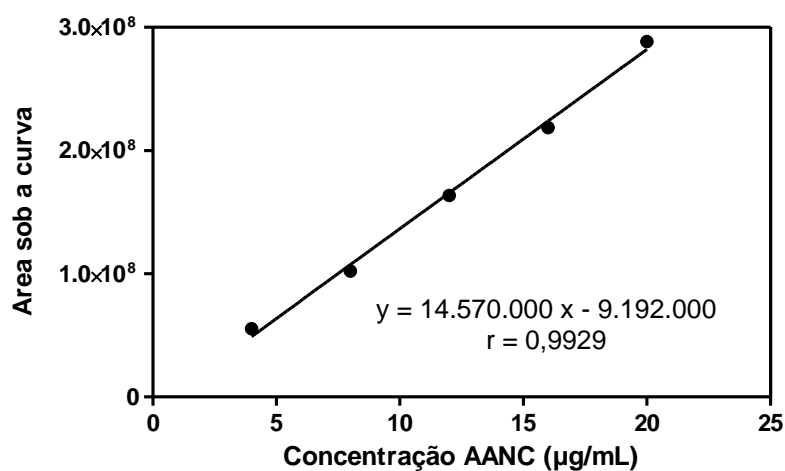
A curva analítica, resultante da média de três curvas padrão, construída a partir de cinco pontos na faixa de concentração de 4,0 a 20,0 µg/mL de AANC, em dias diferentes está representada na Figura 7.

Figura 6 – (A) Cromatograma obtido para a solução de AANC (12 µg/mL) e (B) Cromatograma obtido para a formulação de nanoemulsão branca.



Fase móvel acetonitrila:água 35:65 v/v, $\lambda = 240$ nm, equipamento Agilent.

Figura 7 - Curva analítica média obtida para doseamento da AANC por CLAE.



Concentração de 4,0 a 20,0 µg/mL, fase móvel acetonitrila:água 35:65 v/v, $\lambda = 240$ nm, equipamento Agilent.

Os dados de cada curva foram ajustados por análise de regressão linear e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 7. O coeficiente de correlação (r) obtido foi para a curva média foi igual a 0,9929 e, segundo especificações da Resolução nº 899 o valor de r deve ser igual ou superior a 0,99. Esses resultados indicam, portanto, que a faixa de concentração de AANC proposta foi diretamente proporcional (linear) à resposta do analito.

Tabela 7 – Dados da linearidade das diferentes curvas obtidos por análise de regressão linear.

Parâmetros	Inclinação ± DP	Intercepto ± DP	Coefficiente de correlação
Curva 1	15.060.000 ± 523.500	-7.277.000 ± 6.945.000	0,9981
Curva 2	13.670.000 ± 506.300	-8.281.000 ± 6.717.000	0,9979
Curva 3	14.980.000 ± 641.900	-12.020.000 ± 8.515.000	0,9972
Curva Média	14.570.000 ± 483.300	-9.192.000 ± 6.412.000	0,9929

DP: desvio padrão.

A precisão do método analítico foi verificada pela análise de precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária) no intuito de se obter a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo e em dias diferentes, respectivamente. No presente estudo, foram verificadas três concentrações definidas como baixa (4,0 µg/mL), média (12,0 µg/mL) e alta (20,0 µg/mL). Os valores das concentrações analisadas em um mesmo dia (intra-dia) e em dias diferentes (inter-dia) estão apresentados na Tabela 8. Os valores de DPR de precisão intra-corridas e inter-corridas foram inferiores a 5%, como preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2003) demonstrando precisão adequada do método analítico para o doseamento de AANC.

Tabela 8 - Resultados da precisão intra-dia e inter-dias obtidos para o método analítico de determinação da AANC por CLAE.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Dia	Concentração Calculada ($\mu\text{g/mL}$)	DPR	
			Intra-dia	Inter-dias
4,0	1	4,36	0,37	1,18
		4,38		
		4,40		
	2	4,46	0,31	
		4,48		
		4,48		
12,0	1	11,88	0,50	1,31
		11,93		
		12,00		
	2	11,63	0,34	
		11,66		
		11,71		
20,0	1	20,40	0,31	0,42
		20,43		
		20,52		
	2	20,46	0,42	
		20,55		
		20,63		

Fase móvel acetonitrila:água 35:65 v/v, $\lambda = 240 \text{ nm}$, equipamento Agilent.

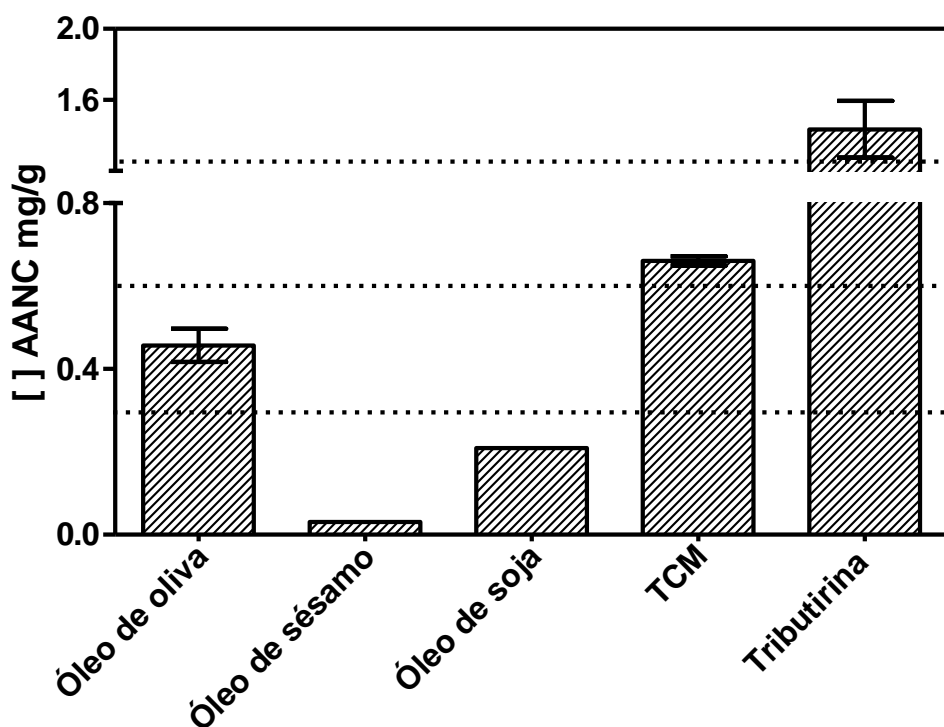
DPR: Desvio Padrão Relativo.

5.2 Determinação da solubilidade do AANC em diferentes óleos

A escolha do núcleo oleoso é um passo fundamental nos estudos de pré-formulação, visto que, a solubilidade da substância a ser encapsulada, geralmente, leva à seleção da fase interna da NE O/A (ARAÚJO et al., 2011; BRUXEL, 2012). Neste estudo, foram selecionados óleos comumente empregados em formulações de uso parenteral e que apresentam diferenças em relação aos ácidos graxos principais: ácido oleico (óleo de oliva), ácidos linoleico, linolênico e oleico (óleo de sésamo e óleo de soja), ácidos caprílico e cáprico (TCM) e ácido butírico (tributirina) (ARAÚJO et al., 2011; GANTA, 2010; WANTEN E CALDER, 2007).

A solubilidade da AANC nos óleos selecionados está apresentada na Figura 8. Entre os óleos testados, a AANC apresentou maior solubilidade na tributirina (1,43 mg/g) e a menor solubilidade foi obtida com óleo de sésamo (0,03 mg/g). A segunda melhor alternativa foi o TCM (0,66 mg/g), seguido do óleo de oliva (0,45 mg/g) e óleo de soja (0,21 mg/g). Esses dados demonstram que a presença de insaturação na cadeia carbônica do ácido oléico (18:1), ácido linoléico (18:2) e ácido linolênico (18:3), ocasiona uma redução da solubilidade da AANC nos óleos de oliva, soja e sésamo. Por outro lado, o predomínio de ácidos graxos saturados no TCM (ácidos capríco e caprílico) e tributirina (ácido butírico) favorece maior interação aumentando, conseqüentemente a solubilidade da AANC. Além disso, o TCM e a tributirina apresentam uma cadeia carbônica mais curta do que as dos demais óleos analisados, possibilitando menores interações do tipo solvente-solvente o que, usualmente, permite uma melhor associação com o soluto (HONG et al., 2016). Com base nesses dados, o desenvolvimento de NE contendo AANC foi realizado utilizando a tributirina e o TCM como constituintes de fase oleosa.

Figura 8 - Solubilidade da AANC em óleo de oliva, óleo de sésamo, óleo de soja, TCM e tributirina.



Vários estudos têm reportado que o ácido butírico apresenta potencial antitumoral, promovendo a diferenciação celular além de atuar como agente antiproliferativo em um amplo espectro de células neoplásicas *in vitro* (SANTINI et al., 2001). No entanto, essa substância tem um reduzido tempo de meia vida e sua eficácia somente é observada após administração de altas doses (BRIOSCHI et al., 2008). A associação da tributirina ao núcleo oleoso da NE pode, portanto, ser uma fonte de ácido butírico, propiciando sua liberação *in vivo*, após a hidrólise da ligação éster pelas esterases. Essa estratégia poderia melhorar a atividade antitumoral do sistema uma vez que carrega duas substâncias com potencial antitumoral.

5.3 Predição das propriedades do AANC utilizando o software QikProp

O software QikProp permite calcular algumas propriedades relevantes para o desenvolvimento de fármacos. Os resultados obtidos nesse estudo foram comparados com os valores recomendados no manual do software QikProp (2016) e estão apresentados na Tabela 9.

Os valores previstos para logP e para a permeabilidade através das células Caco-2 (modelo para permeabilidade intestinal) e das células MDCK (modelo para permeabilidade da barreira hematoencefálica) demonstram que esse composto possui boa permeabilidade celular. Esses resultados estão de acordo com a favorável absorção oral prevista (73%).

O número de reações metabólicas esperadas para a AANC também se enquadra na faixa recomendada para medicamentos, sendo previstas três reações, sabendo-se que uma delas é a redução do grupo nitro. Além disso, o valor estimado para QPlogHERG (-4,4) permite inferir que a AANC possui uma pequena afinidade pelos canais de potássio presentes no coração, o que pode sugerir uma possível toxicidade cardíaca.

Tabela 9 - Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas estimadas para AANC.

Propriedade	Valor recomendado	Valor estimado para AANC
ClogP	≤ 5	1,10
QPlogHERG ^a	> - 5,0	- 4,4
QPPCaco(nm/s) ^b	< 25 fraco > 500 ótimo	164
QPPMDCK (nm/s) ^c	< 25 fraco > 500 ótimo	157
Número de reações metabólicas	1 a 8	3
Porcentagem de absorção oral humana	> 80% alta < 20% pobre	73%

Todos os valores foram calculados com o software QikProp 4.6, Schrödinger, NY;

^a Valor preditivo do logCI50 para bloqueio de canais K⁺ HERG;

^b Permeabilidade aparente em células Caco-2 para transporte não ativo

^c Permeabilidade aparente em células MDCK para transporte não ativo

5.4 Preparo e otimização de formulações de nanoemulsões brancas

A primeira etapa do desenvolvimento farmacotécnico consistiu no preparo de NE brancas mediante variação da composição quali-quantitativa das formulações. O método utilizado no preparo das NE foi homogeneização a quente seguido por ultrasonicação, classificado como um método de alta energia. Esse método foi proposto, tendo em vista que, métodos de alta energia são mais efetivos na redução do diâmetro das gotículas quando comparado aos de baixa energia (KHACHANE et al., 2015; TADROS et al., 2004).

A escolha do núcleo oleoso, TCM e tributirina, como mencionado anteriormente, foi baseada na maior solubilidade da AANC. Além disso, TCM tem sido comumente utilizado no preparo de NE, como visualizado na Tabela 2. Os TCM são cerca de 100 vezes mais miscíveis em água do que os análogos de cadeia longa e são capazes de carrear elevados teores de fármacos lipossolúveis (BRUXEL et al., 2012).

No intuito de determinar a melhor composição para a estabilização da interface da gotícula de óleo no meio aquoso, foram realizados testes abordando diferentes estratégias de associação de agentes tensoativos. Nessa etapa inicial, fixou-se a concentração de fase oleosa (TCM, Tributirina e TCM:Tributirina 1:1) em 1,5% p/v. Os dados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Caracterização físico-química das NE brancas contendo 1,5% de óleo quanto aos parâmetros de diâmetro médio, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta.

Formulações	TCM	TCM:Tributirina	Tributirina
	Tween 80 + Colesterol		
Diâmetro ± DP (nm)	86 ± 6	105 ± 2	141 ± 2
IP ± DP	0,52 ± 0,01	0,46 ± 0,03	0,49 ± 0,02
Potencial zeta ± DP (mV)	-8 ± 1	-11 ± 1	-2 ± 1
	Tween 80 + Lecitina de soja		
Diâmetro ± DP	135 ± 4	126 ± 3	*
IP ± DP	0,30 ± 0,01	0,21 ± 0,01	*
Potencial zeta ± DP (mV)	-28 ± 1	-31 ± 1	*

Dados expressos como média ± desvio padrão (DP) da média.

*Quebra da emulsão, com separação das fases.

Inicialmente, avaliou-se a capacidade do Tween 80 (EHL = 15,0) como único agente tensoativo e do colesterol como co-tensoativo em estabilizar a interface do sistema. Embora os dados de diâmetro tenham sido adequados para a administração IV, os valores de IP demonstraram que os sistemas estavam polidispersos. Além disso, os valores de potencial zeta obtidos estavam abaixo dos valores sugeridos para garantir a estabilidade de sistemas coloidais (aproximadamente 30 mV em módulo). Nesse sentido, alterações posteriores foram sugeridas objetivando melhorar o IP e o potencial zeta das formulações.

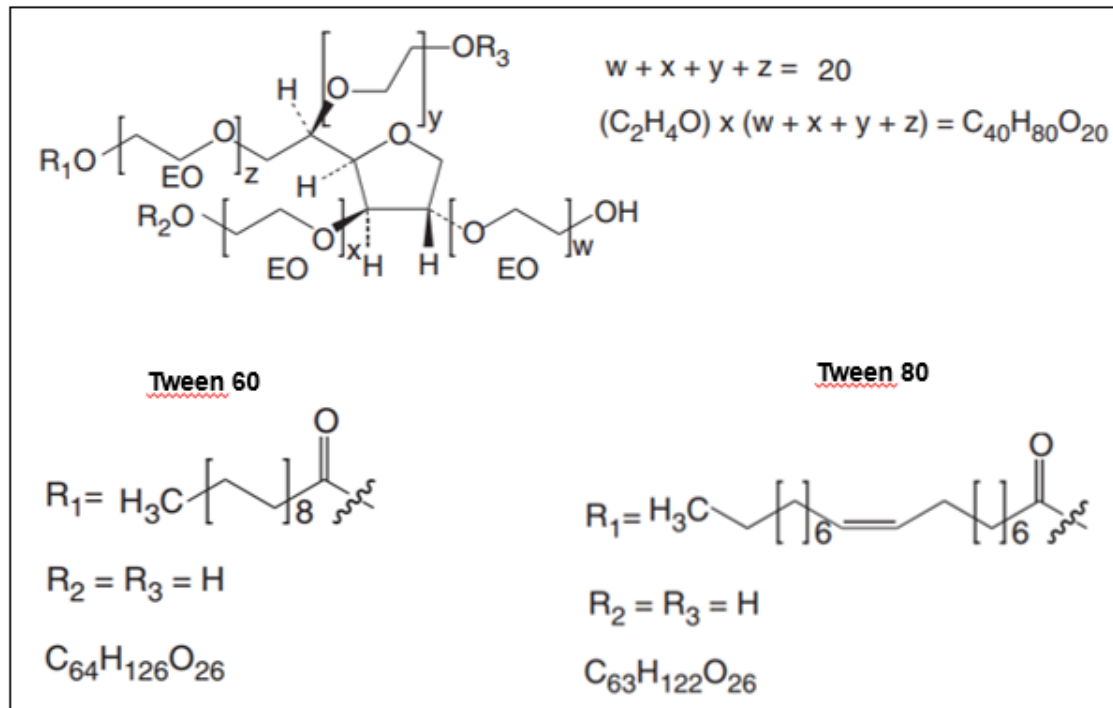
Alguns estudos têm sugerido que emulsões contendo TCM são estáveis com EHL variando entre 11 - 13 (LAWRENCE e REES, 2000). Portanto, avaliou-se então a influência da associação de um tensoativo hidrofílico Tween 80 com um tensoativo anfotérico mais lipofílico, a lecitina de soja (EHL = 8,0) de forma a se obter uma preparação com EHL final igual a 13,0. Essa proposta foi

baseada na hipótese de que a associação de um tensoativo lipofílico com outro hidrofílico têm se mostrado promissora, pois leva à formação de uma interface com maior estabilidade (BRUXEL et al., 2009).

Os resultados demonstraram (Tabela 10) um aumento do diâmetro médio para as formulações contendo TCM e a mistura TCM:Tributirina (1:1), no entanto, os valores encontram-se dentro da faixa recomendada para a administração endovenosa. Além disso, uma redução significativa do IP, compatível com uma preparação monodispersa, e aumento do potencial zeta foram observados nessas duas formulações. Com relação à tributirina, não foi possível obter um sistema emulsionado com estabilidade adequada utilizando-se a mistura de Tween 80 com lecitina de soja. Observou a quebra da emulsão com separação total das fases, 15 minutos após o preparo. Outras proporções dos tensoativos foram testadas, também sem sucesso.

Além disso, estudos prévios têm mostrado que tensoativos com EHL similar favorecem a formação de emulsões com características físico-químicas distintas (MATTOS et al., 2015). A fim de avaliar a influência dessa propriedade dos agentes tensoativos, a concentração de lecitina de soja foi fixada em 0,15% p/v e o Tween 80 foi substituído por Tween 60 (EHL=14,9). Essa mistura de tensoativos não conseguiu estabilizar as preparações, tornando-se inadequada para a produção de NE, nessa proporção empregada. Embora os tensoativos Tween 60 e Tween 80 possuam EHL similares, eles apresentam diferenças na geometria que provavelmente influenciou a interação na interface entre a gotícula de óleo e água. Como é possível observar na Figura 9, os Tweens 60 e 80 têm as mesmas cabeças polares, mas diferentes cadeias hidrofóbicas. O Tween 60 tem uma cadeia saturada ($\geq 90\%$ de ácido palmítico e esteárico) enquanto o Tween 80 possui uma cadeia insaturada ($\geq 58\%$ de ácido oleico). Esse fato pode ocasionar diferentes interações com os demais constituintes, explicando assim, as diferenças no comportamento desses emulsionantes.

Figura 9 – Estruturas químicas dos Tweens 60 e 80.



Adaptado SUGIMOTO et al., 2015.

Abrol e colaboradores (2005) também descreveram que a associação do polissorbato 80 com a lecitina de soja levou a melhor estabilização das gotículas em uma NE O/A. É sabido também que a associação com polioxietileno-sorbitanos gera a formação de uma barreira estérica na interface o que dificulta a agregação das gotículas, aumentando a estabilidade do sistema (BRUXEL et al., 2012; KHACHANE et al., 2015).

Com base nesse conjunto de dados, optou-se por continuar os estudos utilizando a mistura de Tween 80 e lecitina de soja como agentes emulsionantes das preparações e o núcleo oleoso constituído por TCM e pela mistura TCM:Tributirina 1:1.

Em seguida, NE brancas foram desenvolvidas aumentando-se a porcentagem de fase oleosa do sistema de 1,5% para 5% e 10%. Nessas condições, aumentou-se a proporção da mistura de tensoativos mantendo o EHL do

sistema próximo de 13,0. Os dados de diâmetro médio, IP e potencial zeta obtidos estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Caracterização físico-química das NE- AANC brancas quanto aos parâmetros de diâmetro médio, índice de polidispersão (IP), potencial zeta.

Parâmetros	Fase Oleosa (5% p/v)		Fase Oleosa (10% p/v)	
	TCM	TCM:Tributirina	TCM	TCM:Tributirina
Diâmetro médio \pm DP (nm)	93 \pm 4	86 \pm 2	138 \pm 4 ^a	115 \pm 3 ^a
IP \pm DP	0,25 \pm 0,03	0,40 \pm 0,05	0,21 \pm 0,01	0,29 \pm 0,04
Potencial zeta \pm DP (mV)	- 38 \pm 3	- 24 \pm 5	- 31 \pm 7	- 22 \pm 3

^arepresenta diferença significativa em relação à fase oleosa (5% p/v). Dados expressos como média \pm desvio padrão (DP) da média (n=3). O nível de significância foi considerado para valores de $p \leq 0,05$ (teste de Tukey).

Pode-se observar que o aumento da concentração de fase oleosa, ocasionou um aumento significativo do diâmetro médio das gotículas. Kelmann e colaboradores (2007) também relataram que o aumento da concentração de óleos promove um aumento do diâmetro médio das gotículas. Valores de potencial zeta mais negativos foram obtidos para as formulações contendo apenas TCM na fase oleosa. Esse fato pode ser atribuído à presença de ácidos graxos livres do TCM, os quais estariam em maior proporção quando o núcleo é composto apenas por TCM.

5.5 Associação da AANC nas NE

Uma vez estabelecida a composição adequada para o preparo de NE brancas com propriedades físico-químicas aceitáveis para administração parenteral, a etapa posterior do estudo consistiu na avaliação da influência da associação da AANC no sistema. Foram preparadas NE contendo TCM e TCM:Tributirina 1:1 com diferentes concentrações teóricas de AANC (0,2 e 0,4% p/v). Novamente foram avaliadas as características físico-químicas e a concentração de AANC

associada ao sistema. Os resultados para as NE com núcleo oleoso composto por TCM estão demonstrados na Tabela 12.

Tabela 12 – Caracterização físico-química das NE TCM quanto aos parâmetros de diâmetro médio, índice de polidispersão (IP), potencial zeta e concentração de AANC associado ao núcleo oleoso das NE.

Parâmetros	TCM5%		TCM10%
	0,2%	0,4%	0,4%
Diâmetro médio (nm)	105 ± 9	135 ± 9 ^a	175 ± 12 ^b
IP	0,25 ± 0,04	0,19 ± 0,03	0,20 ± 0,02
Potencial zeta (mV)	- 35 ± 3	- 20 ± 8	-25 ± 10
Concentração AANC (mg/mL)	1,7 ± 0,1	2,5 ± 0,5 ^a	2,8 ± 0,6

^arepresenta diferença significativa em relação à formulação contendo 0,2% p/v de AANC. ^brepresenta diferença significativa em relação à formulação contendo 0,4% p/v de AANC e TCM 5%. Dados expressos como média ± desvio padrão (DP) da média (n=3). O nível de significância foi considerado para valores de $p \leq 0,05$ (teste de Tukey).

A presença de AANC ocasionou um aumento progressivo no diâmetro médio das gotículas comparado às NE brancas (93 ± 4 nm, Tabela 9) variando de 105 ± 9 nm a 135 ± 9 nm, para as formulações contendo 0,2% e 0,4% p/v de AANC, respectivamente. Esse aumento pode ser relacionado ao maior aporte de AANC presente nas gotículas. Os valores de IP encontrados não mostraram diferença significativa para nenhuma das NE TCM estudadas. Todas as formulações apresentaram valores de IP menores que 0,3, o que indica boa homogeneidade do sistema, sendo assim compatível para administração endovenosa (YOON et al., 2013).

Como previamente relatado, a avaliação do diâmetro de gotícula e da sua distribuição é uma análise fundamental nas formulações nanoemulsionadas de uso parenteral. Sabe-se que os limites de diâmetro são relacionados à segurança de uso da formulação, prevenindo a ocorrência de embolia pulmonar e oclusão da microvasculatura bem como à estabilidade do sistema. Segundo a Farmacopeia Americana (USP 39) o valor máximo do diâmetro médio das gotículas é 500 nm para emulsões lipídicas com administração injetável (USP, 2016). Além disso, NE contendo glóbulos de diâmetro inferior a 500nm tendem a ser mais estáveis fisicamente (KELMANN et al., 2007). As NE ideais também

não devem apresentar diâmetro inferior a 10 nm, pois seriam rapidamente filtradas pelos rins (TORCHILIN, 2009). Portanto, as NE analisadas apresentaram valores de diâmetro de gotícula dentro das faixas recomendadas para a administração parenteral.

Já os valores de potencial zeta foram negativos em todas as formulações analisadas. Esse resultado pode ser atribuído à presença de ácidos graxos livres do TCM e de lecitina na interface das NE (BRUXEL et al., 2012). Os valores também se mantiveram próximos de -30 mV, o que contribui para a estabilidade das formulações, pois o mecanismo de repulsão eletrostática, limita a agregação e coalescência das gotículas, especialmente, durante o período de armazenamento das NE (KHACHANE et al., 2015). Além disso, alguns estudos têm proposto que a presença de tensoativo não-iônico contribui para a obtenção de nanocarreadores com potencial zeta negativo em decorrência de uma polarização desses agentes tensoativos seguida de uma adsorção de molécula de água também polarizada à superfície da nanoestrutura (HAN et. al, 2008; ZHAO et al., 2014).

Com relação à concentração de AANC associada ao núcleo oleoso, as NE TCM 5% preparadas com 0,4% p/v ($2,5 \pm 0,5$ mg/mL) de AANC tiveram um aumento de cerca de 50% na associação dessa substância quando comparadas àquelas preparadas com apenas 0,2% p/v ($1,7 \pm 0,1$ mg/mL). Almejando carrear uma maior quantidade dessa substância bioativa para aplicação em estudos futuros de atividade antitumoral em modelo experimental *in vivo*, propôs-se aumentar a concentração de fase oleosa para 10% mantendo a concentração de AANC 0,4% p/v. No entanto, conforme é possível observar na Tabela 12, o aumento da concentração de óleo não promoveu aumento significativo na incorporação de AANC ($2,8 \pm 0,6$ mg/mL). Além disso, um aumento significativo ($p < 0,05$) do diâmetro médio das gotículas foi observado com o aumento da quantidade de TCM. A variação do diâmetro obtida foi de aproximadamente 28% quando a concentração de fase oleosa foi aumentada duas vezes.

Esse mesmo racional foi aplicado para as formulações contendo TCM:Tributirina como fase oleosa. Os dados das preparações estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Caracterização físico-química das NE TCM:Tributirina quanto aos parâmetros de diâmetro médio, índice de polidispersão (IP), potencial zeta e concentração de AANC associado ao núcleo oleoso das NE.

Formulações Parâmetros	TCM:Tributirina 5%		TCM:Tributirina 10%
	0,2%	0,4%	0,4%
	Diâmetro médio (nm)	118 ± 5	145 ± 2 ^a
IP	0,25 ± 0,04	0,19 ± 0,02	0,20 ± 0,01
Potencial zeta (mV)	- 36 ± 4	- 42 ± 15	- 36 ± 8
Concentração AANC (mg/mL)	1,6 ± 0,2	2,0 ± 0,6	1,4 ± 0,1

^arepresenta diferença significativa em relação à formulação contendo 0,2% p/v de AANC.

^brepresenta diferença significativa em relação à formulação contendo 0,4% p/v de AANC e TCM:Tributirina 5%. Dados expressos como média ± desvio padrão (DP) da média (n=3). O nível de significância foi considerado para valores de $p \leq 0,05$ (teste de Tukey).

De maneira similar ao descrito anteriormente, para as formulações contendo TCM:Tributirina 1:1 como constituinte de fase oleosa, a presença de AANC também ocasionou um aumento significativo no diâmetro médio das gotículas comparada às formulações brancas (tabela 9). O aumento da concentração de AANC para 0,4% p/v também resultou em um aumento significativo, aproximadamente 23%, no diâmetro médio das gotículas quando comparada à formulação contendo 0,2% p/v da substância. Pode-se observar também um aumento significativo do diâmetro médio das gotículas com o aumento da concentração de óleos. As formulações contendo 0,4% de AANC e apenas 5% de óleos apresentaram diâmetro de gotículas de 145 ± 2 nm, enquanto as NE contendo o dobro da concentração de óleos tiveram num diâmetro de 157 ± 2 nm. Os valores de IP encontrados para as NE TCM:Tributirina também refletem sistemas monodispersos. Portanto, as NE apresentaram diâmetro de gotícula dentro das faixas recomendadas para a administração parenteral.

No que diz respeito ao potencial zeta, os valores obtidos não sofreram alterações relevantes com a incorporação de AANC, bem como com o aumento

da concentração de óleos. Valores negativos foram obtidos e os mesmos se mantiveram próximos do ideal para garantir a estabilidade das formulações.

Com relação à associação da AANC ao núcleo oleoso, levando-se em consideração os dados de solubilidade previamente relatados, esperava-se maior aporte de AANC nessas preparações contendo AANC comparado àquelas contendo somente TCM. Surpreendentemente, os resultados obtidos foram similares às formulações contendo TCM. Mais estudos precisam ser conduzidos no intuito de entender melhor esses dados. Uma hipótese levantada está relacionada à possíveis mudanças na estrutura da tributirina e ou interação com constituintes da formulação durante o preparo da NE que possam ocasionar uma limitação na capacidade de solubilização da AANC.

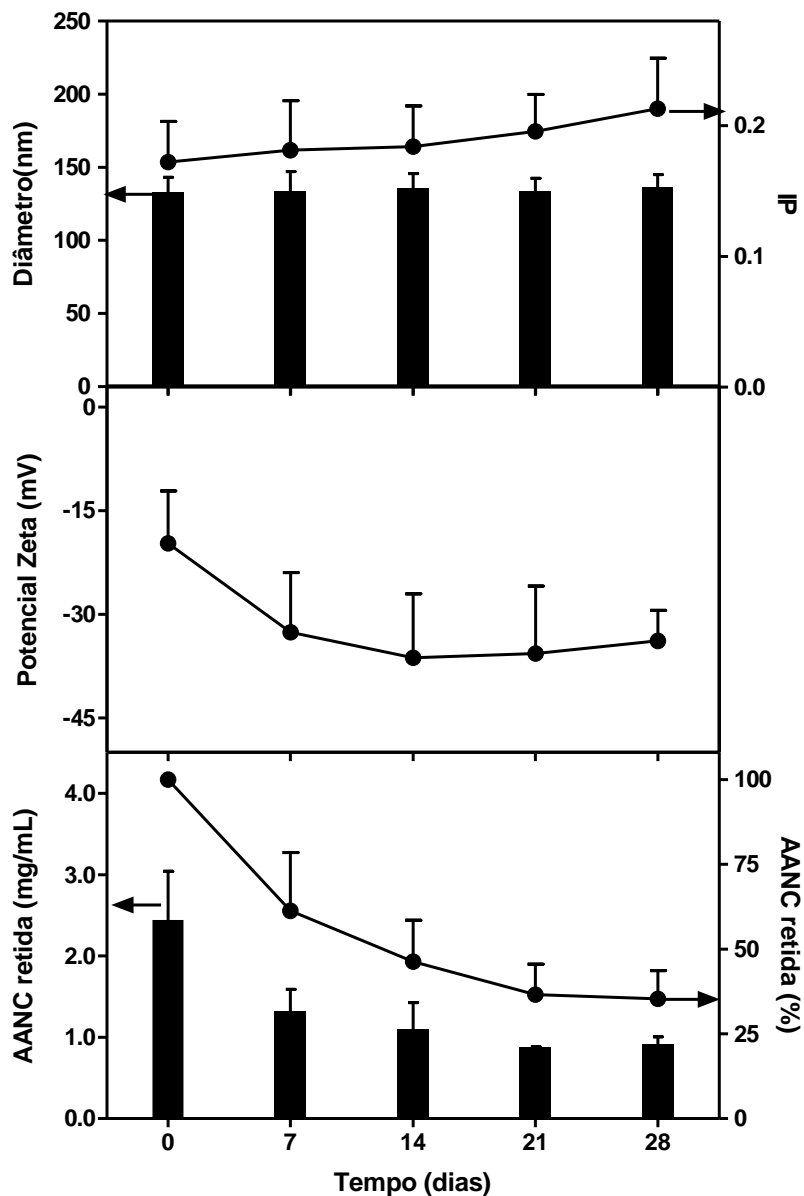
5.6 Estudo de estabilidade

Os estudos de estabilidade foram realizados apenas com as formulações contendo 0,4% p/V de AANC e fase oleosa composta por TCM. Essa escolha levou em consideração principalmente à maior capacidade de incorporação da AANC nessas formulações.

Após o preparo, as formulações foram acondicionadas em frasco de vidro âmbar e armazenadas em temperatura de 5 ± 3 °C, por 28 dias. Em tempos pré-determinados uma fração foi retirada e analisada quanto aos parâmetros físico-químicos e à quantidade de AANC retida no sistema. Os resultados para as NE TCM 5% estão apresentados na Figura 10.

Não foram observadas variações significativas no diâmetro médio das gotículas, sendo o valor inicial de 133 ± 8 nm e ao final do período avaliado de 136 ± 8 nm. IP próximo de 0,2 foi obtido ao longo dos 28 dias de avaliação, sugerindo homogeneidade das formulações de NE bem como ausência de aglomeração durante o tempo de estudo.

Figura 10 - Resultados do estudo de estabilidade realizado com NE TCM 5% carregados com 0,4% de AANC, armazenados a temperatura de $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, ao abrigo da luz, por 28 dias.



Dados expressos como média \pm desvio padrão (n=3).

Os valores de potencial zeta reduziram ao longo do estudo, sendo o valor inicial igual a $-20 \pm 7 \text{ mV}$ e ao final do estudo $-33 \pm 5 \text{ mV}$. Em relação a concentração da AANC associada ao sistema, observa-se uma contínua liberação do conteúdo encapsulado nos primeiros 14 dias do estudo, com $46 \pm 10\%$ de retenção. Após esse período, a concentração de AANC

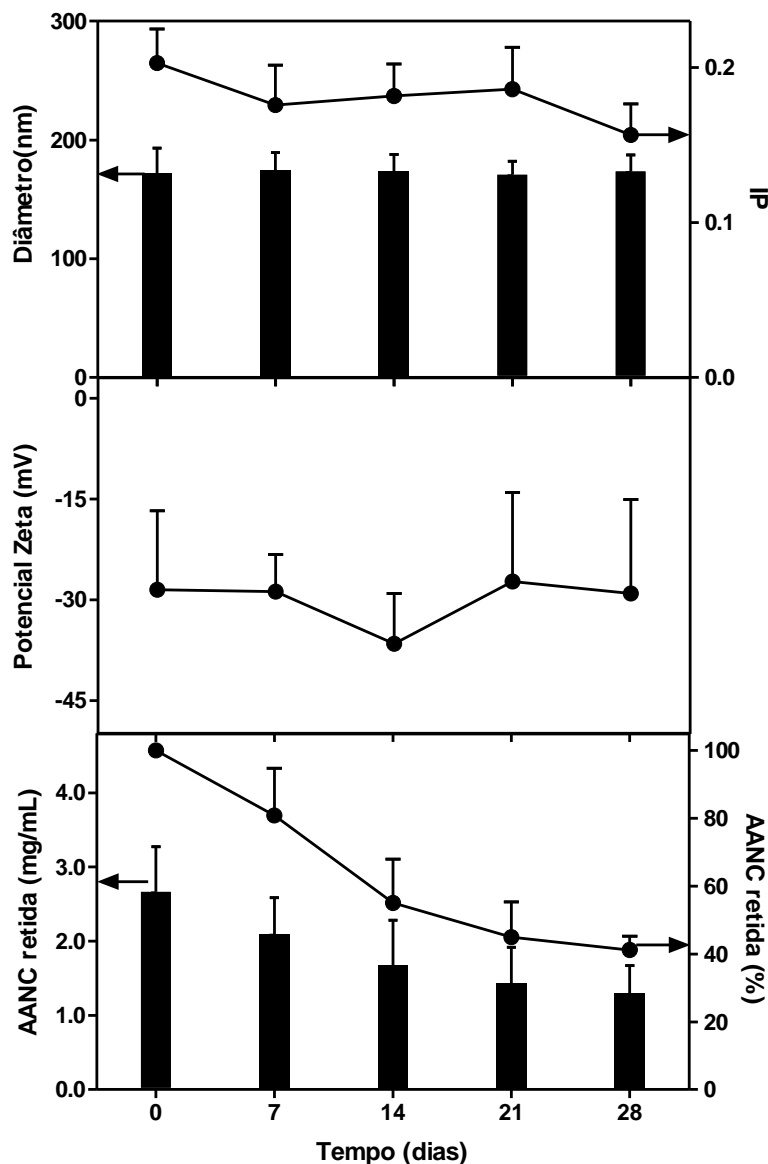
encapsulada e conseqüentemente as porcentagens de retenção mantiveram-se praticamente constantes e não apresentaram variação significativa.

Para as formulações contendo TCM 10% e AANC 0,04% p/v os resultados estão apresentados na Figura 11. Também não foram observadas variações expressivas no diâmetro médio das gotículas ou no IP. No dia inicial as NE apresentaram diâmetro médio das gotículas de 170 ± 11 nm, sendo que mantiveram ao longo do tempo de armazenamento diâmetros sem variações significativas, chegando ao final dos 28 dias com 169 ± 9 nm. Os resultados de IP igualmente não sofreram alterações significativas ao longo do tempo de estudo, bem como não atingiram valores superiores 0,3. Esses dados sugerem que essas preparações foram estáveis com relação a aglomeração, durante o tempo estudado.

Os resultados de potencial zeta também não apresentaram variações significativas ao longo do período avaliado (inicial -30 ± 5 mV e o final -32 ± 6 mV) o que reforça a estabilidade em relação a aglomeração dessas formulações, durante seu período de estocagem.

No entanto, de maneira semelhante ao observado para as formulações contendo 5% de óleo, há um decréscimo significativo na concentração de AANC associada ao sistema, sugerindo que o conteúdo é liberado ao longo do tempo. A concentração inicial ($2,5 \pm 0,3$ mg/mL), diminuiu gradativamente até que no vigésimo oitavo dia ($1,4 \pm 0,3$ mg/mL). A porcentagem de retenção de retenção final foi de $42 \pm 4\%$ valor semelhante ao encontrado para porcentagem de retenção final nas NE TCM 5% ($35 \pm 7\%$). Embora as concentrações de AANC inicialmente encapsuladas nas formulações TCM 5% e TCM 10% fossem semelhantes, a proposta de se avaliar a estabilidade da formulação contendo TCM 10% foi baseada na possibilidade de melhor interação com o núcleo oleoso e maior retenção da AANC. No entanto, isso não foi observado.

Figura 11 - Resultados do estudo de estabilidade realizado com NE TCM 10% carregados com 0,4% de AANC, armazenados a temperatura de 5 ± 3 °C, ao abrigo da luz, por 28 dias.



Dados expressos como média \pm desvio padrão (n=3).

Dessa forma, os dados apresentados no estudo de estabilidade realizado nesse trabalho indicam que as formulações NE TCM 5% e TCM 10%, carregadas com 0,4% de AANC, quando armazenadas a temperatura de 5 ± 3 °C, são consideradas estáveis com relação ao risco de aglomeração das gotículas, permanecendo assim seguras para a administração intravenosa por, no mínimo, 28 dias. Contudo ao longo do armazenamento o conteúdo de AANC das NE diminui durante a estocagem, especialmente nas NE TCM 10%.

Considerando que não ocorreu diferença significativa na retenção de AANC nas NE TCM 5% quando comparadas as NE TCM10% e devido ao menor consumo de óleo, optou-se por prosseguir os estudos *in vitro* e *in vivo* com as formulações TCM 5%.

5.7 Avaliação da atividade citotóxica

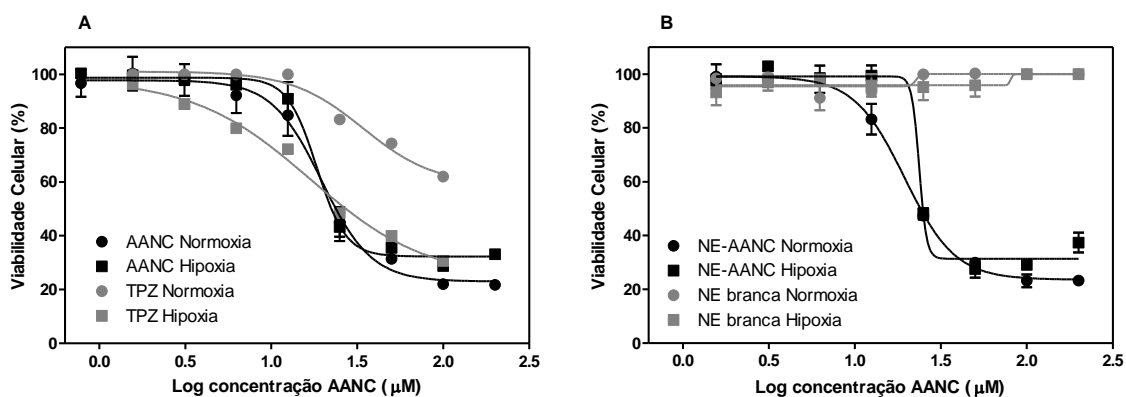
No que diz respeito ao estudo *in vitro*, foi realizado o ensaio MTT para comparar a citotoxicidade da AANC livre e da NE-AANC (TCM 5% AANC 0,4%) contra células tumorais MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano). Foi avaliada também a influência da concentração de oxigênio na citotoxicidade da AANC e da NE-AANC.

Sabe-se que *in vivo* os compostos nitroaromáticos apresentam maior atividade citotóxica em regiões de hipóxia devido a presença de enzimas redutases (GUISE et al., 2014). Essas enzimas, como já foi dito anteriormente, são importantes para a atividade citotóxica da AANC, uma vez que, são capazes de reduzir o grupo nitro, formando intermediários altamente reativos com o DNA, levando assim a destruição da célula (LOPES, et al., 2015; MELLO et al., 2015).

Os resultados do ensaio MTT, apresentados na Figura 12, mostram que tanto a AANC livre quanto a NE- AANC são dose dependente, apresentando maior citotoxicidade em maiores concentrações. A análise dos dados da figura 12A também confirma que não existe variação relevante na redução da viabilidade celular entre células incubadas com AANC livre, seja em condições de normóxia ou em condições de hipóxia. Além disso, a atividade citotóxica da AANC permaneceu a mesma após sua associação em uma NE (Figura 12B). A associação da AANC na NE não interfere na citotoxicidade da substância independente das condições do meio. Vale mencionar também que as células tratadas com o controle negativo (NE branca), em quaisquer concentrações, permaneceram com viabilidade celular aproximadamente 100%, demonstrando

baixa citotoxicidade dos constituintes da formulação. No entanto, observa-se claramente variações no perfil das curvas obtidas para o controle positivo (tirapazamina) nas condições de normoxia e hipóxia (Figura 12A).

Figura 12 - Curvas concentração de AANC-livre versus viabilidade celular e controle positivo com tirapazamina. (B) Curvas concentração de NE-AANC versus viabilidade celular e controle negativo com NE-branco.

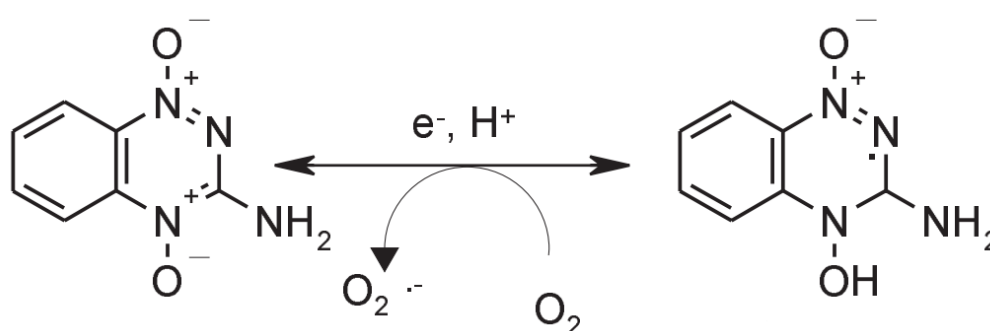


Os valores de CI_{50} encontrados para a AANC livre e NE-AANC foram semelhantes (Tabela 14). Do mesmo modo, os resultados de CI_{50} obtidos para ambas também foram análogos tanto em condições normais de oxigênio (normoxia), quanto em ambiente com restrição de oxigênio (hipóxia). No entanto, a CI_{50} da tirapazamina em condições de normoxia foi $>100 \mu\text{M}$ e em hipóxia a CI_{50} foi de $27,6 \mu\text{M}$. A tirapazamina (Figura 13) é seletivamente tóxica para células hipóxicas e é um excelente substrato para várias redutases intracelulares, as quais a reduzem, mediante adição de um elétron, o que resulta na formação de um intermediário radicalar altamente reativo (radical TPZ). Em condições de hipóxia, o radical TPZ sofre reações de fragmentação levando à formação de radical hidroxila e radical benzotriazinila que causam quebra da dupla fita do DNA e inibição da topoisomerase II (WILLIAM E WILLIAM, 2000).

Em condições de hipóxia, o radical TPZ sofre reações de fragmentação levando à formação de radical hidroxila e radical benzotriazinila que causam quebra da dupla fita do DNA e inibição da topoisomerase II (WILLIAM E

WILLIAM, 2000). Esses dados confirmam, portanto, que o meio em hipóxia realmente atende as condições de restrição de oxigênio, bem como apresenta enzimas redutoras que utilizam como substrato a tirapazamina. No entanto, é sabido que para que o processo redutivo ocorra seletivamente em regiões de baixa concentração de oxigênio, os compostos nitroaromáticos devem apresentar um potencial de redução monoelétrônica na faixa de -500 a -200 mV (OLIVEIRA, 2002). O potencial de redução da AANC previamente determinado foi igual a -727 mV, encontrando-se fora da faixa considerada ideal para biorredução seletiva em condições de hipóxia. Esse fato pode justificar, portanto, a semelhança entre os valores de CI_{50} obtidos para a AANC em condições de hipóxia e normóxia. Além disso, pode-se inferir que a atividade citotóxica da AANC independe da redução do grupo nitro.

Figura 13 - Reação da tirapazamina em região de hipóxia.



Adaptado de DENNY e WILSON, 2000.

Tabela 14 - Determinação da CI_{50} em linhagens de células MDA-MB-231 em condições de hipóxia e normoxia.

Tratamentos	Normoxia		Hipóxia	
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
AANC livre (μM)	18,1 – 24,1	15,2 – 21,8	16,0 – 29,4	14,4 – 17,7
NE – AANC (μM)	17,7 – 21,2	18,2 – 21,4	16,8 – 26,2	16,0 – 29,5
Tirapazamina (μM)	> 100	-	8,3 – 34,4	-

Células MDA-MB-231 foram incubadas durante 72 horas com os tratamentos em condições de hipóxia e normoxia. A viabilidade celular foi quantificada usando MTT e a CI_{50} calculada usando GraphPrism software. Os dados foram obtidos de dois experimentos diferentes.

5.8 Pureza radioquímica e estudos de estabilidade de marcação para ^{99m}Tc -AANC-coligantes e ^{99m}Tc -NE-AANC

No intuito de avaliar o perfil de biodistribuição da AANC livre e NE-AANC foi necessário realizar previamente a marcação de ambas com um radiotraçador. É preconizado na literatura o mínimo de 90% de rendimento de marcação de um produto para estudos de biodistribuição (USP, 2012). Valores de impurezas superiores a 10% prejudicam a obtenção de imagens cintilográficas de qualidade e, portanto, podem inviabilizar experimentos *in vivo* (de BARROS, 2012).

Inicialmente, avaliou-se a eficiência de marcação da AANC por método direto sem a adição de coligantes, no entanto, obteve-se apenas $18,0 \pm 0,2\%$ de marcação. A adição de coligantes (tricina e EDDA) promoveu uma marcação adequada e pureza radioquímica superior a 95%, e foi, portanto, considerada satisfatória.

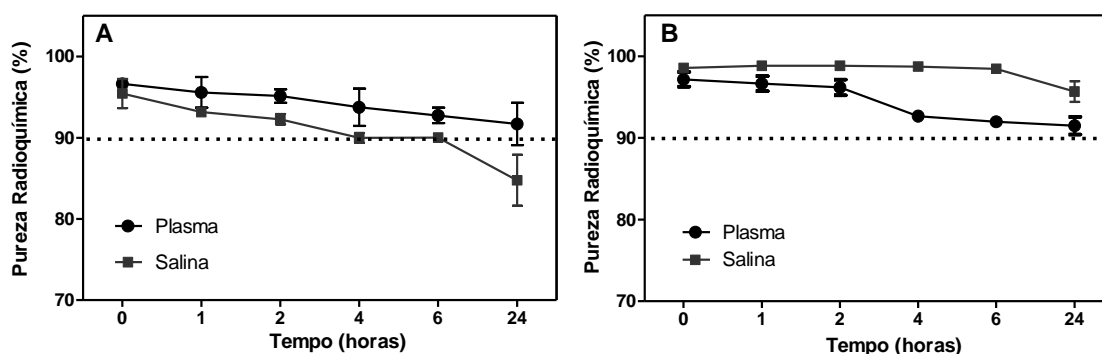
Com relação à formulação NE-AANC, elevada eficiência de marcação superior a 97% foi obtida. A presença de grupos -OH no Tween 80®, um constituinte da formulação, pode explicar a alta eficiência de radiomarkação dessa preparação. Está bem descrito que os metais, incluindo ^{99m}Tc , são mais facilmente estabilizados por grupos doadores de elétrons (MONTEIRO et al., 2017; FERNANDES et al., 2016).

Além de se conseguir uma eficiente radiomarkação, é importante para os agentes de radiodiagnóstico que a ligação do radioisótopo permaneça estável durante um período longo. Tendo em vista à aplicação clínica, esse tempo deve ser suficiente para permitir a injeção do radiofármaco e realizar a aquisição das imagens cintilográficas. Além disso, esse deve ser adequado para se obter um perfil de biodistribuição confiável e reprodutível permitindo prever o destino do radiotraçador. Nesse sentido, avaliar a estabilidade dos complexos radiomarcados é, também, de extrema importância para a sua utilização nos estudos *in vivo*, uma vez que radiofármacos instáveis resultam em uma biodistribuição prejudicada. Caso a ligação do radioisótopo com o

agente de interesse não seja estável ao longo do tempo, podem ocorrer equívocos na interpretação dos resultados, visto que, o destino do ^{99m}Tc não transmite a mesma distribuição do complexo radiomarcado e o alvo de acompanhamento passa a ser o ^{99m}Tc livre (de BARROS, 2012; FERNANDES et al., 2016).

Nesse estudo, a pureza radioquímica foi verificada pela quantificação de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, uma vez que o $^{99m}\text{TcO}_2$ foi removido por filtração em $0,22\ \mu\text{m}$. Os dados na Figura 14A mostram a estabilidade de marcação do complexo ^{99m}Tc -AANC-coligantes. Pode-se observar que durante as 24 horas em que a radiomarcagem foi avaliada, uma elevada pureza radioquímica (superior a 90%) foi obtida em plasma de camundongo. Em salina também observou-se uma elevada pureza até 6 horas, no entanto, uma redução na pureza em 24 horas foi verificada. Para o complexo ^{99m}Tc -NE-AANC pureza radioquímica superior a 90% foi obtida em todos os tempos em ambos os meios avaliados (Figura 14B). Para ambos os complexos, os resultados de pureza radioquímica foram altamente reprodutíveis durante todo o período experimental, mostrando-se satisfatórios para os estudos subsequentes. Com base nesses resultados, os estudos de *clearance*, biodistribuição e a obtenção de imagens cintilográficas foram conduzidos no tempo máximo de 4 horas.

Figura 14 – Dados de estabilidade de marcação *in vitro* dos complexos ^{99m}Tc -AANC-coligantes (A) e ^{99m}Tc -NE-AANC (B) obtidos em salina à temperatura ambiente e plasma de camundongo à 37 °C.



Dados expressos como média.

No intuito de verificar se a radiomarcção interferiria nas propriedades físico-químicas da NE-AANC, o complexo ^{99m}Tc -NE-AANC foi caracterizado quanto ao diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação e os valores estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Diâmetro médio, IP, potencial zeta e concentração de AANC do complexo ^{99m}Tc -NE-AANC.

Diâmetro médio (nm)	153 ± 8
IP	0,20 ± 0,05
Potencial zeta (mV)	-11 ± 3
Concentração AANC (mg/mL)	2,6 ± 0,5

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

Observou-se um aumento no diâmetro da formulação em comparação com as NE-AANC não marcadas com ^{99m}Tc (135 ± 9 nm). Isso ocorre, provavelmente, devido à complexação de átomos de ^{99m}Tc ao sistema. Essa complexação também pode ser responsável pela diminuição do potencial zeta em comparação com as NE não marcadas, uma vez que, os átomos de ^{99m}Tc têm caráter positivo (FERNANDES et al., 2017). A concentração encapsulada de AANC não foi afetada indicando que a marcação não interfere na quantidade de AANC presente no sistema. Esses dados sugerem que o processo de radiomarcção não interfere na integridade da NE, e, muito provavelmente, ocorre na interface da NE, por meio de interações do radioisótopo com o Tween®, como descrito previamente.

5.9 Depuração plasmática em animais sadios

As curvas de depuração sanguínea, para ambos complexos radiomarcados, estão representadas na Figura 15 e os parâmetros farmacocinéticos estão exibidos na Tabela 16.

Tanto para ^{99m}Tc -AANC-coligantes quanto para ^{99m}Tc -NE-AANC, observou-se um decaimento bifásico, com tempos de circulação curtos. Os tempos de meia

vida rápido ($T_{1/2 \alpha}$) e o lento ($T_{1/2 \beta}$) foram semelhantes para $^{99m}\text{Tc-NE-AANC}$ e $^{99m}\text{Tc-AANC-coligantes}$, embora observa-se uma tendência a um aumento no $T_{1/2 \beta}$ para $^{99m}\text{Tc-NE-AANC}$. ASC da formulação também é semelhante à encontrada para a substância livre, ou seja, o tempo para a eliminação da formulação é aproximado ao tempo necessário para eliminação do AANC livre.

Figura 15 - Curva de depuração sanguínea obtida para os complexos $^{99m}\text{Tc-AANC-coligantes}$ e $^{99m}\text{Tc-NE-AANC}$ em animais Swiss sadios (n=8).

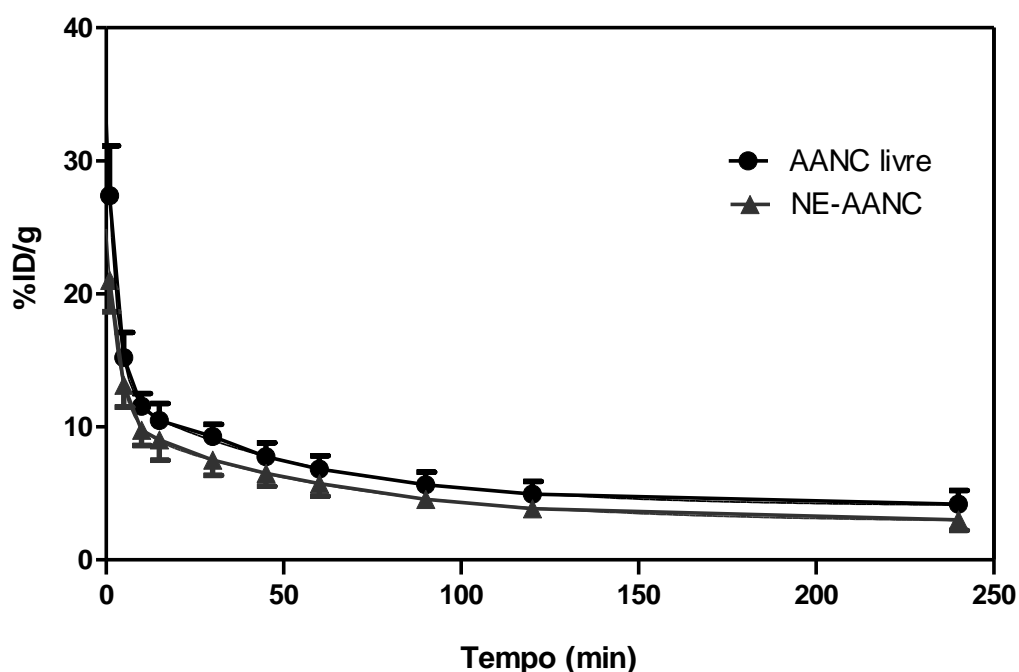


Tabela 16 - Parâmetros farmacocinéticos para $^{99m}\text{Tc-AANC-coligantes}$ e $^{99m}\text{Tc-NE-AANC}$.

	$^{99m}\text{Tc-AANC-coligantes}$	$^{99m}\text{Tc-NE}$
$T_{1/2 \alpha}$ (min)	1,9	2,3
$T_{1/2 \beta}$ (min)	38,3	43,3
ASC ($\%ID \cdot \text{min}^{-1}$)	1485	1185

É descrito na literatura que nanoformulações tendem a ser rapidamente removidas do organismo pelo SFM. Uma vez na corrente sanguínea, NE de superfície não modificadas, como a do presente estudo, são rapidamente opsonizadas e fagocitadas pelo SFM (DANHIER, 2012). No entanto, o diâmetro reduzido da $^{99m}\text{Tc-NE-AANC}$, combinado com a presença de um tensoativo

hidrofílico (Tween 80) podem justificar o tempo de circulação análogo ao da substância livre. O Tween 80 apresenta cadeias de polietilenoglicol (PEG), as quais apresentam potencial para promover propriedades furtivas para as nanoestruturas. A modificação da superfície por adição de PEG é uma estratégia bastante estudada para prolongar o tempo de meia vida de nanocarreadores (BELOQUI et al., 2013).

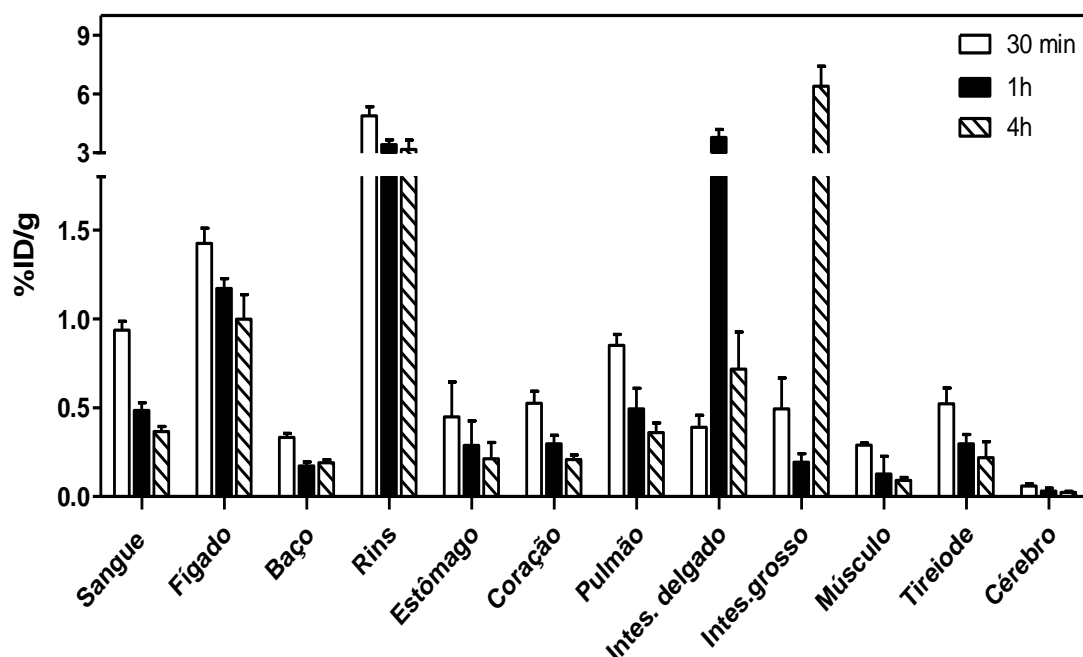
5.10 Estudo de biodistribuição para complexo ^{99m}Tc -AANC-coligantes em animais sadios

WEI e colaboradores (2012) comprovaram que a presença do átomo de ^{99m}Tc e de coligantes não altera a farmacocinética da substância de interesse. Nesse sentido, inicialmente nós avaliamos o perfil de biodistribuição do átomo de ^{99m}Tc ligado apenas aos coligantes, sendo obtidos resultados diferentes dos apresentados para o complexo ^{99m}Tc -AANC-coligantes. Garantindo assim, que os resultados obtidos nesse trabalho, correspondem a biodistribuição do AANC (dados não mostrados).

O perfil de biodistribuição nos tempos 30 min, 1 e 4 horas após a administração do complexo ^{99m}Tc -AANC-coligantes em camundongos Swiss sadios está representado na Figura 16.

É possível observar uma maior captação de radiação nos rins, fígado e intestinos, sugerindo que as possíveis via de excreção da AANC é tanto renal quanto hepato-biliar. No intestino delgado, observa-se um aumento da captação no tempo de 1h em relação ao tempo de 30 minutos. No entanto, em 4h há uma redução no intestino delgado e um aumento significativo do acúmulo do complexo ^{99m}Tc -AANC-coligantes no intestino grosso, ratificando a excreção pelos intestinos. Quanto aos demais órgãos avaliados, todos apresentaram redução significativa entre os tempos de 30 min e 4 horas, o que demonstra a depuração da AANC da circulação sanguínea.

Figura 16 – Perfil de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -AANC-coligantes em animais sadios 30 min, 1 e 4h após a administração.



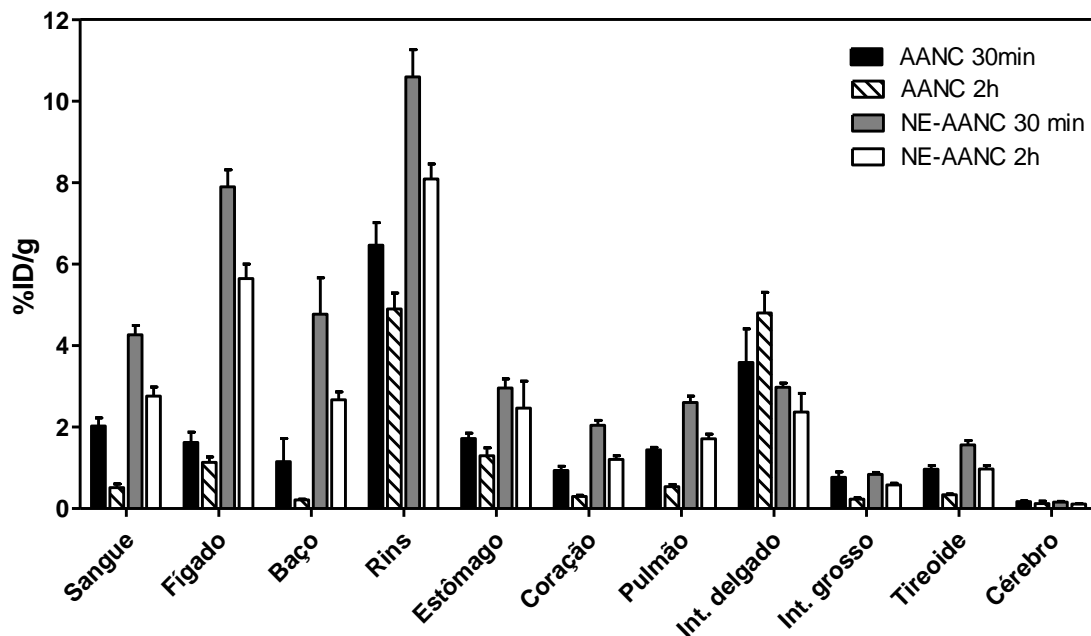
Todos os dados foram expressos como média da dose injetada por grama de tecido \pm desvio padrão (n = 7).

Pode-se também observar uma baixa captação no estômago e na tireoide, em todos os tempos estudados. Esse é um dado relevante, pois sugere que o teor de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ está dentro dos limites preconizados, uma vez que, a captação dessa impureza radioquímica ocorre, preferencialmente, por estômago e tireoide (FERNANDES et al., 2017; THRALL & ZIESSMAN, 2003).

5.11 Estudo de biodistribuição das preparações ^{99m}Tc -AANC-coligantes e ^{99m}Tc -NE-AANC em animais acometidos por tumor sólido de Ehrlich

Tendo em vista que no tempo de 4 horas, apresentado no tópico anterior, o AANC estava em grande quantidade no intestino grosso, optou-se por conduzir os estudos em animais acometidos com o tumor em tempos mais curtos (30 minutos e 2 horas). Na Figura 17 está representado o perfil de biodistribuição, em animais acometidos com tumor sólido de Ehrlich, para ^{99m}Tc -AANC-coligantes e ^{99m}Tc -NE-AANC.

Figura 17 - Perfil de biodistribuição do ^{99m}Tc -AANC-coligantes e do ^{99m}Tc -NE-AANC, após tempos determinados da administração intravenosa, em animais Swiss acometidos pelo tumor sólido de Ehrlich (n = 7).



Todos os dados foram expressos como média da dose injetada por grama de tecido \pm desvio padrão.

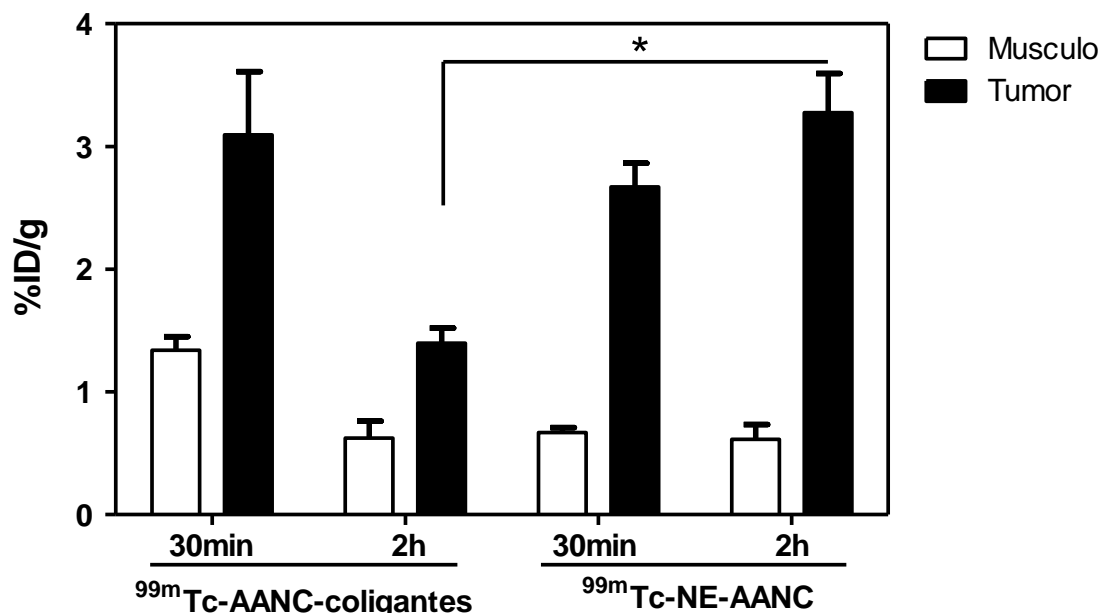
Os resultados obtidos para ^{99m}Tc -AANC-coligantes não mostraram diferenças significativas no perfil de excreção, quando comparados com aqueles obtidos em animais saudáveis. Observa-se alta captação nos rins e no intestino delgado. O mesmo padrão também é encontrado para a biodistribuição do ^{99m}Tc -NE-AANC, ou seja, a excreção da NE-AANC provavelmente se dá igualmente pelas vias renal e hepato-biliar, uma vez que existe uma alta captação nos rins, fígado e intestino delgado nos tempos de 30 minutos e 2 horas.

Os resultados de biodistribuição também revelam que a preparação ^{99m}Tc -NE-AANC apresenta maior captação em órgãos do SFM, como fígado e baço, quando comparado com os dados obtidos nos estudos com o complexo ^{99m}Tc -AANC-coligantes. Esse dado está em consonância com a literatura, tendo em vista que é amplamente descrito que nanosistemas são rapidamente opsonizados e retirados da circulação por macrófagos do SFM (HALEY et al., 2008; NUNES, 2016).

Adicionalmente, observa-se que a detecção da radiação no sangue do ^{99m}Tc -NE-AANC foi maior em ambos os tempos analisados (30 min e 2 horas) quando comparado a captação do ^{99m}Tc -AANC-coligantes, sugerindo que essa nanoformulação apresenta um maior tempo de circulação. No entanto, embora estudos de depuração sanguínea não tenham demonstrado claramente aumento do tempo de meia vida, há um pequeno aumento para a NE-AANC, o que pode corroborar os dados obtidos nesse estudo de biodistribuição.

Os dados de captação no tumor e músculo contralateral estão apresentados na Figura 18. Observa-se que ocorreu maior captação no tumor, quando comparado com o músculo contralateral, em todos os tempos observados, para as duas preparações estudadas. Além disso, uma captação no tumor significativamente superior no grupo ^{99m}Tc -NE-AANC no tempo de 2h comparada ao ^{99m}Tc -AANC-coligantes foi observada.

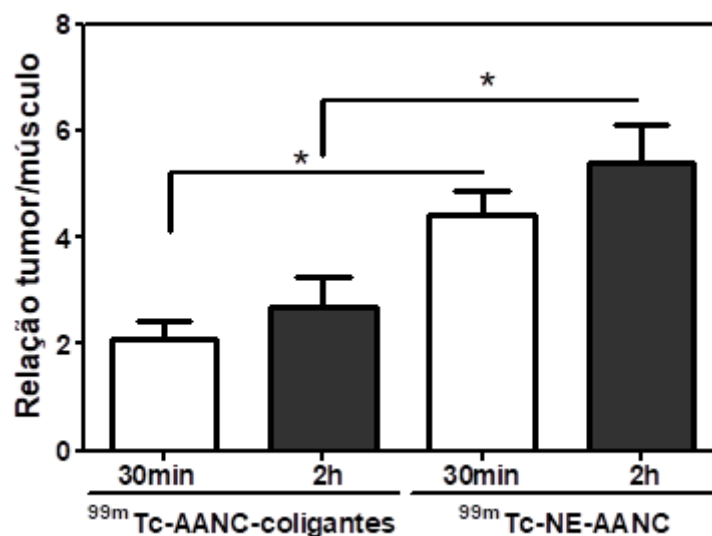
Figura 18 – Porcentagem de captação no tumor e no músculo obtida após administração intravenosa ^{99m}Tc -AANC-coligantes e do ^{99m}Tc -NE-AANC em animais Swiss acometidos pelo tumor sólido de Ehrlich (n = 7).



* representa diferença significativa entre ^{99m}Tc -AANC-coligantes e do ^{99m}Tc -NE-AANC ($p < 0,05$, teste Tukey). Todos os dados foram expressos como média da dose injetada por grama de tecido \pm desvio padrão.

A partir desses dados foi possível estabelecer uma relação tumor/músculo, cujos dados estão representados na Figura 19. Essa relação tumor/músculo sugere maior afinidade tanto da AANC livre quanto da NE-AANC pelo tecido tumoral comparada ao músculo contralateral. No entanto, é possível observar que para os dois tempos avaliados (30 min e 2 h) há uma captação no tumor significativamente maior (cerca de 2 vezes) no grupo $^{99m}\text{Tc-NE-AANC}$ comparado ao $^{99m}\text{Tc-AANC-coligantes}$. Esse fato pode ser explicado pelo tamanho das nanoestruturas, as quais, possivelmente, devido ao efeito EPR, atravessam às fenestrações dos vasos sanguíneos presentes na região tumoral e em função do colapso dos vasos linfáticos e uma ineficiência desse sistema não são facilmente eliminadas e ficam retidas nessa região (FERREIRA et al., 2017; MUNN et al., 2003).

Figura 19 – Relação tumor/músculo para os complexos radiomarcados obtida 30 min e 2 horas após a administração. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (n=7).



* representa diferença significativa entre $^{99m}\text{Tc-AANC-coligantes}$ e do $^{99m}\text{Tc-NE-AANC}$ ($p < 0,05$, este Tukey).

5.12 Imagens cintilográficas das preparações ^{99m}Tc -AANC-coligantes e ^{99m}Tc -NE-AANC em animais acometidos por tumor sólido de Ehrlich

Os estudos de biodistribuição são uma importante ferramenta para analisar novas substâncias e formulações. No entanto, para uma futura translação para estudos clínicos faz-se necessário o uso de técnicas menos invasivas que viabilizem o estudo em humanos.

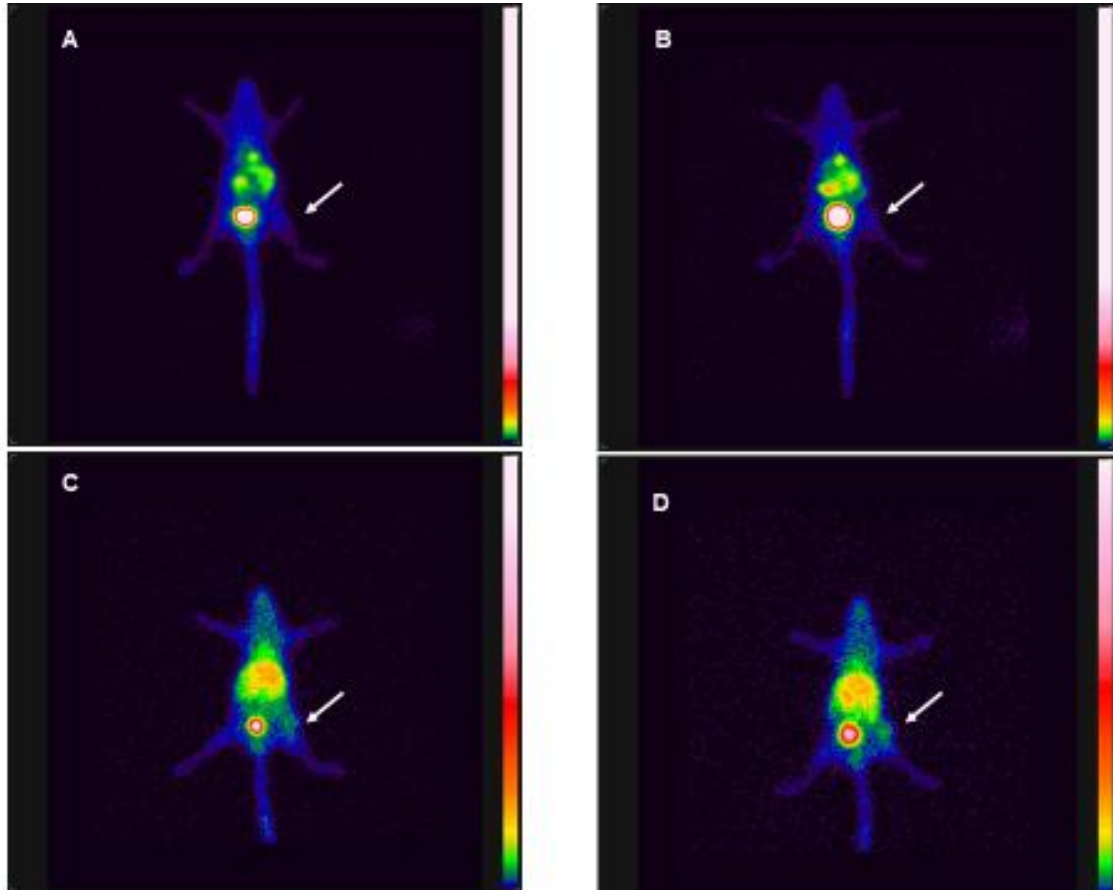
Neste contexto, a obtenção de imagens cintilográficas é uma alternativa para obter dados quantitativos, reprodutíveis e por um método praticamente não invasivo (FERREIRA et al., 2017). Por meio da análise das imagens cintilográficas também é possível avaliar o perfil de biodistribuição bem como obter a relação alvo (tumor)/não alvo (músculo contralateral), assim como foi realizado para os estudos de biodistribuição.

As imagens cintilográficas obtidas para ^{99m}Tc -AANC-coligantes e ^{99m}Tc -NE-AANC estão apresentadas na Figura 20.

As imagens cintilográficas confirmam o perfil observado nos estudos de biodistribuição, demonstrando ausência de captação significativa na região da tireóide e aumento de captação na região do fígado e baço especificamente para a ^{99m}Tc -NE-AANC. Como esperado, nas imagens também foi possível observar um acúmulo preferencial no tumor comparado ao músculo contralateral para ambas as preparações em todos os tempos estudos. Observa-se nitidamente maior captação para o grupo ^{99m}Tc -NE-AANC 2 horas após administração (Figura 20D) na região do tumor implantado na coxa direita do animal e indicada pela seta, corroborando com a maior captação pelo tecido tumoral em relação ao músculo contralateral obtida nos estudos de biodistribuição.

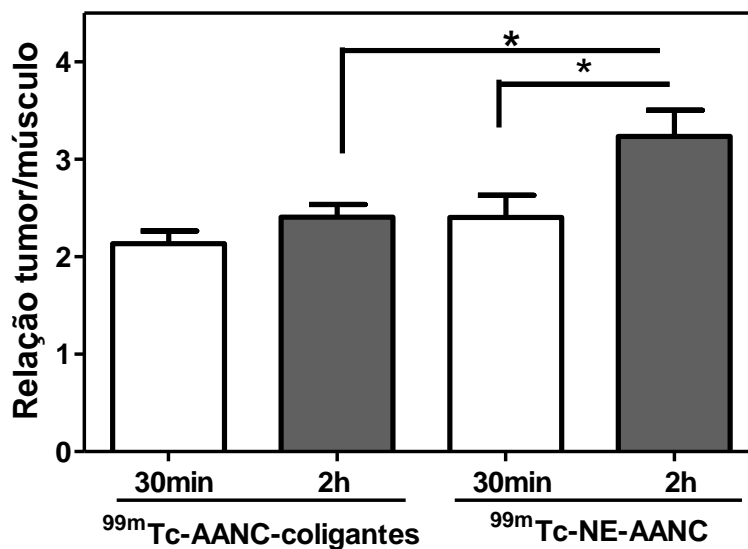
A análise quantitativa das imagens possibilitou a obtenção da relação tumor/músculo (Figura 21) e os valores obtidos confirmam uma maior captação no tecido tumoral em relação ao controle (músculo contralateral).

Figura 20 - Imagens cintilográficas obtidas 30 min e 2 h após a administração das preparações radiomarcadas em camundongos com tumor de Ehrlich implantado na pata posterior direita (seta). (A) ^{99m}Tc -AANC-coligantes 30 minutos; (B) ^{99m}Tc -AANC-coligantes 2 horas; (C) ^{99m}Tc -NE-AANC 30 minutos; (D) ^{99m}Tc -NE-AANC 2 horas.



De forma semelhante ao encontrado no estudo de biodistribuição, não foi possível observar diferença significativa nas relações alvo/não alvo para o complexo ^{99m}Tc -AANC-coligantes em comparação com as relações obtidas para o ^{99m}Tc -NE-AANC para o tempo de 2h. Além disso, observa-se um aumento significativo dessa relação para o ^{99m}Tc -NE-AANC com o aumento do tempo de avaliação. Esse dado novamente corrobora a hipótese de que o acúmulo ocorre em função do efeito EPR.

Figura 21 - Relações alvo/não alvo, obtidas por meio da quantificação das imagens cintilográficas 30 minutos e 2 horas após a administração dos complexos radiomarcados. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (n=7).



* representa diferença significativa entre ^{99m}Tc -AANC-coligantes e do ^{99m}Tc -NE-AANC ($p < 0,05$, teste Tukey).

6 CONCLUSÕES

- ✓ NE-AANC com propriedades físico-químicas adequadas para a administração IV foram desenvolvidas e caracterizadas no presente estudo. Essa formulação não apresentou variação significativa no diâmetro médio da gotícula, PI e valores do potencial zeta durante 28 dias e, aproximadamente, 50% de retenção da AANC, em cerca de 15 dias.
- ✓ O estudo de citotoxicidade *in vitro* demonstrou que essa formulação não interfere na ação citotóxica da AANC e possivelmente essa substância não apresenta um potencial de redução favorável para garantir sua redução nas condições empregadas. Portanto, a atividade citotóxica da AANC independe da redução do grupo nitro.
- ✓ A partir da marcação radioquímica com ^{99m}Tc , foi possível avaliar a biodistribuição e parâmetros farmacocinéticos da AANC e da NE-AANC. O tempo de meia vida para AANC livre e para NE-AANC foi semelhante. Os dados de biodistribuição e as imagens cintilográficas mostraram uma acentuada captação no fígado, rins e intestino sugerindo que esses órgãos são potenciais vias de excreção da substância. No entanto, um maior acúmulo na região tumoral foi observado para a NE-AANC quando comparada a AANC, sugerindo maior capacidade de retenção da NE-AANC no sítio tumoral.
- ✓ Esse conjunto de dados demonstram que NE-AANC pode ser uma alternativa promissora para a investigação de atividade antitumoral, no entanto, estudos adicionais com o intuito de otimizar essa formulação de maneira a prolongar sua estabilidade favorecendo a retenção da AANC precisam ser conduzidos.

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Otimizar a formulação mediante alterações na composição quali-quantitativa objetivando aumentar a estabilidade da formulação.

- ✓ Avaliar a atividade antitumoral da AANC e NE-AANC no intuito de verificar se a maior captação no tecido tumoral favorecerá maior eficácia antitumoral.

- ✓ Avaliar o perfil de toxicidade aguda da AANC e NE-AANC.

REFERÊNCIAS

ABROL, S.; TREHAN, A.; KATARE, O.P. Comparative study of different silymarin formulations: formulation, characterisation and in vitro/in vivo evaluation. **Curr. Drug Deliv.** v.2(1), p.45-51, 2005.

AKBAR, M. U.; AHMAD, M.R.; SHAHEEN, A. MUSHTAQ, S. A review on evaluation of technetium-99m labeled radiopharmaceuticals. **J. Radioanal Nucl. Chem.** v.310, p. 477–493, 2016.

ALMEIDA MG, TEIXEIRA HF, KOESTER LS. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na Atualidade. **Lat. Am. J. Pharm.** v.27 (5), p. 780-788, 2008.

AMONI, F. A. **Avaliação da toxicidade aguda da 4-(clorometil)-3-nitro-N-(2-hidroxietil)benzamida (AANC)**. 2014. Monografia – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ANTON N., VANDAMME T.F. The universality of low-energy nano-emulsification. **Int. J. Pharm.** v. 77, p. 142-147, 2009.

APOLINÁRIO, L. S. **Desenvolvimento e avaliação da atividade antitumoral de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo nbutanoiloxietil)-4-(clorometil)-3-nitrobenzamida (EBAC)** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ARAÚJO, F.A.; KELMANN, R.G.; ARAÚJO, B.V.; FINATTO, R.B.; TEIXEIRA, H.F.; KOESTER, L.S. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 42, p. 238-245, 2011.

AVENDAÑO, C.; MENENDEZ, J. C. **Medicinal Chemistry Of Anticancer Drugs**. Cap. 1. Introduction, 2st edition, Elsevier, 1-7, 2015.

BELOQUI, A.; SOLINIS, M.A.; DELGADO, A.; ÉVORA, C.; DEL POZO-RODRIGUEZ, A.; RODRIGUEZ-GASCON, A. Biodistribution of nanostructured lipid carriers (NLCs) after intravenous administration to rats: influence of technological factors. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 84, p. 309-314, 2013.

BORRIN, T. R. **Nanoemulsões produzidas pelo método de inversão de emulsão para encapsulação de curcumina** 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de materiais) – Universidade de São Paulo, Pissassununga.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Poder Executivo, 2003.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L.B.; MICHELLE, F.; KOESTER, L.S.; TEIXEIRA, H.F. Nanoemulsions as parenteral drug delivery systems. **Quím. Nova.** v.35, p.1827-1840, 2012.

BUSTAMANTE, F. L. S.; SOUZA, E. T.; LANZMASTER, M.; SCARPELLINI, M. Complexos Ativados por Hipóxia: uma Estratégia para o Combate ao Câncer. **Rev. Virtual Quim.** v.1 , p.138-148, 2009.

CALDEIRA, L.R.; FERNANDES, F.R.; COSTA, D.F.; FRÉZARD, F. AFONSO, L.C.C.; FERREIRA, L.A.M. Nanoemulsions loaded with amphotericin B: A new approach for the treatment of leishmaniasis. **Eur. J. Pharm.Sci.** v. 70, p.125-131, 2015.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature.** v. 407, p. 246-257, 2000.

CHEN, T.; GONG, T.; ZHAO, T.; FU, Y.; ZHANG, Z.; GONG, T. A comparison study between lycobetaine-loaded nanoemulsion and liposome using nRGD as therapeutic adjuvant for lung cancer therapy. **Eur. J. Pharm. Sci.** v.111, p.293-302, 2017.

CHHABRA, G.; CHUTTANI, K.; MISHRA, A. K.; PATHAK, K. Design and development of nanoemulsion drug delivery system of amlodipine besilate for improvement of oral bioavailability. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v.8, p.907-916, 2010.

CHIME, S.A.; KENECHUKWU, F.C.; ATTAMA, A. A. **Nanoemulsions - Advances in Formulation, Characterization and Applications in Drug Delivery.** Chapter 3. 2014.

COMAN, D.; HUANG, Y.; RAO, J.U.; DE FEYTER, H.M.; ROTHMAN, D. L.; JUCHEM, C.; HYDER, F. Imaging the intratumoral-peritumoral extracellular pH gradient of gliomas. **NMR. Biomed.** v.3, p.309-319, 2016.

CONSTANTINIDES, P. P.; TUSTIAN, A.; KESSLER, D. R. Tocols emulsions for drug solubilization and parenteral delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.56, p. 1243-1255, 2004.

DANHIER, F. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **J. Control. Release.** v.161, p.505-522, 2012.

DATE, A. A.; NAGARSENKER, M. S. Parenteral microemulsions: an overview. **Int. J. Pharm.** v. 355, p. 19-30, 2008.

de BARROS, A. L. B. **Emprego do complexo ^{99m}Tc -hynic-bombesina₍₇₋₁₄₎ livre e encapsulado em lipossomas na identificação de tumores em modelos experimentais**, 2012. Tese Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

de BARROS, A.L.; MOTA, L.G.; SOARES, D.C., de SOUZA, C.M.; CASSALI, G.D.; OLIVEIRA, M.C.; CARDOSO, V.N. Long-circulating, pH-sensitive liposomes versus long-circulating, non-pH-sensitive liposomes as a delivery system for tumor identification. **J. Biomed Nanotechnol.** v. 9., p. 1636-1643, 2013.

de BARROS, A. L. B.; TSOURKAS, A.; SABOURY, B.; CARDOSO, V.N.; ALAVI, A. Emerging role of radiolabeled nanoparticles as an effective diagnostic technique. **EJNMMI Res.** v.2, p. 39-54, 2012.

de CAMPOS; V.,E.,B.; CERQUEIRA-COUTINHO, C.,S.; MANSUR, C.,R.,E.; SANTOS-OLIVEIRA, R .; PYRRHO, A.,S. Biodistribution of Praziquantel (PZQ) Nanoemulsion (NE) in Healthy Wistar Rats: Evaluation of Biological Behavior. **J. Bionanoscience.** v. 10, p. 486-490, 2016.

FELS, D. R.; KOUMENIS, C. The PERK/eIF2 α /ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. **Cancer Biol. Ther.** v.5, p.723-728, 2006.

FENG SS, CHIEN S. Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. **Chem. Eng. Sci.** v.6, p.41-48, 2008.

FERNANDES, R. S. **Avaliação da biodistribuição e atividade antitumoral de carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com Doxorubicina e ácido docosahexaenoico em modelo experimental** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FERNANDES, R.S., SILVA, J.O., MUSSI, S.V. et al. Nanostructured Lipid Carrier Co-loaded with Doxorubicin and Docosahexaenoic Acid as a Theranostic Agent: Evaluation of Biodistribution and Antitumor Activity in Experimental Model. **Mol. Imaging. Biol.** v.12, p. 1-11, 2017.

FLOYD A.G. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. **Pharm. Sci. Tec. Today**. v. 4, p.134-143. 1999.

FOFARIA, N. M.; QHATTAL, H. S.; LIU, X.; SRIVASTAVA, S. K. Nanoemulsion formulations for anti-cancer agent piplartine--Characterization, toxicological, pharmacokinetics and efficacy studies. **Int. J. Pharm.** v.498, p.12-22, 2016.

GACCHE, R. N & MESHRAM R. J. Angiogenic factors as potential drug target: Efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy. **Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Reviews on Cancer**. v.1846, p. 161-179, 2014.

GANTA S, SHARMA P, PAXTON JW, BAGULEY BC, GARG S. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorambucil delivered in long-circulating nanoemulsion. **J. Drug Target**. v.18(2), p.125–133, 2010.

GANTA, S.; PAXTON, J.W.; BAGULEY, B.C.; GARG, S. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorambucil delivered in parenteral emulsion. **Int. J. Pharm.** v. 360, p.115-121, 2008.

GANTA S, TALEKAR M, SINGH A, COLEMAN TP, AMIJI MM. Nanoemulsões na Pesquisa Translacional - Oportunidades e Desafios na Terapia de Câncer Alvo. **AAPS PharmSciTech**. v.15.3, p.694-708, 2014.

GUISE, C. P.; MOWDAY, A. M.; ASHOORZADEH, A.; YUAN, R.; LIN, W.; WU, D.; SMAIKK, J. B.; PATTERSON, A. V.; DING, K. Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: targeting tumor hypoxia. **Chin. J. Cancer**. v.33, p.80-86, 2014.

GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTONA, T. A.; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft. Matter**. v.12, p.2826-2841, 2016.

HALEY, B. e FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urol. Oncol.** v.26, p.57-64, 2008.

HAN, M.; HE, C. X.; FANG, Q. L.; YANG, X. C.; DIAO, Y. Y.; XU, D. H.; HE, Q. J.; HU, Y. Z.; LIANG, W. Q.; YANG, B.; GAO, J. Q. A novel camptothecin derivative incorporated in nano-carrier induced distinguished improvement in solubility, stability and anti-tumor activity both in vitro and in vivo. **Pharm. Res.** v.6, p.926-935, 2009.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.E.; BENOIT, J.P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials.** v.23, p.283-300, 2003.

HONG, S.S.; CHOI, J. Y.; KIM, J. O.; LEE, M.K.; KIM, S. H.; LIM, S.J. Development of paclitaxel-loaded liposomal nanocarrier stabilized by triglyceride incorporation. **Inter. J. Nanomedicine.** v.11, p.4465–4477, 2016.

HÖRMANN, K. & ZIMME, A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions - A review. **J. Control. Release.** v.223, p.85-98, 2016.

HUNG, C. F.; FANG, C. L.; LIAO, M. H.; FANG, J. Y. The effect of oil components on the physicochemical properties and drug delivery of emulsions: tocol emulsion versus lipid emulsion. **Int. J. Pharm.** v.335, p.193-202, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER – INCA. 2017. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>> Acesso em: 21 de julho de 2017.

JAFARI, S. M.; HE, Y.; BHANDARI, B. Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. **J.Food Eng.** v.82, p.478, 2008.

JIANG, S.P.; HE, S.N.; LI, Y.L.; FENG, D.L.; LU, X.Y.; DU, Y.Z.; YU, H.Y.; HU, F.Q.; YUAN, H. Preparation and characteristics of lipid nanoemulsion

formulations loaded with doxorubicin. **Int. J. Nanomedicine**. v.8, p.3141-3150, 2013.

JUMAA, M.; MÜLLER, B. W. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. **Int. J. Pharm.** v.163, p.81-89, 1998.

KELMANN, R. G.; KUMINEK, G.; TEIXEIRA, H.F.; KOESTER, L.S. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **Int. J. Pharm.** v.342, p.231-239, 2007.

KHACHANE, P.V.; JAIN, A.S.; DHAWAN, V. V.; JOSHI, G. V.; DATEA, A. A.; MULHERKAR, R.; NAGARSENKER, M. S. Cationic nanoemulsions as potential carriers for intracellular delivery. **Saudi. Pharm. J.** v.23, p.188-194, 2015.

KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. **Over. Public. Association**. v.82, p.1069-1079, 1998.

KOO, V.; HAMILTON, P. W; WILLIAMSON, K. Non-invasive in vivo imaging in small animal research. **Cell. Oncol.** v.28, p.127-139, 2006.

LAOUINI, A.; JAAFAR-MAALEJ, C.; LIMAYEM-BLOUZA, I.; SFAR, S.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. **J. Colloid. Interface**. v.1, p.147-168, 2012.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. ver.** v.45, p.89-121, 2000.

LOPES, M. S. **Síntese e avaliação da atividade citotóxica, leishmanicida e tripanocida de derivados nitroaromáticos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LOPES, M. S.; SENA, C. F. A.; SILVA, B. L.; SOUZA, C. M.; RAMOS, J. P.; CASSALI, G. D.; FAGUNDES, E. M. S.; ALVES, R. J.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, R. B. Synthesis of Nitroaromatic Compounds as Potential Anticancer Agents. **Anticancer Agents Med Chem.** v.15, p.206-216, 2015.

MAEDA, H.; WU, J. SAWA, T.; MATSUMURA, Y.; HORI, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **J. Control. Release.** v.65, p.271–284, 2000.

MAHATO, R.; TAI, W.; CHENG, K. Prodrugs for improving tumor targetability and efficiency. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.63, p.659-670, 2011.

MARQUES, F. L. N. *et al.* Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. **Radiol. Bras.** v.34, p.233-239, 2001.

MARTINI, E. **Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química** 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MCCLEAN, E.; COLLIER, P. S.; FEE, J. P. H.; The effect of formulation on the plasma binding and blood/plasma concentration ratio of diazepam **Int. J. Pharm.** v.60, p.35-39, 1990.

McCLEMENTES, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences and similarities. **Soft. Matter.** Cambridge, v.8, p.1719-1729, 2012.

MELLO, M. V. P.; LANZMASTER, M. Ativação redox como estratégia para desenvolvimento de novos fármacos aplicados ao tratamento de câncer. **Rev. Virtual Quim.** v.7, p.1810-1829, 2015.

MISHRA, R. K.; SONI, G.C.; MISHRA, R.P. A review article: on nanoemulsion. **World J. Pharm. Sci.** v.3, p. 258-274, 2014.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A.C.; MURRAY, J. C. Nanomedicina: status atual e perspectivas futuras. **FASEB. J.** v.19, p.311-330, 2005.

MONTEIRO, L. O. F.; FERNANDES, R.S.; CASTRO, L.C; CARDOSO, V.N.; OLIVEIRA, M.C.; TOWNSEND, D.M.; FERRETTI, A.; DOMENICO RUBELLO, D.; LEITE, E.A.; DE BARROS, A.B. Technetium-99 m radiolabeled paclitaxel as an imaging probe for breast cancer in vivo. **Biomed Pharmacother.** v.89, p.146-151, 2017.

MUHLEN A. Z.; SCHWARZ C.; MEHENERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-drug release and release mechanisms. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v.45, p.149-155, 1998.

MULLER, R. H.; SCHMIDT,S.; BUTTLE, I.; AKKAR, A.; SCHMITT,J.; BROMER, S. Novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs. **Inter. J. Pharm.** v.269, p. 293-302, 2004.

MUNN, I. I. Aberrant vascular architecture in tumors and its importance in drug-based therapies. **Drug Discov. Today.** v.8, p.396-403, 2003.

NAKAMURA, H.; JUN, F.; HIROSHI MAEDA, H. Development of next-generation macromolecular drugs based on the EPR effect: challenges and pitfalls. **Expert Opin. Drug Deliv.** v.12, p.53-64, 2015.

NOGUEIRA, A.A.; GUEDES, V.R. Tumores de células germinativas não-seminomatosos: revisão da literatura. **Rev. Pato. Tocantins.** v.3, p.53-67, 2016.

NUNES, S. S. Evaluation the influence of Polyethylene glycol in circulation and biodistribution of pH-sensitive liposomes, radiolabeled with Technetium 99m in

experimental models. **INIS. Reposit.** v. 47, 2016 Available from INIS: http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:47078969.

OHGUCHI, Y.; KAWANO, K.; HATTORI, Y.; MAITANI, Y. Selective delivery of folate-PEG-linked, nanoemulsion-loaded aclacinomycin A to KB nasopharyngeal cells and xenograft: effect of chain length and amount of folate-PEG linker. **J. Drug Target.** v.16, p.660-667, 2008.

OLIVEIRA, L. C.; TAVEIRA, E. J. F.; SOUZA, L. G.; MARRETO, R. N.; LIMA, E. M. Aplicações das nanopartículas lipídicas no tratamento de tumores sólidos: revisão de literatura. **Rev. Bras. Cancerologia.** v.58, p.695-701, 2012.

OLIVEIRA, R. B; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Quím. Nova.** v.25, p. 976-984, 2002.

PATLOLLA, R.R; VOBALABOINA, V. Pharmacokinetics and tissue distribution of etoposide delivered in parenteral emulsion. **J. Pharm. Sci.** v.94, p.437-445, 2005.

PIRES, V.G.A.; MOURA, M.R. Preparação de novos filmes poliméricos contendo nanoemulsões do óleo de melaleuca, copaíba e limão para aplicação como biomaterial. **Quím. Nova.** v.40, p. 1-5, 2017.

QikProp 4.6 User Manual (2016) Schrödinger. LCC, New York Santini V, Gozzini A, Scarppini B, Grossi A, Ferrini PR (2001) Searching for the magic bullet against cancer: the butyrate saga. *Leuk Lymphoma* 42(3):275–289. <https://doi.org/10.3109/10428190109064584>.

ROBBINS; COTRAN. Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 7. ed. Filadélfia: **Elsevier.** 2006.

SADURNI N, SOLANS C, AZEMAR N, GARCIA-CELMA MJ. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **Eur. J. Pharm. Sci.** v.26, p.438–445, 2005.

SANTINI, V., GOZZINI, A., SCARPPINI, B., GROSSI, A., ROSSI FERRINI, P. Searching for the Magic Bullet Against Cancer: The Butyrate Saga. **J. Leukemia & Lymphoma.** v.42p.275-289, 2001.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S. et al. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **Inter. J.Pharm.** v.208, p.71-80, 2000.

SAREEN S, MATHEW G, JOSEPH L. Improvement in solubility of poor water-soluble drugs by solid dispersion. **Int. J. Pharm. Investig.** v.2, p.12-17, 2012.

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

SENA, C. F. A. **Desenvolvimento de formulação de circulação prolongada contendo o conjugado nitroaromático-ácido butírico: uma estratégia de direcionamento para tumores sólidos.** 2013. 162 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SHOHDY, K. S., & ALFAAR, A. S. Nanoparticles targeting mechanisms in cancer therapy; great efforts, less implementations. **Future Sci.** v.4, p.1–13, 2013.

SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KHAN, F. A.; CHAURASIA, M.; JAIN, N. K.; CHOURASIA, M. K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **J. Control. Release.** v.252, p.28-49, 2017.

SPITZNER, M.; EBNER, R.; WOLFF, H. A.; GHADIMI, M.; WIENANDS, J.; GRADE, M. STAT3: A novel molecular mediator of resistance to chemoradiotherapy. **Cancers.** v.6, p.1986-2011, 2014.

STEICHEN, S. D.; CALDORERA-MOORE, M.; PEPPAS, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. **Eur. J. Pharm. Sci.** v.48, p.416-427, 2013.

STUBBS, M.; Mc SHEEHY, P. M. J.; GRIFFITHS, R. Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study. **Adv. Enzyme Regul.** v.39, p.13-30, 1999.

SUGIMOTO, N.; KOIKE, R.; FURUSHO, N.; TANNO, M.; YOMOTA, C.; SATO, K.; YAMAZAKI, T.; TANAMOTO, K. Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group content of polysorbates. **Food Addit Contam.** v. 8, p.799-806, 2015.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Adv. Colloid Interface Sci.** v.108, p.303-318, 2004.

THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. **Medicina Nuclear.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

TORCHILIN, V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v.71, p.431-444, 2009.

TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.63, p. 131-5, 2011.

TRÉDAN, O., GALMARINI, C.M., PATEL, K., TANNOCK, I.F., Drug resistance and the solid tumor microenvironment. **J. Natl. Cancer Inst.** v.99, p.1441-1454, 2007.

USP 34. The United States Pharmacopoeia National Formulary, 34. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, INC, 2012.

USP 39. The United States Pharmacopoeia National Formulary, 39. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, INC, 2016.

VIEIRA, D. B. & GAMARRA, L. F. Avanços na utilização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de câncer. **Einstein.** São Paulo, v.14, p.99-103, 2016.

WANG, J.; CUI, Y.; TANG, X. Chemical stability of teniposide in aqueous and parenteral lipid emulsions. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v.35, p.508, 2009.

WANTEN, G.J.; CALDER, P.C. Immune modulation by parenteral lipid emulsions. **Am. J. Clin. Nutr.** v.85, p.1171-1184, 2007.

WEI, X, WANG, Y, ZENG, W, HUANG, F, QIN, L, ZHANG, C. Stability influences the biodistribution, toxicity, and anti-tumor activity of doxorubicin encapsulated in PEG-PE micelles in mice. **Pharm. Res.** v.29, p.1977–1989, 2012.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Handbook – Non Clinical Safety Testing. Geneva: TDR/WHO, 2004. 117p. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/safety_handbook.pdf> Acesso em: 21 de outubro de 2017.

WILLIAM, A. D. E WILLIAM, R. W. Tirapazamine: a bioreductive anticancer drug that exploits tumour hypoxia. **Expert Opin Investig Drugs**. v.12, p.2889-2901, 2000.

YANG, D. J. et al. Imaging with ^{99m}Tc -ECDG targeted at the multifunctional glucose transport system: feasibility study with rodents. **Radiology**. v.226, p. 465–473, 2003.

YOON, G., PARK, J.W., YOON, I.S. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): recent advances in drug delivery. **J. Pharm. Investig**. v.43. p.353–362, 2013.