

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS POR POLIMERIZAÇÃO
RADICALAR (RAFT) PARA VETORIZAÇÃO BIODIRIGIDA DE TAMOXIFENO

Tailane Sant'Anna Moreira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto
Márcio Nele de Souza
Luís Mauricio Trambaioli da Rocha
e Lima

Rio de Janeiro
Julho de 2015

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS POR POLIMERIZAÇÃO
RADICALAR (RAFT) PARA VETORIZAÇÃO BIODIRIGIDA DE TAMOXIFENO

Tailane Sant'Anna Moreira

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM
ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto, D.Sc.

Prof. Marcio Nele de Souza, D.Sc.

Prof. Luís Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima, D.Sc.

Prof^a. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

Prof^a. Bartira Rossi Bergmann, D.Sc.

Dr. Jorge Carlos Santos da Costa, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JULHO DE 2015

Moreira, Tailane Sant`Anna

Síntese de nanopartículas poliméricas por polimerização controlada (RAFT) para vetorização biodirigida de tamoxifeno/ Tailane Sant`Anna Moreira. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2015.

XXIII, 203 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Márcio de Souza Nele

Luís Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2015.

Referências Bibliográficas: p. 179-203.

1. Polimerização Radicalar Controlada. 2. Liberação vetorizada de nanopartículas poliméricas. 3. Polímeros para aplicações biomédicas. I. Pinto, José Carlos Costa da Silva, *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título

Aos meus pais, Evandro e Miriam, pela melhor companhia, pela eterna compreensão e carinho, pela disponibilidade, dedicação plena, absoluta, infinita e pelos incontáveis esforços para que esta tese e todos os meus sonhos fossem realizados. Meus exemplos de amor, vida, valores, perseverança, determinação, garra e trabalho.

AGRADECIMENTOS

A meus orientadores, Professores José Carlos, Márcio e Luís Mauricio, pela oportunidade, apoio, orientações e pela confiança depositada numa farmacêutica na engenharia.

À Faculdade de Farmácia da UFRJ, aos ex-diretores Carlos Rangel e Lucio Mendes Cabral, à diretora atual Gisela Dellamora Ortiz e à minha chefia imediata Valéria Pereira de Sousa, por me concederem liberação parcial para cursar o doutorado.

Aos membros do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO): os técnicos Luiz Sérgio Junior e Ivone Rosa, pelo apoio para realização das análises de MEV e MET, respectivamente; à M.Sc. Renata Carvalho, pela indicação do uso de para-formaldeído 4% nas análises de MET; e ao Dr. Celso Santanna, pelo apoio na imunomarcção.

Ao pesquisador Dr. Flávio Alves Lara, do Laboratório de Microbiologia Celular do Pavilhão Hanseníase da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), pelo apoio para realização das análises de captação celular.

À minha família: meu pai, minha mãe, meu irmão, minha cunhada e meus sobrinhos que sempre me apoiaram nesta escolha. Ao meu namorado, Alicio, pelo amor, carinho, compreensão, dedicação e enorme paciência (sempre!) em todas as etapas.

À amiga Laís, por ter me levado para o PEQ, por ter me dado essa oportunidade, por ter acreditado em mim, por ter tornado o doutorado uma realidade na minha vida, por ser minha mentora, “mãe”, amiga, uma inspiração e meu grande exemplo. Minha eterna gratidão.

Ao Marco Antônio, colega de Faculdade de Farmácia e de LMSCP, por ter me ajudado com o pontapé inicial, por ter acreditado em mim, por ter me confiado seus conhecimentos e aprendizados sobre polimerização radicalar controlada e miniemulsão, por ter me orientado nos momentos de desespero com a engenharia.

À minhas queridas amigas que o LMSCP me deu: Aline, Luiza, Marina, Bárbara, Paulinha, Paula Naomi. Em especial a minhas amigas de turma, seminário, de dificuldades, dúvidas e sofrimentos compartilhados: Aline e Paula Naomi. Elas tornaram essa jornada mais leve, mais divertida e mais fácil.

A todos os colegas do PEQ. Em especial ao Rodrigo Brackmann, pela paciência, competência e disponibilidade durante o ciclo de disciplinas, o qual foi

fundamental para que eu conseguisse em pouco tempo absorver os conhecimentos necessários.

A todos os colegas do LMSCP, em especial ao corpo técnico, Aderne, Larissa, Nathalie, Rhanayara, Thamyres, pela ajuda, análises, disponibilidade e paciência.

Aos colegas do LabCQ e da Faculdade de Farmácia da UFRJ, Mayre, Maria do Socorro, Eliane, Ana Luiza, Victor, Luiz Antonio, Marcel, Wallace, Natalia e Felipe, que me apoiaram durante todos esses anos e me ajudaram a conciliar o trabalho e a pós-graduação, com incontáveis esforços para suprir as minhas ausências do trabalho.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS POR POLIMERIZAÇÃO RADICALAR (RAFT) PARA VETORIZAÇÃO BIODIRIGIDA DE TAMOXIFENO

Tailane Sant'Anna Moreira

Julho / 2015

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Márcio Nele de Souza

Luís Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima

Programa: Engenharia Química

O tamoxifeno (TXF) é o único agente hormonal aprovado para prevenção do câncer de mama. Contudo, apresenta baixa biodisponibilidade. Uma estratégia para sobrepor esta barreira é a veiculação de TXF em nanopartículas poliméricas (NPPs).

Uma das técnicas usadas para a produção de NPPs é a polimerização radicalar controlada RAFT: reação via radical livre na presença de agentes de transferência de cadeia que permitem que as cadeias cresçam de maneira similar e controlada. Esta técnica ainda permite que o polímero formado seja conjugado com uma molécula biológica: chave para vetorização de fármacos inclusos em NPPs.

Desta maneira, o principal objetivo deste trabalho foi estudar a polimerização em miniemulsão de metacrilato de metila na presença de TXF a fim de produzir NPPs carregadas com TXF e conjugá-las com albumina para serem utilizadas com maior seletividade na terapia contra o câncer de mama.

As NPPs carregadas com TXF base livre (TXFb) foram obtidas com sucesso pela técnica RAFT utilizando AIBN como iniciador na proporção monômero: iniciador: agente RAFT [400:1:2] a 80 °C na presença de 10,0% (p/p) de TXFb em relação ao monômero. Os resultados mostraram que presença do fármaco não afetou significativamente a cinética da reação, pois obteve-se aproximadamente 100% de conversão; a distribuição de massas molares; o índice de polidispersão, que se manteve próximo a 1,1; nem o tamanho de partícula das nanopartículas obtidas; de diâmetro de cerca de 120 nm. Essas partículas ainda foram eficientemente conjugadas quimicamente com albumina e captadas em maior quantidade por células THP-1 quanto maior a concentração de TXF na NPP.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

SYNTHESIS OF POLIMERIC NANOPARTICLES BY RAFT CONTROLLED RADICAL
POLYMERIZATION FOR TARGET RELEASE OF TAMOXIFEN

Tailane Sant'Anna Moreira

July / 2015

Advisors: José Carlos Costa da Silva Pinto

Márcio Nele de Souza

Luís Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima

Department: Chemical Engineering

Tamoxifen (TXF) is the only hormonal agent approved for breast cancer prevention. However, it shows low bioavailability. A strategy to overcome this barrier is including TXF in polymeric nanoparticles (PNPs).

One of the techniques used to Produce PNPs is named RAFT controlled radical polymerization: a free radical reaction in the presence of chain transfer agents which allow the chains to grow in a controlled and similar manner. This technique also allows the formed polymer to be conjugated to a biological molecule: key for site specific delivery of drugs included in PNPs.

Thus, the main objective of this work was to study the polymerization of methyl methacrylate miniemulsion in the presence of TXF to produce PNPs loaded with TXF and conjugate them with albumin to use with more selectivity in breast cancer therapy.

The PNPs loaded with TXF free base (TXFb) were successfully obtained by the RAFT technique using AIBN as the initiator at a ratio of monomer: initiator: RAFT Agent [400: 1: 2] at 80 ° C in the presence of 10.0% (w/w) of TXFb relative to the monomer. The results showed that the presence of the drug did not significantly affect the kinetics of the reaction, since it was reached about 100% of conversion; the distribution of molecular weights; the polydispersity index, which remained close to 1.1; or the particle size of the obtained nanoparticles; with about 120 nm diameter. These particles were also efficiently chemically conjugated with albumin and captured by THP-1 cells the greater the concentration of TXF in PNP..

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1.	TAMOXIFENO NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA	5
2.1.1.	EPIDEMIOLOGIA	5
2.1.2.	CARCINOGENESE MAMÁRIA E OS EFEITOS DO ESTROGÊNIO	7
2.1.3.	TAMOXIFENO (TXF)	8
2.1.3.1.	Mecanismo de Ação	9
2.1.3.2.	Características Físico-químicas do TXF	11
2.1.3.3.	Farmacocinética	11
2.1.3.4.	Efeitos Adversos	13
2.2.	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS E/OU BIOMOLÉCULAS	14
2.2.1.	NANOPARTÍCULAS (NP)	15
2.3.	DISTRIBUIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS NO ORGANISMO	18
2.4.	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS NA TERAPIA DO CÂNCER	22
2.4.1.	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS E O EFEITO RPE NO TRATAMENTO DO CÂNCER	26
2.4.2.	PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS NA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS ANTI-TUMORAIS	28
2.4.2.1.	Nanopartículas Poliméricas conjugada com Albumina como Estratégia para Liberação Alvo de Fármacos Antitumorais	30
2.5.	PREPARO DE NANOPARTÍCULAS	34
2.5.1.	EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE	35
2.5.2.	SECAGEM POR ASPERSÃO	37
2.5.3.	TÉCNICAS DE POLIMERIZAÇÃO UTILIZADAS NO PREPARO DE NANOPARTÍCULAS	38
2.5.3.1.	Polimerização em Emulsão	38

2.5.3.2.	Polimerização em Miniemulsão	44
2.5.3.2.1.	<i>Técnicas de Homogeneização</i>	46
2.5.3.2.2.	<i>Mecanismo de Polimerização em Miniemulsão</i>	48
2.5.3.2.3.	<i>Distribuição do Tamanho de Partícula</i>	50
2.6.	POLIMERIZAÇÃO VIA RADICAL LIVRE X RAFT	51
2.6.1.	POLIMERIZAÇÃO VIA RADICAL LIVRE	51
2.6.2.	POLIMERIZAÇÃO RAFT	55
2.6.3.	MECANISMOS DE POLIMERIZAÇÃO RAFT	57
2.6.3.1.	CTAs, Iniciadores e Monômeros	61
2.6.3.2.	Polimerização Polímeros obtidos por RAFT e Conjugação com Proteínas	65
2.6.4.	POSSÍVEIS INTERFERÊNCIAS DA INCORPORAÇÃO DE FÁRMACOS <i>IN SITU</i>	67
2.7.	COMENTÁRIOS FINAIS	69
3.	OBJETIVOS DA TESE	70
3.1.	OBJETIVOS	70
3.1.1.	OBJETIVO GERAL	70
3.1.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	70
3.2.	JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	71
4.	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	73
4.1.	REAGENTES	73
4.1.1.	MATÉRIA-PRIMA E SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)	78
4.2.	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	78
4.3.	MÉTODOS	82
4.3.1.	ANÁLISE DA MATÉRIA-PRIMA CITRATO DE TAMOXIFENO	82
4.3.1.1.	Identificação por Espectrofotometria no Infravermelho (IR)	83
4.3.1.2.	Identificação por Espectrofotometria de Ultravioleta (UV)	83

4.3.1.3.	Distribuição de Tamanho de Partícula	83
4.3.1.4.	Dissolução por Dispersão	84
4.3.1.5.	Ponto de Fusão	85
4.3.1.6.	Metais Pesados	86
4.3.1.7.	Cinzas Sulfatadas	88
4.3.1.8.	Limite de Enantiômero <i>E</i>	89
4.3.1.9.	Perda por Dessecação	89
4.3.1.10.	Doseamento	90
4.3.1.11.	Degradação Térmica	91
4.3.2.	REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO	92
4.3.2.1.	Unidade Experimental	92
4.3.2.2.	Reação de Polimerização em Miniemulsão	93
4.3.2.3.	Avaliação da Solubilidade do Fármaco nos Monômeros	96
4.3.2.4.	Reação de Polimerização em Miniemulsão na Presença do Fármaco <i>in situ</i>	96
4.3.3.	SECAGEM DAS NANOPARTÍCULAS	98
4.3.4.	CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO	98
4.3.4.1.	Conversão por Gravimetria	98
4.3.4.2.	Identificação por Espectrofotometria no Infravermelho (IR)	99
4.3.4.3.	Distribuição da Massa Molar do Polímero	99
4.3.4.4.	Determinação da Distribuição do Tamanho de Partícula	100
4.3.4.5.	Eficiência de Encapsulamento do Fármaco	101
4.3.4.6.	Interação fármaco-polímero	102
4.3.4.6.1.	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	<i>102</i>
4.3.4.6.2.	<i>Espectrofotometria de Infravermelho (IR)</i>	<i>102</i>
4.3.4.7.	Tensão Interfacial	103

4.3.4.8.	Avaliação Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura	104
4.3.4.9.	Estudos de Liberação do Fármaco da Nanopartícula	104
4.3.4.9.1.	<i>Escolha da Solução Receptora</i>	104
4.3.4.9.2.	<i>Montagem e Utilização da Célula de Difusão Vertical</i>	105
4.2.4.9.2.	<i>Estudo da Cinética de Liberação do Fármaco</i>	107
4.3.5.	REAÇÕES DE BIOCONJUGAÇÃO	108
4.3.5.1.	Reação de Bioconjugação com Polímero Seco	109
4.3.5.2.	Reação de Bioconjugação com Polímero em Látex	110
4.3.5.3.	Reação de Bioconjugação com Polímero em Látex na Presença de Maleimida PEG-NHS MW 5000	111
4.3.5.4.	Avaliação da Eficácia da Bioconjugação	112
4.3.5.4.1.	<i>Ensaio de Bradford</i>	112
4.3.5.4.2.	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão com Anticorpo anti-anticorpo anti-ablumina</i>	112
4.3.6.	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE CAPTAÇÃO CELULAR	113
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
5.1.	ANÁLISE DA MATÉRIA-PRIMA CITRATO DE TAMOXIFENO	115
5.2.	REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO	123
5.2.1.	REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO E MINIEMULSÃO	124
5.2.2.	REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO E CITRATO DE TAMOXIFENO <i>IN SITU</i>	134
5.2.3.	REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO COM TAMOXIFENO BASE <i>IN SITU</i> E PERÓXIDO DE BENZOÍLA	147
5.2.4.	REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO EM MASSA COM TAMOXIFENO BASE <i>IN SITU</i> E PERÓXIDO DE BENZOÍLA OU AIBN	152
5.2.5.	REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO COM TAMOXIFENO BASE <i>IN SITU</i> E AIBN	154
5.3.	ESTUDOS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	164
5.4.	REAÇÃO DE BIOCONJUGAÇÃO COM ALBUMINA	166

5.4.1.	REAÇÃO DE BIOCONJUGAÇÃO COM POLÍMERO SECO	167
5.4.2.	REAÇÃO DE BIOCONJUGAÇÃO COM POLÍMERO EM LÁTEX	170
5.4.3.	REAÇÃO DE BIOCONJUGAÇÃO COM POLÍMERO EM LÁTEX NA PRESENÇA DE MALEIMIDA PEG-NHS MW 5000	171
5.5.	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE CAPTAÇÃO CELULAR	175
6.	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	179
6.1.	CONCLUSÕES	179
6.2.	SUGESTÕES	182
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	183

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula molecular do citrato de tamoxifeno	9
Figura 2. Principais produtos do metabolismo do TXF (MARRERO-ALONSO <i>et al.</i> , 2013)	12
Figura 3. Exemplos das diferentes morfologias de nanopartículas poliméricas: (A) cápsula (sistema reservatório) e (B) esfera (sistema matricial) (KUMARI <i>et al.</i> , 2010)	16
Figura 4. Estrutura cristalográfica de Raio-X da albumina de soro humano (Khan & Khan, 2008)	31
Figura 5. A tecnologia Nab permite tornar mais seletiva a liberação de fármacos em células tumorais através da ligação das NP com a albumina (CORTES & SAURA, 2010)	33
Figura 6. Representação esquemática do processo de obtenção de nanopartículas por evaporação de solvente (SEVERINO <i>et al.</i> , 2011)	36
Figura 7. Representação esquemática do processo de obtenção de nanopartículas por secagem por aspersão (PATEL <i>et al.</i> , 2009)	38
Figura 8. Representação esquemática do modelo de nucleação (CHERN <i>et al.</i> , 2006)	42
Figura 9. Taxa de polimerização em função da conversão do monômero para polimerização em emulsão (CHERN <i>et al.</i> , 2006).	42
Figura 10. Mecanismo genérico de reação de polimerização por radicais livres	52
Figura 11. (A) Evolução da massa molar média em função da conversão para polimerização radicalar convencional (- -) e para a polimerização radicalar controlada (-) (B) Distribuição de massas molares média típica de uma polimerização radicalar convencional e de uma polimerização radicalar controlada (MOAD <i>et al.</i> , 2005).	56
Figura 12. Representação genérica de um agente de transferência de cadeia (MOAD <i>et al.</i> , 2005)	57
Figura 13. Mecanismo esquemático de polimerização CLRP do tipo RAFT (MOAD <i>et al.</i> 2005).	59
Figura 14. Arquiteturas moleculares obtidas com o auxílio da polimerização radicalar controlada (York <i>et al.</i> 2008).	60
Figura 15. Diferentes estruturas de agentes de transferência de cadeia tiocarbônicos utilizados em polimerizações RAFT (MOAD <i>et al.</i> , 2006).	61
Figura 16. Características estruturais do CTA e da forma intermediária na adição radicalar (MOAD <i>et al.</i> , 2006)	62

Figura 17. Diretriz para a seleção dos agentes RAFT para várias polimerizações. Para Z, a velocidade de adição diminui e a de fragmentação aumenta da esquerda para a direita. Para R, a velocidade de fragmentação diminui da esquerda para a direita. As linhas pontilhadas indicam controle parcial (larga polidispersão ou retardo substancial da reação) (MOAD et al., 2005).	64
Figura 18. Esquema da unidade experimental usada para conduzir reações de polimerização	92
Figura 19. Demonstração esquemática do reator usada para conduzir as reações de polimerização	94
Figura 20. Medida de tensão interfacial pelo método de gota ascendente: visão lateral e visão frontal da cubeta que contém a gota	103
Figura 21. Célula de difusão vertical adaptada usada nos ensaios de liberação: (A) visão lateral (B) visão superior	106
Figura 22. Espectro de absorção em ultravioleta de citrato de tamoxifeno matéria-prima (–) e citrato de tamoxifeno SQR (–) realizado conforme metodologia da USP 37.	117
Figura 23. Espectro de absorção em infravermelho de citrato de tamoxifeno padrão e matéria-prima em pastilha de KBR a 3% (p/p).	117
Figura 24. Ensaio qualitativo para determinação de metais pesados com a demonstração da observação horizontal (A) e vertical (B) dos tubos contendo as soluções amostra, controle positivo e padrão, respectivamente.	118
Figura 25. Cromatograma representativo do ensaio de Limite de Enantiômero E	119
Figura 26. Curva de distribuição do tamanho de partícula de citrato de tamoxifeno matéria-prima	120
Figura 27. Perfil de dissolução por dispersão da matéria-prima citrato de tamoxifeno. O ensaio foi realizado a 37 °C, em uma proporção de 20 mg de TXF em 1000 mL de fase líquida (HCl 0,02N) com agitação a 100 rpm.	120
Figura 28. Microscopia eletrônica de varredura das formas de polimorfo A (a) e B (b) de citrato de tamoxifeno (TSUHAKO et al., 2007).	121
Figura 29. Termograma de DSC (A) e TGA (B) de citrato de tamoxifeno.	122
Figura 30. Evolução da conversão nas das reações de polimerização em miniemulsão RM1 a RM7 (condições reacionais descritas na página 97).	123
Figura 31. Diagrama molecular do Poli(metacrilato) de metila (PMMA).	126
Figura 32. Espectros de infravermelho de PMMA obtidos nas reações de polimerização em miniemulsão RM6 e RM7.	127
Figura 33. Evolução da massa molar (Mn) com a conversão do monômero para reações de polimerização radicalar controlada RAFT (RM6) e reações de polimerização radicalar convencional (RM7).	128
Figura 34. Evolução do índice de polidispersão para reações de polimerização radicalar controlada RAFT (RM6) e reações de polimerização radicalar convencional (RM7)	129

Figura 35. Distribuições de massas molares para RM6 (A) e RM7 (B). Dados gerados a partir de análise de GPC de reação de polimerização de MMA radicalar convencional e radicalar controlada RAFT em miniemulsão por 7 horas.	130
Figura 36. Evolução da massa molar média (M_n) da reação de polimerização radicalar controlada RAFT de MMA em miniemulsão (RM6) na presença de agente RAFT, usando PBO como iniciador a 90 °C.	130
Figura 37. Variação dos tamanhos médios de partícula com a conversão para reações de polimerização radicalar controlada RAFT (RM6) e reações de polimerização radicalar convencional (RM7).	132
Figura 38. Curva de distribuição do tamanho de partícula para reação de polimerização radicalar controlada RAFT (RM6).	133
Figura 39. Curva de distribuição do tamanho de partícula para reação de polimerização radicalar convencional (RM7)	133
Figura 40. Evolução da conversão nas reações de polimerização radicalar convencional RM7 (sem citrato de tamoxifeno) e RM9 (com citrato de tamoxifeno)	135
Figura 41. Evolução da conversão nas reações de polimerização radicalar controlada RAFT RM6 (sem citrato de tamoxifeno) e RM8 (com citrato de tamoxifeno)	135
Figura 42. Evolução do índice de polidispersão com a conversão do monômero para reações de polimerização radicalar convencional RM7 (sem citrato de tamoxifeno) e RM9 (com citrato de tamoxifeno).	136
Figura 43. Representação gráfica da evolução da massa molar com a conversão do monômero para reações de polimerização radicalar viva controlada RAFT RM6 (sem citrato de tamoxifeno) e RM8 (com citrato de tamoxifeno)	136
Figura 44. Variação do índice de polidispersão com a conversão para as reações de polimerização radicalar convencional RM7 (sem citrato de tamoxifeno) e RM9 (com citrato de tamoxifeno)	137
Figura 45. Variação do índice de polidispersão com a conversão para as reações de polimerização radicalar controlada RAFT RM6 (sem citrato de tamoxifeno) e RM8 (com citrato de tamoxifeno)	137
Figura 46. Distribuição de massa molar para (A) RM7 e RM9; (B) RM6 e RM8. Dados gerados a partir de análise de GPC de reação de polimerização de MMA radicalar convencional e radicalar controlada RAFT em miniemulsão na presença e ausência de citrato de tamoxifeno.	138
Figura 47. Variação do tamanho médio de partícula com a conversão para reação de polimerização radicalar convencional na ausência (RM7) e na presença (RM9) de citrato de tamoxifeno	139
Figura 48. Variação do tamanho de partícula médio com a conversão para reação de polimerização radicalar controlada RAFT na ausência (RM6) e na presença (RM8) de citrato de tamoxifeno	139
Figura 49. Espectros de infravermelho de amostras de PMMA produzidas por polimerização radicalar convencional (A) e polimerização radicalar controlada (B)	141

Figura 50. Termograma de DSC referentes a TXF, PMMA produzido por polimerização radicalar convencional, PMMA produzido por polimerização radicalar controlada, PMMA e TXF produzido por polimerização radicalar convencional, PMMA e TXF produzido por polimerização radicalar controlada.	142
Figura 51. Solubilidade de citrato de tamoxifeno em diferentes monômeros a 25, 60 e 90 °C	145
Figura 52. Análise de tensão interfacial de MMA em água, mistura de MMA e Citrato de tamoxifeno em água, mistura de MMA em água e LSS 1,0% e mistura MMA e Citrato de tamoxifeno em água e LSS 1,0%.	146
Figura 53. Solubilidade de tamoxifeno base em MMA e água a 25, 60 e 90 °C	148
Figura 54. Evolução da conversão nas reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença de tamoxifeno na forma de sal de citrato e de base livre.	149
Figura 55. Variação da massa molar média com a conversão para as reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença de tamoxifeno na forma de sal de citrato e de base livre.	149
Figura 56. Variação do índice de polidispersão com a conversão para as reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença de tamoxifeno na forma de sal de citrato e de base livre.	149
Figura 57. Distribuições de massa molares para os produtos das reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença de tamoxifeno na forma de sal de citrato e de base livre. Dados gerados a partir de análises de GPC dos produtos de reação de polimerização de MMA radicalar convencional e radicalar controlada RAFT em miniemulsão na presença de tamoxifeno na forma de sal de citrato e de base livre.	150
Figura 58. Variação do tamanho de partícula com a conversão para as reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença de tamoxifeno na forma de sal de citrato e de base livre.	150
Figura 59. Reação de polimerização radicalar convencional em miniemulsão na presença de 20,0% (A - RM16) e 5,0% (B - RM15) a 90 °C, na presença de peróxido de benzoíla como iniciador.	151
Figura 60. Evolução da conversão nas reações de polimerização em miniemulsão radicalar convencional na presença de concentrações crescentes de tamoxifeno base 2,5% (RM14), 5,0% (RM15) e 20,0% (RM16).	151
Figura 61. Aparência do polímero obtido nas reações de polimerização em massa de metacrilato de metila na presença de 5,0% (p/p) de tamoxifeno base e PBO como iniciador.	153
Figura 62. Evolução da conversão nas reações de polimerização em miniemulsão radicalar convencional na presença AIBN como iniciador nas proporções monômero:iniciador 400:1 (RM17 e RM19), 200:1 (RM18 e RM20) e na presença de 10,0% (p/p) de TXFb em relação ao monômero.	154

- Figura 63. (A) Evolução da conversão nas reações de polimerização em miniemulsão radicalar controlada RAFT na presença AIBN como iniciador nas proporções monômero:iniciador 200:1 a 70 °C e 200:1 e 400: 1 a 80 °C. (B) Variação de massa molar média como função da conversão nas reações de polimerização em miniemulsão radicalar controlada RAFT na presença AIBN como iniciador nas proporções monômero:iniciador de 200:1 e 400: 1 a 80 °C. 155
- Figura 64. Evolução da conversão nas reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) presença (marcador cheio) e ausência (marcador vazio) de 10,0% (p/p) de tamoxifeno base, em relação ao monômero e AIBN na proporção monômero:iniciador 400:1 a 80°C 158
- Figura 65. Representação gráfica da variação da massa molar com o tempo para as reações de polimerização radicalar convencional (A) e viva controlada RAFT (B) na presença (marcador cheio) e ausência (marcador vazio) de 10,0% (p/p) de tamoxifeno base, em relação ao monômero e AIBN na proporção monômero:iniciador 400:1 a 80°C 158
- Figura 66. Variação da massa molar média com a conversão para as reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença (marcador cheio) e ausência (marcador vazio) de 10,0% (p/p) de tamoxifeno base, em relação ao monômero e AIBN na proporção monômero:iniciador 400:1 a 80°C 158
- Figura 67. Variação do índice de polidispersão com a conversão para as reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença (marcador cheio) e ausência (marcador vazio) de 10,0% (p/p) de tamoxifeno base, em relação ao monômero e AIBN na proporção monômero:iniciador 400:1 a 80°C 159
- Figura 68. Distribuição de massas molares nas reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença (linha cheia) e ausência (linha vazia) de 10,0% (p/p) de tamoxifeno base, em relação ao monômero e AIBN na proporção monômero:iniciador 400:1 a 80°C 159
- Figura 69. Variação dos tamanhos de partícula médios com a conversão para reações de polimerização radicalar convencional e controlada RAFT na presença (marcador cheio) e ausência (marcador vazio) de 10,0% (p/p) de tamoxifeno base, em relação ao monômero e AIBN na proporção monômero:iniciador 400:1 a 80°C 159
- Figura 70. Curva de distribuição do tamanho de partícula para as reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença (A2 e B2) e ausência (A1 e B1) de 10,0% (p/p) de tamoxifeno base, em relação ao monômero e AIBN na proporção monômero:iniciador 400:1 a 80°C 160
- Figura 71. Micrografias das NP contendo 10,0% (p/p) de tamoxifeno base e produzidas por reações de polimerização em miniemulsão via radical livre convencional (A) e reações de polimerização em miniemulsão via radical livre controlada RAFT (B). 159
- Figura 72. Termogramas de DSC referentes a tamoxifeno base livre, NP de PMMA produzidas com RAFT (reação **RM22**), NP de PMMA produzidas com RAFT na presença de TXFb (reação **RM24**), NP de PMMA (reação **RM25**) e NP de PMMA na presença de TXFb (reação **RM26**) 162
- Figura 73. Látex obtido a partir das reações de polimerização **RM26**, **RM25**, **RM24**, **RM22** respectivamente após 14 dias de armazenamento na temperatura ambiente.. 163
- Figura 74. Perfil de liberação *in vitro* (N = 6) de tamoxifeno para as NP contendo 10,0% p/v de tamoxifeno sintetizadas a partir de reação de polimerização em miniemulsão de metacrilato de metila via radical livre controlada RAFT (**RM24**). 165

Figura 75. Captação de constituintes intravasculares e transcitose através do endotélio vascular pelo receptor de albumina: A) Receptor de albumina (gp60) se liga à albumina, resultando na ligação e indução da caveolina-1; (B) caveolina-1 induz a internalização, aprisionando-a e ligando a proteína à constituintes do plasma; (C) transcitose (HAWKINS <i>et al.</i> , 2008).	167
Figura 76. Micrografias das NP obtidas a partir da reação RM24 secas pela técnica de liofilização	169
Figura 77. Micrografias das NP obtidas a partir da reação RM24 secas em capela de recirculação	169
Figura 78. Micrografias das NP obtidas a partir da reação RM24 secas em bancada	170
Figura 79. Estrutura cristalográfica da albumina de soro bovino (PDB ID 3V03). A) visão em <i>cartoon</i> destacando em amarelo o resíduo de Cys34. B) detalhe da Cys34. Figuras geradas com PyMOL (www.pymol.com).	172
Figura 80. Estrutura molecular da maleimida PEG NHS MW 5000	172
Figura 81. Micrografia de transmissão de NP provenientes da reação RM22 conjugadas com albumina na presença de maleimida PEG NHS 5000 após reação com anticorpo anti-albumina e anticorpo anti-anticorpo anti-albumina segundo o procedimento descrito seção 4.2.5.4.2.	174
Figura 82. Micrografia de transmissão de NP provenientes da reação RM22 não conjugadas com albumina na ausência de maleimida PEG NHS 5000 após reação com anticorpo anti-albumina e anticorpo anti-anticorpo anti-albumina segundo o procedimento descrito na seção 4.2.5.4.2.	175
Figura 83. Quantidade de NP carregadas ou não com tamoxifeno (produto das reações RM24 e RM22 , respectivamente) conjugadas com albumina bovina ou albumina humana por 1 e 24 horas, internalizadas por células THP-1 (calculado realizado pelo software MetaXpress)	176
Figura 84. Micrografia de células THP-1 após o ensaio de internalização de NP carregadas ou não com TXF (produto das reações RM24 e RM22 , respectivamente) conjugadas com albumina bovina ou albumina humana por 1 e 24 horas.	177

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais propriedades físico-químicas do TXF	11
Tabela 2. Amostras produzidas para construir a curva de calibração para o ensaio de dissolução por dispersão	85
Tabela 3. Condições reacionais usadas nas polimerizações em miniemulsão conduzidas na ausência de TXF <i>in situ</i> .	95
Tabela 4. Condições reacionais usadas nas polimerizações em miniemulsão conduzidas na presença de TXF <i>in situ</i>	97
Tabela 5. Modelos típicos de cinética de dissolução	107
Tabela 6. Caracterização da matéria-prima Citrato de Tamoxifeno	116
Tabela 7. Distribuição granulométrica da matéria-prima	119
Tabela 8. Variação dos valores de PDI, massa molar média real e teórica (g/mol) obtidos na reação RM6.	131
Tabela 9. Distribuições de tamanhos de partícula dos produtos finais das reações RM6 e RM7	132
Tabela 10. Eficiência de encapsulamento (%) de citrato de tamoxifeno nas NP	143
Tabela 11. Conversões atingidas nas reações de polimerização em massa de metacrilato de metila na presença de tamoxifeno base e PBO ou AIBN como iniciadores	152
Tabela 12. Eficiência de encapsulamento (%) de tamoxifeno base nas NP	163
Tabela 13. Avaliação da solubilidade de tamoxifeno base em diferentes concentrações de lauril sulfato de sódio 0,1M pH 7,4 para escolha da solução receptora	164
Tabela 14. Modelos cinéticos de dissolução e coeficientes de correlação	165
Tabela 15. Quantidade de albumina conjugada com o polímero seco obtido a partir das reações RM22 e RM24 medida por ensaio de <i>Bradford</i>	168
Tabela 16. Quantidade de albumina conjugada com o polímero em látex obtido a partir das reações RM22 e RM24 medida por ensaio de <i>Bradford</i>	171
Tabela 17. Quantidade de albumina conjugada com o polímero em látex na presença de maleimida PEQ NHS 5000 obtida a partir das reações RM22 e RM24 medida por ensaio de <i>Bradford</i>	170

LISTA DE ABREVIATURAS

AIBN – Azobisisobutironitrila

AM – Anticorpo monoclonal

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATRP – Polimerização por transferência de átomo

BRCA2 – Gene do câncer de mama tipo 2

BSA – Albumina de soro bovino

BSA-Ac – Anticorpo Anti-Albumina bovina produzido em rato

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CLRP – Polimerização radicalar viva controlada

CTA – Agente de transferência de cadeia

CMC – Concentração micelar crítica

Cys-HCl – Cloridrato de cisteína

DEAMA – Dietilamino metilmetacrilato

DEG MMA – Dietilenoglicol metilmetacrilato

DLS – Espalhamento de luz dinâmico

DMEAMA – Dimetilamino metilmetacrilato

DMSO – Dimetilsufóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSC – Calorimetria exploratório diferencial

DTP – Distribuição do tamanho de partícula

EGF – Fator de crescimento epidermal

EMA – *Europe Medicine Agency*

EPR – Retenção e permeabilidade aumentada

ERE – Elemento de resposta ao estrogênio

FDA – *Food and Drug Administration*

FDI – Arranjo de fotodiodos

FGF – Fator de crescimento fibroblástico

gp60 – Glicoproteína 60

GPC – Cromatografia de permeação em gel

HQ – Hidroquinona

HSA – Albumina de soro humano

hst – Oncogene de tumor de estômago

int-2 – Oncogene da mama murina

IFA – Insumo farmacêutico ativo

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IR – Infravermelho

K_2PO_4 – Fosfato de potássio dibásico

KBr – Brometo de potássio

LSS – Lauril sulfato de sódio

MDR – Resistência multi-droga

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MMA – Metacrilato de metila

MPS – Sistema fagocítico mononuclear

MRP – Proteína associada à multiresistência a drogas

M_w/M_n – Índice de polidispersão

Nab – Tecnologia de ligação da nanopartícula à albumina

$NaBH_4$ – Borohidreto de sódio

NaH_2PO_4 – Fosfato de sódio monobásico

$NaHCO_3$ – Bicarbonato de sódio

NMP – Polimerização mediada por nitróxido

NP – Nanopartículas

NPP – Nanopartículas poliméricas

OVA – Ovoalbumina

PI – Ponto isoelétrico

PBO – Peróxido de Benzoíla

PEG – Polietilenoglicol

PEG MMA – Polietilenoglicol metilmetacrilato

RAFT – Transferência reversível por adição e fragmentação

RE – Receptores de estrogênio

RNA – Ácido ribonucleico

SER – Sistema retículo endotelial

SERM – Modulador seletivo do receptor de estrogênio

SLF – Sistema de liberação de fármacos e biomoléculas

SLS – Espalhamento de luz estático

SMF – Sistema mononuclear fagocítico

SPARC – Proteína que modula a interação das células com a matriz extracelular

SQR – Substância química de referência

SR – solução receptora

SUS – Sistema único de saúde

Tg – Temperatura de transição vítrea

TGF α – Fator de crescimento α

TGF β – Fator de transformação de crescimento β

THF – Tetrahidrofurano

TMC – Temperatura micelar crítica

TNB – 5-sulfeto-2-nitrobenzoato

TXF – Tamoxifeno

TXFc – Citrato de Tamoxifeno

TXFb – Tamoxifeno base livre

UV – Ultravioleta

VPF – Fator de permeabilidade vascular

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente, sendo comum entre as mulheres e respondendo por 22% dos casos novos a cada ano (BAN & GODELLAS, 2014). A grande maioria dos tumores mamários identificados é estrogênio dependentes; ou seja, os estrogênios causam a indução de uma série de proteínas e enzimas que estão envolvidas na síntese de ácidos nucléicos e estimulam a produção de fatores de crescimento, exercendo um estímulo positivo sobre o crescimento celular, devido à existência de receptores para vários destes fatores de crescimento nas células do câncer de mama (HULKA & MOORMAM, 2008, SAMAVAT & KURZER, 2015).

O tamoxifeno (TXF) é um fármaco muito importante e usado no tratamento do câncer de mama em todo o mundo, sendo o único agente hormonal aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para prevenção do câncer de mama pré-menopausa, do carcinoma ductal *in situ* e no tratamento do câncer de mama pré-menopausa estrogênio-dependente removido cirurgicamente (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP, 2011; SIEUWERTS *et al.*, 2014). Contudo, o TXF é um fármaco de Classificação Biofarmacêutica II: apresenta baixa solubilidade em água e alta permeabilidade celular. A baixa solubilidade compromete a dissolução e, conseqüentemente, a absorção e biodisponibilidade. Por isso, uma estratégia para sobrepor estas barreiras é a veiculação deste fármaco em sistemas de liberação, como por exemplo, em nanopartículas poliméricas. Desta forma, têm surgido nos últimos anos diversos sistemas de liberação de fármacos ou biomoléculas com a finalidade de modular a cinética de liberação, melhorar a absorção, aumentar a estabilidade do fármaco, ou vetorizá-lo para uma determinada população celular específica. Portanto, sistemas de liberação baseados em nanopartículas poliméricas possuem grande potencial para sobrepor os obstáculos para alcance de um diverso número de tipos celulares. Isso representa uma possibilidade extraordinária para o alcance de células alvo e para conduzir fármacos através de barreiras (AULTON, 2005).

No caso específico da terapia antitumoral, a incorporação de fármacos antitumorais em nanopartículas poliméricas pode promover: (i) o prolongamento do tempo de meia-vida no plasma; (ii) uma maior eficiência em alcançar o tumor especificamente e, conseqüentemente, reduzir a toxicidade; (iii) resgate da imunogenicidade e antigenicidade, com maior estabilidade contra degradação de enzimas hidrolíticas ou radicais livres; (iv) uma promoção da solubilidade e da eficácia; (v) ativação de macrófagos¹ de grande valor para terapia contra o câncer; (vi) uma melhora da endocitose² celular; (vii) uma redução do efluxo de fármacos (o sistema de efluxo mediado pela glicoproteína P nas células multirresistentes³ não opera no caso de fármacos poliméricos); (viii) e favorecimento do acúmulo de fármaco no tecido tumoral, devido ao efeito de retenção e permeabilidade aumentada (MAEDA *et al.*, 2001)

No campo de preparo de nanopartículas poliméricas, a síntese de polímeros teve um grande avanço na última década com o desenvolvimento das técnicas de polimerização radicalar viva controlada (CLRP – “*Controlled/Living Radical Polymerization*”). Essas técnicas tornaram possível, por via radicalar e com monômeros comuns, a obtenção de (co)polímeros com baixa massa molar, com arquitetura molecular bem definida e com as mais diferentes morfologias (ZETTERLUND *et al.*; 2008). A variante da polimerização viva radicalar controlada considerada mais robusta é a técnica chamada RAFT (Transferência reversível por adição e fragmentação). A base da polimerização RAFT é a reação de polimerização radicalar na presença de agentes de transferência de cadeia (CTA ou agente RAFT) que fazem com que as cadeias poliméricas cresçam de maneira similar. Além disso, a polimerização RAFT é a técnica de polimerização radicalar controlada mais versátil que existe, devido à grande variedade de monômeros funcionais que podem ser polimerizados sem a necessidade de proteção de grupamentos químicos e devido à facilidade com que a estrutura funcional pode ser alterada, Além disso, a técnica permite

¹ Em citologia, chamam-se macrófagos as células de grandes dimensões do tecido conjuntivo, ricos em lisossomas, que fagocitam elementos estranhos ao corpo.

² Endocitose é o processo pelo qual as células vivas ativamente absorvem material (moléculas, pedaços de detritos ou outras células) através da membrana celular

³ Células que possuem resistência a diversos tipos de agentes destinados a promover sua destruição.

subseqüente conjugação da cadeia polimérica a uma molécula sintética ou biológica (MOAD *et al.*, 2005, 2006, 2009)

A conjugação com uma molécula biológica é a chave para vetorização de fármacos inclusos em nanopartículas polimerizadas via RAFT. A albumina, por exemplo, é a proteína mais abundante no plasma humano e o carreador natural de moléculas hidrofóbicas do corpo humano. Considerando que sucesso da quimioterapia contra o câncer depende de liberação do agente ativo na célula tumoral, o mecanismo natural do corpo humano para liberação de proteínas para as células, por meio da albumina, pode ser utilizado como ferramenta para ação modificada quanto ao direcionamento da liberação específica de fármacos antitumorais (ELZOGHBY *et al.*, 2012). Além do transporte ativo do fármaco, mediado pela albumina, o grau de vetorização seletiva para células tumorais é fornecido pela SPARC, proteína que modula a interação das células com a matriz extracelular, hiper-expressa em muitos tipos de tumores (KOUKOURAKIS *et al.*, 2003; CHIN *et al.*, 2005; WATKINS *et al.*, 2005; CORTES & SAURA, 2010).

Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho é desenvolver partículas poliméricas de tamanho nanométrico e uniforme, contendo TXF e conjugadas com albumina para o combate seletivo de células tumorais mamárias receptores de estrogênio positivas. O controle do tamanho das partículas e da polidispersão das massas molares pode ser realizado utilizando a técnica de polimerização RAFT, que permite também a funcionalização posterior dessas partículas poliméricas por meio de reações de conjugação com grupos funcionais específicos de proteínas, como a albumina.

A apresentação dessa tese está estruturada em sete capítulos, incluindo a presente Introdução. O Capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica sobre o câncer de mama e o TXF, fármaco escolhido para condução deste estudo. Este capítulo ainda destaca a importância dos sistemas de liberação de fármacos e biomoléculas, mais particularmente aquelas baseadas em nanopartículas poliméricas, relatando mecanismos e reações para formação das partículas. Ainda no Capítulo 2, encontra-se a descrição detalhada da técnica RAFT de polimerização radicalar e

controlada utilizada nessa tese para síntese das partículas poliméricas. No Capítulo 3, os objetivos gerais e específicos deste trabalho, assim como a originalidade, a importância e a viabilidade técnica também são descritos. No Capítulo 4 está relatada a metodologia usada para avaliação da qualidade da matéria-prima usada nas reações e para a obtenção das nanopartículas e sua vetorização. Descrevem-se também os parâmetros usados para avaliação do controle da reação, do tamanho da partícula e da eficiência da vetorização. O Capítulo 5 apresenta os principais resultados obtidos na tese, incluindo discussões sobre a síntese das nanopartículas poliméricas, conjugação com albumina e verificação de testes de eficiência *in vitro*. O Capítulo 6 apresenta as principais conclusões obtidas e algumas sugestões para condução de trabalhos futuros. O Capítulo 7 apresenta as referências bibliográficas.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Polímeros (EngePol) do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ. A tese se enquadra na linha de desenvolvimento de novas técnicas de polimerização e conjugação. A avaliação da eficiência da conjugação das nanopartículas com a albumina foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica (Pbiotech/BiotecFar) da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo tem como objetivo evidenciar a relevância do TXF no tratamento do câncer de mama e os benefícios que a inclusão deste fármaco em sistemas vetorizados de liberação de podem trazer. Discutem-se ainda as vantagens da utilização das reações de polimerização radicalar controlada, em especial da técnica RAFT, para obtenção de nanopartículas (NP) com finalidade farmacêutica e para conjugação dessas NP obtidas com substâncias de interesse biológicas.

2.1. TAMOXIFENO NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

2.1.1. EPIDEMIOLOGIA

Segundo tipo mais freqüente no mundo, o câncer de mama é o tumor mais comum entre as mulheres, respondendo por 22% dos novos casos de câncer registrados a cada ano (BAN & GODELLAS, 2014). Se diagnosticado e tratado oportunamente, o prognóstico de cura é considerado relativamente bom (MARTA *et al.*; 2011, BHARDWAJ & TIWARI, 2015). De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2011 no Brasil foram registradas 13.345 mortes decorrentes deste tipo de câncer, sendo 13.225 mulheres e 120 homens, e estima-se que em 2014 tenham sido registrados 57.120 novos casos. No Brasil, as taxas de mortalidade devido à incidência do câncer de mama continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada apenas em estágios avançados. (LEE *et al.*; 2012, INCA, 2015)

Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos do diagnóstico é de 61%. Relativamente raro antes dos 35 anos, acima desta faixa etária a incidência cresce rápida e progressivamente. Estatísticas indicam um aumento da incidência de câncer de mama tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (GEWEFEL & SALHIA, 2014). Entre 2010 e 2013, houve aumento de 51,1% nos exames realizados pelo Sistema Único de Saúde

(SUS) em mulheres de 50 a 69 anos. A detecção precoce do tumor e início do tratamento aumentam as chances de cura. (LEE *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2015)

Allemani e colaboradores (2015) realizaram um estudo de acompanhamento da evolução de diversos tipos de câncer durante 15 anos em 67 países diferentes, incluindo o Brasil, e relataram que a taxa de sobrevivência para o câncer de mama no Brasil aumentou de 78%, em 2000, para 87%, em 2005, mesmo percentual registrado em países como os Estados Unidos. O diagnóstico precoce associado ao tratamento eficaz da doença foi apontado pelo grupo de pesquisadores como o principal avanço do Brasil. Para o câncer de mama, o aumento de sobrevida deve-se à redução na mortalidade pós-operatória, por conta do tratamento adequado.

A susceptibilidade ao câncer de mama ocorre por herança genética e, assim como no caso de outras doenças, o risco de incidência aumenta de acordo com o histórico familiar. Além da pré-disposição genética, o carcinoma é mais comum em mulheres com sobrepeso e que fazem dietas gordurosas, o que aumenta a presença de bactérias capazes de converter colesterol em estrógeno. Embora a incidência de câncer de mama seja maior em mulheres, os homens também podem desenvolver câncer de mama; contudo sem a genética favorável, o risco de ocorrência é menor que 1% em relação às mulheres. No homem o risco está exclusivamente associado a alterações no gene de câncer de mama tipo 2 (BRCA2), quando o risco sobe para 7% de desenvolver a doença (LEE *et al.*, 2012; ALLEMANI *et al.*, 2015).

Em caso de suspeita, ou anualmente após os 40 anos, deve ser feita uma mamografia⁴ para controle e prevenção da doença. Em caso de pacientes de alto risco (pacientes que possuem casos na família, com hormônios femininos elevados ou com genes BRCA1 ou BRCA2), pode ser realizada a mastectomia⁵ e a retirada dos ovários preventivamente (MANGANIELLO *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2015)

⁴ Exame de diagnóstico por imagem, que tem como finalidade estudar o tecido mamário.

⁵ Cirurgia de remoção completa da mama.

O câncer da mama pode apresentar diversos sintomas: aparecimento de nódulo ou endurecimento da mama ou do tecido debaixo do braço; mudança no tamanho ou no formato da mama; alteração na coloração ou na sensibilidade da pele da mama ou da aréola; secreção contínua por um dos ductos; retração da pele da mama ou do mamilo; inchaço significativo ou distorção da pele e ou das mucosas. Apesar desses sintomas, o câncer de mama não costuma provocar dor física, a não ser indiretamente em estágios avançados de desenvolvimento do tumor (INCA, 2015).

Assim como qualquer tipo de tumor, o câncer da mama pode se espalhar para outros tecidos, ocorrendo a chamada metástase⁶. Por esta razão, é muito importante detectá-lo o quanto antes, principalmente nos estágios iniciais, aumentando assim as chances de tratamento e de cura. Para isso, é imprescindível a realização do auto-exame da mama para a identificação precoce do tumor (VIEIRA *et al.*, 2015; SCHWAB *et al.* 2015).

2.1.2. CARCINOGENESE MAMÁRIA E OS EFEITOS DO ESTROGÊNIO

O câncer de mama ou carcinogênese mamária ocorre em três etapas, por meio de um processo seqüencial (PINOTTI & BARROS, 2004; SILVA *et al.*, 2004; YUE *et al.*, 2013,): (a) a iniciação depende de uma lesão no DNA cromossômico que pode ser adquirida ou geneticamente herdada, levando a alterações na regulação de proliferação e de apoptose celular⁷, por esse motivo a iniciação é considerada como de origem genética; (b) a promoção está ligada à atuação de fatores estimulantes da multiplicação das células alteradas geneticamente pela iniciação; entre estes fatores, os que se sobressaem são os estrogênios; (c) a progressão depende da

⁶ Formação de uma nova lesão tumoral a partir de outra, sem continuidade entre as duas, na qual as células neoplásicas se desprezem do tumor primário e são levadas, por meio do interstício, para um local distante onde formam uma nova colônia neoplásica.

⁷ Apoptose celular, conhecida como morte celular programada (a definição correta é morte celular não seguida de autólise) é um tipo de auto-destruição celular que ocorre de forma ordenada e demanda energia para a sua execução (diferentemente da necrose). Está relacionada com a manutenção da homeostase e com a regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, mas pode também ser causada por um estímulo patológico (como a lesão ao DNA celular).

vascularização e da capacidade das células invadirem a membrana basal e o estroma, e ligada à ação de enzimas como a catepsina D e colagenase tipo IV.

Os estrogênios causam a indução de uma série de proteínas e enzimas que estão envolvidas na síntese de ácidos nucléicos e estimulam a produção de fatores de crescimento, exercendo um estímulo positivo sobre o crescimento celular, devido à existência de receptores para vários destes fatores de crescimento nas células do câncer de mama (HULKA & MOORMAN, 2008; SAMAVAT & KURZER, 2015). O estrogênio ainda induz o aumento nos níveis de Fator de crescimento α (TGF α) em células que contém receptor de estrogênio (RE), evento importante no processo de carcinogênese mamária, pois as células do câncer de mama secretam o TGF α , fator de crescimento semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF), que utiliza o receptor de EGF para desencadear suas funções (FACINA *et al.*, 2003; PINOTTI & BARROS, 2004; SAMAVAT & KURZER, 2015). Outro fator de crescimento estimulado pelo estrogênio e encontrado em várias linhagens de carcinoma mamário é o fator de crescimento fibroblástico (FGF), que representa uma família onde se encontram os oncogenes de tumor de estômago humano (*hst*) e oncogene da mama murina *int-2*, fatores estes ligados ao desenvolvimento de neoplasias (FACINA *et al.*, 2003; SIRÉN *et al.*, 2004).

2.1.3. TAMOXIFENO (TXF)

O TXF é um fármaco muito importante usado no tratamento do câncer de mama em todo o mundo, sendo o único agente hormonal aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para prevenção do câncer de mama pré-menopausa, do carcinoma ductal *in situ* e no tratamento do câncer de mama pré-menopausa estrogênio-dependente removido cirurgicamente (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP, 2011; SIEUWERTS *et al.*, 2014). Os RE encontram-se hiper-expressos em casos de hiperplasia mamária e praticamente todas as hiperplasias atípicas apresentam uma proporção significativa de células RE positivas (ALTHUIS *et al.*, 2004; HULKA & MOORMAN, 2008; YUE *et al.*, 2013; FAN & JORDAN, 2014). Portanto,

nesses casos há consenso na utilização continuada do TXF por média de 5 anos (YANG *et al.* 2010; HALL *et al.*, 2011; DAVIES *et al.*, 2013)

2.1.3.1. Mecanismo de Ação

O TXF é um agente não esteroidal, isômero Z derivado da classe trifeniletilênica (Figura 1) com efeito antiestrogênico e agonista parcial dos estrogênios (RANG *et al.*, 2001; MIRKIN & PICKAR, 2015). O TXF se liga competitivamente ao RE, competindo com o próprio estrogênio pelos receptores (MARRERO-ALONSO *et al.*, 2013). Por isso, o TXF é considerado um modulador seletivo do RE (SERM).

Os SERM, em geral, constituem um grupo de antagonistas/agonistas do RE com efeitos seletivos em tecidos. O grupo é formado por moléculas sintéticas capazes de se ligar ao RE e modular capacidades transcricionais em diferentes tecidos alvos do estrogênio. O TXF é um SERM pioneiro, extensivamente usado na terapia de câncer de mama com RE positivo, tem sido o primeiro agente quimio-preventor aprovado para diminuir a incidência de câncer de mama em mulheres com alto risco (MARRERO-ALONSO *et al.*, 2013; MIRKIN & PICKAR, 2015)

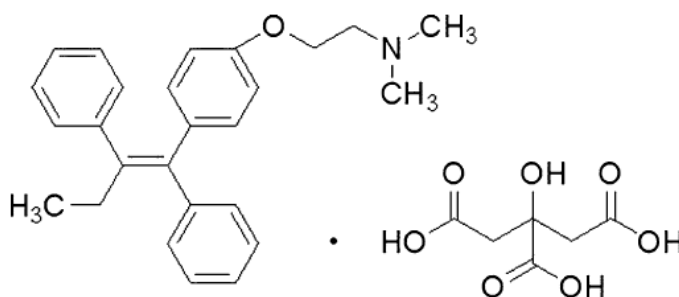


Figura 1. Fórmula molecular do citrato de tamoxifeno

As células passa por processos de proliferação possuem um ciclo regular de fases diferentes, fases estas que são alvos de agentes citotóxicos utilizados para o tratamento de vários

tipos de carcinoma, inclusive o TXF. Estas fases encontram-se descritas a seguir (GRAHAME-SMITH & ARONSON, 2002):

- a) Fase G1 – refere-se à fase de “repouso” que ocorre logo após o final da mitose celular⁸. Durante esta fase não ocorre síntese de DNA; entretanto, as sínteses de RNA e de proteínas continuam ocorrendo normalmente. Algumas células, após a mitose, podem ainda passar para um diferente tipo de fase de “repouso”, a fase G0, em que se encontram fora do ciclo de proliferação, mas apresentando capacidade proliferativa;
- b) Fase S – ocorre logo após a fase G1, diz respeito à síntese de DNA, sendo seguida de um aumento da taxa de síntese de RNA. Este processo resulta em duplicação do DNA da célula e produção de cromátides⁹ irmãs;
- c) Fase G2 – Ocorre logo após a fase S, constituindo uma fase de repouso, com interrupção da síntese de DNA e com atividade normal da síntese de RNA e de proteínas;
- d) Fase M – Fase em que ocorre a mitose, sendo observada uma redução na síntese de RNA e de proteínas, ocorrendo o condensamento do cromossomo, a separação das cromátides irmãs, e por fim a divisão celular. Depois, as células entram novamente em fase de repouso.

O TXF ativo causa a inibição da síntese de DNA, por meio de um bloqueio das células na fase G1/G0 do ciclo celular, desencadeando então um efeito citostático¹⁰ na célula e não citocida¹¹. Por este motivo, os tumores tendem a reaparecer após a suspensão do uso do TXF (COSTA & BUZAID, 2007).

Outro mecanismo pelo qual o TXF regula a transcrição de genes é por intermédio do percurso clássico, por meio de um elemento de resposta ao estrogênio (ERE). Com a interação do

⁸ Fase do processo de divisão celular na qual as células dividem seus cromossomos entre duas células menores do corpo.

⁹ cada um dos dois filamentos de DNA formados pela duplicação de um cromossomo durante a fase S da divisão celular

¹⁰ Que evita o crescimento e a multiplicação celular.

¹¹ Que promove a destruição e morte celular.

complexo fármaco-receptor, o RE torna-se ativado, o que causa a formação de dímeros que se ligam ao ERE e desencadeiam alterações conformacionais no domínio aminoterminal do RE. Isso provoca a interação com fatores de ativação transcricionais, que levam à ativação da transcrição. No entanto, este complexo não consegue ativar completamente o processo de transcrição, interferindo desta forma no ciclo celular (PARK & JORDAN, 2002).

Também verificou-se que o TXF pode se ligar a outros receptores não nucleares que estão presentes na membrana plasmática e no citoplasma de células mamárias. Desta forma, o TXF também age regulando os genes da transcrição por meio de sítios alternativos de ativação presentes na molécula de DNA (OSBORNE & SCHIFF, 2005).

2.1.3.2. Características Físico-químicas do TXF

As principais propriedades físico-químicas do TXF estão apresentadas na Tabela 1:

Tabela 1. Principais propriedades físico-químicas do TXF

Nome IUPAC	1-p-Beta-dimetilaminoetoxifenil-trans-1,2-difenilbut-1-eno
Fórmula Molecular	C ₂₆ H ₂₉ NO
Peso Molecular	371,56 g/mol
Cor e forma	Pó cristalino branco
Ponto de Fusão	144 °C
Densidade	0,55-0,65 g/L
Solubilidade	Pouco solúvel em água
Log P	6,35

2.1.3.3. Farmacocinética

O TXF é comercializado atualmente sob forma de sal de citrato e existe na forma de comprimidos de 10 e 20 mg. Quando administrado por via oral o TXF é facilmente absorvido, atingindo os níveis plasmáticos máximos de 4 a 7 horas após a ingestão. Este fármaco mostra

duas fases de eliminação: a primeira fase com meia-vida de 7 a 14 horas e a segunda com meia-vida de 4 a 11 dias. O equilíbrio dinâmico durante a terapia com doses de manutenção pode levar várias semanas ou até mesmo meses para se estabelecer, devido à meia vida prolongada deste fármaco (RANG *et al.*, 2001).

Após a circulação entero-hepática, os metabólitos do TXF, já conjugados com o ácido glicurônico, são excretados no intestino pelo ducto biliar e, logo em seguida, ocorre reabsorção e recirculação entero-hepática dos metabólitos hidrolisados e conjugados do TXF. Os metabólitos que não são reabsorvidos acabam sendo excretados nas fezes, como os conjugados do metabólito desaminado, sendo mínima a excreção pela urina (HARDMAN *et al.*, 2001).

O TXF é metabolizado por tipos específicos de enzimas do citocromo P-450. Neste processo, o fármaco sofre N-desmetilação e hidroxilação, sendo então metabolizado respectivamente para N-desmetiltamoxifeno e 4- hidroxitamoxifeno, sendo que este segundo composto apresenta uma atividade antiestrogênica muito mais potente do que o fármaco original (Figura 2) (MARRERO-ALONSO *et al.*, 2013).

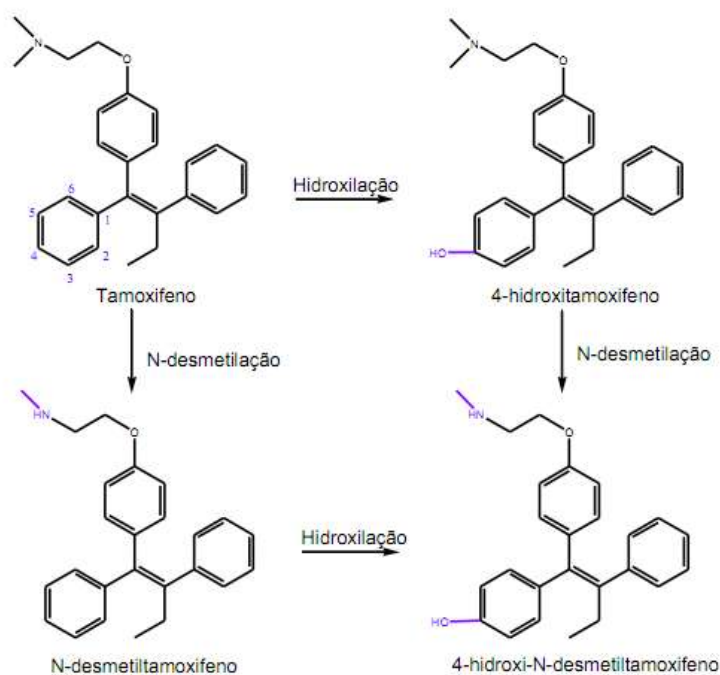


Figura 2. Principais produtos do metabolismo do TXF (MARRERO-ALONSO *et al.*, 2013)

2.1.3.4. Efeitos Adversos

O efeito colateral mais comumente relatado na administração do TXF é a sensação de ondas de calor, que afeta aproximadamente 50% das mulheres tratadas. Embora as sensações variem de intensidade e duração, esses sintomas são mais pronunciados nos primeiros três meses de tratamento. Além disso, outros efeitos colaterais associados à ação antiestrogênica também são muito comuns como náusea e vômito (GAIL *et al.*, 1999; FACINA *et al.*, 2003; DAVIES *et al.*, 2013; MARRERO-ALONSO *et al.*, 2013). Além desses, alguns sintomas podem ser diagnosticados com menor frequência, tais como: irregularidades menstruais, sangramento e corrimento vaginal, prurido vulvar e dermatites. O TXF também pode provocar a retenção de líquidos, aumentar a dor de tumores e, em mulheres com metástase óssea, pode ocasionalmente causar hipercalemia¹² (RANG *et al.*, 2001).

As maiores preocupações com a administração do TXF estão relacionadas ao seu potencial em aumentar o risco de tromboembolismo venoso ou causar câncer endometrial, uma vez que há fortes indícios de que no útero este fármaco apresenta atividade agonista parcial¹³ do estrogênio, estimulando a proliferação das células endometriais (GAIL *et al.*, 1999; FACINA *et al.*, 2003)

O TXF apresenta alguns efeitos colaterais benéficos, como no caso do aumento da densidade óssea. Neste caso, promove-se a redução de fraturas ósseas em mulheres pós-menopausa tratadas com este fármaco. Este efeito se deve ao fato de que o TXF age em células ósseas exercendo a mesma atividade do estrogênio para controle da densidade mineral óssea, sendo então agonista do estrogênio (THE ATAC Trialist's GROUP, 2002).

Ao longo dos anos, as pesquisas evoluíram para o desenvolvimento e a produção de novos fármacos para o combate do câncer de mama, sendo factível a quimioprevenção do câncer de mama com o uso do TXF, que deve ser realizada de forma criteriosa e utilizando medicações

¹² Grande concentração de potássio no sangue que pode resultar ocasionalmente em disfunção renal.

¹³ Substância que estimula um receptor com menor potencial que a estimulante original endógeno.

comprovadamente eficazes. O TXF, representante da classe dos SERM, teve uso pioneiro no tratamento de carcinomas mamários hormônio-dependentes e sua descoberta abriu as portas para as pesquisas e desenvolvimentos de novos fármacos, além de contribuir para a melhora de inúmeros outros já existentes no mercado. No entanto, é imperioso afirmar que, apesar da eficácia comprovada, o TXF apresenta efeitos colaterais que podem causar sérios danos à qualidade de vida da paciente. Pensando nisso é que se impulsiona o estudo e desenvolvimento de novas formas farmacêuticas mais seletivas, capazes de atingir apenas as células cancerosas.

2.2. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS E/OU BIOMOLÉCULAS

Sistemas de liberação de fármacos e biomoléculas (SLF) é um termo que define a forma ou o mecanismo pelo qual o fármaco é disponibilizado no organismo, após sua administração (AULTON, 2005). Nos SLF, os fármacos são disponibilizados aos poucos, de forma controlada ou não, após a administração.

De acordo com Oliveira e colaboradores (2004), raramente a experiência clínica com agentes terapêuticos satisfaz as expectativas criadas em torno de resultados pré-clínicos com medicamentos, já que entre o local de administração e o órgão ou tecido alvo, existe uma série de barreiras anatômicas, químicas e biológicas que dificultam a obtenção do efeito terapêutico desejado. Desta forma, o desenvolvimento de formas diferenciadas de transporte do medicamento no organismo é essencial para que os efeitos desejados sejam atingidos em sua plenitude, reduzindo o risco de intoxicações e dinamizando o tratamento. Assim, têm surgido nos últimos anos diversos SLF com a finalidade de modelar a cinética de liberação, melhorar a absorção, aumentar a estabilidade do fármaco ou vetorizá-lo para uma determinada população celular.

Neste contexto, têm sido realizados avanços tanto na criação de novos SLF e de materiais para SLF. Alguns sistemas que permitem a inclusão de fármacos, como lipossomas (NGUYEN *et al.*, 2011; WIEBER *et al.*, 2011; GAWRYS *et al.*, 2014; REFUERZO *et al.*, 2015), ciclodextrinas (STOJANOV *et al.*, 2012; TAHA *et al.*, 2013; GODINHO *et al.*, 2014; GOODING *et*

al., 2015), e nano e micropartículas (WILCZEWSKA *et al.*, 2012; ELZOGHBY, 2013; LEE *et al.*, 2014; HOLA *et al.*, 2015; SONG & CHEN, 2015), já estão bem estabelecidos.

2.2.1. NANOPARTÍCULAS (NP)

A nanotecnologia pode ser definida como um campo científico multidisciplinar baseado no desenvolvimento, na caracterização, na produção e na aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas com forma e tamanho na escala nanométrica. Atualmente há o investimento global na área de nanotecnologia está em torno de U\$ 7 bilhões por ano e estima-se que entre 2011 e 2015 haja um investimento de cerca de U\$ 1,5 trilhão (KUMARI *et al.*, 2010). Neste contexto, a utilização de SLF envolve um vasto campo de estudos e tem reunido muitos esforços na área de nanotecnologia. Estes esforços estão fortemente associados ao desenvolvimento de estratégias para a veiculação de ingredientes ativos.

A utilização de materiais poliméricos com aplicações biomédicas vem crescendo consideravelmente nos últimos anos, como tem sido evidenciado em diversos campos como na engenharia de tecidos, no implante de dispositivos médicos e órgãos artificiais, na fabricação de próteses, na oftalmologia, na odontologia, para o reparo ósseo e na indústria farmacêutica para veiculação de fármacos (NAIR & LAURENCIN, 2007; WILCZEWSKA *et al.*, 2012).

No âmbito do SLF, sistemas de liberação nanométricos já são usados há pelo menos seis décadas. Os lipossomas foram desenvolvidos em 1964 (BANGHAM & HORNE, 1964) e o termo “NP” foi usado pela primeira vez em 1976 para descrever partículas poliméricas com diâmetro de 100 nm (KREUTER & SPEISER, 1976). Por isso, a idéia do uso de NP para a liberação de fármacos começou quase quatro décadas atrás, ao mesmo tempo em que habilidades únicas das NP tem sido destacadas por diversos cientistas.

As NP poliméricas (NPP) são visualmente sólidas, apresentam estruturas coloidais e possuem tamanho de 10 a 1000 nm. O termo NP (NP) aplicado à liberação de fármacos é amplo e

refere-se a pelo menos dois tipos de estruturas diferentes: as nanoesferas e as nanocápsulas (KREUTER & SPEISER, 1976; AULTON, 2005; RAO & GECKELER, 2011; LEE *et al.*, 2014).

Denominam-se nanoesferas aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homogeneamente disperso ou solubilizado no interior de uma matriz polimérica. Desta forma, obtém-se um sistema monolítico, em que não é possível identificar um núcleo diferenciado. Já as nanocápsulas, ao contrário, constituem os chamados sistemas do tipo reservatórios, em que é possível identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. Neste caso, a substância encapsulada encontra-se visualmente envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, que isolando o núcleo do meio externo (AULTON, 2005).

Os métodos de obtenção das duas formas de NP são semelhantes. A diferença morfológica entre a forma farmacêutica de nanoesfera (sistema polimérico matricial) e nanocápsula (sistema polimérico do tipo reservatório) está ilustrada na Figura 3.

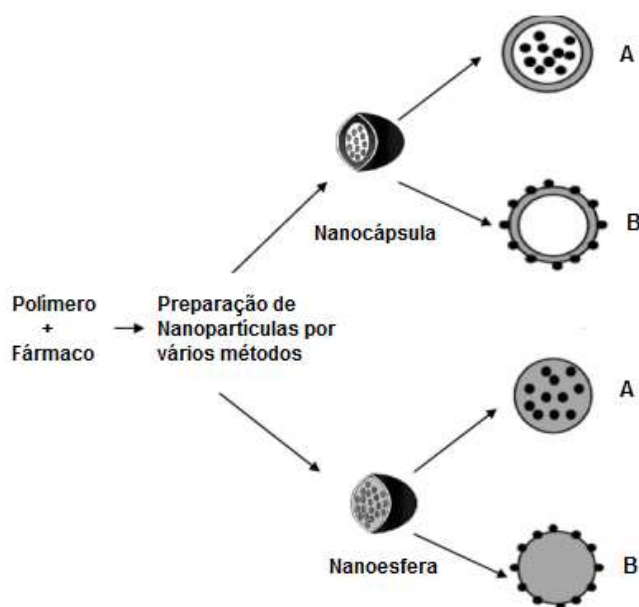


Figura 3. Exemplos das diferentes morfologias de NP poliméricas: (A) cápsula (sistema reservatório) e (B) esfera (sistema matricial) (KUMARI *et al.*, 2010)

O fármaco ou biomolécula de interesse pode estar dissolvido, aprisionado, adsorvido, ancorado ou encapsulado dentro ou sobre a matriz. Dependendo do método de preparação e das

características do material que compõe a NP, esses sistemas podem ser concebidos para apresentarem diferentes propriedades e características de liberação (AULTON 2005; KUMARI *et al.*, 2010; MISHRA *et al.*, 2010; WILCZEWSKA *et al.*, 2012; BENNET & KIM, 2014).

NPP feitas de polímeros naturais ou sintéticos têm recebido grande atenção devida à estabilidade à facilidade de funcionalização da superfície. Tais NPP podem ser feitas sob medida para alcançar tanto a liberação controlada do fármaco quanto a localização específica do sítio da patologia por meio do ajuste das características do polímero e da química da superfície (NAKACHE *et al.* 2000; SOUNDERYA & ZHANG, 2008; SINGH & LILLARD, 2009; LEE *et al.*, 2014; BENNET & KIM, 2014)

As vantagens do uso de NPP para liberação de fármacos resultam de duas propriedades básicas: tamanho nanométrico e disponibilidade de materiais biocompatíveis. Devido ao seu tamanho reduzido, as NPP podem extravasar por meio do endotélio inflamado, epitélio, tumores ou penetrar em microcapilares. As NPP possuem outra vantagem sobre as micropartículas, lipossomas e ciclodextrinas: elas são mais adequadas para administração intravenosa. Os capilares menores possuem cerca de 5-6 μm de diâmetro e o tamanho das partículas a serem distribuídas no sistema sangüíneo deve ser significativamente menor que 5 μm para não formarem agregados (trombos) e, conseqüentemente, provocarem embolismo. Além disso, o uso de materiais biodegradáveis para preparação das NPP permite uma liberação sustentada do fármaco no sítio alvo por um período de dias ou até mesmo semanas (KUMARI *et al.*, 2010; VIDYASAGAR, 2013).

Um nano-sistema de liberação deve ter idealmente alta capacidade de armazenamento de fármaco, reduzindo a quantidade de material de matriz. A adição do fármaco nestes nanodispositivos pode ser feita por dois métodos: pelo método que incorpora o fármaco durante a formulação da NPP e pelo modelo de adsorção/absorção após a formação da NPP. A adição do fármaco e a eficiência do encapsulamento dependem da solubilidade do fármaco e do material da matriz (polímero sólido ou agente de dispersão líquido) no meio de preparo, que está

relacionada com a composição da matriz, a massa molar, a interação fármaco-polímero e a presença de grupos funcionais no fármaco e na matriz (AULTON, 2005).

É importante considerar tanto a velocidade de liberação do fármaco quanto a falta de degradação do polímero quando se desenvolve um sistema nanoparticulado. Em geral a taxa de liberação do fármaco depende dos seguintes fatores: (1) solubilidade do fármaco no meio considerado, (2) dessorção do fármaco ligado ou adsorvido à superfície, (3) difusão do fármaco por meio da matriz da NP, (4) erosão da matriz ou degradação da NP e (5) combinação de processo de erosão e difusão. Assim, solubilidade, difusão e biodegradação da matriz da partícula governam o processo de liberação (AULTON, 2005).

O desenvolvimento de um sistema de NP para liberação-alvo de fármacos já foi revisado algumas vezes (MOGHIMI *et al.*, 2001; WILCZEWSKA *et al.*, 2012). A liberação alvo pode ser alcançada de maneira passiva ou ativa. A forma ativa exige que o agente terapêutico ou o sistema carreador seja conjugado um ligante específico na célula ou tecido (KUMARI *et al.*, 2010). A forma passiva incorpora o agente terapêutico a uma macromolécula ou NP que, passivamente, alcança o alvo no órgão.

Portanto, sistemas de liberação de NP poliméricas apresentam grande potencial para sobrepor obstáculos para alcance de um número diverso de tipos celulares. Isso representa uma possibilidade de alcançar células alvo e de facilitar a condução de fármacos por meio de barreiras. O desafio, no entanto, permanece na caracterização desses alvos moleculares e na segurança de que essas moléculas afetem apenas os órgãos alvo.

2.3. DISTRIBUIÇÃO DE NP NO ORGANISMO

O comportamento das NPP no organismo deve ser monitorado, porque as NPP podem se acumular no organismo e não serem eliminadas em função do baixo diâmetro apresentado. A preocupação central é como o organismo se comporta diante desses nanomateriais. O campo da

nanotoxicidade constitui a fronteira do conhecimento nessa área e pouco ainda se sabe sobre o tema de forma rigorosa.

A biocompatibilidade é importante nesses materiais e os efeitos adversos e os efeitos positivos devem ser analisados. A toxicologia é fundamental em todos esses estudos e pesquisas são obrigatórias para esses sistemas. Para o uso desses materiais em seres humanos, é necessário acumular toda a informação possível a respeito do nível toxicológico. Atualmente há grande preocupação com o risco para a saúde imposto por NPP, como alteração de genes em células hepáticas ou a destruição de células lipídicas, muito sensíveis à NPP (SOUNDERYA & ZHANG, 2008).

Na grande maioria das aplicações, é desejável que as NPP carregadas de fármacos sejam compostas de polímeros biodegradáveis. NP biodegradáveis são freqüentemente usadas para melhorar o índice terapêutico de vários fármacos solúveis (ou não) em água, por meio da melhora da biodisponibilidade, solubilidade e tempo de retenção no organismo (KUMARI *et al.*, 2010; VIDYASAGAR, 2013). Já foi demonstrado que esse tipo de formulação de NPP com polímeros biodegradáveis reduz as despesas, os riscos e a toxicidade aos pacientes e aumenta a eficácia, especificidade, tolerabilidade e o índice terapêutico dos fármacos (KUMARI *et al.*, 2010; SAWALHA *et al.*, 2011). Além disso, fármacos em NP biodegradáveis possuem muitas vantagens, prevenindo contra a degradação prematura, a interação com moléculas biológicas do organismo, aumentando a da absorção pelo tecido, entre outros (ALEXIS *et al.*, 2008).

O conhecimento sobre a cinética, metabolismo e eliminação das NP é limitado, já que poucas NP foram testadas clinicamente. O Doxil[®] e o Abraxane[®] são dois medicamentos do mercado veiculados na forma de NPP para terapia do câncer que já sofreram avaliação clínica, pré-clínica e aprovação pelo FDA. O primeiro é um sistema lipossomal de doxorubicina para o tratamento de carcinoma ovariano que já demonstrou eficácia e segurança (STRAUBINGER *et al.*, 1988; ROBERT *et al.*, 2004). O segundo é uma NP de taxol conjugada com albumina utilizada no

tratamento de câncer de mama metastático (DAMASCELLI *et al.*, 2001; DESAI *et al.*, 2006; MIELE *et al.*, 2006).

Como já discutido anteriormente, as NP carregadas com fármacos são melhores que os fármacos tradicionais no que diz respeito à liberação controlada, liberação alvo e impacto terapêutico. Essa capacidade de liberação alvo é influenciada principalmente pelo tamanho médio da partícula, distribuição dos tamanhos da partículas e grau de hidrofobicidade. Entre eles, o tamanho médio e a distribuição dos tamanhos de partículas são importantes para determinar a interação com a membrana da célula e sua penetração por meio das barreiras fisiológicas.

A fim de ultrapassar diferentes barreiras biológicas, o tamanho ideal da NPP depende do tecido a ser alcançado, do sítio de ação alvo e da circulação (BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2004). Para a internalização celular de NP, a carga da superfície é outro fator muito importante, já que pode determinar se as NP podem se aglomerar no fluxo sanguíneo ou aderir ou interagir com a membrana de células com cargas opostas (JABR-MILANE *et al.*, 2008). Superfícies catiônicas são normalmente desejáveis, já que promovem interações das NPP com as células aumentando a taxa e a extensão da internalização (SHENOY & AMIJI, 2005; GODINHO *et al.*, 2014). Para liberação alvo, a permanência das NP na circulação sanguínea é desejada; porém, as NP convencionais com superfícies hidrofóbicas são rapidamente opsonizadas¹⁴ e massivamente eliminadas pelos macrófagos dos órgãos do sistema mononuclear fagocítico (SMF). Para aumentar a circulação das NPP no sangue, a superfície das NPP convencionais deve ser modificada com diferentes moléculas. Um exemplo disto é o revestimento com polímeros hidrofílicos, como o polietilenoglicol (PEG), que pode criar uma nuvem de cadeias na superfície da partícula que repele as proteínas plasmáticas presentes no sangue (BAREFORD & SWAAN, 2007; HALEY & FRENKEL, 2008; SUN *et al.*, 2011; LIECHTY & PEPPAS, 2012).

O desempenho das NPP *in vivo* é influenciado por características morfológicas, da química de superfície e pela massa molar do polímero. NP com a superfície modificada podem

¹⁴ Opsonização é o processo que facilita o sistema imunológico fixar opsoninas, molécula que age como facilitadora de ligação no processo de fagocitose (englobamento e digestão de partículas sólidas e micro-organismos por células)

apresentar propriedades “anti-adesivas”, em virtude da configuração estendida da superfície da partícula, que provoca impedimento estérico, reduzindo a extensão da eliminação pelos macrófagos circulantes do fígado e possibilitando a permeação aumentada. O mecanismo de liberação de fármacos e biomoléculas presentes nas NP pode ser modulado pela massa molar e pelas características químicas do polímero usado. Quanto maior a massa molar do polímero, mais lentamente o fármaco tende a ser liberado da NP (SHENOY & AMIJI, 2005; KUMARI *et al*, 2010)

Normalmente, quando um agente é introduzido no sistema circulatório, como por exemplo no sistema intravenoso, o agente é jogado imediatamente nos sistemas vascular e linfático. A distribuição do fármaco no tecido está correlacionada com a quantidade relativa de débito cardíaco associado ao tecido. Sendo assim, os tecidos e órgãos com maior fluxo de sangue (cérebro, fígado, coração, intestino, pulmão e rins) podem estar expostos a uma maior concentração do fármaco, já que o mesmo é capaz de penetrar em um tecido particular a partir da vasculatura. O débito cardíaco, um parâmetro fisiológico, pode então agir como um filtro para distribuição de um nanomaterial (FARAJI & WIPF, 2009).

Nanomateriais muito pequenos (1-20 nm) apresentam visualmente maior tempo de residência na circulação e menor extravasamento vascular para espaços intersticiais¹⁵. Isso pode causar uma diminuição do volume de distribuição ou até mesmo a alteração na distribuição no corpo, quando administrado via intravenosa. Partículas maiores que 200 nm são normalmente reconhecidas pelo sistema complemento e são eliminadas do organismo em maior extensão. Por isso, injeções locais requerem NP de tamanhos na ordem de 30 a 100 nm. Essa faixa é suficientemente grande para evitar infiltrações nos capilares, mas também pequenas o bastante para evitar a eliminação pelo sistema reticulo endotelial (SRE) (FARAJI & WIPF, 2009).

Dados de distribuição de NP via intravenosa no organismo demonstram que estes dispositivos se concentram principalmente no fígado, baço e medula óssea, pelo SMF. Esses órgãos funcionam como reservatórios, fazendo com que as NP sejam removidas rapidamente da

¹⁵ Pequena área, orifício ou espaço existente na estrutura de um órgão ou tecido orgânico que pode ser ocupado por um líquido extracelular.

circulação. Dessa forma, a segunda etapa do processo de liberação do fármaco *in vivo* é a degradação e excreção do polímero (UCHEGBU & SCHATZLEIN, 2006). Por isso, deve-se ter sempre a preocupação de que, quando a partícula for liberada o ativo deve ficar livre, assim como o polímero. Dessa forma, a responsabilidade com o acúmulo ou eliminação e degradação são certamente essenciais. Mesmo assim, a segurança para uso humano sempre irá depender de múltiplos fatores, como a via de administração, a dose, a frequência de administração e da liberação de fármacos relacionados à toxicidade de sua carga total.

2.4. NANOPARTÍCULASP POLIMÉRICAS NA TERAPIA DO CÂNCER

Na liberação de agentes terapêuticos em células tumorais *in vivo* é importante contornar os seguintes problemas: 1) resistência do tumor às barreiras fisiológicas; 2) resistência do fármaco e 3) distribuição, biotransformação¹⁶ e eliminação de fármacos anti-tumorais do organismo. Na quimioterapia, a resistência ao fármaco pode ser definida como a falta de redução do tamanho do tumor ou como a ocorrência de uma recidiva clínica após uma resposta inicial positiva do tratamento (KEDAR *et al.*, 2010).

Na terapia de tratamento de tumores, os mecanismos não celulares de resistência podem ser atribuídos a regiões do tumor pouco vascularizadas, as quais podem proteger as células cancerosas da citotoxicidade da quimioterapia. Normalmente, uma massa de células tumorais obtém nutrientes para o crescimento por difusão passiva até atingir um tamanho correspondente a cerca de 2 mm³. Para que o tumor continue a crescer deve ocorrer o desenvolvimento e formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), a fim de suprir com nutrientes a massa crescente de tumor. Uma variedade de sinais inicia a angiogênese, mas o processo não é muito ordenado, o que resulta em áreas pouco vascularizadas, que sofrem posterior necrose, e em má distribuição dos fármacos, enquanto outras áreas do tumor são muito

¹⁶ Biotransformação, transformação metabólica ou bioconversão é o processo em que substâncias como fármacos, nutrientes, dejetos e toxinas dentro de um organismo, passam por reações químicas, geralmente mediadas por enzimas, que o convertem em um composto diferente do originalmente administrado

vascularizadas. Além disso, os vasos sanguíneos dos tumores são anormais, possuindo ramificações e tortuosidades, permitindo o extravasamento de substâncias, já que as membranas apresentam anormalidades. Essas características resultam em permeabilidade aumentada para a passagem de moléculas por meio da parede do vaso para o interstício do tumor. O espaço entre as células endoteliais atinge a faixa de 100 a 780 nm, dependendo do tipo de tumor, bem diferente do tamanho das junções *tight* das células endoteliais normais que varia normalmente de 5 a 10 nm (WILTING *et al.*, 2012; GIULIANO & PAGES, 2013; COJOC *et al.*, 2014; VIDEIRA *et al.*, 2014).

A alta pressão intersticial e a baixa pressão microvascular podem retardar ou impedir o extravasamento das moléculas. O interstício do tumor é composto por uma rede de colágeno e um fluido parecido com um gel, o que apresenta alta pressão intersticial e oferecem resistência para o fluxo interno de moléculas. O transporte de fármacos para o interstício é determinado pelo balanço de forças entre a pressão intersticial e as propriedades de difusão do fármaco (tamanho de partícula, configuração, natureza hidrofóbica, carga elétrica). A pressão intersticial do tumor é maior no seu centro e menor na sua periferia, favorecendo a diminuição da difusão do fármaco para o centro do tumor (KRISHNA & MAYER, 2000). Não obstante, o ambiente ácido dos tumores pode também conferir um mecanismo de resistência contra fármacos de caráter básico. Esses compostos podem ainda estar ionizados, impedindo a difusão por meio da membrana celular (KRISHNA & MAYER, 2000).

A resistência dos tumores a intervenções terapêuticas ainda pode ser atribuída a mecanismos celulares relacionados às alterações na bioquímica das células tumorais. Isso inclui uma atividade alterada de sistemas enzimáticos específicos, regulação alterada da apoptose ou mecanismos baseados em transportes (como sistema de efluxo da glicoproteína P, responsável pela resistência multi-droga ou pela proteína associada à resistência multi-droga). As proteínas de efluxo na membrana celular, como a glicoproteína-P, diminuem a concentração intracelular dos fármacos (MAEDA *et al.*, 2009). A glicoproteína-P também está presente na membrana nuclear, limitando o transporte do fármaco para o núcleo (PLAPIED *et al.*, 2011). Os fármacos que

alcançam o ambiente intracelular podem posteriormente ser capturados por vesículas citoplasmáticas e não serem liberados, sendo depois degradados ou excretados das células (VASIR & LABHASETWAR, 2005). Por isso, uma liberação de fármacos efetiva deve superar todos esses mecanismos de resistência.

Finalmente, fármacos usados nas terapias anti-tumorais geralmente exibem um grande volume de distribuição e são tóxicos, tanto para as células tumorais quanto para as células normais, sendo a eficácia da quimioterapia geralmente limitada pelos efeitos colaterais. Estrategicamente, esses fármacos podem ser associados às NP com o objetivo de superar os mecanismos celulares e não celulares de resistência, aumentando desta forma a seletividade dos fármacos às células cancerosas e diminuindo a toxicidade a tecidos normais. Se desenvolvida apropriadamente, as NP podem agir como veículos capazes de atingir células tumorais e proteger o fármaco de uma inativação prematura durante o transporte (HALEY & FRENKEL, 2008).

De fato, em relação ao tumor, o mecanismo de acúmulo das NP injetadas via intravenosa baseia-se na difusão passiva. A absorção pode também resultar de um reconhecimento específico, no caso das NP reconhecerem um ligante (MOGHIMI *et al.*, 2001).

Normalmente, a depuração via sistema linfático é seriamente comprometida, já que existe uma retenção adicional das partículas coloidais no interstício do tumor. Esse conceito particular é denominado retenção e permeabilidade aumentada (EPR), que será descrito com detalhes na próxima seção, resultando no acúmulo de fármacos antitumorais (MAEDA *et al.* 2009; SINGH & LILLARD, 2009; FANG *et al.*, 2011). As NP ainda podem agir nas células, sendo endocitadas ou fagocitadas por células, como resultado da internalização celular do fármaco encapsulado. Além disso, a liberação controlada do fármaco no interstício tumoral pode ser alcançada por meio do controle da estrutura da NP, como os tipos de polímeros usados e o modo como o fármaco é associado ao carreador.

A contribuição das NPP convencionais para o aumento da eficácia de fármacos antitumorais é limitada, atingindo tumores apenas ao nível dos órgãos SMF. Direcionar as NP

carregadas de fármacos a outros tecidos tumorais não pode ser viável, devido ao pequeno tempo de circulação (a meia-vida média de NPP convencionais é de 3-5 minutos depois da administração intravenosa). Além disso, a penetração do carreador por meio do endotélio tumoral, que permite o extravazamento, seria baixa, levando a concentrações subterapêuticas do fármaco próximos às células neoplásicas.

Diante deste cenário, outros dispositivos nanoparticulados devem ser considerados para atingir tumores não localizados na área SMF. Recentemente, um grande esforço tem sido feito para desenvolver NPP invisíveis aos macrófagos, caracterizadas por demonstrarem um tempo de meia-vida prolongado no sangue. Isso permite que essas NP sejam capazes de alcançar tumores localizados fora da região SMF (KEDAR *et al.*, 2010)

O tamanho e as características de superfície dessas NP são as chaves para o destino biológico, já que esses parâmetros podem prevenir por macrófagos do sistema fagocítico mononuclear (MPS). Como já mencionado, um tamanho menor que 100 nm de diâmetro e uma superfície hidrofílica (ao contrário da hidrofóbica das NP convencionais) são necessários para reduzir a opsonização e subsequente depuração pelos macrófagos (VIDYASAGAR, 2013).

O maior avanço no campo das NPP para tratamento do câncer foi a utilização de polímeros hidrofílicos (PEG, poloxamina, poloxamers, polissacarídeos) para cobrir eficientemente a superfície de NPP convencionais. Esse revestimento provê uma nuvem dinâmica de cadeias hidrofílicas e neutras na superfície das partículas, responsáveis por repelir proteínas plasmáticas. Polímeros hidrofílicos podem ser inseridos na superfície por duas maneiras: adsorção de surfactantes ou uso de blocos ou ramificações em copolímeros. A segunda estratégia, que consiste basicamente na ligação covalente de copolímeros anfífilos, é geralmente preferida, pois evita a possibilidade da dessorção do revestimento por diluição ou posterior contato com componentes do sangue. A cobertura das NPP convencionais para obtenção de um carreador de longa circulação tem sido a primeira estratégia usada para atingir diretamente um tumor *in vivo* (LIECHTY & PEPPAS, 2012).

Muito esforço também vem sendo feito para alcançar uma liberação alvo eficiente, baseada no processo de reconhecimento molecular (interação ligante-receptor ou anticorpo-antígeno). Em alguns casos, a liberação alvo específica pode levar a uma internalização celular mediada por receptor. Por exemplo, tomando vantagem dos receptores de folato na superfície de células malignas, as NP conjugadas com folato foram desenvolvidas na esperança do folato ajudar na absorção seletiva do fármaco pelas células cancerosas (STELLA *et al.*, 2000). O folato, neste caso, foi localizado no citoplasma da célula como consequência da endocitose mediada por receptor. As NPP conjugadas com folato podem não só atingir seletivamente células cancerosas, como também aumentar a internalização de fármacos encapsulados nas células cancerosas.

2.4.1. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS E O EFEITO RPE NO TRATAMENTO DO CÂNCER

Na terapia contra o câncer, os vasos sanguíneos vêm recebendo grande atenção, já que a angiogênese constitui o maior foco de atenção no processo de formação de um tumor e de sua inibição. Entre vários fatores de crescimento endoteliais, um em particular se destaca: o fator de crescimento endotelial (EGF), que foi identificado como o fator de permeabilidade vascular (VPF). O VPF facilita o extravasamento dos componentes do plasma sanguíneo para o espaço intersticial dos tecidos tumorais por meio das paredes dos vasos, o que resulta num suporte nutricional e suprimento de oxigênio para o rápido crescimento das células tumorais. Já foram encontrados muitos outros potentes mediadores de permeabilidade vascular em tecidos tumorais, como bradicinina, óxido nítrico, peroxinitrito, collagenase e prostaglandinas (MAEDA *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2001; KEDAR *et al.*, 2010).

O acúmulo e retenção de fármacos contidos em NP poliméricas são mais favorecidos no tecido tumoral, quando comparado com os tecidos normais, fenômeno conhecido como *Efeito de Retenção e Permeabilidade Elevada* (EPR) de partículas de macromoléculas e lipídeos em tumores sólidos, descrito pela primeira vez por Matsumura e Maeda em 1986 (MATSUMURA & MAEDA, 1986). Esse efeito se aplica apenas para partículas de macromoléculas

e não para compostos de baixa massa molar, a categoria a que a maioria dos fármacos pertence hoje em dia. Esses compostos são livremente distribuídos por difusão para vários tecidos e órgãos, uma vez que os compostos se difundem contra o gradiente de concentração até atingirem o equilíbrio. Sua concentração no tumor não pode ser maior que no plasma sangüíneo, nem pode ser retido em altas concentrações no tumor por um período significativo devido à rápida excreção para a corrente sangüínea. A concentração no plasma diminui rapidamente como resultado de uma eficiente depuração renal via urina. Ao contrário das macromoléculas, os fármacos contidos em partículas poliméricas são retidos no tecido tumoral em uma concentração bem maior que no plasma (MAEDA, 2012; MAEDA *et al.* 2013; MAEDA, 2015). O fenômeno de EPR é reconhecido como uma característica de um tumor viável e de rápido crescimento. Este efeito também é observado na periferia de tumores e em tecidos normais que circundam este tumor, devido à variedade de mediadores vasculares localizados nesta região. Fármacos poliméricos podem ser rapidamente eliminados do tecido normal via drenagem linfática, quando comparado com tecidos tumorais. Tudo isso demonstra que a vasculatura de um tumor pode ser um alvo ideal para liberação seletiva de agentes anti-tumorais.

A conjugação do fármaco com um polímero próprio (biocompatível) é bem aceita porque o polímero confere características farmacocinéticas ao princípio ativo original de baixo peso molecular. De acordo com Maeda e colaboradores (2001), tais características incluem:

- Prolongamento do tempo de meia-vida no plasma;
- Maior eficiência em alcançar o tumor e suprimir a toxicidade;
- Eliminação da supressão da imunogenicidade e antigenicidade;
- Estabilidade contra degradação de enzimas hidrolíticas ou radicais livres;
- Mudança na solubilidade, de maneira que princípios ativos insolúveis podem ser solubilizados;
- Diversificação da formulação;
- Ativação de macrófagos de grande valor para terapia do câncer;

- Melhor custo-benefício, já que a posologia diminui, ao mesmo tempo em que a eficácia aumenta.;
- Possibilidade de formulação oral, mesmo para peptídeos e proteínas (mesmo com grande susceptibilidade a enzimas digestivas e pH ácido), já que a administração de uma formulação oleosa permite melhor absorção intestinal;
- Melhora da endocitose celular;
- Redução do efluxo de fármacos, já que o sistema de efluxo mediado pela glicoproteína-P nas células multirresistentes não opera no caso de fármacos poliméricos;

Neste cenário, uma menor quantidade de fármaco é liberada em tecidos e órgãos normais. Porém, deve-se saber que essas melhorias são significativas apenas quando se usa fármacos poliméricos. Deve-se ter em mente que os vasos sanguíneos tumorais são alvos da liberação específica de fármacos anti-tumorais, que reduzem os efeitos colaterais porque o efeito EPR facilita o acúmulo seletivo de fármaco, embora não em órgãos vitais normais.

2.4.2. PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS NA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS ANTI-TUMORAIS

Atualmente é possível combater o câncer e individualizar a terapia com o auxílio de tratamentos personalizados. Idealmente, a medicina clínica deveria usar a nanotecnologia baseada em marcadores tumorais de cada paciente, enquanto que os cientistas formulariam as NPP usando os mesmos biomarcadores daqueles encontrados no tumor do paciente, carregando o fármaco específico para se ligar à proteína biomarcadora relacionada àquele tumor. Esses biomarcadores do câncer incluem uma grande variedade de moléculas como genes mutantes, RNAs, proteínas, lipídeos, carboidratos e outros metabólitos menores. A apresentação ou expressão alterada está relacionada a uma mudança biológica (expressa como uma neoplasia).

Muitos peptídeos e proteínas possuem atividade biológica que os caracterizam como potenciais agentes terapêuticos, em especial anti-tumorais. Anticorpos ligantes câncer-específicos também podem ser considerados como proteínas anti-tumorais como os anticorpos monoclonais (AM). A terapia com AM já vem sendo estudada pelos últimos 15 anos e é considerada uma das estratégias de maior sucesso para o combate de tumores em pacientes com tumores sólidos e doenças hematológicas malignas. O fundamento desta terapia consiste no levantamento dos antígenos expressos na superfície do tumor a ser tratado por meio de técnicas sorológicas. Esses antígenos normalmente são super expressos na superfície do tumor, quando comparado com tecidos normais, o que pode torná-lo alvo seletivo de um “anticorpo” (com função agonista ou antagonista), modulando o sistema imune ou liberando um fármaco específico que está conjugado com esse anticorpo (SCOOT *et al.*, 2012).

A utilização de proteínas e peptídeos como agentes terapêuticos é dificultada pela rápida eliminação na filtração renal, pela degradação enzimática, pela aprisionamento pelo sistema retículo endotelial (SRE) e pelo acúmulo em órgãos e tecidos que não são alvos. Em função da rápida eliminação e ampla distribuição de fármacos em órgãos não-alvo, em muitas terapias o fármaco precisa ser administrado em grandes quantidades, ocasionando em certos pacientes uma toxicidade não-específica (MAEDA *et al.* 2009; FANCIULLINO *et al.*, 2013).

Muitos peptídeos e proteínas, assim como anticorpos, exercem ação extracelular pela interação com receptor. Porém, pode haver muitos outros alvos dentro da célula. Além disso, a baixa permeabilidade da membrana a macromoléculas representa um obstáculo adicional para o desenvolvimento de formulações anti-tumorais baseadas em peptídeos e proteínas. A filtração e excreção renal são majoritariamente responsáveis pela rápida eliminação das proteínas de baixo peso molecular (menor que 40 kDa) da circulação sanguínea. Isso pode ser prevenido pela conjugação de biomoléculas com polímeros solúveis em água, os quais resultam num complexo maior que 40 kDa (MAEDA *et al.*, 2009; MAEDA, 2015,).

A liberação eficaz de fármacos anti-tumorais em tumores resolve apenas uma parte do problema. Para muitos fármacos conjugados a proteínas e peptídeos, o próximo desafio é alcançar a liberação intracelular, uma vez que muitos alvos de fármacos anti-tumorais estão localizados dentro das células. Porém, nem todos os alvos de proteínas, que podem ser identificados e validados por ferramentas de biologia molecular são considerados adequados para o desenvolvimento de medicamentos anti-tumorais, geralmente devido à localização intracelular (SCOOT *et al.*, 2012).

Assim, o conhecimento atual provê algumas abordagens promissoras para a liberação específica de fármacos anti-tumorais, conjugados com proteínas e peptídeos, em tumores e células tumorais a partir de sistemas poliméricos nanoparticulados.

2.4.2.1. Nanopartículas Poliméricas Conjugada com Albumina como Estratégia para Liberação Alvo de Fármacos Antitumorais

A albumina é uma proteína de alto valor biológico presente principalmente na clara do ovo, no leite e no sangue. Portanto, existem três tipos principais de albumina: a ovoalbumina (OVA), a albumina de soro bovino (BSA) e a albumina de soro humano (HSA).

A OVA é uma proteína funcional encontrada no ovo. Quimicamente é uma fosfoglicoproteína monomérica que consiste em 385 resíduos de aminoácidos, em que cada molécula tem uma ligação dissulfeto interna e quatro grupos sulfidrilas livres. A massa molar é de 47.000 Da e o ponto isoelétrico (PI) é de 4,8. A OVA é muito utilizada como carreador de fármacos devido à disponibilidade e baixo custo, quando comparada com outras proteínas. Além disso, este tipo de albumina exhibe muitas outras funções, como habilidade de formar uma rede de gel e estabilizar emulsões e espumas (ELZOGHBY *et al.*, 2012).

A BSA tem peso molecular de 69.323 Da e PI de 4,7 em água a 25 °C. Esta albumina é amplamente utilizada para liberação de fármacos devido a sua importância médica, abundância,

baixo curso, facilidade de purificação, propriedades ligantes e grande aceitação na indústria farmacêutica (ELZOGHBY *et al.*, 2012).

A BSA pode ser substituída pela HSA, a fim de evitar possíveis respostas imunológicas *in vivo*. A HSA (Figura 4) é a proteína mais abundante no plasma humano (35-50 g/L de soro), com uma meia-vida média de 19 dias. A HSA é uma proteína globular monomérica muito solúvel, apresentando 585 resíduos de aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 66.500 Da. A HSA contém 35 resíduos de cisteína, formando um grupo sulfidríla e 17 pontes dissulfeto. Esta não é uma proteína padrão, uma vez que é extremamente robusta ao pH (estável na faixa de pH 4 a 9), temperatura (pode ser aquecida a 60 °C por até 10 horas) e solventes orgânicos. Quando a HSA é quebrada, aminoácidos fornecem alimentação para os tecidos periféricos. Estas propriedades, bem como a captação preferencial pelo tecido tumoral e inflamado, a disponibilidade imediata, a degradabilidade e a ausência de toxicidade fazem dela uma candidata ideal à liberação de fármacos (ELZOGHBY *et al.*, 2012).

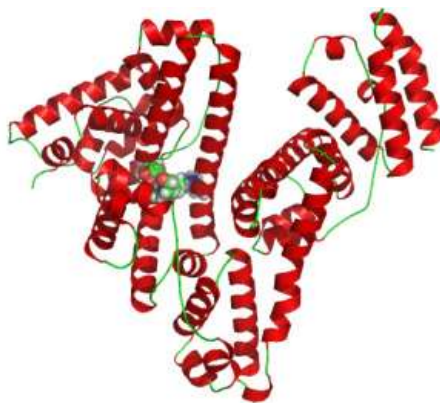


Figura 4. Estrutura cristalográfica de Raio-X da albumina de soro humano (KHAN & KHAN, 2008).

A albumina possui uma estrutura primária muito bem definida e, por isso, oferece grande possibilidade de se ligar às superfícies das NPP, devido à presença de grupos funcionais do tipo carboxílico ou amino. A conjugação da albumina com a superfície da NPP é realizada normalmente por meio da formação de uma ligação covalente entre o ligante da NPP e o grupo funcional da albumina. Quando a albumina se liga à superfície de um nanocarreador, ela pode

modificar os parâmetros farmacocinéticos do fármaco carregado, aumentar a estabilidade do nanossistema, prolongar o tempo de meia-vida de circulação, e diminuir a eliminação do fármaco e agir como vetor. (ELZOGHBY *et al.*, 2012)

A tecnologia de ligação da NPP à albumina, também chamada de tecnologia “Nab” (“*Nanoparticle-albumin bound*”), permite o acoplamento de fármacos hidrofóbicos inclusos em NPP à albumina. Esta técnica permite o transporte de fármacos hidrofóbicos pelo organismo sem a necessidade de utilização de solventes tóxicos, evitando assim reações de hipersensibilidade. Portanto, além de evitar os efeitos adversos provenientes do solvente utilizado, a tecnologia Nab permite que maiores concentrações do fármaco ativo atinjam os tecidos tumorais (BERRY *et al.*, 2005, FANCIULLINO *et al.*, 2013).

Os fármacos chamados Taxanos (como docetaxel, paclitaxel) são considerados os agentes anti-tumorais com maior atividade no tratamento de tumores mamários (KATSETOS & DRÁBER, 2012). A forma comercial de paclitaxel é formulada com Cremofor EL^{®17} e etanol como veículos. O docetaxel é formulado com Tween 80[®] e etanol como diluentes. Esses solventes e surfactantes são biologicamente e farmacocineticamente ativos e induzem uma série de efeitos adversos. Por isso, os taxanos em geral e o paclitaxel em particular, além de fármacos anti-tumorais hidrofóbicos, são fármacos candidatos a serem formulados em formas de administração mais aceitáveis do ponto de vista clínico.

A albumina é o carreador natural de moléculas hidrofóbicas do corpo humano e o meio pelo qual ácidos graxos, hormônios e vitaminas solúveis em gordura são transportados. Por isso, a ligação da albumina ao receptor de glicoproteína gp60 nas células endoteliais resulta na transcitose de NPP intactas por meio da membrana celular. A endocitose difere da transcitose, em que o conteúdo das vesículas não é digerido (Figura 5).

¹⁷ Marca registrada da BASF para sua versão de óleo de mamona polietoxilado. É preparado pela reação de 35 moles de óxido de etileno para cada mol de óleo de rícino. O produto resultante é uma mistura registrada com número CAS 61791-12-6.

Considerando que o sucesso da quimioterapia contra o câncer depende da liberação do agente ativo na célula tumoral, neste caso, o mecanismo natural do corpo humano para liberação de proteínas para as células, utilizando a albumina, pode ser utilizado como ferramenta para a liberação de fármacos antineoplásicos. Além do transporte ativo do fármaco, mediado pela albumina, o grau de vetorização seletiva para células tumorais é fornecido pelo SPARC (proteína secretada ácida e rica em cisteína), proteína que modula a interação das células com a matriz extracelular (BREKKEN & SAGE, 2001).

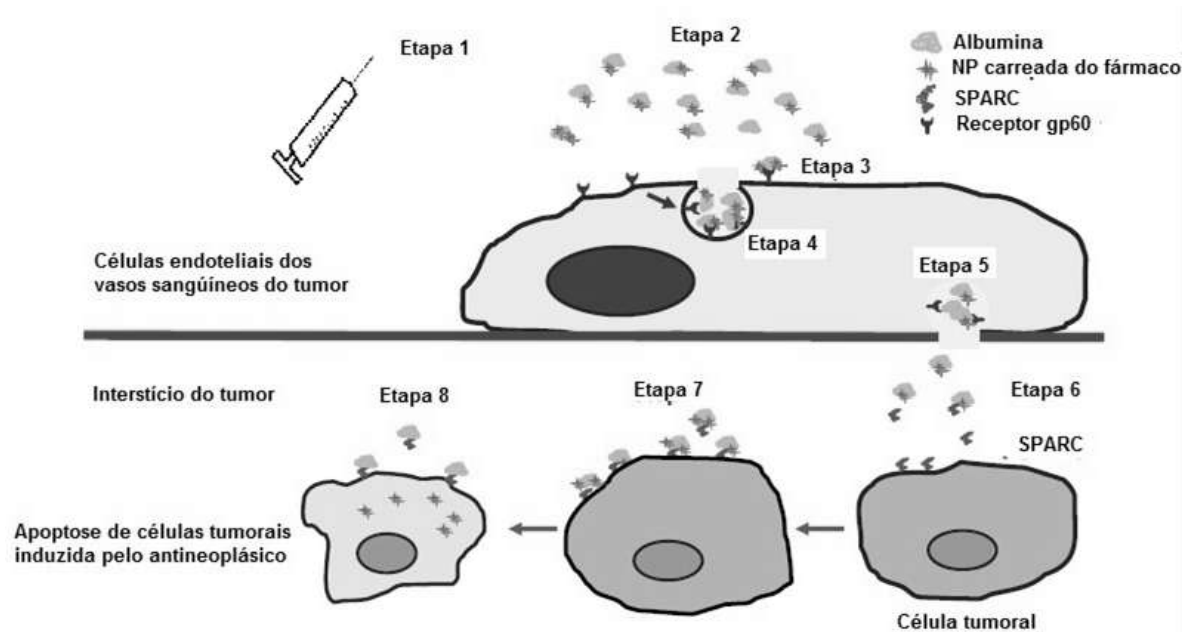


Figura 5. A tecnologia Nab permite tornar mais seletiva a liberação de fármacos em células tumorais por meio da ligação das NP com a albumina. Etapa 1 – Injeção do Nab-fármaco na corrente sanguínea; Etapa 2 – O Nab-fármaco suspenso no sangue; Etapa 3 – Porque está ligado à albumina, o Nab-fármaco se liga ao receptor gp60 presente na célula endotelial do vaso sanguíneo do tumor; Etapa 4 – Ligação à albumina ativa a transcitose e faz com que o fármaco na NP migre por meio do citoplasma; Etapas 5 e 6 – Nab-fármaco se liga a SPARC; Etapa 7 – Ocorre um acúmulo de fármaco via SPARC na membrana da célula tumoral; Etapa 8 – Difusão do fármaco no compartimento intracelular e subsequente indução da célula à morte (CORTES & SAURA, 2010)

A SPARC se liga à albumina com uma afinidade tão grande quanto o receptor gp60, sendo super-expressa em muitos tipos de tumores. Apesar de estar associada a tumores, a SPARC não é específica para tecidos e células tumorais, já que também é encontrada em tecidos normais saudáveis, especialmente durante o desenvolvimento embrionário. O aumento dos níveis de SPARC está associado com o remodelamento e hiperproliferação de tecidos e ossos. Contudo, o

aumento pronunciado em sua expressão está associado a transformações malignas. Além disso, junto com as integrinas, a SPARC pode estar envolvida no processo de metástase e, por isso, altos níveis de expressão de SPARC estão associados a um mau prognóstico de muitos tumores, incluindo os de cabeça, pescoço, pulmão e mama. SPARC está presente na superfície de células de carcinoma de mama humano MX-1 e é por isso que o transporte de altas concentrações de antineoplásico num sistema NP conjugado à albumina pode levar a uma liberação específica e seletiva de altas concentrações do fármaco em células tumorais e, conseqüentemente, a uma apoptose seletiva (KOUKOURAKIS *et al.*, 2003; CHIN *et al.*, 2005; WATKINS *et al.*, 2005; CORTES & SAURA, 2010).

A tecnologia Nab já demonstrou bastante eficácia, quando comparada com outras quimioterapias, no tratamento de câncer de mama metastático em estudos pré-clínicos e em estudos clínicos já em fase II, utilizando Paclitaxel em NP de albumina (FOOTE, 2007; DRANITSARIS *et al.*, 2007; GLÜCK *et al.*, 2010; YAMOTO *et al.*, 2011; LLUCH *et al.*, 2014).

2.5. PREPARO DE NANOPARTÍCULAS

As propriedades das NPP devem ser otimizadas, dependendo de cada tipo de aplicação. Para alcançar as propriedades de interesse, o modo de preparo dessas NP desempenha um papel fundamental.

O preparo de NPP pode ser feito por basicamente dois métodos: usando polímeros já formados ou formando as NP com auxílio de técnicas específicas de polimerização. Na área farmacêutica, normalmente utilizam-se polímeros prontos, sendo as técnicas de evaporação do solvente e secagem por aspersão (*spray drying*) as mais usuais (SAWALHA *et al.*, 2011).

Por outro lado, as NPP podem ser sintetizadas diretamente por meio da polimerização de monômeros, usando várias técnicas distintas de polimerização, principalmente em sistemas dispersos como os de polimerização em suspensão, emulsão, microemulsão e miniemulsão. A

escolha do método de preparo é feita com base em inúmeros fatores, como o tipo de sistema polimérico, a área de aplicação, o tamanho requerido da partícula, a via de administração e o tipo de fármaco a ser utilizado (RAO & GECKELER, 2011). Independentemente do método escolhido, o produto final obtido deve apresentar algumas características, como a manutenção da estabilidade e atividade do fármaco, alta eficiência de encapsulação, baixo índice de polidispersão de tamanho e de massas molares das NPP obtidas e cinética de liberação do fármaco reprodutível entre as bateladas.

2.5.1. EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE

O método de evaporação de solvente (Figura 6) foi o primeiro método a ser desenvolvido para preparar NPP a partir de polímeros prontos (VANDERHOFF *et al.*, 1979). Apesar de ter sido originalmente proposto para polímeros sintéticos, a maior parte do desenvolvimento desta técnica ocorreu no campo da tecnologia farmacêutica, utilizando polímeros naturais para produção de medicamentos (KUMARI *et al.*, 2010). A técnica de evaporação de solvente consiste no preparo de soluções de polímero e do fármaco em solventes voláteis. Até meados da década de 1990, diclorometano e clorofórmio eram os solventes utilizados, mas recentemente foram substituídos por acetato de etila, que possui um melhor perfil toxicológico. A emulsão formada é então convertida em uma suspensão de NP durante a evaporação do solvente, que forma a fase dispersa da emulsão, resultando na precipitação do polímero e do fármaco na forma de partículas sólidas (ANTON *et al.*, 2008).

Dentre as técnicas de dispersão, a técnica de evaporação de solvente é a mais utilizada atualmente para o preparo de NP de polímeros. Nos métodos convencionais, duas estratégias estão sendo muito usadas para formação das emulsões: o preparo de emulsões simples (como água em óleo – A/O) ou emulsões duplas (como água em óleo em água – A/O/A). Esses métodos usam inicialmente uma etapa de homogeneização de alta pressão ou ultrassom, seguido da evaporação do solvente sob agitação contínua na temperatura ambiente ou sob

pressão reduzida. As NP sólidas podem ser coletadas por ultra-centrifugação e “lavadas” com água destilada, para remover qualquer tipo de aditivo ou surfactante remanescente. Finalmente, o produto final é seco com auxílio de alguma técnica de secagem, como Liofilização (secagem a vácuo sob pressão reduzida) (SEVERINO *et al.*, 2011). Portanto a técnica requer a formação inicial de uma emulsão estável e em seguida secagem apropriada do meio.

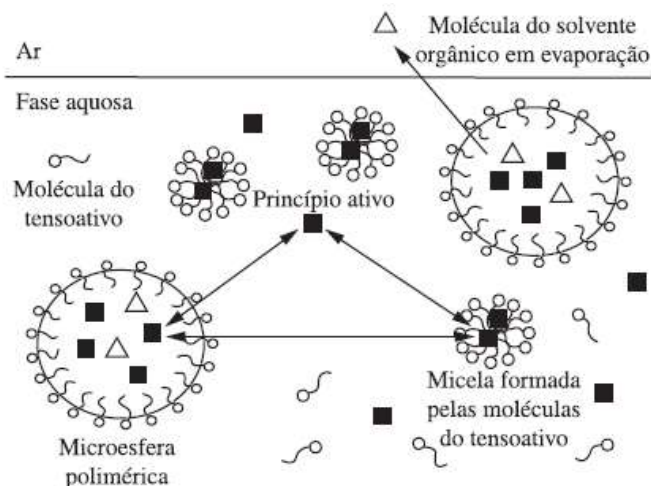


Figura 6. Representação esquemática do processo de obtenção de NP por evaporação de solvente (SEVERINO *et al.*, 2011).

As principais vantagens dessa técnica são (KIM, *et al.*, 2002; VARDE & PACK, 2004; FREITAS *et al.*, 2005; VAUTHIER & BOUCHEMAL, 2008): obtenção de emulsão estável, emprego de baixas temperaturas, bom controle do tamanho de partícula e possibilidade de utilização de fármacos polares e apolares. A principal desvantagem dessa técnica é a possibilidade de coalescência das NP durante o processo de evaporação do solvente. Além disso, essa técnica é atualmente utilizada apenas em escala laboratorial, por apresentar dificuldades de escalonamento relacionadas ao emprego de grandes quantidades de solvente e requer a aplicação de grandes quantidades de energia para emulsificação e secagem.

2.5.2. SECAGEM POR ASPERSÃO

O método de secagem por aspersão (Figura 7) já é bem estabelecido e muito usado na indústria farmacêutica para produzir NPP secas a partir de uma fase aquosa (BROADHEAD *et al.*, 1992), com a vantagem de que a formação e secagem da partícula pode ser realizada numa única etapa e de forma contínua (LEE *et al.*, 2012). Várias propriedades da partícula, como tamanho médio e densidade, podem ser facilmente ajustadas por meio da manipulação de parâmetros do processo ou da própria configuração do equipamento de secagem. Desta forma, esta técnica é bastante versátil para formular NP de fármacos.

O processo típico de secagem por aspersão normalmente é operado em equipamentos conhecidos como “*spray dryer*” e passa por 4 etapas fundamentais: 1) atomização da alimentação (líquidos, emulsões ou suspensões) no *spray*, 2) contato *spray*-ar, 3) secagem do *spray* e 4) separação do produto seco do ar de secagem. A matéria-prima líquida é atomizada num *spray* a finas gotículas e depois colocada em contato com o gás de secagem a quente numa temperatura suficiente para ocorrer a evaporação da mistura. Conforme a mistura evapora das gotas, o produto sólido é formado e o pó é recuperado do gás de secagem (LEE *et al.*, 2012). O tempo necessário para secagem das gotas depende do tempo de residência da gota na fase gasosa que por sua vez depende da geometria da câmara, vazão de fluxo do gás carreador, temperatura e pressão. A coleta do pó pode ser feita usando uma bolsa de filtro (OKUYAMA *et al.*, 2006).

Como no caso anterior, o escalonamento do processo de secagem por aspersão hoje ainda não é possível. O preparo de NP por secagem por aspersão hoje é conduzido apenas em ambientes laboratoriais e com baixíssima eficiência. O desenvolvimento de técnicas por *spray dryer* para a produção de NPP constitui a fronteira do conhecimento na área de secagem

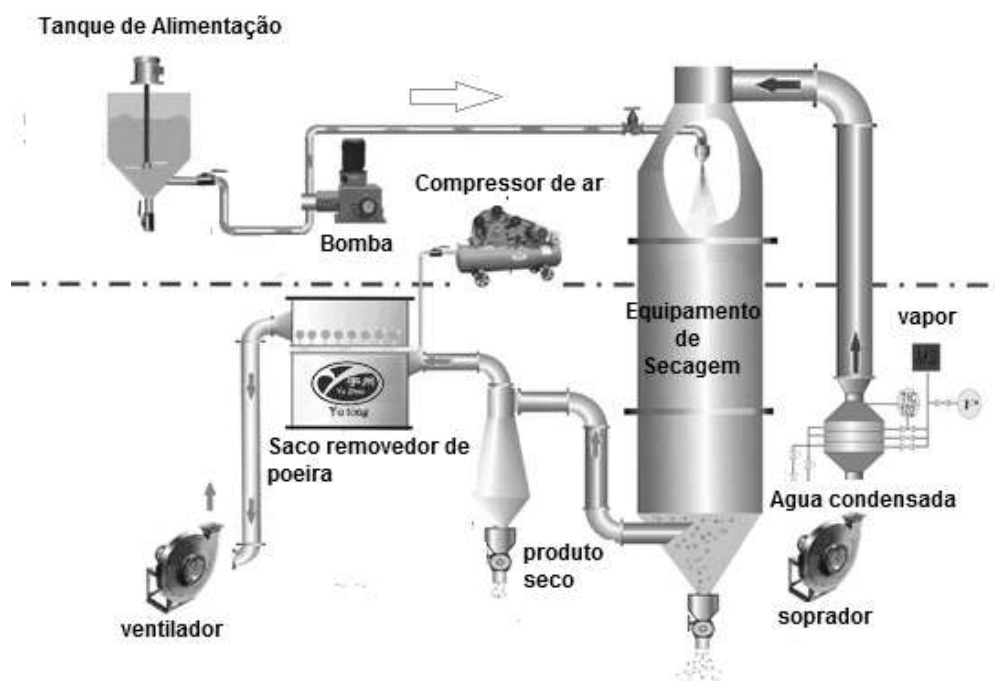


Figura 7. Representação esquemática do processo de obtenção de NP por secagem por aspersão (PATEL *et al.*, 2009).

2.5.3. TÉCNICAS DE POLIMERIZAÇÃO UTILIZADAS PARA O PREPARO DE NANOPARTÍCULAS

2.5.3.1. Polimerização em Emulsão

A polimerização em emulsão é caracterizada por ocorrer em sistemas heterogêneos, sendo que a maior parte da reação ocorre no interior das partículas poliméricas (20 a 1000 nm de diâmetro) dispersas na fase aquosa (ARAÚJO, 1999). Uma formulação típica é composta de água, uma mistura de monômeros, um co-estabilizante, um surfactante e um iniciador de radicais livres (CHERN, 2006)

No processo de formação da emulsão convencional, o monômero (substância orgânica) é disperso na solução aquosa com auxílio de um surfactante e de agitação. Os surfactantes são compostos orgânicos anfífilos, com grupamentos funcionais de polaridades distintas nas extremidades, estando presentes na emulsão numa concentração que excede a

concentração micelar crítica (CMC), que é a menor concentração que induz a formação de micelas¹⁸ do surfactante. Nas micelas, os grupos hidrofílicos se orientam em direção à fase aquosa, enquanto os grupos lipofílicos se orientam em direção à fase orgânica no interior das micelas. Desta forma, ocorre a formação de agregados coloidais (micelas), compostos por moléculas de surfactantes e inchados com monômero solubilizado. Portanto, o sistema é inicialmente composto por gotas de monômero estabilizadas pelo surfactante, pelas micelas que contêm monômero dissolvido e pela fase aquosa (CHERN, 2006).

Quando o iniciador solúvel na aquosa é adicionado ao sistema, inicia-se a decomposição e a geração de radicais livres a uma velocidade que depende da natureza química do iniciador, do pH do meio e da temperatura do sistema. A polimerização iniciada pela adição do iniciador gera partículas de tamanho submicrométrico por causa da captura de radicais livres pelas micelas (nucleação heterogênea), que exibem uma grande área interfacial óleo-água. Em geral, as gotas de monômero não são eficazes em competir com as micelas pela captura dos radicais livres formados na fase aquosa devido à área interfacial relativamente pequena. Porém, as gotas de monômero podem se tornar o local predominante de nucleação da partícula se o tamanho da gota for reduzido para uma faixa submicroscópica (miniemulsão) (ASUA, 2002; CHERN, 2006; THICKETT & STUART, 2007).

Serão discutidas a seguir as 3 fases usuais da reação de polimerização em emulsão (ARAÚJO, 1999; ASUA, 2002; CHERN, 2006). A primeira fase (Fase I) é a fase chamada de *Nucleação*. Nesta fase os radicais livres reagem com as moléculas de monômero dissolvidas na fase aquosa contínua. Isso resulta numa diminuição da hidrofobicidade dos radicais oligoméricos. Quando se alcança um comprimento de cadeia crítico, esses radicais oligoméricos se tornam tão hidrofóbicos que mostram forte tendência de entrar nas micelas inchadas com monômeros, onde continuam a propagar por meio da reação com moléculas de monômero. Dessa forma, as micelas inchadas de monômero são transformadas com sucesso em núcleos de partículas. Esse “embrião” de partícula continua a crescer adquirindo espécies reativas a partir das gotas de

¹⁸ Agregados de surfactants orientador em função da natureza anfifílica das moléculas do surfactante

monômeros e das micelas inchadas de monômeros. Além disso, as moléculas de surfactantes adsorvidas na superfície das gotas de monômero podem também desorver da superfície da gota, difundir por meio da fase aquosa e então adsorver sobre a superfície da partícula em expansão. O estágio de nucleação da partícula (Fase I) termina imediatamente após a exaustão das micelas.

O número de partículas de látex nucleadas por unidade de volume de água é proporcional à concentração de surfactante e de iniciador. Apesar de o período de nucleação ser relativamente pequeno (10-20% da conversão do monômero), ele controla o tamanho de partícula e a distribuição dos tamanhos de partícula (DTP). Quanto menor o período de nucleação da partícula e, portanto, quanto menor a concentração de surfactante, mais estreita é a DTP.

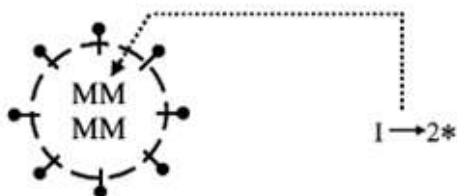
Deve ser notado que alguns mecanismos, além da nucleação das micelas, devem ser responsáveis pelo processo de formação da partícula quando a concentração de surfactante está abaixo da CMC. Já foi também proposto o mecanismo de nucleação homogênea para formação do núcleo da partícula na fase aquosa contínua. Primeiro, os radicais iniciadores são gerados e podem crescer de tamanho por conta da reação de propagação com as moléculas de monômero dissolvidas na fase aquosa. Os radicais oligoméricos então se tornam insolúveis em água quando um tamanho de cadeia crítico é atingido. O radical oligomérico hidrofóbico pode, portanto, precipitar e formar um núcleo de partícula na fase aquosa. A precipitação é seguida pela formação de partículas primárias estáveis via flocculação limitada do núcleo da partícula relativamente instável e adsorção das moléculas de surfactantes na superfície das partículas. As espécies de surfactantes necessárias para estabilizar essas partículas primárias são supridas pela fase aquosa e daquelas pela na superfície das gotas de monômero.

Na emulsão convencional as gotas de monômero (1-10 μm) são bem maiores que as micelas inchadas com monômeros (10-20 nm). Em contrapartida, as micelas estão presentes em maior quantidade que as gotas de monômeros; dessa forma, as partículas poliméricas são formadas preferencialmente por nucleação homogênea ou heterogênea (LANDFESTER *et al.*, 1999; ASUA, 2002)

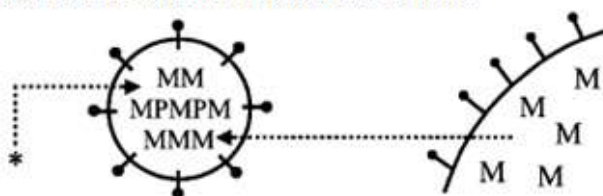
A segunda fase (Fase II) é chamada de *Crescimento*. Nesta fase, depois que o processo de nucleação é realizado, o número de partículas de látex por unidade de volume de água permanece relativamente constante até o final da polimerização. A reação de propagação dos radicais livres com as moléculas de monômero ocorre, primeiramente, nas partículas inchadas com monômero. As gotas de monômeros servem apenas como reservatórios para suprir as partículas em crescimento com monômeros e surfactantes. A maior parte do monômero é consumida nesse estágio de crescimento da partícula (de 10-20 a 60% de conversão). O estágio de crescimento da partícula (Fase II) acaba quando as gotas de monômero desaparecem no sistema de polimerização. A concentração de monômero nas partículas não varia durante o progresso da polimerização na presença de gotas de monômeros. Como resultado, uma taxa de polimerização de equilíbrio essencialmente constante é atingida durante a Fase II.

A terceira fase (Fase III) é a fase de *Diminuição da Concentração de Monômero*. Na Fase III as partículas de látex se tornam ávidas por monômeros e a concentração de monômero no local da reação continua a diminuir até o fim da polimerização. Como consequência, a taxa de equilíbrio da polimerização observada na Fase II não pode ser mantida, e a taxa de polimerização tende a decrescer durante a Fase III. Por outro lado, a taxa de polimerização pode aumentar rapidamente com o aumento da conversão do monômero. Isso decorre da redução na taxa de reação de terminação bimolecular entre dois radicais poliméricos dentro da partícula muito viscosa quando a polimerização é conduzida a uma temperatura mais baixa que a temperatura de transição vítrea da solução de polímero e ávida de monômero. Esse fenômeno é denominado de efeito gel (RUSSEL *et al.*, 1992, CHEN & SAJJADI, 2009). Minimizar o conteúdo de monômero residual no produto final é essencial para o sucesso do desenvolvimento farmacêutico do produto por causa do risco potencial para os usuários finais. Representações esquemáticas do modelo de polimerização e da taxa de polimerização em função da conversão do monômero estão apresentadas nas Figuras 8 e 9.

Esquema 1: Nucleação das micelas inchadas de monômero



Esquema 2: Crescimento das partículas de latex



Partículas de latex

Gotas de monômero

Esquema 3: Consumo do monômero residual

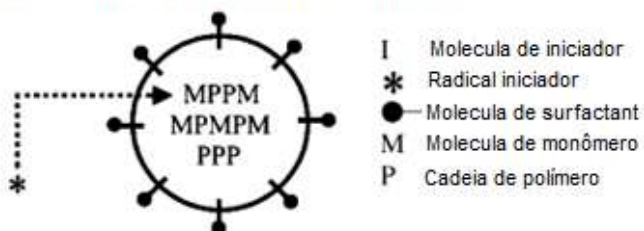


Figura 8. Representação esquemática do modelo de nucleação (CHERN *et al.*, 2006).

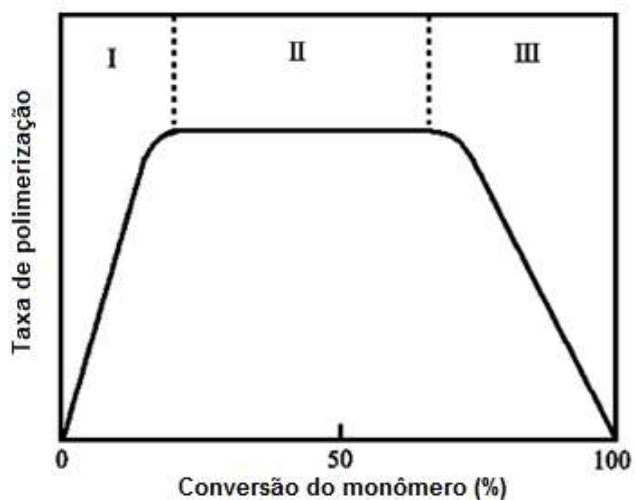


Figura 9. Representação esquemática da taxa de polimerização em função da conversão do monômero para polimerização em emulsão (CHERN *et al.*, 2006).

A ocorrência do “efeito gel” afeta sobremaneira a etapa de terminação, resultando na formação de espécies de alta massa molar, afetando a evolução do aumento da viscosidade do meio. Outro fator que também pode influenciar a etapa de terminação é a taxa de captura de radicais formados no meio aquoso, já que os radicais livres eventualmente presentes na partícula podem não se encontrar para promover a terminação em um ambiente de alta viscosidade. Uma vez capturado um outro radical, a probabilidade de terminação ocorrer aumenta bastante (PIRMA, 1982).

É importante ressaltar que nesse tipo de polimerização a concentração do agente emulsificante é crucial para determinação da taxa de reação, já que é a concentração de surfactante que determina a quantidade de partículas a serem formadas. Outro ponto importante é que a massa molar é definida essencialmente pela concentração de iniciador. Admitindo-se que a terminação é imediata, a cadeia polimérica cresce durante o período de tempo decorrido entre dois eventos de captura de radicais livres gerados no meio aquoso. Esse intervalo de tempo é inversamente proporcional à taxa de geração de radicais livres no meio aquoso (LANDFESTER *et al.*, 1999).

Dentre outras, as principais vantagens dos processos em emulsão são: a possibilidade de obter elevadas massas molares e elevadas taxas de reações simultaneamente, devido (i) à natureza compartimentalizada destes sistemas; (ii) facilidade de transferência de calor, (iii) à natureza heterogênea do meio; (iv) maior adequação a normas ambientais e (v) possibilidade de uso do produto final diretamente, dispensando etapa de separação. Atualmente, a importância dos processos em emulsão vem crescendo devido às leis ambientais mais rigorosas, pois esses processos em emulsão não usam solventes orgânicos. A reação pode ser feita em regime batelada, batelada alimentada (semi-batelada) ou regime contínuo. Os principais problemas de controle estão associados ao controle preciso da curva de distribuição de massas molares do produto final e à manutenção da estabilidade do látex. Além disso, nos casos em que é preciso separar o produto polimérico, a etapa de separação do polímero pode ser limitante (ARAUJO *et al.*, 2001).

2.5.3.2. Polimerização em Miniemulsão

A miniemulsão é um tipo especial de emulsão em que se obtém dispersões submicrométricas (na faixa de 50 a 500 nm) por meio da mistura de duas fases imiscíveis (por exemplo óleo em água ou água em óleo) na presença de agentes tensoativos e, possivelmente, na presença também com agentes de pressão osmótica (para minimizar a degradação de *Ostwald*). Esse sistema pode apresentar grande estabilidade por extensos períodos de tempo (FONSECA *et al.*,2010).

Os surfactantes utilizados para a polimerização em miniemulsão podem ser aniônicos, catiônicos, não-iônicos, misturas de emulsificantes aniônico e não-iônico e podem ser preparados *in situ* com surfactantes reativos (KITZMILLER *et al.*, 1995; CHERN *et al.*, 1999; LANDFESTER *et al.* 1999). Além disso, esses surfactantes devem apresentar os mesmos requisitos exigidos na polimerização em emulsão (EL-AASSER & MILLER, 1997): (i) ter uma estrutura anfifílica com grupos polares e não-polares; (ii) ser mais solúvel na fase aquosa, bem como estar prontamente disponível para adsorção na superfície das gotas; (iii) adsorver fortemente e não ser facilmente deslocado quando duas gotas colidirem; (iv) reduzir a tensão interfacial; (v) apresentar um potencial eletro-cinético suficiente para prevenir a aglomeração das gotas em emulsão; (vi) ser utilizado em pequenas concentrações; (vii) ser relativamente barato, não-tóxico e seguro para manusear. Uma grande variedade de surfactantes comerciais preenche esses requisitos.

O tamanho da partícula na polimerização em miniemulsão depende, entre outros fatores, da quantidade de surfactante utilizada: quanto menor a quantidade de surfactante, maior o tamanho médio das partículas. A quantidade média de surfactante utilizada neste tipo de polimerização varia visualmente na faixa de 1 a 5% do peso dos monômeros (LANDFESTER, 2001).

A coalescência acontece quando duas gotículas estão próximas o suficiente para que ocorra o contato entre as gotas levando à formação de uma única gota maior. LANDFESTER (2000) discute que é necessária a presença de surfactante na interface entre as gotículas da

miniemulsão para ocorrer a estabilização. Notou também que, durante a polimerização em miniemulsão com o surfactante lauril sulfato de sódio, a área da gotícula coberta com surfactante aumentava com o decréscimo do tamanho da partícula. Assim, o autor concluiu que quanto menores são as partículas, mais surfactante por área é preciso para obter um estado estável depois da miniemulsificação. LANDFESTER e colaboradores (1999) também observaram que o tamanho das gotas depende da quantidade da fase dispersa. Com a redução da fração de fase dispersa, o tamanho das partículas diminui devido à diminuição da taxa de coalescência.

Os agentes de pressão osmótica mais utilizados são o hexadecano e o álcool cetílico; porém, alguns compostos hidrófobicos (como polímeros) também podem ser usados. A estrutura ideal para tal substância deve apresentar baixa massa molar ter baixa solubilidade em água. O agente de pressão osmótica exerce uma pressão osmótica dentro da gotícula de monômero, neutralizando a pressão de Laplace, permanecendo dentro da gotícula e não se difundindo para outras gotículas (LIM & CHEN, 2000)

Como já dito anteriormente, os agentes de pressão osmótica são empregados para prevenir a degradação de *Ostwald*. Devido à energia de superfície, o potencial químico do monômero em gotas pequenas é maior que em gotas grandes ou em superfícies planas. Conseqüentemente, o monômero se difunde de uma gota pequena para uma gota grande, podendo levar à desestabilização da emulsão. Dessa maneira, a adição do agente de pressão osmótica retarda a degradação da emulsão por difusão molecular, porque a baixa taxa de difusão do agente permite que o monômero permaneça equilibrado entre as gotas, reduzindo a diferença de potencial químico entre as gotas (ASUA, 2002).

Na polimerização em miniemulsão, o surfactante é visualmente dissolvido na água, enquanto agente de pressão osmótica é dissolvido nos monômeros e ambas as fases são misturadas por agitação e, posteriormente, sujeitas a a um processo de homogeneização para formar a miniemulsão.

2.5.3.2.1. Técnicas de Homogeneização

Uma grande variedade de equipamentos está disponível comercialmente para promover a emulsificação de fases. Os mais importantes são os rotores, os sonicadores e os homogeneizadores de alta pressão. Os homogeneizadores de alta pressão são os mais eficientes pois geram os menores tamanhos de gotas e são facilmente escalonáveis. Os sonicadores e os sistemas rotor-estator são os menos efetivos por resultarem em distribuições mais longas e serem mais difíceis de escalonar (BLYTHE *et al.*, 1999, FONSECA *et al.*, 2010).

Os sistemas rotor-estator e outros dispositivos de cisalhamento (ex: ultra-turrax) dependem da turbulência para produzir a emulsificação. O tamanho mínimo de uma gota que pode ser alcançado com estes equipamentos depende da dimensão da escala de turbulência formada, a qual, por sua vez, depende da geometria do sistema rotor-estator e da velocidade de rotação (ASUA, 2002).

O sonicador produz ondas de ultrassom que fazem com que as moléculas oscilem em torno de uma posição de equilíbrio, conforme as ondas se propagam. Durante o ciclo de compressão, a distância média entre as moléculas diminui, embora durante o ciclo de rarefação a distância aumente. A rarefação resulta numa pressão negativa que pode causar a formação de vazios e cavidades (bolhas de cavitação) que podem crescer em tamanho. No ciclo seguinte de compressão da onda as bolhas são forçadas a contrair e podem até desaparecer totalmente. Ocorre, dessa maneira, um colapso total das bolhas, causando a quebra das gotas de monômero que estão em volta. O problema associado ao sonicador é que apenas a pequena região do fluido em volta da ponta do sonicador é diretamente afetado pelas ondas de ultrassom. Dessa maneira, para sofrer a quebra as gotas de monômero devem passar por meio desta região. Portanto, quando a sonicação é usada para formar uma miniemulsão, algum outro tipo de agitação deve ser usado para garantir que o fluido passe por meio da região de sonicação. Esse processo faz com que as características da miniemulsão dependam do tempo de sonicação. Então, existem evidências de que o tamanho de partícula diminui com o aumento tempo de sonicação. Essa

diminuição é, inicialmente, mais pronunciada e depois o tamanho da gota chega a um valor que depende tanto da formulação quanto da energia inserida (BIGGS & GRIESER, 1995; TEO *et al.*, 2008)

O homogeneizador de alta pressão pressuriza dispersões previamente formadas usando uma bomba de deslocamento positivo e um fluxo de alta velocidade por meio de um orifício estreito. O homogeneizador é constituído por uma bomba de pistões de alta pressão e por válvulas especiais denominadas de válvulas homogeneizadoras. O produto entra na sede da válvula, cuja saída é fechada por um êmbolo pelo aperto de uma mola ou pistão hidráulico. Devido à pressão da emulsão do produto, este êmbolo recua uma fração de milímetro e o produto sai por esta folga com uma velocidade extremamente elevada, de até 300 m/s, batendo contra um anel de impacto disposto em volta da válvula. Pela queda brusca de pressão e o impacto, as partículas de sólidos ou líquidos suspensos no produto se fracionam em partículas extremamente pequenas, conforme as condições de operação (MANEA *et al.*, 2008).

No homogeneizador de alta pressão, a homogeneização é devida quase que inteiramente a forças extensionais, com alguma contribuição da cavitação e das forças de impacto. A cavitação acontece porque uma grande variação de pressão ocorre por meio de um orifício muito estreito. Quando a pressão de saída é pequena em relação à pressão de vapor do líquido, ocorre a formação de bolhas de cavitação. Quando essas bolhas implodem, ondas de choque são geradas no líquido e essas ondas de choque são responsáveis pela maior parte da ruptura. O tamanho médio da partícula e a distribuição do tamanho de partícula (DTP) diminuem com o número de vezes que a dispersão passa pelo homogeneizador. A diminuição é mais pronunciada nas primeiras passagens (ASUA, 2002).

Alguns trabalhos anteriores do nosso grupo já demonstraram a eficiência da utilização do homogeneizador de alta pressão em relação a outros métodos e homogeneização (FONSECA *et al.*, 2012; PEIXOTO *et al.*, 2012). Fonseca e colaboradores (2012), mostraram que emulsões poliméricas de metacrilato de metila e acetato de vinila apresentavam separação de fase após 12

horas quando se utilizava o ultra-turrax como técnica de homogeneização. As mesmas emulsões tinham estabilidade superior a 6 meses quando se utilizava o homogeneizador de alta pressão.

2.5.3.2.2. Mecanismo de Polimerização em Miniemulsão

A polimerização começa quando o iniciador é adicionado ao sistema a uma temperatura adequada, promovendo a formação de radicais livres. Os iniciadores usados para polimerização em miniemulsão podem ser solúveis tanto na fase aquosa quanto na orgânica (MORI & KAWAGUCHI, 2006). O tipo de iniciador impacta diretamente no processo de polimerização em miniemulsão e, por isso, deve ser selecionado de acordo com as propriedades finais desejadas (MORI & KAWAGUCHI, 2007)

A primeira etapa da polimerização em miniemulsão é a nucleação. Como já visto anteriormente, a nucleação pode ocorrer pelos mecanismos de nucleação homogênea, heterogênea ou na gota. Na polimerização em miniemulsão espera-se que a nucleação ocorra na gota de monômero, devido à grande área de interface disponível, onde o surfactante deve estar preferencialmente adsorvido, sobrando pouco surfactante livre para formar micelas (ANTONIETTI & LANDFESTER, 2002; ASUA, 2002; EL-JABY, 2009).

É importante tentar maximizar a fração de partículas geradas pela nucleação na gota. Essa fração depende do número de gotas e micelas, das taxas de entrada de radicais nas gotas de monômero e nas micelas, e da taxa de polimerização na fase aquosa. A presença das micelas depende da quantidade de surfactante e do processo de homogeneização utilizado: um processo de homogeneização de baixa intensidade gera gotas grandes e micelas livres de surfactantes, que podem formar partículas por nucleação micelar. Com o aumento na intensidade da homogeneização são formadas gotas menores, sendo necessária uma maior quantidade de surfactante para estabilizar essas gotas, deixando menos surfactante livre para formar micelas. Com uma alta intensidade de homogeneização as micelas desaparecem e ocorre a formação de

partículas por nucleação na gota, com geração de um maior número de partículas (LANDFESTER, 2000; ASUA, 2002; TAUER & NAZARAN, 2010.)

Desta forma, o processo de nucleação da partícula se inicia e envolve os seguintes eventos, que ocorrem em paralelo:

- Formação de radicais na fase aquosa pela decomposição do iniciador (que é muito hidrofóbico para entrar nas gotas de monômero ou nas micelas);
- Polimerização dos radicais na fase aquosa para gerar oligômeros de hidrofobicidade crescente;
- Entrada dos oligômeros hidrofóbicos nas gotas de monômero (nucleação da gota) e nas micelas (nucleação micelar), embora as cadeias possam crescer e se tornarem insolúveis em água a ponto de precipitar (nucleação homogênea);
- Possibilidade de desaparecimento das gotas pequenas de monômero por coalescência com outra gota e partículas de polímero, ou por degradação difusional, caso o agente de pressão osmótica seja solúvel o suficiente em água para difundir das pequenas para as maiores gotas.

Na maioria dos casos, pode-se evitar a formação de micelas ajustando a concentração de surfactante e as condições de homogeneização. Sob estas circunstâncias, a fração de polímero gerado por nucleação na gota é determinada pela fração de radicais capturados pelas gotas de monômero em relação à fração que precipita na fase aquosa, produzindo partículas por nucleação homogênea. A fração de radicais capturados pelas gotas depende do número de gotas, que pode variar com a concentração de surfactante, condições de homogeneização e da taxa de entrada de radicais livres (ASUA, 2002).

Uma vez nucleadas as partículas, o processo de controle do crescimento da partícula é similar ao observado na polimerização em emulsão. Pode-se esperar alguma retenção do monômero numa gota não nucleada, levando a uma ligeira redução na concentração do monômero nas partículas de polímero e, de alguma maneira, a uma diminuição na taxa de

polimerização. Essa situação é mais complexa na copolimerização em miniemulsão devido à presença de dois ou mais monômeros no processo de polimerização. Devido à partição dos monômeros entre as fases do sistema, podem ocorrer variações na composição do copolímero (ASUA, 2002).

É importante observar na polimerização em miniemulsão o iniciador pode ser adicionado à fase orgânica, minimizando a importância das trocas de massa entre as fases. Dessa forma, cada gota de monômero se comporta como um nanoreator, com radicais livres gerados diretamente no interior das gotas emulsificadas (LANDFESTER, 2000).

2.5.3.2.3. Distribuição do Tamanho de Partícula (DTP)

A DTP é a característica mais importante da miniemulsão, pois esta afeta diretamente a estabilidade da miniemulsão, além de influenciar a etapa de nucleação das gotas. Por isso, o entendimento dos mecanismos que regulam a polimerização em miniemulsão depende fortemente na determinação apurada da DTP.

A técnica de espalhamento de luz é o método mais usado para determinar o tamanho médio das partículas e a DTP (RAO & GECKELER, 2011). Essa técnica é rápida e fácil de implementar; contudo é necessário diluir a amostra para evitar múltiplos espalhamentos. A operação de diluição pode afetar o DTP devido à desorção do surfactante e dissolução do monômero na fase aquosa.

Segundo ASUA (2002), as miniemulsões são produzidas por uma técnica de homogeneização e depois podem ser estocadas por algum período até serem polimerizadas. Durante este período de estocagem, vários fatores podem afetar a estabilidade da miniemulsão:

- Quebra da gota que, dependendo do processo de homogeneização usado, pode ser causada por turbulência, cavitação e forças de colisão;

- Coalescência das gotas, causada por colisão devido ao movimento browniano e às forças atrativas de van-der-waals. A coalescência promove o aumento do tamanho da partícula e depende do padrão de mistura do homogeneizador e do surfactante usado para estabilizar as gotas de monômero;
- Degradação da gota por difusão do monômero (degradação de *Ostwald*). Como discutido, esse processo pode ser minimizado com o uso de agentes de pressão osmótica.

Como já mencionado o fator que mais afeta a degradação de *Ostwald* é a natureza do agente de pressão osmótica: a estrutura ideal é a de baixa massa molar e baixa solubilidade em água, com adição de frações de volume de 2-4%.

2.6. POLIMERIZAÇÃO VIA RADICAL LIVRE X RAFT

2.6.1. POLIMERIZAÇÃO VIA RADICAL LIVRE

Atualmente, a diversidade de materiais disponíveis para uso em engenharia é extraordinariamente grande, atendendo às mais diversas aplicações. Dentro desse contexto, os materiais poliméricos obtidos por meio de diferentes técnicas de polimerização têm atraído consideravelmente à atenção da indústria química e de transformação nas últimas décadas. Pesquisadores em todo mundo buscam o aperfeiçoamento de métodos de polimerização para obtenção de novos materiais com propriedades específicas (COSTA & RESENDE, 2000).

Os processos de polimerização via radicais livres são freqüentemente escolhidas para obtenção de polímeros em larga escala em detrimento de outros métodos de preparação, uma vez que são mais robustos, de menor custo, de fácil adequação, menos sensíveis a vestígios de impurezas e utilizam condições reacionais amenas. A polimerização via radical livre é o processo responsável pela produção de cerca de 50% de todos os polímeros comerciais. Neste tipo de polimerização podem ser utilizados vários monômeros, entre os quais estireno, metacrilato de metila, acetato de vinila, etileno, entre muitos outros. Além disso, é um processo tolerante a

impurezas, de fácil implementação, compatível com água e com vários monômeros funcionais (ODIAN, 2004; ZETTERLUND *et al.*, 2008).

A polimerização radicalar inclui tipicamente várias etapas como iniciação, propagação, transferência de cadeia e terminação (Figura 10).

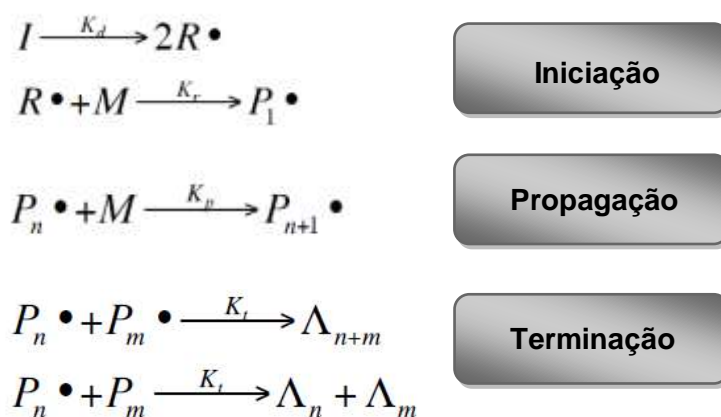


Figura 10. Mecanismo genérico de reação de polimerização por radicais livres

A espécie iniciante é formada pela cisão homolítica de uma ligação covalente fraca na molécula do iniciador (I). A espécie ativa formada é um radical livre ($R \bullet$), que ataca o monômero (M), gerando um radical livre monomérico que inicia a polimerização ($P_1 \bullet$). Na etapa de propagação o produto é formado por meio de adições sucessivas de monômero ao centro ativo. Em teoria, a reação de propagação podia continuar até a provisão de monômeros chegar à exaustão. Porém, este resultado é muito improvável. Normalmente, o crescimento de uma cadeia de polímero é detido pela reação de terminação. A terminação acontece tipicamente em dois modos: combinação e desproporcionamento. O crescimento da cadeia é interrompido por mútua aniquilação de dois radicais livres. A terminação por combinação acontece quando o crescimento do polímero é interrompido por meio da formação de uma ligação covalente entre os elétrons desemparelhados de duas cadeias crescentes, formando uma cadeia única. Já o desproporcionamento interrompe a reação de propagação quando um radical abstrai um átomo de hidrogênio de uma outra cadeia ativa. Uma ligação dupla carbono-carbono toma o lugar do hidrogênio perdido (ODIAN, 2004)

Uma característica intrínseca do mecanismo das reações de polimerização via radicais livres é o fato das cadeias em propagação apresentarem uma tendência a sofrerem terminação prematura. Este fato dificulta um bom controle da massa molar e da distribuição das massas molares, afetando as propriedades mecânicas dos materiais obtidos e, conseqüentemente, o desempenho desses materiais em algumas aplicações. (ALLCOCK & LAMPE, 1990). Isto, entre outros fatores, limita a utilização da polimerização via radicais livres convencional para a síntese de polímeros com arquitetura molecular bem definidas, com baixa polidispersão de massas molares e de copolímeros com arquiteturas moleculares complexas (BOYER *et al.*, 2011).

Neste tipo de polimerização, a concentração de espécies propagantes no estado estacionário é de aproximadamente $10^{-7}M$. As cadeias individuais crescem por no máximo 5 a 10 segundos antes da terminação. Durante a polimerização, radicais são continuamente formados, cadeias propagam e são terminadas pela reação radical-radical. As massas molares das cadeias formadas nos primeiros estágios de polimerização são maiores e reduzem com a conversão devido à depleção do monômero. A largura da distribuição de massas molares e o índice de polidispersão (M_w/M_n) das cadeias poliméricas são governados por fatores essencialmente estatísticos, que no caso avaliado é sempre superior a 1,5 (MOAD *et al.*, 2005).

Após a terminação, a polimerização radicalar não permite a reiniciação de espécies radicalares, impossibilitando a preparação de copolímeros em blocos que encontram uma ampla variedade de aplicações. Copolímeros são polímeros obtidos por um processo de polimerização na qual dois ou mais monômeros são polimerizados simultaneamente (ODIAN, 2004). Por isso, diz-se que a polimerização radicalar convencional produz cadeias de polímero morto.

A copolimerização permite a síntese de um número quase ilimitado de diferentes produtos por variações nas condições de reação, na ordem de adição dos monômeros durante a polimerização e nas quantidades relativas das unidades de monômero adicionadas ao copolímero. Para cada tipo de produto formado, obtém-se um conjunto distinto de propriedades. Por isso, os copolímeros possuem uma importância comercial muito grande, uma vez que permitem a produção de materiais com propriedades específicas. Para o uso comercial, deseja-se

obter normalmente um copolímero com uma distribuição de composição estreita, uma vez que as propriedades dos polímeros (e portanto, da utilização final) são muito dependentes da composição do copolímero (ODIAN, 2004).

Copolímeros de bloco e com baixa polidispersão de massas molares podem ser sintetizados por técnicas de polimerização iônica, que apresentam uma espécie de natureza viva, que é essencial para controle e distribuição das massas molares dos polímeros. No entanto, processos de polimerização iônica normalmente requerem monômeros e solventes altamente puros e atmosfera isenta de oxigênio e umidade (MOREIRA & WANG, 2004).

Portanto, até o fim dos anos 1980 a opinião consensual era a de que a polimerização por radicais livres era uma técnica madura, porém incapaz de produzir polímeros com estrutura molecular bem definida. Ao contrário, o que normalmente se observa é um baixo controle da reação, não sendo possível preparar blocos de copolímero, polímeros de distribuição de massas molares estreita ou com arquiteturas moleculares mais complexas, devido à alta reatividade dos radicais de propagação e sua propensão a sofrerem terminação, transferência de cadeia e outras reações. Essas limitações levaram ao desenvolvimento de novas técnicas de polimerização radicalar: “viva” e controlada (ZETTERLUND *et al.*; 2008).

A polimerização radicalar livre controlada (ou polimerização radicalar CLRP) é uma técnica versátil e robusta e uma alternativa para obtenção de polímeros sintéticos com arquitetura molecular bem definida. Em processos de polimerização via radicais livres convencionais, os radicais gerados por decomposição do iniciador sofrem propagação e reações de terminação bimolecular em segundos. Na CLRP a vida útil de um radical pode ser estendida por horas, permitindo a preparação de polímeros com massas molares pré-definidas, com baixa polidispersão e composições e funcionalidade controladas (ZETTERLUND *et al.*, 2008).

O princípio comum dessa técnica é a manutenção de baixa concentração da espécie ativa radicalar. Os radicais propagadores são convertidos em espécies dormentes, cuja natureza depende da técnica que está sendo empregada. Isso reduz a probabilidade de terminação, uma

vez que o mecanismo de terminação é bimolecular em relação aos radicais livres. Nessas reações a maior parte das cadeias forma espécies dormentes, permitindo melhor controle da massa molar, uma vez que a supressão das reações de terminação permite a existências de um sistema “vivo” (VOSLOO *et al.*, 2002; BAUM & BRITAIN, 2002).

Existem diversas técnicas de CLRP, sendo que as mais conhecidas são: (i) polimerização mediada por nitróxido (*Nitroxide Mediated Polymerization*, NMP), (ii) polimerização radicalar por transferência de átomo (*Atom Transfer Polymerization*, ATRP) e (iii) polimerização por transferência de cadeia por adição e fragmentação reversível (*Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization*, RAFT) (GEORGES *et al.*, 1993; DAVIS & MATYJASZEWSKI, 2004; QIU, *et al.*, 2001; CUNNINGHAN *et al.*, 2002; MOAD, 2005; ZETTERLUND *et al.*, 2008). Dentre essas técnicas, a polimerização RAFT é uma das mais versáteis, podendo ser utilizada com uma variedade de monômeros e condições reacionais, produzindo polímeros de massas molares controladas e distribuição de massa molares estreita (CHIEFARI *et al.*, 1998; BOYER *et al.*, 2011).

2.6.2. POLIMERIZAÇÃO RAFT

Há poucos anos, os grupos Madix e Rhoda foram os pioneiros no desenvolvimento e na utilização de polimerizações Madix e RAFT, respectivamente (CHIEFARI, 1998; CHARMOT, 2000). Ambas as técnicas de CLRP fazem uso do mesmo mecanismo químico de polimerização, divergindo apenas quanto ao tipo de agente de transferência utilizado, chamado de Agente RAFT.

A polimerização RAFT é a técnica de CLRP mais versátil que existe devido à grande variedade de monômeros funcionais que podem ser polimerizados sem a necessidade de proteção de grupamentos químicos e devido à facilidade com que a estrutura funcional pode ser colocada com subsequente conjugação a uma molécula sintética ou biológica (MOAD *et al.*, 2009). Além disso, a técnica de polimerização RAFT permite uma grande versatilidade na síntese

de arquiteturas solúveis em água com uma dimensão precisa e funcionalidade apropriada para conjugação e liberação-alvo para diagnósticos e agentes terapêuticos. Apesar de até hoje poucos artigos terem sido publicados sobre o uso dessa técnica para produzir veículo de liberação de fármacos, a técnica possui várias vantagens em relação aos processos convencionais de polimerização: possibilidade de controle da arquitetura molecular, facilidade de funcionalização pós-polimerização, com formação de ligação cruzada ou biconjugação. A técnica de CLRP do tipo RAFT permite a condução da polimerização em miniemulsão com produção de partículas com dimensão precisa e em nanoescala, com estreita distribuição de massa molecular, superfície funcionalizada, etc (MOAD *et al.*, 2005)

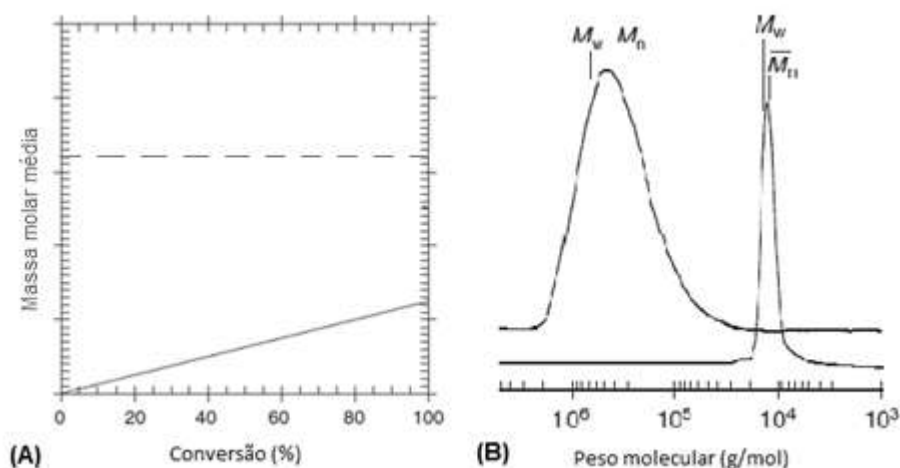


Figura 11. (A) Evolução da massa molar média em função da conversão para polimerização radical convencional (- -) e para a polimerização radical controlada (-) (B) Distribuição de massas molares média típica de uma polimerização radical convencional e de uma polimerização radical controlada (MOAD *et al.*, 2005).

Numa polimerização controlada ideal, todas as cadeias são iniciadas e crescem na mesma velocidade e sobrevivem à polimerização; ou seja, não existe terminação. Neste caso, a propensão de radicais livres sofrerem terminação bimolecular impões que, no caso da polimerização, as cadeias não sejam ativadas simultaneamente. Para conferir o caráter “vivo” a uma polimerização, é necessário suprimir todos os processos que promovem a terminação irreversível das cadeias. Portanto, polimerização radical controlada só se torna possível na

presença de reagentes que reajam com radicais em propagação por desativação reversível ou transferência de cadeia reversível, para que a maioria das cadeias seja mantida na forma dormente. O rápido equilíbrio entre as formas dormentes e ativas garante que todas as cadeias possuam chances iguais de crescer e que todas as cadeias irão crescer, embora intermitentemente. Sob essas condições, conforme ilustrado na Figura 11, a massa molar média cresce linearmente com a conversão e a distribuição de massas molares obtida é estreita ($M_w / M_n \cong 1,1$) (MOAD *et al.*, 2005).

2.6.3. MECANISMOS DE POLIMERIZAÇÃO RAFT

O mecanismo da polimerização RAFT ocorre como em um processo degenerativo de transferência de cadeia. O processo RAFT é similar a uma polimerização via radicais livres convencional, porém ocorre na presença de um agente de transferência de cadeia (CTA).

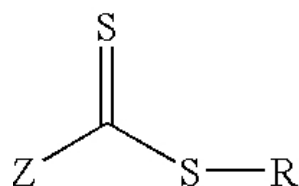


Figura 12. Representação genérica de um agente de transferência de cadeia (MOAD *et al.*, 2005)

O CTA na CLRP do tipo RAFT (Figura 12) normalmente contém um grupamento tiocarbonílico que é reativo a radicais e, por isso, facilita a fragmentação das espécies radicalares intermediárias resultantes (Figura 13, esquema II) (MC CORMICK & LOWE, 2004; MOAD *et al.*, 2005; 2009). A espécie funcional $\mathbf{R}\bullet$ então reage com o monômero, criando $\mathbf{RM}\bullet$, que pode ser reversivelmente adicionado a outro grupamento tiocarbonílico. Eventualmente, o principal equilíbrio é atingido entre o radical polimérico em propagação e o macroCTA inativo. O radical intermediário pode então fragmentar nas duas direções, dando condições iguais de crescimento a todas as

cadeias de polímero, resultando num crescimento uniforme da cadeia e também em pequeno índice de polidispersão (CHIEFARI *et al.*, 1998, MOAD *et al.*, 2005, 2006, 2009).

É possível obter um controle excelente da distribuição de massas molares se o CTA, monômero, iniciador, condições de reação e conversão forem cuidadosamente escolhidas. Se a reação for interrompida a taxas de conversão moderadas, diminui-se as chances de terminação. A retenção dessas cadeias “vivas” permite a extensão da cadeia por polimerização com um segundo monômero (Figura 13, esquema III). Neste tipo de polimerização, a ordem de construção dos blocos é muito importante. O radical propagante para o primeiro bloco formado deve ser um bom grupo de partida homolítico em relação ao segundo bloco (MC CORMICK & LOWE, 2004; MOAD *et al.*, 2005; PERRIER & TAKOLPUCKDEE, 2005; LOWE & MC CORMICK, 2007).

Normalmente, a concentração inicial de CTA é maior que a de iniciadores, garantindo que o número de moléculas de CTA em solução seja maior que a de radicais livres. A concentração de radicais livres é ditada pelo grau de dissociação do iniciador, enquanto que o número de cadeias é controlado pela concentração de CTA presente na solução. O equilíbrio reverso permite a ativação de um grande número de moléculas de CTA por um pequeno número de fragmentos de iniciadores (MOAD *et al.*, 2005, 2006, 2009).

Assim como nas reações de polimerização radicalares convencionais, uma fonte inicial de radicais é necessária para iniciar a polimerização. Neste processo o iniciador se decompõe originando radicais primários que reagem com unidades de monômero para formar radicais oligoméricos (Figura 13, esquema I). Esses oligômeros reagem com a dupla ligação enxofre-carbono do CTA, promovendo sua ativação (Figura 13, esquema II, 1). A espécie radicalar resultante (Figura 13, esquema II, 2) é incapaz de reiniciar a propagação, porém sofre uma fragmentação homolítica. (saída do grupo $R\cdot$ ou $P_m\cdot$ - Figura 13, esquema II, 3). O grupo R do CTA deve fragmentar eficientemente e reiniciar a polimerização e, na polimerização RAFT, todas as cadeias próximas são iniciadas pelo grupo R ; assim, as cadeias geradas pelo iniciador são poucas. Dessa forma, é estabelecido um equilíbrio entre as espécies ativas e dormentes das cadeias poliméricas via adição e fragmentação. O equilíbrio entre as espécies propagantes e os

macro-radicais RAFT é a chave de todo o processo RAFT (Figura 13, esquema II, 4). As duas constantes de velocidade (K_{β} e $K_{-\beta}$) controlam o equilíbrio; isto é, a velocidade de fragmentação deve ser mais lenta do que a velocidade de adição para garantir que as espécies dormentes prevaleçam no meio reacional. Assim a probabilidade de ocorrer reações de terminação entre espécies radicalares é muito baixa (MOAD *et al.*, 2005, 2006, 2009).

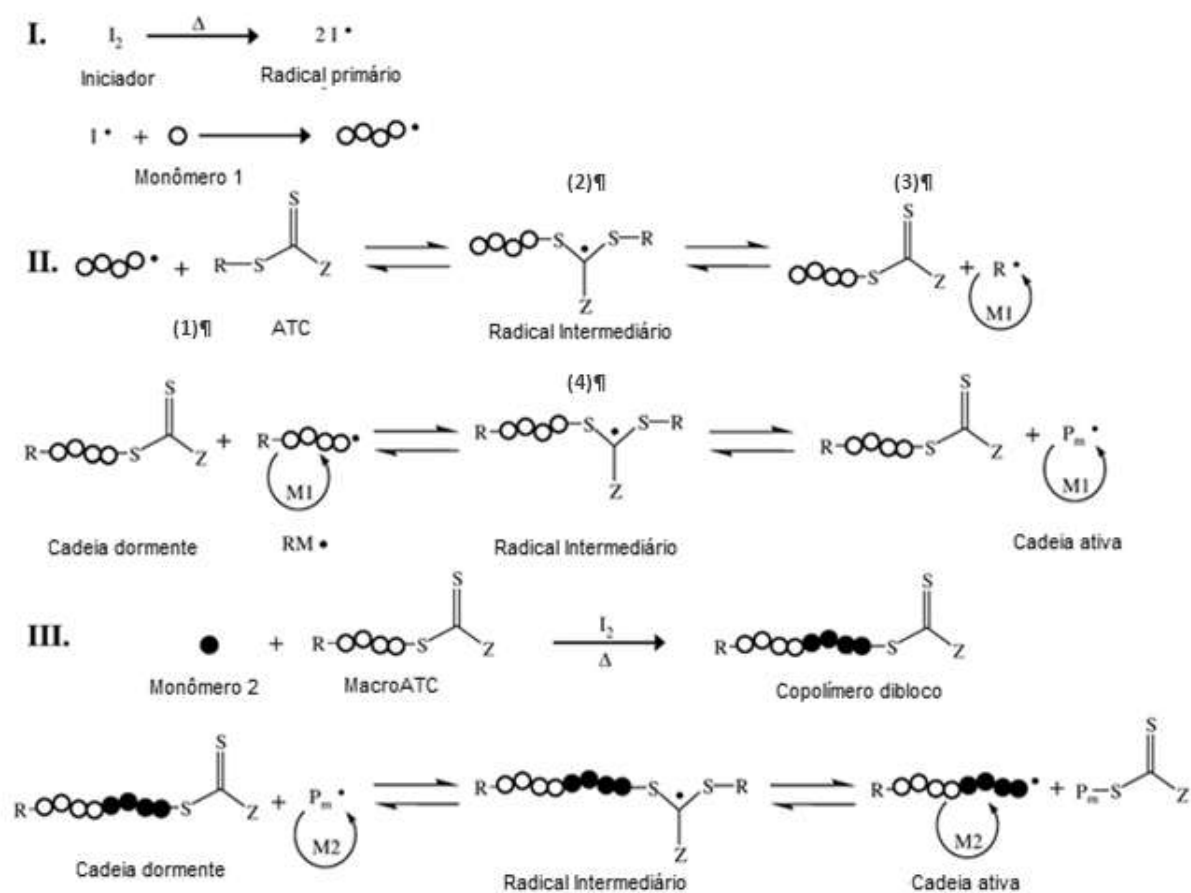


Figura 13. Mecanismo esquemático de polimerização CLRP do tipo RAFT (MOAD *et al.* 2005)

Quando a polimerização termina, a maioria das cadeias retém no final o grupo do CTA e os polímeros podem ser isolados como materiais estáveis. Sendo assim, esses polímeros podem ser usados em novas polimerizações como macro-CTA para formação de copolímeros em bloco (Figura 13, esquema III).

Sob essas condições, a massa molar média do produto final da polimerização é controlado pela quantidade de monômero e iniciador, na forma:

$$M_n = \frac{M_0 \times M_w \text{ monômero} \times \alpha}{CTA_0} + M_w CTA \quad \text{eq. (1)}$$

onde, M_0 é a concentração inicial de monômero, M_w é o peso molecular do monômero α é a conversão, $M_w CTA$ é o peso molecular do CTA, CTA_0 é a concentração inicial de ATC (MOAD *et al.*, 2005, LOWE & MC CORMICK, 2007)

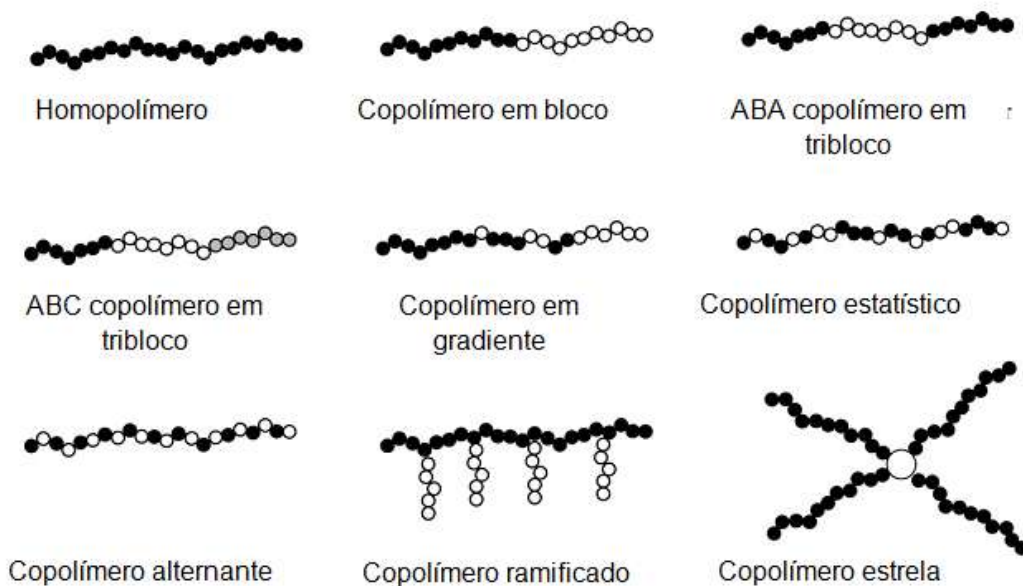


Figura 14. Arquiteturas moleculares obtidas com o auxílio da polimerização radical controlada (YORK *et al.* 2008).

É visível, a partir desta equação, que uma massa molar específica e um tamanho de cadeia podem ser alcançados interrompendo a polimerização num determinado tempo. Esse controle permite a síntese de homopolímeros ou blocos de copolímeros com dimensões controladas, fazendo da polimerização RAFT, como no caso de outras técnicas CLRP, uma estratégia atrativa para a produção de materiais para uso em aplicações de liberação de fármacos

e genes. Além disso, controlando o comprimento da cadeia, esse tipo de polimerização pode ser usado para sintetizar polímeros de arquiteturas variadas (Figura 14), incluindo estruturas moleculares do tipo multi-blocos, estrela, com ramificações, estatística, alternante, gradiente, dentre outras. (MATYHASZEWSKI, 2004; MOAD *et al.*, 2005; LOWE & MC CORMICK, 2007)

2.6.3.1. CTAs, iniciadores e monômeros

A chave para o processo RAFT e para o controle da massa molar é o grupamento tiocarbônico do CTA (Figura 15) que possui, em geral, estrutura $RSC(=S)Z$ (CHIEFARI *et al.*, 2003; CHONG *et al.*, 2003). Vários grupamentos similares são relatados na literatura e classificados por categorias (Figura 15), sendo os mais comuns tritioarbonetos, ditioésteres, xantanas e ditiocarbamatos.

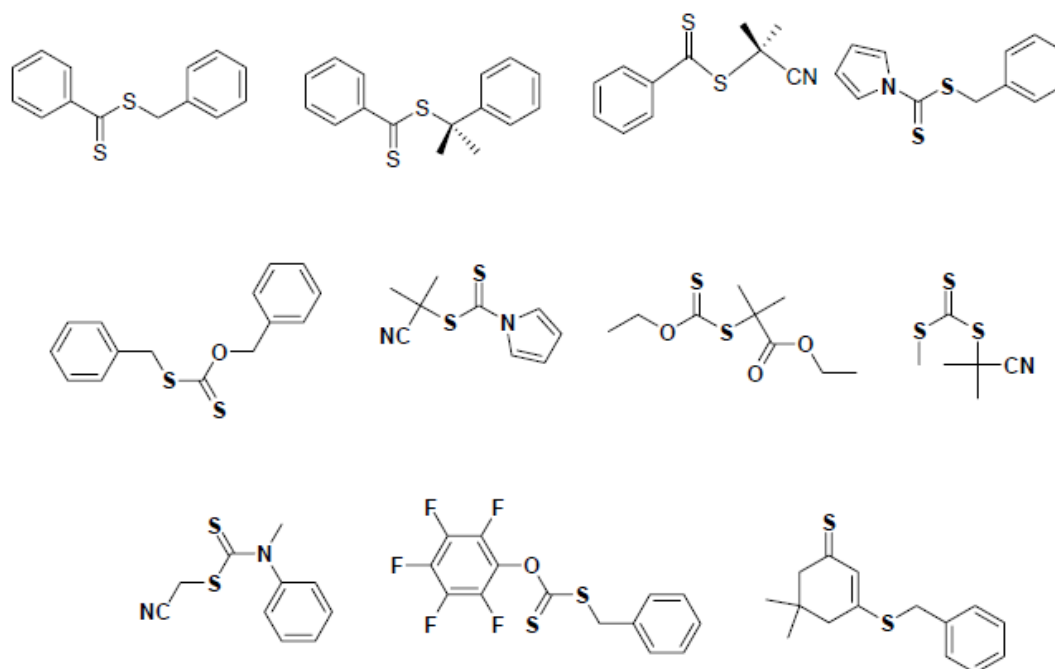


Figura 15. Diferentes estruturas de agentes de transferência de cadeia tiocarbônicos utilizados em polimerizações RAFT (MOAD *et al.*, 2006).

Destes, poucos se encontram comercialmente disponíveis. Entretanto, existem muitos métodos para síntese de CTA na literatura, embora estes métodos sejam normalmente complexos e resultem em rendimento apenas moderado (MOAD *et al.*, 2003; PERRIER *et al.*, 2005; THEIS *et al.*, 2005). A seleção de um CTA não adequado pode causar perda do controle da reação, atraso significativo, longo período de indução e/ou completa inibição da polimerização. Por isso, esses agentes são escolhidos em função da natureza dos grupos Z e R e da eficiência de estabilização dos radicais (MOAD *et al.* 2005).

O CTA consiste num grupo Z estabilizado (ou não) e um grupo R, mencionado anteriormente, que deve reiniciar a polimerização eficientemente (Figura 16). A escolha do grupo Z, R e do monômero não é arbitrária e deve ser feita cuidadosamente (CHIEFARI *et al.*, 2003)

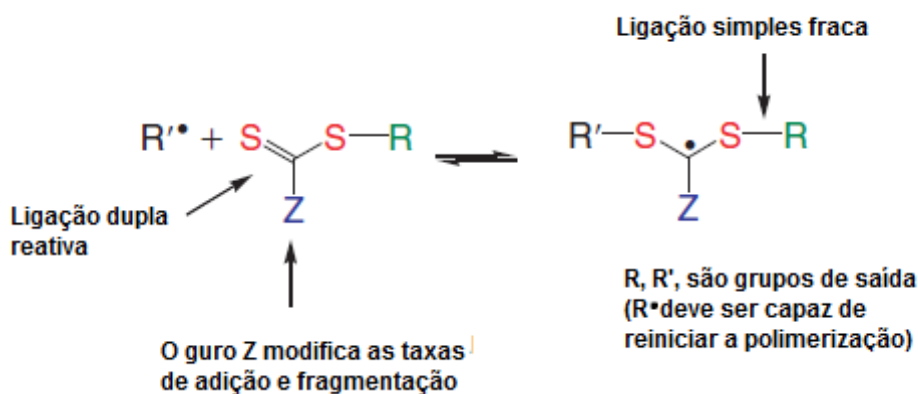


Figura 16. Características estruturais do CTA do tipo RAFT e da forma intermediária na adição radicalar (MOAD *et al.*, 2006)

Para uma polimerização ser eficiente, é necessário que os agentes RAFT tenham uma ligação dupla reativa (C=S) com alta constante de velocidade de adição (K_{ad}), que os radicais intermediários formados se fragmentem rapidamente (ou seja, ter uma alta constante de dissociação (K_{β}) e uma fraca ligação S-R), além de não sofrerem reações laterais. O intermediário deve ter uma constante de dissociação maior ou igual à constante de adição ($K_{\beta} > K_{\beta}$) para favorecer a formação dos produtos, enquanto os radicais expelidos R^{\bullet} devem reiniciar eficientemente a polimerização.

O principal papel do grupo **Z** é ativar a ligação dupla do tiocarbonil para adição radicalar, a fim de prevenir que uma propagação extensiva ocorra antes do evento de transferência de cadeia (CHIEFARI *et al.*, 2003). Por isso, o grupo **Z** ajuda na estabilização e aumenta o tempo de meia-vida dos radicais intermediários formados na Fase I e II do processo de RAFT. Ao aumentar a ativação da ligação dupla do grupo tiocarbonila, aumenta-se a probabilidade de que cadeias em propagação sejam adicionadas ao CTA, permitindo que poucos monômeros se unam à cadeia crescente de polímero entre os eventos de transferência. Uma super estabilização dos radicais intermediários, porém, pode levar a uma fragmentação lenta, resultando no atraso da polimerização (MAYADUNNE *et al.*, 1999) e na maior probabilidade de que ocorra uma terminação do radical intermediário (BARNER-KOWLLIK *et al.*, 2001; KAWAK *et al.*, 2002.)

Apesar do grupo **Z** contribuir para reatividade do grupo tiocarbonila por meio da polimerização RAFT, a contribuição do grupo **R** é englobada completamente na fase de pré-equilíbrio (Fase I). O papel do grupo **R** é de, efetivamente, fragmentar o radical intermediário do pré-equilíbrio e subseqüentemente reiniciar a polimerização (CHONG *et al.*, 2003). A estabilidade do grupo **R** deve ser maior ou igual à do radical oligomérico **P_n•**, para permitir a fragmentação do radical intermediário. Porém, a reatividade do grupo **R** deve ser grande o suficiente para reiniciar rapidamente a polimerização do monômero.

A eficácia do agente RAFT depende do monômero que está sendo polimerizado e depende fortemente das propriedades do radical livre **R** (grupo de saída) e do grupo **Z**, que pode ser escolhido para ativar ou desativar a dupla ligação tiocarbonílica e modificar a estabilidade dos radicais intermediários (MOAD *et al.*, 2005), como ilustrado na Figura 17.

CTA interessantes para liberação de fármacos são aqueles que permitem fácil pré ou pós-conjugação com produtos biológicos. Alguns exemplos são aqueles que contêm ácido carboxílico, ditioesteres e tritocarbonatos (CHIEFARI, *et al.*, 1998; LAI *et al.*, 2002; MOAD *et al.*, 2005; CONVERTINE *et al.*, 2006). Polímeros preparados com esses CTA possuem funcionalidade α -carboxilica e w -tiocarboniltio que são facilmente derivatizados. A presença do grupo carboxílico,

por exemplo, permite que esses CTA sejam dissolvidos diretamente em solução aquosa, permitindo a reação de polimerização RAFT em meio aquoso.

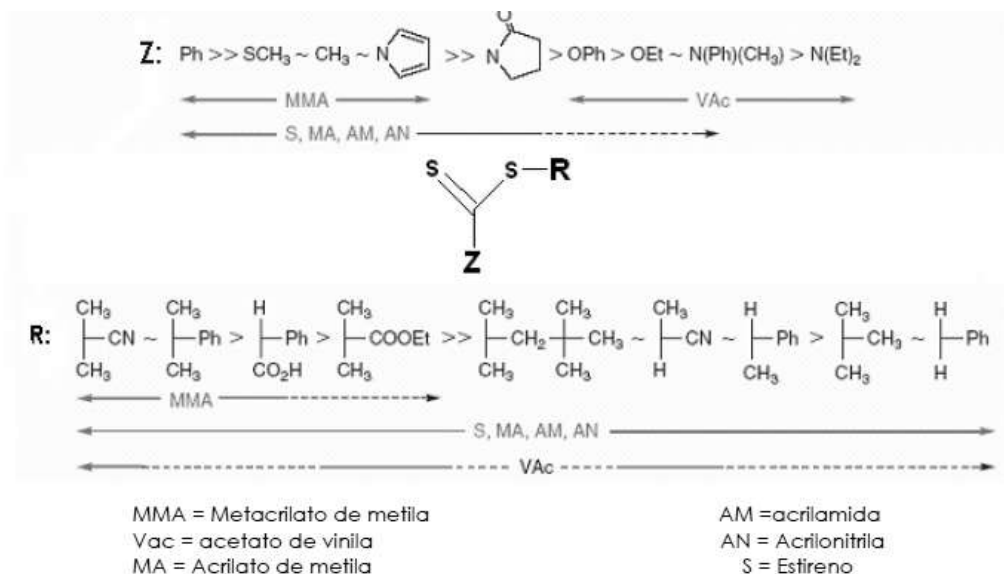


Figura 17. Diretriz para a seleção dos agentes RAFT para várias polimerizações. Para Z, a velocidade de adição diminui e a de fragmentação aumenta da esquerda para a direita. Para R, a velocidade de fragmentação diminui da esquerda para a direita. As linhas pontilhadas indicam controle parcial (larga polidispersão ou retardo substancial da reação) (MOAD *et al.*, 2005).

Iniciadores químicos, que contêm em grupos azo são tipicamente usados para gerar radicais livres e iniciar a polimerização RAFT, apesar de outros iniciadores químicos à base de peróxidos orgânicos também poderem ser usados (MOAD *et al.*, 2005; PERRIER & TAKOLPUCKDEE, 2005). Apesar do pequeno número de cadeias geradas na polimerização RAFT e derivadas diretamente do iniciador, pode ser vantajoso o uso de um iniciador que possua funcionalidade idêntica à do grupo R do CTA, para manter a máxima homogeneidade do produto.

O número de estudos a respeito de polímeros obtidos via polimerização RAFT para aplicação biomédica e farmacêutica tem aumentado dramaticamente nos últimos anos. Isso se deve, entre outros fatores, à facilidade de síntese de arquiteturas biologicamente relevantes e à solubilidade em água ou em condições moderadas do produto obtido (MC CORMICK & LOWE, 2004, LOWE & MC CORMICK, 2007; STENZEL, 2008). Por isso, polimerizações RAFT podem ser conduzidas em temperaturas moderadas em meio orgânico, apesar de grande quantidade de

monômeros poder ser polimerizada à temperatura ambiente em meio aquoso. Isso permite a formação direta de blocos de copolímeros a partir de macroCTAs tiocarbonílicos derivados de biopolímeros (como polissacarídeos e polipeptídeos) sem degradação ou desnaturação esperada para altas temperaturas. Além disso, a polimerização RAFT não requer espécies potencialmente tóxicas de metais de transição nem ligantes coordenados, como no caso da ATRP. Porém, foi recentemente relatado que o grupamento tiocarbonílico do CTA pode ser tóxico (STENTZEL *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2007). Entretanto, isso pode ser facilmente superado pela remoção deste grupamento por meio de várias rotas de modificação após a polimerização (PERRIER & TAKOLPUCKDEE, 2005; CHONG *et al.*, 2007).

Outra grande vantagem da polimerização RAFT é que esta técnica permite o uso de uma grande variedade de monômeros no preparo de polímeros com atividade controlada e/ou com moléculas alvo conjugadas; sejam eles neutros, catiônicos, aniônicos e zwitterionicos (LAI *et al.*, 2002, YUSA *et al.*, 2003, DONOVAN *et al.*, 2003, CONVERTINE *et al.*, 2004, PAI *et al.*, 2004, VASILIEVA *et al.*, 2005).

2.6.3.2. Polimerização de Polímeros obtidos por RAFT e Conjugação com Proteínas

A vantagem de administrar partículas poliméricas como carreadores de fármacos ao invés do fármaco livre reside principalmente no aumento do tempo de circulação do fármaco no corpo, pois sua eliminação rápida é evitada por conta da filtração glomerular nos rins. Essa rota de eliminação possui um “*cut-off*” de massa molar de, aproximadamente, 50.000 g/mol. Entretanto, o RES pode detectar a partícula polimérica e eliminá-la da circulação. Além disso, fármacos encapsulados em polímeros apresentam desempenho reconhecidamente superiores em relação aos fármacos livres no tratamento de tumores sólidos, devido ao efeito EPR que leva ao acúmulo preferencial do polímero no tumor, enquanto o sistema linfático ineficiente em torno das células tumorais dificulta a eliminação do carreador do fármaco.

A modificação da superfície da partícula pode atrasar o reconhecimento pelo RES. Como já mencionado, a conjugação com PEG, aumenta o tempo de circulação substancialmente devido ao alto grau de hidrofiliabilidade e ao fato de que a eliminação de um fármaco é muito menor quando o mesmo está incluso em partículas menores que 200 nm.

Como já comentado, o sucesso da quimioterapia contra o câncer depende da liberação do agente ativo na célula tumoral. Por isso, o mecanismo natural do corpo humano para liberação de proteínas para as células, baseado no transporte por albumina, pode ser utilizado como ferramenta para a liberação de fármacos antineoplásicos (BREKKE & SAGE, 2001; ELZOGHBY *et al.*, 2012). Como já é bem estabelecido, existem diversas maneiras de conjugar proteínas e peptídeos por meio de reações com vários tipos de grupos funcionais. Esses grupos funcionais podem ser facilmente incorporados em agentes RAFT, levando a polímeros com grupos terminais reativos. Dependendo do *design* e da estabilidade do agente RAFT, esses grupos funcionais vão ser inseridos no grupo iniciador (R) ou no grupo RAFT (Z). Duas abordagens já foram descritas na literatura: a formação de um polímero funcionalizado com a subsequente conjugação de proteínas, ou a conjugação da proteína com o agente RAFT, seguida da polimerização (STENZEL, 2008; BOYER *et al.*, 2009).

A química do grupo tiol tem sido extensivamente aplicada à modificação de macromoléculas, já que o grupo tiol pode participar de maneira particular de uma série de transformações químicas que incluem o acoplamento dissulfeto e a alquilação por adição de alcanos halogenados, alquenos, compostos carbonílicos α ou β insaturados (como no caso da adição de Michael). Este último é um excelente exemplo de reação tiol-eno eficiente para preparação e funcionalização de uma grande variedade de moléculas. Entre vários aminoácidos comumente utilizados como alvo para modificação de proteínas, a cisteína é particularmente atraente para a ligação sítio específica já que existem geralmente poucos resíduos de cisteína em proteínas nativas. Dessa maneira, reações que atingem apenas os grupos do tipo tiol podem facilitar a funcionalização sítio específica. Grupos terminais vinilsulfona, maleimida e dissulfeto

ativado têm sido utilizados também com sucesso em procedimentos de bioconjugação (LI *et al.* 2010)

Normalmente as proteínas contêm resíduos de cisteína que não participam de pontes dissulfeto e que podem participar de reações de bioconjugação. A BSA, por exemplo, possui um resíduo de cisteína livre, o resíduo 34, que pode reagir por conjugação com o grupamento tiol, proveniente da redução do grupo terminal tiocarboníltio do agente RAFT (BONTEMPO *et al.*, 2004; HEREDIA *et al.*, 2005; ZELIKIN *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007).

Agentes RAFT com grupos dissulfeto piridila já foram empregados na polimerização de acrilato e butilacrilato de propilenoglicol e de N-isopropirilacrilamida e acrilato de hidroxietil. Um copolímero em bloco resultante com uma terminação dissulfeto piridil pode reagir quantitativamente com o grupo tiol presente em compostos como a albumina bovina (BSA), por exemplo, por meio do resíduo de 34 de cisteína (BOYER *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007; BOYER *et al.*, 2009). A modificação posterior feita em polímeros com artifício de NaBH₄ pode gerar um polímero com uma função tiol, que pode ser conjugada com peptídeos e substâncias biologicamente ativas (CARUSO *et al.*, 2007).

2.6.4. POSSÍVEIS INTERFERÊNCIAS DA INCORPORAÇÃO DE FÁRMACOS *IN SITU*

A incorporação de fármacos durante o processo de polimerização já é normalmente utilizada para a obtenção de dispositivos de liberação de fármacos; porém, a maior parte dos estudos ainda é realizada em sistemas de emulsão e com polímeros biodegradáveis. De acordo com a estratégia de polimerização *in situ*, o fármaco é adicionado ao sistema de polimerização junto com o monômero e os outros constituintes, antes do começo da reação. As maiores vantagens desta estratégia são: (i) a síntese de um polímero “carregado” numa única etapa, (ii) a rapidez do método e (iii) a facilidade de escalonar para escala industrial. O fármaco neste caso pode estar presente durante a polimerização para ser aprisionado na rede polimérica, pode estar

ligado covalentemente ao polímero ou pode ser adicionado após a polimerização para ser adsorvido à superfície do polímero (BURGESS & HICKEY, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2011b).

Contudo, a adição *in situ* de fármacos no meio reacional de polimerização pode não ser trivial. Resultados de temperatura de transição vítrea (T_g), conversão, tamanho de partícula e variação de massa molar dos polímeros podem apresentar fortes indícios de que o fármaco incorporado *in situ* influencia (ou não) o processo de polimerização e as propriedades finais do material obtido. Alguns trabalhos do nosso próprio grupo demonstram bem esta dificuldade e são comentados a seguir.

Oliveira e colaboradores (2011a, 2012a) demonstraram que a adição de 1 a 3 % (p/p) de amoxicilina em polimerizações em suspensão de acetato de vinila e metacrilato de metila afeta a morfologia das partículas geradas e a massa molar dos copolímeros obtidos. Neste trabalho, a conversão do monômero também foi afetada pela adição do fármaco, que exerceu um efeito inibitório, minimizado pela adição de metacrilato de metila como co-mônomo.

Lorca e colaboradores (2012) mostraram que a polímero obtido a partir da polimerização em miniemulsão de metacrilato de metila na presença de benzofenona-3 apresentava massas molares maiores que na ausência do filtro solar. Neste caso, o filtro interagiu com o processo de polimerização devido à presença de grupos funcionais oxidáveis, o que faz com que o filtro aja como um agente reticulante. Essa hipótese foi reforçada com o fato de que ocorria polimerização do monômero a baixas taxas mesmo na ausência de iniciador. Resultados similares também foram observados para polimerização *in situ* de doxorrubicina (OLIVEIRA *et al.*, 2012b).

Ao contrário, Fonseca e colaboradores (2012) mostraram que a incorporação de 30% (p/p) de praziquantel *in situ* na polimerização radicalar em miniemulsão de metacrilato de metila não interfere na conversão do monômero, na massa molar do polímero obtido, na distribuição de tamanho de partícula, nem na morfologia das partículas obtidas, apresentando comportamento

essencialmente inerte. Vê-se, portanto, que o efeito do fármaco sobre a polimerização é pouco sensível, dada a estrutura complexa e multifuncional de menor parte desses compostos

2.7. COMENTÁRIOS FINAIS

Como comentado exaustivamente, a produção de NPP como sistema de liberação de fármacos para o tratamento do câncer vem sendo extensivamente estudado e não constitui uma novidade. Porém, a maior parte dos estudos utiliza a preparação das NPP a partir de polímeros prontos e disponíveis no mercado por técnicas de precipitação ou evaporação de solvente. Pouquíssimos trabalhos relatam a incorporação *in situ*, de fármacos em sistemas de polimerização para obtenção de NPP. Isso é particularmente verdadeiro para a técnica de polimerização RAFT.

O fármaco em estudo, TXF, constitui o medicamento mais utilizado como ferramenta para o tratamento e prevenção do câncer de mama. Muitos trabalhos demonstram a inclusão deste fármaco em NPP e os benefícios desta inclusão para promover o aumento da biodisponibilidade, estabilidade físico-química, solubilidade e diminuição dos efeitos colaterais. Porém, não há nenhum trabalho descrito na literatura que relate a incorporação do TXF *in situ* em sistema de polimerização radicalar convencional ou em qualquer sistema de polimerização radicalar controlada. A técnica RAFT permite ainda que o polímero seja conjugado com moléculas biológicas posteriormente, por conta dos grupos tiocarbonílicos residuais.

3. OBJETIVOS DA TESE

Este capítulo apresenta os objetivos gerais e específicos da tese, bem como a proposta para produção de NP poliméricas por meio da técnica de polimerização radicalar controlada via adição e fragmentação reversível, para produção de NP de TXF e posterior vetorização.

3.1. OBJETIVOS

3.1.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal do projeto é o desenvolvimento de NP poliméricas carregadas com TXF, com tamanho de tamanho nanométrico e uniforme, conjugadas com albumina para o combate seletivo de células tumorais mamárias receptoras de estrogênio positivas.

3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos perseguidos nessa fase foram:

- Desenvolvimento da técnica de polimerização RAFT em miniemulsão, a fim de obter NP polimerizadas com o TXF *in situ* em uma única etapa e com bom controle da massa molar do polímero e do tamanho de partícula;
- Caracterização das NP obtidas pelos diferentes processos, já que as propriedades finais das NP são importantes para se caracterizar o desempenho final do produto obtido, se ele está cumprindo seu objetivo.
- Avaliação da eficiência de inclusão do fármaco TXF nas NP;
- Conjugação das NP obtidas com a albumina;

- Avaliação da eficiência da conjugação da albumina com as NP;

3.2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

O TXF é um modulador seletivo do receptor de estrogênio usado no tratamento do câncer de mama e é atualmente um dos fármacos mais utilizados para este tipo de câncer. Apesar da baixa solubilidade deste fármaco ter sido contornada pela formação do sal de citrato para administração via oral (comprimidos de 10 e 20 mg), ainda se observa uma baixa biodisponibilidade devido à precipitação de sua base livre no estômago e devido ao efeito hepático do metabolismo de primeira passagem. Dessa maneira, a atividade e os efeitos colaterais deste fármaco ficam sujeitos a grande variabilidade e são dependentes da dose e da concentração.

Conforme já relatado por diversos trabalhos, a inclusão do fármaco em NP constitui uma ferramenta para superar algum desses obstáculos. Além de favorecer o acúmulo e retenção nas células tumorais e a diminuição nos mecanismos de resistência do tumor, a inclusão de fármacos em NP favorece a solubilidade, biodisponibilidade, estabilidade físico-química e biológica. As NP são sistemas de tamanho nanométrico capazes de atravessar o endotélio tumoral, resultando numa concentração preferencial em tecidos tumorais. Ainda, o direcionamento das NP para tecidos tumorais é possível devido à hiperpermeabilidade vascular do tumor (efeito de retenção e permeabilidade aumentada). A conjugação da nanopartícula com a albumina promove a vetorização para células tumorais via SPARC, o transporte ativo do fármaco conjugado e a apoptose de células cancerígenas de maneira seletiva.

A técnica de polimerização em miniemulsão proposta nesse trabalho é extremamente promissora e apresenta diversas vantagens em relação às demais, pois permite a obtenção de NP carregadas com o fármaco em uma única etapa, permite o controle do tamanho de partícula, é uma técnica de baixo custo e apresenta facilidade de aumento de escala. A utilização da

polimerização radicalar controlada RAFT é essencial, pois permite a formação de polímeros com arquitetura molecular definida, um bom controle da massa molar e da distribuição de massas molares dos polímeros sintetizados e a utilização de uma grande variedade de monômeros. Além disso, esta técnica promove a formação de polímeros com um grupo terminal tiocarboníltio em cada cadeia formada, que pode ser facilmente convertido a tiol e, conseqüentemente, ser bioconjugado com uma ampla variedade de moléculas bioativas.

A grande relevância do projeto diz respeito à obtenção de NP poliméricas carregadas com TXF conjugadas com albumina pela técnica de polimerização radicalar controlada RAFT em miniemulsão, que simultaneamente mantém a integridade do fármaco e promove um aumento da estabilidade físico-química e biodisponibilidade. A conjugação do polímero com a albumina é muito importante, pois esta técnica pode ser usada como modelo para conjugação em outros sistemas.

É muito importante ressaltar que o projeto apresenta originalidade, pois não há relatos na literatura de inclusão de TXF *in situ* em sistemas de polimerização em miniemulsão utilizando polimerização radicalar controlada RAFT. Além disso, também não há relatos na literatura sobre a conjugação de albumina em sistemas de polimerização em miniemulsão utilizando polimerização radicalar controlada RAFT, com o objetivo de vetorizar um fármaco incluso *in situ*.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Este capítulo aborda as metodologias experimentais usadas para conduzir as reações de polimerização e as técnicas de caracterização empregadas no trabalho para caracterizar as propriedades e o desempenho do produto final apresentando uma descrição dos procedimentos usados e os objetivos perseguidos por cada uma das técnicas usadas. Nesse tópico também estão relacionados os principais reagentes e equipamentos utilizados.

4.1. REAGENTES

Todos os reagentes empregados não passaram por qualquer purificação prévia, sendo usados diretamente como recebidos do fabricante, a não ser que se faça menção explícita em contrário.

- 2-ciano-2-propilditiobenzoato (CPBTD) HPLC, fornecido pela Sigma-Aldrich, com pureza mínima de 97%, sendo usado como agente de transferência de cadeia (agente RAFT) nas polimerizações em solução e em miniemulsão;
- 4',6 – diamidino diamidino diamidino-2- fenil-indol, fornecido pela Life Technologies, usado nos ensaios de captação celular;
- Acetato de forbol-miristila, fornecida pela Sigma-Aldrich, usada nos ensaios de captação celular;
- Acetato de sódio, fornecido pela VETEC Química Fina com 99 % de pureza, usado para determinação de metais pesados de TXFc;
- Acetona P.A., fornecida pela VETEC Química Fina com 99,5% de pureza, usada na limpeza dos materiais após a reação;
- Acetonitrila grau HPLC/Spectro, fornecido pela Tedia Company Inc., com 99,99% de pureza, usado como solvente na polimerização em solução;
- Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico, fornecido pela Sigma-Aldrich, com pureza mínima de 98%, usado no preparo do Reagente Ellman;

- Ácido Acético glacial, grau HPLC, fornecido pela Tedia Company Inc. com pureza mínima de 99,7%, usado na análise de Limite de Isômero *E* da matéria-prima;
- Ácido acético glacial, fornecido pela VETEC Química Fina com 98% de pureza usado na determinação do teor de TXFc;
- Ácido clorídrico, fornecido pela VETEC Química Fina com 37,0 % de concentração, usado no ensaio de perfil de dissolução por dispersão de TXFc, na determinação do percentual dissolvido de metais pesados de TXFc e no ajuste de pH nos ensaios de bioconjugação;
- Ácido fosfórico, fornecido pela VETEC Química Fina com 85,0 % de concentração, usado no preparo do Reagente de Bradford.
- Ácido nítrico, fornecido pela VETEC Química Fina com 65,0 % de concentração, usado na determinação de metais pesados de TXFc;
- Ácido perclórico, fornecido pela VETEC Química Fina com 70,0 % de concentração, usado na determinação do teor de TXFc;
- Ácido sulfúrico, fornecida pela VETEC Química Fina com 98% de pureza, usado nos ensaios de resíduo de ignição e de limite de ferro da matéria-prima;
- Água filtrada e desmineralizada, usada na reação de polimerização em miniemulsão e no preparo das amostras de miniemulsão para análise do tamanho de partícula
- Água filtrada purificada, usada nos ensaios de bioconjugação, confirmação de bioconjugação e captação;
- Albumina de soro bovino (BSA), fornecido pela Sigma Aldrich com 97% de pureza, usado nos ensaios de bioconjugação;
- Albumina de soro humano (HSA), fornecido pela Sigma Aldrich com 98,5% de pureza, usado nos ensaios de bioconjugação;
- Anticorpo anti-albumina bovina produzido em coelho (BSA-Ac), fornecida pela Sigma Aldrich, usado nos ensaios de avaliação da bioconjugação com Microscopia eletrônica de transmissão (MET);

- Azobisisobutironitrila (AIBN), fornecido pela MERCK com 98,5% de pureza, sendo usado como iniciador nas polimerizações em miniemulsão;
- Azul Tripán, fornecido pela Sigma-Aldrich, usada nos ensaios de captação celular;
- Bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fornecido pela PROQUIMIOS com 99,70% de pureza, usado como tampão na polimerização em miniemulsão;
- Borohidreto de sódio (NaBH_4), fornecido pela VETEC Química Fina com 99% de pureza, usado nos ensaios de bioconjugação;
- Brometo de potássio (KBr), fornecido pela VETEC Química Fina com 98% de pureza, sendo usado como agente dispersante para formação de pastilhas na análise espectrofotométrica de infra-vermelho;
- Cloridrato de Cisteína (Cys-HCl), fornecido pela Sigma Aldrich com 99,7% de pureza, usado nos ensaios de bioconjugação,
- Clorofórmio, fornecido pela VETEC Química Fina, com 98% de pureza, usado na reação de neutralização do sal de citrato da molécula de TXF;
- Coomassie Blue G250, usado para preparo do Reagente de Bradford.
- Dimetilsulfóxido (DMSO), fornecida pela VETEC Química Fina com 98 % de pureza, usado para diluição da fluoresceína usada nos ensaios de bioconjugação;
- Estreptomicina, fornecida pela Sigma-Aldrich, usada nos ensaios de captação celular;
- Etanol 95%, fornecido pela VETEC Química Fina com 95% de pureza, usado no preparo do Reagente de Bradford;
- Flúido de silicone 200/350 CST, fornecido pela Dow Corning Brasil Ltda, sendo usado como banho para aquecimento da reação.
- Fosfato de potássio dibásico (K_2PO_4), fornecido pela VETEC com 98,5% de pureza, usado nos ensaios de bioconjugação;
- Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fornecido pela VETEC com 98% de pureza, usado nos ensaios de bioconjugação;

- Gelatina de peixe, fornecido pela Sigma Aldrich com 48 % em água, usada nos ensaios de confirmação de bioconjugação;
- Graxa de silicone para vedação, fornecido pela VETEC Química Fina, sendo usada para vedar os orifícios do septo de borracha para vedação;
- Hexadecano ($C_{18}H_{34}$), fornecido pela VETEC Química Fina com 99% de pureza, sendo usado como agente de pressão osmótica na polimerização em miniemulsão;
- Hidroquinona (HQ), fornecida pela VETEC Química Fina com 99% de pureza, sendo usada como inibidor da reação de polimerização quando adicionada às alíquotas retiradas durante reação;
- Hidróxido de amônio, fornecido pela VETEC Química Fina com 65,0 % de concentração, usado na determinação de metais pesados de TXFc;
- Hidróxido de sódio, fornecido pela VETEC Química Fina com 98,0 % de pureza usado na reação de neutralização do sal de citrato da molécula de TXF;
- IgG anti coelho (molécula inteira) – anticorpo de ouro produzido em cabra - anticorpo com afinidade isolada, suspensão aquosa de glicerol, 10 nm (ouro coloidal), fornecida pela Sigma Aldrich, usado nos ensaios de avaliação da bioconjugação com microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), fornecida pela Sigma Aldrich, usado nos ensaios de avaliação da bioconjugação com captação celular;
- Lauril sulfato de sódio (LSS), fornecido pela PROQUIMIOS com 95% de pureza, sendo usado como emulsificante da polimerização em miniemulsão e como agente de molhabilidade para determinação de distribuição de tamanho de partícula de TXFc e para determinação do perfil de liberação do fármaco da nanopartícula;
- Maleimida-PEG-NHS MW5000, fornecido pela Nanocs, lote 120910, usada nos ensaios de bioconjugação;
- Meio RPMI-1640, fornecido pela LGC Biotecnologia, usado nos ensaios de captação celular;

- Metacrilato de metila (MMA), fornecido pela VETEC Química Fina, com pureza mínima de 99%, usado como monômero nas reações de polimerização em solução e miniemulsão;
- Metanol, fornecida pela VETEC Química Fina com 99,5% de pureza, usado em ensaio de identificação da matéria-prima e de doseamento de TXF nas nanopartículas;
- Metanol, grau HPLC, fornecido pela Tedia Company Inc. com pureza mínima de 99,9%, usado na análise de limite de Isômero *E* da matéria-prima e de doseamento de TXF nas nanopartículas;
- Metilmetacrilato de dietilamino, fornecido pela Sigma-Aldrich com pureza mínima de 99% sendo usado com monômero para ensaio de solubilidade.
- Metilmetacrilato de dietileneoglicol, fornecido pela Sigma-Aldrich com pureza mínima de 98%, sendo usado com monômero para ensaio de solubilidade.
- Metilmetacrilato de dimetilamino, fornecido pela Sigma-Aldrich com pureza mínima de 99%, sendo usado com monômero para ensaio de solubilidade.
- Metilmetacrilato de polietilenoglicol, fornecido pela Sigma-Aldrich, com pureza mínima de 98%, usado com monômero para ensaio de solubilidade;
- Nitrato de chumbo, fornecido pela VETEC Química Fina com 99 % de pureza, usado na determinação de metais pesados de TXFc;
- Nitrogênio, fornecido pela Linde Gás/AGA S/A com pureza mínima de 99,9, usado para manter a atmosfera inerte nas reações de polimerizações em miniemulsão;
- Paraformaldeído, fornecida pela VETEC Química Fina com 98,5 % de pureza, usado nos ensaios de bioconjugação e captação celular;
- Penicilina, fornecida pela Sigma-Aldrich, usada nos ensaios de captação celular;
- Peróxido de benzoíla (BPO), fornecido pela VETEC com 97% de pureza, sendo usado como iniciador nas polimerizações em miniemulsão;
- Sal de 1-octanossulfonato de sódio, fornecido pela Spectrochem, com pureza mínima de 99%, sendo usado como reagente para fase móvel no ensaio de limite de enantiômero para TXFc;

- Soro fetal bovino, fornecido pela Cripion, usado nos ensaios de captação celular;
- Tetrahidrofurano (THF) grau HPLC/Spectro, fornecido pela Tedia Company Inc. com pureza mínima de 99,90%, usado na análise de cromatografia de permeação em gel como fase móvel e na solubilização das amostras;
- Tioacetamida, fornecida pela VETEC Química Fina com 98 % de pureza, usado na determinação de metais pesados de TXFc;
- Tolueno P.A., fornecido pela VETEC Química Fina com 99,5% de pureza, usado como solvente na polimerização em solução;
- Trietilamina. fornecida pela VETEC Química Fina com 99 % de pureza usada na determinação de TXF nas nanopartículas.

4.1.1. MATÉRIA-PRIMA E SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)

- TXFc substância química de referência (SQR), fabricante USP, lote I0D294 (teor 100%), empregada como padrão; ou seja, referência para padronização secundária da matéria-prima de TXFc e nas análises que exigiram identificação e quantificação de TXF.
- TXFc matéria prima, lote 127/2011-2012, fabricante Polydrug Laboratories, procedência Pharma-Nostra, validade 08/2016.

4.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os materiais e equipamentos empregados para e durante as reações de polimerização, na etapa caracterização das amostras produzidas e nas reações de bioconjugação são descritos a seguir:

- Agulhas descartáveis;
- Analisador de tamanho de partícula (Malvern Instruments Master-sizer com modulo Hydros 2000S), usado para a determinação da distribuição de tamanhos de partículas de TXFc;

- Analisador de tamanho de partícula (Malvern Instruments Zeta Sizer-Nano, modelo Nano-ZS), usado para a determinação da distribuição de tamanhos de partículas presentes no sobrenadante de cada polimerização;
- Balanças (Gehaka, modelo BG-400, pesagem máxima de 404 g; Belmark, modelo U210A, pesagem máxima de 210 g), com precisão de 0,001 g, para pesagens dos componentes das polimerizações e das amostras para análise;
- Balões de fundo redondo de 50 mL com junta 24/40;
- Balões volumétricos, com capacidades variando de 10 a 100 mL, para preparação de curva de calibração;
- Banho de ultrassom (UNIQUE, modelo USC 2850), para homogeneização de amostras solubilizadas;
- Barras de agitação magnética;
- Bastões de vidro;
- Béqueres, com capacidades variando de 30 a 500 mL, para pesagens dos reagentes e preparação das soluções;
- Cadinhos de platina;
- Calorímetro DSC- 8500 Perkin-Elmer, EUA, para avaliação da interação fármaco-polímero;
- Cânula de amostragem de alumínio para introdução do nitrogênio no balão de fundo redondo e para a retirada de alíquotas durante a reação polimerização;
- Centrifuga Eppendorf modelo 5804R, usada nos ensaios de bioconjugação;
- Coluna cromatográfica C₁₈ 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, Kromasil, usada para determinação de TXF nas NP;
- Coluna cromatográfica fenil 300 mm x 4 mm, 10 µm, Shimadzu, usada para determinação do limite de enantiômero *E* no TXFc;
- Cromatógrafo (Viscotek, modelo VE 2001, equipado com quatro colunas Phenomenex e detector refratométrico Viscotek, modelo VE 3580) para a determinação da distribuição de

massas molares das partículas produzidas. A calibração do equipamento foi feita com padrões de poliestireno, com massas molares na faixa de 2340 – $1,86 \times 10^6$ Da;

- Dessecador de vidro;
- Dissolutor (Vankel VK 7010), para determinação do perfil de dissolução por dispersão de TXFc;
- Equipamento para determinação de ponto de fusão BÜCHI B-540;
- Equipamento TGA Mettler Toledo, modelo SDTA 851, usado para as análises de degradação térmica do fármaco e de interação fármaco-polímero;
- Espátulas de alumínio;
- Espectrofotômetro de ultravioleta Shimadzu, modelo UV2401PC, para determinação do limite de enantiômero no TXFc e do percentual dissolvido da matéria-prima;
- Espectrofotometro leitor de placa Molecular Devices modelo Spectramax M5, usado nos ensaios de bioconjugação;
- Espectrômetro de infravermelho (Shimadzu, modelo ABB FTLA 2000-100), usado para identificação de grupos funcionais e caracterização das reações de polimerização;
- Estufa de circulação (Quimis, modelo Q314) para a secagem das alíquotas de conversão;
- Estufa Quimis para incubação de cultra e bacteriologia modelo Q316M4, usada na incubação das soluções nos ensaios de bioconjugação;
- Fita de pH (Merck), usada para ajuste do pH de soluções no ensaio de determinação de metais pesados de TXFc e determinação de pH das soluções do ensaio de bioconjugação;
- HPLC JASCO, bomba quaternária modelo PU20895 puls, detector de uv modelo 2075 plus, integrador LC-Net/ADC, injetor manual, loop de 20 μ L, seringa Hemiltong de 100 μ L, integrado a software modelo Jasco, usado nos ensaios de liberação do fármaco a partir das NP;
- Liofilizador, VIRTIRS, modelo Benchtop K, usado para secagem do látex da miniemulsão;
- Membrana de diálise de acetato de celulose (Sigma-Aldrich), com 0,45 μ m de diâmetro de poro e 47 mm de espessura;

- Membrana filtrante 0,45 µm MILLIPORE, usada para filtração de fase móvel;
- Microscópio ImageXpress Micro XLS Widefield High Content Screening System acoplado software MetaXpress;
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Fei Company, modelo Quanta 200, com tensão máxima de 30 kV, em alto vácuo e em elétrons secundários. As fotomicrografias foram processadas em um analisador de imagens da Fei Company e as amostras foram metalizadas no metalizador JFC 1500, Jeol LTDA;
- Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) Fei Company, modelo TITAN, com tensão entre 80 e 300 kV. As fotomicrografias foram processadas em um analisador de imagens da Fei Company;
- Mufla (Fornitec In e Con. LTDA), usada para determinação de cinzas sulfatadas e metais pesados de TXFc;
- Papel alumínio;
- pHmetro LabMeter modelo PHS-3B, usado nos ensaios de bioconjugação;
- pHmetro/conduvímetero METTLER-TOLEDO – MPC227;
- Pipetas Pasteur;
- Pipetas automáticas de 20, 200, 1000 e 5000 µL marca EPPENDORF;
- Placa de agitação (IKA C-MAG HS 7) para homogeneização das soluções empregadas e condução da realização de polimerização em solução e miniemulsão;
- Placa multi-poços, 96 poços, TPP;
- Placa multipontos (6 pontos) com agitação e aquecimento IKA MH-C6;
- Rotaevaporador IKA RS10, utilizado na reação de neutralização do sal de citrato da molécula de TXF;
- Septo de borracha (24/40 Sigma Aldrich) para vedação do balão de fundo redondo usado como “reator” das polimerizações em miniemulsão;
- Seringa de plástico para retirada de alíquotas durante a reação polimerização;
- Shaker Biomixer modelo TS-2000A VDRL shaker, usado nos ensaios de bioconjugação

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu, equipado com bomba modelo LC-10AD vp, auto-injetor modelo SIL-10AD vp, detector de arranjo de fotodiodos modelo SPD-M10A vp e sistema de dados (*software*) modelo CLASS-VP versão 6.1;
- Tensiômetro de gota Kruss, modelo DAS-100, usado para avaliação da tensão superficial do monômero em estudo;
- Termômetros (10-200 °C);
- Termopares do tipo J, com junta de ferro;
- TGA Mettler Toledo, modelo SDTA 851, usado nas análises de termogravimetria
- Titulador automático (Metrhom, modelo 905 titrando), acoplado ao *software* Tiamo, equipado com bureta de 50 mL e eletrodo de detecção para titulação em meio não aquoso 854iconnect com eletrólito de cloreto de lítio em etanol;
- Tubos Falcon de 15 e 50 mL;
- Tubos de ensaio;
- Ultrassom LABOMETRIC, modelo LB550, usado para homogeneizar as miniemulsões;
- Unidade descartável filtrante 0,45 µm de poro MILLIPORE, usada para filtragem de amostras a serem inseridas nos sistemas de cromatografia e para filtragem da água usada para analisar a distribuição do tamanho de partícula das NP.
- Vortex Phoenix, modelo AP56, usado nos ensaios de bioconjugação e captação celular.

4.3. MÉTODOS

4.3.1. ANÁLISE DA MATÉRIA-PRIMA CITRATO DE TAMOXIFENO

A análise da matéria-prima de TXFc foi realizada com o objetivo de atestar a qualidade da matéria-prima a ser usada para posterior preparo das NP. Os ensaios realizados estão descritos em monografia oficial da farmacopéia americana e compreendem: (i) identificação por espectrofotometria no infravermelho, (ii) identificação por espectrofotometria de ultravioleta, (iii) tamanho de partícula, (iv) dissolução por dispersão, (v) ponto de fusão, (vi) metais pesados, (vii)

cinzas sulfatadas, (viii) limite de enantiômero *E*, (ix) perda por dessecação e (x) doseamento (USP 37, 2014).

4.3.1.1. Identificação por espectrofotometria no infravermelho (IR)

Foram preparadas pastilhas de amostra dispersa em brometo de potássio (KBr) contendo 3% (p/p) de TXF, que foram levadas ao espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu, modelo ABB FTLA 2000-100, realizando-se varredura do espectro entre 400 e 4000 cm^{-1} . O espectro da amostra obtido foi comparado com o da SQR de TXF preparada nas mesmas condições. As bandas observadas foram caracterizadas de acordo com os grupos funcionais que as representam. O espectro de absorção no IR da amostra deve apresentar máximos de absorção nos mesmos comprimentos de onda daqueles obtidos no espectro de TXF padrão (USP 37, 2014).

4.3.1.2. Identificação por espectrofotometria de ultravioleta (UV)

A amostra foi dissolvida volumetricamente em metanol até chegar à concentração de 20,0 $\mu\text{g/mL}$ e levada ao espectrofotômetro de ultravioleta Shimadzu UV 2401-PC onde foi realizada varredura do espectro na faixa de 200 a 400 nm. O espectro obtido da amostra foi comparado com o da SQR de TXF preparada nas mesmas condições. O espectro de absorção no UV da amostra deve apresentar máximos de absorção nos mesmos comprimentos de onda daqueles obtidos no espectro de TXF padrão (USP 37, 2014).

4.3.1.3. Distribuição de tamanho de partícula

A análise da distribuição do tamanho de partícula foi realizada usando a técnica de difração a laser. A difração a laser baseia-se no princípio (difração Fraunhöffer) de que, quanto menor o tamanho da partícula, maior o ângulo é de difração de um feixe luminoso que atravessa

uma população de partículas. Essa técnica não mede partículas individuais, mas sim, com auxílio de transformações matemáticas (transformada de Fourier inversa), calcula uma estatística de distribuição de tamanho dessa população de partículas. Nesse cálculo é empregada uma aproximação que admite que todos os tamanhos de partícula espalham a luz com a mesma eficiência e que as partículas analisadas são opacas, não transmitindo a luz incidida (RAWLE, 2004).

Foi utilizado como meio de dispersão da amostra uma solução aquosa lauril sulfato de sódio (LSS) 0,01%. O LSS foi utilizado para promover melhor molhabilidade no meio, a água, no qual o TXF é parcialmente insolúvel. Foi adicionada quantidade de fármaco até a saturação do meio para impedir a solubilização de partículas da matéria-prima. Após agitação em placa por 24 horas, o meio foi filtrado em unidade filtrante 0,45 µm.

Para análise da distribuição do tamanho de partícula, foram transferidos cerca de 100 mL do meio de dispersão ao módulo úmido do equipamento, o Malvern Hydros 2000S para realização da leitura de base. Em seqüência, foi adicionada sob agitação a matéria-prima em quantidade tal até obter uma obscuração (perda de transmissão da luz) de aproximadamente 5%. Assim, foram iniciadas as leituras.

4.3.1.4. Dissolução por dispersão

A cinética de dissolução da matéria-prima foi realizada em dissolutor Vankel VK 7010, empregando 1000 mL de ácido clorídrico 0,02 N como meio de dissolução e o aparato 1 (cesta) com rotação de 100 rpm e banho termostaticado a 37 °C. A escolha da metodologia e das condições foram baseadas na monografia oficial da farmacopéia americana para comprimidos de TXFc (USP 37, 2014).

O meio de dissolução empregado foi previamente filtrado, desaerado e aquecido até uma temperatura de 37 °C. Ao chegar a esta temperatura, 1000 mL do meio de dissolução foram transferidos para cada uma das 6 cubas do dissolutor com auxílio de uma proveta de 1000 mL.

Foram pesadas 6 amostras de 20 mg do fármaco, as quais foram colocadas em membranas de diálise de acetato de celulose lacradas em ambas as extremidades com pregador específico. Os “saquinhos” de diálise foram colocados em cada uma das 6 cestas, as quais foram acopladas à haste do dissolutor. O ensaio foi iniciado após a estabilização da temperatura do meio de dissolução com o banho termostatizado em $37,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Alíquotas de 10 mL foram coletadas de cada cuba nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30 e 45 minutos através omde cânulas de amostragem, sem reposição de meio. As alíquotas foram filtradas em unidade filtrante $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e submetidas à análise em espectrofotômetro de ultravioleta Shimadzu UV 2401-PC para quantificação da quantidade dissolvida de TXF a 275 nm, usando uma curva de calibração na faixa de 0,005 a 0,04mg/mL (Tabela 2) e o meio de dissolução para ajuste do zero.

Tabela 2 – Amostras produzidas para construir a curva de calibração para o ensaio de dissolução por dispersão

Nível	Alíquota (mL)	Balão volumétrico (mL)	Concentração (mg/mL)*
25 %	5,0	100	0,005
50 %	1,0	10	0,010
100 %	2,0	10	0,020
125 %	2,5	10	0,025
150 %	4,0	10	0,040

*Amostras preparadas a partir de uma solução mãe de 0,1 mg/mL de TXFc em ácido clorídrico 0,02 N

4.3.1.5. Ponto de fusão

As amostras em triplicata foram introduzidas em capilares de vidro e levadas ao equipamento de ponto de fusão BÜCHI B-540 para determinação da faixa de fusão pelo método do capilar (Farmacopéia Brasileira, 2010). As amostras devem fundir entre 140 e 144 °C.

4.3.1.6. Metais pesados

O ensaio limite consiste na formação de partículas sólidas dos sulfetos de metais pesados, em suspensão, e posterior comparação visual da intensidade da cor nas preparações das amostras e do padrão em tubo de Nessler. O ensaio é semi-quantitativo e possibilita inferir se a amostra passa ou não no teste, representando o somatório da concentração dos elementos contaminantes na amostra.

O ensaio foi realizado de acordo com o método II para metais pesados da farmacopéia americana (USP 37, 2014). Para execução do ensaio foram preparados alguns reagentes:

- *Solução estoque de nitrato de chumbo*: foram dissolvidas cerca de 159,8 mg de nitrato de chumbo em 100 mL de água com adição de 1 mL de ácido nítrico. Diluiu-se no meio com água para 1000 mL e fez-se homogeneização. Essa solução foi estocada em recipientes de vidro isentos de sais solúveis de chumbo.

- *Solução padrão de chumbo (10 ppmPb)*: no dia do uso, foram diluídos 10 mL da solução estoque de nitrato de chumbo para 100 mL com água. Cada mL dessa solução continha o equivalente a 10 µg de chumbo (10 ppmPb).

- *Tampão acetato pH 3,5*: foram dissolvidas cerca de 25 g de acetato de amônio em 25 mL de água e adicionados 38 mL de ácido clorídrico 6 M. O pH foi ajustado para 3,5 com hidróxido de amônio 6 M. A diluição foi completada para 100 mL com água.

- *Reagente de tioacetamida*: foram dissolvidos 4 g de tioacetamida em água e completou-se o volume para 100 mL. Foi retirada uma alíquota de 0,2 mL e adicionado 1 mL da mistura de hidróxido de sódio 1 M, 5 mL de água e 20 mL de glicerina. Foi feito o aquecimento em banho-maria por 20 segundos, seguido de resfriamento.

Para o preparo da amostra, foi utilizada a quantidade de amostra, em gramas, especificada na monografia (4 g). A amostra foi transferida para cadinho de platina, onde foi

adicionado ácido sulfúrico suficiente para umedecer a substância e feita a incineração, cuidadosamente, sob temperatura baixa. Foram adicionados à massa carbonizada 2 mL de ácido nítrico e 5 gotas de ácido sulfúrico. O cadinho foi aquecido, com cuidado, até que não mais se desprendesse mais vapores brancos. Então o cadinho foi incinerado em mufla a 500 - 600 °C até completa combustão do carbono. O cadinho foi estocado em temperatura ambiente em dessecador. Depois de resfriado foi adicionados mais 4 mL de ácido clorídrico 6 M. O cadinho foi levado coberto para banho-maria onde a amostra foi digerida por 15 minutos. Após esse tempo, o cadinho foi descoberto e a solução foi evaporada em banho-maria ,lentamente, até secura. O resíduo foi então umedecido com 1 gota de ácido clorídrico e 10 mL de água quente e, novamente, digerido em banho-maria, por 2 minutos. Esta solução foi alcalinizada em papel tornassol com hidróxido de amônio 6 M, adicionado gota a gota. A amostra foi então diluída com água para 25 mL em um becher e o pH foi ajustado entre 3,0 e 4,0 com ácido acético 1 M, utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. As amostras então foram diluídas com água para aproximadamente 40 mL e homogeneizadas.

Para o preparo do padrão foram transferidos para um bécher 2 mL de solução padrão de chumbo (10 ppm Pb) e diluídos para 25 mL com o mesmo solvente empregado para a dissolução da amostra. O pH foi ajustado entre 3,0 e 4,0 com ácido acético 1 M ou hidróxido de amônio 6 M, utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. O padrão então foi diluído com água para aproximadamente 40 mL e homogeneizado.

Para o preparo da amostra controle , foram transferidos para um terceiro bécher um volume de solução da amostra preparada conforme descrito anteriormente e adicionados 2 mL de solução padrão de chumbo (10 ppmPb). O pH foi ajustado entre 3,0 e 4,0 com ácido acético 1 M, utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. As amostras controle então foram diluídas com água para aproximadamente 40 mL e homogeneizadas.

Depois de preparados a amostra, o padrão e a amostra controle positiva, cada uma dessas soluções foram transferidas para tubos de Nessler de 50 mL. A cada uma das preparações

foram adicionados 2 mL de tampão acetato pH 3,5 e 1,2 mL de tioacetamida. Os tubos foram completados com água para 50 mL, as soluções foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 2 minutos. Após 2 minutos, foi observado o desenvolvimento da coloração que variava do amarelo ao preto. Qualquer coloração desenvolvida na preparação amostra não era mais intensa do que a do padrão; ou seja, a quantidade de metais pesados devia ser inferior a 0,001%. O teste somente era considerado válido se a intensidade da coloração desenvolvida na preparação controle fosse igual ou superior àquela da preparação padrão.

4.3.1.7. Cinzas sulfatadas

Cinzas sulfatadas compreendem o resíduo não volátil da incineração na presença de ácido sulfúrico. Em geral, o ensaio visa a determinar o teor de constituintes ou impurezas inorgânicas contidos em substâncias orgânicas. Também se destina à determinação de componentes inorgânicos em misturas e da quantidade de impurezas contidas em substâncias inorgânicas termolábeis.

O ensaio foi realizado de acordo com o método cinzas sulfatadas descrito da farmacopéia americana (USP 37, 2014). Foi pesado 1 g da amostra em cadinho de platina previamente calcinado, esfriado em dessecador e tarado, e adicionado cerca de 1 mL de ácido sulfúrico. O cadinho foi aquecido brandamente até carbonização em temperatura não superior a $600\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$. O cadinho então foi resfriado e lentamente foi adicionado cerca de 1 mL de ácido sulfúrico para umedecer, carbonizar e incinerar o resíduo com aquecimento gradativo até $600\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$. O cadinho foi novamente resfriado, pesado e incinerado por mais 30 minutos. Este procedimento foi repetido até que a diferença entre duas pesagens sucessivas não fosse maior que 0,5 mg. O cálculo do percentual de cinzas sulfatadas foi realizado pela seguinte equação:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{(P_2 - P_1)}{P_3} \times 100 \quad \text{eq. (2)}$$

onde P_1 é a massa do cadinho após a calcinação e esfriamento (tarado cadinho); P_2 é a massa do cadinho com amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador e P_3 é a massa da amostra inicial

A amostra deve apresentar no máximo 0,2% de cinzas sulfatadas.

4.3.1.8. Limite de enantiômero *E*

A análise foi conduzida em cromatógrafo líquido JASCO, provido de detector ultravioleta (UV). A coluna fenil de 300 x 4 mm foi mantida à temperatura ambiente. A fase móvel utilizada foi uma mistura de 678 mL de metanol, 2 mL de ácido acético glacial e solução contendo 1,08g de octanossulfonato de sódio em 320 mL de água. A vazão foi mantida em 0,7mL/min e a detecção foi feita em comprimento de onda de 254 nm.

Foram preparadas uma solução padrão e três replicatas de solução amostra contendo 600 µg/mL, diluindo cerca de 30 mg da matéria-prima e da SQR em 50 mL da fase móvel. Foram então injetados 5 vezes 20 µL de cada solução preparada. O desvio padrão das replicatas de injeção da solução padrão não pode ser maior que 3,0% e o tempo de retenção relativo do pico referente ao isômero *E* em relação ao isômero *Z* não é maior que 0,93. A concentração do isômero *E* não pode ultrapassar 0,3 %.

4.3.1.9. Perda por dessecação

Esse ensaio se destinou a determinar a quantidade de substância volátil natureza eliminada nas condições especificadas na monografia.

Inicialmente foi pesado cerca de 1 g da matéria-prima e transferida para pesa-filtro chato, previamente dessecado durante 30 minutos nas mesmas condições empregadas na determinação (105 °C). Após resfriamento em dessecador, o pesa-filtro foi pesado e tampado, contendo a amostra. O pesa-filtro foi agitado brandamente para distribuir a amostra da maneira

mais uniforme possível, a uma altura ideal de 5 mm. O pesa-filtro então foi colocado na estufa e a tampa foi removida, deixando-a também na estufa. A amostra foi seca a 105 °C por 4 horas. Após esse tempo, o pesa-filtro foi removido da estufa, resfriado até temperatura ambiente em dessecador e, posteriormente, pesado. A amostra não pode perder mais que 0,5% em peso. O cálculo do percentual de perda por dessecação foi realizado pela seguinte equação:

$$\% \text{ Perda} = \frac{(P_u - P_s)}{P_a} \times 100 \quad \text{eq.(3)}$$

onde P_a é a massa da amostra, P_u é a massa do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação e P_s é a massa do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

A amostra deve apresentar no máximo 0,5% de perda por dessecação.

4.3.1.10. Doseamento

O doseamento de TXFc matéria-prima foi realizado por titulação em meio não-aquoso com determinação potenciométrica, em titulador automático Metrohm modelo 905 titrando, do ponto de equivalência com o objetivo de determinar o teor da mesma, de acordo com a farmacopéia americana (USP 37, 2014)

A solução titulante de ácido perclórico 0,1 N foi preparada e aferida antes da titulação das amostras. A aferição foi feita em triplicata com cerca de 150 mg de biftalato de potássio previamente dessecado por 4 horas a 105 °C, em 50 mL ácido acético glacial, para obtenção do fator de correção da solução titulante. Cada 1 mL de ácido perclórico 0,1 N neutralizam cerca de 20,42 mg de biftalato de potássio. O cálculo do fator de correção da solução titulante foi realizado pela seguinte equação:

$$FC = \frac{M}{V \times 20,42} \quad \text{eq. (4)}$$

onde, M é a massa pesada de bftalato de potássio em mg e V é o volume de solução titulante gasto em mL.

Para determinação do teor da matéria-prima foram pesadas, analiticamente, cerca de 0,4 g de matéria-prima no copo do titulador automático, onde foram dissolvidos em 50 mL de ácido acético glacial. As amostras foram levadas ao ultrassom por 5 minutos até a completa solubilização. Foram realizadas 5 determinações consecutivas além da análise do branco. O fator de correção da solução titulante foi calculado imediatamente antes da análise de determinação do teor. Cada 1 mL de ácido perclórico 0,1 N neutralizam cerca de 56,36 mg de TXFc. Esta matéria-prima deve conter entre 99,0 e 101,0 % de TXFc calculado sobre a base dessecada. O cálculo do teor de TXFc foi realizado pela seguinte equação:

$$Teor(\%) = \frac{V_{total} \times Fc \times 56,36 \times 100}{M_p} \quad \text{eq. (5)}$$

onde, V_{total} é o volume total gasto para determinação do ponto de equivalência em mL, Fc é o fator de correção da solução titulante, 56,36 é o fator de análise do sal de TXFc em ácido perclórico 0,1 N e M_p a massa pesada da amostra em mg

4.3.1.11. Degradação térmica

A avaliação da degradabilidade térmica foi analisada por termogravimetria em equipamento TGA Mettler Toledo, modelo SDTA 851. As amostras foram submetidas a temperatura de 25 a 700 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min. Nesta análise foi utilizado nitrogênio como gás de arraste na vazão de 50 mL/min.

4.3.2. REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO

Foram realizadas reações em solução e em miniemulsão usando o mecanismo clássico de radicais livres e também a técnica de polimerização radicalar controlada do tipo RAFT.

4.3.2.1. Unidade experimental

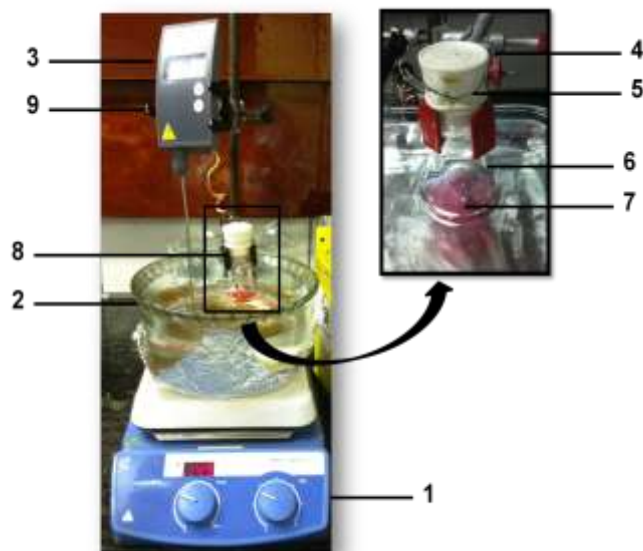


Figura 18. Esquema da unidade experimental usada para conduzir reações de polimerização

A unidade experimental (Figura 18) era constituída por:

1. Placa de agitação e aquecimento IKA C-MAG HS 7;
2. Banho de aquecimento constituído por silicone;
3. Termopar para aquisição de sinais de temperatura ao longo da reação;
4. Septo de borracha para vedação de balão de fundo redondo com dois orifícios feitos por agulha e cânula de amostragem, respectivamente, vedados com graxa;
5. Fio de arame para garantir a vedação e a segurança do batoque preso ao balão de fundo redondo;
6. Balão de vidro de fundo redondo de 50 ml com boca 24/40;
7. Barra magnética;

8. Suporte em garra para balão de fundo redondo;
9. Suporte em garra para termopar.

4.3.2.2. Reação de polimerização em miniemulsão

Esta reação requer o de um preparo prévio da miniemulsão, o que era feito em três etapas. Na primeira etapa, as quantidades de água, tensoativo (lauril sulfato de sódio, LSS) e agente tamponante (bicarbonato de sódio) foram misturadas até a solubilização do LSS e do bicarbonato, formando a fase aquosa. Separadamente, as quantidades de monômero (MMA), agente de pressão osmótica (Hexadecano, HXD), iniciador (PBO ou AIBN) e agente RAFT (CPDTB) foram misturadas até a solubilização e homogeneização de todos os componentes, formando a fase orgânica. A fase aquosa e orgânica foram vertidas para o mesmo bécher em banho de gelo e foram agitadas por 15 minutos em uma placa de agitação com auxílio de barra magnética. No caso das reações de polimerização em miniemulsão via radicais livres convencional, a etapa de adição do agente RAFT na fase orgânica foi eliminada.

A segunda etapa do preparo da miniemulsão consistia no preparo da miniemulsão propriamente dita. Ainda em banho de gelo, para evitar a polimerização e a volatilidade do monômero, a mistura da fase aquosa com a fase orgânica foi feita sob ultrassom LABOMETRIC modelo LB550 por 10 minutos sob 70% de amplitude e pulso de 1 segundo a cada minuto sob agitação com auxílio de uma placa e barra de agitação magnética.

A terceira e última etapa consistia na reação de polimerização propriamente dita. Após a obtenção da miniemulsão no ultrassom, ainda em banho de gelo, a mistura era transferida para um balão de fundo redondo de 50 mL, contendo uma barra de agitação magnética. O balão era tampado com um septo de borracha para vedação. Um arame era amarrado fortemente em volta do septo fixando-o ao balão. Com auxílio de uma agulha descartável foi feito um pequeno orifício na superfície do septo (Figuras 18 e 19). A agulha era deixada encaixada no septo funcionando

como um canal para entrada e saída de ar. Com auxílio da cânula de amostragem, era feito um segundo orifício na superfície do septo e esta cânula era deixada encaixada no septo, funcionando também como um canal para entrada e saída de ar. Enquanto a extremidade da cânula de amostragem localizada na parte interna no balão encontrava-se submersa na solução, a outra extremidade da cânula localizada na parte externa do balão era conectada à linha de nitrogênio, assim, era feita uma purga com nitrogênio na solução contida no balão por 1 hora em banho de gelo.

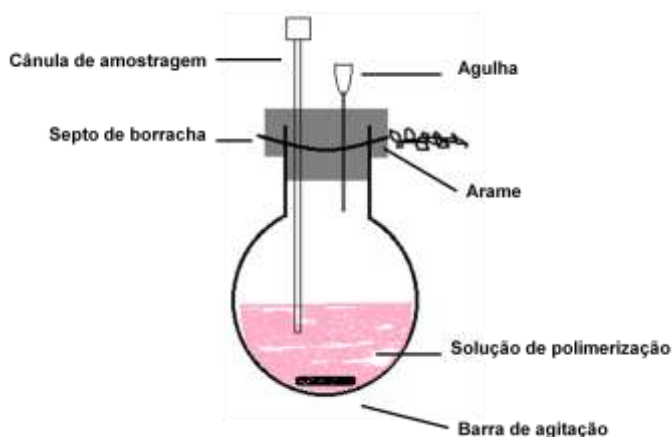


Figura 19. Demonstração esquemática do reator usada para conduzir as reações de polimerização

A medida da temperatura do meio reacional era realizada por um termopar tipo J em contato com o banho de silicone. O controle de agitação era realizado utilizando a velocidade de agitação controlado pela placa de aquecimento/agitação (nível 3), mantida sempre no mesmo valor durante toda a reação e entre todas as reações realizadas.

Após o término da reação, as soluções finais de polímero foram armazenadas em frasco de vidro âmbar de 100 mL e mantidas a 25 °C e sob abrigo da luz.

As condições das reações de polimerização em miniemulsão realizadas estão descritas na Tabela 3. Os ajustes foram realizados visando obter a melhor relação entre o tempo de reação, a velocidade da reação e o rendimento do polímero final obtido.

Tabela 3. Condições reacionais usadas nas polimerizações em miniemulsão conduzidas na ausência de TXF *in situ*.

Reação	RM1	RM2	RM3	RM4	RM5	RM6	RM7	RM17	RM18	RM21	RM22	RM23	RM25
Temperatura (°C)	70	70	70	90	90	90	90	70	70	70	80	80	80
MMA (mol)*	200	200	200	200	200	200	200	400	200	200	400	200	400
PBO (mol)*	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
AIBN (mol)*	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1
Agente RAFT (mol)*	-	2	-	-	-	2	-	-	-	2	2	2	-
HXD (%)^a	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
LSS (%)^b	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Bicarbonato (%)^b	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Água (%)^c	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80

* Valores expressos em proporção molar;

^a % (p/p) em relação à fase orgânica; ^b % (p/p) em relação à fase aquosa, ^c % (p/p) em relação ao peso final da miniemulsão

4.3.2.3. Avaliação da solubilidade do fármaco nos monômeros

Para realizar a polimerização na presença do fármaco *in situ*, em diferentes momentos avaliou-se a solubilidade do sal de TXFc e do TXFb no monômero (MMA), na temperatura das reações indicadas na Tabela 4. Para isso, saturou-se uma solução de 10 mL de monômero na temperatura indicada até a precipitação do fármaco. Esta solução foi mantida na mesma temperatura sob agitação constante por 4 horas. Após este período, uma alíquota foi retirada, imediatamente filtrada em unidade filtrante 0,45 µm e a solução foi analisada por varredura em espectrofotômetro de ultravioleta Shimadzu UV 2401-PC com detecção no pico máximo de absorvância a 265 nm. A quantidade de fármaco dissolvida no monômero foi calculada por meio da comparação com uma curva de calibração do fármaco em MMA.

Posteriormente foi avaliada a solubilidade do sal de TXFc em diferentes monômeros: metimetacrilato de polietilenoglicol (PEG MMA), metilmetacrilato de dietilenoglicol (DEG MMA), metilmetacrilato de dietilamino (DEAMA) e metilmetacrilato de dimetilamino (DMEAMA) à temperatura ambiente, atendendo o mesmo procedimento descrito a cima.

4.3.2.4. Reação de polimerização em miniemulsão na presença do fármaco *in situ*

A reação de polimerização em miniemulsão contendo o fármaco *in situ* foi realizada de acordo com o procedimento descrito na seção 4.3.2.2., solubilizando o fármaco na fase orgânica. As condições testadas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Condições reacionais usadas nas polimerizações em miniemulsão conduzidas na presença de TXF *in situ*

Reação	RM8	RM9	RM10	RM11	RM12	RM13	RM14	RM15	RM16	RM19	RM20	RM24	RM26
Temperatura (°C)	90	90	90	90	90	90	90	90	90	70	70	80	80
MMA (mol)*	200	200	200	200	200	200	200	200	200	400	200	400	400
PBO (mol)*	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
AIBN (mol)*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1
Agente RAFT (mol)*	2	-	2	-	-	2	-	-	-	-	-	2	-
Fármaco (m%) ^a	0,65 ^d	0,65 ^d	0,65 ^d	0,65 ^d	0,65 ^e	0,65 ^e	2,5 ^e	5,0 ^e	20,0 ^e	10,0 ^e	10,0 ^e	10,0 ^e	10,0 ^e
HXD (%) ^a	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
LSS (%) ^b	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Bicarbonato (%) ^b	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Água (%) ^c	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80

* Valores expressos em proporção molar;

^a % (p/p) em relação à fase orgânica; ^b % (p/p) em relação à fase aquosa, ^c % (p/p) em relação ao peso final da miniemulsão, ^d reações com TXFc, ^e reações com TXFb

4.3.3. SECAGEM DAS NP

As partículas foram secas por 3 diferentes métodos. (i) por liofilização num no liofilizador VIRTIS modelo benchtop K a uma temperatura de -50°C e um vácuo de 0,5 mbar.; (ii) em estufa de circulação (Quimis, modelo Q314) a 50°C por 24 horas e (iii) à temperatura ambiente a partir do látex que foi retirado do balão de reação e dispensado num recipiente de vidro refratário de 20 x 20 cm, forrado com papel alumínio e coberto com papel filme furado com ponta de cânula de amostragem e deixado por 120 horas em capela com exaustão acionada.

4.3.4. CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO

Com o objetivo de avaliar a eficácia do processo e das condições de polimerização empregadas, a qualidade do controle das reações contendo agente RAFT e as características das partículas poliméricas obtidos, foram feitos estudos de caracterização com as amostras finais obtidas ao final das reações de polimerização. As técnicas e métodos utilizados estão descritos nas próximas seções.

4.3.4.1. Conversão por gravimetria

A conversão gravimétrica foi obtida como a razão entre a massa de polímero presente no reator e a massa de monômero inicial usada na formulação. A massa de sólidos foi calculada a partir do resíduo seco obtido pela evaporação da amostra de látex levada à estufa de recirculação com ventilação forçada. A massa de polímero foi obtida a partir da subtração da massa de hidroquinona e da fração de sólidos não poliméricos presentes no resíduo seco.

Durante a reação, alíquotas de 1 mL foram retiradas do reator com auxílio da cânula de amostragem e seringa de plástico de 5 mL. Para isso, segundos antes da amostragem foi removida com papel a graxa para vedação que cobria o orifício feito anteriormente com a cânula

de amostragem para purga do nitrogênio. A cânula de amostragem foi inserida e as alíquotas retiradas. Essas amostras coletadas eram transferidas para cápsulas de alumínio previamente taradas. Em seguida, se adicionavam-se 3 gotas de solução de hidroquinona 1% (p/v) em água. Os pesos da amostra sem e com hidroquinona foram anotados e as cápsulas de porcelana foram levadas à estufa de recirculação a 60 °C por 24 horas. Após esse período, o resíduo seco obtido foi novamente pesado.

4.3.4.2. Identificação por espectrofotometria no infravermelho (IR)

Foram preparadas pastilhas do resíduo seco obtido da análise gravimétrica, dispersando o pó em brometo de potássio (KBr) contendo 3% (p/p) de polímero. As pastilhasquais foram levadas ao espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu IR Prestige, realizando-se varredura do espectro entre 400 e 4000 cm^{-1} . O espectro da amostra obtido foi comparado com o da SQR de TXF preparada nas mesmas condições. As bandas observadas foram caracterizadas de acordo com os grupos funcionais que as representam.

4.3.4.3. Distribuição da massa molar do polímero

A determinação da distribuição de massas molares do polímero é realizada pela técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC). A técnica de GPC é extremamente poderosa para fracionamento de um polímero e caracterização de sua distribuição de massa molar. Em essência, a técnica consiste na separação molecular com base no tamanho efetivo das moléculas em solução, conseguido por meio da injeção de uma solução de polímero numa corrente contínua de solvente, que passa através de colunas recheadas com perolas porosas. As moléculas menores penetram mais nas partículas, permanecendo mais tempo na coluna do que as moléculas maiores.

O gel poroso da coluna era constituído de partículas de poliestireno copolimerizado com divinilbenzeno, para o caso de polímeros solúveis em solventes orgânicos. É muito importante que o polímero seja completamente solúvel no solvente selecionando. Como exemplo, usa-se comumente tetrahidrofurano (THF), tolueno e dimetilformamida para conduzir as análises de GPC.

A determinação da distribuição das massas molares do polímero obtido foi realizada em cromatógrafo Viscotek modelo VE2001, equipado com detector de índice de refração e 4 colunas Phenomenex com tamanho de poros de 500, 10000, 100000 e 1000000 Å, na temperatura de 40 °C, com vazão de fase móvel de 1,0 mL/min e usando THF como fase móvel. O volume de injeção das amostras foi de 100 µL.

No preparo das amostras resultantes das reações de polimerização em solução e miniemulsão, 10 mg de polímero obtido do resíduo seco da análise gravimétrica foram pesados, dissolvidos e homogeneizados em 10 mL de THF. A solução foi filtrada em membrana 0,45 µm e injetadas. Para a obtenção dos resultados destas análises, foram preparadas quatro soluções padrões de estireno com as seguintes massas molares:

- Solução 1: 1.850.000, 226.000, 23.000 Dalton
- Solução 2: 1.000.000, 100.000, 12.600 Dalton
- Solução 3: 65.000, 520.000, 2.340 Dalton
- Solução 4: 335.000, 43.500 Dalton

4.3.4.4. Determinação da distribuição de tamanhos de partículas

Este ensaio foi realizado apenas para as amostras coletadas durante as reações de polimerização em miniemulsão.

Nesse caso, a distribuição de tamanhos de partícula foi determinada por espalhamento dinâmico da luz. Essa técnica determina o diâmetro médio das partículas por meio

da iluminação da amostra por um feixe de laser. As partículas mudam de posição no fluido em relação às demais, interferindo na intensidade e frequência do feixe de luz captada pelo detector. Esse procedimento foi empregado na determinação dos tamanhos de partículas presentes nas alíquotas removidas durante a polimerização para conversão gravimétrica. Uma gota da amostra, sem tratamento prévio, foi recolhida com uma pipeta Pasteur e colocada em uma cubeta de vidro. Preenchia-se a cubeta com água destilada e microfiltrada. Em seguida, a cubeta era transferida para o módulo do equipamento. As análises foram feitas em triplicata.

4.3.4.5. Eficiência de Encapsulamento do Fármaco

Esse ensaio teve como objetivo determinar a quantidade de fármaco que realmente foi encapsulado. A eficiência de encapsulamento do fármaco foi caracterizada de duas maneiras: (i) através da diálise do látex obtido da reação e (ii) através da dissolução das NP secas.

Primeiro, retirou-se uma alíquota (5 mL) do látex obtido da reação e colocou-se numa membrana de diálise vedada com grampo nas duas extremidades. Essa bolsa de diálise contendo o fármaco foi dialisada por 12 horas em 80 mL de água sob agitação à temperatura ambiente. Avaliou-se a quantidade de fármaco presente na água de diálise com auxílio de espectrofotômetro de ultravioleta Shimadzu UV 2401-PC no comprimento de onda de 275 nm, comparando com uma curva padrão preparada no mesmo solvente.

Na análise conduzida com a dissolução das NP secas, foram pesadas cerca de 100 mg de polímero para um balão volumétrico de 5 mL, onde foram adicionados 3 mL de metanol. As amostras foram levadas ao ultrassom por 30 minutos. Em seguida completou-se o volume com o mesmo solvente. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm com auxílio de uma seringa direto no vial e injetadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência JASCO sob as seguintes condições: Coluna do tipo C18, com 150 mm x 4,6mm, 5µm; fase móvel constituída de solução aquosa de 0,02% de trietilamina e metanol (11:89), usando volume de injeção 20 µL; detecção no comprimento de onda 254nm (CHAWLA & AMIJI, 2002; SARMAH *et al.*; 2011). A

quantidade percentual de fármaco foi calculada por meio da comparação com uma curva de calibração do fármaco em metanol.

4.3.4.6. Interação fármaco-polímero

4.3.4.6.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os métodos termoanalíticos, tais como DSC, têm sido muito usados para investigar interações entre polímeros e fármacos em diversas formulações. Assim, informações úteis podem ser obtidas a respeito da morfologia do polímero cristalino e sobre o estado de dispersão sólida ou molecular do fármaco associado a estes sistemas poliméricos (JENQUIN & MCGINITY, 2000; JENNING *et al.*, 2000; SARMAH *et al.*; 2011).

A análise de DSC foi empregada neste trabalho com o objetivo de demonstrar se realmente ocorreu alguma interação do fármaco com o polímero e se o TXF foi realmente incorporado nas NP. Foi utilizado um Calorímetro DSC- 8500 Perkin-Elmer. Foram pesados 3 mg de cada amostra e as mesmas foram submetidas a uma faixa de aquecimento de 25 a 200 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min em cadinho de alumínio com tampa furada. O nitrogênio líquido foi utilizado como gás de arraste numa vazão de 80 mL/min e um cadinho de alumínio vazio foi usado como referência. Os termogramas obtidos para as amostras que continham as nanopartículas foram comparados com aqueles obtidos para amostras do polímero puro e do fármaco puro.

4.3.4.6.2. Espectrofotometria de infravermelho (IR)

A espectrofotometria de infravermelho também constitui uma poderosa ferramenta para avaliação de interações químicas que possam ocorrer entre o polímero e o fármaco. Foram preparadas NP com e sem o fármaco, assim como a mistura física a 0,5% (p/p) do fármaco com o

polímero. Foram dispersos 3 mg de cada amostra em 100 mg de KBr. Após o preparo as amostras foram submetidas à varredura no espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu IR Prestige entre 400 a 4000 cm^{-1} por reflectância difusa.

4.3.4.7. Tensão interfacial

A medida da tensão interfacial foi realizada utilizando o método da gota ascendente com um tensiômetro DSA 100 da Kruss a 20,5 °C. O método parte do princípio de que uma gota de líquido pendurada em uma agulha assume uma forma característica que depende da tensão interfacial. Para isso, ela precisa estar em equilíbrio hidromecânico, que é o equilíbrio entre o empuxo e a tensão interfacial do líquido.

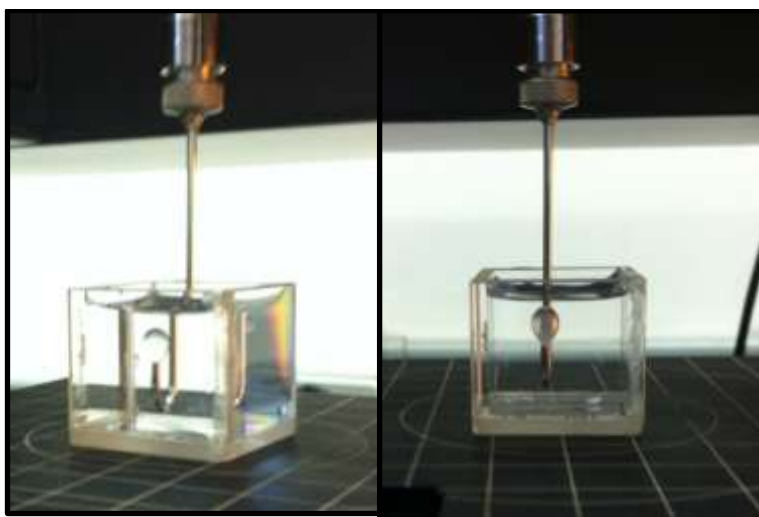


Figura 20. Medida de tensão interfacial pelo método de gota ascendente: visão lateral e visão frontal da cubeta que contém a gota

As medidas foram realizadas entre o monômero (fase orgânica) na ausência e na presença de TXF e a água (fase aquosa), na ausência e na presença de 1,0% de tensoativo (laurel sulfato de sódio), concentração usada no preparo da miniemulsão. A fase aquosa contendo ou não o tensoativo foi colocada na cubeta de vidro e monômero, contendo ou não o fármaco, foi

colocado na seringa em forma de anzol (ambas pertencentes ao equipamento). Injetou-se o monômero para a formação da gota nas condições ideais do equilíbrio hidromecânico, com a seringa imersa na solução (Figura 20).

4.3.4.8. Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura

A análise de morfologia foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no equipamento MEV Quanta 200 da FEI Company. O detector empregado foi de elétrons secundários (ETD). Uma ponta de espátula contendo a amostra era adicionada a um pedaço de fita dupla face que estava aderida do suporte. O suporte era levado a uma câmera para a metalização com ouro em atmosfera de argônio e alto vácuo. Posteriormente, as amostras eram levadas ao microscópio. A espessura final da camada de ouro era de aproximadamente 300 Å.

4.3.4.9. Estudo de liberação do fármaco da nanopartícula

4.3.4.9.1. Escolha da solução receptora

Segundo recomendação do FDA (U.S. FDA/CDER, 1997), misturas tamponadas com adição de tensoativos até 5 % (p/v) podem ser utilizadas como meio receptor em estudos de liberação e penetração *in vitro*, quando o fármaco tem baixa hidrofiliabilidade.

A solubilidade do TXFb em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 na presença de diferentes concentrações de lauril sulfato de sódio (LSS) foi determinada com o objetivo de verificar se essas soluções obedeciam à condição *sink*; ou seja, não favoreceriam proximidade a saturação para essa massa de fármaco.

Para cada tubo de ensaio contendo aproximadamente 5 mL da SR a ser avaliada, foi adicionada uma quantidade suficiente de TXF, de forma a garantir um excesso de TXF no

sistema. As soluções receptoras testadas foram soluções de tampão fosfato 0,1M pH 7,4 contendo LSS em diferentes concentrações.

Os tubos foram levados a um banho-maria a 37 °C, sob agitação magnética constante de 500 rpm. Após um período de 24 horas, os tubos foram centrifugados por 5 minutos, numa velocidade de 5000 rpm. Imediatamente, o sobrenadante foi filtrado através de membrana de poro de 0,45 µm. A solução resultante da filtração foi analisada quantitativamente por UV Shimadzu 2401-PC com varredura na faixa de 200 a 400 nm, utilizando a SR sem o fármaco para ajuste do zero.

Para cada SR testada, preparou-se uma curva padrão para a quantificação do TXF solubilizado. As concentrações definidas foram escolhidas de forma a englobar pontos de baixa, média e alta solubilidade do TXF na solução em teste.

4.3.4.9.2. Montagem e utilização da célula de difusão vertical

Segmentos de aproximadamente 5 cm da membrana de acetato de celulose (membrana de diálise) foram cortados e, subsequentemente, lavados em água corrente e fervidas em cerca de 50 mL de água destilada por 5 minutos. O procedimento foi repetido por três vezes com novo volume de água destilada

Foi montado um sistema adaptado de células de difusão modificada. O sistema foi constituído de um banho de água termostaticado a 37 °C em recipiente de vidro sobre uma placa de agitação de 6 pontos. Neste banho ficavam contidos 6 béqueres de 250 mL cada. O compartimento doador, feito de seringas de 5 mL cortadas de maneira transversal na ponta, sem êmbolo, foi preso de cabeça para baixo em um isopor com furo no meio de diâmetro semelhante ao diâmetro da seringa, que ficou presa no isopor e suspensa pelas hastes. O isopor de formato redondo apresentava o mesmo diâmetro do béquer onde estava contida a SR. A membrana, recentemente preparada, foi presa ao compartimento doador com elástico e foi colocada em contato com a solução receptora, tangenciando-a (Figura 21). O orifício do compartimento doador

foi totalmente preenchido com, aproximadamente, 100 μ L (\approx 10 mg de TXF base) de látex. Os béqueres foram cobertos com o próprio isopor, a fim de evitar a evaporação do meio, que continha um orifício que permitia a passagem da cânula de amostragem. O compartimento receptor de cada béquer foi preenchido com 100 mL de SR e mantido sob agitação por meio de uma pequena barra magnética.

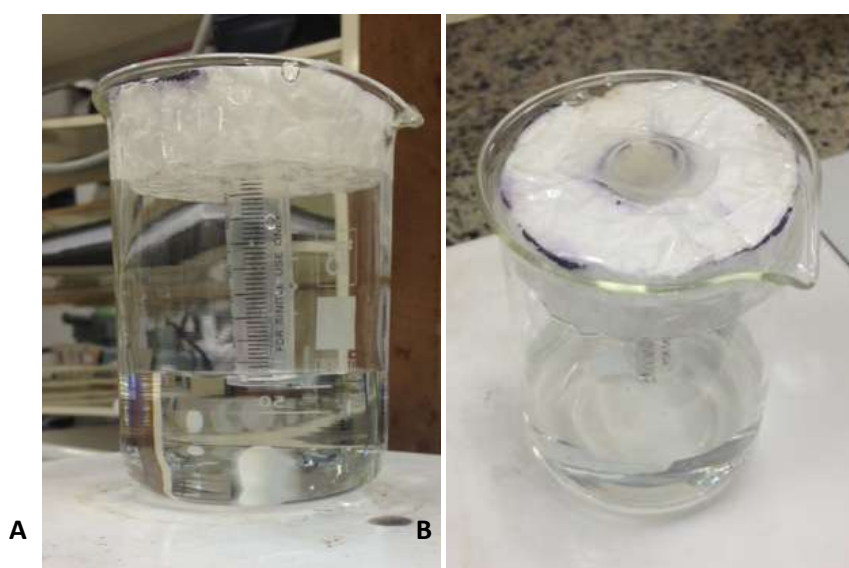


Figura 21. Célula de difusão vertical adaptada usada nos ensaios de liberação: (A) visão lateral (B) visão superior

A retirada de amostra foi realizada com auxílio de uma coletando 1 mL de SR através do orifício contido no isopor repostado, imediatamente, com 1 mL de SR. Dessa forma, o volume da SR foi mantido constante durante todo o ensaio e a membrana foi mantida sempre tangenciando a SR. Amostras foram retiradas em tempos pré determinados e submetidas à análise por CLAE, de acordo com as condições estabelecidas (seção 4.3.4.5).

A massa de TXF acumulada no compartimento receptor em cada tempo foi calculada, considerando o volume total do béquer, a quantidade de fármaco retirada nas coletas de amostras anteriores e a área efetiva para a liberação na célula, conforme a equação abaixo:

$$Q_{\text{real}, t} = (C_{\text{mensurada}, t} \times V_r) + (V_a \times \sum^{n-1} C_a) \quad \text{eq. (6)}$$

Onde, Q é a quantidade permeada acumulada; Q_{real} é o valor real no tempo t; $C_{\text{mensurada}, t}$ é a concentração da coleta medida no tempo t; V_r é o volume da célula de difusão; V_a é o volume de amostra removido; C_a é a concentração da amostra removida.

4.3.4.9.3. Estudo da cinética de liberação do fármaco

A interpretação quantitativa dos valores obtidos nos ensaios de dissolução é facilitada pela utilização de uma equação que descreve a curva de dissolução com função de alguns parâmetros relacionados com a forma farmacêutica. O tipo de fármaco, a sua forma polimórfica, a cristalinidade, o tamanho de partícula, a solubilidade e a quantidade incorporada na forma farmacêutica podem influenciar a cinética de liberação (COSTA & LOBO, 2001; EL ARINI & LEUENBERGER, 1995; SALOMON & DOELKER, 1980).

Têm sido desenvolvidos muitos modelos matemáticos (Tabela 5) com o objetivo de descrever a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica que o contém (OFOEFULE et al., 2000).

Tabela 5. Modelos típicos de cinética de dissolução

Ordem / Modelo	Equação*
Zero Ordem	$Q_t = Q_0 - K_0 t$
Primeira Ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 - K_1 t$
Higuchi	$Q_t = Q_0 - K_H t^{1/2}$

* Q_t quantidade de fármaco liberado no tempo t; Q_0 quantidade inicial de fármaco em solução; K_0 , K_1 , K_H , constantes de liberação de zero ordem, de primeira ordem e de Higuchi, respectivamente; t tempo.

A cinética de ordem zero descreve dissolução de fármacos a partir de formas farmacêuticas que não desagregam e que liberam o fármaco lentamente, desde que a área de troca não se modifique muito e que não se atinjam condições de equilíbrio. Deste modo, e desde que as condições já referidas se mantenham, um gráfico da fração de fármaco dissolvido *versus*

tempo será linear (VARELAS et al., 1995). As formas farmacêuticas que seguem este perfil liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo.

A cinética de primeira ordem se aplica ao modelo em que o gráfico do logaritmo decimal da quantidade liberada do fármaco versus tempo é linear. As formas farmacêuticas que seguem este perfil de dissolução, tais como as que contêm fármacos hidrossolúveis em matrizes porosas, liberam o fármaco de forma proporcional à quantidade remanescente no seu interior, de tal modo que a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui (MULYE & TURCO, 1995).

A cinética de pseudo-primeira ordem ou Higuchi se aplica a modelos teóricos para estudar a liberação de fármacos solúveis e pouco solúveis incorporados em matrizes semi-sólidas e sólidas. Este modelo descreve a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick. Este modelo pode ser usado para descrever a dissolução de fármacos a partir de diversas formas farmacêuticas de liberação modificada, tais como alguns sistemas transdérmicos, e comprimidos matriciais com fármacos hidrossolúveis (COSTA & LOBO, 2001).

Os modelos cinéticos foram calculados a partir da porção linear da curva de percentual liberação *em função do tempo* para avaliar a característica de liberação do fármaco a partir das NP com auxílio do software Excel (Microsoft).

4.3.5. REAÇÃO DE BIOCONJUGAÇÃO

Os resíduos de cisteína são freqüentemente alvo de conjugação sítio-específica através do grupo tiol. Geralmente as proteínas contêm alguns resíduos de cisteína que não participam de pontes dissulfeto e que podem participar de reações de bioconjugação. A BSA, por exemplo, possui um resíduo de cisteína livre, o resíduo 34, que pode reagir por conjugação com o grupamento tiol, proveniente da redução do grupo terminal tiocarboníltio do agente RAFT (BONTEMPO et al., 2004; HEREDIA et al., 2005; ZELIKIN et al., 2007; LIU et al., 2007).

4.3.5.1. Reação de bioconjugação com polímero seco

As primeiras tentativas de reação de conjugação foram realizadas adaptando o método sugerido por Zelikin e colaboradores (2007), suspendendo 200 mg do polímero seco (na presença e ausência de TXF) em 1 mL de água em tubo Falcon de 15 mL. Adicionaram-se 0,0373 g de borohidreto de sódio (NaBH_4 concentração final $\cong 1$ M) a esta solução para proceder à redução do grupo tiocarboníltio remanescente do agente RAFT em tiol. Colocaram-se esta solução sob agitação no shaker por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente adicionou-se 85 μL de ácido clorídrico concentrado para neutralizar o excesso de NaBH_4 . Adicionou-se 0,0174 g de fosfato de potássio dibásico para tamponar o meio (concentração final de 0,1 M) e o pH foi ajustado para 8,0 com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio diluído. As soluções obtidas então foram reservadas.

Em diferentes tubos Falcons adicionaram-se 50 μL de Reagente Ellman (4 mg/mL em tampão fosfato de sódio monobásico 0,1 M contendo 1 mM de EDTA), 2,5 mL de tampão do mesmo tampão e 250 μL de cada solução reservada. Um branco foi realizado, adicionando a um dos tubos 250 μL do tampão. As amostras foram agitadas em shaker por 30 minutos e submetidas à análise em espectrofotômetro a 412 nm. A concentração de grupos tiol disponíveis foi calculada pela comparando com uma curva padrão de cloridrato de cisteína (cys-HCl).

O reagente Ellman ou DTNB é um composto que pode ser usado para determinação quantitativa de grupos sulfidrilas em solução. O dissulfeto do Reagente Ellman sofre rápida transformação em sulfidrilas livres, para formar um dissulfeto e liberar uma molécula de uma substância cromogênica 5-sulfeto-2-nitrobenzoato, chamado também de TNB. A coloração amarela intensa produzida pelo anion TNB pode ser medida por absorvância a 412 nm (em pH 8). Como cada grupo sulfidrilas presente gera uma molécula de reagente por molécula de reagente Ellman, pode-se realizar uma quantificação da quantidade de grupos sulfidrilas livres presentes em peptídeos e proteínas (HERMANSON, 2008).

A partir da concentração de grupos tiois definidos pela reação com reagente de Ellman, procedeu-se à adição da albumina, com relativo excesso, às soluções reservadas. Então adicionaram-se 200 μL (\cong 2 mg) de uma solução de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA em água e a solução foi colocada em shaker por 30 minutos. O mesmo procedimento foi realizado em dois tubos Falcon em branco, um sem adição do polímero e outro sem adição de polímero e de NaBH_4 . Colocaram-se os tubos em centrífuga a 2500 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e reservado. O polímero foi lavado com uma fração de 0,5 mL e mais 3 frações de 5 mL de água. A primeira fração foi adicionada ao sobrenadante reservado anteriormente e as outras foram descartadas.

4.3.5.2. Reação de bioconjugação com polímero em látex

A tentativa de realizar a bioconjugação do polímero em látex ocorrem por causa do fracasso da tentativa de bioconjugação do polímero seco ou concentrado e à provável inacessibilidade dos resíduos de cisteína livres para conjugação com o grupo tiol derivado da redução do grupamento do grupo tiocarboníltio do agente RAFT.

Esta tentativa utilizou uma adaptação do método descrito por Zelikin e colaboradores (2007). Neste contexto, 25 mg do látex (na presença e ausência de TXF) foram diluídos em 5 mL de água purificada em tubo Falcon de 15 mL. Adicionaram-se 0,186 g de borohidreto de sódio, (NaBH_4 concentração final \cong 1 M) a esta solução para proceder a redução do grupo tiocarboníltio do agente RAFT em tiol. Colocou-se esta solução sob agitação no shaker por 2 horas na temperatura ambiente. Posteriormente adicionou-se 85 μL de ácido clorídrico concentrado para neutralizar o excesso de NaBH_4 . Adicionaram-se 0,87 g de fosfato de potássio dibásico para tamponar o meio (concentração final de 0,1 M) e o pH foi ajustado para 8,0 com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio diluído. Posteriormente, procedeu-se a avaliação da concentração de grupos tiois livres de acordo com o descrito na seção 4.3.5.1.

O mesmo procedimento foi realizado com látex produzido na presença e ausência de TXF, suprimindo a etapa de redução; ou seja, suprimindo a adição de NaBH_4 , responsável pela

redução do grupo tiocarboníltio. Desta maneira, não foram disponibilizados grupamentos tióis livres, passíveis de serem conjugados com a proteína. Este procedimento foi realizado como um controle negativo.

A partir da concentração de grupos tióis definidos pela reação com reagente de Ellman, procedeu-se à adição da albumina, com relativo excesso, a 50 µL das soluções reservadas. Então adicionaram-se 300 µg de uma solução de 10 µg/µL de BSA em água e a solução foi colocada em shaker por 30 minutos, 12 horas e 72 horas. Colocaram-se os Ependorfs em centrífuga a 5000 rpm por 10 minutos a 15 °C. O sobrenadante foi removido e reservado. O polímero foi lavado com três frações de 100 µL de água. A primeira fração foi adicionada ao sobrenadante reservado anteriormente e as outras foram descartadas.

4.3.5.3. Reação de bioconjugação com polímero em látex na presença de maleimida PEG-NHS MW 5000

Praticamente o mesmo procedimento descrito na seção 4.3.5.2 foi realizado neste ensaio. Após a redução dos grupos tiocarboníltio e tamponamento, o pH foi ajustado para 5,5 com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio diluído.

Foi então preparada uma solução aquosa com pH 5,5 (ajustado com ácido clorídrico diluído) de 10 µg/µL de maleimida PEG-NHS MW 5000 e 30 µL desta solução foram adicionados, imediatamente após o preparo, a 50 µL da solução final resultante do processo de redução dos grupos tiocarboníltio. Os Ependorfs foram colocados em *shaker* por 30 min na temperatura ambiente. Após esse tempo foram adicionados 35 µL de uma solução a 10 µg/mL de albumina. Essas amostras foram incubadas sob agitação em estufa a 37 °C por 1 hora e 24 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos a 15 °C. O sobrenadante foi removido e reservado. O polímero foi lavado com três frações de 100 µL de água. A primeira fração foi adicionada ao sobrenadante reservado anteriormente e as outras foram descartadas.

4.3.5.4. Avaliação da eficácia da bioconjugação

4.3.5.4.1. Ensaio de Bradford

Para confirmar a quantidade de albumina que reagiu com o polímero realizou-se o ensaio de Bradford, método usado para quantificação de proteína. 1, 5,10 e 20 μL de cada solução reservada foram pipetadas diretamente ou de uma diluição realizada com as soluções reservadas para diferentes poços em placa multi-poços, assim como uma curva padrão de 0,2 a 5 μg de uma solução 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de albumina em água. A cada um dos poços foram adicionados 160 μL de Reagente Bradford (10 mg de Coomessie G250 em 5 mL de etanol 95%, 10 mL de ácido fosfórico 85% e 85 mL de água) com cuidado de não promover a formação de bolhas. A placa multipoços foi submetida à análise no espectrofotômetro de ultravioleta a 595 nm, utilizando o reagente de Bradford para ajuste do zero. A quantidade de albumina na solução reservada (ou seja, quantidade de albumina que não reagiu) pôde ser quantificada comparando-se as leituras obtidas com a curva padrão de albumina (KRUGER, 1994).

4.3.5.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão com anticorpo anti-anticorpo anti-albumina.

As NP conjugadas com albumina precipitadas por centrifugação a partir do processo descrito na seção 4.3.5.3, foram suspensas com 80 μL de água e 20 μL de solução de paraformaldeído 4 % (v/v). Essas amostras foram submetidas a shaker por 30 minutos na temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos a 15 °C. O polímero precipitado foi lavado com três frações de 100 μL de água.

Foram então pipetados 5 μL de cada amostra num parafilme em placa de petri fechada para não evaporar. Colocou-se a grade em cima da gota por 5 minutos a 25 °C, permitindo a incubação. Após esse tempo, as amostras foram lavadas por 30 minutos com bloqueio (gelatina de peixe 3,0% p/v em água). Então a grade foi incubada 1 hora com anticorpo primário (Anticorpo Anti-Albumina bovina produzido em coelho) na diluição 1/250 com gelatina de peixe em água a 25

°C e, em seguida, lavada com gelatina de peixe e deixada *over night* a 4 °C. Posteriormente foi realizada a incubação por 1 hora com anticorpo secundário na diluição 1/100 com gelatina de peixe em água a 25 °C. Após esta etapa, as grades foram lavadas quatro vezes por 5 minutos em água a 25 °C. As grades então foram submetidas à estufa a 55-65 °C para secar e analisadas por MET.

4.3.6. ENSAIOS *IN VITRO* DE CAPTAÇÃO CELULAR

Para esses ensaios foram utilizadas as nanopartículas na presença e ausência de TXF e conjugadas e não conjugadas com albumina pelos tempos de 1 e 24 horas foram suspensas com 80 µL de água e 20 µL de solução de paraformaldeído 4% (v/v). Essas amostras foram submetidas a shaker por 30 minutos à temperatura ambiente e Após esse período as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos na temperatura de 15 °C. O polímero precipitado foi lavado com três frações de 100 µL de água.

Posteriormente, foram adicionados 10 µL de fluoresceína diluída em DMSO a essas partículas suspensas em água. As amostras foram envoltas com papel alumínio, vortexadas e deixadas no escuro por 15 minutos. Após esse tempo as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos na temperatura de 15 °C. O polímero precipitado foi lavado com oito frações de 100 µL de água.

As células THP-1 e cultivadas em meio RPMI-1640 contendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, e suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em frascos de cultura à 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ através de repiques semanais. Para o ensaio de “*high content screening*”, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e a viabilidade aferida pelo método de exclusão por coloração pelo azul Tripán. Posteriormente, 4x10⁴ células foram plaqueadas em placas de 96 poços e estimuladas com 200 nM (50 ng/mL) de acetato de forbol-miristila para diferenciação em macrófagos. Após 24h de estímulo, as células foram lavadas com o meio para a retirada de acetato de forbol-miristila e

então adicionado meio fresco. Os macrófagos foram então estimulados por 4h com as NP contendo ou não TXF e conjugadas com albumina humana ou bovina revestidas após 1h e 24h de reação. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído 4% (v/v). Após a fixação, as células foram marcadas com 4',6 - diamidino diamidino diamidino-2-fenil-indol e observadas em microscópio ImageXpress Micro XLS Widefield High Content Screening System. O número de beads / núcleo / campo foi determinado através do Software MetaXpress. Os ensaios de captação celular foram realizados em colaboração com o pesquisador Dr. Flávio Alves Lara, do Laboratório de Microbiologia Celular do Pavilhão Hanseníase da Fundação Oswaldo Cruz

A análise estatística para comparação da quantidade de partículas captadas pelos macrófagos foi realizada pelo Software Graphpad Prisma.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados os resultados de avaliação da qualidade do insumo farmacologicamente ativo escolhida como fármaco utilizado nos ensaios de polimerização e vetorização. Também estão mostrados os resultados dos testes de polimerização conduzidos em miniemulsão para determinação das condições reacionais adequadas para obtenção de NP com bom controle da reação de polimerização RAFT. Finalmente, são apresentados os resultados dos testes de encapsulamento do TXF e bioconjugação com a albumina.

5.1. ANÁLISE DA MATÉRIA-PRIMA CITRATO DE TAMOXIFENO

A matéria-prima foi aprovada em todos os testes a que foi submetida. Os resultados de identificação, ponto de fusão, metais pesados, cinzas sulfatadas, limite de enantiômero *E*, perda por dessecação e doseamento estão listados na Tabela 6.

De acordo com os resultados, pode-se concluir que todos os ensaios realizados se encontram de acordo com a especificação da monografia da Farmacopéia Americana (USP 37, 2014), compêndio oficial reconhecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil e por outras agências regulatórias internacionais, como o EMEA (*Europe Medicine Agency*) e FDA (*Food and Drug Administration*). Dessa forma, pode-se considerar este lote da matéria-prima como aprovado para ser utilizado no trabalho a ser desenvolvido.

Nas Figuras 22 e 23 estão mostrados os espectros de absorção de ultravioleta e infravermelho, respectivamente, de TXFc matéria-prima e SQR USP. Na Figura 22, tanto o espectro da amostra quanto o da SQR preparadas de maneira idêntica, apresentaram máximos de absorção semelhantes nos mesmos comprimentos de onda: 275, 236 e 205 nm.

Tabela 6. Caracterização da matéria-prima Citrato de Tamoxifeno.

Ensaio	Resultado	Especificação
Identificação por IR	Positiva	De acordo com TXFc SQR (Figura 22)
Identificação por UV	Positiva	De acordo com TXFc SQR (Figura 23)
Ponto de Fusão	141,8 °C	140 – 144 °C
Metais Pesados	< 0,001	< 0,001% (Figura 24)
Cinzas Sulfatadas	0,089	< 0,2%
Limite de Enantiômero <i>E</i>	0,21 ± 0,04 (Média de N=3)	< 0,3% (Figura 25)
Perda por Dessecação	0,34 ± 0,01 (média de N=3)	< 0,5%
Doseamento	100,11 ± 0,12 (Média de N=5)	99,0 – 101,0%

O uso da espectroscopia de infravermelho permitiu a identificação dos compostos por meio da análise dos grupos funcionais. O TXFc (Figura 22) apresentou em 3400 cm^{-1} uma absorção associada à vibração de deformação axial no átomo de hidrogênio ligado ao oxigênio (ligação O-H), referente à hidroxila do ácido cítrico; em 1730 cm^{-1} foi observado um pico de absorção referente à vibração de deformação axial da ligação C=O da carbonila presente no ácido cítrico; em torno de 1580 cm^{-1} está presente um pico de absorção referente à vibrações do núcleo aromático, em 1220 cm^{-1} está presente um pico referente à vibração de deformação angular da ligação C-O do éster aromático, entre 700 e 900 cm^{-1} observam-se picos de absorção referentes à vibração de deformações angulares de hidrogênios adjacentes em anéis aromáticos. Além disso, o espectro da substância química de referência demonstrou a apresentação de bandas idênticas na mesma região que o espectro da matéria-prima. Para fins de referência, a estrutura molecular do TXF é apresentada na Figura 1 (página 9) do presente documento

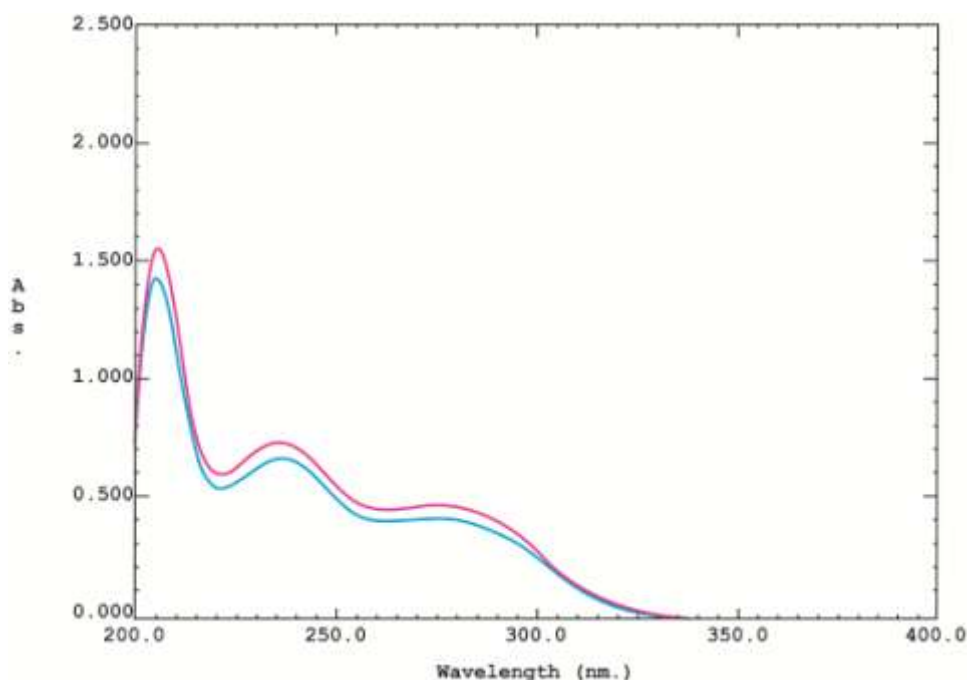


Figura 22. Espectro de absorção em ultravioleta de citrato de tamoxifeno matéria-prima (—) e citrato de tamoxifeno SQR (—) realizado conforme metodologia da USP 37.

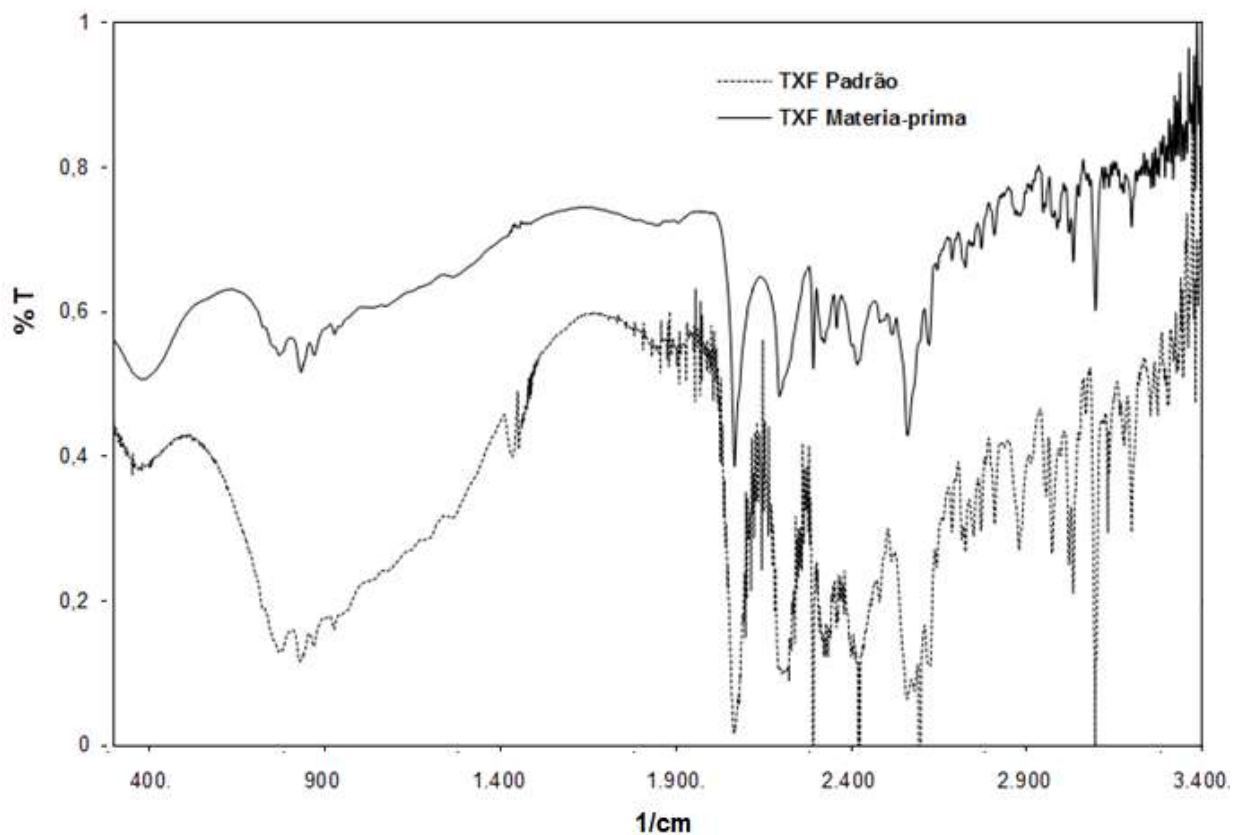


Figura 23. Espectro de absorção em infravermelho de citrato de tamoxifeno padrão e matéria-prima em pastilha de KBR a 3% (p/p).

O ensaio qualitativo de metais pesados é apresentado na Figura 24. Pode-se observar que a intensidade da turvação observada no tubo da solução amostra não foi maior do que aquela observada no tubo da solução padrão; ou seja, a quantidade de metais pesados foi inferior a 0,001%. O teste pode ser considerado válido, uma vez que a intensidade da coloração desenvolvida na preparação do controle positivo (coloração levemente amarelada) foi superior à desenvolvida na solução padrão.

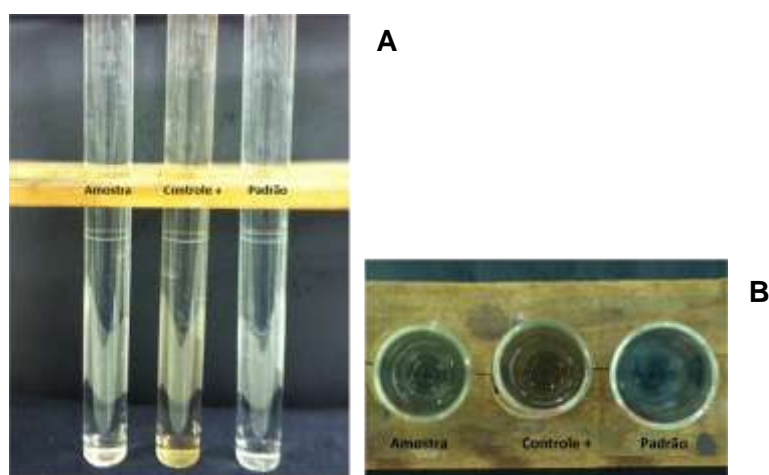


Figura 24. Ensaio qualitativo para determinação de metais pesados com a demonstração da observação horizontal (A) e vertical (B) dos tubos contendo as soluções amostra, controle positivo e padrão, respectivamente.

O cromatograma da análise de limite de enantiômero E é apresentado na Figura 25. O tamoxifeno apresenta dois isômeros que podem ser analisados por C18-RP-HPLC, conforme USP37. O método consiste em identificar picos adicionais em relação ao principal, entre a área do pico do enantiômero E em relação ao pico principal (enantiômero Z). O desvio padrão entre as áreas das replicatas de injeção da solução padrão foi de 0,12%. O tempo de retenção relativo do pico referente ao isômero E em relação ao isômero Z foi de 0,14; ou seja, menor que 0,93. A concentração do isômero E foi de 0,21%, portanto menor que 0,3%, conforme preconizado pela USP37.

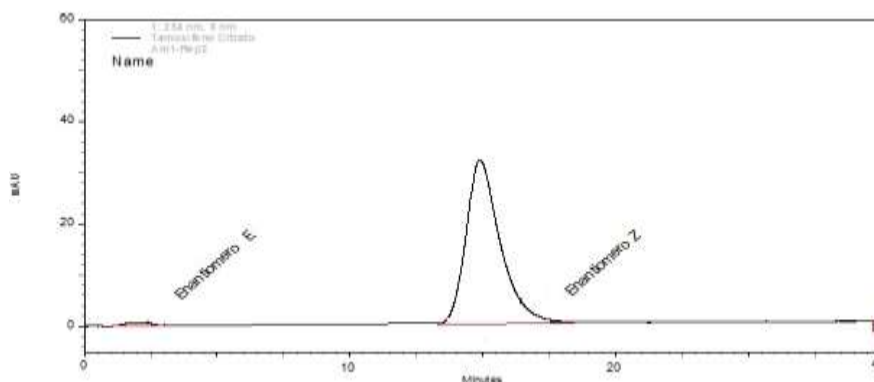


Figura 25. Cromatograma representativo do ensaio de limite de enantiômero E

Os resultados da análise de distribuição de tamanhos de partícula do TXF-IFA estão listados na Tabela 7 e apresentados na Figura 26. De acordo com esses resultados, pode-se concluir que os tamanhos de partícula do lote de TXF-IFA empregado ao longo de toda esta tese eram bastante elevados, levando-se em consideração que o objetivo final era a obtenção de um material nanoparticulado. Esses resultados demonstram e reforçam que a matéria-prima deve, ser previamente solubilizada no meio para que ocorra a incorporação do TXFc na nanopartícula.

Tabela 7. Distribuição granulométrica da matéria-prima.

Amostras de TXF matéria-prima	Diâmetro, μM		
	D10	D50	D90
1	9,06	35,07	89,16
2	8,62	33,17	94,29
3	8,36	31,82	87,46
4	8,46	32,49	88,92
5	8,88	34,59	94,59
6	8,17	33,67	90,24
Média \pm dp*	8,59 \pm 0,34	33,47 \pm 1,23	90,78 \pm 2,98

*dp = desvio padrão

De acordo com os resultados obtidos e com a Figura 26, observa-se uma distribuição de tamanhos de partícula larga e unimodal. Devido ao grande tamanho médio de partículas observado, pode ser interessante a micronização da matéria-prima para utilização nos ensaios de

polimerização *in situ*. A micronização tem como objetivo a redução do tamanho da partícula, evitando problemas de dissolução da matéria-prima na formulação.

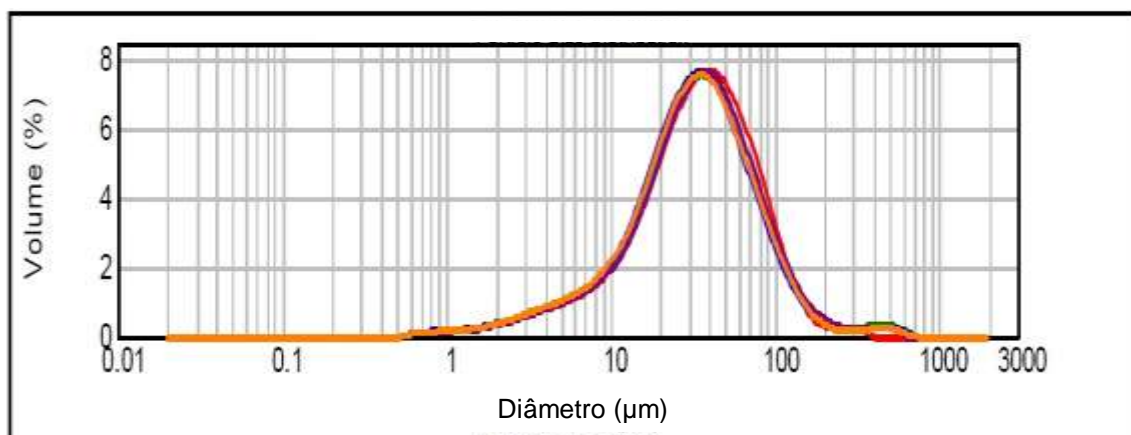


Figura 26. Curva de distribuição do tamanho de partícula de citrato de tamoxifeno matéria-prima

O estudo de dissolução da matéria prima de TXFc por dispersão foi realizado para avaliar a cinética de dissolução para uma posterior comparação com dados de liberação do fármaco das NP. Este resultado está apresentado na Figura 27. Como pode ser observado, a matéria-prima apresentou uma cinética de dissolução muito rápida já que mais de 85% do fármaco se encontra dissolvido em cerca de 15 minutos de ensaio.

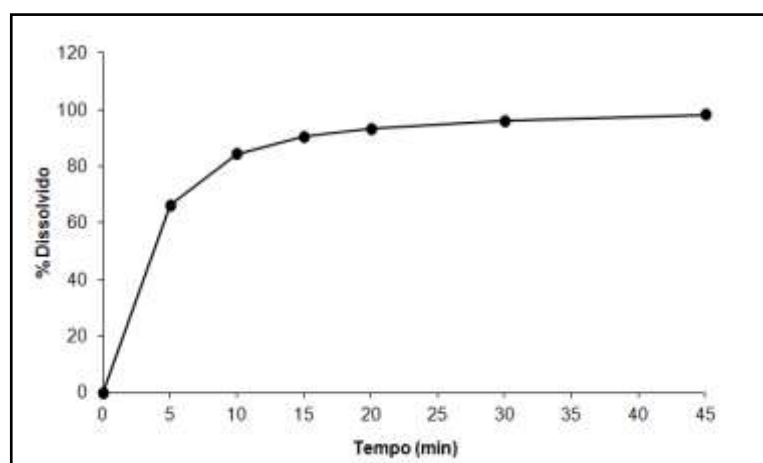


Figura 27. Perfil de dissolução por dispersão da matéria-prima citrato de tamoxifeno. O ensaio foi realizado a 37 °C, em uma proporção de 20 mg de TXF em 1000 mL de fase líquida (HCl 0,02N) com agitação a 100 rpm.

Existe uma grande preocupação em relação à estabilidade do fármaco durante a reação de polimerização *in situ*, já que o fármaco é adicionado no meio reacional e encapsulado na da nanopartícula polimérica durante a formação da mesma. Para isso, foram realizados ensaios de degradabilidade térmica em estufa nas temperaturas de 70 e 90 °C, temperaturas testadas nas condições reacionais de polimerização, e análise térmica (Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC - e análise termogravimétrica – TGA) do TXFc-IFA sólido, para avaliar a partir de qual temperatura o fármaco começa a sofrer degradação. Segundo Tsuhako e colaboradores (2007), o TXFc é bem conhecido por possuir duas formas polimórficas bem estudadas e definidas: formas A e B. Este grupo estudou e definiu as características físico-químicas de ambas as formas polimórficas desta matéria-prima e mostrou que a forma A possui formato de agulha espigada, a enquanto a forma B apresenta a forma de agulha em coluna (Figura 28) (TSUHAKO *et al.*, 2007).

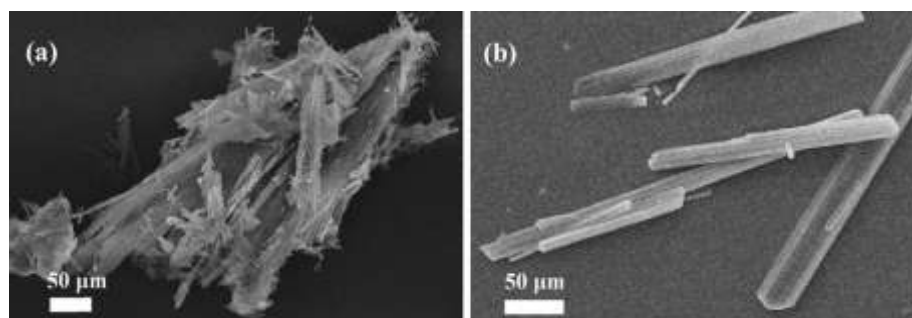


Figura 28. Microscopia eletrônica de varredura das formas de polimorfo A (a) e B (b) de citrato de tamoxifeno (TSUHAKO *et al.*, 2007).

Por meio de análise de DSC e TGA da amostra de TXFc, foi possível mostrar que ambas as formas possuem estabilidade térmica similar no estado sólido, apenas fundindo a uma temperatura de 148,8 °C (Figura 29). Desta forma, assim como no estudo de Tsuhako e colaboradores, as análises na matéria prima adquirida mostraram que o fármaco TXFc pode ser, a princípio, adicionado nas reações de polimerização com baixo risco de degradação em temperaturas menores que 140 °C.

De acordo com Tshuako e colaboradores (2007), as formas A e B apresentaram picos de fusão endotérmicos a 147,5 e 144,8 °C, e calor de fusão (ΔH_f) de 59,7 e 63,7 KJ/mol, respectivamente, mostrando que ambas as formas possuem propriedades térmicas semelhantes. Ainda, foi mostrado que as formas A e B começam a sofrer degradação térmica somente a partir de seus pontos de fusão. Portanto os resultados foram bastante compatíveis com os reportados na literatura.

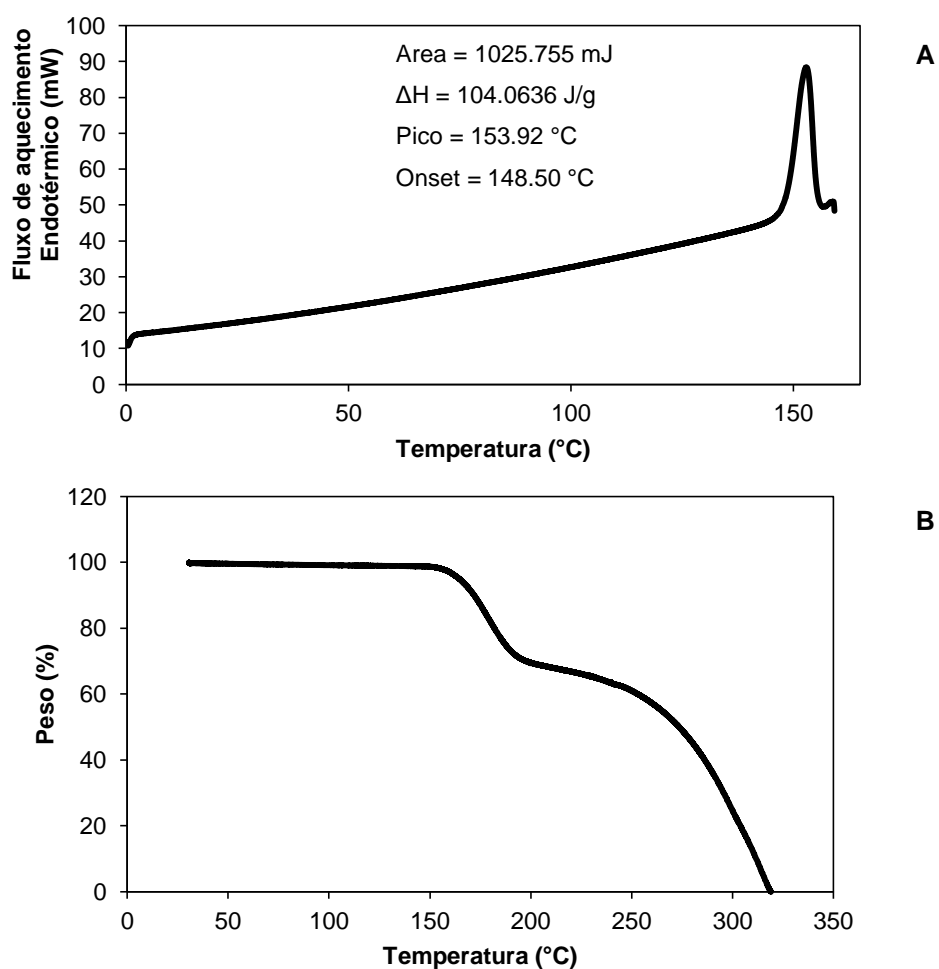


Figura 29. Termograma de DSC (A) e TGA (B) de citrato de tamoxifeno.

5.2. REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO

As reações de polimerização foram realizadas usando o metacrilato de metila (MMA) como monômero. Este monômero foi escolhido devido ao fácil acesso, versatilidade, boa reatividade, compatibilidade com cinco dos sete agentes RAFT disponíveis para compra no mercado nacional e temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero PMMA, a qual deve ser idealmente superior à temperatura do meio reacional para evitar aglomeração (ODIAN, 2004). A T_g do poli(metacrilato de metila), PMMA, é de 122 °C, o que torna conveniente o uso de temperatura do meio reacional entre 70 a 100 °C.

Além disso, o MMA possui compatibilidade e um uso histórico em sistemas de liberação de fármacos (ORÉFICE & VILLANOVA, 2010):

- Os principais exemplos de emulsificantes poliméricos usados em sistemas de liberação são copolímeros de elevada massa molar derivados do ácido acrílico e dos metacrilatos de alquila, contendo ligações cruzadas por éteres alílicos do pentaeritritol ou da alil sacarose;
- Poli(metacrilatos) podem ser usados como aglutinantes em processos de granulação pela via úmida;
- Copolímeros acrílicos baseados no acrilato, metacrilato de amônio e estireno originam máscaras, delineadores, *mousses* e filtros solares com excelentes características.
- Formulações farmacêuticas à base de PMMA exibem funções variadas: estética, organoléptica, estabilizadora, protetora, moduladora da liberação (entérica e sustentada), sendo que as vias de administração são oral, bucal, tópica, vaginal e retal;
- Os principais polímeros sintéticos utilizados nas matrizes de comprimidos de liberação prolongada baseados em sistemas matriciais são: bisacrilamida, poli(acrilamida) (PAm), PEG, PVA, PAA, poli(ácido metacrílico) (PMAA),

- O PMMA foi o primeiro poliacrilato empregado como biomaterial, inclusive em processos de revestimento farmacêutico, sendo que os principais monômeros utilizados para a produção de poliacrilatos: metacrilato de metila (MMA), metacrilato de etila (EMA), metacrilato de butila (BMA), acrilato de etila (EA), dimetilaminoetil metacrilato (DMAEMA) e cloridrato de trimetilaminoetil metacrilato (TAMCI);
- Um exemplo de dispositivo médico contendo fármacos usado na terapêutica é o Septopal® (laboratório Merck S.A.), comercialmente disponível, apresentado na forma de cordão composto por esferas de copolímero de metacrilato de metila e acrilato de metila, unidas por fio cirúrgico. As esferas contêm sulfato de gentamicina, um agente antibiótico que pode ser usado no tratamento de infecções de ossos e tecidos moles. As esferas não degradáveis podem ser utilizadas a curto ou longo prazo, sendo removidas manualmente ou através de intervenções cirúrgicas, respectivamente.
- Um exemplo de comprimido cujo revestimento tem finalidade protetora é a Aspirina® Protect. Já o Asacol® HD, da farmacêutica Procter & Gamble, possui revestimento cuja finalidade é proteger o fármaco do pH ácido e promover sua liberação em pH acima de 7. Ambos os revestimentos são copolímeros do ácido metacrílico e do metacrilato de metila, nas proporções de 1:1 e 1:2, respectivamente.

Por tudo que foi mostrado, a escolha do MMA como monômero e do PMMA como polímero parece natural.

5.2.1. REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO

Baseando-se em trabalhos da literatura (XU *et al.*, 1999, ZHOU *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2009;), primeiramente foram testadas condições reacionais (**RM1** e **RM2**) usando LSS a 1% (p/v) como surfactante e bicarbonato de sódio 0,1% (p/v) como agente tamponante na fase aquosa. Na fase orgânica foi usado MMA, iniciador, hexadecano (como agente de pressão

osmótica) e, nas reações de CLRP, agente RAFT na temperatura de 70 °C. As quantidades de agente RAFT e monômero utilizadas em todas as reações foram escolhidas de maneira a obter um polímero de massa molar 10.000 g/mol. Nessas condições, após 7 horas de reação, obteve-se a conversão de cerca de 100% para a reação de polimerização radicalar convencional (**RM1**) e de 35% para as reações de polimerização radicalar controlada RAFT (**RM2**). A reação **RM1** foi repetida, **RM3**, permitindo coletar amostras do meio em reacional intervalos de tempo mais curtos, para avaliar melhor a curva de conversão.

As curvas de conversão em relação ao tempo obtidas nas reações de polimerização em miniemulsão **RM1** a **RM7** estão representadas na Figura 30.

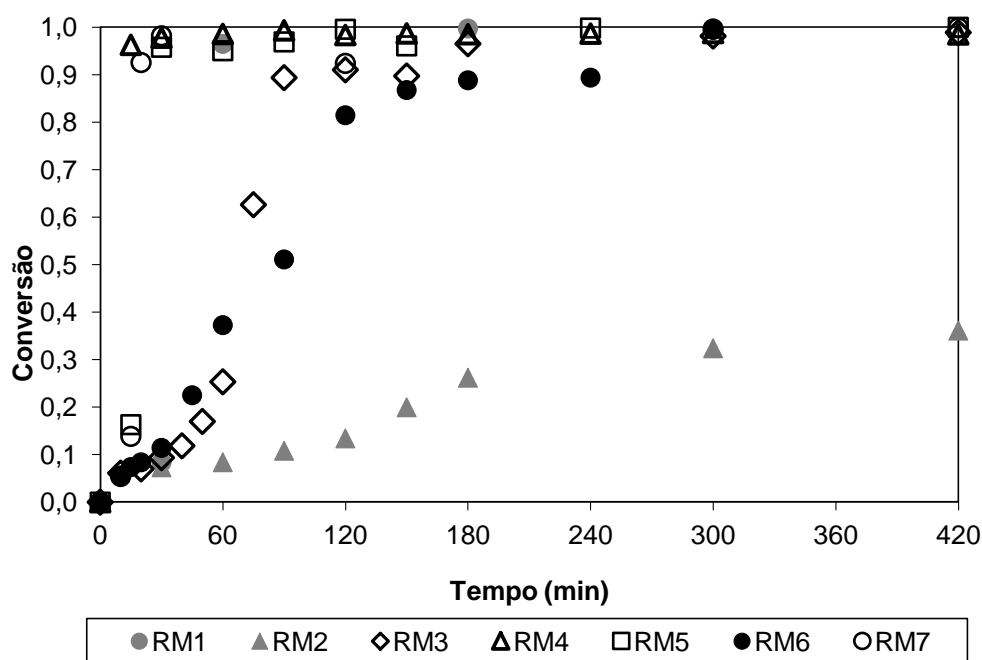


Figura 30. Evolução da conversão nas das reações de polimerização em miniemulsão RM1 a RM7 (condições reacionais descritas na página 97).

A reação **RM4** foi realizada nas mesmas condições da reação **RM3**, via polimerização radicalar convencional, modificando apenas a temperatura reacional de 70 para 90 °C, com o intuito de promover o aumento da conversão para a polimerização controlada RAFT. As reações **RM5** e **RM7** foram repetições da reação **RM4**, a fim de tentar observar melhor a curva de conversão da reação **RM4**, que resultou em quase 100% de conversão após 15 minutos de

reação. Foi observado que, para a reação de polimerização radicalar convencional em miniemulsão, a conversão sofreu um brusco aumento entre 15 (\cong 13%) e 20 minutos (\cong 92%). Isso se deve, provavelmente, ao efeito gel muito intenso observado nas reações com o monômero (ODIAN *et al.*, 2004). Além disso, aumento da temperatura causado pela aceleração da reação aumenta o número de radicais livres gerados na reação, o que promove o aumento da quantidade de cadeias que são iniciadas e propagadas, aumentando ainda mais a viscosidade do meio e reduzindo a mobilidade dos macroradicaís, reduzindo a terminação e aumentando a conversão em um mecanismo de feedback positivo.

A reação **RM6** foi realizada nas mesmas condições da reação **RM2**, via polimerização radicalar controlada por RAFT, modificando a temperatura reacional de 70 para 90 °C a fim de promover o aumento da conversão. Nessas condições a reação **RM6** atingiu cerca de 100% de conversão após 5 horas de reação. Essa condição foi considerada apropriada para conduzir a reação. A redução da taxa de reação na presença do agente RAFT já era esperada como discutido no capítulo 3. De forma similar, o aumento das velocidades de reação com a temperatura já podia ser esperado.

A espectroscopia de infravermelho permite não só identificar as amostras através da observação da presença de grupos funcionais, mas também permite avaliar a presença de interações químicas entre o polímero e o agente RAFT. Na Figura 32 estão representados os espectros de infravermelho do polímero de PMMA (Figura 31) obtido nas reações **RM6** e **RM7**, respectivamente.

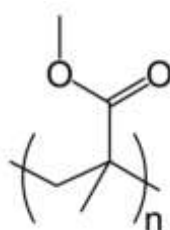


Figura 31. Diagrama molecular do Poli(metacrilato) de metila (PMMA).

Os modos de estiramento C-H e deformação angular dos grupos metileno, metila e metila do grupamento éster se apresentam sobrepostos nas respectivas regiões, dificultando o assinalamento dos referidos grupos. As bandas mais proeminentes são as bandas representativas dos grupamentos, C=O (1730 cm^{-1}), C-C-O (1270 e 1240 cm^{-1}), o estiramento assimétrico C-O-C (1190 e 1150 cm^{-1}) e do estiramento C-C (750 cm^{-1}) da molécula de PMMA obtido nas duas reações. Dessa maneira, pode-se concluir que o polímero de PMMA foi obtido pelas duas técnicas reacionais.

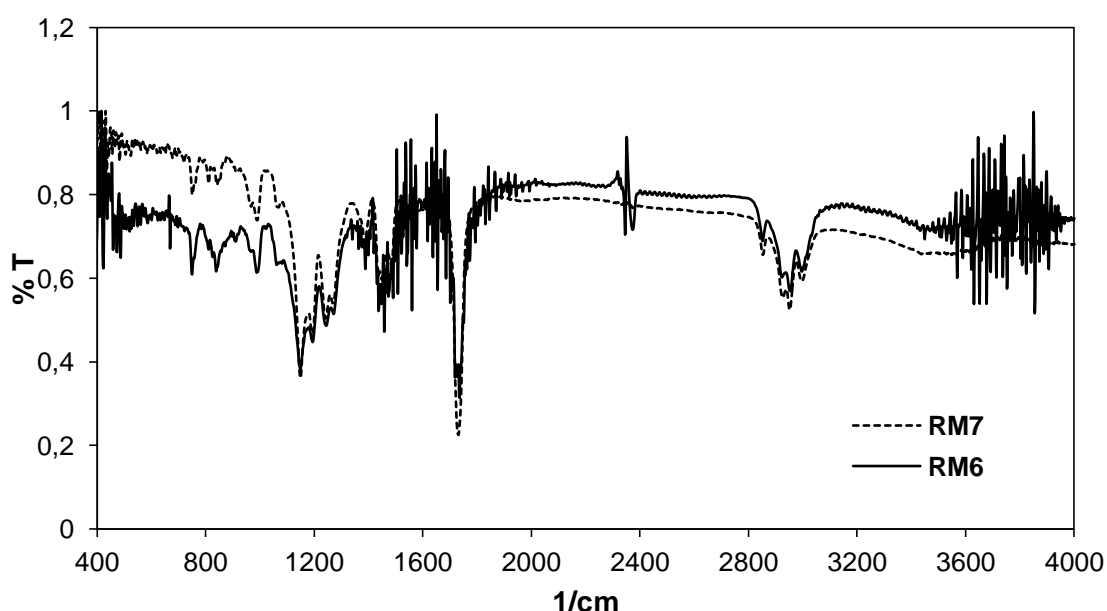


Figura 32. Espectros de infravermelho de PMMA obtidos nas reações de polimerização em miniemulsão RM6 e RM7.

Como já explicitado anteriormente, no mecanismo convencional de polimerização radicalar as cadeias são iniciadas por radicais (formados por um iniciador) que adicionam as moléculas de monômeros. A propagação da cadeia, então, envolve a adição sequencial de unidades de monômero ao radical (P_n^*) formado. A terminação do crescimento da cadeia ocorre quando os radicais em propagação reagem por combinação ou desproporcionamento. Nesse tipo de polimerização, a concentração de estado estacionário das espécies em propagação é de cerca de 10^{-7} M e as cadeias crescem por no máximo 5 a 10 segundos antes de terminarem. As cadeias

são continuamente formadas, propagadas e terminadas por reação radical-radical. A massa molar molecular das cadeias formadas nos primeiros estágios de polimerização é maior e se reduz com a conversão devido à depleção do monômero. Além disso, o índice de polidispersão costuma ser maior que 1,5 ($M_w/M_n > 1,5$) (ODIAN *et al.*, 2004; MOAD *et al.*, 2005).

Na polimerização radicalar controlada, todas as cadeias são iniciadas no princípio da reação, crescem na mesma taxa e sobrevivem à polimerização (ou seja, idealmente não ocorre terminação). O caráter vivo é conferido pela presença de substâncias que reagem com o radical em propagação (P^*) por transferência de cadeia reversível, mantendo a maioria das cadeias no estado dormente. O rápido equilíbrio entre as formas ativas e dormentes garante que todas as cadeias apresentam chances iguais de crescer e que todas as cadeias crescem de forma intermitentemente. Sob essas condições, a massa molar aumenta linearmente com a conversão e a distribuição de massa molar é estreita ($M_w/M_n \cong 1,1$).

Essas características da polimerização radicalar convencional e da polimerização radicalar controlada por RAFT podem ser observadas nas Figuras 33 e 34, para as reações em solução e em miniemulsão, confirmando o caráter “vivo” da reação conduzida na presença do agente RAFT.

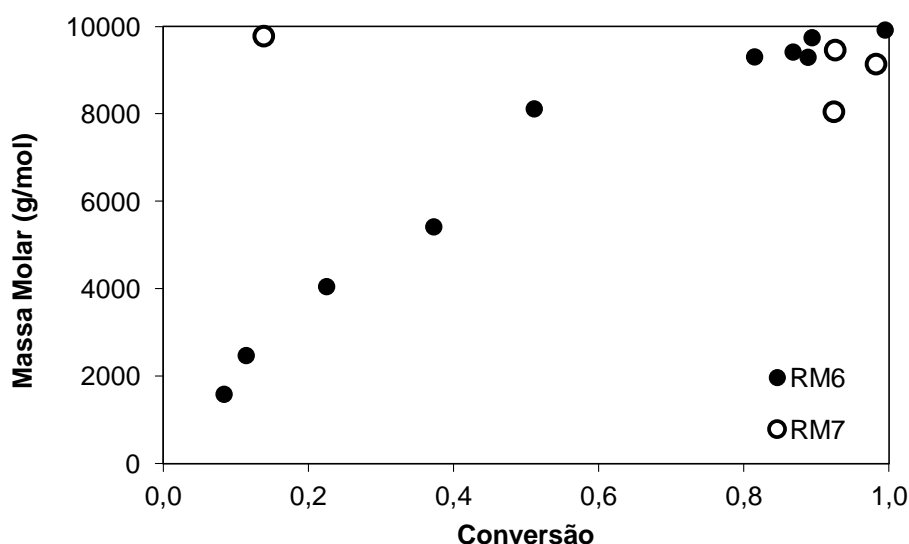


Figura 33. Evolução da massa molar (M_n) com a conversão do monômero para reações de polimerização radicalar controlada RAFT (RM6) e reações de polimerização radicalar convencional (RM7)

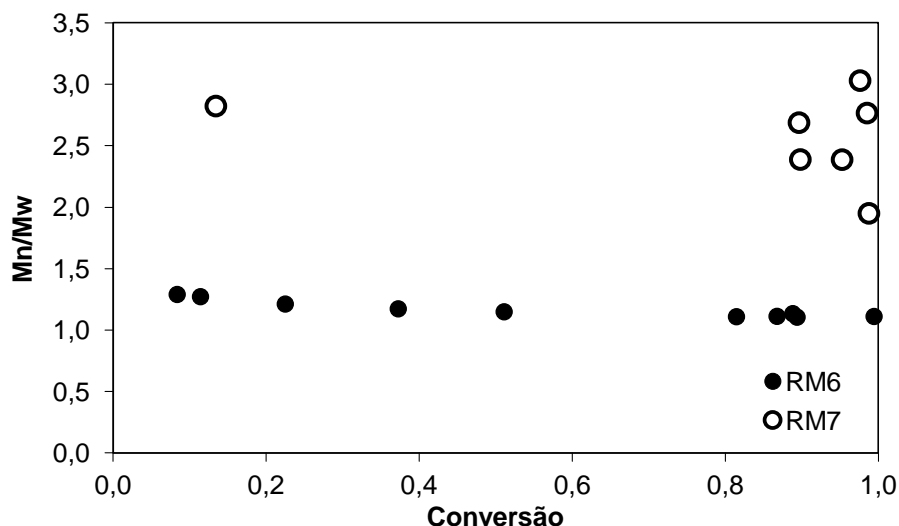


Figura 34. Evolução do índice de polidispersão para reações de polimerização radical controlada RAFT (RM6) e reações de polimerização radical convencional (RM7)

Os dados de distribuição de massas molares são apresentados na Figura 35 observando-se distribuições monomodais. Para a polimerização realizada na presença do agente RAFT (Figura 35 A), mostra-se o deslocamento das curvas para valores de maior massa molar à medida que ocorre o aumento da conversão. Este fato é consistente com um processo de polimerização radical controlado. Este fenômeno, no entanto, não é observado nas reações de polimerização radical convencional (Figura 35 B), em que pode ser observada a sobreposição das distribuições de massas molares em diferentes níveis de conversão: neste tipo de reação, as massas molares formadas desde o início da reação são altas e diminuem com a depleção do monômero.

Portanto, no caso da polimerização radical controlada, a massa molar da polimerização é controlada pelo monômero e pela taxa de iniciação, na fórmula dada pela equação 1 (página 59).

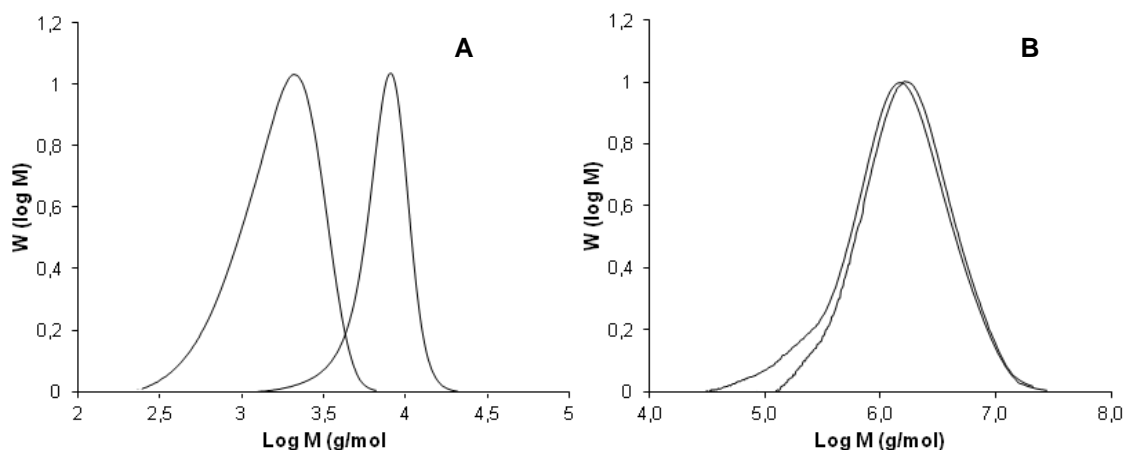


Figura 35. Distribuições de massas molares para RM6 (A) e RM7 (B). Dados gerados a partir de análise de GPC de reação de polimerização de MMA radicalar convencional e radicalar controlada RAFT em miniemulsão por 7 horas.

É visível, a partir da equação 1, que uma massa molar específica pode ser alcançada interrompendo a polimerização num tempo determinado. Como já mencionado anteriormente, a quantidade de monômero utilizada foi escolhida de maneira a gerar um polímero com massa molar em torno de 10.000 g/mol. A Figura 36 apresenta as massas molares (g/mol) reais obtidas durante a reação e as massas molares (g/mol) teóricas projetadas através das curvas de conversão obtida com as reações.

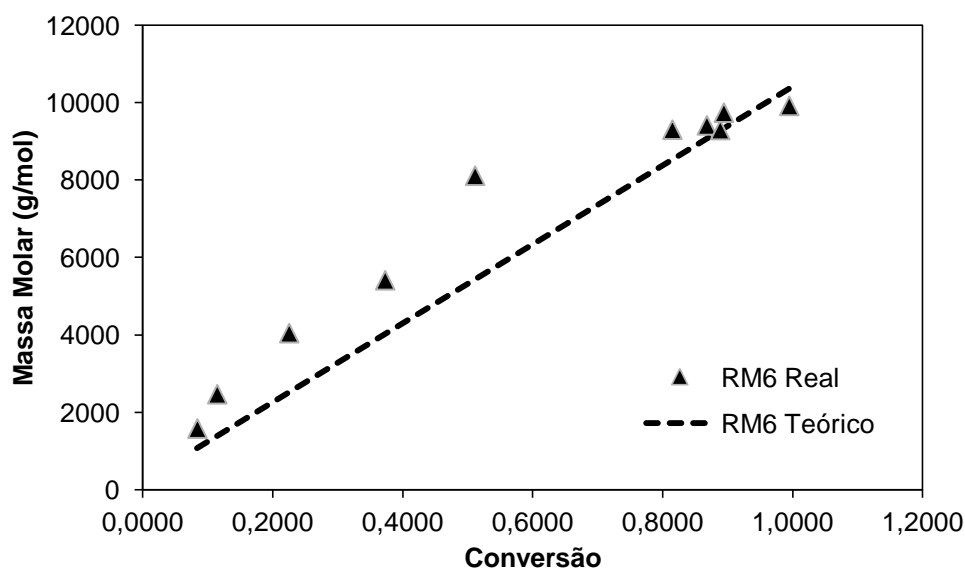


Figura 36. Evolução da massa molar média (M_n) da reação de polimerização radicalar controlada RAFT de MMA em miniemulsão (RM6) na presença de agente RAFT, usando PBO como iniciador a 90 °C.

Pode-se concluir a partir da Figura 36 que o crescimento da massa molar foi aproximadamente linear, como esperado, pois realizando a regressão linear dos pontos obtidos chega-se aos valores de coeficiente de correlação de 0,95 para **RM6**. Além disso, valores de massa molar (g/mol) obtidos com a reação ficaram próximos dos valores esperados para a conversão obtida.

A Tabela 8 apresenta numericamente os valores das massas molares (g/mol) reais obtidas durante a reação e as massas molares (g/mol) teóricas, projetadas através das curvas de conversão obtida com as reações. Além disso, também podem ser observadas as variações dos valores do índice de polidispersão ao longo da reação, sempre próximo a 1,1.

Tabela 8. Variação dos valores de PDI, massa molar média real e teórica (g/mol) obtidos na reação RM6.

Conversão		0,08	0,11	0,23	0,37	0,51	0,81	0,87	0,89	0,89	0,99
	PDI	1,29	1,27	1,21	1,17	1,15	1,11	1,11	1,13	1,11	1,11
RM6	Mn Real (g/mol)	1585	2471	4048	5415	8115	9304	9415	9295	9743	9918
	Mn Teórico (g/mol)	1385	2515	4020	5430	8525	9066	9276	9333	10358	10394

Por fim, o estudo de sistemas particulados exige o conhecimento da distribuição do tamanhos de partícula, pois esta ferramenta é essencial para as operações de processamento de materiais. De forma geral, as NP obtidas devem possuir uma distribuição unimodal, com baixo índice de polidispersão (MOAD *et al.*, 2005, 2006, 2009). Entretanto, nem sempre este objetivo é alcançado, já que o tamanho médio e a distribuição dos tamanhos de partícula dependem, entre outros fatores, do sistema de reação, do método de homogeneização e dos parâmetros definidos para a operação método de homogeneização escolhido. Devido à pouca quantidade de amostra usada para realizar as reações, em função da pouca disponibilidade do agente RAFT, e devido a boa eficiência do processo, o método escolhido para homogeneização do sistema nas reações de

polimerização em miniemulsão foi o ultrassom. A variação do tamanho de partícula (nm) em função da conversão está representada na Figura 37 e na Tabela 9. É possível observar uma pequena contração das partículas de polímero em relação às gotas de monômero, devido à maior densidade do polímero. Em ambos os casos, as partículas apresentaram tamanhos médios nas proximidades de 100 nm, adequados para a circulação no organismo e aplicações de liberação de fármaco para o tratamento do câncer.

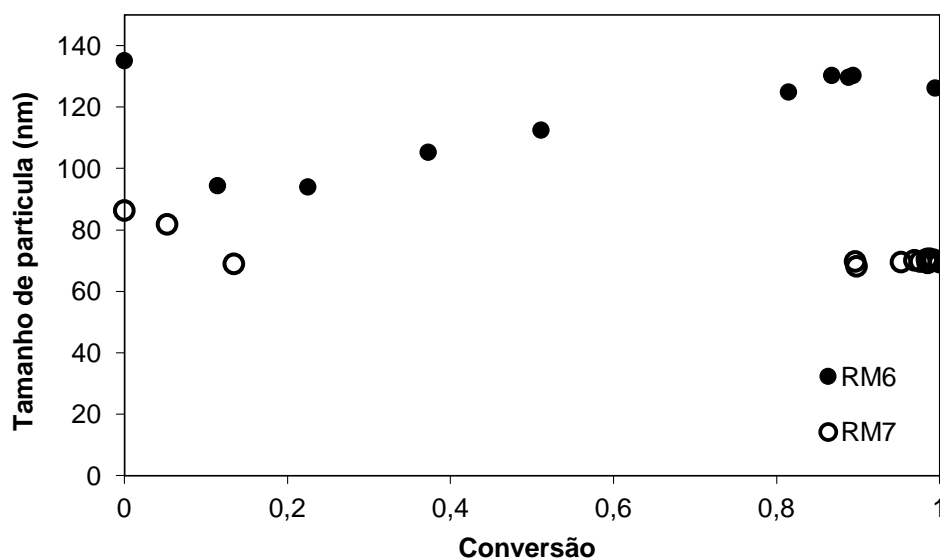


Figura 37. Variação dos tamanhos médios de partícula com a conversão para reações de polimerização radical controlada RAFT (RM6) e reações de polimerização radical convencional (RM7).

Tabela 9. Distribuições de tamanhos de partícula dos produtos finais das reações RM6 e RM7

RM6			RM7		
Conversão	Tamanho (nm)	PDI	Conversão	Tamanho (nm)	PDI
0,0000	135,1	0,255	0,0000	86,33	0,296
0,0561	177,9	0,275	0,0525	81,82	0,420
0,0738	208,6	0,432	0,1344	68,96	0,159
0,0838	164,0	0,259	0,8982	68,16	0,051
0,1143	94,4	0,165	0,9528	69,54	0,044
0,2251	94,0	0,144	0,9763	69,71	0,087
0,3727	105,3	0,107	0,9854	69,28	0,039
0,5111	112,5	0,121	0,9879	70,61	0,044
0,8148	124,9	0,101	0,8965	69,74	0,064
0,8678	130,3	0,092	0,9971	69,54	0,054
0,8884	129,7	0,078	0,9846	70,53	0,066
0,8940	130,3	0,095	0,9930	70,27	0,058

Também são apresentadas as curvas de distribuições de tamanhos de partícula dos produtos finais das reações quando foram observados quase 100% de conversão (ultimo ponto de coleta de reação em 420 minutos) nas Figuras 38 (RM6) e 39 (RM7).

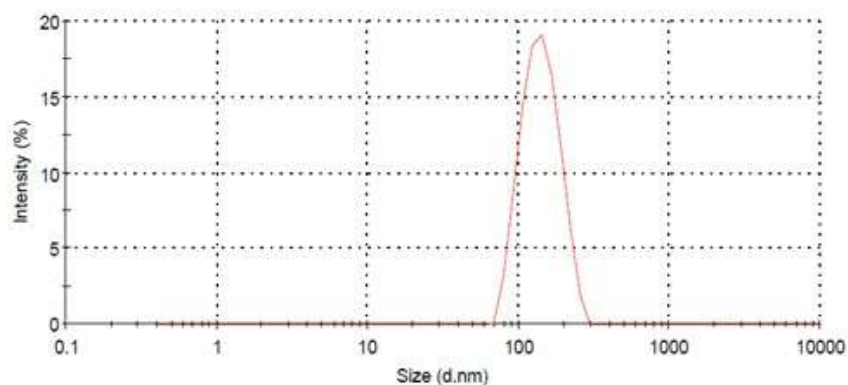


Figura 38. Curva de distribuição do tamanho de partícula para reação de polimerização radical controlada RAFT (RM6)

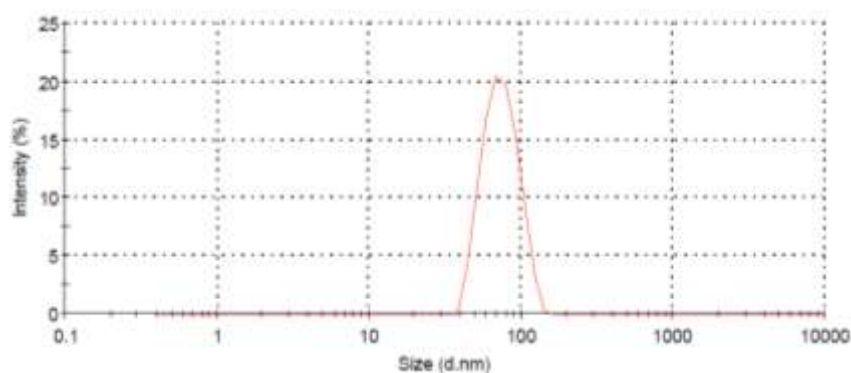


Figura 39. Curva de distribuição do tamanho de partícula para reação de polimerização radical convencional (RM7)

Observando os resultados, pode-se inferir que a reação de polimerização radical convencional gerou partículas em torno de 70 nm, ao mesmo tempo em que a reação de polimerização radical controlada gerou partículas em torno de 120 nm. Ambas as técnicas de polimerização apresentaram índices de polidispersão baixos e distribuição unimodal, o que demonstra que a técnica de homogeneização empregada foi satisfatória e que a faixa de distribuição de tamanho de partícula é estreita, o que pode proporcionar uma liberação mais uniforme no caso da utilização das NP como sistemas de liberação de fármacos (HUSSAIN *et al.*, 2001).

Os maiores tamanhos médios das reações conduzidas com o agente RAFT provavelmente decorreram dos maiores tempos de reação e condições mais favoráveis para a coalescência e degradação de ostwald em meios menos viscosos. Além disso, é possível que o agente RAFT afete a atividade superficial do meio, influenciando os tamanhos das partículas formadas no processo de emulsificação.

5.2.2. REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO E CITRATO DE TAMOXIFENO *IN SITU*

Para realizar as reações em miniemulsão na presença de tamoxifeno foi, analisada a solubilidade do fármaco no monômero a 90 °C. O ensaio de solubilidade foi realizado para avaliar a quantidade de fármaco que poderia ser adicionado às reações, sem haver precipitação no meio orgânico. A solubilidade observada do fármaco no MMA a 90 °C foi de 6,3 mg/mL. Por isso, adicionou-se às reações cerca de 65 mg do fármaco, uma vez que foram empregados 10 g (\cong 10,65 mL) de monômero em todas as reações.

No tratamento usual, a dose oral usual de TXFc é de 10 ou 20 mg e esta formulação apresenta baixa biodisponibilidade (20-30%) devido à precipitação da base livre no ambiente ácido do estômago e ao extenso metabolismo de primeira passagem (SHIN & CHOI, 2009). Portanto, a possibilidade de obter NP carregadas com TXFc na concentração de 0,6 % (p/p) pode ser considerada satisfatória, considerando que há relatos na literatura de outros trabalhos de inclusão de tamoxifeno em NP utilizando concentração fármaco/polímero inferior a essa (BRIGGER *et al.*, 2001).

As reações **RM8** e **RM9** foram conduzidas na presença do fármaco nas mesmas condições das reações **RM6** e **RM7**, respectivamente. As reações **RM10** e **RM11** foram conduzidas nas mesmas condições das reações **RM8** e **RM9**, respectivamente, com intuito de confirmar os resultados obtidos e a influência da presença do TXFc na cinética da reação e nas partículas obtidas.

As curvas de conversão em relação ao tempo obtidas nas reações de polimerização em miniemulsão na presença e na ausência de TXFc *in situ* estão representadas nas Figuras 40 e 41.

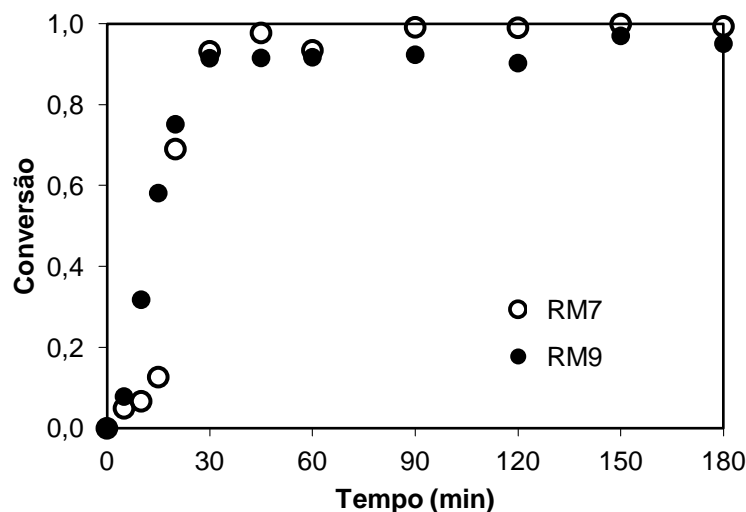


Figura 40. Evolução da conversão nas reações de polimerização radicalar convencional RM7 (sem citrato de tamoxifeno) e RM9 (com citrato de tamoxifeno)

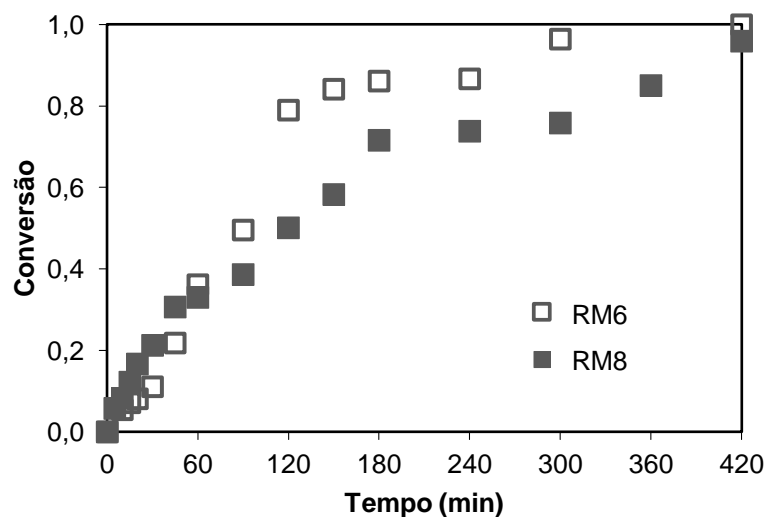


Figura 41. Evolução da conversão nas reações de polimerização radicalar controlada RAFT RM6 (sem citrato de tamoxifeno) e RM8 (com citrato de tamoxifeno)

Pode-se observar que a presença do TXF na reação não provocou mudanças no perfil de conversão das reações de polimerização convencional, especialmente porque a conversão é muito rápida. Neste caso, na presença e na ausência do fármaco, observa-se quase 100% de conversão em 30 minutos. Já na polimerização RAFT pode-se observar que a presença do fármaco promove uma ligeira diminuição na velocidade de reação do monômero em polímero,

porém, o perfil de conversão se mantém o mesmo, sendo atingida uma alta conversão após 7 horas de reação. Não foi observado qualquer efeito da presença do fármaco sobre índice de polidispersão, de maneira que o TXFc não parece interferir no caráter vivo da polimerização. O efeito inibitório causado pelo TXF pode ser devido à presença de átomos de oxigênio e nitrogênio em as estrutura capazes de estabilizar radicais livres.

Para avaliar a influência da presença do fármaco no meio reacional sobre o “controle” da reação, avaliou-se a variação do índice de polidispersão (Figuras 42 e 43) e da massa molar (Figuras 44 e 45) do polímero formado em função da conversão para as reações de polimerização radicalar convencional e controlada na ausência e na presença do fármaco.

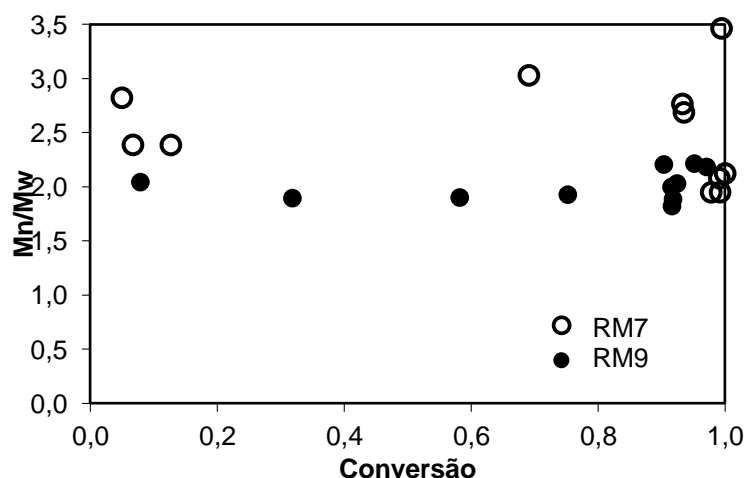


Figura 42. Evolução do índice de polidispersão com a conversão do monômero para reações de polimerização radicalar convencional RM7 (sem citrato de tamoxifeno) e RM9 (com citrato de tamoxifeno).

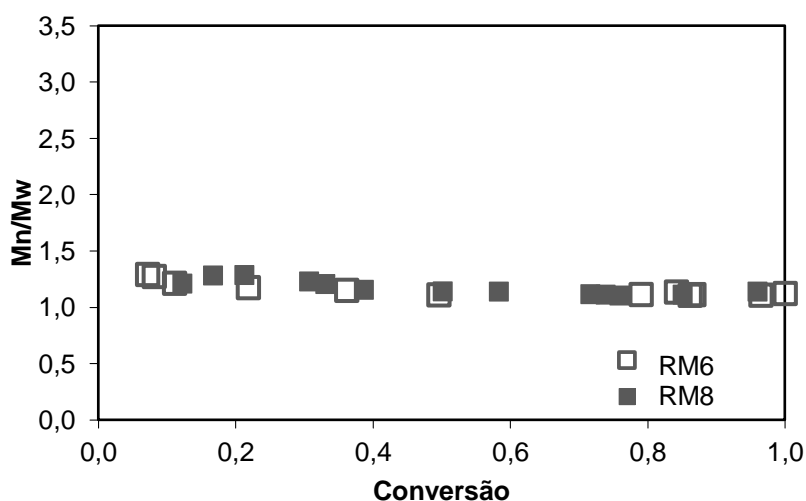


Figura 43. Evolução do índice de polidispersão com a conversão do monômero para reações de polimerização radicalar controlada RAFT RM6 (sem citrato de tamoxifeno) e RM8 (com citrato de tamoxifeno).

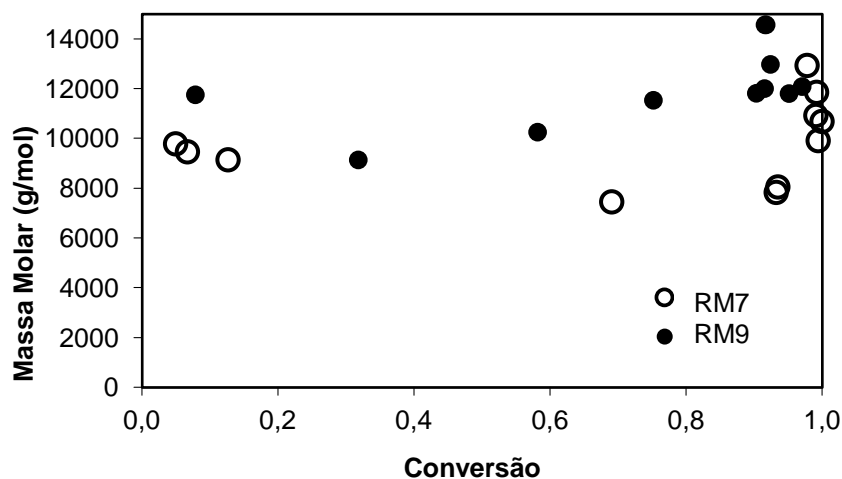


Figura 44. Variação do índice de polidispersão com a conversão para as reações de polimerização radicalar convencional RM7 (sem citrato de tamoxifeno) e RM9 (com citrato de tamoxifeno)

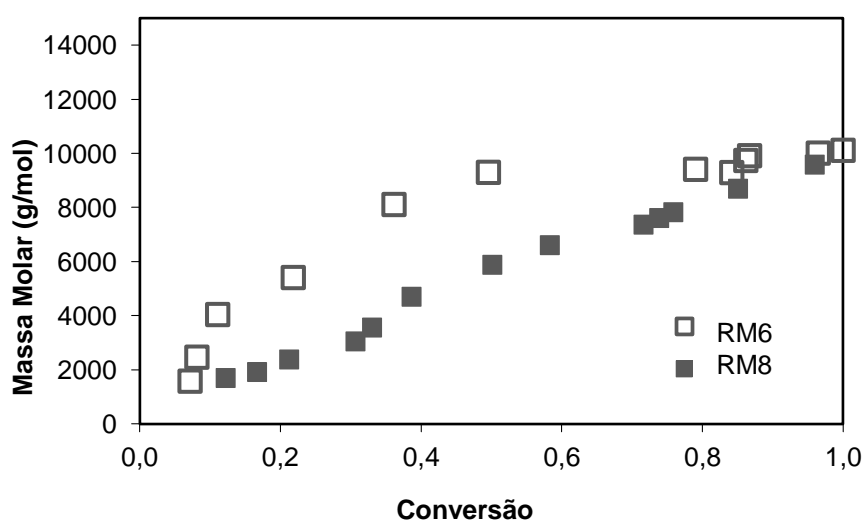


Figura 45. Variação do índice de polidispersão com a conversão para as reações de polimerização radicalar controlada RAFT RM6 (sem citrato de tamoxifeno) e RM8 (com citrato de tamoxifeno)

Nas reações de polimerização radicalar convencional (**RM7** e **RM9**, Figuras 42 e 44) a massa molar média das cadeias formadas nos primeiros estágios de polimerização foi ligeiramente maior, mas dentro do erro experimental. Além disso, o índice de polidispersão foi maior que 1,5 ($M_w/M_n > 1,5$). Nas reações de polimerização radicalar controlada (**RM6** e **RM8**, Figuras 43 e 45) observou-se que a massa molar aumentou linearmente com a conversão, como esperado, e que a distribuição de massas molares foi estreita ($M_w/M_n \cong 1,1$). Ou seja, a presença

do fármaco não alterou os perfis de variação de massa molar e de índice de polidispersão para as reações convencionais e controladas.

Os dados de distribuição de massas molares (Figura 46) das reações realizadas na presença do agente RAFT e na presença ou ausência do fármaco mostraram o deslocamento das curvas para valores de maior massa molar à medida que ocorre o aumento da conversão. Este fato é consistente com um processo de polimerização tipo CLRP e caracteriza o controle da reação. Além disso, também mostraram que a presença do fármaco não alterou o controle da reação de polimerização radicalar RAFT. Na reação convencional, a presença do fármaco afetou pouco a evolução das distribuições de massas molares

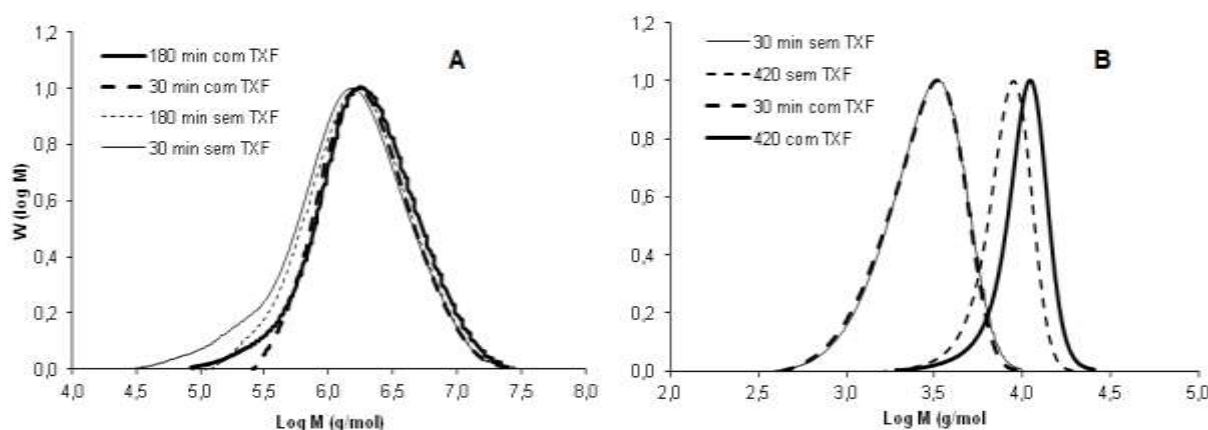


Figura 46. Distribuição de massa molar para (A) RM7 e RM9; (B) RM6 e RM8. Dados gerados a partir de análise de GPC de reação de polimerização de MMA radicalar convencional e radicalar controlada RAFT em miniemulsão na presença e ausência de citrato de tamoxifeno.

Também foi avaliado o impacto da presença do fármaco no meio reacional sobre as variações da distribuição dos tamanhos de partícula nas reações convencional e controlada (Figuras 47 e 48). Os resultados mostram que o tamanho da partícula não foi afetado pela presença do fármaco, indicando a boa reprodutibilidade das medidas. A reação de polimerização radicalar convencional continuou gerando partículas em torno de 70 nm, ao mesmo tempo em que a reação de polimerização radicalar controlada continuou gerando partículas em torno de 120 nm.

Por conta dos maiores valores iniciais de diâmetro, isso reforça a hipótese de que o agente RAFT afeta a atividade interfacial da emulsão. A presença do fármaco também não alterou o índice de polidispersão, que permaneceu baixo durante toda a reação para todas as reações (RM6 RM7, RM8 e RM9), nem a forma unimodal da distribuição. Isso mostra que a técnica de homogeneização empregada foi eficiente e que a faixa de distribuição de tamanho de partícula é estreita mesmo na presença do fármaco, o que pode proporcionar uma liberação mais uniforme (HUSSAIN *et al.*, 2001).

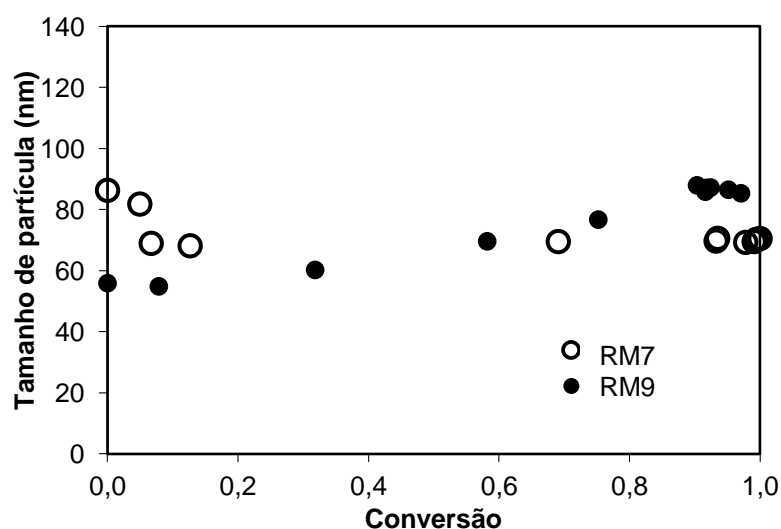


Figura 47. Variação do tamanho médio de partícula com a conversão para reação de polimerização radicalar convencional na ausência (RM7) e na presença (RM9) de citrato de tamoxifeno

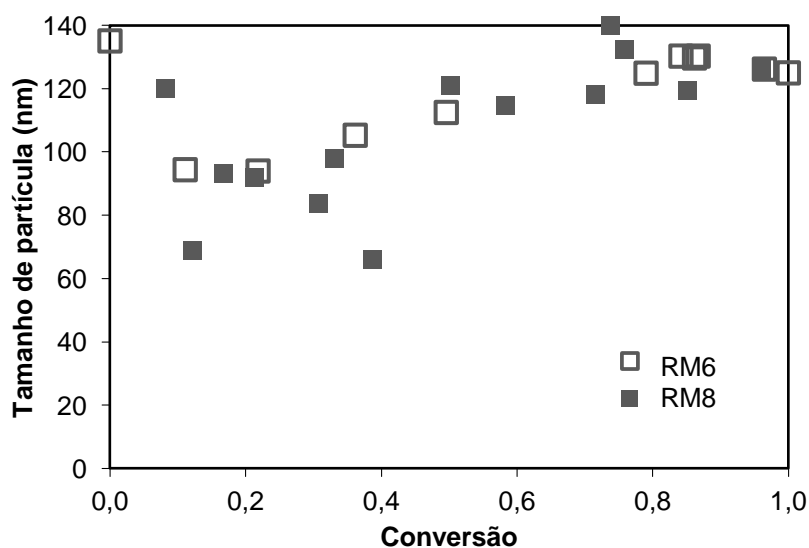


Figura 48. Variação do tamanho de partícula médio com a conversão para reação de polimerização radicalar controlada RAFT na ausência (RM6) e na presença (RM8) de citrato de tamoxifeno

A análise dos tamanhos médios de partícula permite avaliar a tendência de agregação das partículas dispersas em suspensões ou emulsões em função do tempo, constituindo uma importante ferramenta para avaliação da estabilidade. As análises de tamanho de partícula foram realizadas imediatamente após o preparo (Figuras 47 e 48) e após 30 dias. Não foi observada qualquer alteração nos resultados. As emulsões ficaram armazenadas em frascos de vidro âmbar, na temperatura ambiente e protegidos da luz. Portanto as emulsões formadas podem ser consideradas estáveis para armazenamento.

A interação fármaco-polímero foi avaliada por ensaios de IR (Figura 49 A e B) e de DSC (Figura 50). A espectrometria de infravermelho também permite avaliar a presença de interações químicas entre o fármaco e o polímero, constituindo mais uma ferramenta para determinação da forma de associação entre ambos.

Avaliando os espectros não foi possível observar bandas referentes ao TXFc no produto obtido na presença do fármaco *in situ* no meio reacional, uma vez que os espectros são idênticos. Ambos apresentam picos principais associados à ligações O-CH₃ (2850-2815 cm⁻¹); -C=O (1650-1790 cm⁻¹) e -CH₃ (1430-1470 cm⁻¹), como já discutido (PRETSCH *et al.*, 1989). Na mistura física foi possível observar pico referente ao anel aromático presente no fármaco (\cong 1630 cm⁻¹). A ausência da observação de picos referentes ao TXFc no produto e a presença na mistura física pode ser atribuída à baixa concentração de fármaco presente no polímero, não só proveniente da adição de baixa quantidade de fármaco no meio reacional (\cong 0,6% p/p em relação ao monômero), mas também pela possível perda de fármaco presente no polímero formado por conta de uma possível baixa eficiência de encapsulamento.

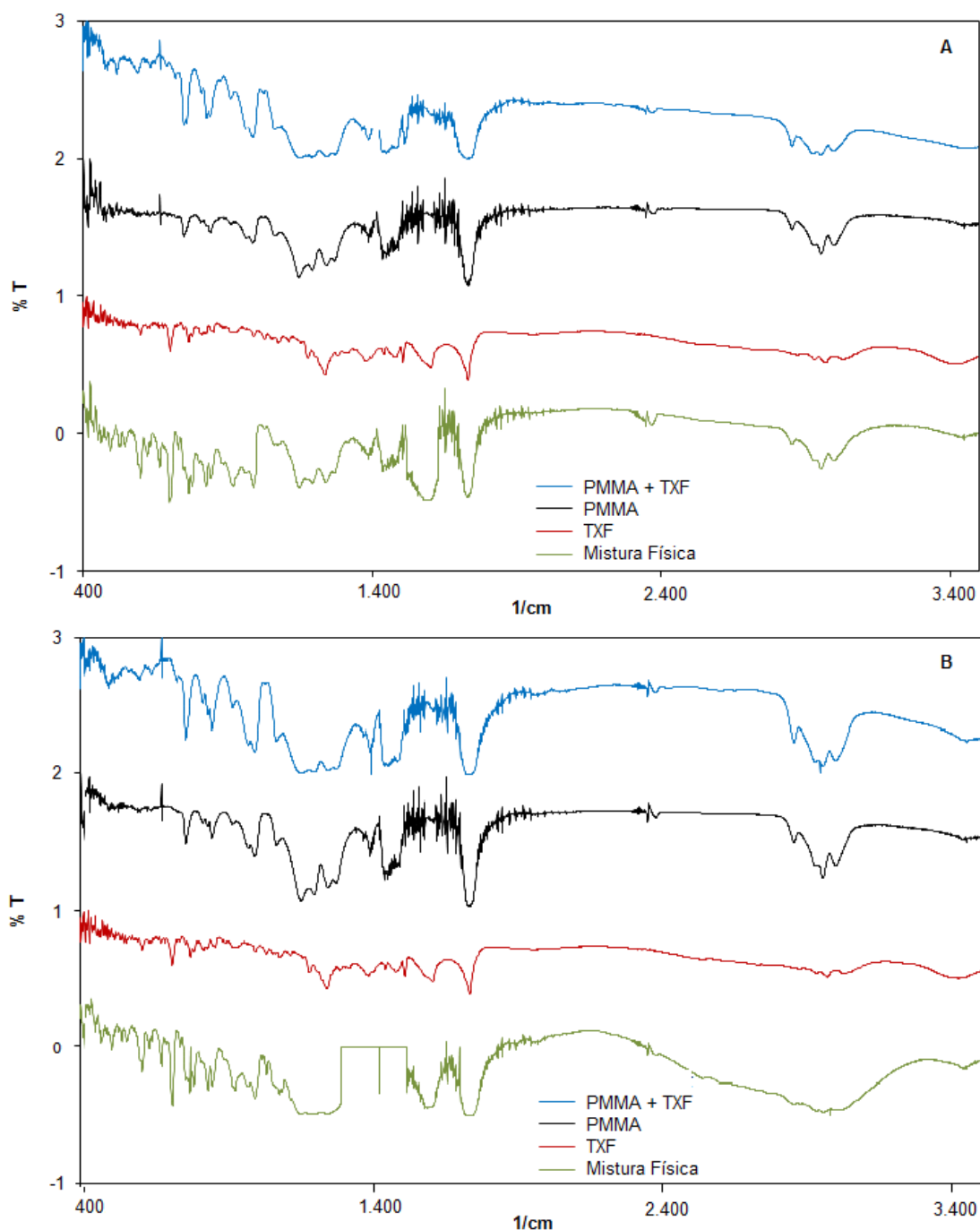


Figura 49. Espectros de infravermelho de amostras de PMMA produzidas por polimerização radicalar convencional (A) e polimerização radicalar controlada (B)

A Figura 50 mostra os termogramas de DSC das NP preparadas pelas técnicas de polimerização radicalar convencional e controlada RAFT na presença e na ausência do fármaco. Esses experimentos foram realizados para definir o estado físico do polímero e do fármaco na

formulação e avaliar a possibilidade de existência de possíveis interações entre o polímero e o fármaco (ESPUELAS *et al.*, 1997).

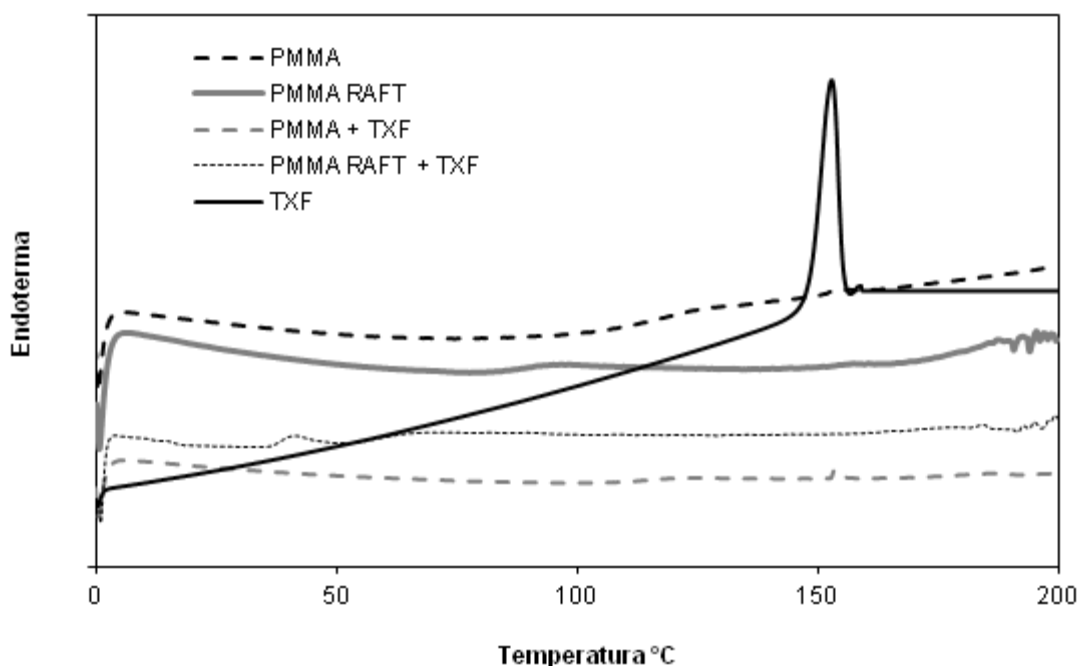


Figura 50. Termograma de DSC referentes a TXF, PMMA produzido por por polimerização radicalar convencional, PMMA produzido por polimerização radicalar controlada, PMMA e TXF produzido por polimerização radicalar convencional, PMMA e TXF produzido por polimerização radicalar controlada.

O termograma da Figura 50 mostra que o TXFc apresenta um pico de fusão endotérmico em 153 °C ($\Delta H_f = 104,06$ J/g), indicando sua natureza cristalina. Esse pico é observado no termograma do fármaco livre (A). O termograma das NP na ausência o fármaco preparadas por polimerização radicalar convencional (B) e controlada (C) não demonstram qualquer evento endotérmico na faixa do TXFc. Porém, o termograma das NP preparadas na presença do fármaco preparadas por polimerização radicalar convencional (D) apresenta um pico pequeno endotérmico em 154 °C ($\Delta H_f = 0,54$ J/g). Isso mostra a ausência de interação entre o fármaco e o polímero e que existe a presença de uma pequena quantidade de fármaco (em função do baixo valor de entalpia de transição) na forma cristalina. Já o termograma das NP na presença do fármaco preparadas por polimerização radicalar controlada (E) não apresenta a transição característica do fármaco, demonstrando que possivelmente o fármaco não está

presente como uma fase distinta, mas como uma solução diluída na matriz polimérica, ou seja, o fármaco está incorporado na matriz polimérica. Porém, é importante levar em consideração que a ausência de eventos endotérmicos no caso do termograma (E) também pode estar relacionada à baixa quantidade de TXFc adicionada à reação ($\approx 0,6\%$ p/p em relação ao polímero).

Contudo, ainda que a análise DSC seja capaz de monitorar e quantificar eventos térmicos ocorridos em uma amostra, ela não revela diretamente as causas deste evento. Para isto, é necessário que as análises por DSC sejam acompanhadas de métodos complementares (BUNJES & UNRUH, 2007).

A quantidade de fármaco presente nas NP foi calculada por duas técnicas: espectrofotometria de ultravioleta, medindo-se a quantidade de fármaco não incluso no látex presente na água de diálise (método indireto) e por cromatografia líquida de alta eficiência, medindo-se a quantidade de fármaco obtido com a dissolução das NP secas (método direto). Os resultados estão apresentados na Tabela 10 e estão expressos em quantidade percentual de fármaco incluso em relação à quantidade total de fármaco adicionado na reação.

Tabela 10. Eficiência de encapsulamento (%) de citrato de tamoxifeno nas NP.

Amostras (n = 3)	UV	CLAE
RM6	49,69 \pm 0,04	18,41 \pm 0,09
RM9	38,74 \pm 0,11	15,45 \pm 0,23

A técnica usada para avaliar a inclusão por UV foi considerada inadequada, uma vez que os espectros obtidos se diferenciavam substancialmente do espectro da substância pura, o que indica que algum componente do látex podia estar presente na água de diálise, causando interferência na faixa de absorção do fármaco. Além disso, esta técnica foi descartada, porque as NP poderiam liberar o fármaco por longo tempo durante o processo da diálise (12 horas), de

maneira que os resultados obtidos não poderiam ser representativos da inclusão, mas sim resultante de um somatório das quantidades de fármaco inclusa e liberada.

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que o fármaco foi encapsulado, mas que a quantidade incluída foi baixa ($\cong 15\%$). Este resultado é insatisfatório e se deve, provavelmente, à migração do fármaco para fase contínua (água), uma vez que sua solubilidade em água aumenta substancialmente com o aumento da temperatura, na temperatura reacional, em relação à solubilidade no monômero (Figura 51).

Devido aos resultados obtidos de eficiência e encapsulamento, às análises de DSC e à possibilidade do fármaco migrar para fase contínua, decidiu-se avaliar a solubilidade do TXF em água e em outros monômeros metacrilatos disponíveis no laboratório, compatíveis com o agente RAFT utilizado, a 25, 60 e 90 °C: metimetacrilato de polietilenoglicol (PEG MMA), metilmetacrilato de dietilenoglicol (DEG MMA), metilmetacrilato de dietilamino (DEAMA) e metilmetacrilato de dimetilamino (DMEAMA) (Figura 51). Esses resultados confirmaram que a solubilidade do fármaco em água a 90 °C (temperatura reacional) é muito maior que no monômero utilizado, o MMA. Além disso, a solubilidade de TXFc em água aumenta muito com o aumento da temperatura, quando comparado com a solubilidade em MMA. Isso pode explicar a solubilização do fármaco no meio aquoso e a baixa eficiência de encapsulamento.

Entre os monômeros avaliados, a 90 °C o fármaco apresentou maior solubilidade no monômero DMEAMA ($\cong 1\text{g/ mL}$). Porém, este monômero é solúvel em água e só poderia ser utilizado na formação de uma miniemulsão inversa. Miniemulsões inversas apresentam baixa estabilidade em relação à miniemulsão normal e utiliza grande quantidade de solvente orgânico como fase contínua, o que não é interessante para constituição de sistemas de liberação de fármacos. Depois do DMEAMA, o monômero que resultou em maior solubilidade do fármaco foi o PEGMMA ($\cong 20\text{ mg/mL}$). Como já mencionado, a presença de PEG em NP poliméricas utilizadas como sistema de liberação de fármacos é particularmente interessante, pois é capaz de criar uma nuvem de cadeias na superfície da partícula, que repele as proteínas plasmáticas presentes no

sangue, aumentando o tempo de circulação substancialmente (BRIGGER *et al.*, 2002). Os resultados sugerem que o meio aquoso seja preparado para reduzir a solubilidade do fármaco na água (com adição de sais, por exemplo) para reduzir a atividade do TXF no meio aquoso e aumentar a eficiência de encapsulamento em MMA. De qualquer forma, dadas as baixas quantidades de TXF requeridas no tratamento, as quantidades encapsuladas não comprometem a aplicação pretendida.

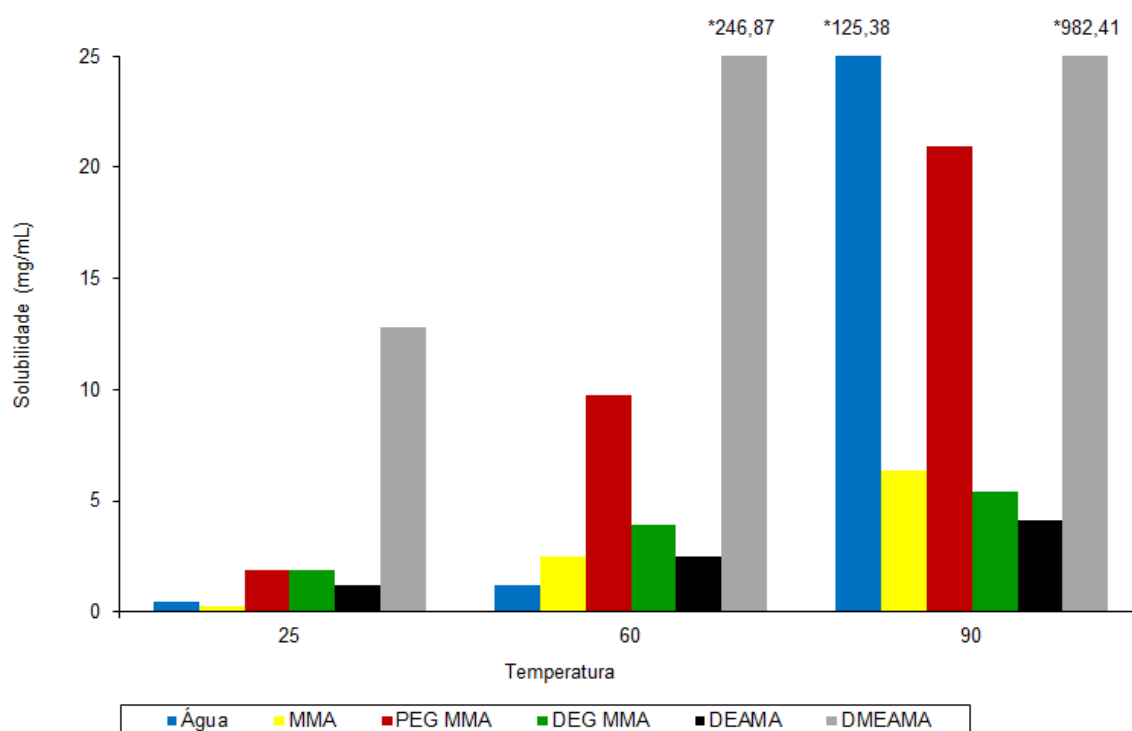


Figura 51. Solubilidade de citrato de tamoxifeno em diferentes meios a 25, 60 e 90 °C.

Para entender melhor os efeitos do TXFc na formação da gota e na estabilidade durante a polimerização em miniemulsão, foram realizados ensaios de tensão interfacial entre o monômero (fase orgânica), na ausência e presença do fármaco, e a água (fase aquosa), na ausência e presença do tensoativo utilizado na receita (LSS 1,25% p/v).

A Figura 52 mostra uma alta e constante tensão interfacial entre o monômero puro e a água pura. Quando o fármaco é adicionado ao sistema, ocorre uma ligeira queda na tensão

interfacial, que logo aumenta até valores próximos aos do monômero puro e se torna constante. A tensão interfacial da gota apenas diminui substancialmente quando um “estabilizante” (LSS) é adicionado, tanto na presença quanto na ausência do fármaco. Esses dados estão de acordo com os dados de solubilidade, sendo possível admitir que a migração do fármaco para a fase contínua da miniemulsão, já que a adição do fármaco é capaz de mudar inicialmente a tensão interfacial entre o monômero e a água, mostrando que o fármaco exerce atividade superficial. Porém, ao migrar para fase aquosa, a tensão interfacial se aproxima àquela obtida com o monômero puro. Esse fato, provavelmente, explica a baixa eficiência de encapsulamento.

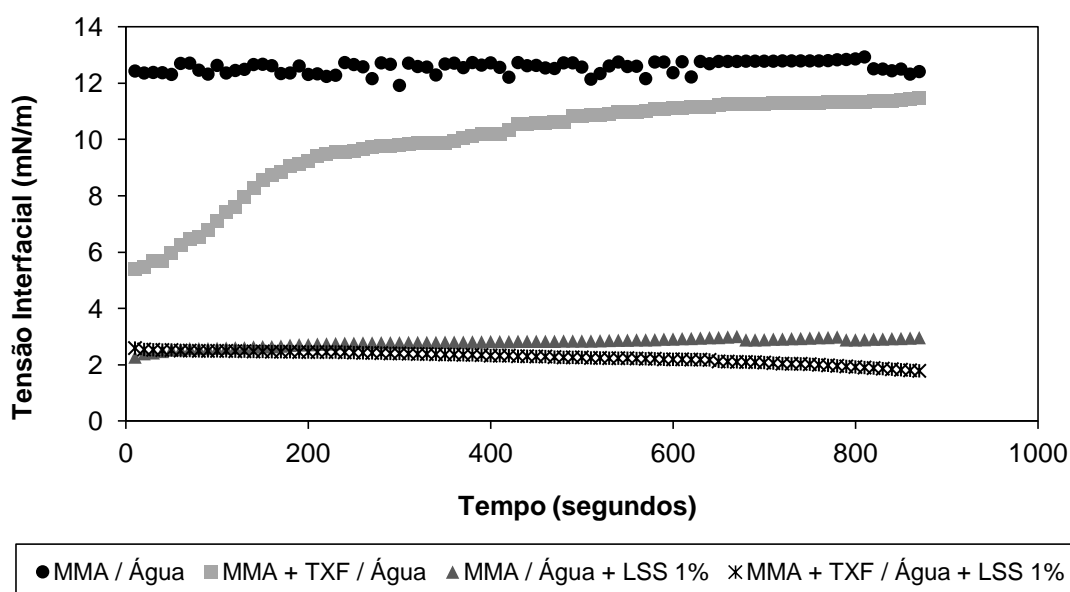


Figura 52. Análise de tensão interfacial de MMA em água, mistura de MMA e Citrato de tamoxifeno em água, mistura de MMA em água e LSS 1,0% e mistura MMA e Citrato de tamoxifeno em água e LSS 1,0%.

Esse conjunto de resultados mostra que o fármaco na forma de sal de citrato, na temperatura reacional, tem maior afinidade pela fase contínua (água) do que pela fase dispersa (MMA), contribuindo para a baixa eficiência de incorporação do fármaco na matriz polimérica. Contudo, como já explicado, esse fato não compromete a aplicação pretendida.

5.2.3. REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO COM TAMOXIFENO BASE *IN SITU* E PERÓXIDO DE BENZOILA

Com base nos resultados obtidos, resolveu-se trabalhar com o fármaco na forma de base livre (TXFb). Para isso, a matéria prima adquirida na forma de sal de citrato foi solubilizada em água sob aquecimento e um excesso de NaOH foi adicionado em relação à quantidade de moléculas de citrato presentes, com o objetivo de liberar a base de TXF. O precipitado obtido foi centrifugado, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado 3 vezes com água. O precipitado então foi dissolvido em clorofórmio e evaporado em rotaevaporador a 70 °C.

O rendimento em massa deste procedimento foi de 89,6% e o teor obtido de TXFb foi de $98,96 \pm 0,16$ % (N = 6). O teor foi obtido a partir do método de CLAE utilizado para determinação da eficiência de incorporação do fármaco na nanopartícula, quando usada a SQR de TXFc. As devidas correções de cálculo foram realizadas, já que o padrão utilizado era apresentado na forma de sal.

Foi realizado também ensaio de ponto de fusão. O ponto de fusão definido é uma característica de substâncias puras. Dessa forma, essa medida foi utilizada como um valioso critério de pureza. A presença de impurezas, mesmo em pequena quantidade na amostra produz considerável aumento no intervalo de fusão (CONSTANTINO *et al.*, 2004). O ponto de fusão observado foi de 95,6 °C; ou seja, próximo do que determina a literatura 96-98 °C (USP 37, 2014).

Assim como foi realizado para a forma de sal de citrato, também foi analisada a solubilidade do fármaco na forma de base livre, para avaliar a quantidade de fármaco que poderia ser adicionado às reações, sem haver precipitação do mesmo. Para isso, foi analisada a solubilidade do fármaco no monômero a 25, 60 e 90 °C. Os resultados observados estão mostrado na Figura 53.

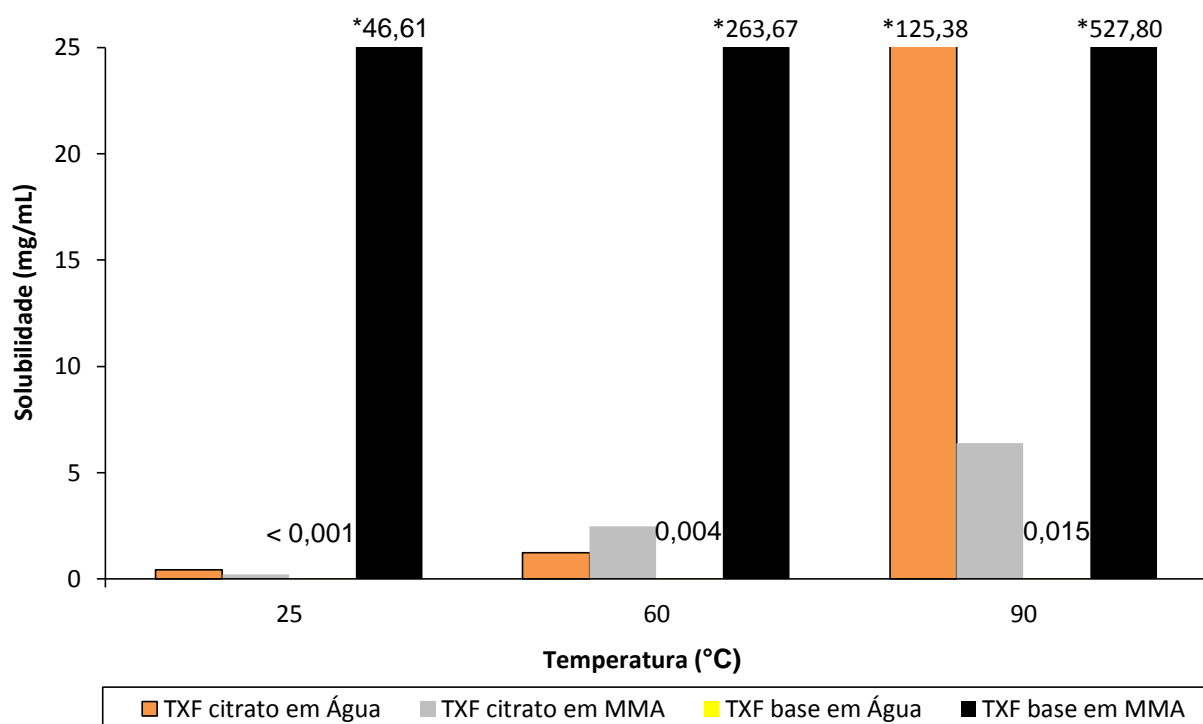


Figura 53. Solubilidade de tamoxifeno base em MMA e água a 25, 60 e 90 °C.

Os resultados confirmam que a solubilidade do fármaco na forma de base livre é muito maior no monômero utilizado, o MMA, em relação à água, fase contínua. Além disso, a solubilidade de TXFb em MMA aumenta muito com o aumento da temperatura, quando comparado com a solubilidade em água. Esses resultados sugerem que o fármaco na forma de base livre tem maior chance de ficar disperso na matriz polimérica e, por isso, ser incorporado com maior eficiência na mesma.

Dessa forma, foram inicialmente realizadas reações foram nas mesmas condições e concentrações do fármaco utilizadas anteriormente, usando o fármaco, na forma de base livre no monômero. Observou-se que na concentração de cerca de 0,6% (p/p) o TXFb não afetou a distribuição de massas molares, a distribuição dos tamanhos médios de partícula, a conversão e o índice de polidispersão, tanto para as reações de polimerização radicalar convencional (**RM12**) quanto para a reação radicalar controlada na presença do agente RAFT (**RM13**), quando comparadas com as reações na presença do sal de citrato (**RM8** e **RM9**)(Figuras 54 à 58).

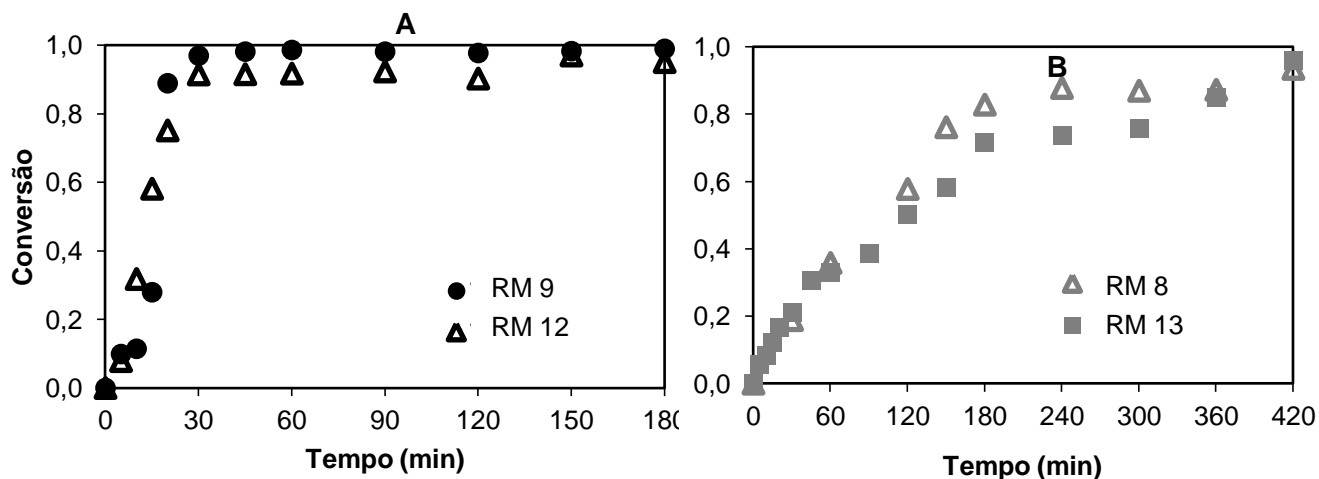


Figura 54. Evolução da conversão nas reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença de tamoxifeno na forma de sal de citrato e de base livre.

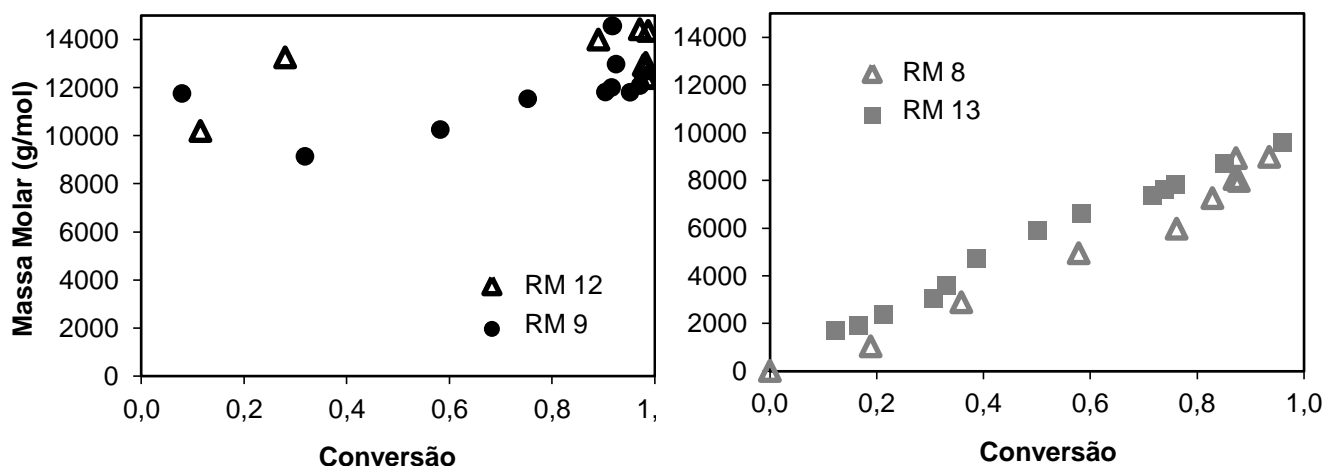


Figura 55. Variação da massa molar média com a conversão para as reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença de tamoxifeno na forma de sal de citrato e de base livre.

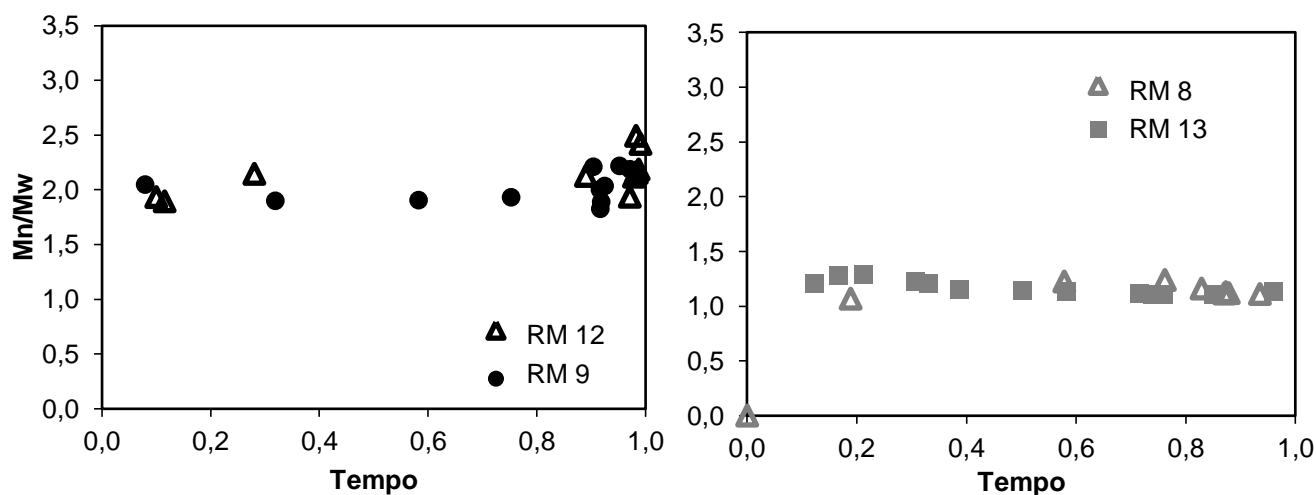


Figura 56. Variação do índice de polidispersão com a conversão para as reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença de tamoxifeno na forma de sal de citrato e de base livre.

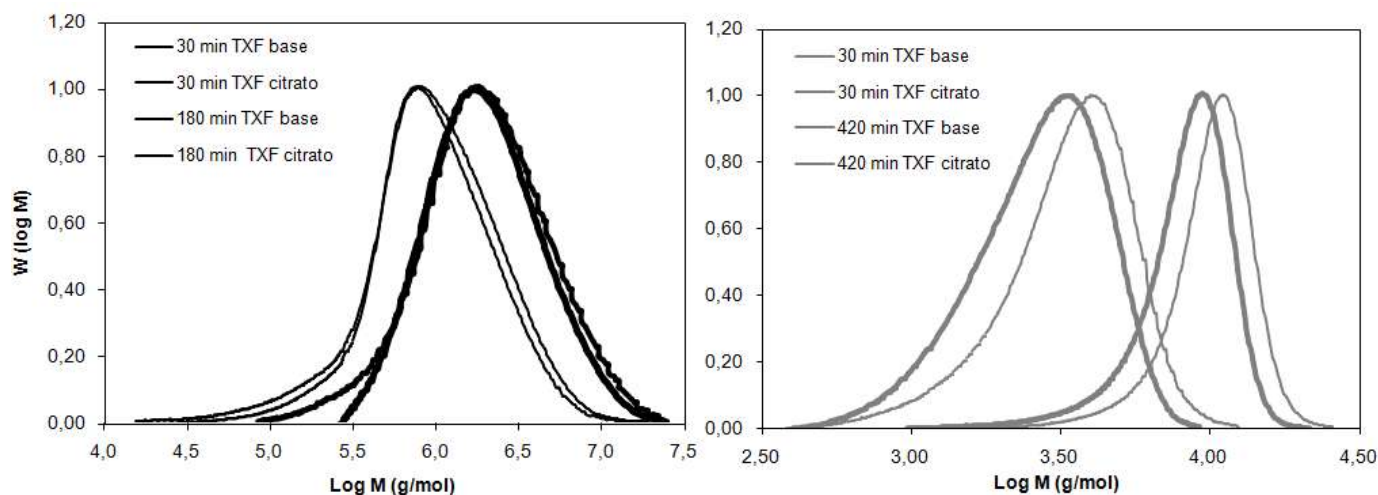


Figura 57. Distribuições de massa molares para os produtos das reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença de tamoxifeno na forma de sal de citrato e de base livre. Dados gerados a partir de análises de GPC dos produtos de reação de polimerização de MMA radicalar convencional e radicalar controlada RAFT em miniemulsão na presença de tamoxifeno na forma de sal de citrato e de base livre.

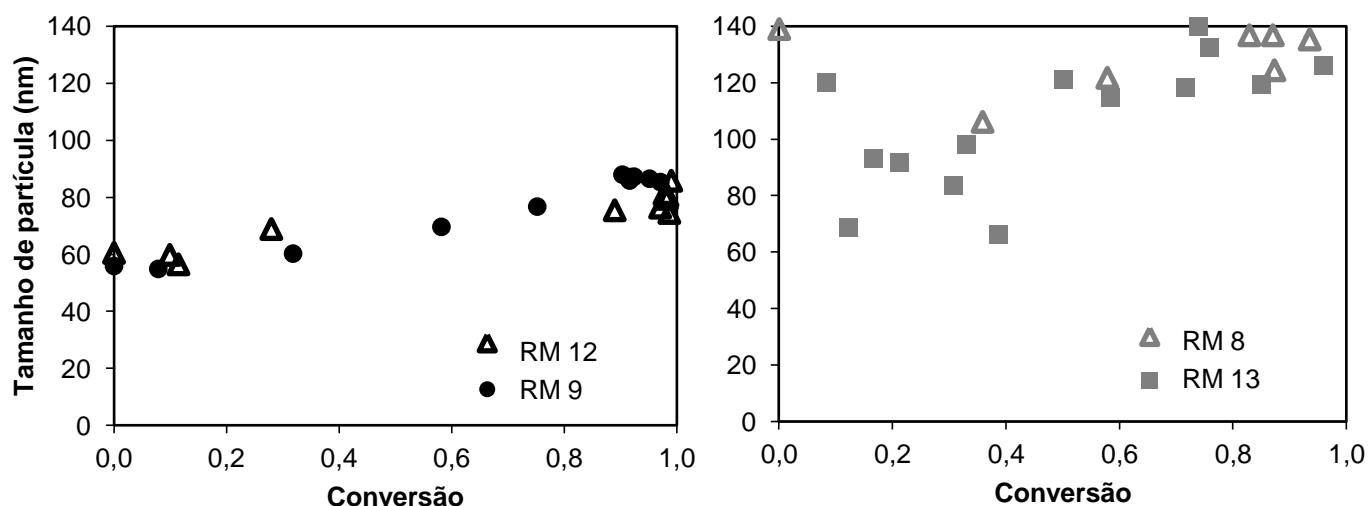


Figura 58. Variação do tamanho de partícula com a conversão para as reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença de tamoxifeno na forma de sal de citrato e de base livre.

Como o fármaco apresentou alta solubilidade no monômero na temperatura reacional (90 °C), foram testadas concentrações maiores de fármaco (TXFb) em relação ao monômero: 2,5% (RM14), 5,0% (RM15) e 20,0% (RM16) p/p. Porém, utilizando concentrações maiores de TXFb em reações de polimerização em miniemulsão convencional nas mesmas condições da reação RM12 observou-se a inibição pronunciada da formação do polímero. Concentrações de

TXFb maiores que 0,6% p/p em relação ao monômero promoveram a instabilização da emulsão, separação das fases da reação (Figura 59), conseqüentemente, inibindo a reação (Figura 60)

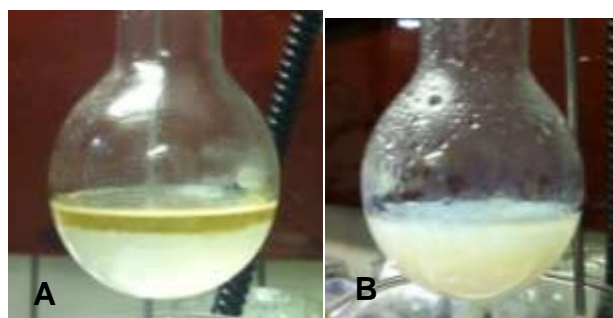


Figura 59. Reação de polimerização radicalar convencional em miniemulsão na presença de 20,0% (A - RM16) e 5,0% (B - RM15) a 90 °C, na presença de peróxido de benzoíla como iniciador.

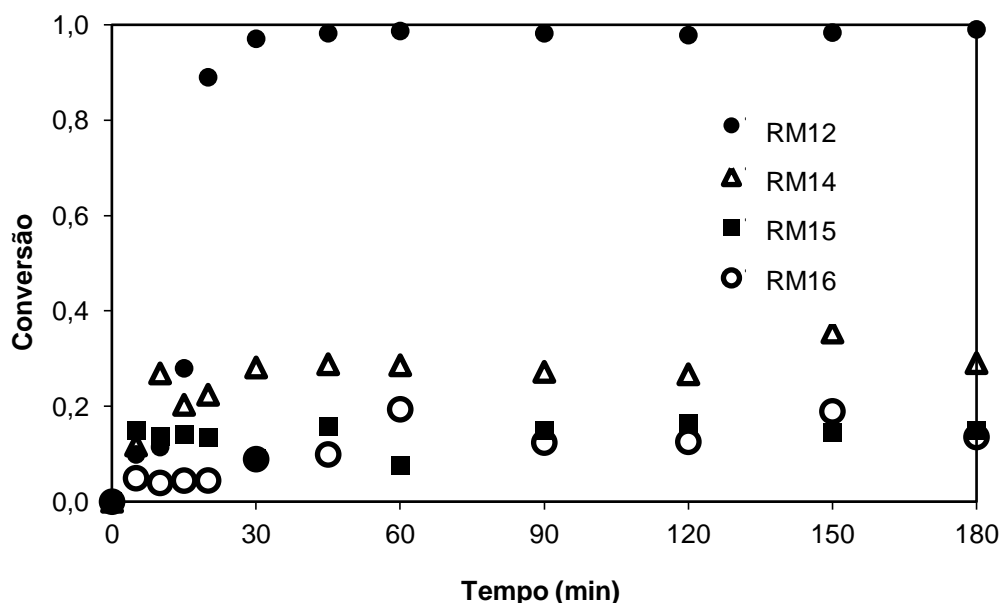


Figura 60. Evolução da conversão nas reações de polimerização em miniemulsão radicalar convencional na presença de concentrações crescentes de tamoxifeno base 2,5% (RM14), 5,0% (RM15) e 20,0% (RM16).

O exame da estrutura química do TXF (Figura 1, página 9) não mostra a presença de fortes grupos inibidores, uma vez que não há nenhum grupo que doe facilmente um átomo de hidrogênio para um radical livre. Porém, o TXF já mostrou promoção de efeitos antioxidantes: inibição da peroxidação de lipídios em microsomas de fígado de rato e em fosfolipídeos de lipossomas, (WISEMAN *et al.*, 1990), neuroproteção no caso de lesão cerebral (ZHANG *et al.*,

2007) e lesão de medula espinhal (MOSQUERA *et al.*, 2014). A presença de átomos de oxigênio e nitrogênio na molécula pode promover a estabilização de estruturas radicalares, como já explicado.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 59, as reações realizadas com 2,5%, 5,0% e 20,0% (p/p) de TXFb em relação ao monômero foram muito mais lentas e não evoluíram, não resultando em conversão apreciável do monômero em polímero. Isto pode ser explicado pela possível ação antioxidante do TXFb, que pode estabilizar os radicais formados pela degradação do iniciador PBO. Do ponto de vista prático, esses resultados parecem limitar os teores de TXFb a cerca de 1% da massa de polímero, o que é suficiente para as aplicações pretendidas.

5.2.4. REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO EM MASSA COM TAMOXIFENO BASE *IN SITU* E PERÓXIDO DE BENZOÍLA OU AIBN

Para investigar o motivo pelo qual a reação não evoluía com aumento da concentração de TXFb na presença de PBO como iniciador, foram realizadas reações de polimerização em massa com 2,5% e 5,0% (p/p) de TXFb em relação ao monômero (MMA) na presença de concentrações crescentes de PBO e AIBN como iniciadores. Foram testadas concentrações de monômero e iniciador nas relações molares de 200:1, 200:2, 200:3 e 200:4 na temperatura de 80 °C. A Tabela 11 mostra os valores de conversão atingidos.

Tabela 11. Conversões atingidas nas reações de polimerização em massa de metacrilato de metila na presença de tamoxifeno base e PBO ou AIBN como iniciadores

Iniciador	PBO	AIBN	PBO	AIBN
Mn:I	2,5% (p/p) TXF base ^a		5,0% (p/p) TXF base ^a	
200:1	4,35	63,07	7,22	98,55
200:2	7,84	76,10	9,32	97,87
200:3	11,00	79,24	11,55	98,05
200:4	75,65	99,94	12,54	95,52

^a Em relação ao monômero

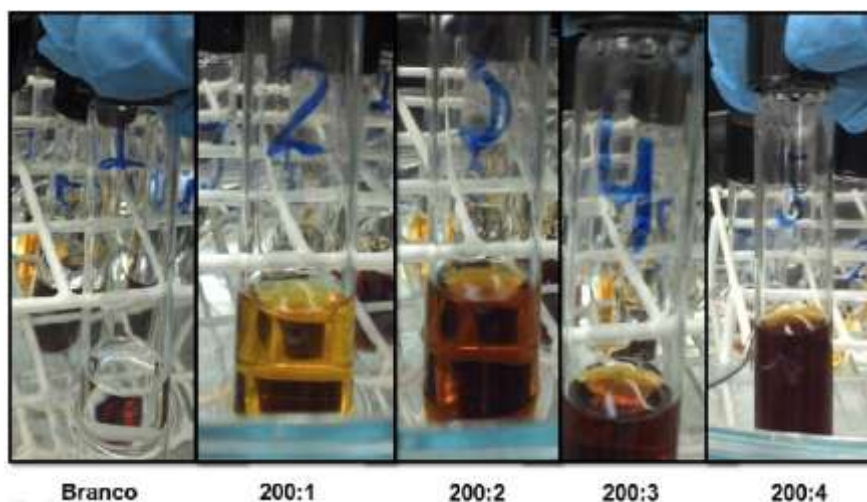


Figura 61. Aparência do polímero obtido nas reações de polimerização em massa de metacrilato de metila na presença de 5,0% (p/p) de tamoxifeno base e PBO como iniciador.

De acordo com a Tabela 11 e a Figura 61, foi observado que o PBO parece reagir com o fármaco, de maneira que a reação só gera conversão apreciável com altas concentrações de PBO presentes no meio. Parece que todo fármaco deve reagir com o PBO presente e o PBO restante possa participar da reação de polimerização. Sendo assim, optou-se pela utilização de AIBN como iniciador, já que esse iniciador não parece induzir o efeito inibitório do TXF observado anteriormente.

A Figura 61 ainda mostra que a presença de TXFb em altas concentrações promove o mesmo efeito visual similar ao da hidroquinona quando presente na reação de polimerização, ou seja, de escurecimento. A hidroquinona é conhecida por interromper as reações de polimerização via radical livre e adquirir coloração castanha com o ar e com os radicais livres por oxidar-se a p-benzoquinona (ODIAN, 2004). É possível que efeito similar ocorra com o TXF. A razão desse efeito não ser observado ainda é desconhecida

5.2.5. REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO COM TAMOXIFENO BASE *IN SITU* E AIBN

Devido aos resultados insatisfatórios obtidos com PBO como iniciador, optou-se em prosseguir o trabalho usando AIBN como iniciador. Como este iniciador apresenta taxas de ativação maiores em temperaturas menores, foram realizadas inicialmente reações de polimerização via radical livre convencional em miniemulsão com AIBN na proporção monômero:iniciador de 400:1 (**RM17**) e 200:1 (**RM18**) a 70°C, para avaliar a viabilidade da reação e da formação das NP (Figura 62) na ausência e presença (**RM19** e **RM20**) de 10,0% (p/p) de TXFb em relação ao monômero. Esta concentração foi escolhida respeitando a solubilidade do fármaco no monômero na temperatura reacional e considerando ainda que o fármaco resultasse em 100% de inclusão. Assim, em cada 1 mL de látex contendo NP com TXF haveria uma dose de 20 mg de fármaco, dose usual de 1 comprimido via oral comercializado.

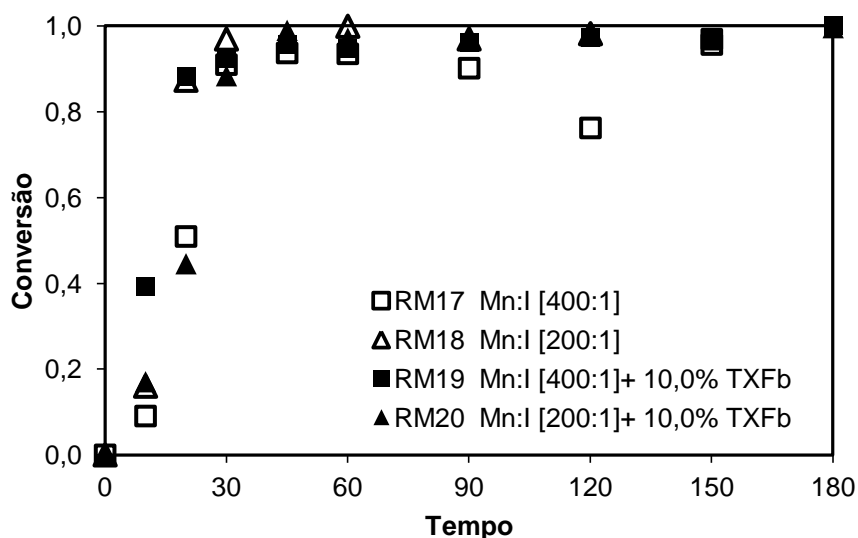


Figura 62. Evolução da conversão nas reações de polimerização em miniemulsão radicalar convencional na presença AIBN como iniciador nas proporções monômero:iniciador 400:1 (RM17 e RM19), 200:1 (RM18 e RM20) e na presença de 10,0% (p/p) de TXFb em relação ao monômero.

Observou-se que tanto na proporção monômero: iniciador 400:1, quanto 200:1 a 70°C, na presença ou ausência de 10,0% de TXFb, atingia-se 100% de conversão em 60 minutos de reação. Ou seja, a presença de 10,0% (p/p) do fármaco em relação ao monômero não afetou a

viabilidade da reação. Dessa forma, a reação foi reproduzida de maneira idêntica, usando inicialmente a maior proporção monômero:iniciador (200:1) na presença do agente RAFT na proporção RAFT:Monômero 100:1 na ausência de fármaco (RM21). A Figura 63A apresenta a evolução da conversão nessa reação.

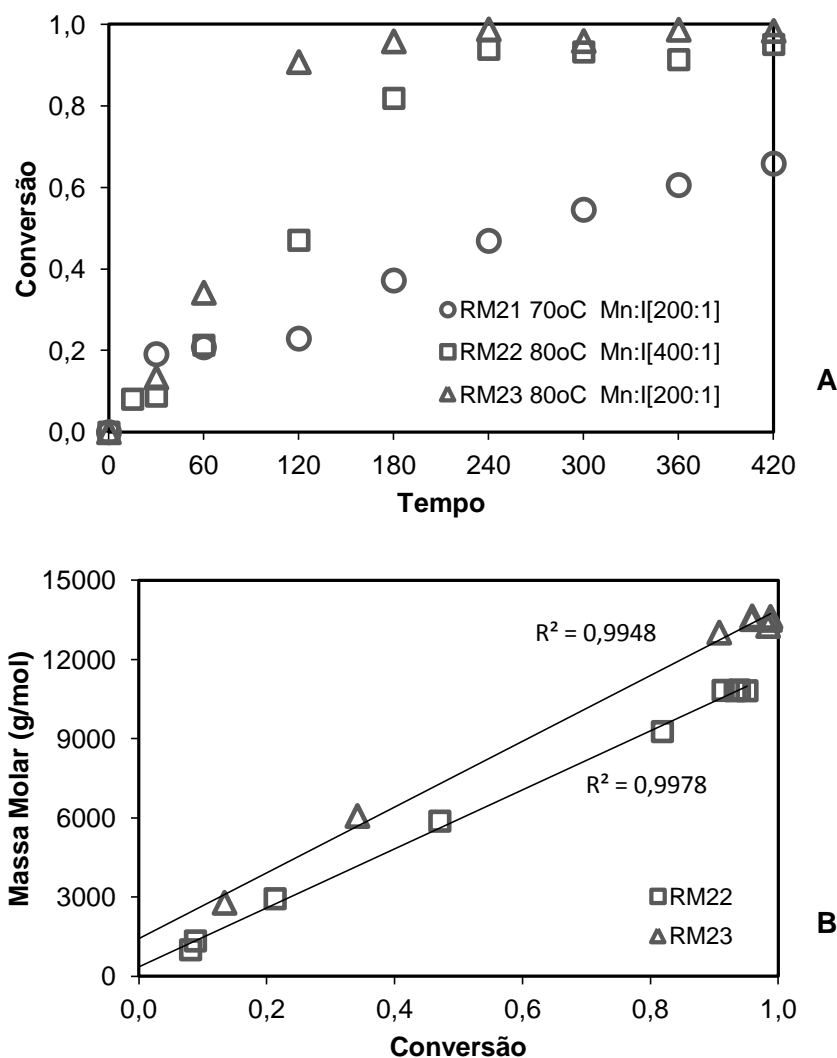


Figura 63. (A) Evolução da conversão nas reações de polimerização em miniemulsão radicalar controlada RAFT na presença AIBN como iniciador nas proporções monômero:iniciador 200:1 a 70 °C e 200:1 e 400: 1 a 80 °C. (B) Variação de massa molar média como função da conversão nas reações de polimerização em miniemulsão radicalar controlada RAFT na presença AIBN como iniciador nas proporções monômero:iniciador de 200:1 e 400: 1 a 80 °C.

Observou-se que após 7 horas de reação, era atingido apenas cerca de 68% de conversão para reação **RM21**. Por isso, com intuito de promover o aumento da conversão, foram realizadas novas reações via radical livre em miniemulsão na presença de agente RAFT, com aumento da temperatura reacional para 80 °C. Foram testados nesta condição duas proporções de monômero:iniciador: 400:1 (**RM22**) e 200:1 (**RM23**). Os dados de conversão como função do tempo e distribuição de massa molar média como função da conversão destas reações estão mostradas na Figura 63A e 63B, respectivamente.

Os dados de conversão mostraram que as reações **RM22** e **RM23** atingiam 100% de conversão perto de 4 horas de reação. A reação **RM22** apresentou uma cinética relativamente mais lenta quando, comparada com a reação **RM23**, provavelmente devido a menos concentração de iniciador em relação à concentração de monômero presente.

O crescimento da massa molar em relação à conversão está apresentado na Figura 63B e apresenta comportamento linear. Realizando a regressão linear dos pontos obtidos, chega-se aos valores de coeficiente de correlação de 0,997 para **RM22** e 0,994 para **RM23**, ou seja, próximos de 1,00, como esperado em polimerizações controladas. Além disso, valores de massa molar (g/mol) obtidos com a reação ficaram próximos dos valores esperados para a conversão obtida (cálculo realizado com auxílio da equação 1, considerando a massa pesada de monômero para a reação).

Como que a reação **RM22** utilizou uma menor quantidade de iniciador, atingiu 100% de conversão e apresentou relação linear entre o crescimento da massa molar e da conversão, efeito esperado para reações radiculares controladas mediadas por agentes RAFT, esta condição foi escolhida como referência para conduzir a síntese de NP carregadas com TXFb (Figuras 64-69).

As reações de polimerização em miniemulsão de metacrilato de metila via radical livre controlada do tipo RAFT a 80 °C, com a proporção monômero:iniciador 400:1 foram chamadas de **RM22** na ausência e de **RM24** na presença de 10,0% (p/p) de TXFb em relação ao monômero. As

reações de polimerização em miniemulsão de metacrilato de metila via radical livre convencional foram realizadas das mesmas condições, porém na ausência de um agente RAFT, foram chamadas de **RM25** na ausência e de **RM26** na presença de 10,0% (p/p) de TXFb em relação ao monômero.

A partir dos dados obtidos pode-se observar que a presença de 10,0% (p/p) de TXFb em relação ao monômero não afeta significativamente a cinética da reação (Figura 64), a distribuição de massas molares (Figuras 65, 66 e 68), o índice de polidispersão (Figura 67) nem o tamanho de partícula das nanopartículas (Figura 69) obtidas tanto nas reações de polimerização em miniemulsão via radical livre convencional quanto nas reações de polimerização em miniemulsão via radical livre controlada RAFT. Isso pode indicar que o TXF na forma polar é responsável pelos efeitos de inibição observados na seção anterior.

As distribuições de massas molares são apresentados na Figura 68 e apresentam aspecto monomodais. Para as polimerizações realizadas na presença do agente RAFT (Figura 68B) observa-se o deslocamento das curvas para valores de maior massa molar, à medida que ocorre o aumento da conversão. Este fato é consistente com um processo de polimerização radicalar controlada. Este fenômeno, no entanto, não é observado nas reações de polimerização radicalar convencional (Figura 68A), em que pode ser observada a sobreposição das curvas de distribuição de massas molares em diferentes níveis de conversão: neste tipo de reação, as massas molares formadas no início da reação são altas e tendem a diminuir com a depleção do monômero.

Pode-se concluir a partir da Figura 65B que o crescimento da massa molar foi linear. Além disso, valores de massa molar (g/mol) experimentais ficaram muito próximos dos valores calculados para a conversão obtida (Figura 65B). Além disso, a variação dos valores do índice de polidispersão ao longo da reação se apresentaram sempre próximos a 1,1 (67B). Todos esses resultados confirmam a condução eficiente das reações de polimerização radicalares na presença de TXFb.

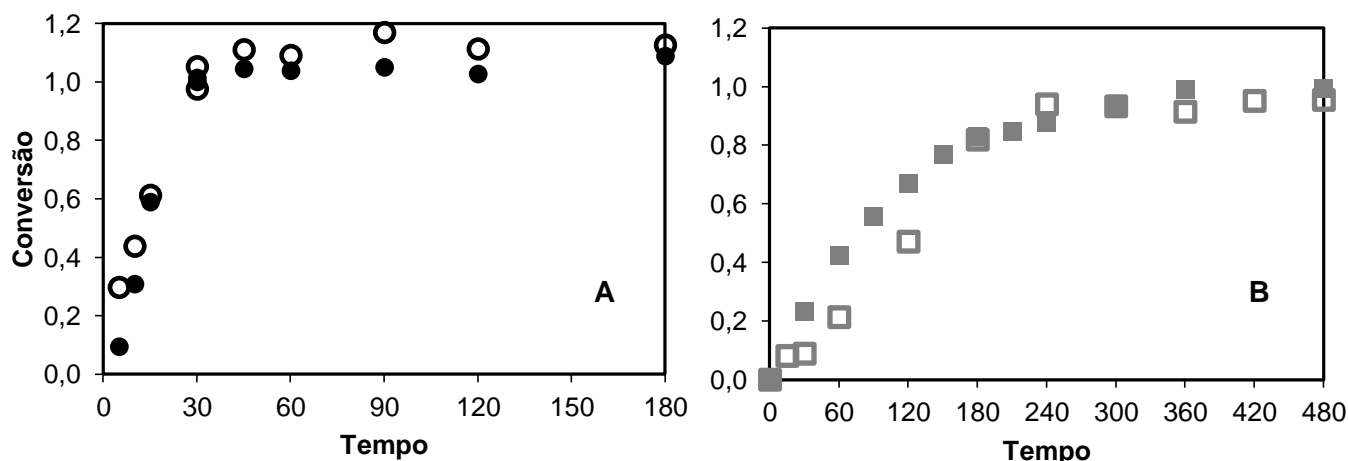


Figura 64. Evolução da conversão nasas reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) presença (marcador cheio) e ausência (marcador vazio) de 10,0% (p/p) de tamoxifeno base, em relação ao monômero e AIBN na proporção monômero:iniciador 400:1 a 80°C

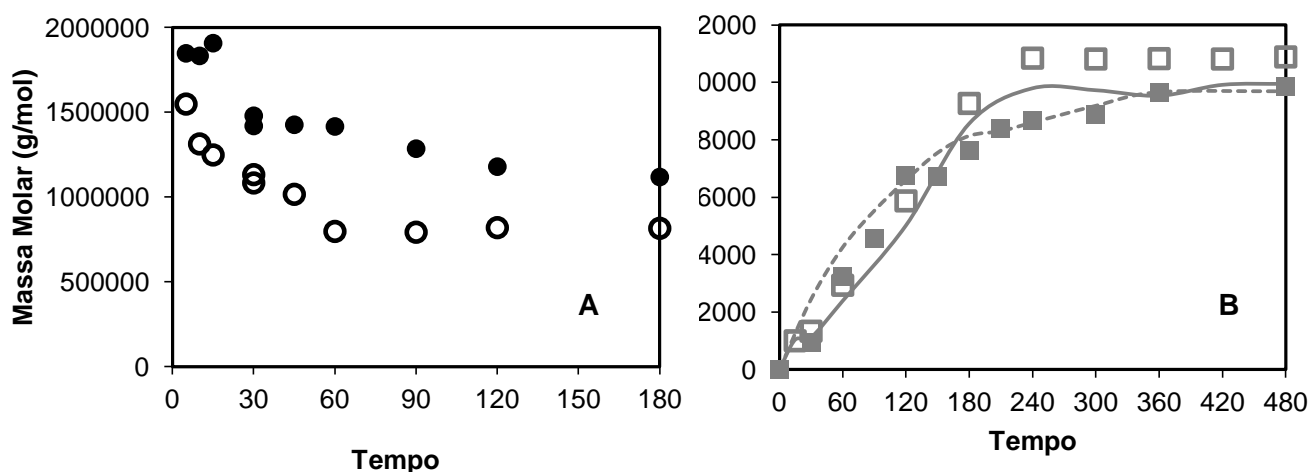


Figura 65. Variação da massa molar média com o tempo para as reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença (marcador cheio) e ausência (marcador vazio) de 10,0% (p/p) de tamoxifeno base, em relação ao monômero e AIBN na proporção monômero:iniciador 400:1 a 80°C

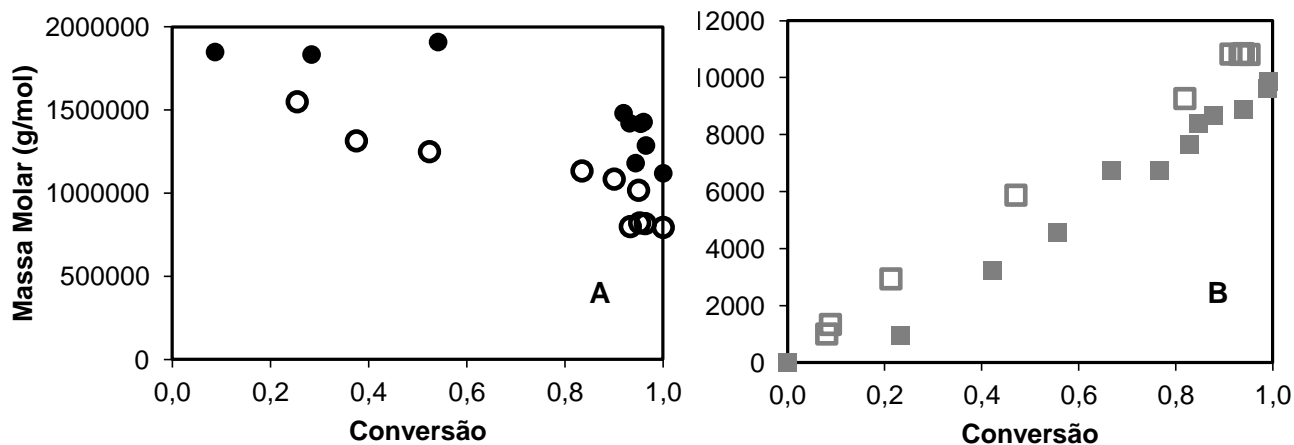


Figura 66. Variação da massa molar médiacom a conversão para as reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença (marcador cheio) e ausência (marcador vazio) de 10,0% (p/p) de tamoxifeno base, em relação ao monômero e AIBN na proporção monômero:iniciador 400:1 a 80°C

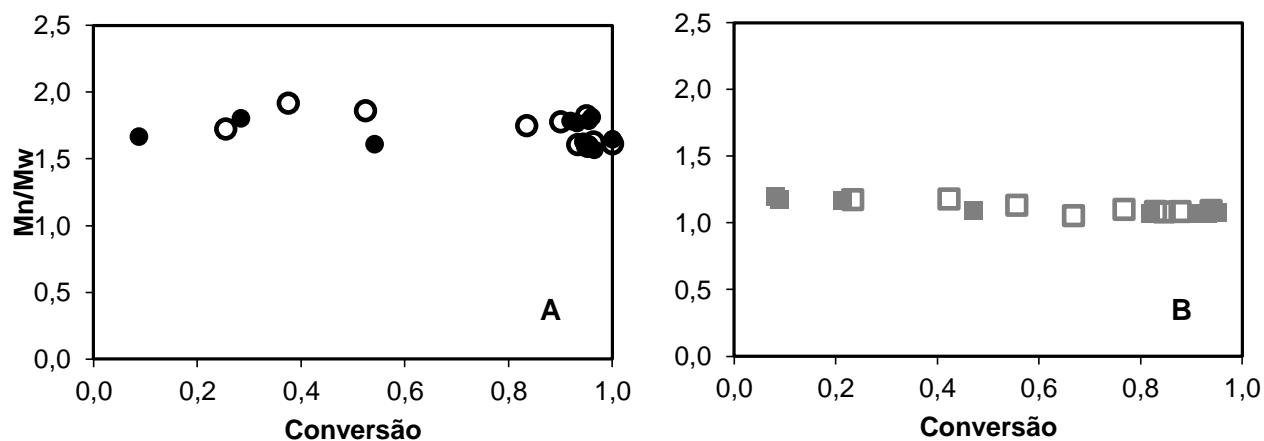


Figura 67. Variação do índice de polidispersão com a conversão para as reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença (marcador cheio) e ausência (marcador vazio) de 10,0% (p/p) de tamoxifeno base, em relação ao monômero e AIBN na proporção monômero:iniciador 400:1 a 80°C

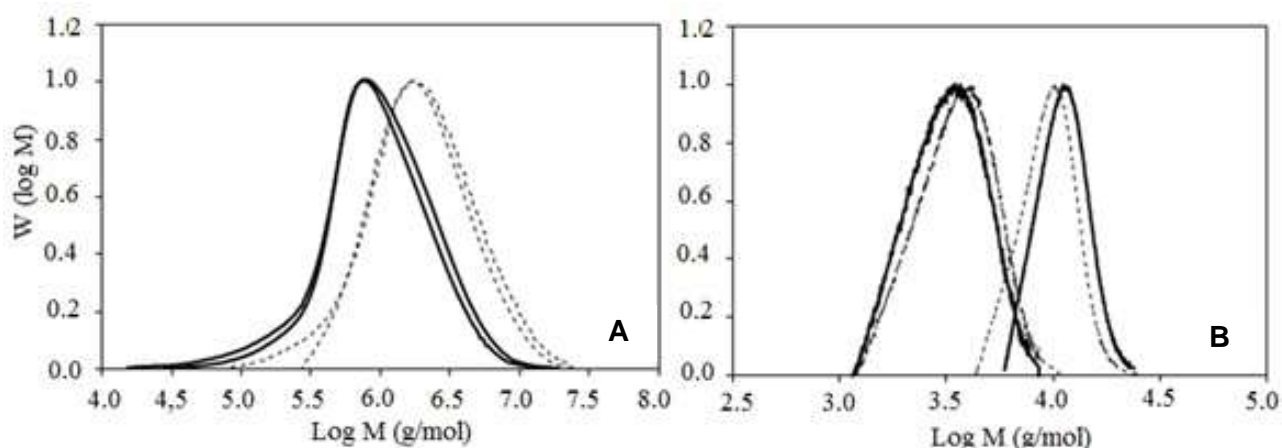


Figura 68. Distribuição de massas molares nas reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença (linha cheia) e ausência (linha vazia) de 10,0% (p/p) de tamoxifeno base, em relação ao monômero e AIBN na proporção monômero:iniciador 400:1 a 80°C

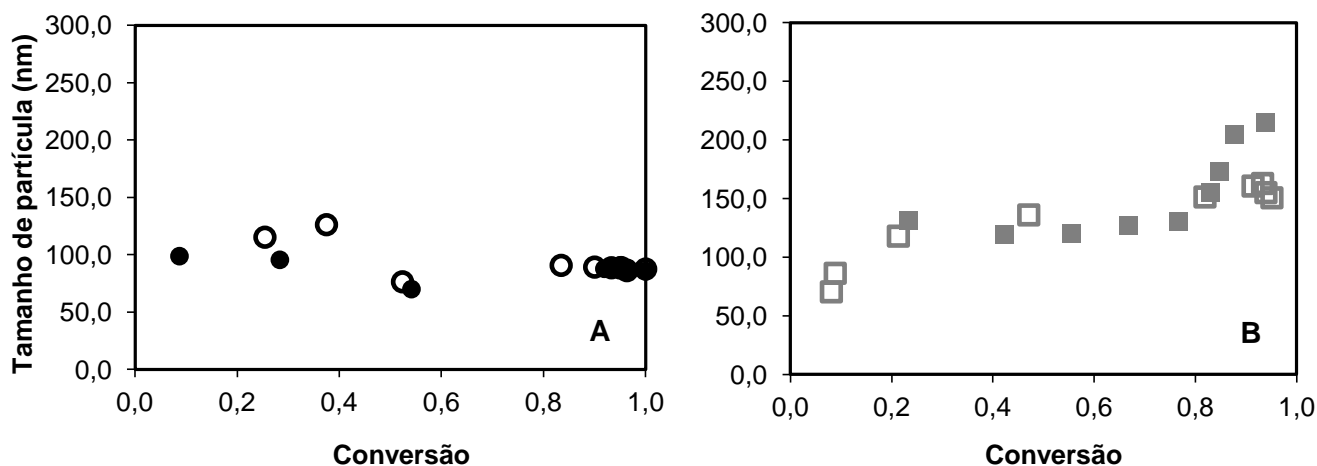


Figura 69. Variação dos tamanhos de partícula médios com a conversão para reações de polimerização radicalar convencional e controlada RAFT na presença (marcador cheio) e ausência (marcador vazio) de 10,0% (p/p) de tamoxifeno base, em relação ao monômero e AIBN na proporção monômero:iniciador 400:1 a 80°C

Por fim, as distribuições finais de tamanho de partícula representativa são apresentadas na Figura 70. Observando os resultados, pode-se inferir que a reação de polimerização radicalar convencional gerou partículas em torno de 80 nm, ao mesmo tempo em que a reação de polimerização radicalar controlada gerou partículas em torno de 120 nm. Ambas as técnicas de polimerização apresentaram índices de polidispersão baixos e distribuição unimodal, o que mostra que a técnica de homogeneização empregada foi satisfatória e que a faixa de distribuição de tamanho de partícula é estreita, o que pode proporcionar uma liberação mais uniforme no caso da utilização das NP como sistemas de liberação de fármacos (HUSSAIN *et al.*, 2001). Esse resultado mais uma vez é muito similar aos observados anteriormente, o que sugere novamente que o agente RAFT afeta a atividade da interface, o que precisa ser melhor caracterizado.

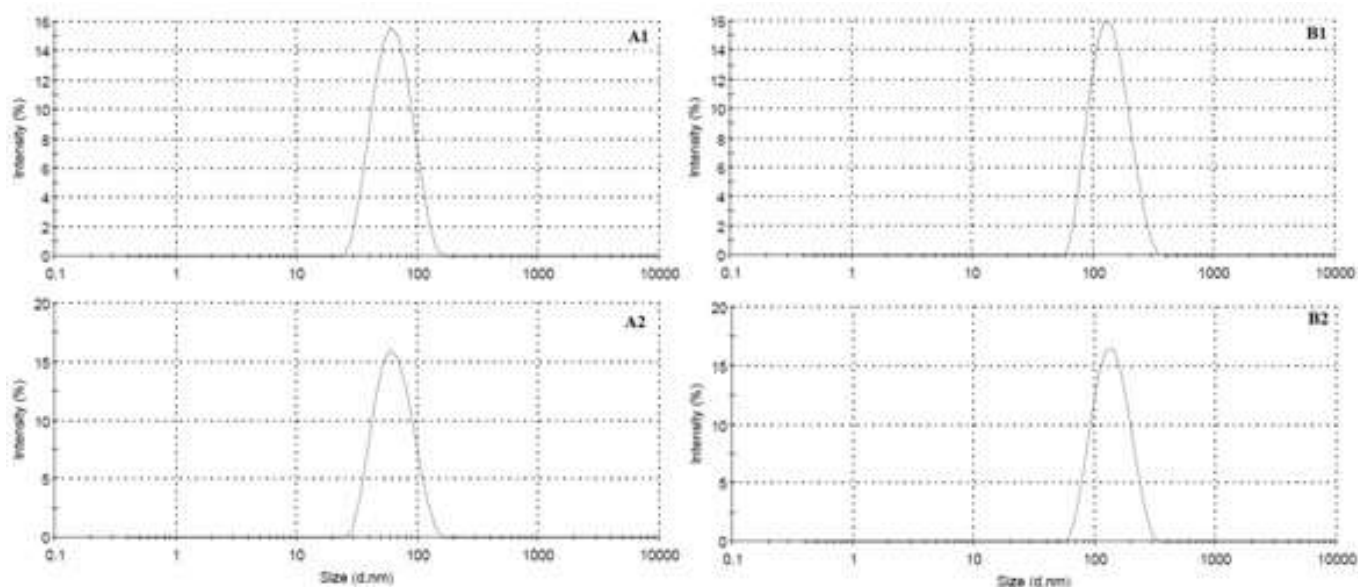


Figura 70. Curva de distribuição do tamanho de partícula para as reações de polimerização radicalar convencional (A) e controlada RAFT (B) na presença (A2 e B2) e ausência (A1 e B1) de 10,0% (p/p) de tamoxifeno base, em relação ao monômero e AIBN na proporção monômero:iniciador 400:1 a 80°C

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma das técnicas de escolha empregadas para obtenção de informações relativas à forma, e ao tamanho de NP e micropartículas. (MOSQUEIRA *et al.*, 2000; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

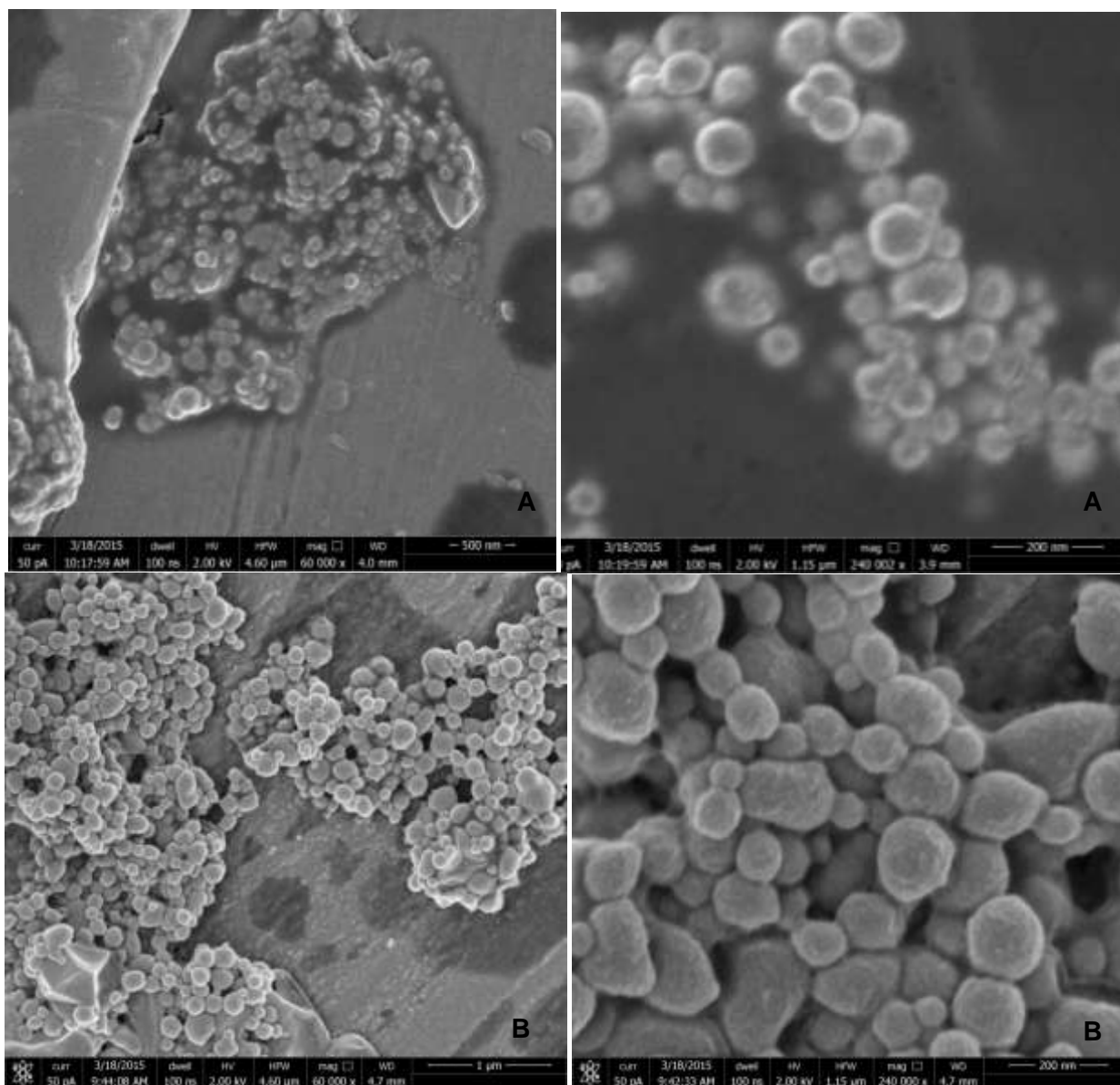


Figura 71. Micrografias das NP contendo 10,0% (p/p) de tamoxifeno base e produzidas por reações de polimerização em miniemulsão via radical livre convencional (A) e reações de polimerização em miniemulsão via radical livre controlada RAFT (B).

A Figura 71 apresenta a micrografias das NP contendo 10,0% (p/p) de TXFb produzidas por reações de polimerização em miniemulsão via radical livre convencional (A) e reações de polimerização em miniemulsão via radical livre controlada RAFT (B). A Figura 71

mostra que as NP obtidas possuem forma esferoidal e os tamanhos das partículas observados por microscopia estão de acordo com os medidos pela técnica de DLS.

A interação fármaco-polímero foi avaliada por DSC. As curvas estão apresentadas na Figura 72.

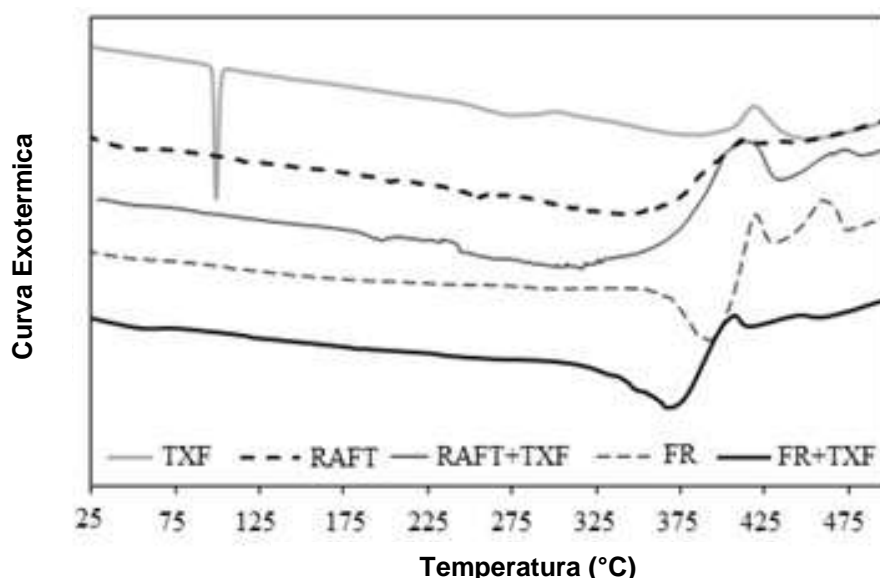


Figura 72. Termogramas de DSC referentes a tamoxifeno base livre, NP de PMMA produzidas com RAFT (reação **RM22**), NP de PMMA produzidas com RAFT na presença de TXFb (reação **RM24**), NP de PMMA (reação **RM25**) e NP de PMMA na presença de TXFb (reação **RM26**)

O termograma da Figura 72 mostra que TXFb livre apresenta um pico endotérmico em 97,61 °C, indicando sua natureza cristalina. Esse pico não é observado em qualquer outro termograma apresentado. Isso mostra que o fármaco existe como uma solução diluída na matriz polimérica, ou seja, o fármaco está incorporado na matriz polimérica e não disperso na forma de cristais de TXFb.

A quantidade de fármaco nas NP foi medida por cromatografia líquida de alta eficiência, medindo-se a quantidade de fármaco incluso pela solubilização das NP secas (método direto). Os resultados são apresentados na Tabela 12 e estão expressos em quantidade percentual de fármaco incluso em relação a quantidade total de fármaco adicionado na reação. Pode-se observar que a quantidade de fármaco inclusa pode ser considerada bastante alta para

ambas as técnicas de polimerização empregadas (> que 85%). Vê-se, portanto, que o uso da forma livre de base garante o encapsulamento eficiente do TXF, como esperado, se forem considerados os dados de solubilidade.

Tabela 12. Eficiência de encapsulamento (%) de tamoxifeno base nas NP

Amostras (n = 6)	CLAE
RM24	85,26 ± 2,06
RM26	90,98 ± 1,77

Por fim, a Figura 73 mostra o látex obtido a partir das reações de polimerização em miniemulsão de metacrilato de metila via radical livre controlada RAFT a 80 °C com a proporção monômero:iniciador 400:1 **RM22** na ausência e **RM24** na presença de 10,0% (p/p) de TXFb em relação ao monômero. As reações de polimerização em miniemulsão de metacrilato de metila via radical livre convencional foram realizadas das mesmas condições, porém na ausência de um agente RAFT, **RM25** na ausência e **RM26** na presença de 10,0% (p/p) de TXFb em relação ao monômero. Todas as miniemulsões obtidas se apresentaram estáveis, sem apresentação de aglomerados ou separação de fases. Isso mostra boa estabilidade para fins de armazenamento.



Figura 73. Látex obtido a partir das reações de polimerização **RM26**, **RM25**, **RM24**, **RM22** respectivamente após 14 dias de armazenamento na temperatura ambiente.

A coloração rosa para as reações de polimerização controladas se deve à coloração grenar do agente RAFT, presente nessas reações.⁴

5.3. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Com base nesses resultados deu-se início ao estudo de cinética de liberação do fármaco a partir das NP de polímero. Para isso, foi avaliada a solubilidade do TXFb na solução receptora (SR) a ser utilizada. Foi determinada então a solubilidade do fármaco em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 na presença de diferentes concentrações de LSS com o objetivo de verificar se essas soluções obedeciam à condição *sink*, ou seja, não se aproximariam da saturação para essa massa de fármaco.

Tabela 13. Avaliação da solubilidade de tamoxifeno base em diferentes concentrações de lauril sulfato de sódio 0,1M pH 7,4 para escolha da solução receptora

Solução Receptora (SR)	LSS (% p/v)	mg/mL	mg/20 mL
Tampão fosfato 0,1M pH 7,4	0,0	0,0008	0,016
	1,0	0,0217	0,42
	2,0	0,0541	1,08
	3,0	0,0826	1,64
	4,0	1,0862	21,72
	5,0	5,5589	111,16

De acordo com a Tabela 13 e com base na condição *sink*, considerando a maior dose recomendada (20 mg) e o volume de SR a ser utilizado nos ensaios (100 mL), escolheu-se a solução tampão com lauril sulfato de sódio a 4,0%. Dessa forma realizaram-se os ensaios de liberação *in vitro* (N = 6) de TXF para as NP contendo 10,0% p/v de TXF sintetizadas a partir de reação de polimerização em miniemulsão de metacrilato de metila via radical livre controlada RAFT (**RM24**). Os resultados obtidos após 12 horas de experimento está mostrado na Figura 74.

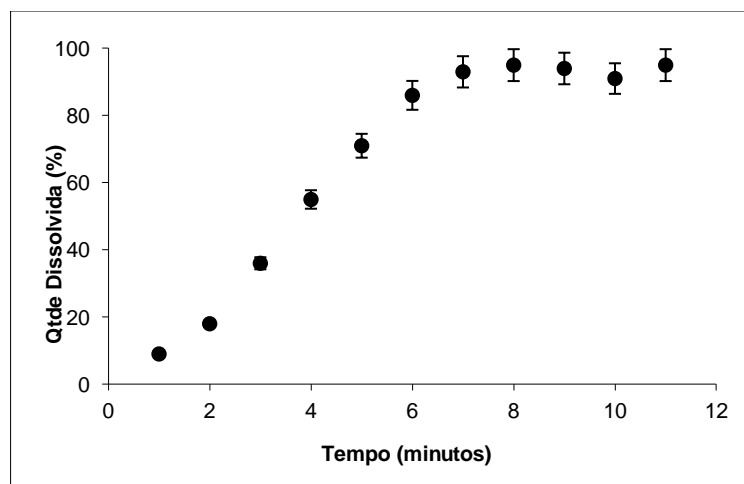


Figura 74. Perfil de liberação *in vitro* (N = 6) de tamoxifeno para as NP contendo 10,0% p/v de tamoxifeno sintetizadas a partir de reação de polimerização em miniemulsão de metacrilato de metila via radical livre controlada RAFT (RM24).

Observa-se que a liberação do fármaco a partir das NP é lenta e que o máximo de liberação é atingido com cerca de 6 horas de experimento. De acordo com o perfil de liberação obtido foram avaliados os coeficientes de correlação das quantidades dissolvidas de fármaco em função do tempo de acordo com os modelos cinéticos da Tabela 14.

Tabela 14. Modelos cinéticos de dissolução e coeficientes de correlação

Ordem/Modelo	Equação*	correlação
Zero Ordem	$Q_t = Q_0 - K_0t$	0,9771
Primeira Ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 - K_1t$	0,9343
Higuchi	$Q_t = Q_0 - K_Ht^{1/2}$	0,9964

* Q_t é a quantidade de fármaco liberado no tempo t ; Q_0 quantidade inicial de fármaco em solução; K_0 , K_1 , K_H , são as constantes de liberação de zero ordem, de primeira ordem e de Higuchi, respectivamente; t é o tempo.

A partir dos resultados obtidos pode-se observar que a cinética de liberação obedece mais proximamente a cinética de pseudo-primeira ordem, ou Higuchi, modelo que descreve a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick. Este modelo pode ser usado para descrever a dissolução de fármacos a partir de diversas formas farmacêuticas de

liberação modificada (COSTA & LOBO, 2001). Isso indica que a matriz polimérica controla o processo de liberação do fármaco e que o tamanho de nanopartícula pode modular o processo de liberação.

5.4. REAÇÃO DE BIOCONJUGAÇÃO COM ALBUMINA

Sistemas de liberação de fármacos baseados em NP são extensivamente estudados como estratégia farmacêutica. Em geral, esses sistemas protegem o fármaco da degradação, promovem maior absorção devido à facilidade de difusão através do epitélio e modificam a farmacocinética e o perfil de distribuição do fármaco nos tecidos, melhorando a penetração e distribuição intracelular (BREUNIG & BAUER, 2008)

NP baseadas em proteínas são particularmente interessantes no caso do uso desse sistema no tratamento antitumoral. A maior captação das NP tratadas com albumina em tumores sólidos é mediada pela fisiopatologia do tecido tumoral, caracterizado pela angiogênese, hipervascularização, arquitetura vascular defeituosa e drenagem linfática deficiente. A captação também é afetada pela transcitose iniciada pela ligação da albumina nativa à superfície das células ao receptor (albumina) de glicoproteína (gp60), assim como à SPARC (glicoproteína da matriz extracelular super expressa em uma grande variedade de tumores). A albumina se liga ao receptor gp60, resultando na ligação desta glicoproteína a uma proteína intracelular (caveolina-1) e subsequente invaginação da membrana celular, para formar as vesículas de transcitose (HAWKINS *et al.*, 2008)

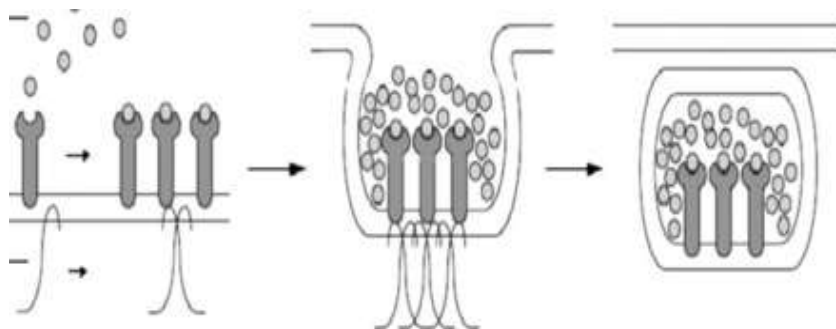


Figura 75. Captação de constituintes intravasculares e transcitose através do endotélio vascular pelo receptor de albumina: A) Receptor de albumina (gp60) se liga à albumina, resultando na ligação e indução da caveolina-1; (B) caveolina-1 induz a internalização, aprisionando-a e ligando a proteína à constituintes do plasma; (C) transcitose (HAWKINS *et al.*, 2008).

Por esses motivos, NP de albumina representam uma estratégia promissora para liberação alvo de fármacos em células tumorais devido ao aumento da biodisponibilidade e distribuição do fármaco, diminuindo sua toxicidade e reduzindo a resposta do corpo humano à resistência aos fármacos.

5.4.1. REAÇÃO DE BIOCONJUGAÇÃO COM POLÍMERO SECO

Uma das técnicas de polimerização normalmente usadas para preparar polímeros, com conseqüente imobilização de moléculas biológicas, é a polimerização controlada pela técnica RAFT, em que o agente de transferência de cadeia (CTA) desta reação contém um grupo tiocarboníltio, o qual pode ser facilmente convertido num tiol. A química deste grupamento resultante é muito usada para modificação em moléculas biológicas já que participa de muitas transformações químicas eficientes (BOYER *et al.*, 2007, LI *et al.*, 2010).

O método escolhido para a conjugação da albumina com o polímero formado foi o de pós modificação, ou seja, após a formação do polímero, o grupo tiocarboníltio do CTA foi reduzido com auxílio de NaBH_4 , expondo o grupamento tiol. A técnica usada foi baseada e adaptada do experimento de Zelinkin e colaboradores (2007).

Após o procedimento para reação descrito na seção 4.3.5.1, procedeu-se a avaliação da eficácia desta conjugação pelo método de *Bradford* (seção 4.3.5.4.1), método indireto que mede a quantidade de proteína não conjugada. Foram avaliados os polímeros secos provenientes dos seguintes métodos de secagem: liofilização, estufa (obtido a partir dos polímeros secos utilizados para avaliação da conversão por gravimetria) e capela (látex seco por evaporação natural do solvente em capela)

No polímero seco avaliou-se que praticamente toda a proteína adicionada não estava conjugada (Tabela 15). Os resultados obtidos revelaram que praticamente 100% da proteína adicionada era recuperada no ensaio de *Bradford*, tanto para os polímeros secos na presença e na ausência do fármaco quanto no branco. Ou seja, a diferença média de quase 1 mg em relação à quantidade de proteína adicionada pode ser atribuída ao erro do método ou à perda de material durante as lavagens.

Tabela 15. Quantidade de albumina conjugada com o polímero seco obtido a partir das reações **RM22** e **RM24** medida por ensaio de *Bradford*

Polímero Seco	Albumina não conjugada (%)		
	Liofilização	Capela	Bancada
RM22	96,16 ± 1,26	94,21 ± 0,75	93,21 ± 0,13
RM24	96,85 ± 0,89	93,64 ± 0,33	91,34 ± 0,25
Branco	98,23 ± 0,31	96,76 ± 0,19	94,76 ± 0,51

Por isso, investigou-se a morfologia dessas partículas secas para avaliar a possível dificuldade de acessibilidade da proteína aos grupamentos tiols disponibilizados através da redução do grupo do CTA com NaBH₄. Essas avaliações foram realizadas por MEV e estão apresentadas nas Figuras 76 a 78.

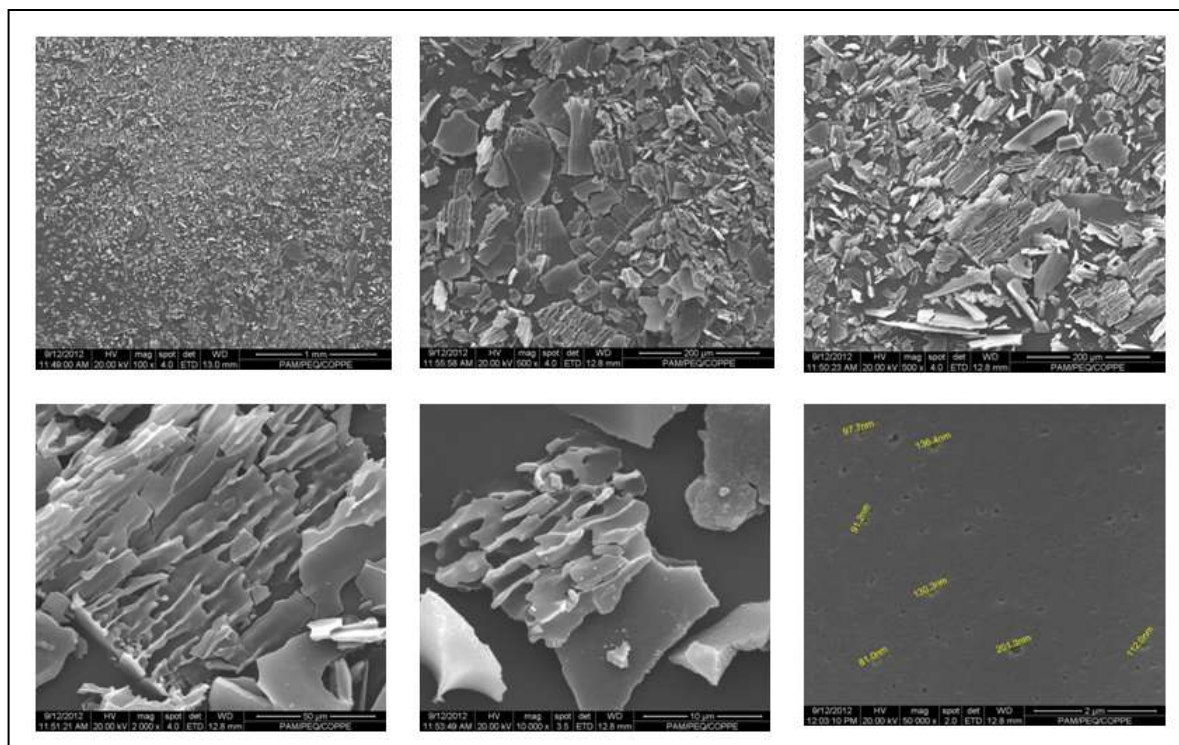


Figura 76. Micrografias das NP obtidas a partir da reação **RM24** secas pela técnica de liofilização

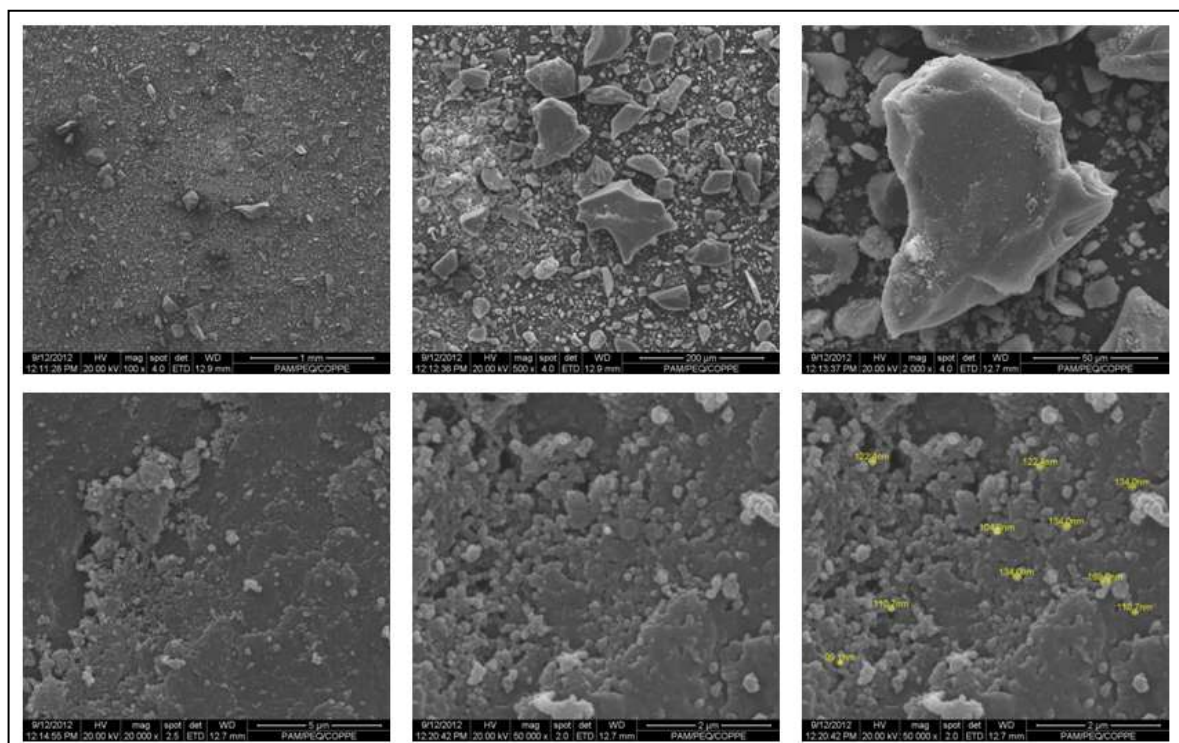


Figura 77. Micrografias das NP obtidas a partir da reação **RM24** secas em capela de recirculação

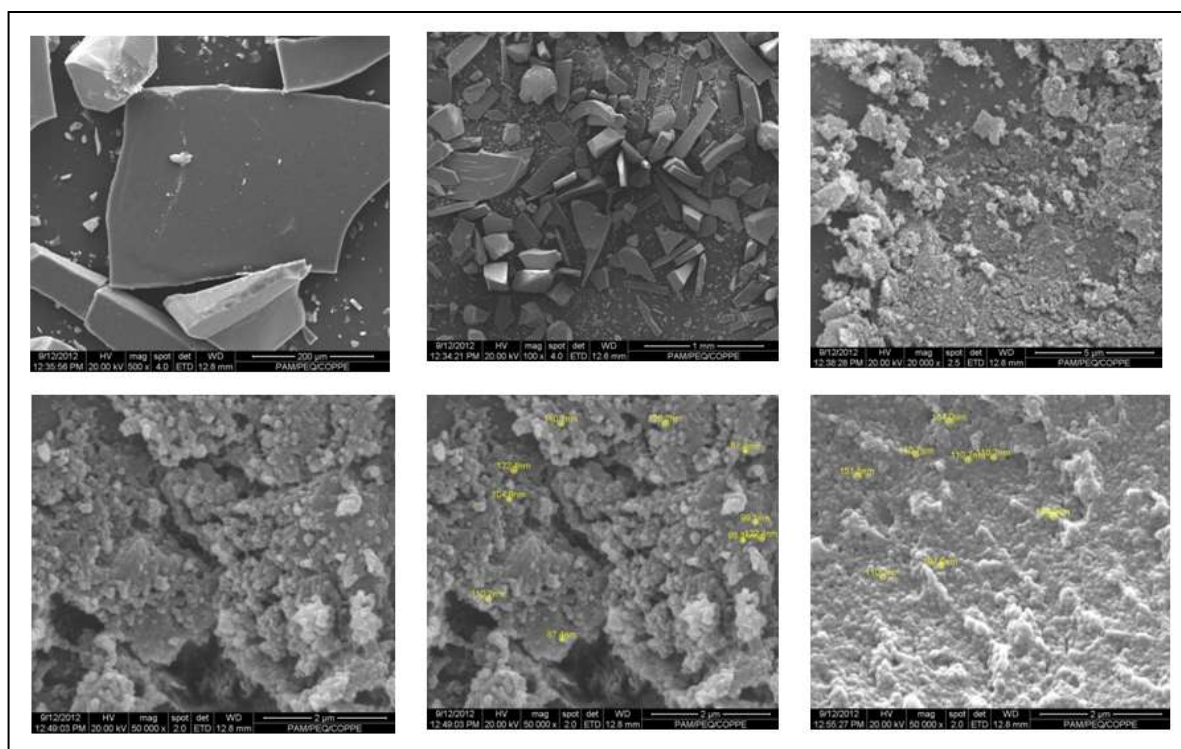


Figura 78. Micrografias das NP obtidas a partir da reação **RM24** secas em bancada

A partir das imagens obtidas percebeu-se que a liofilização deformava as NP e transformava-as em lâminas. Ao mesmo tempo, a secagem na capela e na bancada mantinha a forma esférica das partículas; porém, existia ainda muita aglomeração das partículas. Portanto, pode-se atribuir a baixa taxa de conjugação à aglomeração ou deformação das partículas, o que pode dificultar a acessibilidade do resíduo tiol da nanopartícula ao resíduo de cisteína livre da proteína. Por isso, a técnica foi repetida no polímero em látex diluído. Como discutido no capítulo 2, a secagem de emulsões constitui a fonte de conhecimento na área.

5.4.2. REAÇÃO DE BIOCONJUGAÇÃO COM POLÍMERO EM LÁTEX

Após o procedimento para reação descrito na seção 4.3.5.2 se procedeu a avaliação da eficácia desta conjugação pelo método de *Bradford* (seção 4.3.5.4.1) método indireto que mede a quantidade de proteína não conjugada.

Tabela 16. Quantidade de albumina conjugada com o polímero em látex obtido a partir das reações **RM22** e **RM24** medida por ensaio de *Bradford*

Polímero em Látex	Albumina não conjugada (%)
RM22	81,76 ± 1,36
RM24	74,19 ± 2,55
Branco	96,41 ± 0,97

Observou-se que, com o látex diluído, a quantidade de albumina conjugada era ligeiramente maior em relação ao uso do polímero seco. De 15 a 20% da quantidade de albumina adicionada foi conjugada com o polímero em látex. Isso pode ser confirmado quando se comparam os resultados obtidos com o polímero em látex e com o branco (reação na ausência de polímero).

5.4.3. REAÇÃO DE BIOCONJUGAÇÃO COM POLÍMERO EM LÁTEX NA PRESENÇA DE MALEIMIDA PEG-NHS MW 5000

Resíduos livres de cisteína são raros em proteínas nativas e podem ser facilmente introduzidos via engenharia de proteína. Reações com maleimida são eficientes e levam à conjugação quimio-seletiva de proteínas em soluções de pH menor ou igual a 7 (BAYS *et al.*, 2009)

Bays e colaboradores (2009) exploraram a reação RAFT de polietilenoglicol metil éter acrilato poli(PEGA) na presença de um CTA pré-funcionalizado com maleimida, que permitia fazer conjugados irreversíveis. Heredia e colaboradores (2005) também já sintetizaram um macroCTA conjugado com proteína através da reação de funcionalização do grupo tiocarboníltio do CTA com maleimida e a sulfidril livre do resíduo 34 de cisteína da albumina bovina (BSA). Neste último caso relatou-se que a reação ocorria prontamente e era específica para grupamentos tiols em pH específico (HEREDIA *et al.*, 2005, BAYS *et al.*, 2009).

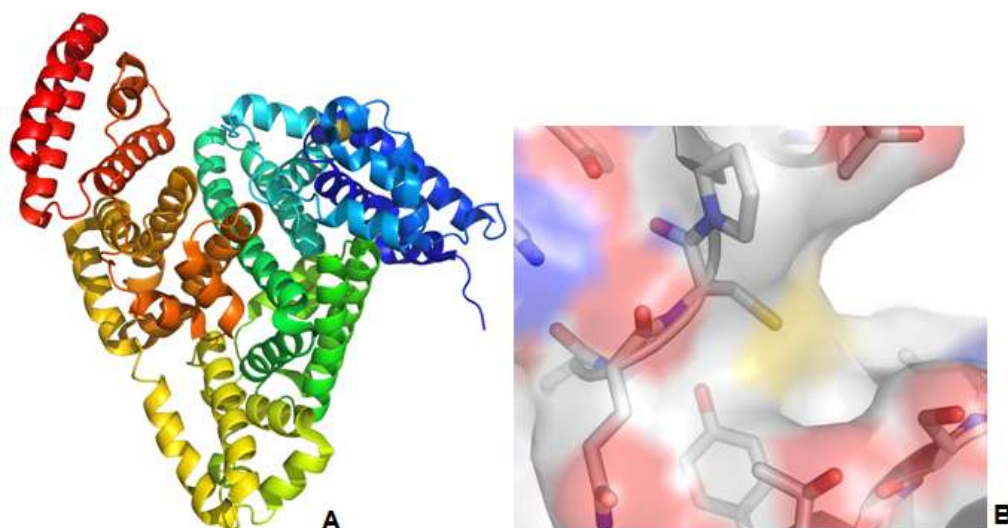


Figura 79. Estrutura cristalográfica da albumina de soro bovino (PDB ID 3V03). A) visão em *cartoon* destacando em amarelo o resíduo de Cys34. B) detalhe da Cys34. Figuras geradas com PyMOL (www.pymol.com).

Usando a estrutura cristalográfica de albumina de soro bovino (PDB ID 3V03 e 4F5S) e o programa ArealMol dentro da suíte de programas CCP4, pudemos calcular em aproximadamente 10% a área de superfície acessível a solvente do resíduo Cys34. Isso demonstra a baixa acessibilidade, e portanto a razão para o insucesso na conjugação direta de albumina com as Np MMA, que nos levaram a lançar mão do acoplamento via um linker solúvel flexível de PEG bifuncional, o qual permitiu o acoplamento satisfatoriamente (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER 4, 1994).

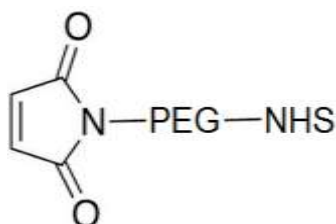


Figura 80. Estrutura molecular da maleimida PEG NHS MW 5000

Dessa forma, com base na literatura e considerando os resultados anteriores e ainda que o resíduo 34 de cisteína livre se apresenta estericamente impedido na molécula da albumina (Figura 79), decidiu-se utilizar a maleimida PEG-NHS MW 5000 nas reações de bioconjugação das nanopartículas obtidas com a albumina.

Realizou-se a reação de bioconjugação das nanopartículas obtidas na presença de maleimida PEG NHS 5000 conforme descrito na seção 4.3.5.3. As medidas de quantidade de albumina não conjugada foram obtidas 1 hora e 24 horas após a adição da albumina. As amostras foram medidas após 24 horas e foram armazenadas em estufa a 37 °C mantidas sob agitação. Os resultados obtidos se apresentam na Tabela 17.

Tabela 17. Quantidade de albumina conjugada com o polímero em látex na presença de maleimida PEG NHS 5000 obtida a partir das reações **RM22** e **RM24** medida por ensaio de *Bradford*

Polímero em Látex	Albumina não conjugada (%)	
	1 hora de reação	24 horas de reação
RM22	23,22 ± 1,74	3,25 ± 0,88
RM24	19,78 ± 1,11	1,19 ± 0,46
Branco	95,09 ± 0,76	94,18 ± 1,09

Pode-se observar que, assim como observado por Heredia e colaboradores (2005), a reação na presença de maleimida ocorre prontamente. Após 24 horas, quase 100% da albumina adicionada era conjugada com a nanopartícula. Neste procedimento a maleimida era inicialmente adicionada à solução contendo o grupo tiocarboníltio reduzido. Portanto, garantia-se que todo tiol exposto fosse conjugado com o tiol livre da maleimida adicionada. Posteriormente era adicionada a albumina e a reação entre a proteína e a nanopartícula se dava através dos resíduos de ácido carboxílico da maleimida e os resíduos de grupamentos amino da proteína, muito mais abundantes e disponíveis para reação.

Para confirmar a bioconjugação da albumina com as NP, foi realizada a imunomarcagem, seguida de localização por microscopia eletrônica de transmissão das partículas.

As partículas foram previamente tratadas com paraformaldeído para estabilizá-las, seguido de tratamento com anticorpo IgG primário (produzido em coelho) anti-albumina e posteriormente reagido com anticorpo secundário marcado com NP de ouro coloidal de 10 nm de diâmetro médio, segundo o procedimento descrito na seção 4.2.5.4.2.

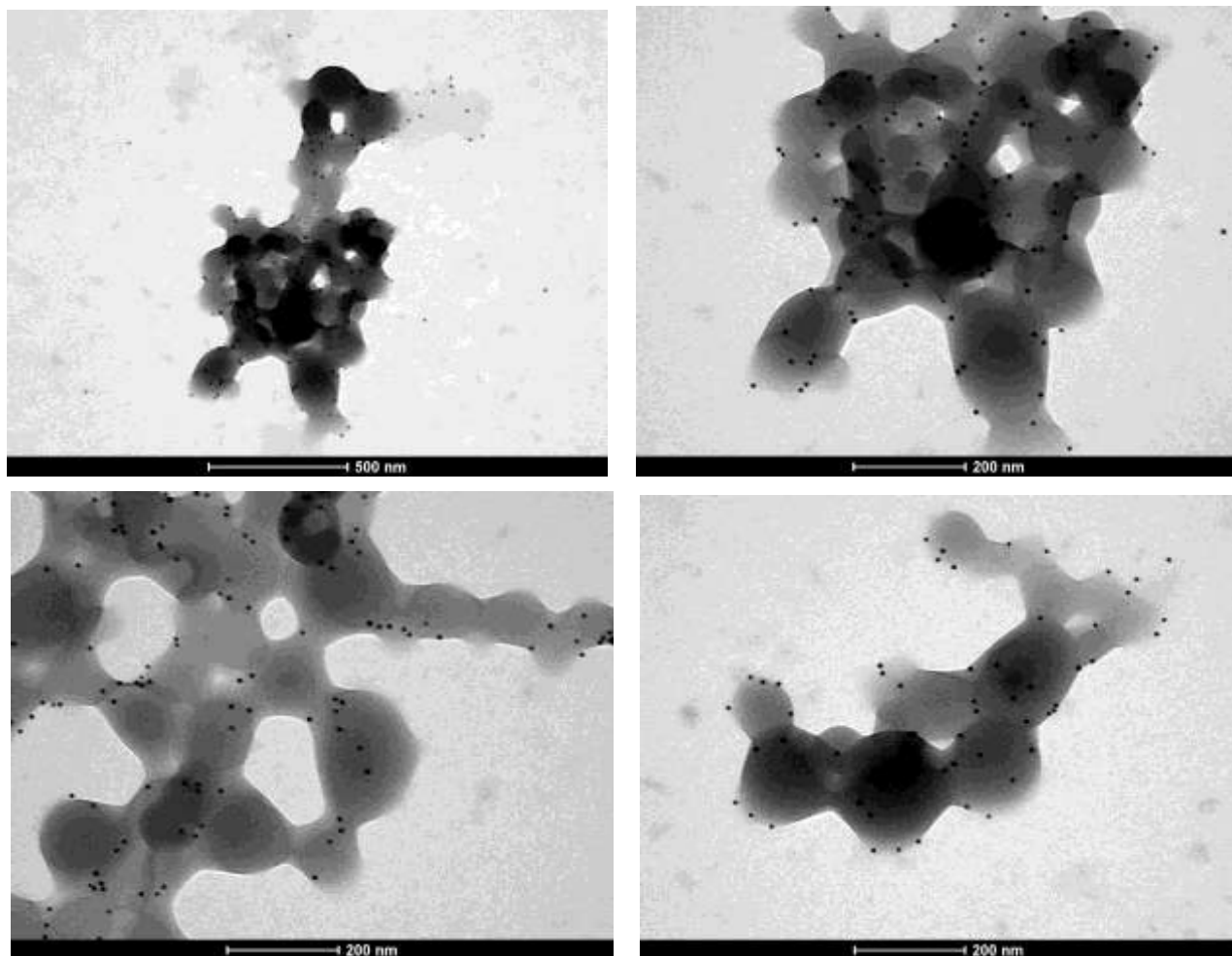


Figura 81. Micrografia de transmissão de NP provenientes da reação **RM22** conjugadas com albumina na presença de maleimida PEG NHS 5000 após reação com anticorpo anti-albumina e anticorpo anti-anticorpo anti-albumina segundo o procedimento descrito seção 4.2.5.4.2.

A Figura 81 demonstra visualmente a eficiência da bioconjugação enquanto a Figura 82 mostra o controle. Os pontos pretos simbolizam os anticorpos anti-anticorpo anti-albumina marcados com ouro, sendo que os pontos não são observados na amostras controle. Observa-se que esses anticorpos se ligam aos anticorpos anti-albumina na superfície de todas as

nanopartículas. Não se observa a marcação que não nas NP de PMMA, indicando não somente a especificidade com albumina, mas também sugerindo que esta de fato esteja ligada às NP de PMMA pelo método de conjugação empregado.

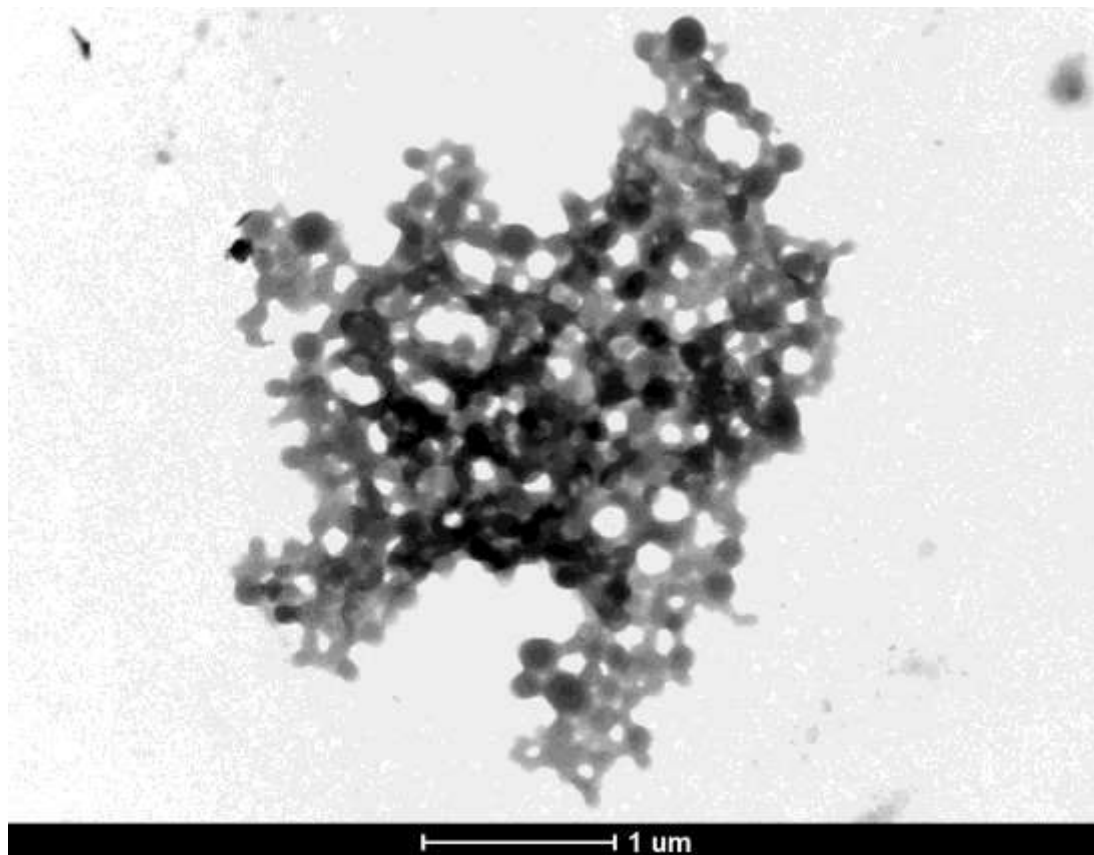


Figura 82. Micrografia de transmissão de NP provenientes da reação **RM22** não conjugadas com albumina na ausência de maleimida PEG NHS 5000 após reação com anticorpo anti-albumina e anticorpo anti-anticorpo anti-albumina segundo o procedimento descrito na seção 4.2.5.4.2.

5.5. ENSAIOS *IN VITRO* DE CAPTAÇÃO CELULAR

Para avaliar a capacidade de captação celular das NP produzidas pelas reações **RM22** e **RM24** conjugadas com albumina humana e bovina por meio de incubação por 1 e 24 horas foi realizado ensaio de captação celular utilizando células THP-1. As partículas foram previamente marcadas com paraformaldeído para estabilizá-las e, posteriormente, com fluoresceína para realizar a marcação da proteína conjugada, segundo procedimento descrito na seção 4.3.6.

As Figuras 83 e 84 mostram visualmente a eficiência da captação celular das NP na ausência e na presença de TXF (produto final das reações **RM22** e **RM24**, respectivamente) conjugadas quimicamente com albumina humana e bovina por macrófagos THP-1. A Figura 84 apresenta as micrografias de um campo contendo as NP conjugadas com albumina bovina e humana internalizadas por macrófagos. A coloração verde fluorescente representa a proteína (albumina) marcada, conjugada com a nanopartícula; sendo a coloração azul a célula macrofagocítica THP-1. Pode-se observar que, aparentemente as amostras contendo TXF foram internalizadas em maior quantidade que aquelas que não continham o fármaco. A Figura 83 mostra esses resultados de maneira mais clara revelando matematicamente através de um gráfico de barras as quantidades de NP internalizadas por célula, calculadas com auxílio do *software* MetaXpress. Para quase todos os casos demonstrou-se diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre a quantidade captada de NP carregadas e não carregadas com TXF. Apenas as NP conjugadas quimicamente com albumina bovina por meio de incubação por 24h não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) para a quantidade de NP captadas quando comparada a ausência e presença de TXF. Não foi observada diferença estatisticamente significativa para a quantidade captada de NP carregadas ou não com TXF conjugadas com albumina bovina ou humana quando comparado o tempo de incubação de 1 ou 24h ($p > 0,05$).

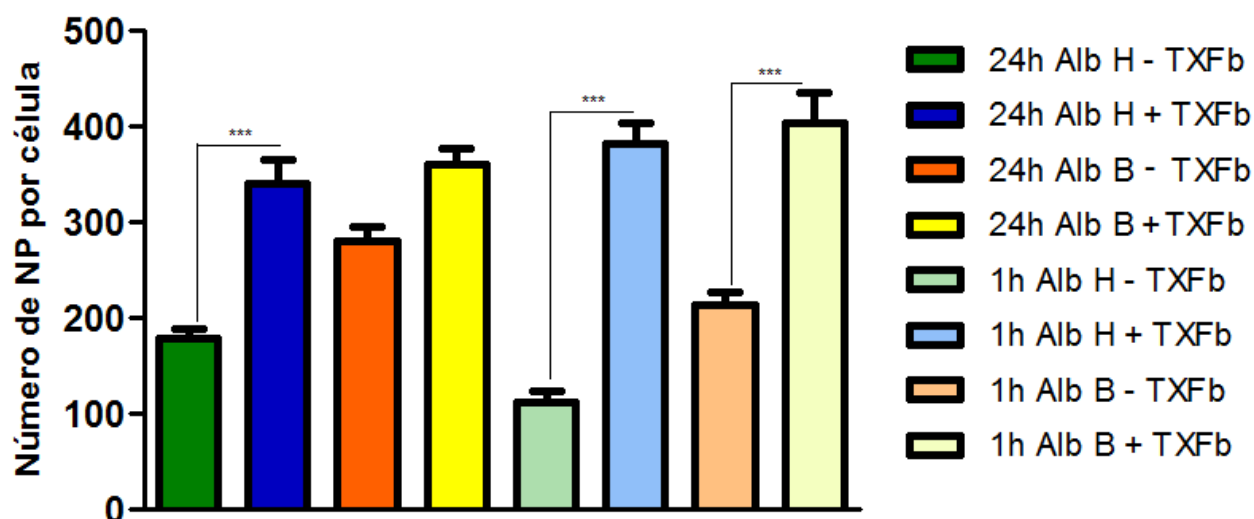


Figura 83. Quantidade de NP carregadas ou não com tamoxifeno (produto das reações **RM24** e **RM22**, respectivamente) conjugadas com albumina bovina ou albumina humana por 1 e 24 horas, internalizadas por células THP-1 (cálculo realizado pelo software MetaXpress)

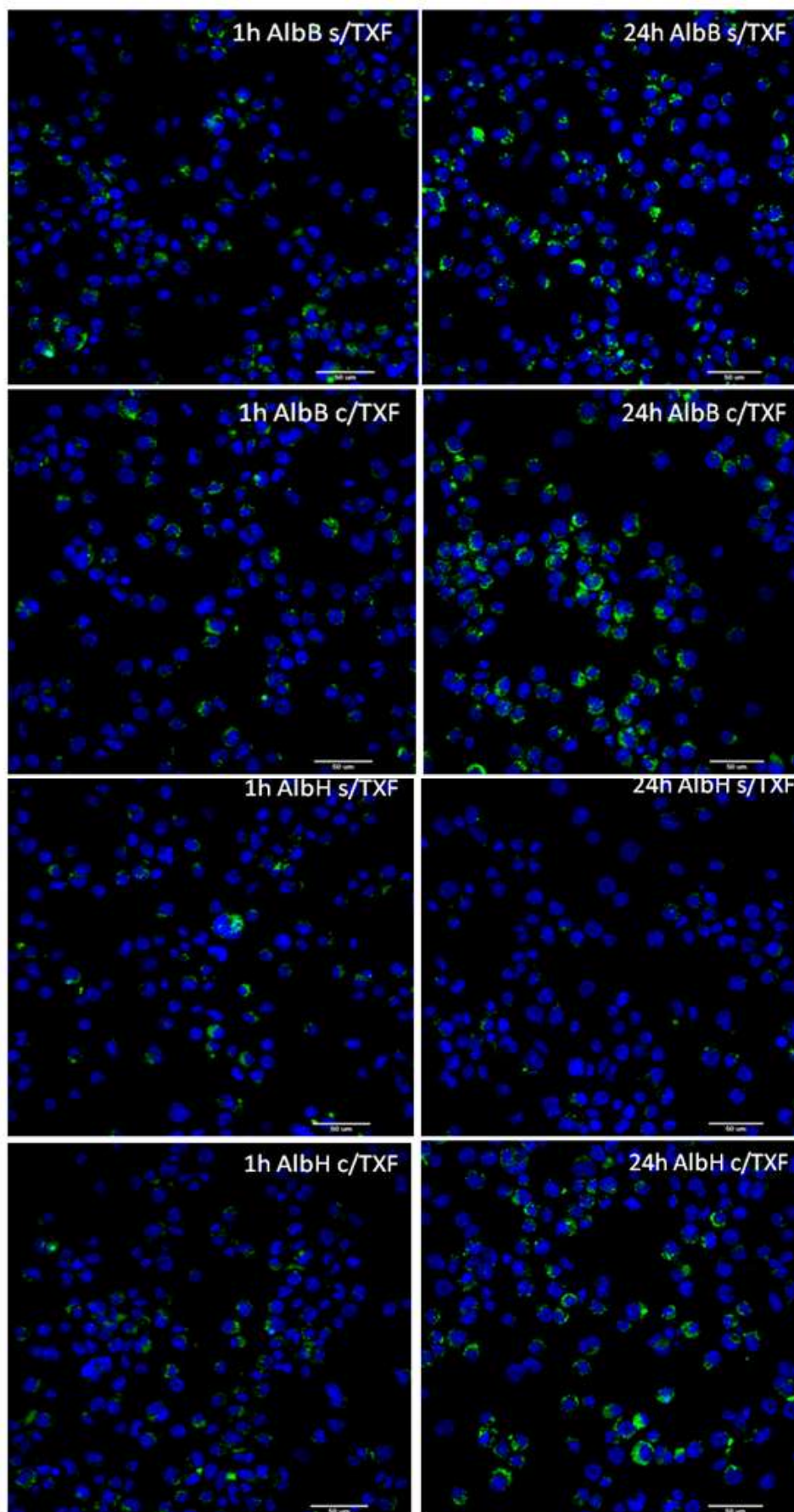


Figura 84. Micrografia de células THP-1 após o ensaio de internalização de NP carregadas ou não com TXF (produto das reações **RM24** e **RM22**, respectivamente) conjugadas com albumina bovina ou albumina humana por 1 e 24 horas.

Diante desses resultados pode-se observar que as células THP-1 são capazes de internalizar NP conjugadas quimicamente com albumina humana ou bovina de forma eficiente. Contudo, de maneira geral, foi observada maior eficiência de captação celular das NP carregadas com TXF. Este dado constitui um questionamento que necessita ser elucidado pelo nosso grupo.

6.1. CONCLUSÕES

Diante dos resultados expostos e discutidos podem-se apresentar as conclusões descritas nos próximos parágrafos.

Foi comprovada a obtenção do controle e a manutenção do caráter vivo da reação polimerização radicalar controlada na presença de um agente RAFT, por meio da observação da variação do índice de polidispersão e da evolução das massas molares tanto para as reações conduzidas em miniemulsão;

O TXFc é solúvel em MMA no limite de, cerca de, 67 mg/mL a 90 °C, temperatura reacional;

A presença de cerca de 0,6% p/p em relação ao monômero do fármaco no meio reacional não parece afetar a distribuição de massas molares, tamanhos de partícula, conversão e o índice de polidispersão, tanto para as reações de polimerização radicalar convencional quanto para a reação radicalar controlada na presença do agente RAFT utilizando PBO como iniciador.

Foi observada uma baixa incorporação do TXFc nas NP, ao redor de 15% O TXFc não permanece incluso nas NP obtidas por polimerização radicalar convencional e polimerização radicalar controlada RAFT devido à baixa solubilidade do fármaco no monômero, quando comparada com a solubilidade do fármaco na fase contínua (água) nas condições de reação.

A reação de liberação do sal de citrato do TXF e sua transformação em base livre (TXFb) é possível de ser realizada com alto rendimento e manutenção da pureza e características físico-químicas do fármaco.

O TXFb apresenta maior solubilidade em MMA quando comparado com a fase contínua (água) em todas as faixas de temperatura analisadas, especialmente em temperaturas altas (reacionais), na faixa de 70 a 90 °C.

As reações realizadas com 2,5%, 5,0% e 20,0% (p/p) de TXFb em relação ao monômero foram mais lentas e não evoluíram satisfatoriamente, resultando em separação de fases nas primeiras horas de reação e não demonstrando conversão do monômero em polímero. Isto pode ser explicado pela possível ação antioxidante do TXFb, a que pode reagir com os radicais formados pela degradação do iniciador PBO.

A utilização de AIBN como iniciador na proporção monômero: iniciador [400:1] nas reações de polimerização radicalar convencional e polimerização radicalar controlada RAFT na presença de 10,0% (p/p) de TXFb em relação ao monômero não parece afetar significativamente a cinética da reação, a distribuição de massas molares, o índice de polidispersão nem o tamanho de partícula das nanopartículas obtidas.

Foi observada alta incorporação do TXFb nas NP obtidas a partir das reações de polimerização radicalar convencional e polimerização radicalar controlada RAFT na presença de 10,0% (p/p) de TXFb em relação ao monômero e AIBN como iniciador, próxima de 90%.

As miniemulsões obtidas a partir das reações de polimerização radicalar convencional e polimerização radicalar controlada RAFT na presença de 10,0% (p/p) de TXFb em relação ao monômero e AIBN como iniciador se apresentaram estáveis, sem apresentação de aglomerados ou separação de fases.

A liberação do TXFb a partir das NP é lenta (cerca de 6 horas) em relação à dissolução de comprimidos de liberação imediata e o máximo de liberação é atingido com cerca de 6 horas de experimento. A cinética de liberação obedece a cinética de pseudo primeira ordem, ou Higuchi, modelo que descreve a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick. Este modelo pode ser usado para descrever a dissolução de fármacos a partir de diversas formas farmacêuticas de liberação modificada e sugere o controle da matriz polimérica sobre o processo.

As reações de bioconjugação dos polímeros obtidos por polimerização radicalar controlada RAFT com as partículas secas ou em látex não foram conduzidas de forma apropriada provavelmente por conta de um conjunto de fatores: deformação das NP pela técnica de liofilização, que as transformava em lâminas, aglomeração das NP pela técnica de secagem em estufa e bancada. Além disso, a apresentação estrutural da albumina mostra uma limitação estérica de acessibilidade ao único resíduo de cisteína não-oxidado, resíduo livre (34), passível de ser conjugado com os grupos tiols livres da molécula do CTA.

Observou-se por meio da estrutura cristalográfica de BSA e do programa ArealMol dentro da suíte de programas CCP4, que aproximadamente 10% a área de superfície acessível a solvente do resíduo Cys34, demonstrando a baixa acessibilidade, e portanto justificando o insucesso na conjugação direta de albumina com as NP, que nos levaram a lançar mão do acoplamento via um linker solúvel flexível de PEG bifuncional, o qual permitiu o acoplamento satisfatoriamente.

As reações de bioconjugação dos polímeros obtidos por polimerização radicalar controlada RAFT resultaram em 100% de conjugação das NP com a proteína na presença de maleimida PEG NHS MW 5000. Neste procedimento, a maleimida era inicialmente adicionada à solução contendo o grupo tiocarboníltio reduzido. Portanto, garantia-se que todo tiol exposto fosse conjugado com o tiol livre da maleimida adicionada. Posteriormente, era adicionada a albumina e a reação entre a proteína e a NP se dava através dos resíduos de ácido carboxílico da maleimida e os resíduos de grupamentos amino da proteína, muito mais abundantes e disponíveis para reação.

Os ensaios de captação celular revelaram que, de modo geral, as células THP-1 são capazes de internalizar NP conjugadas quimicamente com albumina humana ou bovina de forma eficiente. Contudo, foi observada maior eficiência de captação celular das NP carregadas com TXF. Este dado constitui um desafio que necessita ser elucidado pelo nosso grupo.

6.2. SUGESTÕES

Com base nos resultados sugere-se a realização de estudos para avaliar a maior capacidade de internalização celular em células THP-1 de NP conjugadas quimicamente com albumina e carregadas com TXF em relação aquelas não carregadas com o fármaco.

Além disso, sugere-se a realização também de estudos *in vitro* e *ex vivo* para avaliação da captação celular em linhagem de células tumorais mamárias: (i) com NP finais carregadas com tamoxifeno e conjugadas com albumina, (ii) com NP na ausência da albumina e (iii) com NP na ausência do fármaco e da albumina. Estes estudos permitirão avaliar os benefícios da inclusão do fármaco na NP e de sua vetorização no combate às células tumorais, comparando os resultados com aqueles obtidos com a formulação usual de comprimidos distribuída no mercado nacional.

Sugere-se ainda a realização de estudo de farmacocinética *in vivo* para avaliar a liberação, distribuição e eliminação das (i) NP finais carregadas com tamoxifeno e conjugadas com albumina, (ii) NP na ausência da albumina e (iii) NP na ausência do fármaco e da albumina.

Por fim, após todos os ajustes, sugere-se o trabalho de avaliação de um método adequado para secagem das NP, que não afete a morfologia e as propriedades finais do material obtido, e também o aumento de escala (scale up) para produção das NP em escala industrial e semi-industrial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L. K.; FAROHJZAD, O. C. “Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles”, **Molecular Pharmacology**, v.5, pp. 505 – 515, 2008.
- ALLCOCK, H. R.; LAMPE, F. W. “Contemporary Polymer Chemistry”, 2nd ed.; Prentice Hall: Englewood Cliffs, NJ, 1990.
- ALLEMANI, C., WIER, H., CARREIRA, H. *et al.* “Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2)”. **The Lancet**, v. 385 (9972), pp. 977-1010, 2015.
- ALTHUIS, M., FERGENBAYM, M., GARCIA-CLOSAS *et al.* “Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature”. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 13 (10), pp. 1558-1568, 2004.
- ANTON, N.; BENOUIT, J. P.; SAULNIER, P. “Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – a review”, v. 128, pp. 185-199, 2008.
- ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K., “Polyreactions in miniemulsions”. **Progress in Polymer Science**, v. 27, pp. 689-757, 2002.
- ARAÚJO, L.; SHEPPARD, M.; LÖBENBERG, R.; KREUTER, J.; “Uptake of PMMA nanoparticles from gastrointestinal tract after oral administration to rats: modification of the body distribution after suspension in surfactant solutions and oil vehicles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 176, pp. 209 - 224, 1999.
- ARAUJO, O.; GIUDICI, R.; SALDIVAR, E.; RAY, W.H.J., “Modeling and experimental studies of emulsion copolymerization systems”. I. Experimental result. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, pp. 2360 , 2001.
- ASUA, J. M. “Miniemulsion polymerization”. **Progress in Polymer Science**, v. 27, pp. 1283 - 1346, 2002.
- AULTON, M. E. - “Delineamento de formas farmacêuticas”, Artmed, Porto Alegre, 2005.
- BAN, K. B., GODELLAS, C. V. “Epidemiology of Breast Cancer”. **Surgical Oncology of North America**, v. 23 (3), pp. 409-422, 2014
- BANGHAM, A.D., HORNE, R.W., “ Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface active agents as observed in the electron microscope”. **Journal of Molecular Biology**, v. 8, pp.660–668, 1964.

- BAREFORD, L., SWAAN, P. "Endocytic mechanisms for targeted drug delivery". **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, pp. 748-758, 2007.
- BARNER-KOWOLLIK, C.; QUINN, J. F.; NGUYEN, T. L. U.; HEUTS, J. P. A.; DAVIS, T. P. "Kinetic investigation of RAFT polymerizations: cumyl, phenyldithioacetate mediated homopolymerizations of styrene and methyl methacrylate". **Macromolecules**, v. 34, pp. 7849-7857, 2001.
- BAUM, M., BRITAIN, J. "Synthesis of Polymer Brushes on Silicate Substrates via Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Technique" **Macromolecules**, v. 35, pp. 610-615, 2002.
- BAYS, E., LEI, T., CHIEN WEN, C. et al. "Synthesis of semitelechelic maleimide poly(PGA) for protein conjugation by RAFT polymerization". **Biomacromolecules**, v.10 (7), pp.1777-1781,2009
- BENNET, D., KIM, S. "Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery" In: **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**, Chapter 8: Polymer, Publisher: InTech, Editors: Ali Demir Sezer, pp.257-310, 2014.
- BERRY, D. A., CRONIN, K. A., PLEVITIS, S. K. et al., "Effect of Screening and Adjuvant Therapy on Mortality from Breast Cancer". **The New England Journal of Medicine**, v.353, PP.1784-1792, 2005
- BHARDWAJ, A., TIWARI, A. "Breast cancer diagnosis using Genetically Optimized Neural Network model". **Expert Systems with Applications**, v.42 (10), pp. 4611-4620, 2015.
- BIGGS, S.; GRIESER, F., "Preparation of Polystyrene Latex with Ultrasonic Initiation" **Macromolecules**, v. 28, pp. 4877 – 4882, 1995.
- BLYTHE, P.J.; KLEIN, A.; SUDOL, E.D. AND EL-AASSER, M.S., "Enhanced Droplet Nucleation in Styrene Miniemulsion Polymerization. 3. Effect of Shear in Miniemulsions That Use Cetyl Alcohol as the Cosurfactant", **Macromolecules**, v. 32, p. 4225 – 4231, 1999.
- BONTEMPO D, HEREDIA K, FISH B, MAYNARD H. "Cysteine-reactive polymers synthesized by atom transfer radical polymerization for conjugation to protein". **Journal of the American Chemical Society**, v. 126 (47), pp: 15372-15373, 2004
- BOYER, C., BULUMUS, V., LIU, J. et al., "Well-Defined Protein-Polymer Conjugates via in Situ RAFT Polymerization". **Journal of American Chemical Society**, v. 129 (22), pp 7145–7154, 2007
- BOYER, C., STENZEL, M.H., DAVIS, T.P. "Bioapplications of RAFT polymerization." **Chemical Reviews**, v.119 (11), pp. 5402-5436, 2009.

- BOYER, C., STENZEL, M.H., DAVIS, T.P. "Building nanostructures using RAFT polymerization". **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 49, pp 551-595, 2011.
- BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J.O., "Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy", **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56 , pp. 1649 – 1659, 2004.
- BREKKEN, R.A., SAGE, E.H. SPARC, "A matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication". **Matrix Biology**, vol.19, p.816–27, 2001.
- BREUNIG, M., BAUER, S, GOEPFERICH, "APolymers and nanoparticles: intelligent tools for intracellular targeting?" **European Journal of Pharmceutics and. Biopharmaceutics**, v. 68 pp. 112–128, 2008
- BRIGGER, I.; CHAMINADE, P.; MARSAUD, V. APPERL, M; BESNARD, M.; GURNY, R.; RENOAIR, M.; COUVREUR, P. "Tamoxifen encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. A new antiestrogen formulation". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 214, pp. 37–42, 2001.
- BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P., "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis". **Advanced Drug Reviews**, v. 54, pp. 631 – 651, 2002.Delivery
- BRITTAİN, J W.; BAUM, M, "Synthesis of Polymer Brushes on Silicate Substrates via Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Technique". **Macromolecules**, v. 35, pp 610–615, 2002.
- BROADHEAD, J.; ROUAN, S.K.E.; RHODES, C.T., "The spray drying of pharmaceuticals". **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 18, pp. 1169 – 1206, 1992.
- BUNJES, H.; UNRUH, T. "Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering". **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, pp. 379-402, 2007.
- BURGESS, D. J.; HICKEY, A. J. "Microsphere technology and applications". In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C., eds. **Encyclopedia of Pharm.aceutical technology**. New York: Marcel Dekker, v. 10, p. 1-29, 1994.
- CHARMOT, D., CORPART, P., THANG, S. H., "Controlled Radical Polymerization in Dispersed Media". **Macromolecular Symposia**, v. 150, p. 23-32, 2000.
- CHAWLA, S. J; AMIJI, M. M. "Biodegradable poly(o-caprolactone) nanoparticles for tumortargeted delivery of tamoxifen". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, p. 127-138, 2002.
- CHEN, Y.; SAJJADI, S., "Particle formation and growth in a initio emulsifier-free emulsion polymerizationnunder monomer-starved conditions". **Polymer**, v. 50, p.357 - 365, 2009.

- CHERN, C.S., "Emulsion polymerization mechanisms and kinetics". **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 443 – 486, 2006.
- CHERN, C.S.; LIOU, Y.C., "Kinetics of styrene miniemulsion polymerization stabilized by nonionic surfactant alkyl methacrylate". **Polymer**, v. 40, p. 3763 – 3772, 1999.
- CHIEFARI, J., CHONG, Y.K., ERCOLE, F. "Living Free Radical Polymerization by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer – The RAFT Process". **Macromolecules**, v.31, p. 5559-5562, 1998
- CHIEFARI, J.; MAYADUNNE, R. T. A., MOAD, G.; RIZZARDO, E. POSTMA, "A Thiocarbonylthio compounds in RAFT polimerizaton. Effect of the activation of Z group". **Macromolecules**, v. 36, p. 2273-2283, 2003.
- CHIN, D., BOYLE, G.M., WILLIAMS, R.M., KALTIN, F., NIRMALA, P., JULIE, P., "Markers for poor prognosis in head and neck cancer". **International Journal of Cancer** vol. 113, p.789–97, 2005.
- CHONG Y K, KRSTINA J, LE T P T, MOAD G, POSTMA A, RIZZARDO E, "Thiocarbonylthio compounds [S:C(Ph)SR] in free radical polymerization with reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT polymerization). Role of the free-radical leaving group (R) ". **Macromolecules**, v. 36, p. 2256–2272, 2003.
- CHONG Y K, MOAD G, RIZZARDO E, THANG S H, "Thiocarbonylthio end group removal from RAFT-synthesized polymers by radical-induced reduction", **Macromolecules**, v. 40, p. 4446-4455, 2007.
- COJOC, M., MÄBERT, K., MUDERS, M. *et al.* "A role for cancer stem cells in therapy resistance: Cellular and molecular mechanisms". **Seminars in Cancer Biology**, v. 31, pp. 16-27, 2014.
- COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER 4."The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography". **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 50 (Pt 5), pp. 760-763, 1994.
- CONSTANTINO, M. G.; SILVA, G. V. J.; DONATE, P. M.; **Fundamentos de Química Experimental**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2004.
- CONVERTINE, A. J., AYRES, N.; SCALES, C. W., LOWE, A. B.; MCCORMICK, C. L. "Facile, controlled, room temperature RAFT polymerization of N-isopropylacrylamide". **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1177-1180, 2004.
- CORTES, J., SAURA, C., "Nanoparticle albumin-bound (nab™)-paclitaxel: improving efficacy and tolerability by targeted drug delivery in metastatic breast cancer". **EJC supplements**, vol. 8, p.1–10, 2010

- COSTA, F. P.; BUZAID, A. C. “Hormonioterapia na doença metastática na prémenopausa. Câncer de Mama: tratamento multidisciplinar”, **Dendrix**, cap. 25, 2007.
- COSTA, M. L.; RESENDE, C. M., PARDINI, L. C., “Estudo da influência do diluente reativo PGE na cinética de cura de resina epóxi utilizada em compósitos estruturais”. **Química Nova**, v. 23, p. 320-325, 2000.
- COSTA, P., LOBO, J. M. S. “Modeling and comparison of dissolution profiles”. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13(2), pp. 123-133, 2001.
- CUNNINGHAM, M. F., “Living/controlled radical polymerizations in dispersed phase systems”. **Progress in Polymer Sciences**, v. 27, p. 1039, 2002
- DAMASCELLI, B.; CANTU, G.; MATTAVELLI, F, et al., “Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-007): phase II study of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck and anal canal: preliminary evidence of clinical activity”. **Cancer**, v. 92, p. 2592 – 602, 2001.
- DAVIES, C, PAN, H., GODWIN, J. *et al.*, “Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised Trial”. **The Lancet**, v. 381 (9869), pp. 805-816, 2013.
- DAVIS K A, MATYJASZEWSKI K, “Effect of (pseudo)halide initiators and copper complexes with non-halogen anions on the atom transfer radical polymerization”. **Journal of Macromolecular Science: Pure and Applied Chemistry** V. .A41, p. 449–65, 2004.
- DESAI ,N; TRIEU, V; YAO, Z; LOUIE, L.; CI, S.; YANG, A.; TAO, C.; DE, T.; BEALS, B.; DYKES, NOKER, P.; YAO, R.; LABAO, E.; HAWKINS, M., SOON-SHIONG, P., “Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel”. **Clinical Cancer Research** ,v. 12, p. 1317 – 24, 2006.
- DONOVAN, M. S.; LOWE, A. B.; STANFORD, T. A.; MCCORMICK, C. I. “Sulfobetaine-containing diblock and triblock copolymers via RAFT polymerization in aqueous media”. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 41, p. 1262-1281, 2003.
- DRANITSARIS, G., COLEMAN, R., GRADISHAR, W.J. “Nab-Paclitaxel weekly or Q3Wks compared to Docetaxel Q3Wks as first-line therapy in patients with metastatic breast cancer: an economic analysis of a prospective randomized trial”. **European Journal of Cancer Supplements**, vol. 5, p. 219, 2007.

- EARLY BREAST CANCER COLABORATIVE GROUP “Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: Patient-level meta-analysis of randomised trials”. **The Lancet**, v.378 (9793), pp. 771-784, 2011
- EL ARINI, S. K., LEUENBERGER, H. “Modeling of drug release from polymer matrices: effect of drug loading”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 121(25), pp. 141-148, 1995.
- EL-AASSER M.S.; MILLER C.M., “Preparation of Latexes Using Miniemulsions, em Polymeric Dispersions: Principles and Applications“, Kluwer Academic Publishers, 109-126, 1997.
- EL-JABY, U.; FARZI, G.; BOURGEAT-LAMI, E.; CUNNINGHAM, M.; MCKENNA, T. F., L. “Emulsification for latex using static mixers“. **Macromolecular Symposia**, v. 281, p. 77 - 84, 2009.
- ELOGHBY, A. O., SAMY, W. M., ELGINDY, N. A., “Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems“. **Journal of Controlled Release**, p. 168–182, 2012.
- ELZOGHBY, A. “Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research”. **Journal of Controlled Release**, v. 172 (3), pp. 1075-1091, 2013.
- ESPUELAS, M.S., LEGRAND, P., IRACHE, J.M., GAMAZO, C., ORECCHIONI, A.M., DEVISSAGUET, J.P., YGARTUA, P. “Poly(o-caprolactone) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin-B toxicity“. **International Journal of Pharmaceutics**, v.58, p. 19-27, 1997.
- FACINA, G., BARACAT, E., LIMA, G. *et al.*, “Efeito de diferentes doses de tamoxifeno sobre a proliferação celular do epitélio mamário”. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25 (3), PP. 185-191, 2003.
- FAN, P., JORDAN, V. C., “Acquired resistance to selective estrogen receptor modulators (SERMs) in clinical practice (tamoxifen & raloxifene) by selection pressure in breast cancer cell populations”. **Steroids**, v. 90, pp.40-52, 2014.
- FANCIULLINO, R., CICCOLINI, J., MILANO, G. “Challenges, expectations and limits for nanoparticles-based therapeutics in cancer: A focus on nano-albumin-bound drugs”. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.88 (3), pp. 504-513, 2013.
- FANG, J., NAKAMURA, H., MAEDA, H. “The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect”. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, pp. 136-151, 2011.
- FARAJI, A., WIPF, P. “Nanoparticles in cellular drug delivery”. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, vol. 17 (8), pp. 2950-2962, 2009

Farmacopéia Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FONSECA, G. E.; MCKENNA, T. F.; DUBÉ, M. A. “Minuieusio vs. Convetional emulsion polymerization for pressure-sensitive adhesives production”. **Chemical Engineering Science**, v. 65, pp. 2797-2810, 2010.

FONSECA, L. B.; PINTO, J. C. S.; VOLPATO, N. M. “Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo Praziquantel para o tratamento da esquistossomose”, Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2012.

FOOTE, M. A. Using nanotechnology to improve the characteristics of antineoplastic drugs: Improved characteristics of nab-paclitaxel compared with solvent-based paclitaxel“. **Biotechnology Annual Review**, vol. 13, p. 345-357, 2007.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B., “Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of art of microespheres preparation process technology“. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 313 - 332, 2005.

GAIL, M., COSTANTINO, J., BRYANT, J. *et al.* “Whighing the risks and benefits of tamoxifen Treatment for preventing breast cancer” **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91 (21), pp. 1829-1846, 1999.

GAWRYS, O., POLKOWSKA, M., ROSZKOWSKA-CHOJECKA, M. *et al.* “Effects of liposomes with polyisoprenoids, potential drug carriers, on the cardiovascular and excretory system in rats”. **Pharmacological Reports**, v. 80 (1), PP.52-57, 2015.

GEORGES, M. K.; VEREGIN, R. P. N.; KAZMAIER, P. M.; HAMER, G. K. “Narrow molecular weight resins by a free-radical polymerization process“. **Macromolecules**, v. 26, p. 2987, 1993.

GEWEFEL, H., SALHIA, B. “Breast Cancer in Adolescent and Young Adult Women”. **Clinical Breast Cancer**, v. 14 (6), pp.390-395, 2014.

GIULIANO, S., PAGES, G., “Mechanisms of resistance to anti-angiogenesis therapies”. **Biochimie**, v. 95 (6), pp. 1110-1119, 2013.

GLUCK, S., LOBO, C., LOPES, G., CASTRELLON, A., HURLEY, J., REIS, I., RICHMAN, S., SILVA, O., SLINGERLAND, J., “Final results of a phase II study of combination with nab-paclitaxel, bevacizumab, and gemcitabine as first-line therapy in patients with HER2-negative metastatic breast cancer“. **European Journal of Cancer Supplements**, vol. 8, p. 196-205, 2010.

- GODINHO, B., OGIER, J., QUINLAN, A. *et al.* "PEGylated cyclodextrins as novel siRNA nanosystems: Correlations between polyethylene glycol length and nanoparticle stability". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473 (1-2), PP.105-112, 2014.
- GOODING, M., MALHOTRA, M., MCCARTHY, D. *et al.* "Synthesis and characterization of rabies virus glycoprotein-tagged amphiphilic cyclodextrins for siRNA delivery in human glioblastoma cells: in-vitro analysis". **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, PP. 80-92, 2015.
- GRAHAME-SMITH, D. G.; ARONSON, J. K. "Interações medicamentosas. Tratado de Farmacologia Clínica e Farmacoterapia". 3. Ed, Guanabara Koogan, cap. 10, 2002.
- HALEY, B. FRENKEL, E. "Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment". **Urologic oncology**, v. 26 (1), pp. 57-64, 2008.
- HALL, P., WALKINGTON, J., CAMERON, D. "Stopping Tamoxifen after 5 Years of Therapy for Early Breast Cancer: Does it Alter Quality of Life?". **Clinical Oncology**, v. 23 (9), pp.652, 2011.
- HARDMAN, J.G., LIMBIRD, .LE., GILMAN, A.G. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, 10th edition, 2001, New York.
- HAWKINS, M. J., SOON-SHIONG, P., DESAI, N "Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine", **Advanced Drug Delivery. Reviews**, v. 60, pp. 876–885 2008.
- HEREDIA K, BONTEMPO D, LY T *et al.*. " In situ preparation of protein-"smart" polymer conjugates with retention of bioactivity". **Journal of the American Chemical Society**, vol: 127 (48,) pp: 16955-16960, 2005
- HERMANSON, G. T. Bioconjugate Techniques, Second Edition, 2nd Edition, Academic Press, New York, p. 164-165.
- HOLA, K., MARKOVA, G., ZOPPELLARO, G., *et al.* "Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances". **Biotechnology Advances**, *In Press*, 2015.
- HULKA, B., MOORMAN, P. "Breast cancer: Hormones and other risk factors". **Maturitas**, v. 61 (1), pp. 203-213, 2008.
- HUSSAIN, N.; JAITLEY, V.; FLORENCE, A. T. "Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics". **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 107-142, 2001.

- INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA), Mama
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/mama/cancer_mama ,
 Acessado em 18 de março de 2015.
- JABR-MILANE, L., VAN VLERKEN, L., DEVALAPALLY, H., *et al.* “Multi-funcional nanocarriers for target delivery of drugs and genes”. **Journal of Controlled Release**, v. 130 (2), pp. 121-128, 2008.
- JENNING, V.; THUNEMANN, A. F.; GOHLAA, S.H.; “Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carriersystem based on binary mixtures of liquid and solid lipids”. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 199, p.167–177, 2000.
- JENQUIN, M. R., MCGINITY, J. W., “Characterization of acrylic resin matrix films and mechanisms of drug-polymer interactions”. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 199 p.167–177, 2000
- KAMAL, J.K.A., ZHAO, L., ZEWAİL, A. H.” Ultrafast hydration dynamics in protein unfolding: Human serum albumin”. **PNAS** , vol. 101 (37), pp. 13411–13416, 2004.
- KATSETOS, C. D, DRÁBER, P. “Tubulins as therapeutic targets in cancer: from bench to bedside”. **Current Pharmaceutical Design**, v.18, pp. 2778–2792, 2012.
- KAWAK, Y.; GOTO, A.; TSUJII, Y.; MURATA, Y.; KOMATSU, K.; FUKUDA, T.; “A kinetic study on the rate retardation in radical polymerization of styrene with addition-fragmentation chain transfer”. **Macromolecules**, v. 35, p. 3026-3029, 2002.
- KEDAR, U., PHUTANE, P., SHIDHAYE, S. *et al.*, “Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting”. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6 (6), PP.714-729, 2010.
- KHAN, S.N., KHAN, A.U. “Computational Simulation of Mitoxantrone Binding with Human Serum Albumin”. **Journal of Proteomics & Bioinformatics**, vol. S1, p. S017-S020, 2008.
- KIM, B.; HWANG, S.; PARK, J.; PARK, H., “Preparations and Characterization of drug loaded polymethacrylate microspheres by an emulsion solvent evaporation method”. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, p. 179 - 186, 2006.
- KITZMILLER, E.L.; MILLER, C.M.; SUDOR, E. D.; EL-AASSER, M.S., Miniemulsion polymerization: an approach to control copolymer composition. *Macromolecules Symposium*, v. 92, p. 157 - 168, 1993.
- KOUKOURAKIS, M.I., GIATROMANOLAKI, A., BREKKEN, R.A., SIVRIDIS, E., GATTER, K.C., HARRIS, A.L., “Enhanced expression of SPARC/osteonectin in the tumor-associated stroma

- of non-small cell lung cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with poor prognosis of patients”. **Cancer Research**, vol. 63, p.5376–80, 2003.
- KREUTER, J., SPEISER, P., “In vitro studies of poly(methylmethacrylate) adjuvants. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, pp. 1624–1627, 1976.
- KRISHNA, R.; MAYER, L. D. “Multidrug resistance in cancer mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs”. **European Journal of Cancer Sciences**, v. 11, p. 265-283, 2000.
- KRUGER, N. “The Bradford method for protein quantification”. **Methods in. Molecular Biology**, v.32, p.9-15, 1994
- KUMARI, A., YADAV, S.K., YADAV, S.C. “Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems”, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 75, p. 1-18, 2010.
- LAI, J. T., FILLA, D.; SHEA, R.; “Funcional polymers from novel carboxyl-terminated trithiocarbonates as highly efficient RAFT agents”, **Macromolecules**, v. 35, p. 6754-6756, 2002.
- LANDFESTER, K., “Polyreactions in miniemulsions”. **Macromolecular Rapid Communication**, v. 22, p. 896-936, 2001.
- LANDFESTER, K., “Recent developments in miniemulsions – Formation and stability mechanisms”. **Macromolecular Symposia**, v. 150, p.171 - 178, 2000.
- LANDFESTER, K.; BECHTHOLD, N.; FRANCA, T.; ANTONIETTI, M., “Formulation and stability mechanisms of polymerizable miniemulsions”. **Macromolecules**, v. 32, p. 5222 - 5228, 1999.
- LANDFESTER, K.; BECHTOLD, N.; FORSTER, S.; ANTONIETTI, M. “Evidence for the preservation of the particle identity in miniemulsion polymerization”. **Macromolecular Rapid Communication**, v. 20, p. 81, 1999.
- LANDFESTER, K.; BERCHTHOLD, N.; TIARKS, F.; ANTONIETTI, M., “Miniemulsion Polymerization with cationic and nonionic surfactants: a very efficient use of surfactants for heterophase polymerization”. **Macromolecules**, v. 32, p. 2679 - 2683, 1999.
- LEE, B., LIEDKE, P., BARRIOS, C. *et al.* “Breast cancer in Brazil: Present status and future goals”. **The Lancet Oncology**, v. 13 (3), pp.95-102, 2012.
- LEE, B., YUN, Y., PARK, K. “Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities”. **Chemical Engineering Science**, V. 125, PP. 1-7, 2014.

- LEE, S.H.; HENG, D.; NG, W.K.; CHAN, H.K.; REGINALD, B.H., “Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, p. 192 – 200, 2011.
- LI, M., DE, P., LI, H. *et al.*, “Conjugation of RAFT-generated polymers to proteins by two consecutive thiol–ene reactions”. **Polymer Chemistry**, v. 6 (1), pp. 854, 2010.
- LIETCHY, W., PEPPAS, N. “Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy”, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, pp. 241-246, 2012.
- LIM, M.S.; CHEN, H., “Miniemulsion polymerization of styrene with a block copolymer surfactant”. **Journal of Applied Polymer Science Part A: Polymeric Chemistry**, v. 38, p. 1818 - 1827, 2000.
- LIU J, BULMUS V, HERLAMBANG D, *et al.* “In situ formation of protein-polymer conjugates through reversible addition fragmentation chain transfer polymerization”. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, vol: 46 (17), pp: 3099-103, 2007
- LIU, J., BULUMUS, V., HERLAMBANG, C *et al.* “Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerization”. **Angewandte Chemie**, V.46 (17), pp 3099–3103, 2007.
- LLUCH, A., ALVAREZ, I., MUNOZ, M. “Treatment innovations for metastatic breast cancer: Nanoparticle albumin-bound (NAB) technology targeted to tumors”. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 89 (1), p.62-72, 2014.
- LORCA, B. S. S. BESSA, E. S. NELE< M., SANTOS, E. P., PINTO, J. C. S. “Preparation of PMMA Nanoparticles Loaded with Benzophenone-3 through Miniemulsion Polymerization”. **Macromolecular Symposia**, v.319 (1), pp. 246-250, 2012.
- LOWE, A. B.; MCCORMICK, C. L.; “Reversible addition-fragmentation chain copolymers under homogeneous conditions in organic and aqueous media”. **Progress in Polymer Sciences**, v. 32, p. 283-351, 2007.
- MAEDA, H. “Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond”. **Journal of Controlled Release**, v. 164 (2), pp. 138-144, 2012
- MAEDA, H., “Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity”. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *In Press*, 2015.
- MAEDA, H., BAHARATE, G. DARUWALLA, J. “Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect”. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71 (3), PP.409-419, 2009.

- MAEDA, H., NAKAMURA, H., FANG, J. “The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo”. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, (1), 71-79, 2013.
- MAEDA, H.; SAWAA, T; KONNOB, T., “Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS”, “ v. 74, p. 47 – 61, 2001.
- MANEA, M; CHEMTOB, A.; PAULIS, M.; DE LA CAL, J. C.; BARANDIARAN, M. J.; ASUA, J. M. Miniemulsification in High-Pressure Homogenizers”. **AIChE Journal** v. 54, p 289, 2008.
- MANGANIELLO, A., HOGA, L., ROBERTE, L. *et al.*, “Sexuality and quality of life of breast cancer patients post mastectomy”. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 15 (2), PP.167-172, 2011.
- MARRERO-ALONSO, J., MORALES, B., GARCIA MARRERO, B. *et al.*, “Unique SERM-like properties of the novel fluorescent tamoxifen derivative FLT_X1”. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, PP. 898-910, 2013
- MARTA, G., HANNA, S., MARTELLA, E *et al.* “Câncer de mama estágio inicial e radioterapia: atualização”. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57(4), pp. 468-474, 2011.
- MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. “A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS”. **Cancer Research**, v. 46, p. 6387-6392, 1986.
- MATYJASZEWSKI, K.; “Advances in controlled/living radical polymerization”. **American Chemical Society**: Washington, D. C., vol. 854, 2004.
- MAYADUNNE R T A, RIZZARDO E, CHIEFARI J, CHONG Y K, MOAD G, THANG S H, “Living Radical Polymerization with Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT Polymerization) Using Dithiocarbamates as Chain Transfer Agents”, **Macromolecules**, v. 32, p. 6977-6980, 1999.
- MCCORMICK, C. L.; LOWE, A. B., “Aqueous RAFT polymerization: recent development in synthesis of functional water soluble polymers with controlled structures”. **Accounts of Chemical Research**, v. 37, p. 312-325, 2004.
- MIELE, E.; SPINELLI, G.P.; TOMAO, F.; TOMAO, S. “Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer”. **International Journal of Nanomedicine**, v. 4, p. 99 – 105, 2009.
- MIRKIN, S., PICKAR, J., “Selective estrogen receptor modulators (SERMs): A review of clinical data”. **Maturitas**, v. 80 (1), pp.52-57, 2015.

- MISHRA, B. PATEL, B., TIWARI, S. "Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery" **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, V. 6 (1), pp. 9-24, 2010.
- MOAD, G., RIZZARDO, E., THANG, S.H. "Living Radical Polymerization by the RAFT Process – A Second Update", **Austrian Journal of Chemistry**, vol. 62, p.1402–1472, 2009
- MOAD, G., RIZZARDO, E., THANG, S.H. "Living Radical Polymerization by the RAFT Process – A First Update", **Austrian Journal of Chemistry**, vol. 59, p.1669-692, 2006
- MOAD, G., RIZZARDO, E., THANG, S.H., "Living Radical Polymerization by the RAFT Process", **Australian Journal of Chemistry**, vol. 58, p. 379, 2005
- MOAD, G.; CHONG, Y. K.; POSTMA, A.; RIZZARDO, E.; THANG, S. H., "Advances in RAFT polymerization: the synthesis of polymers with defined end-groups". **Polymer**, v. 46, p. 8458, 2005
- MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURAY, J. C.. "Long-Circulating and Target- Specific Nanoparticles: Theory to Practice". **Pharmacological Reviews**,. v.53 (2), pp.283-318, 2001.
- MOREIRA, J. C; WANG, H. S. "Síntese de Copolímeros em Bloco de p-Acetoxiestireno com Isopreno através de Polimerização "Viva" Via Radical Livre Polímeros". **Ciência e Tecnologia**, v. 14, p. 171-175, 2004.
- MOREIRA, J. C; WANG, S. H "Synthesis of block copolymers from p-acetoxystyrene and isoprene by "living" free radical polymerization". **Polímeros: Ciência e Tecnologia**; v. 14, p. 171-175, 2004
- MORI Y, KAWAGUCHI H.; "Impact of initiators in preparing magnetic polymer particles by *miniemulsion* polymerization". **Colloid Surface B** , 56: 246–254, 2007
- MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRAT, G. "Poly (D, L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties". **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, pp. 614-626, 2000.
- MOSQUERA, L., COLÓN, J., SANTIAGO, J. *et al.* "Tamoxifen and estradiol improved locomotor function and increased spared tissue in rats after spinal cord injury: Their antioxidant effect and role of estrogen receptor alpha". **Brain Research**, v. 1561, pp. 11-22, 2014.
- MULYE, N. V., TURCO, S. J. "A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dihydrate matrices". **Drug Dev.Ind. Pharm.**, New York, v. 21, n. 8, p. 943-953, 1995.

- NAIR, L.S; LAURENCIN, C.T., “Biodegradable polymers as biomaterials”. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 762 - 798, 2007.
- NAKACHE, E., POULAIN, N., CANDAU, F., *et al.* “Biopolymer and Polymer Nanoparticle and their Biomedical Applications” In: *Handbook of Nanostructured Materials and Nanotechnology*, v. 5: Organics, **Polymers and Biological Materials**, Academy Press, pp.537-635, 2000
- NGUYEN, S., HIORTH, M., RYKKE, M. *et al.*, “The potential of liposomes as dental drug delivery systems”. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77 (1), p.75-83, 2011.
- ODIAN, G G. “Principles of Polymerization”, John Wiley & Sons Publication, 4th edition, 2004, New York
- OFOEFULE, S. I., OKOLI, S. E., CHUKWU, A. “Mechanisms behind sustained release matrix tablets prepared with poly(acrylic) acid polymers”. **Acta Pharm.**, v. 50, n. 3, p. 229-238, 2000.
- OKUYAMA, K; ABDULLAH, M; LENGGORO, I.W.; ISKANDAR, F., “Preparation of functional nanostructured particles by spray drying Review Article” **Advanced Powder Technology**, v. 17, p. 587 – 611, 2006.
- OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, F. R.; FORMARIZ, T. P.. “Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos”. **Química Nova**, v. 27, p. 131 - 138, 2004.
- OLIVEIRA, M A M; PINTO, J. C. S.; NELE, M., MELO, P. A.,”In-Situ Incorporation of Amoxicillin in PVA/PVAc-co- PMMA Particles during Suspension Polymerizations”. **Macromolecular Symposia** , v. 299, p. 34–40, 2011a.
- OLIVEIRA, M A M; PINTO, J. C. S.; NELE, M., MELO, P. A., *Macromolecular Symposia*, *submitted*, 2012a.
- OLIVEIRA, M A M; PINTO, J. C. S.; NELE, M., MELO, P. A., “Produção de micropartículas e nanopartículas poliméricas para aplicações biomédicas em sistemas heterogêneos de polimerização”. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2011b.
- OLIVEIRA, M A M; PINTO, J. C. S.; NELE, M., MELO, P. A., “Suspension Copolymerization of Vinyl Acetate and Methyl Methacrylate in the Presence of Amoxicillin”. **Macromolecular Reaction Engineering**, p. 1-13, 2012b.
- ORÉFICE, R. L.; VILLANOVA, J. C. O., “Aplicações Farmacêuticas de Polímeros”. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 51-64, 2010.

- OSBORNE, C. K.; SCHIFF, R. “Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications”. **Journal of Clinical Oncology**, Houston, v. 23, p. 1616-1622, 2005.
- PAI, T. C., BARNER-KOWOLLIK, C.; DAVIS, T. P.; STENZEL, M. H. Synthesis of amphiphilic block copolymers based on polydimethylsiloxane via RAFT polymerization. *Polymer*, v. 45, p. 4383-4389, 2004.
- PARK, W. C.; JORDAN, V. C. “Selective estrogen receptor modulators (Serms) and their roles in breast cancer prevention”. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 2, p. 82-88, 2002.
- PATEL, R.P. PATEL, M.P., SUTHAR, A.M. “Spray drying technology: an overview” **.Indian Journal of Science and Technology**, vol.2, p. 44-47, 2009.
- PEIXOTO, A. C. B., PINTO, J. C. C., FERRAZ, H. C., “Funcionalização de nanopartículas poliméricas para liberação sítio-dirigida”. Dissertação de M. Sc. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2013.
- PERRIER S, TAKOLPUCKDEE P, “Macromolecular design via reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT)/xanthates (MADIX) polymerization”. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry** , v. 43, p 5347–5393, 2005.
- PERRIER S, TAKOLPUCKDEE P, MARS C A. “Reversible addition fragmentation chain transfer polymerization: end group modification for functionalized polymers and chain transfer agent recovery”. **Macromolecules**, v. 38, p.2033–2036, 2005.
- PERRIER, S.; TAKOLPUCDEE, P.; WESTWOOD, J.; LEWIS, D. M. “Versatile Chain Transfer Agents for Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerization to Synthesize Functional Polymeric Architectures”. **Macromolecules**, v. 37, p. 2709-2717, 2004.
- PINOTTI, J. A.; BARROS, A. C. S. D. “Carcinoma de mama. Em Ginecologia Moderna: condutas da clínica ginecológica da faculdade de medicina da USP”. Rio de Janeiro: Revinter, cap. 63, 2004.
- PIRMA, I., “Emulsion Polymerization”. Academic Press, New York, 1982.
- PLAPIED, L., DUHEM, N., DES RIEUX, A. *et al.*, “Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery”. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 16, pp.228-237, 2011.
- QIU, J.; CHARLEUX, B.; MATYJASZEWSKI, K. “Controlled/living radical polymerization in aqueous media: homogeneous and heterogeneous systems”. **Progress in Polymer Sciences**, v. 26, p. 2083, 2001.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; Farmacologia, Editora Guanabara Koogan, 4ª edição, Rio de Janeiro, 2001.

- RAO, J., GECKELER, K. "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters" **Progress in Polymer Science (Oxford)**, V. 36 (7), pp. 887-913, 2011.
- REFUERZO, J., ALEXANDER, J., LEONARD, F. *et al.*, "Liposomes: a nanoscale drug carrying system to prevent indomethacin passage to the fetus in a pregnant mouse model". **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, *In Press*, 2015.
- ROBERT, N.J.; VOGEL, C.L.; HENDERSON, I.C., "The role of the liposomal anthracyclines and other systemic therapies in the management of advanced breast cancer". **Seminars in Oncology**, v. 31, p. 106 – 46, 2004.
- RUSSELL, G.T.; GILBERT, R.G.; NAPPER, D.H., "Chain-length-dependent termination rate processes in free-radical polymerization. 1. Theory". **Macromolecules**, v. 25, p. 2459 – 69, 1992.
- SALAMON, J. L., DOELKER, E. "Formulation of prolonged release tablets.Part 1.Inert matrices". **Pharmaceuticals Acta Helv**, v. 55(6), pp. 174-182, 1980.
- SAMAVAT, H., KURZER, M., "Estrogen metabolism and breast câncer". **Cancer Letters**, v. 356 (2), pp.231-243, 2014
- SARMAHA, J. K, MAHANTAB, R., BHATTACHARJEEA, S. K.; MAHANTAC, R.; BISWASD, "A.Controlled release of tamoxifen citrate encapsulated in cross-linked guar gum". **International Journal of Biological Macromolecules** vol. 49, p. 390– 396, 2011.
- SAWALHA, H., SCHROEN, K., BOOM, R., "Biodegradable polymeric microcapsules: Preparation and properties". **Chemical Engineering Journal**, V. 169 (1-3), pp. 1-10, 2011
- SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. "Caracterização e eatabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos". **Química Nova**, v. 26 (5), p. 726-737, 2003
- SCHWAB, F., HUANG, D., SCHMID, S. *et al.* "Self-detection and clinical breast examination: Comparison of the two "classical" physical examination methods for the diagnosis of breast cancer". **The Breast**, v. 24 (1), pp.90-92, 2015.
- SCOOT, A., WOLCHOK, J., OLD, L., "Antibody therapy of cancer".**Nature Reviews Cancer**, v, 12 (4), pp.278-287, 2012.
- SEVERINO, P., SANTANA, M. H.A., PINHO, S.C., SOUTO, E.B., "Biodegradable synthetic polymers: raw-materials and production methods of microparticles for drug delivery and controlled release" . **Polímeros**, v. 21 (4), pp. 286-292, 2011.

- SHENOY, D., AMIJI, M. "Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer". **International journal of pharmaceutics**, V. 293, pp. 261-270, 2005.
- SHIN S.C., CHOI J.S. "Effects of epigallocatechin gallate on the oral bioavailability and pharmacokinetics of tamoxifen and its main metabolite, 4-hydroxytamoxifen, in rats". **Anticancer Drugs**, v. 20, p.584, 2009.
- SIEUWERTS, A., LYNG, M., MEIJER-VAN GELDER, M. *et al.*, "Evaluation of the ability of adjuvant tamoxifen-benefit gene signatures to predict outcome of hormone-naive estrogen receptor-positive breast cancer patients treated with tamoxifen in the advanced setting" **Molecular Oncology**, v. 8 (8), pp. 1679-1689, 2014.
- SILVA, A., SERAKIDES, R., CASSALIS, G. D., "Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes". **Ciência Rural**, v. 34 (2), PP. 625-633, 2004.
- SINGH, R., LILLARD, J. "Nanoparticle-based targeted drug delivery". **Experimental and molecular pathology**, V. 86 (3), pp. 245-223, 2009.
- SIRÉN, M., VAINIOMÄKI, K., VÄÄNÄNEN, K. *et al.*, "α-Trinositol inhibits FGF-stimulated growth of smooth muscle and breast cancer cells". **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 325 (3), PP. 691-697, 2004.
- SONG, Y., CHEN, L., "Effect of net surface charge on physical properties of the cellulose nanoparticles and their efficacy for oral protein delivery". **Carbohydrate Polymers**, V. 121, PP. 10-17, 2015.
- SOUNDERYA, N., ZHANG, Y. "Use of Core/Shell Structured Nanoparticles for Biomedical Applications". **Recent Patents on Biomedical Engineering**, V. 1, pp 34-42, 2008.
- STELLA, B.; ARPICCO, S.; PERACCHIA, M. T.; DESMAELE, D.; HOEBEKE, J.; RENOAIR, M.; D'ANGELO, J.; CATTEL, P. C.; "Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting". **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 1452-1464, 2000.
- STENZEL, M. H. "RAFT polymerization: an avenue to functional polymeric micelles for drug delivery". **Chemical communications**, v.30, p.3486-3503, 2008.
- STENZEL, M. H.; BARNER-KOWOLLIK, C.; DAVIS, T. P.; DALTON, H. "Amphiphilic Block Copolymers Based on Poly(2-acryloyloxyethyl phosphorylcholine) Prepared via RAFT Polymerisation as Biocompatible Nanocontainers" **Macromolecules and Bioscience**, v. 4, p. 445–453, 2004

- STOJANOV, M., NIELSEN, H., LARSEN, K., “Cyclodextrins: Efficient biocompatible solubilizing excipients for bromhexine liquid and semi-solid drug delivery systems”. **International Journal of Pharmaceutics**, V. 422 (1-2), PP. 349-355, 2012.
- STRAUBINGER, R.M.; LOPEZ, N.G.; DEBS, R.J.; HONG, K., “Papahadjopoulos D. Liposomebased therapy of human ovarian cancer: parameters determining potency of negatively charged and antibody-targeted liposomes”. **Cancer Research**, v. 48, p. 5237–4525, 1988.
- SUN, P., ZHOU, D., GAN, Z., “ Novel reduction-sensitive micelles for triggered intracellular drug release”. **Journal of Controlled Release**, v. 155, pp. 96-103, 2011.
- TAHA, M., CHAI, F., BLANCHEMAIS, N. *et al.*, “Validating the poly-cyclodextrins based local drug delivery system on plasma-sprayed hydroxyapatite coated orthopedic implant with toluidine blue O”. **Materials Science and Engineering C**, v. 33 (5), pp. 2639-2647, 2013.
- TAUER K, HERNANDEZ, F. “Mechanism and Modeling of Emulsion Polymerization: New Ideas and Concepts - 2. Modeling Strategies”. **Macromolecular Symposia**, vol. 288, p. 9-15, 2010.
- TEO B.M.; PRESCOTT, S.W.; ASHOKKUMAR, M.; GRIESER, F., “Ultrasound initiated miniemulsion polymerization of methacrylate monomers”. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15,,p. 89 - 94, 2008.
- The ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) Trialists' Group. “Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial”. **The lancet**, v. 359, pp. 2131-2139, 2002
- THEIS, A.; STENZEL, M. H.; DAVIS, T.P.; COOTE, M. L.; KOWOLLIK-BARNER, C. “A synthetic approach to a novel class of fluorine-bearing reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) agents: F-RAFT”. **Australian Journal of Chemistry**, v. 58, p. 437-441, 2005.
- THICKETT, S.C.; GILBERT, R.G., “Emulsion polymerization: State of the art in kinetics and mechanisms”. **Polymer**, v. 48, p. 6965 - 2007.
- TSAVALAS, J. G.; SCHORK, F. J.; DE BROUWER, H.; MONTEIRO, M. J. “Living Radical Polymerization by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer in Ionically Stabilized Miniemulsions”. **Macromolecules**, v.34, p. 3938, 2001.
- TSUHAKO, M.; KOJIMA, T.; FATO, F.; TERAOKA, R.; MATSUDA, Y.; KITAGAWA, S., “Physicochemical characterization of tamoxifen citrate pseudopolymorphs, methanolate and ethanolate”. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 55, p. 407-11, 2007.

- UCHEGBU, I. F., SCHATZLEIN, A. G. "Polymers in Drug Delivery Polymeric Nanoparticles as Drug Carriers". 1th edition, Ed. CRC Taylor & Francis Group, 2006.
- USP, USP UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, NF 37, 2014.
- VANDERHOFF, J. W.; EL ASSER, M. S.; UGELSTAD, Journal of Polymer emulsification process. US Patent 4, 177,177, 1979.
- VARDE, N. K.; PACK, D. W., "Microspheres for controlled release drug delivery". **Expert Opinion on Biological Therapy**, v.4, p. 1 - 17, 2004.
- VARELAS, C. G., DIXON, D. G., STEINER, C. A. "Zero-order release from biphasic polymer hydrogels". **Journal of Controlled Release** , v. 34, pp. 185-192, 1995.
- VASILIEVA, Y. A.; SCALES, C. W.; THOMAS, D. B.; EZELL, R. G.; LOWE, A. B.; AYRES, N.; MCCORMICK, C. L. "Controlled/living polymerization of methacrylamide in aqueous media via RAFT process". **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 43, p. 3141-3152, 2005.
- VASIR, J.K.; LABHASEWAR, V., "Targeted drug delivery in cancer therapy". **Technology in Cancer Research and Treatment**, v. 4, p. 363 – 74, 2005.
- VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K.," Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles". **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1025 - 1058, 2008.
- VIDEIRA, M., REIS, R., BRITO, M. "Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance.. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1846 (2), pp. 312-325, 2014.
- VIDYASAGAR, K., "Polymer Nanoparticles: Newer Strategies towards Targeted Cancer Therapy". **Journal of Physical Chemistry & Biophysics**, v. 3 (4), pp.4-6, 2013.
- VIEIRA, R., LOURENÇO, T., MAUAD, E. *et al.* "Barriers related to non-adherence in a mammography breast-screening program during the implementation period in the interior of São Paulo State, Brazil". **Journal of Epidemiology and Global Health**, *In Press*, 2015.
- VOSLOO, J. J.; WET-ROSS, D.; TONGE, M. P.; SANDERSON, R. D. "Controlled Free Radical Polymerization in Water-Borne Dispersion Using Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer". **Macromolecules**, v. 35, p. 4894-4902, 2002.
- WATKINS, G., DOUGLAS-JONES, A., BRYCE, R., "Increased levels of SPARC (osteonectin) in human breast cancer tissues and its association with clinical outcomes". **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, vol.72, p.267–72, 2005.
- WIEBER, A., SELZER, T., KREUTER, J. "Characterisation and stability studies of a hydrophilic decapeptide in different adjuvant drug delivery systems: A comparative study of PLGA

- nanoparticles versus chitosan-dextran sulphate microparticles versus DOTAP-liposomes”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 421 (1), PP.151-159, 2011.
- WILCZEWSKA, A., NIEMIROWICZ, K., MARKIEWICZ, K. *et al.* “Nanoparticles as drug delivery systems”. **Pharmacological Reports**, v. 64 (5), pp. 1020-1037, 2012.
- WILTING, R., DANNENBERG, J., “Epigenetic mechanisms in tumorigenesis, tumor cell heterogeneity and drug resistance”. **Drug Resistance Updates**, v. 15 (1-2), pp. 21-38, 2012.
- WISEMAN, H., LAUGHTON, M., ARNSTEIN, H. *et al.*, “The antioxidant action of tamoxifen and its metabolites: Inhibition of lipid peroxidation”. **FEBS Letters**, v. 263 (2), pp. 192-194, 1990.
- World Health Organization. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. *Rev Panam Salud Publica*, v;12, p. 366 - 70, 2002.
- WU, J.; AKAIKE, T.; HAYASHIDA, K.; OKAMOTO, T.; OKUYAMA, A.; MAEDA, H.; “Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxynitrite and matrix metalloprotenases”. **Japanese Cancer Research**, v. 92, p. 439-451, 2001.
- XU, X., GE, X., ZHANG, Z. *et al.*, “Micromulsion polymerization of methyl methacrylate initiated with BPO. **European Polymer Journal**, v. 35 (11), pp.1975-1978, 1999.
- YAMAMOTO, Y., KAWANO I, , H. “Nab-paclitaxel for the treatment of breast cancer: efficacy, safety, and approval”. **Journal of OncoTargets and Therapy** v.4, pp.123–136, 2011.
- YANG, J., PARK, S., CHO, L. “Cost-effectiveness analysis of 5 years of postoperative adjuvant tamoxifen therapy for Korean women with breast cancer: Retrospective cohort study of the Korean breast cancer society database” **Clinical Therapeutics**, v. 32 (6), pp.1122-1138, 2010.
- YANG, L., LUO, Y., LIU, X., *et al.*, “RAFT miniemulsion polymerization of methylmetacrilate”. **Polymer**, v. 50 (18) pp. 4334-4342, 2009
- YORK, A. W.; KIRKLAND, S. E., Mc CORMICK, C. L., “Advances in the synthesis of amphiphilic block copolymers via RAFT polymerization: Stimuli-responsive drug and gene delivery”. **Advanced Drug Delivery Reviews**, V. 60, p. 1018–1036, 2008.
- YUE, W., YAGER, J., WANG, J. *et al.* “Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis”. **Steroids**, v. 78 (2), pp.161-170, 2013.
- YUSA, S.; SHIMADA, Y.; MITSUKAMI, Y.; YAMOTO, T.; MORISHIMA, Y. “pH responsive micellization of amphiphilic diblock copolymer synthesized via RAFT polymerization”. **Macromolecules**, v. 36, p. 4028-4215, 2003.
- ZELIKIN A, SUCH G, POSTMA A *et al.* “Poly(vinylpyrrolidone) for bioconjugation and surface ligand immobilization”. **Biomacromolecules**, vol: 8(9), pp: 2950-2953, 2007.

- ZETTERLUND, P., KAGAWA, Y., OKUBO, M. "Controlled/Living Radical Polymerization in Dispersed Systems". **Chemical Reviews.**, v.108, pp.3747–3794, 2008.
- ZETTERLUNG, P. B., KAGAWA, Y., OKUBO, M. Controlled/Living Radical Polymerization in Dispersed Systems. *Chemical Reviews*, v. 108, p. 3747-3894, 2008.
- ZHANG, Y., MILATOVIC, M., ASCHNER, M., *et al.*, "Neuroprotection by tamoxifen in focal cerebral ischemia is not mediated by an agonist action at estrogen receptors but is associated with antioxidant activity". **Experimental Neurology**, v. 204 (2), pp. 819-827, 2007.
- ZHANG, Z.; ZHANG, W.; ZHU, X.; CHENG, Z.; ZHU, J.; "Living/controlled free radical polymerization of MMA in the presence of cobalt(II) 2-ethylhexanoate: A switch from RAFT to ATRP mechanism". **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 45, p. 5722–5730, 2007.
- ZHOU, X., NI, P., YU, Z. "Comparison of RAFT polymerization of methyl methacrylate in conventional emulsion and miniemulsion systems". **Polymer**, v. 48 (21), pp.6262-6271, 2007.