

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

Sued Eustaquio Mendes Miranda

**AVALIAÇÃO DO LAPACHOL RADIOMARCADO COM TECNÉCIO-99m
COMO MARCADOR TUMORAL E DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÃO CONTENDO LAPACHOL**

Belo Horizonte - MG

2018

Sued Eustaquio Mendes Miranda

**AVALIAÇÃO DO LAPACHOL RADIOMARCADO COM TECNÉCIO-99m
COMO MARCADOR TUMORAL E DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÃO CONTENDO LAPACHOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. André Luís Branco de Barros

BELO HORIZONTE

2018

M672a Miranda, Sued Eustaquio Mendes.
Avaliação do lapachol radiomarcado com tecnécio-99m como marcador tumoral e desenvolvimento e caracterização de nanoemulsão contendo lapachol / Sued Eustaquio Mendes Miranda. – 2018.
110 f. : il.

Orientador: André Luís Branco de Barros.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Naftoquinona – Teses. 2. Tumores – Teses. 3. Câncer de mama – Teses. 4. Tecnécio – Teses. 5. Atividade antitumoral – Teses. 6. Radiofármacos – Teses. I. Barros, André Luís Branco de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 616.994



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

UFMG
■

FOLHA DE APROVAÇÃO


**AVALIAÇÃO DO LAPACHOL RADIOMARCADO COM
TECNÉCIO-99m COMO MARCADOR TUMORAL E
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÃO
CONTENDO LAPACHOL**


SUED EUSTAQUIO MENDES MIRANDA

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

Aprovada em 27 de abril de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. André Luis Branco de Barros - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof. Valbert Nascimento Cardoso
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof. Luciene das Graças Mota
Departamento de Anatomia e Imagem - UFMG

COLABORADORES

Prof. Elaine Amaral Leite – Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica – Departamento de Produtos Farmacêuticos – Faculdade de Farmácia – UFMG;

Prof. Lucas Antônio Miranda Ferreira – Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica – Departamento de Produtos Farmacêuticos – Faculdade de Farmácia – UFMG;

Prof. Ricardo José Alves – Laboratório de Química Farmacêutica – Departamento de Produtos Farmacêuticos – Faculdade de Farmácia – UFMG;

Doutoranda Renata Salgado Fernandes – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) – Faculdade de Farmácia – UFMG;

Doutoranda Juliana de Oliveira Silva - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) – Faculdade de Farmácia – UFMG;

Janaína de Alcântara Lemos - Bolsista de IC do Laboratório de Radioisótopos – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Farmácia – UFMG.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus por me dar forças para vencer mais esta batalha, muito obrigado por tudo o que me proporcionou nesta jornada. Agradeço ao meu pai e irmão por todo o auxílio fornecido durante este momento. À minha mãe que está no céu me olhando e cuidando, essa vitória foi para a senhora.

Ao meu orientador, Professor André Luís por toda orientação, auxílio, e companheirismo, este trabalho é em grande parte seu por todo o apoio e dedicação comigo. Você foi, é e sempre será um exemplo de profissional e pessoa, um verdadeiro exemplo de sucesso a seguir.

Ao Professor Lucas por ter me recebido em seu laboratório, pela confiança, atenção e ensinamentos que contribuí muito para a execução deste trabalho. A aluna de Iniciação Científica Bruna pelo auxílio no laboratório de Farmacotécnica.

Obrigado a todos do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Carol Henriques, Carol Oda, Liziane, Bruna, Eduardo, Gabriel, muito agradecido pela recepção.

Ao Professor Ricardo José, pelas contribuições, auxílios e ensinamentos para a realização deste trabalho.

A Doutoranda Renata por todo o auxílio na execução deste trabalho, você foi quase como uma “co-orientadora” de tanto que ajudou. Muito obrigado pelo auxílio, colaboração, conhecimento, exemplo e ensinamentos.

A Janaína que me auxiliou em todos os momentos do mestrado, nos experimentos, nos bate-papos, nas gordices. Obrigado por todo apoio. A Luisa

Trindade pela disponibilidade, discussões, lanches, conversas e ajuda na escrita deste trabalho.

Obrigado a todos os companheiros do laboratório de Radioisótopos, Simone Generoso, Maria Emília, Patrícia Barros, Rafaela, Maíra, Luiza, Paula vocês fazem este laboratório um local especial. Um obrigado especial ao grupo do boteco Shirleide, Juliana, Fernanda Lapa, Nara.

Obrigado ao Vanderli, pela atenção, disponibilidade, auxílio em todos os experimentos, preparo de materiais e lanches.

Obrigado ao Batista e Adelaide do biotério da Faculdade de Farmácia pelo auxílio com os experimentos em animais.

Obrigado especial a Tâmara, amiga pra vida toda, por todo o sofrimento de vida de mestrando, a Talita, amiga da biomedicina para sempre. Obrigado por ouvirem minhas reclamações, dramas, ciúmes, chatices (sei que são muitas) pelo apoio, por todos os encontros, por todas as gordices, que de fato tornaram essa caminhada muito mais leve. As Fernanda's, Bello e Santos, e Livia Cristina amigas da biomedicina e companheiras de vida.

Agradeço a todos meus tios e primos por todo apoio neste caminho, principalmente aos primos diretoria pela grande amizade, encontros, reuniões, lanches e companheirismo, muito obrigado por tudo.

Obrigado a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) pelo apoio financeiro deste projeto.

Obrigado a todos que foram importantes e participaram desta caminhada.

“Pon las alas contra el viento

No hay nada que perder

*No te quedes con tu nombre escrito en
la pared*

(...)

No pares, no pares no

No tengas miedo a volar

Vive tu vida.”

(Lynda Thomas)

RESUMO

O câncer é considerado um problema de saúde pública, com estimativa de 600 mil novos casos no biênio 2018/2019, sendo o câncer de mama responsável por 28% dos novos casos. Devido à sua grande incidência e mortalidade, tem-se buscado novas alternativas para tratamento e diagnóstico dessa doença. Nos últimos anos a busca por substâncias com atividade antitumoral tem aumentado e algumas classes de compostos tem recebido bastante interesse, como as naftoquinonas. O lapachol é uma naftoquinona utilizada desde o final do século XX para o tratamento de diversas doenças, incluindo certos tipos de câncer, chegando a testes clínicos de fase 2 para o tratamento de sarcoma de Yoshida e carcinoma da Walker 256, porém teve seu estudo cancelado devido, especialmente, a sua baixa concentração plasmática. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi realizar a radiomarcagem com tecnécio-99m e estudos de biodistribuição do lapachol em modelo experimental de tumor de mama, bem como preparar e caracterizar uma nanoformulação contendo lapachol para estudos posteriores de tratamento de tumores de mama. Os resultados demonstraram que o lapachol pode ser marcado com elevada pureza radioquímica ($95,9\% \pm 3,4\%$), e a marcação se manteve estável por até 24 horas. Estudos subsequentes indicaram caráter hidrofílico (coeficiente de partição $-1,55 \pm 0,17$) para o complexo ^{99m}Tc -lapachol com alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas (aproximadamente 90%). Estudos *in vivo* indicaram depuração bifásica com tempo de meia vida de distribuição e eliminação iguais a 4 e 54 minutos, respectivamente. A biodistribuição e as imagens cintilográficas em animais com tumor de mama apresentaram alta captação em órgãos de excreção e maior acúmulo na região tumoral quando comparado ao músculo contralateral. A nanoemulsão contendo lapachol foi preparada com sucesso e apresentou tamanho e teor de encapsulação compatíveis com uma futura administração endovenosa. Estudos preliminares indicaram estabilidade da formulação na concentração 0,5 mg/mL por até 15 dias. A formulação foi radiomarcada com ^{99m}Tc apresentando alta pureza radioquímica ($94,5 \pm 1,3\%$) e elevada estabilidade por até 24 horas. Diante do exposto, conclui-se que o complexo ^{99m}Tc -lapachol apresenta características promissoras para um potencial agente de diagnóstico de tumores de mama e a formulação preparada pode ser utilizada em estudos futuros para avaliação do potencial antitumoral do lapachol.

Palavras-chave: Lapachol. Tumor. Câncer de mama. Nanoemulsão. Tecnécio-99m, Radiomarcção.

ABSTRACT

Cancer is considered a public health problem, in 2018/2019 is expected 600,000 new cases being breast cancer responsible for 28%. Due to the high incidence and mortality, new alternatives have been sought for the treatment and diagnosis of this disease. In recent years, the search for substances with antitumor activity has increased and some classes of compounds have received a lot of interest, such as naphthoquinones. Lapachol is a naphthoquinone used since the late twentieth century in the treatment of various diseases, including certain types of cancer that have been brought to stage 2 clinical trials for the treatment of Yoshida's sarcoma and Walker 256 carcinoma, but its study was canceled because of especially their low plasma concentration. In this context, the objective of this work was to perform radiochemistry with technetium-99m and biodistribution studies of lapachol in a breast tumor experimental model, as well as to prepare and characterize a nanoformulation containing lapachol for further studies on the treatment of breast tumors. The results demonstrated that lapachol can be labeled with high radiochemical purity ($95.9\% \pm 3.4\%$), and the labeling remained stable for up to 24 hours. Subsequent studies indicated hydrophilic character (partition coefficient - 1.55 ± 0.17) for the ^{99m}Tc -lapachol complex with high plasma protein binding rate (approximately 90%). *In vivo* studies indicated biphasic clearance with distribution and elimination half-lives of 4 and 54 minutes, respectively. Biodistribution and scintigraphic images in breast tumor-bearing mice showed high uptake in organs of excretion and greater accumulation in the tumor region when compared to the contralateral muscle. The lapachol-loading nanoemulsion was successfully prepared showing size and encapsulation percentage compatible with intravenous administration. Preliminary studies indicated stability of the formulation at the concentration 0.5 mg/mL for up to 7 days. The formulation was radiolabeled with ^{99m}Tc exhibiting high radiochemical purity

($94.5 \pm 1.3\%$) and high stability up to 24 hours. Therefore, the ^{99m}Tc -lapachol complex presents promising characteristics for a potential breast cancer diagnostic agent and the prepared formulation can be used in future studies to evaluate the antitumor potential of lapachol.

Keywords: Lapachol. Tumor. Breast cancer. Nanoemulsion. Technetium-99m. Radiolabeling.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS QUINONAS QUANTO AO CICLO AROMÁTICO.	26
FIGURA 2 - CLASSIFICAÇÃO DAS NAFTOQUINONAS BASEADA EM SUA ESTRUTURA	27
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DO LAPACHOL.....	28
FIGURA 4 - DIFERENÇAS ENTRE TUMOR BENIGNO E MALIGNO	32
FIGURA 5 - SEIS FATORES DA CARCINOGENESE	33
FIGURA 6 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO E DECAIMENTO DO TECNÉCIO-99 METAESTÁVEL.	39
FIGURA 7 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA NANOTECNOLOGIA APLICADA À ENTREGA DE MEDICAMENTOS	41
FIGURA 8 - ILUSTRAÇÃO DO EFEITO DE PERMEABILIDADE E RETENÇÃO AUMENTADA	42
FIGURA 9 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DE EMULSÕES	44
FIGURA 10 - CROMATOGRÁFICO DA PUREZA RADIOQUÍMICA DO COMPLEXO ^{99m} Tc-LP.	59
FIGURA 11 - ESTABILIDADE DO COMPOSTO ^{99m} Tc-LP.....	60
FIGURA 12 - CURVA DE PORCENTAGEM DE LIGAÇÃO ÀS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.	62
FIGURA 13 - CURVA DE DEPURAÇÃO SANGUÍNEA DO COMPLEXO ^{99m} Tc-LP EM ANIMAIS BALB/c SADIOS.	62
FIGURA 14 - BIODISTRIBUIÇÃO DO ^{99m} Tc-LP APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA	64
FIGURA 15 - IMAGENS CINTILOGRÁFICAS OBTIDAS APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DO COMPLEXO ^{99m} Tc-LP.....	65

FIGURA 16 - RELAÇÃO ALVO/NÃO ALVO EM ANÁLISES DE DOSE INJETADA POR GRAMA DE TECIDO OBTIDO DE ENSAIO DE BIODISTRIBUIÇÃO	66
FIGURA 17 - ANÁLISE POR REGIÃO DE INTERESSE EM IMAGEM CINTILOGRÁFICA	67
FIGURA 18 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PREPARO DAS NANOEMULSÕES À QUENTE.	76
FIGURA 19 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DOSAGEM DE LAPACHOL POR CLAE	78
FIGURA 20 - VARIAÇÃO DO DM DAS NANOEMULSÕES DE LP AO LONGO DE QUINZE DIAS.....	85
FIGURA 21 - VARIAÇÃO DO IP DAS NANOEMULSÕES DE LP AO LONGO DE QUINZE DIAS	86
FIGURA 22 - VARIAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DAS NANOEMULSÕES DE LP AO LONGO DE QUINZE DIAS	86
FIGURA 23 - GRÁFICO DE ENCAPSULAÇÃO DE LP EM NANOEMULSÕES AO LONGO DO TEMPO.	87
FIGURA 24 - FOTOGRAFIA DE NANOEMULSÕES APÓS TRÊS DIAS DE PREPARO COM PRESENÇA DE PRECIPITADO.....	88
FIGURA 25 - MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA EM NANOEMULSÃO COM FÁRMACO ENCAPSULADO NA CONCENTRAÇÃO 0,5 mg/mL.....	89
FIGURA 26 - MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA EM NANOEMULSÃO COM FÁRMACO ENCAPSULADO NA CONCENTRAÇÃO 0,75 mg/mL.....	89
FIGURA 27 - MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA EM NANOEMULSÃO COM FÁRMACO ENCAPSULADO NA CONCENTRAÇÃO 1,0 mg/mL.....	90
FIGURA 28 - ENSAIO DE LIBERAÇÃO DO LP LIVRE E ENCAPSULADO EM NANOEMULSÕES	91
FIGURA 29 - ESTABILIDADE RADIOQUÍMICA DO ^{99m} Tc-NE-LP EM SALINA E PLASMA.	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. OCORRÊNCIA DE LAPACHOL.....	29
TABELA 2. ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA.....	63
TABELA 3. COMPOSIÇÃO DAS NANOEMULSÕES BRANCAS	70
TABELA 4. COMPOSIÇÃO DAS NANOEMULSÕES CONTENDO LAPACHOL	70
TABELA 5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOEMULSÕES.....	78

Lista de Equações

Porcentagem de $^{99m}\text{TcO}_4^-$	47
Porcentagem de Pureza Radioquímica	48
Taxa de Ligação às Proteínas Plasmáticas	49
Equação do Coeficiente de Partição	50
Cálculo de Impureza Radioquímica	76
Cálculo de pureza da marcação	76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

® - Marca registrada

μ - Micro

°C - Graus Celsius

γ - Gama

%ID/g - Percentual de dose injetada por grama

¹⁸F - Flúor-18

⁶⁴Cu - Cobre-64

⁶⁷Ga - Gálio-67

⁹⁸Mo - Molibdênio-98

⁹⁹Mo - Molibdênio-99

⁹⁹MoO₄²⁻ - Molibdato

⁹⁹Tc - Tecnécio-99

^{99m}Tc - Tecnécio-99m

^{99m}TcO₄⁻ - Tecnécio Livre

^{99m}TcO₂ - Tecnécio Hidrolisado

^{99m}Tc-LP - Lapachol radiomarcado com tecnécio-99-metaestável

^{99m}Tc-NE-LP - Nanoemulsão contendo lapachol radiomarcada com tecnécio-99-metaestável

¹³¹I - Iodo-131

¹²⁵I - Iodo-125

¹¹¹In - Índio-111

²⁰¹Tl- Tálíio-201

²³⁵U - Urânio-235

A/O - nanoemulsão água em óleo

A/O/A - nanoemulsão múltipla água em óleo em água

Al₂O₃ - Óxido de Alumínio

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC - Área sob a curva

CCD - Cromatografia em camada delgada

CCNSC - *Cancer Chemotherapy National Service Center*

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DLS - *Dynamic Light Scattering*/ Espalhamento Dinâmico de Luz

DM - Diâmetro Médio

DMEN - Dulbecco's Modified Eagle Medium

EE - Eficiência de encapsulação

EPR - Enhanced Permeability and Retention/ Efeito de permeabilidade e retenção aumentada

eV - Elétrons-volt

FA - Fase aquosa

FO - Fase oleosa

HPAO - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Oxigenados

IP - Índice de polidispersão

INCA - Instituto Nacional do Câncer

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IT - Índice Terapêutico

LAFEPE - Laboratório de Farmacologia do Estado de Pernambuco

LP - Lapachol

MBq - Megabecquerel

MeOH - Metanol

MN - Medicina Nuclear

NE - Nanoemulsão

Na^{99m}TcO₄ - Pertecnetato de Sódio

nm - Nanômetros

O/A - nanoemulsão óleo em água

O/A/O - nanoemulsão múltipla óleo em água em óleo

OMS - Organização Mundial da Saúde

NE - nanoemulsão

PBS - Tampão fosfato salina

PET - *Positron Emission Tomography*/ Tomografia por emissão de pósitron

PLM - Microscopia de Luz Polarizada

R - Coeficiente de Correlação

R² - Coeficiente de determinação

RM - Ressonância Magnética

RPM - Rotações Por Minuto

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

ROI - *Region of Interest*/ Região de interesse

sd - Standard deviation/ Desvio padrão

SFB - Soro Fetal Bovino

SnCl₂.2H₂O - Cloreto Estanoso Dihidratado

SPECT - *Single Photon Emission Computed Tomography*/ Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único

T_{1/2} - Tempo de meia vida

Tc - Tecnécio

TE - Teor de Encapsulação

THF - Tetraidrofluorano

TC - Tomografia Computadorizada

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

USP - United States Pharmacopeia

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	24	
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26	
2.1. QUINONAS	26	
2.2. LAPACHOL	28	
2.3. CÂNCER.....	31	
2.3.1. TUMOR DE MAMA	33	
2.3.2. DIAGNÓSTICO.....	35	
2.4. MEDICINA NUCLEAR.....	36	
2.5. TECNÉCIO	38	
2.6. MODELOS DE ENTREGA DE FÁRMACOS	40	
2.7. NANOEMULSÕES.....	43	
3.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45	
4.OBJETIVO GERAL	46	
CAPÍTULO 1 - RADIOMARCAÇÃO DO LAPACHOL COM TECNÉCIO-99M, ESTUDO DE DEPURAÇÃO, BIODISTRIBUIÇÃO, E IMAGENS CINTILOGRÁFICAS EM ANIMAIS PORTADORES DE TUMOR MAMA MURINO.		47
1.INTRODUÇÃO	48	
2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50	
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	51	
3.1. MATERIAIS.....	51	
3.2. MÉTODOS.....	51	
3.2.1. RADIOMARCAÇÃO DO LAPACHOL	51	

3.2.2.	RENDIMENTO DA MARCAÇÃO RADIOQUÍMICA	52
3.2.3.	ESTABILIDADE DA RADIOMARCAÇÃO	53
3.2.4.	TAXA DE LIGAÇÃO ÀS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	54
3.2.5.	DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO	54
3.2.6.	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE MEIA-VIDA.....	55
3.2.7.	DESENVOLVIMENTO DO MODELO TUMORAL EM CAMUNDONGOS..	55
3.2.8.	ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO <i>EX VIVO</i>	56
3.2.9.	IMAGENS CINTILOGRÁFICAS	56
3.2.10.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1.	PUREZA RADIOQUÍMICA	58
4.1.1.	CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA.....	58
4.1.2.	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	58
4.2.	ESTUDOS DE ESTABILIDADE PARA ^{99m} Tc-LP	59
4.3.	DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO	60
4.4.	PORCENTAGEM DE LIGAÇÃO ÀS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	61
4.5.	DEPURAÇÃO PLASMÁTICA EM ANIMAIS SADIOS	62
4.6.	ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS CINTILOGRÁFICAS EM ANIMAIS PORTADORES DE TUMOR DE MAMA MURINO	63
5.	CONCLUSÃO.....	69
CAPÍTULO 2 - SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE RADIOMARCAÇÃO DE NANOEMULSÕES CONTENDO LAPACHOL		
1.	INTRODUÇÃO	71

2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	73
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	74
3.1. MATERIAIS.....	74
3.2. MÉTODOS.....	74
3.2.1. PREPARO DAS NANOMULSÕES.....	74
3.2.2. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	76
3.2.3. FORMAÇÃO DO COMPLEXO ^{99m} Tc-NE-LP	80
3.2.4. PUREZA RADIOQUÍMICA E PURIFICAÇÃO DO COMPLEXO ^{99m} Tc-NE-LP 80	
3.2.5. ESTABILIDADE DA RADIOMARCAÇÃO ^{99m} Tc-NE-LP	81
3.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	81
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	83
4.2. ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO.....	84
4.2.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA FORMULAÇÃO	84
4.2.2. TEOR DE ENCAPSULAÇÃO	87
4.3. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA.....	88
4.4. ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	90
4.5. PUREZA RADIOQUÍMICA DO COMPLEXO ^{99m} Tc-NE.....	91
4.6. ESTABILIDADE DA RADIOMARCAÇÃO ^{99m} Tc-NE-LP	92
5.CONCLUSÃO.....	94
CONCLUSÃO GERAL.....	95
PERSPECTIVAS.....	96

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXO I	109

1. INTRODUÇÃO

Dados epidemiológicos globais sinalizam um número cada vez maior de pessoas acometidas por câncer (BRASIL, 2018a). Portanto, a busca por novas formas de diagnóstico e terapia tem se tornado um dos principais tópicos abordados na medicina nos últimos anos (ODA, 2015).

A Medicina Nuclear (MN) é uma área médica baseada na utilização de radionuclídeos para o diagnóstico e terapia de inúmeras doenças sendo capaz de fornecer informações fisiológicas e bioquímicas, de forma não-invasiva, com alta sensibilidade e baixos níveis de radiação (CHERRY et al., 2012; FUSCALDI, 2012; MOURA, 2017; THRALL; ZIESSMAN, 2003).

O lapachol é uma quinona, da classe das naftoquinonas, isolada da casca e cerne de *Tabebuia avellanedae*, com atividades biológicas relatadas para diversas doenças, incluindo o câncer (BALASSIANO et al., 2005; FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003; PIMENTA, 2015; RAO et al., 1968). Devido a sua baixa biodisponibilidade, seu uso como potencial agente antitumoral tem sido limitado. Contudo, a utilização de nanossistemas, como as nanoemulsões, permite aumentar a solubilidade e melhorar a entrega de fármacos à sítios tumorais. Nanoemulsões são dispersões de dois líquidos imiscíveis onde o tamanho da gota está em escala nanométrica, com faixa de diâmetro compreendida entre 20-200 nm. A formulação possui certa estabilidade devido ao tamanho reduzido e a presença de tensoativos posicionados entre as duas fases da emulsão - água e óleo (ĐEKIĆ e PRIMORAC, 2017; KOURNIATIS et al., 2010; SILVA et al., 2012). Nanossistemas aliados as técnicas de imagem com radionuclídeos podem favorecer a detecção precoce da

doença, otimizar o tratamento, garantindo assim um melhor prognóstico para o paciente (HONG et al., 2009).

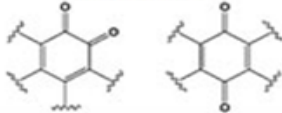
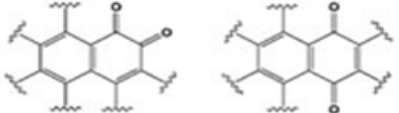
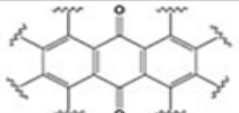
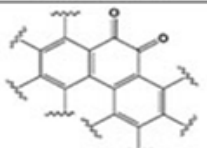
Neste contexto, esse trabalho teve como objetivo realizar a radiomarcagem do lapachol com tecnécio-99m e avaliar o seu perfil de biodistribuição em modelo experimental de tumor de mama. Adicionalmente, foi preparada, caracterizada e radiomarcada uma nanoformulação contendo lapachol para estudos posteriores de tratamento de tumores de mama.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. QUINONAS

As quinonas são um grupo de substâncias orgânicas geralmente coloridas e semivoláteis, resultantes da combustão incompleta de matéria orgânica que variam em número de anéis benzênicos, pertencentes à classe dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Oxigenados (HPAO). Estes compostos possuem dois grupamentos carbonilas em um anel insaturado de seis átomos de carbono. Baseado na posição das carbonilas, as quinonas são classificadas como benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e fenantraquinonas (**figura 1**) (SOUSA et al., 2016).

Figura 1 – Classificação das quinonas quanto ao ciclo aromático

Grupo	Sistema aromático	Estruturas Básicas
1. Benzoquinonas	→ Anel benzênico	
2. Naftoquinonas	→ Anel naftalênico	
3. Antraquinonas	→ Anel antracênico	
4. Fenantraquinonas	→ Anel fenantrênico	

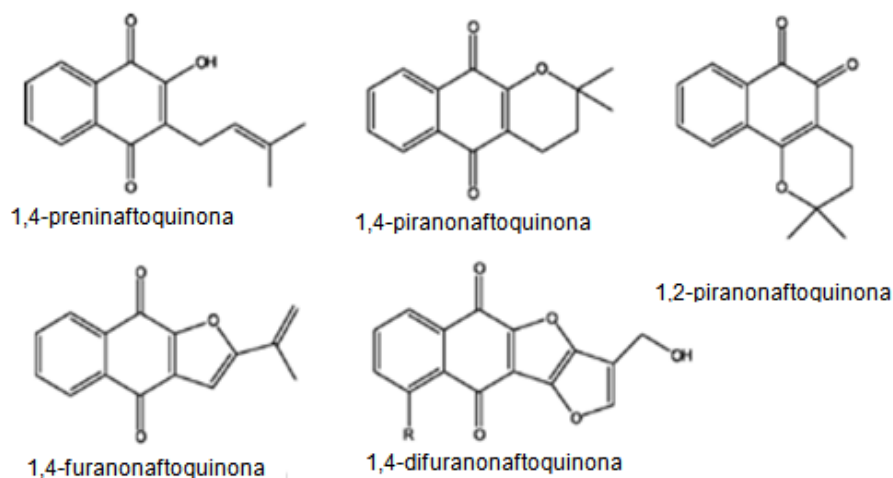
Fonte: adaptado de SOUSA et al., 2016.

As quinonas apresentam grande interesse farmacológico devido suas atividades oxidantes e eletrofílicas, o que permite participar de reações do ciclo redox e reações de Michael (MADEO et al., 2013; SOUSA et al., 2016). Estudos farmacológicos

demonstraram que as quinonas podem apresentar propriedades microbicidas, tripanomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, podendo atuar induzindo formação de espécies reativas de oxigênio, inibindo o complexo de topoisomerases - ação que gera a apoptose celular (SILVA et al., 2003).

Naftoquinonas são metabólitos gerados por algas, fungos, plantas e animais, utilizadas por populações de diversas localidades para tratamento de vários males, incluindo doenças parasitárias e alguns tipos de câncer. Encontradas em diferentes famílias da classe *Angiospermae* com destaque para as *Bignoniaceae*, *Ebenaceae*, *Plumbinaceae*, *Verbenaceae* as naftoquinonas podem ser divididas, em função da presença do anel heterocíclico oxigenado, em 1,2 e 1,4 naftoquinonas, ou de acordo com sua estrutura em prenaftoquinonas, furanaftoquinonas, difuranaftoquinonas e piranaftoquinonas (**figura 2**) (DA SILVA et al., 2012). O lapachol é considerado um dos principais representantes das 1,4 naftoquinonas (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

Figura 2 – Classificação das naftoquinonas baseada em sua estrutura

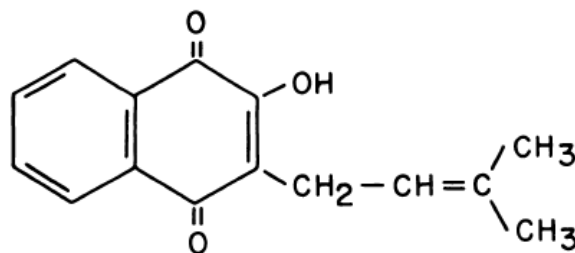


Fonte: adaptado de SILVA et al., 2012.

2.2. LAPACHOL

O lapachol (LP) é uma hidroxinaftoquinona substituída, 2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (**figura 3**), que foi primeiramente isolado por E. Paterno, em 1882, a partir da casca e cerne de árvores do gênero *Tabebuia avellanedae*, árvore argentina conhecida como “Lapacho” e que no Brasil recebe o nome de “ipê-roxo”. Posteriormente, o lapachol foi encontrado em outras famílias como *Leguminosae*, *Malvaceae*, *Verbenaceae*, *Proteaceae*, entre outras, (**Tabela 1**) (ARAÚJO et al., 2002; EPIFANO et al., 2014; FONSECA; et al., 2003; JÚNIOR, 2005).

Figura 3 – Estrutura química do lapachol



Fonte: RAO, MCBRIDE; OLESON, 1968.

O LP pode ser obtido por várias formas de extração a partir de sua alta solubilidade em solventes orgânicos gerando soluções amarelas (FONSECA et al., 2003). Já em água sua solubilidade é dependente da temperatura, sendo insolúvel em água fria e ligeiramente solúvel em água em ebulição, e do pH apresentando solubilidade de 1,5 µg/mL em pH 4 e 5mg/mL em pH 10. Na presença de hidróxido de sódio forma um sal sódico que confere coloração vermelho brilhante, extremamente ativa como corante (FONSECA et al., 2003; LUI et al., 1985).

Tabela 1 – Ocorrência de lapachol em algumas famílias e espécies

Família	Espécie
Bignoniaceae	<i>Tabebuia flavescens</i>
	<i>T. guayacan</i>
	<i>T. avellaneda</i>
	<i>T. serratifolia</i>
	<i>T. rosa</i>
	<i>T. bata</i>
	<i>T. pentaphylla</i>
	<i>T. heptaphylla</i>
	<i>Haplophragma adenophyllum</i>
	<i>Heterophragma adenophyllum</i>
	<i>Kigelia pinnata</i>
	<i>Phyllarthron comorense</i>
	<i>Radermachera sinica</i>
	<i>Paratecoma peroba</i>
	<i>Tecoma araliaceae</i>
	<i>T. undulata</i>
	<i>Stereospermum suaveolens.</i>
	<i>S. kunthianum</i>
	<i>Zeyhera digitalis</i>
	<i>Z. tuberculosa</i>
	<i>Millingtonia hortensis</i>
	<i>Stereospermum tetragonum</i>
	<i>Stereospermumpersonatum</i>
	<i>Catalpa longissima</i>
	<i>Cybistax antisyphilitica</i>
	<i>Macfadyena unguis-cati</i>
<i>Melloa quadrivalvis</i>	
<i>Newbouldia laevis</i>	
Verbenaceae	<i>Tectona grandis</i>
	<i>Avicennia tomentosa</i>
	<i>Avicennia officinalis</i>
Proteaceae	<i>Conospermum teretifolium</i>
Leguminosae	<i>Diphysa robinoide</i>
Sapotaceae	<i>Bassia latifolia</i>
Malvaceae	<i>Hibiscus tiliaceus</i>
Scrophulariaceae	<i>Paulownia kawakamii</i>

Fonte: adaptado de HUSSAIN *et al.*, 2007.

Muito utilizado desde o Império Inca, no século XIII, na forma de chá para o tratamento de diversas enfermidades, o lapachol apresenta atividade comprovada

antimicrobiana, antifúngica, inibição na replicação de RNA viral, antiplasmódica, antitripanossômica, antiinflamatória, antiparasitária, leishmanicida, moluscicida, antimalárica, antiedêmico, pesticida, schistosomicida, citotóxico (contra células humanas de leucemia HL-60, analgésico, atividade antipsoríase, antimetastático e antitumoral (ARAÚJO et al., 2002; BALASSIANO et al., 2005; FONSECA et al., 2003; HUSSAIN et al., 2007; MAEDA et al., 2008; PINTO e CASTRO, 2009; SILVA et al., 2012).

Na década de 70 destacou-se pela atividade antineoplásica e um índice terapêutico (IT) melhor quando comparado com outros fármacos da classe. Nos Estados Unidos, testes clínicos foram aprovados e realizados pela CCNSC (Cancer Chemotherapy National Service Center) em pacientes portadores de sarcoma de Yoshida e carcinoma de Walker 256, onde houve regressão definitiva das neoplasias em aproximadamente 30% dos portadores destas doenças. Porém, o tratamento gerou efeitos tóxicos indesejados como anemia, diminuição do tempo de protrombina, vômitos, náuseas e baixas concentrações plasmáticas que culminaram no término do ensaio (PIMENTA, 2015; RAO et al., 1968).

No Brasil, o LP foi comercializado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE), na forma de cápsulas gelatinosas (250mg) para o tratamento de sarcoma de Yoshida, carcinoma de Walker 256, em alguns casos de adenocarcinoma e carcinomas escamosos do aparelho digestivo, carcinoma epidermóide do colo de útero e do assoalho da boca, no entanto, atualmente não se encontra disponível para comercialização (ARAÚJO et al., 2002; LAFEPE, [s.d.]).

2.3. CÂNCER

A palavra câncer, derivada do grego *karkínos* que significa caranguejo, foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates. Atualmente é o nome dado a um conjunto que engloba mais de 100 doenças (BRASIL, 2012; PATRICK, 2013). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se para o biênio 2018-2019 a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, sendo os cânceres de próstata e mama os mais frequentes, com 68 e 60 mil ocorrências, respectivamente (BRASIL, 2018a).

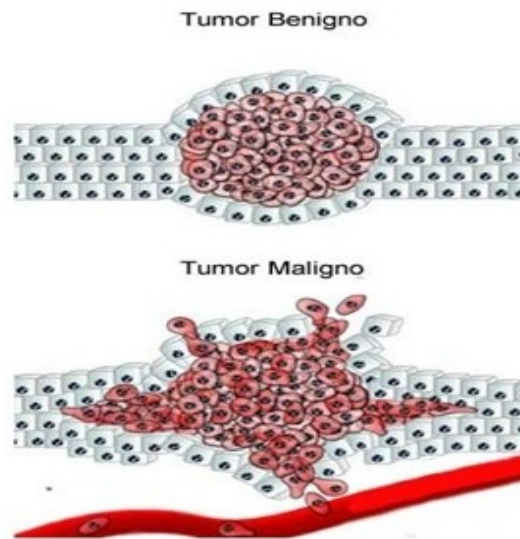
Devido à sua crescente incidência e mortalidade nos últimos anos, o câncer é considerado um problema de saúde pública com grande impacto social e econômico, sendo responsável pela segunda maior causa de mortes em todo o mundo (BRASIL, 2018a; STEWART e WILD, 2014).

Neoplasias ou tumores, como são usualmente conhecidos, denominam o processo no qual a célula perde a capacidade de diferenciação, com proliferação acentuada, que pode ultrapassar os limites dos tecidos normais adjacentes. Os tumores são classificados em dois tipos principais, benignos e malignos, devido suas características morfológicas, crescimento celular e comportamento biológico (FILHO, 2006; SILVA, 2016).

As neoplasias benignas apresentam crescimento lento, expansivo, bem delimitado, mantendo as características do tecido originário e com formação de uma pseudocápsula fibrosa ao redor do tecido tumoral. Já, nas neoplasias malignas o crescimento é rápido e desordenado, com delimitação imprecisa. Possui características diferentes do tecido de origem, são altamente invasivos, capazes de disseminar por

meio de metástases (FERNANDES, 2016; ODA, 2015). A **figura 4** ilustra as principais diferenças entre os dois tipos de tumor.

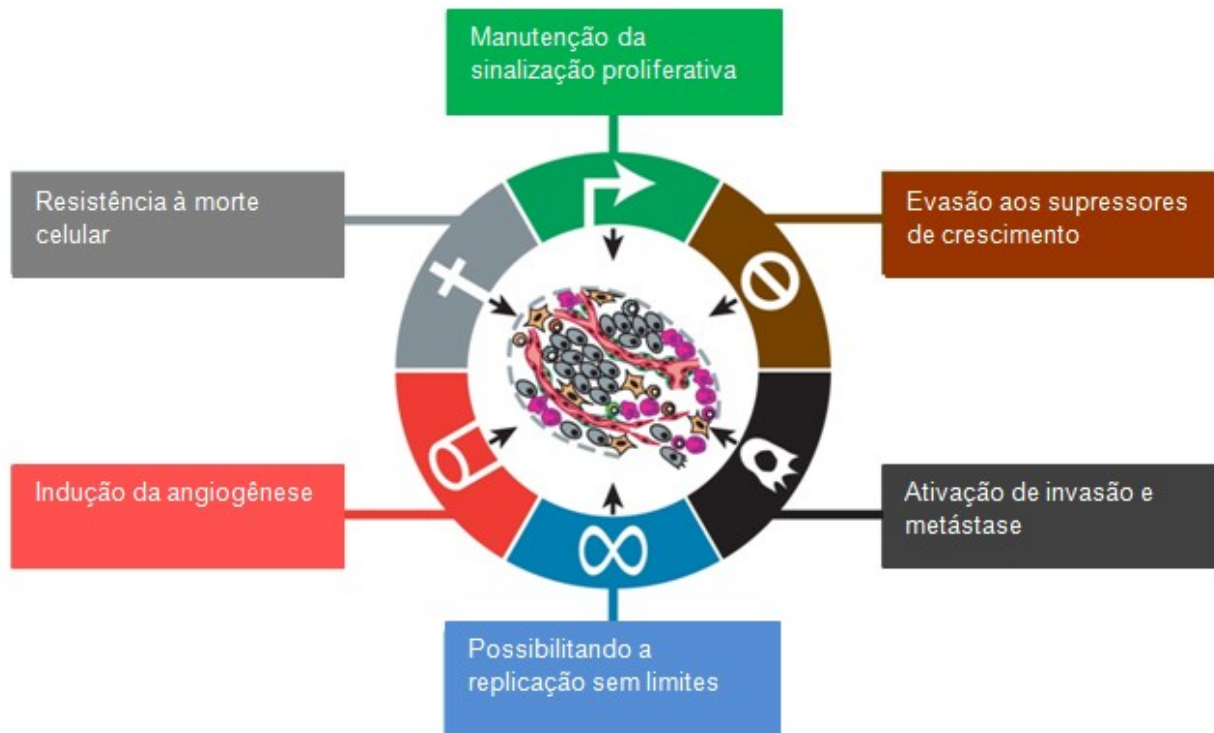
Figura 4 – Diferenças entre tumor benigno e maligno



Fonte: FIGUEIREDO, 2013.

A carcinogênese em humanos é desencadeada por diversos fatores interligados que irão fomentar a transformação progressiva de células normais em derivados altamente malignos (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Células normais evoluem progressivamente para o câncer adquirindo características únicas que permitem o crescimento do tumor, disseminação metastática e resistência a morte. Essas características ilustradas na **figura 5** demonstram o processo em que as células tornam-se tumorigênicas e posteriormente, malignas (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Figura 5 – Seis fatores da carcinogênese



Fonte: adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

2.3.1. TUMOR DE MAMA

Câncer de Mama é o tipo de câncer mais comum entre mulheres no Brasil e no mundo representando cerca de 30% dos novos casos a cada ano (BRASIL, [s.d.]; STEWART e WILD, 2014). Apesar da alta incidência, a estimativa da letalidade é menor que um terço da incidência podendo ser ainda menores com alternativas de diagnóstico e terapia mais adequadas (BRASIL, 2018a).

O câncer de mama possui etiologia multifatorial com alguns fatores de risco bem elucidados incluindo fatores genéticos, endócrinos e reprodutivos. Além disso, fatores ambientais como o consumo de álcool, primeira gestação após os 30 anos, anticoncepcional combinados de estrogênio-progestogênio, terapia de reposição hormonal, exposição às radiações X e γ , dietas calóricas e sedentarismo também contribuem para o aparecimento do câncer de mama. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos de idade, sendo um fator preponderante no surgimento da doença (MATOS et al., 2010; FERNANDES, 2016; INCA - 2018).

O câncer de mama é uma doença heterogênea, caracterizada por grande variação na apresentação clínica, porém com presença de nódulos, normalmente fixos e endurecidos, como principal forma de apresentação. Também pode ser observada vermelhidão, enrugamento, abaulação, retração, alterações no mamilo, saída espontânea de líquidos, além de nódulos em pescoço e axilas (PINHO e DE ASSIS, 2016).

Muitos avanços no estudo dos tumores têm melhorado o conhecimento acerca de marcadores biológicos de prognóstico e predição da resposta ao tratamento, contribuindo de forma relevante para a avaliação e orientação de pacientes. Para escolha do tratamento, são utilizadas informações como a extensão do tumor, a disseminação para linfonodos e a presença ou ausência de metástases (HOWLADER et al., 2014).

Existem quatro tipos principais de tratamento para o câncer, em especial o câncer de mama: cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal, sendo normalmente utilizado mais de um tipo de tratamento. Os tratamentos locais (cirurgia e

radioterapia) são, muitas das vezes, eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase, sendo responsáveis pela cura de um terço dos pacientes. A quimioterapia atua destruindo as células neoplásicas sendo amplamente utilizada no combate de tumores metastáticos e de leucemias. Entretanto, atua de forma não-específica lesando células malignas e normais, o que explica a maior parte dos efeitos adversos. A terapia hormonal é indicada para os casos nos quais as células neoplásicas apresentam positividade para receptores hormonais (DE ALMEIDA et al., 2005; BRASIL, 1999).

2.3.2. DIAGNÓSTICO

Câncer pode acometer qualquer tecido, órgão ou sistema. Por acometer vários tecidos é necessário o conhecimento básico do comportamento biológico do tumor, sua relação com o hospedeiro, avaliação da lesão inicial e a pesquisa de metástase, para um correto diagnóstico (BRASIL, [s.d.]).

A detecção precoce do câncer está diretamente relacionada à efetividade da farmacoterapia, possibilidade de cura e melhor qualidade de vida do paciente (BRASIL, 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as recomendações para o combate ao câncer de mama no Brasil baseiam-se no diagnóstico precoce e no rastreamento de mulheres na faixa etária de 50-69 utilizando mamografia a cada dois anos (TOMAZELLI et al., 2016).

A anamnese e o exame físico são à base do diagnóstico clínico, constituindo elementos orientadores da indicação dos exames complementares. O tratamento é baseado a partir do diagnóstico, incluindo o estadiamento, que é a avaliação da extensão do comprometimento do organismo, que fornecerá dados para o planejamento terapêutico (BRASIL, [s.d.], 2012, 2018b). O tecido alterado deve ser

biopsiado e encaminhado para histopatologia para confirmação do diagnóstico. A confirmação, determinação da extensão e identificação dos órgãos acometidos fornecem informação para o prognóstico, seleção da terapêutica, avaliação dos resultados do tratamento e investigação epidemiológica (BRASIL, [s.d.], 2012).

Exames laboratoriais, de registros gráficos, endoscópicos e radiológicos, inclusive ultrassonográficos e de Medicina Nuclear também são rotineiramente utilizados e têm por finalidade avaliar o tumor primário e a presença de outros focos, funções orgânicas, ocorrência simultânea de outras doenças e extensão da doença (BRASIL, [s.d.], 2012). Os exames por imagem auxiliam no diagnóstico por métodos que permitem a avaliação anatômica do paciente como a Tomografia Computadorizada (TC), Ressonância Magnética (RM) e ultrassonografia. Além disso, existem técnicas que permitem avaliação funcional como a Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) e Tomografia por Emissão de Fóton Único (SPECT) (CHRISTIAN e WATERSTRAM-RICH, 2012).

2.4. MEDICINA NUCLEAR

Medicina Nuclear é uma especialidade médica baseada na utilização de métodos cintilográficos em diversas modalidades clínicas. Possui em sua base a radiofarmácia, ciência que estuda aspectos químicos, bioquímicos e fisiológicos de compostos radioativos. Estes compostos, denominados radiofármacos, são utilizados para diagnóstico e/ou tratamento de diversas doenças (MOURA, 2017; THRALL e ZIESSMAN, 2003).

A MN é caracterizada por duas grandes classes de imagens cintilográficas, o SPECT e a PET. A primeira utiliza radionuclídeos que decaem por emissão de raios γ

permitindo a formação de imagens transversais da distribuição do radionuclídeo (CHERRY ET AL.,2012). Já a técnica PET é baseada na detecção de raios γ proveniente da aniquilação de pósitrons emitidos por certos radionuclídeos (CHERRY et al.,2012).

A cintilografia é um método de diagnóstico não invasivo, indolor, com alta sensibilidade, baixas doses de radiação, custo e disponibilidade razoáveis (FUSCALDI, 2012; MOURA, 2017). Os estudos cintilográficos fornecem informações de alterações fisiológicas e bioquímicas do órgão em análise, provendo visualização, caracterização e medidas de processos biológicos a nível molecular e celular (MANKOFF, 2007; FUSCALDI, 2012). Desta forma, permite a identificação dos processos patológicos em estágios iniciais, ao contrário das técnicas de imagens convencionais que necessitam de alterações anatômicas e morfológicas do órgão alvo (DE BARROS et al., 2010; FUSCALDI, 2012).

Para os estudos de tumores, as imagens cintilográficas podem fornecer diagnóstico precoce da doença, aumentando as chances de cura dos pacientes. Ademais, os estudos em MN podem contribuir para o monitoramento da farmacoterapia auxiliando na decisão entre troca ou manutenção do regime terapêutico (DE BARROS et al., 2010; ALMUHAIDEB et al., 2011).

Vários radionuclídeos podem ser empregados na MN como Iodo-131 (^{131}I), Índio-111 (^{111}In), Gálio-67 (^{67}Ga), Tálcio-201 (^{201}Tl), Flúor-18 (^{18}F), Cobre-64 (^{64}Cu) e Tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) (FUSCALDI, 2012; ODA, 2015).

2.5. TECNÉCIO

O tecnécio (Tc) é um metal de transição da família VII B, número atômico 43, podendo existir em oito estados de oxidação (-1 a +7). Esse isótopo foi isolado e identificado pelos pesquisadores italianos Perrier e Segrè em 1937, extraído de uma placa defletora de Molibdênio em um cíclotron na Califórnia, EUA (FUSCALDI, 2012; MOURA, 2017; ODA, 2015).

O Tc possui um total de 22 isótopos e 9 isômeros, ^{90}Tc a ^{110}Tc , onde o ^{111}Tc apresenta a menor meia-vida física (0,3 seg) e o ^{98}Tc com a maior meia-vida física ($4,2 \times 10^6$ anos). Dentre os isótopos conhecidos o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é o que apresenta as melhores condições para aplicação em MN (SCHWOCHAU, 2000; ODA, 2015).

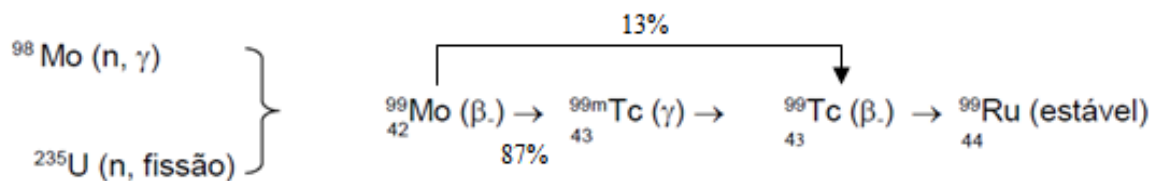
O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é o radionuclídeo mais utilizado na MN, sendo o principal radioisótopo para obtenção das imagens cintilográficas, correspondendo a um volume de 80% da rotina clínica em um serviço de MN. Este fato se deve, principalmente, às características físicas e químicas deste radionuclídeo que são ideais para um radiofármaco (FUSCALDI, 2012; MARQUES et al., 2001).

As propriedades físicas e químicas adequadas deste radionuclídeo consistem na emissão de radiação γ de baixa energia, predominantemente 140 keV; capacidade de se ligar a diversas moléculas; custo do isótopo relativamente baixo, sua obtenção por meio de gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99-metaestável ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$) e meia-vida física de aproximadamente 6,02 horas (MARQUES et al., 2001; CHALELA e MENEGHETTI, 2006; DE BARROS et al., 2010; ODA, 2015). A meia-vida física de 6 horas é importante, pois o tempo é suficiente para permitir a preparação farmacêutica e

aquisição das imagens *in vivo*, sem exposição excessiva do paciente à radiação (ODA, 2015).

O isótopo ^{99m}Tc é originado da desintegração do elemento radioativo Molibdênio-99 (^{99}Mo). O ^{99}Mo é proveniente da fissão nuclear no Urânio-235 (^{235}U) ou do bombardeamento por nêutrons do Molibdênio-98 (^{98}Mo) (estável) em um reator nuclear. O ^{99m}Tc decai para Tecnécio-99 (^{99}Tc) como demonstrado no esquema da **figura 6** (MOURA, 2017; THRALL; ZIESSMAN, 2003).

Figura 6 – Esquema de obtenção e decaimento do tecnécio-99-metaestável



Fonte: adaptado de MOURA, 2017.

O ^{99m}Tc , é obtido de um gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ na forma de pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), onde apresenta estado de oxidação +7. Nesse estado de oxidação, o ^{99m}Tc apresenta-se não reativo sendo necessário sua redução para estados de oxidação mais baixos para que possa formar complexos estáveis com moléculas que apresentem grupos doadores de elétrons. Comumente se utiliza o cloreto de estanho II dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como agente redutor na preparação de compostos radiomarcados com ^{99m}Tc (FUSCALDI, 2012; SAHA, 2010).

O Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ consiste em uma coluna cromatográfica empacotada com óxido de alumínio (Al_2O_3) onde é depositado o molibdato ($^{99}\text{MoO}_4^{2-}$), radionuclídeo

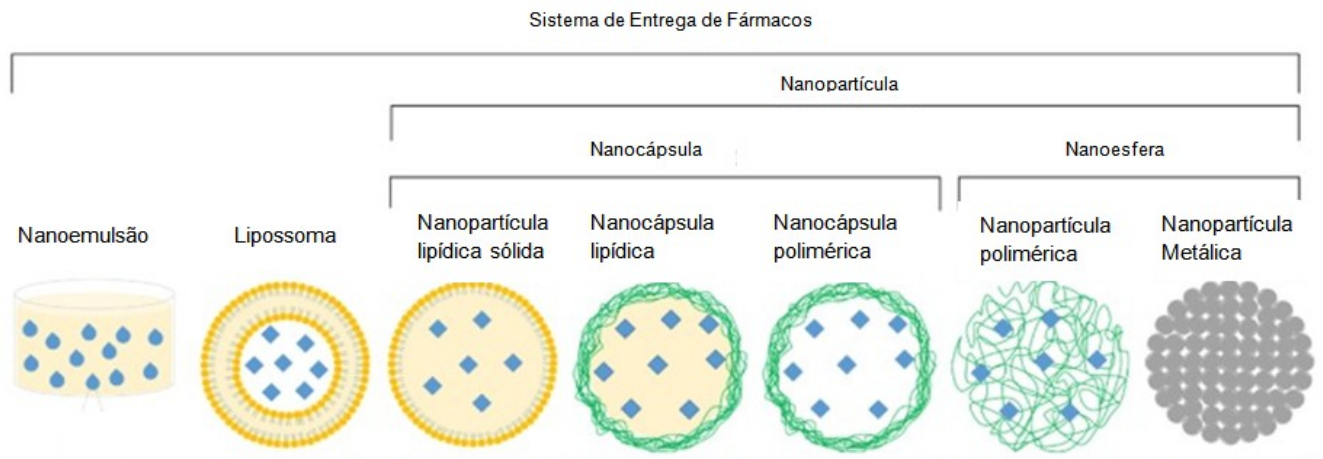
pai. Ao desintegrar, o ^{99}Mo emite uma partícula β^- originando o $^{99\text{m}}\text{Tc}$, radionuclídeo filho. O radionuclídeo filho não possui afinidade pela alumina presente na coluna, e seus átomos são eluídos da coluna com uma solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v) na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) (MARQUES et al., 2001; FUSCALDI, 2012).

2.6. MODELOS DE ENTREGA DE FÁRMACOS

No início do século XX, Paul Ehrlich propôs o primeiro modelo de um sistema transportador de fármacos, onde o fármaco ligava-se a um transportador, que ficou conhecido como “bala mágica” (LANZILLOTTI, 2012; LOPES et al., 2005). A entrega de moléculas bioativas é uma área em constante evolução englobando vários desafios como tecidos inacessíveis ou diferentes perfis de liberação (GODSEY et al., 2013).

Os modelos de administração de fármacos baseados em nanoestruturas podem ser classificados de acordo com suas características em nanoemulsões, lipossomas ou nanopartículas, que se dividem em nanoesferas e nanocápsulas (**figura 7**) (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2017).

Figura 7 – Esquema representativo da nanotecnologia aplicada à entrega de medicamentos

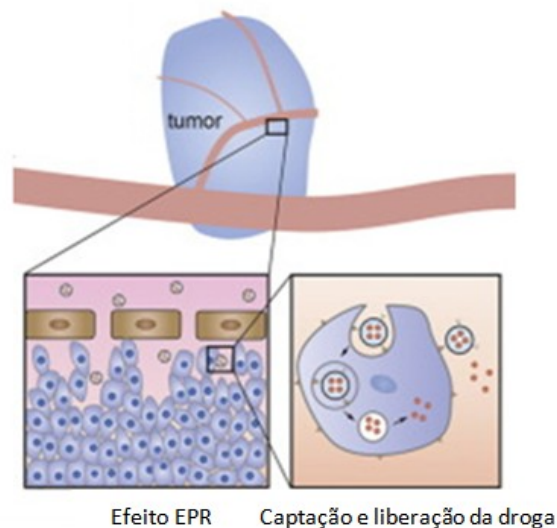


Mais de 200 produtos já aprovados ou em fase pré-clínica, tornam a entrega de agentes terapêuticos um dos ramos com maior desenvolvimento na área de nanotecnologia, com um crescimento exponencial desde o início dos anos 2000. Com o objetivo de diagnosticar, tratar e/ou monitorar processos físicos e patológicos, estruturas de tamanho nanométrico apresentam grande potencial biológico para a encapsulação de substâncias pouco hidrossolúveis, bem como podem conferir características atrativas ao novo sistema formado como a proteção de moléculas bioativas contra ação enzimática, a modificação da farmacocinética, a diminuição de resistência à fármacos e o direcionamento de fármacos para sítios de interesse. Além disso, uma tendência importante é o desenvolvimento de nanopartículas multifuncionais, capazes de realizar mais de um objetivo, como imagens e terapia (BAO *et al.*, 2013; BERTRAND *et al.*, 2014; JAHANGIRIAN *et al.*, 2017).

As células cancerosas possuem um crescimento rápido e promovem o recrutamento de novos vasos (neovascularização). O desequilíbrio dos fatores angiogênicos faz com que os vasos sejam altamente desorganizados e dilatados, com fenestrações variando de 200 a 2000 nm, dependendo do tipo do tumor, da localização e do seu ambiente (BERTRAND et al., 2014; CHO et al., 2008).

Além da alta permeabilidade, a função linfática dos tumores é comprometida, resultando em uma drenagem mínima do fluido intersticial (BERTRAND et al., 2014). Este conceito de Efeito de Permeação e Retenção aumentada (EPR) (**figura 8**) foi introduzido em 1986 por Jain e Maeda em estudos independentes, que enfatizaram o benefício do uso de nanopartículas na terapêutica do câncer (STYLIANOPOULOS e JAIN, 2015).

Figura 8 – Ilustração do Efeito de Permeabilidade e Retenção aumentada



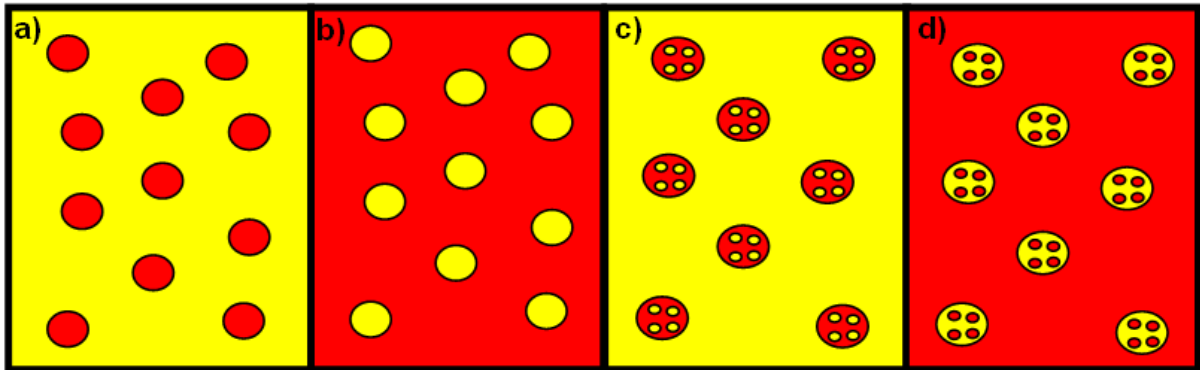
Fonte: Adaptado de DAWIDCZYK et al., 2014.

2.7. NANOEMULSÕES

As emulsões são sistemas isotrópicos a olho nu, transparentes e termodinamicamente instáveis de dois líquidos não miscíveis, tipicamente água e óleo. Normalmente, as emulsões contêm surfactantes responsáveis por formar um filme monomolecular na interface água/óleo. As emulsões possuem gotículas esféricas na faixa de 20-200 nm, sendo também encontrado na literatura como miniemulsões, emulsões ultrafinas e emulsões submicrométricas (DEKIĆ e PRIMORAC, 2017; PATRAVALE; DANDEKAR; JAIN, 2012).

O óleo e a fase aquosa geram uma emulsão grosseira, podendo se transformar em escala nanométrica de forma espontânea ou aplicando alta energia. Baseado em seus componentes, elas podem ser classificadas em óleo em água (O/A), onde as gotículas de óleo estão dispersas em água, água em óleo (A/O), onde as gotículas de água estão dispersas em fase oleosa e emulsão múltipla, onde encontra-se gotículas dispersas em gotas maiores no sistema (**figura 9**). As emulsões podem ainda ser classificadas de acordo com a carga presente em sua superfície em neutras, aniônicas ou catiônicas (RAI et al., 2018).

Figura 9 – Esquema representativo de emulsões. a) emulsão A/O; b) emulsão O/A; c) emulsão múltipla O/A/O; d) emulsão múltipla A/O/A. (água = vermelho; óleo = amarelo)



Fonte: próprio autor.

Nanoemulsões são de grande interesse devido à sua gama de aplicações na indústria farmacêutica, alimentar, cosmética e química. As nanoemulsões apresentam características relevantes para o uso por via parenteral, incluindo a capacidade de dissolver grandes quantidades de moléculas hidrofóbicas, utilização de quantidades mínimas de solvente orgânico na preparação e capacidade de proteger os fármacos de hidrólise e degradação enzimática. Desta forma, sistemas nanoemulsionados constituem estratégias importantes para modificar o fornecimento de fármacos, com entrega segura e eficaz de agentes de baixa biodisponibilidade (BRUSCHI, 2015; RAI et al., 2018).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

LP é uma naftoquinona com diversas atividades biológicas relatadas, dentre elas microbicida, fungicida, antiinflamatória e antineoplásica. Comercializado no Brasil pelo Laboratório de Farmacologia do Estado do Pernambuco e testada nos Estados Unidos pela CCNSC, apresentou resultados consideráveis na regressão definitiva de tumores. No entanto, seu estudo foi cancelado devido aos efeitos adversos como anemia, aumento do tempo de coagulação sanguínea e problemas gastrointestinais, além de sua baixa concentração plasmática.

Devido a sua comprovada atividade em tumores torna-se interessante avaliar a capacidade dessa molécula, quando radiomarcada, em acumular-se no tecido tumoral, podendo ser utilizada como um potencial agente para diagnóstico de câncer.

Em adição, ainda considerando o potencial do lapachol no tratamento de tumores, o emprego de nanossistemas poderia contribuir para minimizar os problemas enfrentados para sua efetiva aplicação clínica, como baixa disponibilidade. Nesse ínterim, o emprego de nanoemulsões possibilita a administração de fármacos pouco hidrofílicos, de forma que aumente sua biodisponibilidade. As nanoemulsões podem ainda aumentar a captação do fármaco pelo tumor devido ao efeito de permeabilidade e retenção aumentada.

Nesse sentido, a encapsulação do LP em nanoemulsões pode se mostrar um sistema promissor para novos estudos baseados neste fármaco como agente terapêutico.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar a potencialidade do lapachol, radiomarcado com tecnécio-99m, como marcador tumoral e desenvolver uma nanoformulação contendo lapachol, radiomarcada com tecnécio-99m, com características favoráveis para estudos *in vivo*.

**CAPÍTULO 1 - RADIOMARCAÇÃO DO LAPACHOL COM TECNÉCIO-
99m, ESTUDO DE DEPURAÇÃO, BIODISTRIBUIÇÃO, E IMAGENS
CINTILOGRÁFICAS EM ANIMAIS COM DE TUMOR DE MAMA MURINO.**

1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais e/ou suas estruturas para descoberta e desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos sempre foi importante, sendo historicamente uma das principais fontes de novos produtos farmacêuticos. Em relação ao câncer, 75% dos novos fármacos são produtos originados diretamente ou indiretamente de compostos naturais. Atualmente, mais de 30 compostos de origem natural estão em diferentes fases do estudo clínico para tratamento de câncer (LIU et al., 2009; NEWMAN e CRAGG, 2016).

O LP é uma naftoquinona de ocorrência natural isolado pela primeira vez em 1882 por E. Paterno do cerne e casca de *Tabebuia avellanedae*, podendo também ser encontrado em outras famílias como: *Verbenaceae*, *Proteaceae*, *Leguminosae*, *Sapotaceae*, *Scrophulariaceae* e *Malvaceae*. Apresenta fórmula química $C_{15}H_{14}O_3$, com forma de cristais prismáticos ou folhas amarelas. Solúvel em alguns compostos orgânicos, sua solubilidade em água é dependente do pH e temperatura (FONSECA et al., 2003; EPIFANO et al., 2014; NEPOMUCENO, 2015).

Dentre as naftoquinonas biologicamente ativas, o LP é um dos mais versáteis com atividades antibiótica, analgésica, antiulcerogênica, antiplasmódicas, antioxidante, antiviral, tripanocida, antineoplásica, imunossupressora para artrite autoimune, ação moluscida, cercaricida e antimalárica (ARAÚJO et al., 2002; MAEDA et al., 2008; PERES et al., 2017).

Rao (1968) realizou investigações de atividade antitumoral em carcinoma de Walker 256 e Sarcoma de Yoshida. Essas investigações culminaram em liberação para pesquisas clínicas de fase 2 pelo CCNSC. Mesmo apresentando dados de 30% de

regressão definitiva das doenças testadas o ensaio foi cancelado devido aos efeitos adversos, como problemas gastrointestinais, anemia e aumento do tempo de coagulação. Esses efeitos estão relacionados com a similaridade da estrutura do LP com a vitamina K (HUSSAIN et al., 2007; MARQUES, 2006; RAO et al., 1968).

Devido a sua comprovada atividade em tumores torna-se interessante avaliar a capacidade dessa molécula, quando radiomarcada, em acumular-se no tecido tumoral, podendo ser utilizada como um potencial agente para diagnóstico de câncer.

Dentre os diagnósticos por imagem, a cintilografia apresenta grande destaque, pois fornece imagens por técnica não invasiva, com alta sensibilidade, permitindo o diagnóstico precoce. O ^{99m}Tc é o principal radionuclídeo utilizado na MN por possuir características físicas e químicas ideais para um radiofármaco, como meia-vida física de aproximadamente 6 horas, emissão γ de baixa energia (140 keV), fácil acesso por meio de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, e capacidade de se complexar a diversas substâncias (MARQUES et al., 2001; CARLESSO et al., 2016; FERNANDES et al., 2016b).

Diante do exposto, esse capítulo teve como objetivo radiomarcado, de maneira eficiente e estável, o LP e avaliar a sua potencialidade como marcador tumoral.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer protocolo de marcação do LP com ^{99m}Tc ;
- Determinar a estabilidade, *in vitro*, do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ em presença de salina e plasma à 37°C sob agitação;
- Avaliar a taxa de ligação às proteínas plasmáticas do $^{99m}\text{Tc-LP}$;
- Realizar estudos de depuração sanguínea do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ em animais sadios;
- Realizar testes de biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ em animais com tumor de mama murino (4T1);
- Realizar imagens cintilográficas do $^{99m}\text{Tc-LP}$ em animais com tumor de mama murino (4T1).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

O ^{99m}Tc foi obtido de um gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (IPEN/Brasil). O LP foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). O ^{99m}Tc foi obtido de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (IPEN/Brasil). A solução de xilazina (Dopaser[®] 2%) foi adquirida da Hertape Calier (Juatuba, Brasil). A solução de cloridrato de ketamina (Dopalen[®] 10%) foi comprada da Vetbrands Agroline (Campo Grande, Brasil). As demais substâncias utilizadas foram de grau reagente, sem purificação adicional.

Camundongos BALB/c, com massa corpórea média de 20g, foram adquiridos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e mantidos sem restrição de água e ração e ciclo escuro de 12:12 horas, na sala de experimentação animal do Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os experimentos em animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo nº 283/2017 (**ANEXO I**)

3.2. MÉTODOS

3.2.1. RADIOMARCAÇÃO DO LAPACHOL

Alíquotas de 0,2 mL da solução de LP em PBS (1mg/mL) foram adicionadas a um frasco, seguido da adição de 50 μL de solução $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em HCl 0,25 mol/L. Em seguida, o pH foi ajustado para 7,4 utilizando solução de NaOH (1 mol/L). O frasco foi lacrado e foi realizado vácuo ao mesmo. Uma alíquota de 0,1 mL de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (37 MBq) foi adicionada a solução. A mistura reagente foi mantida à temperatura ambiente por 15 minutos.

3.2.2. RENDIMENTO DA MARCAÇÃO RADIOQUÍMICA

3.2.2.1. PUREZA RADIOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

A pureza radioquímica foi determinada por cromatografia em camada delgada (CCD) (TLC-SG, Merck, Darmstadt, Alemanha) utilizando sílica gel como fase estacionária e acetona como fase móvel para quantificar $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre, onde o complexo radiomarcado permanece no local de aplicação ($R_f = 0-0,1$) juntamente com o $^{99m}\text{TcO}_2$ ($R_f = 0$) e a impureza $^{99m}\text{TcO}_4^-$ migra com o eluente ($R_f = 0,9-1,0$). Após secagem, as fitas foram cortadas na metade e a porcentagem da pureza foi obtida por meio do cálculo de porcentagem de impureza radioquímica (**equação 1**). A radioatividade presente nas tiras de cromatografia foi determinada por um contador gama (Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, EUA).

$$^{99m}\text{TcO}_4^- (\%) = \frac{\text{Radioatividade superior (cpm)}}{\text{Radioatividade total (cpm)}} \quad (1)$$

O $^{99m}\text{TcO}_2$ foi quantificado utilizando um filtro de seringa de 0,45 μm , capaz de reter o $^{99m}\text{TcO}_2$ como descrito anteriormente por Fernandes e colaboradores (FERNANDES et al., 2016a). Neste método a solução radiomarcada é filtrada em filtro de seringa 0,45 μm , onde o $^{99m}\text{TcO}_2$ fica retido devido sua estrutura química, colóides. O filtro é então levado ao contador γ para quantificar a radioatividade presente, que é devida os radiocolóides do $^{99m}\text{TcO}_2$. Cabe ressaltar que essa estratégia é interessante, pois além de quantificar o nível de radiocolóides na preparação propicia a purificação

do radiofármaco para estudos posteriores. O rendimento de marcação foi dado segundo a **equação 2**:

$$\% \text{ marcação} = 100 - (\% \text{ TcO}_4^- + \% \text{ TcO}_2) \quad (2)$$

3.2.2.2. PUREZA RADIOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A pureza radioquímica foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde a amostra foi injetada em cromatógrafo Waters seguindo as condições descritas: sistema eluente constituído de metanol:ácido acético 5%, proporção 80:20 (v/v), coluna de fase reversa Innoval, C18, 5 μm , 4,6x150 mm (Agela Technologies, Tianjin, China); fluxo de 1,0 mL/min; temperatura de 25°C, volume de injeção de 20 μL e forno da coluna à 40°C. O equipamento utilizado consiste em dois módulos de bomba isocrática Waters 515 (Milford, EUA), injetor automático Waters 717 plus (Milford, EUA) e detector UV-Dual λ 2487 Waters (Milford, EUA).

Alíquotas da corrida cromatográfica foram coletadas (Waters fraction collector III) a cada três segundos e sua atividade mensurada em contador gama (Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, EUA) para a confecção de um radiocromatograma.

3.2.3. ESTABILIDADE DA RADIOMARCAÇÃO

Foram realizados testes de estabilidade *in vitro* de marcação para o complexo $^{99\text{m}}\text{Tc-LP}$ (n=6) em presença de NaCl 0,9% (p/v) à temperatura ambiente e plasma de camundongo à 37°C sob agitação (Banho Metabólico Dubnoff MA-095/CF). Para o

estudo de estabilidade em plasma foi utilizada a proporção de 90 uL da solução do $^{99m}\text{Tc-LP}$ para cada 1 mL de plasma de camundongo.

Após os tempos de 1, 4, 8 e 24 horas, alíquotas foram retiradas e o percentual de impurezas foi determinado por CCD, como descrito anteriormente. Após eluição, as fitas cromatográficas foram quantificadas em um contador γ (Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, EUA).

3.2.4. TAXA DE LIGAÇÃO ÀS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Alíquotas de 0,01 mL do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ foram adicionadas à 0,1 mL de plasma murino e incubadas por 1, 2, 4 e 24 horas à 37°C sob agitação (n=3). Ao final de cada um dos tempos predeterminados 1,5 mL de acetonitrila foi adicionado às alíquotas para a precipitação das proteínas plasmáticas. As alíquotas foram centrifugadas por 5 minutos a 700 x g. A proporção de ligação às proteínas plasmáticas foi obtida pela seguinte fórmula (**equação 3**):

$$\% \text{ de ligação} = \frac{\text{pellet}}{\text{pellet} + \text{sobrenadante}} \times 100 \quad (3)$$

3.2.5. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

Uma alíquota de 0,1 mL do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ foi adicionada a tubos de ensaio contendo 1 mL de solução fisiológica NaCl 0,9% (p/v) e 1 mL de *n*-octanol. As amostras (n=3) foram tampadas, agitadas em vórtex por 5 minutos e deixadas em repouso por 120 minutos para completa separação das fases. Alíquotas de 0,1 mL de cada fase foram retiradas e a atividade mensurada em contador γ (Wallac

Wizard 1470-020 Gamma Counter, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, EUA). O coeficiente foi determinado de acordo com a **equação 4** abaixo:

$$\text{Log P} = \text{Log}_{10} \left(\frac{\text{Radioatividade na fase } n\text{-octanol}}{\text{Radioatividade na fase aquosa}} \right) \quad (4)$$

3.2.6. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE MEIA-VIDA

Alíquotas de 0,1 mL do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ foram injetadas, por via intravenosa, na cauda de camundongos BALB/c sadios ($n=7$). Uma incisão foi realizada na cauda dos animais e o sangue coletado, em tubos previamente pesados, nos tempos de 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 e 1440 minutos após a administração do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$. Os tubos com sangue foram pesados e levados ao contador γ para determinação da radioatividade. Os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de sangue (%ID/g). Estes dados foram utilizados para traçar uma curva de depuração sanguínea onde foi possível determinar os tempos de meia-vida de distribuição e de depuração.

3.2.7. DESENVOLVIMENTO DO MODELO TUMORAL EM CAMUNDONGOS

O tumor mamário 4T1 foi desenvolvido em camundongos BALB/c fêmeas com 7-8 semanas de vida. As células 4T1 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$), em câmara com 5% de CO_2 , 95% de umidade e 37°C . Após 3-5 dias de cultivo, as células foram tripsinizadas e a viabilidade celular foi avaliada após coloração com o Azul de

Trypan. A concentração da suspensão de 4T1 foi ajustada para $2,5 \times 10^6$ células em 50 μL e injetada via subcutânea (SC) na coxa direita dos animais.

3.2.8. ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO *EX VIVO*

Alíquotas de 0,1 mL do complexo $^{99\text{m}}\text{Tc-LP}$ (3,7 MBq) foram injetadas, por via intravenosa, na cauda de camundongos BALB/c com tumor de mama. Após períodos de 1, 4, 8 e 24 horas, cada animal (n=7) foi anestesiado, por via intraperitoneal, com uma solução de ketamina e xilazina na dose de 80 mg/kg e 15 mg/kg, respectivamente. O sangue foi coletado por punção cardíaca, e os camundongos sacrificados por deslocamento cervical. Órgãos como, baço, cérebro, coração, estômago, fígado, intestino delgado e grosso, músculo, osso, pulmão, rins, sangue, tireoide e tumor foram removidos, secos sobre papel filtro e pesados em balança analítica. A determinação da radioatividade presente em cada órgão foi determinada por um contador γ . O percentual de radiação nos tecidos (%ID/g) foi obtido a partir da relação entre a radioatividade do tecido e a radioatividade do padrão de dose, alíquota semelhante à injetada no camundongo, utilizada para considerar o decaimento radioativo do $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

3.2.9. IMAGENS CINTILOGRÁFICAS

Alíquotas de 0,1 mL do complexo $^{99\text{m}}\text{Tc-LP}$ (18 MBq) foram injetadas, por via intravenosa, na cauda de camundongos BALB/c com tumor de mama. Após períodos de 1, 4, 8 e 24 horas, cada animal (n=7) foi anestesiado, por via intraperitoneal, com uma mistura de ketamina e xilazina na dose na dose de 80 mg/kg e 15 mg/kg, respectivamente. Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito ventral de modo que o detector da gama câmara (Nuclide TM TH 22, Mediso, Hungria) pudesse ser posicionado na região posterior do animal.

As imagens foram obtidas utilizando um colimador do tipo LEHR (Low Energy High Resolution/ baixa energia e alta resolução) e foi empregada matriz de dimensão de 256x256x16 pixels com um tempo de aquisição de 5 minutos, utilizando janela simétrica de 20% com pico de energia fixo em 140 keV. Por meio de análise da radioatividade presente na área de interesse, delineando a área ao redor do alvo (tumor) e comparando com a área não alvo (músculo contralateral) obteve-se relação alvo-não alvo, através das imagens cintilográficas.

3.2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores médios e os desvios-padrão (sd) foram calculados para todos os experimentos. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. Um nível de $p < 0,05$ foi aceito como estatisticamente significativo. As análises foram realizadas utilizando o softwares GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PUREZA RADIOQUÍMICA

4.1.1. CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

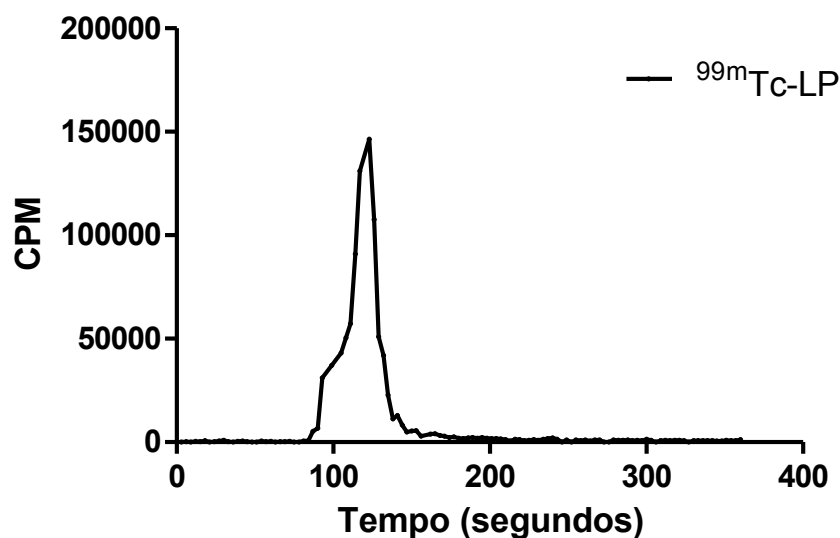
O protocolo de radiomarkação proporcionou um rendimento de $95,9 \pm 3,4\%$ ($n > 6$), com $0,8 \pm 0,9\%$ de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $6,0 \pm 5,0$ de $^{99m}\text{TcO}_2$, indicando níveis aceitáveis de impurezas radioquímicas, conforme descrito pela Farmacopéia Americana (USP, 2012). Importante destacar que após as etapas de quantificação, a pureza radioquímica obtida é ainda superior, pois todo o $^{99m}\text{TcO}_2$ foi removido na etapa de filtração em filtro $0,45 \mu\text{m}$.

Sabe-se que rendimento de marcação superior a 90% é o preconizado para iniciar estudos *in vivo*, como estudos de biodistribuição e depuração sanguínea. Altos teores de impurezas radioquímicas acarretam imagens de baixa qualidade, exposição desnecessária do paciente à radiação e altos níveis de radiação no tecido circundante (MONTEIRO, 2012; SAHA, 2010). A biodistribuição do tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) por exemplo, apresenta um perfil com captação em tireóide, glândula salivar, mucosa gástrica e plexo coróide (SCHWOCHAU, 2000). Já o $^{99m}\text{TcO}_2$ apresenta captação significativa em fígado e baço, acarretando exposição desnecessária destes órgãos em caso de rendimentos de marcação inferiores ao preconizado.

4.1.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Os resultados da CLAE estão representados pelo radiocromatográfico presente na **figura 10** e indicam apenas uma substância radiomarcada. Este achado comprova que a marcação é eficaz, gerando apenas um produto radiomarcado.

Figura 10 – Cromatográfico da pureza radioquímica do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$



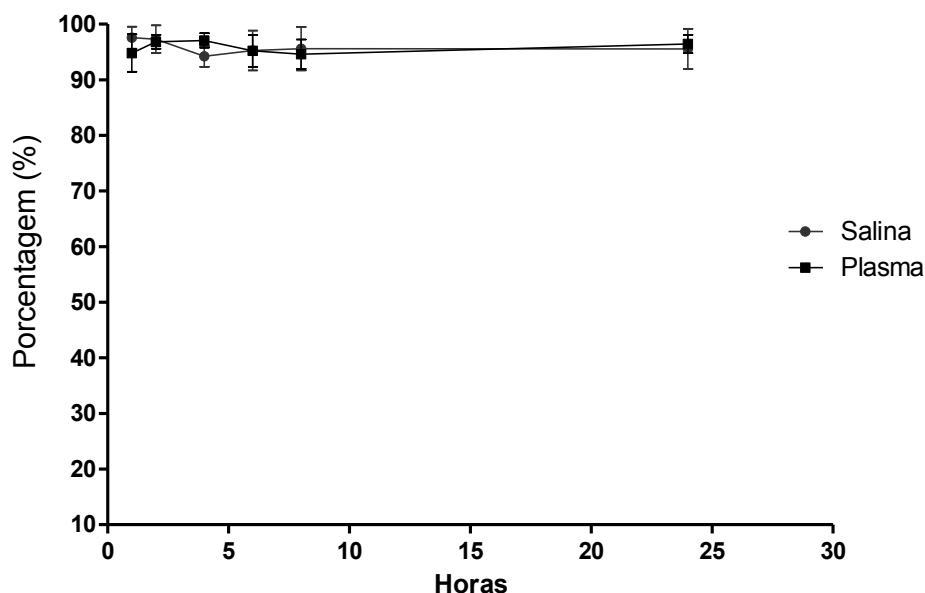
Fonte: próprio autor.

A presença de um único pico no radiocromatograma indica estabilidade do complexo marcado, resultando em apenas uma espécie radioativa. A atividade radioativa presente no pico representa 94% de toda a atividade da corrida, indicando pureza radioquímica acima do valor sugerido pela farmacopéia.

4.2. ESTUDOS DE ESTABILIDADE PARA $^{99m}\text{Tc-LP}$

A **figura 11** apresenta o resultado da estabilidade em função do tempo, em presença de solução salina 0,9 % (p/v) e plasma murino à 37°C, sob agitação. Radiofármacos instáveis alteram a biodistribuição devido a formação de impurezas pela quebra das ligações do complexo, podendo acarretar em interpretações errôneas (MONTEIRO et al., 2017; ODA, 2015; SAHA, 2010). Os resultados apresentados para o complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ indicam elevada estabilidade nos dois sistemas testados sugerindo que o complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ pode ser utilizado em estudos *in vivo* subsequentes.

Figura 11 – Estabilidade do composto ^{99m}Tc -LP em salina à 25 °C e plasma murino à 37 °C sob agitação



Fonte: próprio autor.

4.3. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

O resultado do coeficiente de partição permite correlacionar as propriedades físico-químicas com as propriedades biológicas do composto (MARESCA et al., 2009; RADIN, 2010). O complexo ^{99m}Tc -LP apresentou um valor de $\log P$ igual a $-1,55 \pm 0,17$ ($n=3$), indicando um perfil hidrofílico.

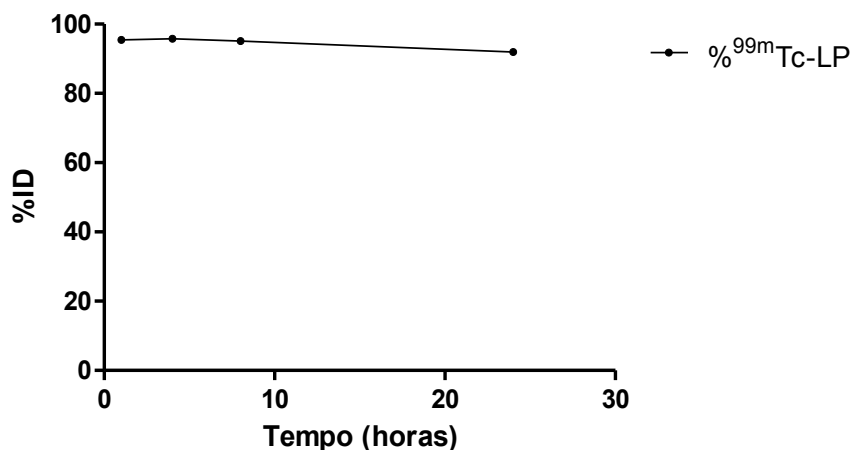
O complexo ^{99m}Tc -LP apresentou coeficiente de partição diferente do relatado na literatura para o LP não radiomarcado ($\log P = 2,69$) (FONSECA et al., 2003). Essa diferença pode ser explicada pelo caráter hidrofílico conferido ao complexo pelos compostos acrescentados, PBS e ^{99m}Tc , sugerindo que o PBS atue como co-ligante estabilizando a ligação entre LP e ^{99m}Tc . Outros estudos demonstraram diferenças na

lipofilicidade dos complexos radiomarcados em virtude da modificação de quelantes ou co-ligantes utilizados na reação (SANTOS, 2009).

4.4. PORCENTAGEM DE LIGAÇÃO ÀS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

A porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas é uma informação importante para um novo radiofármaco antes do seu uso clínico. A ligação à proteína afeta a biodistribuição, depuração sanguínea e absorção do órgão de interesse retardando a captação nos locais de afinidade, sendo a albumina a proteína que mais contribui para a ligação (SAHA, 2010). A curva de ligação às proteínas plasmáticas está demonstrada na **figura 12**, onde o complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ apresentou valores superiores a 90% de ligação às proteínas plasmáticas em até 24 horas de incubação (n=3). Essa alta taxa de ligação do $^{99m}\text{Tc-LP}$ às proteínas plasmáticas é conhecida e relatada por outros autores, mesmo utilizando metodologias distintas (ZSILA e FITOS, 2010).

Figura 12 – Curva de porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas murinas do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ ao longo do tempo

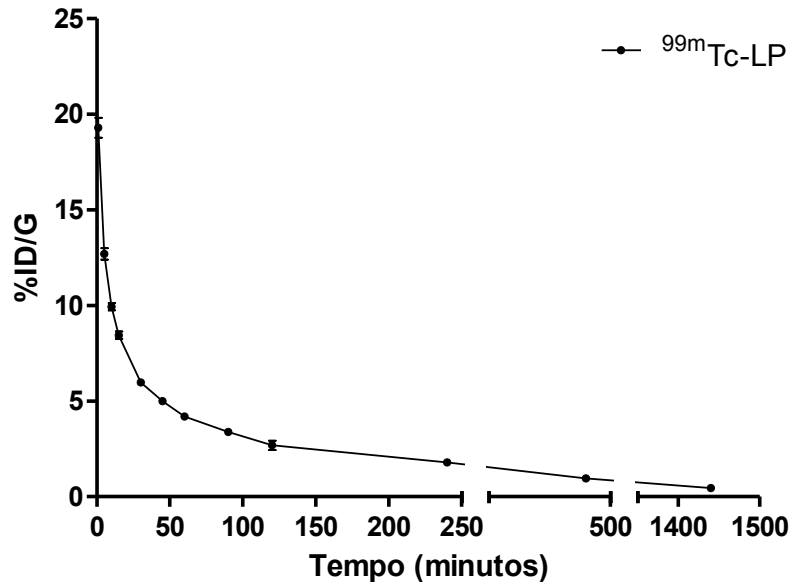


Fonte: próprio autor.

4.5. DEPURAÇÃO PLASMÁTICA EM ANIMAIS SADIOS

A curva de depuração sanguínea do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ está representada na **figura 13**. É observado um perfil bifásico de depuração consistindo de uma meia vida de distribuição de 3,7 minutos e outra de eliminação de 54 minutos. A área sob a curva calculada foi igual a 1904 %ID/g.min (n=7). Valores similares de depuração sanguínea são relatados para o LP (33 minutos) após administração intravenosa em camundongos (FONSECA et al., 2003).

Figura 13 – Curva de depuração sanguínea do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ em animais BALB/c sadios

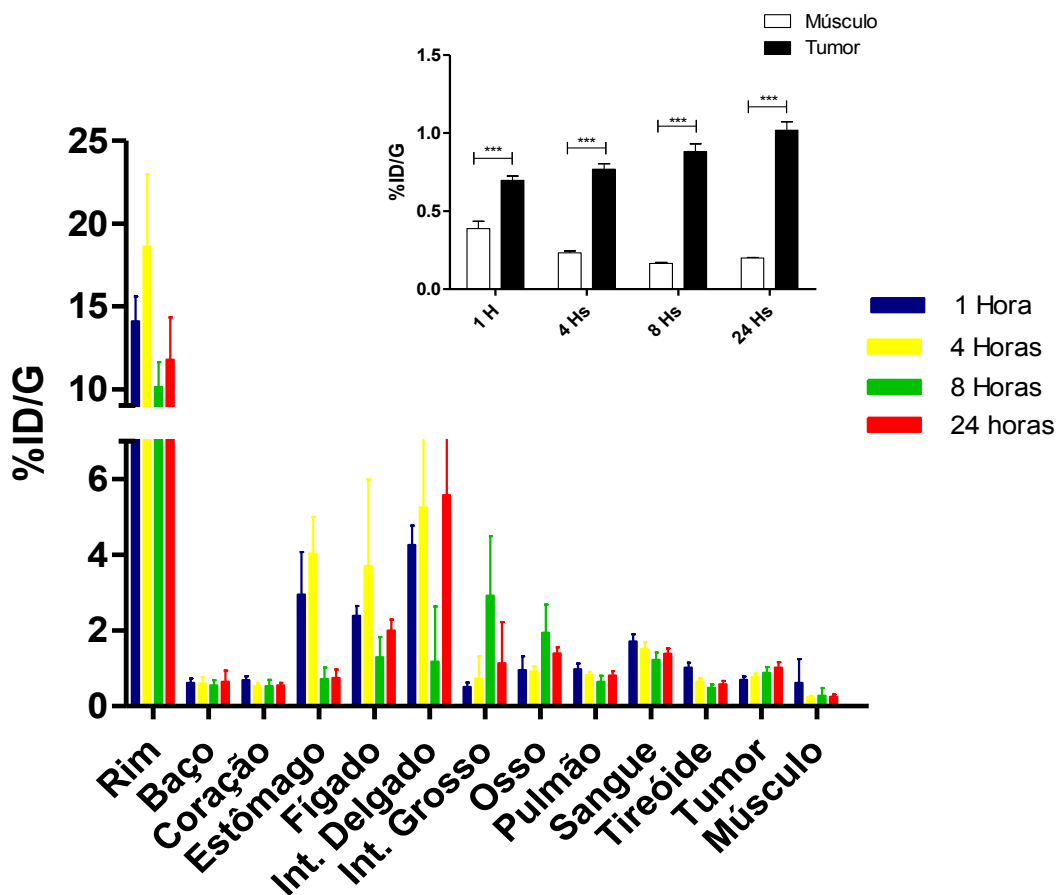


Fonte: próprio autor.

4.6. ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS CINTILOGRÁFICAS EM ANIMAIS COM TUMOR DE MAMA MURINO

Nos estudos de biodistribuição (**figura 14**) (n=7) e nas imagens cintilográficas (**figura 15**) (n=7) realizados em camundongos BALB/c com tumor de mama murino da linhagem 4T1 é possível observar uma alta captação nos rins e intestinos, órgãos responsáveis pela excreção do LP. A alta captação renal deve-se principalmente ao caráter hidrofílico do complexo, fornecido pela presença de PBS e ^{99m}Tc . A excreção intestinal, ainda que presente é bem menor e provavelmente devido à captação do complexo pelo fígado.

Figura 14 – Biodistribuição do ^{99m}Tc -LP após administração intravenosa em animais portadores de tumor de mama murino 4T1 (n=7) (*Inset*: captação em tumor e músculo 1,4, 8 e 24 horas após administração intravenosa). Dados expressos como média da dose injetada de ^{99m}Tc -LP por grama de tecido \pm desvio padrão. (***) $p < 0,01$

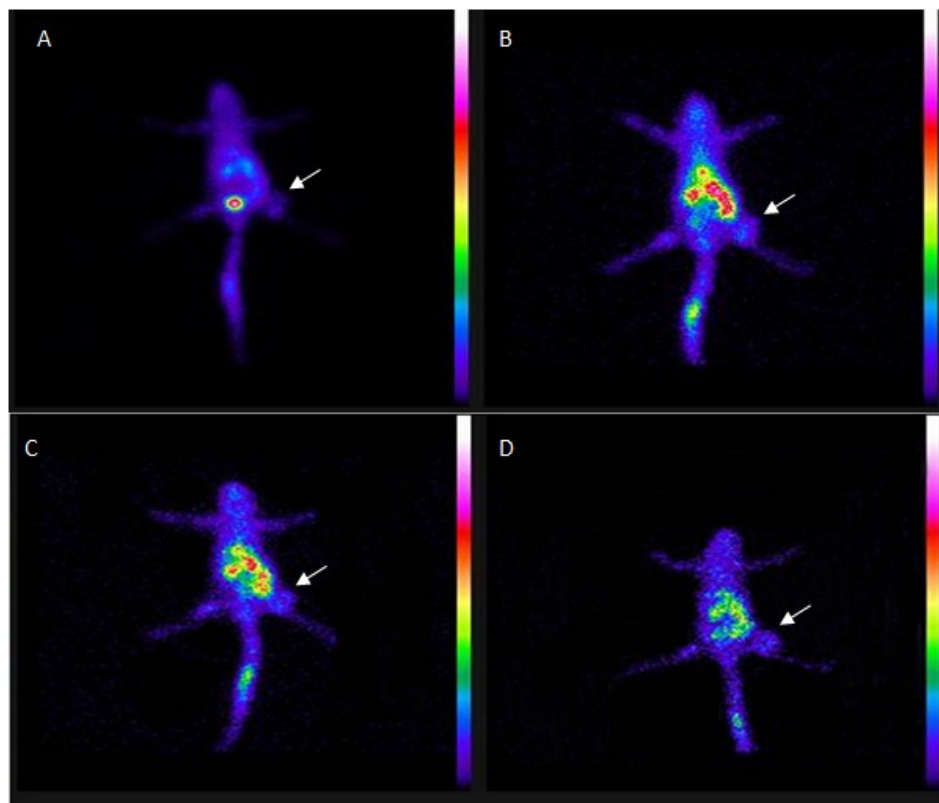


Fonte: próprio autor

Nos estudos de biodistribuição, impurezas como $^{99m}\text{TcO}_4^-$ podem acarretar em imagens de baixa qualidade e conseqüentemente, interpretações equivocadas dos resultados. O ^{99m}Tc na sua forma livre, resultado de baixa eficiência de marcação e/ou instabilidade do complexo formado, apresenta afinidade pela tireoide (SAHA, 2010). Portanto, a análise desse órgão é indicativa de estabilidade do complexo marcado após

administração. Os valores encontrados para a tireoide foram abaixo de 1% em todos os tempos investigados sugerindo que o complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ apresenta estabilidade adequada para os estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas (**figura 15**). Estes dados asseguram que as imagens obtidas para o $^{99m}\text{Tc-LP}$ realmente refletem a distribuição do radiofármaco preparado e não de impurezas obtidas.

Figura 15 – Imagens cintilográficas obtidas após administração intravenosa do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ em camundongos BALB/c portadores de tumor de mama murino. A- 1 hora; B - 4 horas; C - 8 horas e D - 24 horas; seta indica tumor



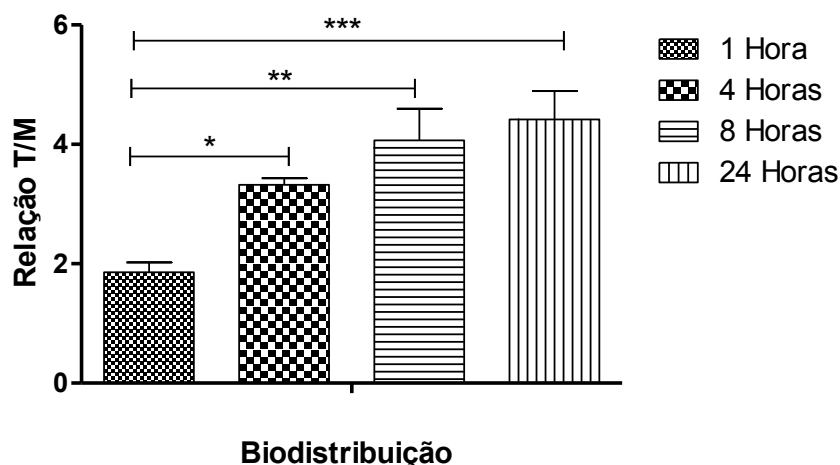
Fonte: próprio autor.

Em relação ao acúmulo do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ no tecido tumoral, foram observadas captações significativamente maiores quando comparadas com aquelas

obtidas para o músculo contralateral, utilizado como controle nesse estudo (**figura 14 - inset**). Cabe ressaltar que a captação se manteve constante durante todo o experimento (até 24 horas), indicando a permanência do radiotraçador na região tumoral. Esse fato é relevante, pois favorece uma maior relação sinal/ruído em tempos mais longos, uma vez que o complexo radioativo será depurado de outros órgãos que não tenha afinidade.

A partir dos dados obtidos pelo estudo de biodistribuição foi possível calcular a relação tumor/músculo para o $^{99m}\text{Tc-LP}$ (**figura 16**). Como discutido anteriormente foi possível observar um aumento na relação ao longo do tempo, atingindo valores próximos a 5 em 24 horas após a injeção do radiotraçador.

Figura 16 – Relação alvo/não alvo em análises de dose injetada por grama de tecido obtido de ensaio de biodistribuição em animais com tumor de mama (* indica diferença estatística entre os tempos testados)

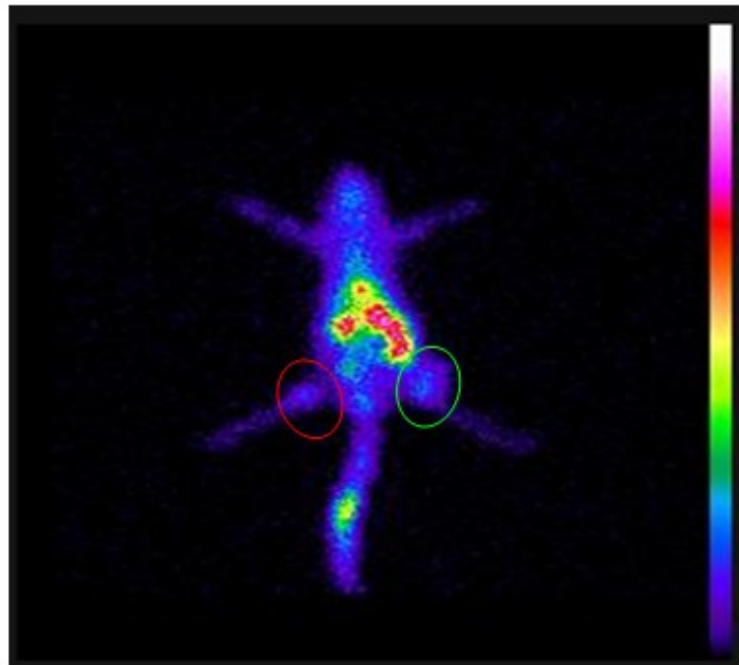


Fonte: próprio autor.

Pela análise das imagens cintilográficas é possível observar o mesmo perfil obtido nos estudos de biodistribuição, com alta captação nos órgãos de excreção

(caracterizado pela extensa captação na região abdominal) e baixa captação pela tireoide (indicativo de estabilidade do radiocomplexo formado). Por meio da análise semi-quantitativa das regiões de interesse (tumor e músculo contralateral – **figura 17**) na imagem é possível obter a relação alvo/não alvo para o $^{99m}\text{Tc-LP}$, de maneira similar àquela obtida pelo estudo de biodistribuição (**Tabela 2**). Foram observados valores superiores a 2 para todos os tempos investigados, indicando, ao menos, 100% mais captação no tecido tumoral que na região contralateral. Segundo Phillips, 1999, substâncias que apresentem relação alvo/não alvo superiores a 1,5, ou seja, captação 50% maior no alvo, podem ser consideradas como potenciais radiotraçadores para o diagnóstico.

Figura 17 – Análise por região de interesse em imagem cintilográfica. Região alvo em verde e em vermelho o músculo controle.



Fonte: próprio autor.

Tabela 2. Análise semi-quantitativa pela cintilografia da relação Tumor/Músculo do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ em camundongos BALB/c com tumor de mama murino 4T1.

	Relação T/M
1 Hora	2,03 ± 0,53
4 Horas	2,36 ± 0,76
8 Horas	2,16 ± 0,39
24 Horas	2,50 ± 0,47

Fonte: próprio autor.

As diferenças nas relações obtidas pelos dois métodos podem ser explicadas pelos diferentes métodos de aquisição e metodologia aplicada em cada estudo. Na análise por meio das imagens cintilográficas, os valores obtidos para as áreas alvo e não alvo são referentes a todas as estruturas presentes na região em análise. Devido a obtenção em imagens em 2D não é possível discriminar entre a captação no órgão de interesse e os demais tecidos presentes na região selecionada (por exemplo, fêmur). Já para os estudos de biodistribuição essa distinção se torna possível, uma vez que os órgãos são coletados e contados separadamente, fornecendo, de fato, os valores para a relação tumor/músculo. Cabe ressaltar, como discutido anteriormente, que mesmo com as diferenças apresentadas pelos métodos, todos os valores de relação obtidos foram superiores a 2,0, indicando a potencialidade do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ para identificação de tumores da linhagem 4T1 e, provavelmente, para outros tipos de tumores de mama.

5. CONCLUSÃO

Com os estudos apresentados nesse capítulo foi possível realizar a marcação do LP com ^{99m}Tc , com baixo nível de impurezas, facilmente reprodutível, e com estabilidade elevada até 24 horas. Os ensaios *in vivo*, indicaram rápida depuração sanguínea e acentuada captação tumoral quando comparado com a região contralateral (utilizada como controle). Os dados apresentados indicam a potencialidade desse radiotraçador como um marcador tumoral para o modelo experimental de tumor de mama 4T1, e possivelmente para outros tipos de tumores.

**CAPÍTULO 2 - SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE
RADIOMARCAÇÃO DE NANOEMULSÕES CONTENDO LAPACHOL.**

1. INTRODUÇÃO

Nanoemulsões (NE) são sistemas nanoestruturados com grande aplicabilidade por possuírem características que permitem a dissolução de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos. Além disso, são preparados com baixos níveis de solvente orgânico e apresentam a capacidade de proteger o conteúdo encapsulado da ação enzimática, permitindo maior entrega do fármaco. NE são compostas de dois líquidos não miscíveis, tipicamente água e óleo, podendo apresentar tamanho entre 20-200 nanômetros, que possibilita sua aplicação em nanomedicina (PATRAVALE et al., 2012; BRUSCHI, 2015; DEKIĆ e PRIMORAC, 2017; RAI et al., 2018).

A nanomedicina surgiu como uma nova área com grande potencial clínico, que além das vantagens características do uso das nanoestruturas, pode ainda ser utilizada para gerar imagens cintilográficas, sem limite de penetração tecidual e geração de imagens quantitativas. Nesse sentido, o emprego de nanossistemas radiomarcados tem ganhado interesse por possibilitar o acesso a uma plataforma teranóstica, capaz de carrear um fármaco potencialmente ativo e gerar imagens que fornecerão informações como localização e extensão do tumor, efetividade do regime terapêutico, e ajuste de dose para cada paciente individualmente. O radionuclídeo mais utilizado para diagnóstico na MN, é o ^{99m}Tc , devido às suas características ideais, como meia vida física de seis horas, emissão de radiação gama de 140 keV, fácil obtenção por meio de gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (MARQUES et al., 2001).

Diante do exposto, esse capítulo teve como objetivo preparar e caracterizar uma NE contendo LP. Adicionalmente, estudos de radiomarcagem desse sistema e estudos

de estabilidade foram realizados para avaliar seu potencial em estudos *in vivo* posteriores.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar um método de preparo de NE contendo ou não LP.
- Caracterizar as formulações quanto ao diâmetro médio, potencial zeta, teor de encapsulação;
- Determinar a estabilidade em curto prazo das nanoemulsões encapsuladas;
- Estabelecer um protocolo de marcação das NE com ^{99m}Tc (-Tc-NE-LP);
- Avaliar a estabilidade, *in vitro*, da ^{99m}Tc -NE-LP em presença de salina e plasma à 37°C sob agitação;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

O álcool metílico grau HPLC foi adquirido da empresa Tedia Company (Ohio, EUA). A água utilizada foi purificada utilizando o equipamento de destilação e deionização Milli-Q[®] (Millipore, USA). Monooleato de sorbitanoetoxilado (*SuperRefinedTM PolysorbateTM 80; Tween 80TM*), lapachol, cloreto estânico, óleo de soja foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os meios de cultura *Dubelcco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), e Roswell Park Memorial Institute (RPMI), soro fetal bovino (SFB), gentamicina, penicilina e estreptomicina foram comprados da Invitrogen (São Paulo, Brasil). O tecnécio-99m foi obtido de um gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (IPEN/Brasil). A solução de xilazina (Dopaser[®] 2%) foi adquirida da Hertape Calier (Juatuba, Brasil). A solução de cloridrato de ketamina (Dopalen[®] 10%) foi comprada da Vetbrands Agroline (Campo Grande, Brasil). As demais substâncias utilizadas foram de grau reagente, sem purificação adicional.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. PREPARO DAS NANOMULSÕES

As NE foram preparadas pelo método de homogeneização à quente, utilizando o agitador Ultra Turrax T-25 e ultrassom com sonda de titânio de alta potência (CPX 500, Cole-Palmer Instruments, Vernon Hills, EUA). A composição da formulação está representada nas **tabelas 3 e 4**. Para o preparo das NE contendo LP, o fármaco foi pesado e acrescentado à fase oleosa. Foram preparadas NE contendo LP em três concentrações diferentes (1 mg/mL; 0,75 mg/mL; 0,5 mg/mL).

A fase oleosa (FO) e a fase aquosa (FA) foram pesadas e aquecidas, separadamente, à 70°C. A FA foi lentamente vertida sobre a FO, sob agitação, em Ultra Turrax T-25, a 8.000 rpm, por dois minutos. Posteriormente, as partículas foram calibradas, em relação ao diâmetro, em ultrassom, por 10 minutos (**figura 18**).

Tabela 3. Composição das Nanoemulsões Brancas

Fase Oleosa (FO)	Peso	Fase Aquosa (FA)	Peso
Óleo de soja	200mg (4%)	Glicerol	112mg (2,24%)
Tween 80	75mg (1,5%)	Água purificada q.s.p	5mL

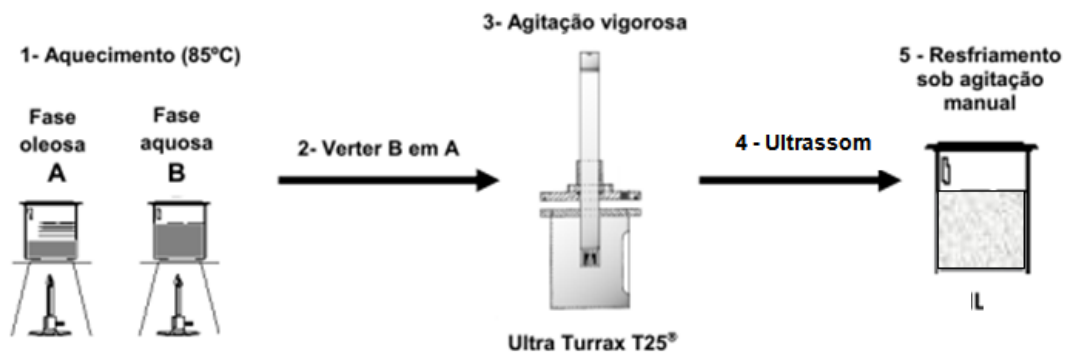
Fonte: próprio autor.

Tabela 4. Composição das nanoemulsões contendo lapachol (1mg/mL)

Fase Oleosa (FO)	Peso	Fase Aquosa (FA)	Peso
Óleo de soja	200mg (4%)	Glicerol	112mg (2,24%)
Tween 80	75mg (1,5%)	Água purificada q.s.p	5mL
Lapachol	5mg (0,1%)		

Fonte: próprio autor.

Figura 18 – Esquema representativo do preparo das nanoemulsões à quente com calibração por ultrassom



Fonte: FERNANDES, 2016.

3.2.2. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

3.2.2.1. AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO (DM)

O diâmetro médio (DM) e índice de polidispersão (IP) foram determinados por espalhamento dinâmico da luz (DLS), a 25°C e ângulo de incidência do laser de 90°. Esta técnica consiste na análise da intensidade da luz espalhada em determinado ângulo, de acordo com o movimento da partícula em solução (NOMURA et al., 2014).

Para realização das medidas de DM e IP, foi utilizado equipamento Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra) e as amostras foram diluídas 100 vezes em água MiliQ®.

3.2.2.2. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ZETA

Para avaliação do potencial zeta das partículas foi utilizado o equipamento Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra), pela técnica de DLS associado

à mobilidade eletroforética, à temperatura de 25°C e ângulo de incidência do laser de 90°. As amostras foram diluídas 100 vezes em água MiliQ®.

Este método avalia a carga elétrica na superfície da partícula em dispersão. Ao aplicar um campo elétrico na dispersão as partículas carregadas migram para o eletrodo com carga oposta com uma velocidade proporcional à sua carga de superfície (FAYAD et al., 2009).

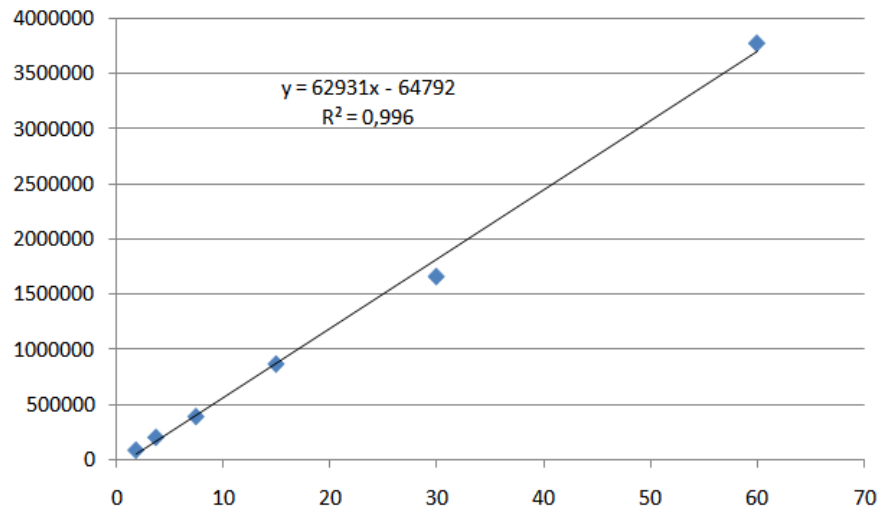
3.2.2.3. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE LAPACHOL

O teor de LP encapsulado foi dosado por CLAE (n=3) com as seguintes condições cromatográficas: sistema eluente constituído de metanol:ácido acético 5%, na proporção 80:20 (v/v), coluna de fase reversa Innoval, C18, 5 µm, 4,6x150 mm (Agela Technologies, Tianjin,China); fluxo de 1,0 mL/min; temperatura de 25°C, volume de injeção de 20 µL e forno da coluna a 40°C. O equipamento utilizado consiste em dois módulos de bomba isocrática Waters 515 (Milford, EUA), injetor automático Waters 717 plus (Milford, EUA) e detector UV-Dual λ 2487 Waters (Milford, EUA).

A formulação foi centrifugada por cinco minutos a 5000 x g para a remoção do LP não encapsulado (*pellet*). Após essa etapa, 200 µL das NE (sobrenadante) foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, onde foram adicionados 4 mL de tetrahidrofurano (THF), para solubilização dos lípides da matriz. O volume foi completado com metanol (MeOH) e o sobrenadante analisado por CLAE, avaliando a absorbância em comprimento de onda $\lambda = 278$ nm (FONSECA et al., 2004).

Para quantificação da concentração do LP ($\mu\text{g/mL}$) utilizou-se a equação $y = 62931x - 64792$, obtida por curva de calibração padronizada e construída com ensaios intradias e interdias sem diferença estatística entre as curvas de calibração.

Figura 19 – Curva de Calibração para dosagem de Lapachol por CLAE.



Fonte: próprio autor.

Para cálculo de linearidade foram utilizadas sete concentrações diferentes, mínimo de $1,88 \mu\text{g/mL}$ e máximo de $60 \mu\text{g/mL}$, com cálculo de média, desvio padrão e coeficiente de variação, que indica homogeneidade da amostra.

O coeficiente de determinação (R^2) é comumente utilizado para explicar a variação percentual do modelo, onde quanto mais próximo de 1 melhor o modelo consegue descrever a variação em y . O valor de correlação linear (R) é utilizado para indicar o quanto pode ser considerada adequada uma reta como modelo matemático, sendo necessário um valor igual ou superior a 0,90 para o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e 0,99 para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

Os resultados obtidos de $R^2=0,996$ e $R=0,998$ indicam alta correlação, segundo as duas principais agências regulatórias, e podem ser utilizados para quantificação das amostras (GUILHEN et al., 2010; OTOMO, 2010).

3.2.2.4. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

O encapsulamento do LP no núcleo lipídico dos nanocarreadores foi avaliado por microscopia de luz polarizada (PLM). A presença de cristais de LP nas dispersões da NE foi avaliada por um microscópio óptico (Zeiss Axio Imager.M2, Carl Zeiss, Alemanha) acoplado a um polarizador de luz e equipado com uma câmera digital AxioCam (Modelo ERC 5S, Carl Zeiss, Alemanha). As amostras foram preparadas em lâminas de microscópio (não diluídas) e a ausência de cristal indica encapsulação do LP.

3.2.2.5. AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE

Para avaliação da estabilidade das NE parâmetros como DM, IP, potencial zeta e teor de encapsulação (TE) foram investigados utilizando os métodos descritos nos itens anteriores. As amostras foram preparadas e armazenadas em geladeira (4°C) e analisadas nos tempos 0, 3, 7 e 15 dias após o preparo.

3.2.2.6. ENSAIO DE LIBERAÇÃO DO LAPACHOL ENCAPSULADO

Estudos de liberação foram conduzidos utilizando uma solução de LP livre (solução de LP em PBS + 2% Tween 60) de concentração 0,46 mg/mL. Alíquotas de 1 mL da formulação com concentração 0,5 mg/mL e da solução livre (0,46 mg/mL) foram colocadas em um saco de diálise (membrana de celulose, largura plana de 33 mm (1,3 polegadas) com corte de peso molecular de 14000 Da - Sigma Aldrich, Steinheim -

Alemanha). Após diluição (1/50) das NE em PBS + 2% de Tween, a diluição foi mantida a 37°C sob agitação magnética (KS 4000 i control, IKA Shakers, Staufen - Alemanha), e alíquotas foram retiradas em tempos específicos.

Após os tempos de 15, 30, 60, 90, 120, 240, 360 e 1440 minutos, alíquotas foram retiradas e a concentração dosada por CLAE como descrito no tópico 3.2.2.3.

3.2.3. FORMAÇÃO DO COMPLEXO ^{99m}Tc -NE-LP

As NE foram marcadas utilizando ^{99m}Tc por método direto e $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como agente redutor. Em um frasco de penicilina, contendo 1 mL da formulação, foram adicionados 100 μL de uma solução de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em HCl 0,25M (10 mg/ml). O pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 0,1M. O frasco foi lacrado e foi realizado vácuo. Em seguida, 0,5 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v) contendo 37 MBq de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$ pertecnetato de sódio foram adicionados ao frasco, e mantido em temperatura ambiente, por 15 minutos.

3.2.4. PUREZA RADIOQUÍMICA E PURIFICAÇÃO DO COMPLEXO ^{99m}Tc -NE-LP

A pureza radioquímica foi determinada por CCD (TLC-SG, Merck, Darmstadt, Alemanha) utilizando sílica gel como fase estacionária e acetona como fase móvel para quantificar $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre, onde o complexo radiomarcado fica no ponto de aplicação e a impureza $^{99m}\text{TcO}_4^-$ migra com o solvente. Após secagem, as fitas foram cortadas ao meio e a porcentagem da pureza foi obtida por meio do cálculo de porcentagem de impureza radioquímica (**equação 5**). A radioatividade presente nas tiras de

cromatografia foi determinada por um contador gama (Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, EUA).

$${}^{99m}\text{TcO}_4^- (\%) = \frac{\text{Radioatividade superior (CPM)}}{\text{Radioatividade total (CPM)}} \quad (5)$$

O ${}^{99m}\text{TcO}_2$ foi quantificado e removido da preparação utilizando um filtro 0,45 μm , onde o tecnécio coloidal (${}^{99m}\text{TcO}_2$) fica retido no filtro e quantificado em um contador gama, conforme descrito anteriormente por Fernandes e colaboradores (FERNANDES et al., 2016a). O rendimento de marcação foi obtido por meio da fórmula **(equação 6)**:

$$\% \text{ marcação} = 100 - (\% \text{ TcO}_4^- + \% \text{ TcO}_2) \quad (6)$$

3.2.5. ESTABILIDADE DA RADIOMARCAÇÃO ${}^{99m}\text{Tc-NE-LP}$

Foram realizados testes de estabilidade *in vitro* de marcação para os compostos (n=6) em presença de NaCl 0,9% (p/v) à temperatura ambiente e plasma de camundongo à 37°C sob agitação (Banho Metabólico Dubnoff MA-095/CF).

Após os tempos de 1, 4, 8 e 24 horas, alíquotas foram retiradas e o percentual de impurezas foi determinado em CCD, como descrito anteriormente. Após eluição, as fitas cromatográficas foram quantificadas em um contador gama (Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, EUA).

3.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores médios e os desvios-padrão (sd) foram calculados para todos os experimentos. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância

(ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. As análises foram realizadas utilizando o softwares GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

Foram preparadas NE brancas e NE contendo lapachol em três concentrações diferentes (0,5; 0,75 e 1,0 mg/mL) (n=5). As NE foram avaliadas, logo após o preparo, por meio da análise do DM, IP, carga superficial (zeta) e TE. As caracterizações físico-químicas das NE estão dispostas na **tabela 5**. NE são caracterizadas por tamanho variando de 20-200 nm, e portanto, os valores encontrados para as formulações preparadas nesse trabalho estão de acordo com o preconizado na literatura (PATRAVALE et al., 2012). Adicionalmente, todas as formulações apresentaram valores de IP inferiores a 0,3, indicando homogeneidade do sistema (NEMEN e LEMOS-SENNA, 2011; SOUZA et al., 2012).

Tabela 5. Caracterização físico-química das nanoemulsões.

	Tamanho (nm)	IP	Zeta (mV)	TE (%)
NE	174 ± 14	0,201 ± 0,040	-26,0 ± 8,3	_____
NE-LP 0,5	178 ± 6	0,175 ± 0,019	-20,6 ± 7,8	100,3 ± 1,5
NE-LP 0,75	174 ± 2	0,179 ± 0,020	-17,9 ± 4,0	97,3 ± 2,9
NE-LP 1,0	176 ± 6	0,170 ± 0,025	-21,9 ± 2,8	85,4 ± 3,7

IP: Índice de Polidispersão; TE: Teor de encapsulação

Fonte: próprio autor.

O potencial zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou atração eletrostática das partículas, sendo um parâmetro fundamental na avaliação de sua estabilidade. Os valores encontrados para as partículas indicam uma carga superficial negativa, em torno de -20 mV. Esses resultados estão de acordo com dados relatados

por outros autores para NE com composições semelhantes (AVRANAS e STALIDIS, 1991; HSU e NACU, 2003). Além disso, segundo Hsu e Nacu (2003) o óleo de soja possui potencial zeta positivo, mas tensoativos da família do Tween conferem carga negativa às partículas.

De forma geral, sabe-se que partículas com carga superior a 30 mV, em módulo, apresentam maior estabilidade pela repulsão entre cargas, enquanto que formulações com cargas próximas a neutralidade (5 mV, em módulo) tendem a agregação rápida (RAI et al., 2018). Embora as formulações apresentadas não tenham atingido valores de potencial zeta dentro do recomendado para evitar agregação das partículas, os valores próximos a -20mV já podem ser considerados capazes de garantir certa estabilidade ao sistema (RAI et al., 2018).

Ressalta-se que a presença do LP na formulação não alterou significativamente ($p \geq 0,05$) o DM ou a carga superficial das NE. Já o teor de encapsulação se mostrou próximo a 100% para as concentrações 0,5 mg/mL e 0,75 mg/mL, enquanto que para as formulações contendo 1mg/mL de LP o TE foi reduzido para 85%, indicando certa saturação do sistema. Essa saturação é também relatada por outros autores utilizando sistemas semelhantes (BROUWERS et al., 2009; LI et al., 2012; WARREN et al., 2010).

4.2. ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO

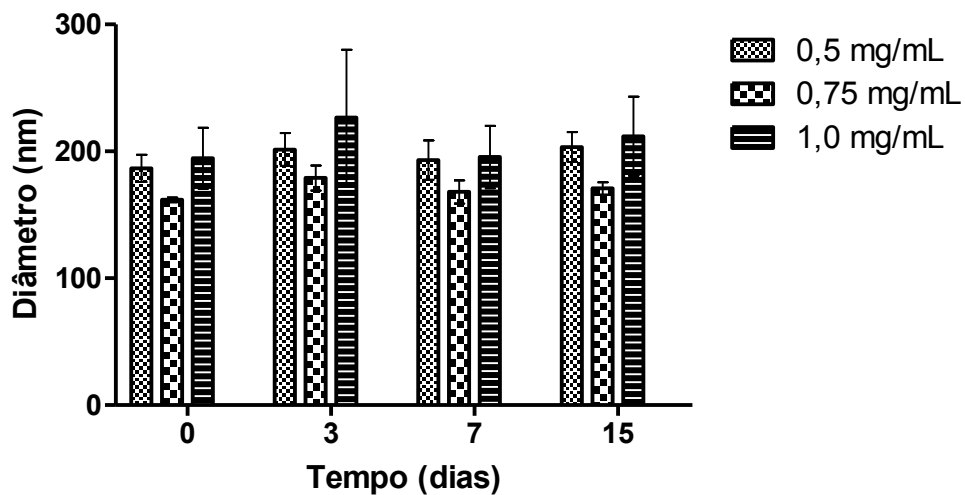
4.2.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA FORMULAÇÃO

Diversos fatores estão relacionados à instabilidade de nanoemulsões como, temperatura, agitação, congelamento, pH que acarreta em uma degradação dos triglicerídeos e fosfolípidos, presença de eletrólitos, contaminação da nanoemulsão e

os constituintes do nanossistema, como o tensoativo presente na interface que forma filmes mais compactos (BRUXEL et al., 2012; RAI et al., 2018).

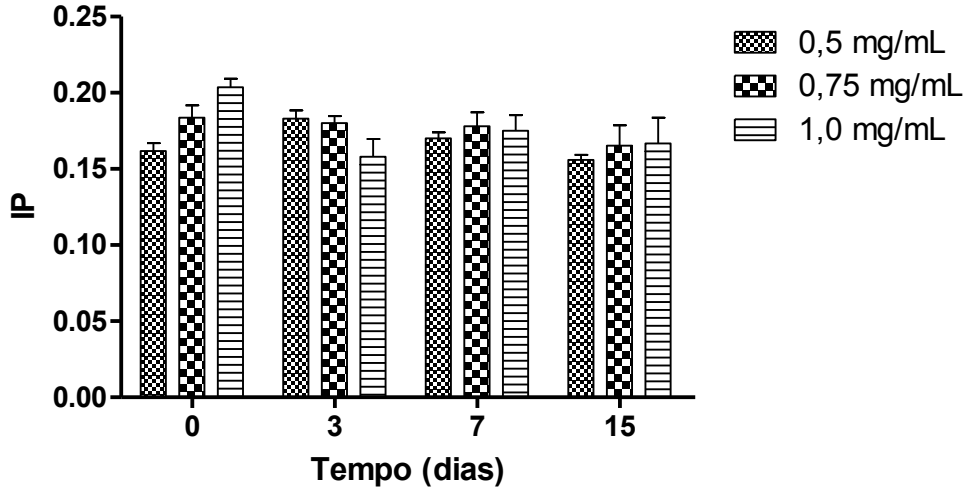
A formulação não apresentou alteração significativa quanto ao DM ao longo do tempo estudado indicando ausência de agregados e estabilidade do sistema (**figura 20**). O IP não se alterou durante o tempo observado, se mantendo sempre com valores inferiores a 0,2, valor indicativo de um sistema monodisperso (**figura 21**).

Figura 20 – Variação do DM das NE de LP ao longo de quinze dias (n=3)



Fonte: próprio autor.

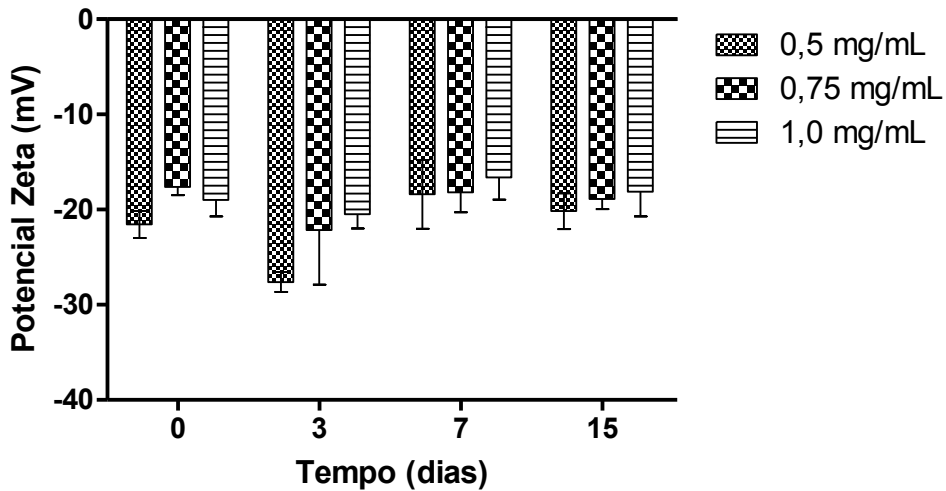
Figura 21 – Variação do IP das NE de LP ao longo de quinze dias (n=3)



Fonte: próprio autor.

O mesmo perfil foi observado para a carga superficial que se mostrou inalterada ao longo de todo o estudo (figura 22).

Figura 22 – Variação do potencial zeta das nanoemulsões de LP ao longo de quinze dia (n=3)



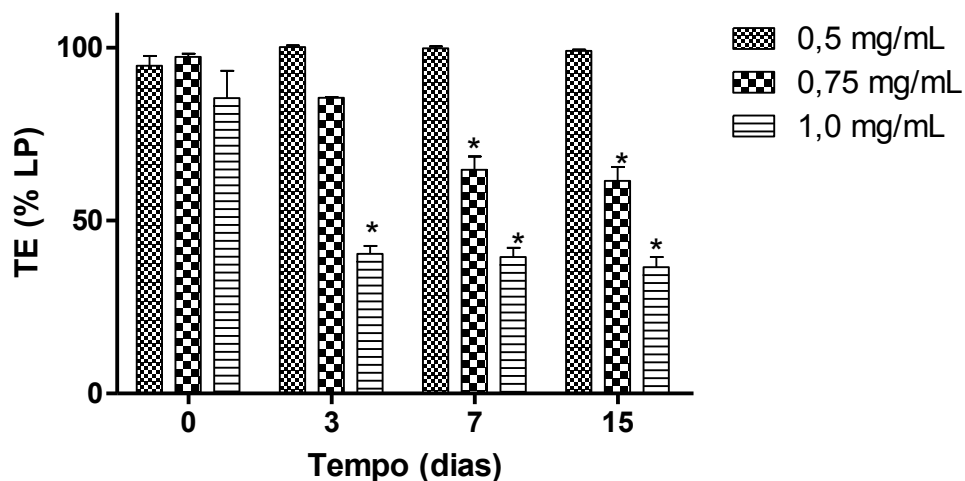
Fonte: próprio autor.

Os parâmetros de tamanho e carga superficial são geralmente utilizados como preditivos de estabilidade de um nanossistema. Estes resultados de DM, IP e potencial zeta, indicam estabilidade do nanossistema durante o tempo testado. Em caso de desestabilização do sistema os valores de DM aumentariam devida agregação das gotículas e aumento do IP, para valores superiores a 0,3, encontrados em amostras heterodispersas (RAI et al., 2018).

4.2.2. TEOR DE ENCAPSULAÇÃO

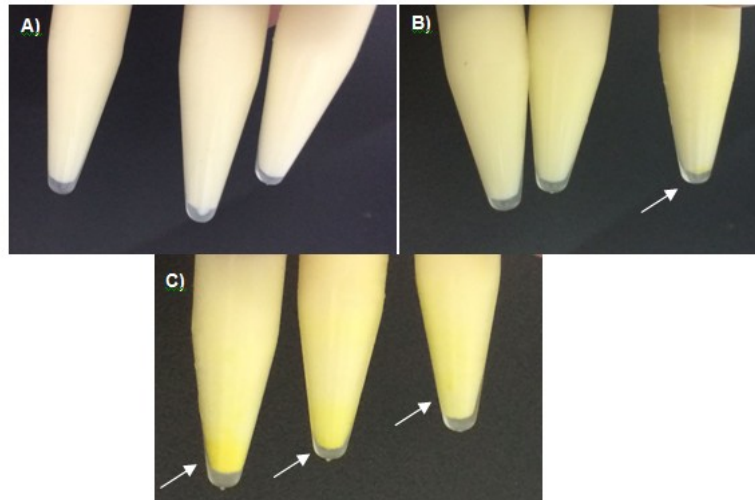
A porcentagem de encapsulação ao longo do tempo foi verificada por CLAE. A formulação contendo 0,5 mg/mL se mostrou mais estável que as demais formulações testadas (0,75 mg/mL e 1 mg/mL) como demonstrado na **figura 23**. Devido à baixa solubilidade do lapachol em água, a instabilidade do sistema, com consequente liberação do fármaco, é facilmente identificada pela presença de um precipitado amarelo, como observado na **figura 24**.

Figura 23 – Gráfico de encapsulação de LP em nanoemulsões ao longo do tempo. (* indicam diferença estatística quando comparado ao dia zero)



Fonte próprio autor.

Figura 24 – Nanoemulsão após três dias de preparo, com presença de precipitado amarelo. A) 0,5 mg/mL; B) 0,75 mg/mL; C) 1,0 mg/mL. Seta indica presença de precipitado



Fonte: próprio autor.

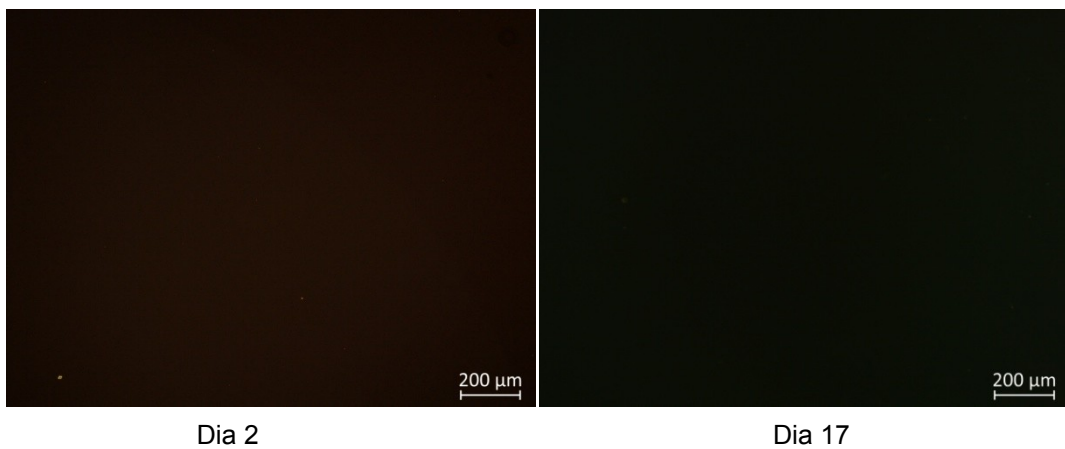
Como o LP apresenta baixa solubilidade em água tende a precipitar em meio aquoso, o que explica o sólido amarelo encontrado no fundo dos eppendorfs. Como verificado nas imagens a formulação apresenta presença de precipitado, o que está condizente com o encontrado no gráfico de TE, que apresenta uma encapsulação menor que 100%, nas concentrações de 0,75 e 1,0 mg/mL.

4.3. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

A microscopia realizada em amostras recém preparadas, dia 2, e após 17 dias (armazenadas a 4°C) nas concentrações de 0,5; 0,75 e 1,0 mg/mL (**figura 25, 26 e 27**, respectivamente) apresentou resultados semelhantes para as amostras de concentração 0,5 e 0,75 mg/mL na amostra recente, sem presença de cristais precipitados na amostra no dia 2. Porém, após armazenamento por 17 dias já é possível observar a formação de alguns cristais para a concentração 0,75 mg/mL,

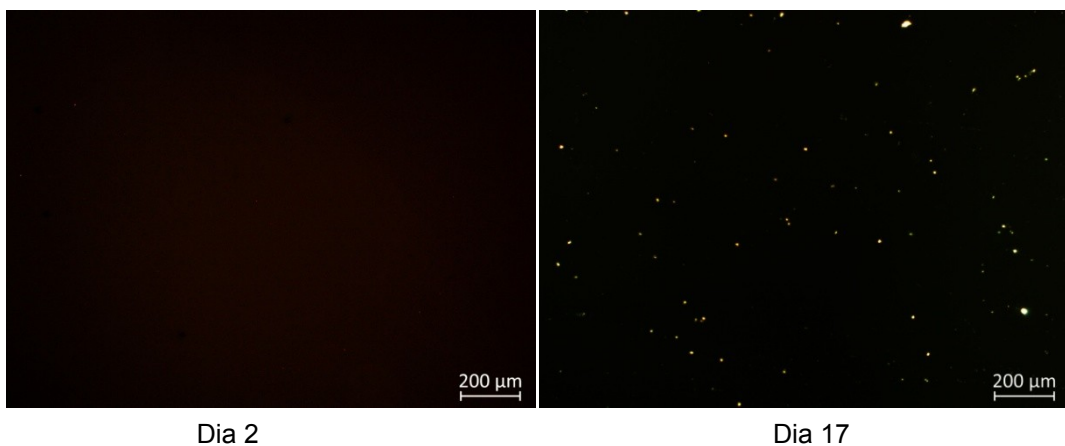
indicando perda da estabilidade do sistema nessa concentração. O mesmo não foi observado para a formulação na concentração 0,5 mg/mL, indicando estabilidade.

Figura 25 – Microscopia de luz polarizada em nanoemulsão com fármaco encapsulado na concentração 0,5 mg/mL. Aumento de 5X



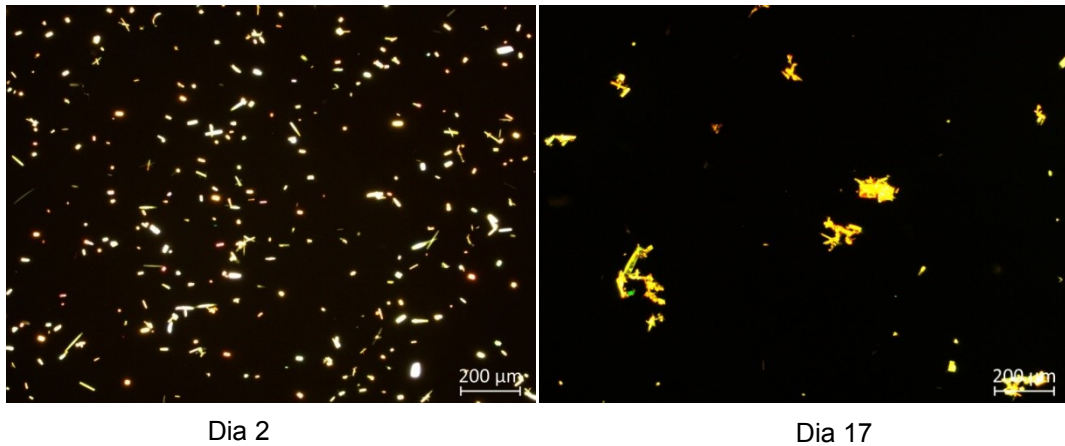
Fonte: próprio autor.

Figura 26 – Microscopia de luz polarizada em nanoemulsão com fármaco encapsulado na concentração 0,75 mg/mL. Aumento de 5X



Fonte: próprio autor.

Figura 27 – Microscopia de luz polarizada em nanoemulsão com fármaco encapsulado na concentração 1,0 mg/mL. Aumento de 5X



Fonte: próprio autor.

Já para a formulação contendo 1,0 mg/mL foi encontrado, já no dia 2, presença de cristais sugestivos de LP não encapsulado com formato semelhante ao descrito na literatura (FONSECA et al., 2003). A presença dos cristais condiz com os dados encontrados no estudo de teor de encapsulação, que demonstram uma baixa encapsulação nesta concentração teórica estipulada.

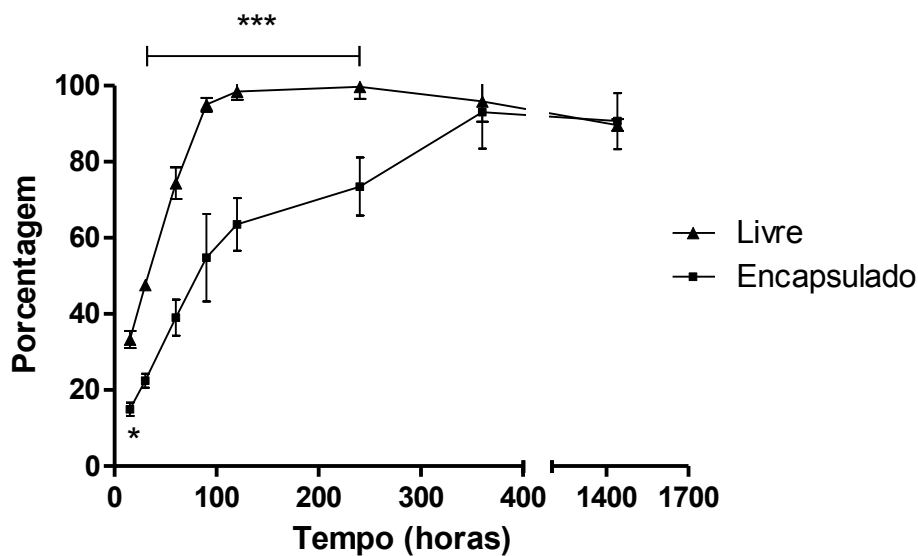
4.4. ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Ensaio de liberação são dados importantes para garantir a efetividade do sistema utilizado, que deve apresentar liberação mais lenta que a solução do fármaco livre. As NE são caracterizadas por aumentar a capacidade de entrega de fármacos pouco hidrofílicos, com o intuito de melhorar a farmacoterapia. As curvas encontradas no ensaio de liberação estão representadas na **figura 28**.

Os resultados indicam uma liberação lenta do fármaco encapsulado em comparação com a solução do LP livre, com menor liberação nos tempos iniciais. Esse

achado é interessante, pois pode assegurar a maior disponibilização do fármaco no sítio tumoral uma vez que o nanossistema irá circular por um período mais prolongado podendo assegurar maior concentração do ativo no tecido alvo.

Figura 28 – Ensaio de Liberação do LP Livre e Encapsulado em Nanoemulsões
 (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$)



Fonte: próprio autor.

Este sistema é caracterizado por uma liberação lenta, gradual e prolongada, sem picos de concentração, porém mais rápida que outros sistemas mais robustos, como nanopartículas lipídicas sólidas. A cinética de liberação é dependente da composição das formulações e das propriedades do fármaco, o que define sua localização no sistema óleo/água e sua velocidade de liberação (BRUXEL et al., 2012).

4.5. PUREZA RADIOQUÍMICA DO COMPLEXO $^{99m}\text{Tc-NE}$

O complexo $^{99m}\text{Tc-NE-LP}$ foi preparado por um método rápido e eficaz resultando em pureza radioquímica de $94,5 \pm 1,3\%$, sendo $1,7 \pm 1,0\%$ de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $3,8 \pm 0,1\%$ de $^{99m}\text{TcO}_2$ (n=5). O $^{99m}\text{TcO}_2$ foi satisfatoriamente removido da marcação

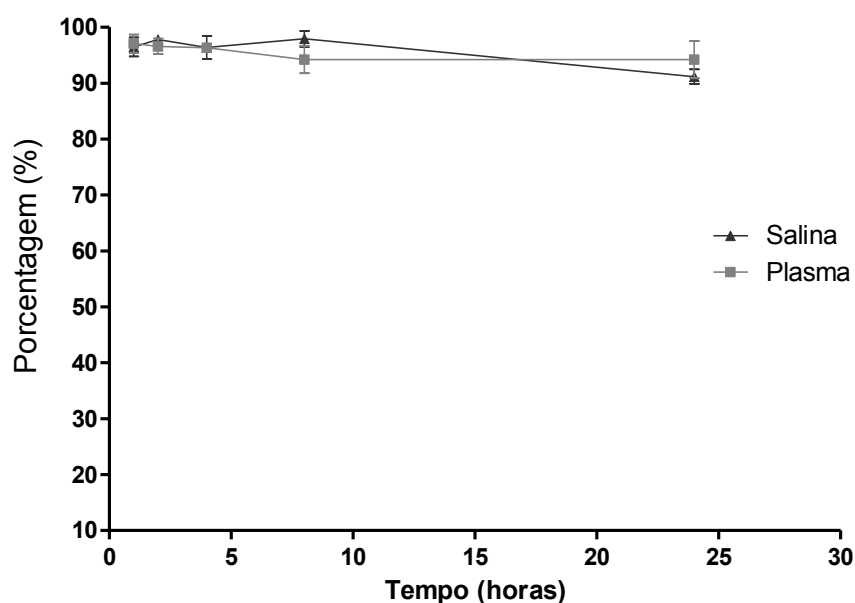
utilizando o filtro de seringa 0,45 μm . Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores utilizando NE com outros componentes (CHHABRA et al., 2011; KAUR et al., 2017).

A determinação do rendimento de marcação é importante indicador da qualidade da imagem e da confiabilidade dos ensaios de biodistribuição. Valores superiores a 90% são propostos pela Farmacopéia Americana (USP) e Européia e recomendados para início dos ensaios *in vivo* (MONTEIRO, 2012).

4.6. ESTABILIDADE DA RADIOMARCAÇÃO $^{99\text{m}}\text{Tc-NE-LP}$

A estabilidade do complexo $^{99\text{m}}\text{Tc-NE}$ foi testada em presença de solução salina 0,9 % (p/v) e plasma de camundongo à 37°C sob agitação. Os resultados indicaram alta estabilidade (>90%) nas duas condições testadas (**figura 29**).

Figura 29 – Estabilidade radioquímica do $^{99\text{m}}\text{Tc-NE-LP}$ em salina e plasma.



Fonte: próprio autor.

Como discutido anteriormente, a estabilidade da marcação é fundamental para assegurar uma imagem de qualidade e a correta interpretação dos resultados *in vivo* (SAHA, 2010). Portanto, valores de estabilidade superiores a 90%, como os apresentados para $^{99m}\text{Tc-NE}$, credeciam esse sistema para estudos posteriores em animais.

5. CONCLUSÃO

Nos estudos apresentados neste capítulo foi possível encapsular o LP em nanoemulsões, óleo em água, de forma eficaz sem alterações significativas em seu diâmetro, índice de polidispersão ou carga superficial. O ensaio de estabilidade indicou melhor encapsulação e estabilidade da formulação na concentração de 0,5 mg/mL em até 15 dias. A radiomarcagem da nanoemulsão se mostrou com baixo nível de impurezas e facilmente reproduzível, apresentando estabilidade elevada em até 24 horas. Portanto, o sistema apresenta características promissoras para posteriores estudos em modelo experimental de tumores sólidos.

CONCLUSÃO GERAL

Com os resultados apresentados nesse trabalho pode-se concluir que foi possível a realização da marcação do lapachol com tecnécio-99m, com baixos níveis de impurezas e estabilidade elevada em até 24 horas. Ensaio *in vivo* indicaram rápida depuração sanguínea e maior captação tumoral comparada ao tecido controle. Esses achados indicam a potencialidade do complexo $^{99m}\text{Tc-LP}$ como marcador tumoral em modelo experimental de tumor de mama 4T1.

Em adição também foi demonstrada nesse trabalho a encapsulação eficaz e estável do lapachol em nanoemulsões na concentração 0,5 mg/mL, sem alterar as características físico-químicas do nanossistema com liberação do fármaco de forma retardada. A radiomarkagem das nanoemulsões se mostrou reprodutível, eficaz e com baixo nível de impurezas, além de estabilidade elevada em até 24 horas. O sistema se mostrou promissor para estudos de atividade antitumoral em modelos experimentais.

PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados demonstram um grande potencial das NE contendo LP encapsulado, permitindo sua utilização como plataforma anticâncer. Contudo, novos estudos devem ser conduzidos para avaliar o real potencial do sistema proposto:

- ❖ Avaliação da estabilidade das NE a longo prazo;
- ❖ Avaliação das propriedades físico-químicas após procedimento da radiomarcagem;
- ❖ Ensaios de depuração sanguínea das NE radiomarcadas em animais saudáveis;
- ❖ Estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas em animais com tumor de mama murino;
- ❖ Comparação da farmacocinética das NE brancas com NE com LP encapsulado, ambas radiomarcadas;
- ❖ Avaliação da atividade das ^{99m}Tc -NE-LP em modelo experimental de tumor.
- ❖ Avaliação da toxicidade do sistema *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMUHAIDEB, A.; PAPATHANASIOU, N.; BOMANJI, J. 18F-FDG PET/CT imaging in oncology. **Annals of Saudi medicine**, v. 31, n. 1, p. 3–13, 2011.

ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Agência Sanitária Nacional de Vigilância**, p. 1–12, 2003.

ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 57–59, 2002.

AVRANAS, A.; STALIDIS, G. Interfacial properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized with binary mixtures of surfactants: II. Effect of a cationic surfactant on a nonionic surfactant stabilized emulsion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 143, n. 1, p. 180–187, 1 abr. 1991.

BALASSIANO, I. T.; DE PAULO, S. A.; SILVA, N. H.; CABRAL, M. C.; CARVALHO, M. D. G. D. C. Demonstration of the lapachol as a potential drug for reducing cancer metastasis. **Oncology Reports**, v. 13, n. 2, p. 329–333, 2005.

BAO, G.; MITRAGOTRI, S.; TONG, S. Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 15, n. 1, p. 253–282, 11 jul. 2013.

Bertrand, N.; Wu, J.; Xu, X.; Kamaly, N.; Farokhzad, O. C. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced drug delivery reviews**, v. 66, p. 2–25, fev. 2014.

BRASIL, M. DA S. **INCA - Câncer - Tipo - Mama**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama>. Acesso em: 16 fev. 2018a.

BRASIL, M. DA S. **Sistematização do Diagnóstico - INCA**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=47>. Acesso em: 18 fev. 2018b.

BRASIL, M. DA S. **Exames Complementares no Diagnóstico do Câncer - INCA**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=50>. Acesso em: 16

fev. 2018c.

BRASIL, M. DA S. **Estadiamento - INCA**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=54>. Acesso em: 18 fev. 2018d.

BRASIL, M. DA S. **Controle do câncer: uma proposta de integração ensino - serviço**. 2. ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer, 1999.

BRASIL, M. DA S. **ABC do Câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 2. ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2012.

BRASIL, M. DA S. **Estimativa | 2018 Incidência de Câncer no Brasil**. Instituto Nacional do Câncer, 2018a.

BRASIL, M. DA S. PORTARIA CONJUNTA Nº 04. 2018b.

BROUWERS, J.; BREWSTER, M. E.; AUGUSTIJNS, P. Supersaturating Drug Delivery Systems: The Answer to Solubility-Limited Oral Bioavailability? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 8, p. 2549–2572, 1 ago. 2009.

BRUSCHI, M. L. Drug delivery systems. In: **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**. Elsevier, 2015. p. 87–194.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsions As Parenteral Drug Delivery Systems. **Quimica Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

CARLESSO, F. N.; ARAÚJO, R. S.; FUSCALDI, L. L.; MIRANDA, S. E.M.; RUBELLO, D.; TEIXEIRA, C. S.; DOS REIS, D. C.; LEITE, E. A.; SILVEIRA, J. N.; FERNANDES, S. O. A.; CASSALI, G. D.; DE OLIVEIRA, M. C.; COLLETTI, P. M.; DE BARROS, ANDRÉ L.B; CARDOSO, V. N. Preliminary data of the antipancreatic tumor efficacy and toxicity of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin. **Nuclear Medicine Communications**, v. 37, n. 7, p. 727–734, jul. 2016.

CHALELA, W. A.; MENEGHETTI, J. C. Radiotraçadores. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 86, p. 14–15, abr. 2006.

CHERRY, S.; SORENSON, J.; PHELPS, M. **Physics in Nuclear Medicine**. Elsevier,

2012.

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 Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 8, p. 907–916, 14 ago. 2011.

CHO, K.; WANG, X.; NIE, S.; CHEN, Z.; SHIN, D. M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1310–1316, 1 mar. 2008.

CHRISTIAN, P. E. .; WATERSTRAM-RICH, K. M. **Nuclear Medicine and PET/CT Technology and Techniques**. 7. ed. Elsevier Mosby, 2012. v. 7

DAWIDCZYK, C. M. et al. State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. **Journal of Controlled Release**, v. 187, p. 133–144, 10 ago. 2014.

DA SILVA, ANA M. P.; DE PAIVA, S. R.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, MARIA A. C. Atividade Biológica de Naftoquinonas de Espécies de Bignoniaceae Biological Activity of Naphthoquinones from Bignoniaceae Species. **Revista Fitos**, v. 7, 2012.

DE ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, fev. 2005.

DE BARROS, A. L. B.; MOTA, L. D. G.; FERREIRA, C. D. A.; DE OLIVEIRA, M. C.; DE GÓES, A. M.; CARDOSO, V. N. Bombesin derivative radiolabeled with technetium-99m as agent for tumor identification. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 21, p. 6182–6184, 1 nov. 2010.

DEKIĆ, L.; PRIMORAC, M. Microemulsions and Nanoemulsions as Carriers for Delivery of NSAIDs. In: **Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Formulation Challenges and Potential Benefits**. Elsevier, 2017. p. 69–94.

EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; FIORITO, S.; MATHIEU, V.; KISS, R. Lapachol and its congeners as anticancer agents: A review. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 37–49, 2014.

FAYAD, S. J.; RAMOS, B. G. Z.; MINATTI, E.; SOLDI, V. Nanopartículas Obtidas a Partir Da Proteína Isolada De Soja (SPI) Pelo Método de Coacervação em Água : Efeito da Força Iônica e das Concentrações de Proteína e Surfactante Surfactante . **Anais do 10 Congresso Brasileiro de Polímeros**, 2009.

FERNANDES, R. S. **AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CARREGADOS COM DOXORRUBICINA E ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO EM MODELO EXPERIMENTAL**. (Dissertação, Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

FERNANDES, R. S.; SILVA, J. D. O.; LOPES, S. C. A.; CHONDROGIANNIS, S.; RUBELLO, D.; CARDOSO, V. N.; DE OLIVEIRA, M. C.; FERREIRA, L. A. M.; DE BARROS, A. L. B. Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification. **Nuclear medicine communications**, v. 37, n. 3, p. 307–12, mar. 2016a.

FERNANDES, R. S.; FERREIRA, D. D. S.; FERREIRA, C. D. A.; GIAMMARILE, F.; RUBELLO, D.; DE BARROS, A. L. B. Development of imaging probes for bone cancer in animal models. A systematic review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1253–1264, out. 2016b.

FILHO, G. B. Distúrbios do Crescimento e da Diferenciação Celular. In: **Bogliolo Patologia**. 7. ed. Belo Horizonte: Guanabara Koogan, 2006. p. 1492.

FONSECA, S. G. C.; DA SILVA, L. B. L.; CASTRO, R. F.; DE SANTANA, D. P. Validação de metodologia analítica para doseamento de soluções de lapachol por CLAE. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 157–159, fev. 2004.

FONSECA, S. G. DA C.; BRAGA, R. M. C.; DE SANTANA, D. P.. Lapachol – química, farmacologia e métodos de dosagem. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 84, n. 1, p. 9–16, 2003.

FUSCALDI, L. L. **Emprego do peptídeo 99mTc-HYNIC-βAla-Bombesina(7-14) na identificação de tumor de próstata da linhagem LNCaP em modelo experimental.** (Dissertação, Mestrado em Ciências Farmacêuticas) UFMG, 2012.

GODSEY, M. E.; SURYAPRAKASH, S.; LEONG, K. W. Materials innovation for co-delivery of diverse therapeutic cargos. **RSC advances**, v. 3, n. 47, p. 24794–24811, 2013.

GUILHEN, S. N.; PIRES, M. A. F.; DANTAS, E. S. K.; XAVIER, F. V. Validação de metodologia analítica para determinação de mercúrio total em amostras de urina por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS): estudo de caso. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1285–1290, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HONG, H.; ZHANG, Y.; SUN, J.; CAI, W. Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. **Nano today**, v. 4, n. 5, p. 399–413, 1 out. 2009.

HOWLADER, N.; CHEN, V. W.; RIES, L. A. G.; LOCH, M. M.; LEE, R.; DE SANTIS, C.; LIN, C. C.; RUHL, J.; CRONIN, K. A. Overview of breast cancer collaborative stage data items-their definitions, quality, usage, and clinical implications: A review of SEER data for 2004-2010. **Cancer**, v. 120, p. 3771–3780, 1 dez. 2014.

HSU, J.-P.; NACU, A. Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 259, n. 2, p. 374–381, 15 mar. 2003.

HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V. U.; MIANA, G. A.; GREEN, I. R. Lapachol: An overview. **Arkivoc**, v. 2007, n. 2, p. 145, 23 ago. 2007.

INCA - CÂNCER - Tipo - Mama - Fatores de risco. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/fatores_de_

risco_1>. Acesso em: 21 mar. 2018.

INMETRO. ORIENTAÇÕES SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIOS QUÍMICOS - DOQ-CGCRE-008. **Instituto Nacional de Metrologia e Normalização e Qualidade Industrial**, 2003.

JAHANGIRIAN, H.; LEMRASKI, E. G.; WEBSTER, T. J.; RAFIEE-MOGHADDAM, R.; ABDOLLAHI, Y. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 2957–2978, 2017.

JÚNIOR, A. G. B. **Projeto de sistemas cromatográficos para a separação de lapachol**. (Tese, Doutorado em Ciências) Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

JUNIOR, E. DA S.; , IVANA ZANELLA , RENATA RAFFIN, V. C.; SOUZA, B. E L. O. Formação de nanoemulsões do tipo óleo em água contendo óleo de semente de romã. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas**, v. 14, n. 1, p. 115–122, 2013.

KAUR, A.; GUPTA, S.; TYAGI, A.; SHARMA, R. K.; ALI, J.; GABRANI, R.; DANG, S. Development of Nanoemulsion Based Gel Loaded with Phytoconstituents for the Treatment of Urinary Tract Infection andin VivoBiodistribution Studies. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 7, n. 4, p. 611–619, dez. 2017.

KOURNIATIS L. R.; SPINELLI, L. S.; MANSUR, C. R. E.; GONZÁLEZ, G. Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 295–300, 2010.

LAFEPE. **LAFEPE LAPACHOL - Bula**. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/bula/2992/lafepe_lapachol.htm>. Acesso em: 13 abr. 2017.

LANZILLOTTI, P. F. **Sistema para liberação modificada de fármacos. (Monografia)** p. 117. Fundação Oswaldo Cruz. 2012.

LI, Y.; ZHENG, J.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-soluble bioactive compounds: Influence of formulation parameters on Polymethoxyflavone crystallization. **Food hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 517–528, 1 jun. 2012.

LIU, E-H.; QI, L-W.; WU, Q.; PENG, Y-B.; LI, P. Anticancer agents derived from natural products. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 9, n. 13, p. 1547–55, 2009.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.

LUI, C. Y.; AYENI, A. A.; GYLLENHAAL, C.; GROVES, M. J. Some Formulation Properties of Lapachol, A Potential Oncolytic Agent of Natural Origin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 11, n. 9–10, p. 1763–1779, 20 jan. 1985.

MADEO, J.; ZUBAIR, A.; MARIANNE, F. A review on the role of quinones in renal disorders. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 139, dez. 2013.

MAEDA, M.; MURAKAMI, M.; TAKEGAMI, T.; OTA, T. Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 229, n. 2, p. 232–238, 2008.

MANKOFF, D. A. A definition of molecular imaging. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 48, n. 6, p. 18N, 21N, jun. 2007.

MARESCA, K. P.; HILLIER, S. M.; FEMIA, F. J.; ZIMMERMAN, C. N.; LEVADALA, M. K.; BANERJEE, S. R.; HICKS, J.; SUNDARARAJAN, C.; VALLIANT, J.; ZUBIETA, J.; ECKELMAN, W. C.; JOYAL, J. L.; BABICH, J. W. Comprehensive Radiolabeling, Stability, and Tissue Distribution Studies of Technetium-99m Single Amino Acid Chelates (SAAC). **Bioconjugate Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 1625–1633, 19 ago. 2009.

MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. **Radiologia Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 233–239, 2001.

MARQUES, V. A. A. **Investigação dos efeitos do extrato bruto de *Tabebuia avellanedae* e do princípio ativo isolado β -lapachona sobre alguns parâmetros imunológicos em camundongos portadores do tumor ascítico de ehrlich.** (Tese, Doutorado em Fisiopatologia Médica) Universidade Estadual de Campinas, 2006.

MATOS, J. C. DE; PELLOSO, S. M.; CARVALHO, M. D. D. B. Prevalência de fatores de risco para o câncer de mama no município de Maringá, Paraná. **Revista Latino-Americano Enfermagem**, v. 18, n. 3, p. 57–64, 2010.

MONTEIRO, E. D. G. **ESTUDO COMPARATIVO ENTRE METODOLOGIAS DE CROMATOGRAFIA PLANAR PARA CONTROLE RADIOQUÍMICO DE RADIOFÁRMACOS DE TECNÉCIO-99m.** (Dissertação, mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear). Universidade de São Paulo - IPEN, 2012

MONTEIRO, L. O. F. et al. Technetium-99m radiolabeled paclitaxel as an imaging probe for breast cancer in vivo. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 89, p. 146–151, maio 2017.

MOURA, L. P. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LEUCÓCITOS MARCADOS COM ^{99m}Tc -ECD NA IDENTIFICAÇÃO DE PROCESSO INFLAMATÓRIO NA PELE ÍNTEGRA DE MEMBROS POSTERIORES ISQUÊMICOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 2.** (Dissertação em Análises Clínicas e Toxicológicas). Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUSPENSÕES COLOIDAIAS DE NANOCARREADORES LIPÍDICOS CONTENDO RESVERATROL DESTINADOS À ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA. **Quim. Nova**, v. 34, n. 3, p. 408–413, 2011.

NEPOMUCENO, J. C. **Lapachol and its derivatives as potential drugs for cancer treatment.** iConcept Press, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

Nomura, D. A.; Enoki, T. A.; Goldman, C.; Lamy, M. T. Espalhamento dinâmico de luz.

Apostila para a 2ª Escola de Colóides da USP, p. 1–18, 2014.

ODA, C. M. R. **DESENVOLVIMENTO DE MICELAS POLIMÉRICAS CARREADORAS DE PACLITAXEL RADIOMARCADAS COM TECNÉCIO-99m PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO DE CÂNCER**. (Dissertação, Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

OTOMO, J. I. **Desenvolvimento E Validação De Metodologia Analítica Para Determinação De Hormônios, Considerados Disruptores Endócrinos, Nas Águas Destinadas Ao Abastecimento Público Na Região Do Rio Paraíba Do Sul, Sp**. (Dissertação, Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais). Universidade de São Paulo - IPEN, 2010.

PATRAVALE, V.; DANDEKAR, P.; JAIN, R. Nanoparticulate systems as drug carriers: the need. In: **Nanoparticulate Drug Delivery**. Elsevier, 2012. p. 1–28.

PATRICK, G. L. Anticancer Agents. In: **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5. ed. Oxford: Oxford University Press, 2013. p. 804.

PERES, R. S.; SANTOS, G. B.; CECILIO, N. T.; JABOR, V. A. P.; NIEHUES, M.; TORRES, B. G. S.; BUQUI, G.; SILVA, C. H. T. P.; COSTA, T. D.; LOPES, N. P.; NONATO, M. C.; RAMALHO, F. S.; LOUZADA-JÚNIOR, P.; CUNHA, T. M.; CUNHA, F. Q.; EMERY, F. S.; ALVES-FILHO, J. C. Lapachol, a compound targeting pyrimidine metabolism, ameliorates experimental autoimmune arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 19, n. 1, p. 47, 7 dez. 2017.

PIMENTA, V. DE S. C. **Propriedades citotóxicas da β -lapachona em células de osteossarcoma canino in vitro**. (Tese, Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás, 2015.

PINHO, A. C.; DE ASSIS, M. CÂNCER DE MAMA: O QUE A MULHER PRECISA SABER? **Correio Braziliense**, p. 13, 2016.

PINTO, A. V.; CASTRO, S. L. DE. The Trypanocidal Activity of Naphthoquinones: A Review. **Molecules**, p. 4570–4590, 2009.

RADIN, A. **Preparo e avaliação de complexos de [^{99m}Tc] tecnécio aquacarbonil contendo ligantes 1,2-diamino-N-suistituídos para detecção de tumores.** (Dissertação, Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, 2010.

RAI, V. K. et al. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of Controlled Release**, v. 270, p. 203–225, 28 jan. 2018.

RAO, K. V; MCBRIDE, T. J.; OLESON, J. J. Recognition and Evaluation of Lapachol as an Antitumor Agent. **American Association for Cancer Research**, v. 28, n. 10, p. 1952–1954, 1968.

SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. New York, NY: Springer New York, 2010. v. 9

SANTOS, J. DA S. **AVALIAÇÃO DA RADIOMARCAÇÃO DA ANEXINA A5 COM TECNÉCIO- ^{99m}: INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE MARCAÇÃO NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO COMPOSTO.** (Tese, Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear- Aplicações). Universidade de São Paulo - IPEN, 2009.

SCHWOCHAU, K. **Technetium**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000.

SILVA, A. M. P.; PALVA, S. R.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Atividade Biológica de Naftoquinonas de Especies de Bignoniaceae. **Revista Fitos**, v. 7, n. 207, 2012.

SILVA, J. DE O. **AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO E DA TOXICIDADE AGUDA IN VIVO DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO DOXORRUBICINA.** (Dissertação, Mestrado em Análises Clínicas e Toxicológicas) Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

SILVA, M. N. DA; FERREIRA, V. F. .; SOUZA, M. C. B. V. DE. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407–416, 2003.

SOUSA, E. T.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. DE. SOURCES, FORMATION, REACTIVITY AND DETERMINATION OF QUINONES IN THE ATMOSPHERE. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 486–495, 2016.

SOUZA, P. M. S.; LOBO, F. A.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 132–137, 2012.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. World cancer report 2014. **World Health Organization**, p. 1–2, 2014.

STYLIANOPOULOS, T.; JAIN, R. K. Design considerations for nanotherapeutics in oncology. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 11, n. 8, p. 1893–907, nov. 2015.

THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. **Medicina Nuclear**. London: Guanabara Koogan, 2003.

TOMAZELLI, J. G.; MIGOWSKI, A.; RIBEIRO, C. M.; DE ASSIS, M.; DE ABREU, D. M. F. Avaliação das ações de detecção precoce do câncer de mama no Brasil por meio de indicadores de processo: estudo descritivo com dados do Sismama, 2010-2011. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 26, n. 1, p. 61–70, jan. 2016.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; MACHADO, L. F.; BORTOLETI, B. T. D. S.; SAHD, C. S.; CHAGAS, A. F.; ASSOLINI, J. P.; OLIVEIRA, F. J. D. A.; PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I.; COSTA, I. N.; MELANDA, F. N. Nanotechnology as a potential therapeutic alternative for schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 174, p. 64–71, 1 out. 2017.

USP. **The United States Pharmacopeia National Formulary**. 34. ed. Rockville, 2012.

WARREN, D. B.; BENAMEUR, H.; PORTER, C. J. H.; POUTON, C. W. Using polymeric precipitation inhibitors to improve the absorption of poorly water-soluble drugs: A mechanistic basis for utility. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, n. 10, p. 704–731, 26 dez. 2010.

ZSILA, F.; FITOS, I. Combination of chiroptical, absorption and fluorescence spectroscopic methods reveals multiple, hydrophobicity-driven human serum albumin binding of the antimalarial atovaquone and related hydroxynaphthoquinone compounds. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 8, n. 21, p. 4905, 13 out. 2010.

ANEXO I

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 283/2017

Título do projeto: Radiomarcagem do Lapachol e estudos de biodistribuição

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Andre Luis Branco de Barros

Unidade: Faculdade de Farmacia

Departamento: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 23/10/2017. Validade: 23/10/2017 à 22/10/2022
Belo Horizonte, 24/10/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de [Minas Gerais](#)
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br