

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Letícia Bueno Macedo

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* DE
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS pH-SENSÍVEIS CONTENDO
METOTREXATO**

Santa Maria, RS, Brasil

2017

Letícia Bueno Macedo

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* DE
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS pH-SENSÍVEIS CONTENDO METOTREXATO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração I - Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Clarice Madalena Bueno Rolim
Coorientadora: Dr^a. Daniele Rubert Nogueira Librelotto

Santa Maria, RS

2017

Letícia Bueno Macedo

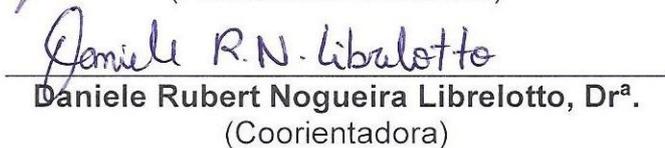
**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* DE
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS pH-SENSÍVEIS CONTENDO METOTREXATO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração I - Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 01 de setembro de 2017:



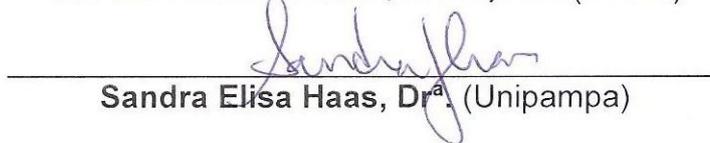
Clarice Madalena Bueno Rolim, Dr^a.
(Presidente/Orientador)



Daniele Rubert Nogueira Librelotto, Dr^a.
(Coorientadora)



Scheila Rezende Schaffazick, Dr^a. (UFSM)



Sandra Elisa Haas, Dr^a. (Unipampa)

Santa Maria, RS
2017

Dedico este trabalho à minha família, pela paciência, compreensão, estímulo e amor. Vocês foram essências nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida, por permanecer ao meu lado me ajudando a superar todos os desafios e principalmente por colocar no meu caminho tantas pessoas iluminadas, sem as quais não teria chegado aqui;

Aos meus pais, Sandero e Sandra, pelo carinho, respeito, paciência e amor incondicional. Por sempre apoiar minhas decisões, acreditar em mim e por todo esforço que fizeram para que estivesse aqui. Obrigada por me inspirarem diariamente a ser uma pessoa melhor;

À minha irmã Julia pela cumplicidade, carinho, apoio e incentivo. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos;

Aos meus avós Hildo e Neli, e também aos meus avós Aracy e Nilza que não estão mais fisicamente conosco. Obrigada pela sabedoria e pelo exemplo de honestidade e humildade;

À Professora Clarice, minha orientadora, pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa. Obrigada pelo apoio, disponibilidade e confiança;

À Daniele, minha coorientadora, pelos ensinamentos, apoio e confiança. Obrigada pela disponibilidade em esclarecer minhas dúvidas e pela dedicação durante o desenvolvimento e conclusão deste trabalho;

Aos meus colegas do LabCQ pelo companheirismo, amizade e compreensão. Pelas sugestões e por toda ajuda que recebi durante a realização deste trabalho. Obrigada pelas risadas e principalmente pelo apoio nos momentos mais difíceis;

Aos meus amigos, que longe ou perto me apoiaram e incentivaram. Obrigada pela amizade;

À Universidade federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de desenvolver e realizar este trabalho;

A todos que, mesmo não citados aqui, contribuíram para conclusão deste trabalho;

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos.

“As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.”
(Clarice Lispector)

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA IN VITRO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS pH-SENSÍVEIS CONTENDO METOTREXATO

AUTORA: Letícia Bueno Macedo
ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Clarice Madalena Bueno Rolim
COORIENTADORA: Dr^a Daniele Rubert Nogueira Librelotto

As terapias tradicionais de tratamento do câncer atuam de maneira inespecífica, resultando em efeitos adversos caracterizados pela perda da função das células normais. Portanto, o desenvolvimento de novos tratamentos que apresentem maior seletividade para o tecido neoplásico é muito importante para o progresso da terapia do câncer. Nos últimos anos, vários estudos mostraram que uma abordagem eficaz para aperfeiçoar a ação farmacológica dos fármacos é associar a molécula ativa com um sistema de liberação nanoestruturado. Esses novos sistemas de liberação têm o potencial de melhorar o índice terapêutico de diversos fármacos já disponíveis, aumentando a sua eficácia, diminuindo a sua toxicidade e atingindo níveis terapêuticos estacionários por um período prolongado. Nesse contexto, o principal objetivo deste trabalho foi desenvolver nanopartículas (NPs) poliméricas baseadas no polímero poli(ϵ -caprolactona) e modificadas com um tensoativo pH-dependente (77 KL), para encapsular o fármaco antitumoral metotrexato (MTX). Após a realização de um exaustivo estudo de formulação, as NPs foram otimizadas utilizando o tensoativo poloxâmero 407, que possui capacidade de melhorar a eficiência de encapsulação (EE) de sistemas nanoparticulados, bem como de diminuir a resistência de células tumorais. As NPs apresentaram tamanho médio de partícula, índice de polidispersão, e potencial zeta de 178,5 nm, 0,135, -1,98 mV, respectivamente. Um método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência foi desenvolvido e validado para a quantificação do MTX nas NPs. Os estudos de estabilidade e fotoestabilidade, a EE e o perfil de liberação *in vitro* do MTX encapsulado foram avaliados utilizando o método analítico validado. As NPs foram liofilizadas com 10% (p/v) de trealose, a fim de melhorar a estabilidade das NPs, e apresentaram EE de 20,52%. O perfil de liberação *in vitro* das NPs foi avaliado nos pH 7,4 e 5,4, apresentando liberação ligeiramente superior no pH 5,4. O potencial das NPs em romper as membranas celulares de modo pH-dependente foi estudado utilizando o eritrócito como modelo de membrana endossomal, sendo que os resultados obtidos evidenciaram que as NPs com 77 KL apresentaram atividade hemolítica superior nos pHs ácidos característicos dos compartimentos intracelulares. Além disso, determinou-se a atividade antitumoral *in vitro* das NPs, tanto em pH fisiológico como no pH característico do tecido tumoral (pH_e ~ 6,6), utilizando linhagens celulares tumorais (MCF-7 e HepG2) e diferentes ensaios de viabilidade celular (MTT e NRU). O MTX nanoencapsulado foi mais citotóxico que o MTX livre em ambas linhagens celulares e ensaios de viabilidade. Portanto, os resultados obtidos demonstraram que as NPs possuem propriedades pH-dependentes e uma atividade antitumoral *in vitro* superior ao fármaco livre, sugerindo sua potencial utilização na terapia antineoplásica.

Palavras chaves: Metotrexato. Nanopartículas pH-dependentes. Atividade biológica *in vitro*. Cultivo celular.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND IN VITRO BIOLOGICAL EVALUATION OF pH-RESPONSIVE METHOTREXATE-LOADED POLYMERIC NANOPARTICLES

AUTHOR: Letícia Bueno Macedo
ADVISOR: Prof^a Dr^a Clarice Madalena Bueno Rolim
CO-ADVISOR: Dr^a Daniele Rubert Nogueira Librelotto

The traditional cancer treatments act in a non-specific way, and cause side effects through loss of normal cell functions. Therefore, the development of new treatments with greater selectivity for the tumoral tissue is very important for the improvement of the anticancer therapy. In the last years, many studies have shown that an effective approach to enhancing the pharmacological action of drugs is conjugating the active molecule with a nanostructured delivery system. These new drug delivery systems have the capacity to improve the therapeutic index of several drugs, increasing the efficiency, decreasing the toxicity and achieving therapeutic indexes for an extended period. Therefore, the main objective of this research was to develop polymeric nanoparticles (NPs) with the polymer poli(ϵ -caprolactone) and incorporating the surfactant 77 KL as a pH-responsive adjuvant, in order to entrap the antitumor drug methotrexate (MTX). After an exhaustive formulation study, the NPs were optimized with the surfactant poloxamer 407 as a stabilizer, which has the capacity to improve the entrapment efficiency (EE) of nanoparticulate systems, as well as to decrease the resistance of tumor cells. The NPs showed mean hydrodynamic diameter, polydispersity index and zeta potential of 178.5 nm, 0.135, -1.98 mV, respectively. A high-performance liquid chromatography method was developed and validated to measure the MTX in the NPs. The stability and photostability assessments, the EE and the *in vitro* release studies of MTX were determined using the validated analytical method. The NPs were freeze-dried with trehalose at 10% (w/v) as a cryoprotectant to improve the NPs stability, showing EE of 20.52%. *In vitro* release studies were performed in media with pH 7.4 and 5.4, exhibiting slightly accelerated release patterns under acidic conditions. The pH-dependent membrane-lytic activity of NPs was assessed using the hemolysis assay, with the erythrocytes as a model of the endosomal membrane. The inclusion of 77KL on the formulation gives it a pH-sensitive membrane-lytic behavior in the acidic environment found in the intracellular compartments. Moreover, the *in vitro* antitumor activity of the NPs was evaluated in physiological pH and in the pH characteristic of the tumor tissue (pHe ~ 6.6), using tumor cell lines (MCF-7 and HepG2) and different cell viability assays (MTT and NRU). Our results proved that the nanoencapsulated MTX was more active against the tumor cell lines than the free drug, as determined by both viability assays. Therefore, the overall results indicated that the NPs have pH-sensitive properties and a greater *in vitro* antitumor activity than the free drug, suggesting that these nanodevices could be potentially useful as a carrier system in cancer therapy.

Keywords: Methotrexate. pH-sensitive nanoparticles. *In vitro* biological activity. Cell culture.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1 - Estrutura química do fármaco antitumoral metotrexato.....23
Figura 2 - Estrutura química do tensoativo aniônico 77 KL.....28

ARTIGO CIENTÍFICO

- Figura 1 - Perfil de liberação do MTX livre e encapsulado nos pHs 7,4 e 5,4. A estatística foi realizada usando ANOVA seguida do teste de Tukey. * diferença significativa em relação ao pH 7,4 ($p < 0,05$).....49
- Figura 2 - Percentual de hemólise obtido pelas NPs após 10 e 60 min de incubação com eritrócitos humanos em que (a) NPs sem MTX (concentrações equivalentes às NPs contendo o fármaco) e (b) NPs com MTX. Cada valor corresponde a média \pm DP de três experimentos independentes...52
- Figura 3 - Atividade lítica pH-dependente para as NPs com e sem MTX e 77KL, onde (a) NPs brancas sem 77KL, (b) NPs brancas com 77KL, (c) NPs com MTX sem 77KL e (d) NPs com MTX e com 77KL. Os resultados correspondem a média de três experimentos independentes \pm DP. A estatística foi realizada usando ANOVA seguida do teste de Tukey. ^a diferença significativa em relação ao pH 7,4 ($p < 0,05$) e ^b diferença significativa em relação ao pH 6,6 ($p < 0,05$). * diferença significativa em relação às NPs sem 77KL ($p < 0,05$).....54
- Figura 4 - Atividade lítica do MTX livre. Os resultados correspondem a média de três experimentos independentes \pm DP.....55
- Figura 5 - Efeitos citotóxicos do MTX livre e encapsulado em diferentes concentrações e ensaios de viabilidade (MTT e NRU). Os gráficos representam as viabilidades encontradas nas células (a) HaCaT, (b) MCF-7 e (c) HepG2. Os resultados correspondem a média de três experimentos independentes \pm DP. A estatística foi realizada usando ANOVA seguida do teste de Tukey. ^a diferença significativa em relação às células HaCaT ($p < 0,05$) e ^b diferença significativa em relação às células MCF-7 ($p < 0,05$). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ para diferença significativa em relação ao MTX livre.....57
- Figura 6 - Citotoxicidade obtida para as NPs brancas utilizando MTT e NRU nas linhagens celulares MCF-7, HepG2 e HaCaT.58
- Figura 7 - Viabilidade celular encontrada para as MCF-7 no pH 6,6. Os resultados correspondem a média de três experimentos independentes \pm DP. A estatística foi realizada usando ANOVA seguida do teste de t. ** diferença significativa em relação ao MTX livre ($p < 0,005$).....59
- Figura 8 - Teores obtidos após exposição do MTX livre e nanoencapsulado (NP MTX) à radiação UVA (a) e UVC (b).....60
- Figura 9 - Cromatograma obtido para fotodegradação do MTX livre na UVC em 8h onde (1) é o MTX e (2, 3 e 4) produtos de degradação.....60

RESULTADOS COMPLEMENTARES

- Figura 1 - Curva média e equação da reta obtidas para o MTX pelo método desenvolvido.....75
- Figura 2 - Cromatogramas obtidos na avaliação da especificidade do método analítico por CLAE. (1) NPs branca, (2) NPs com MTX (15 µg/mL) e (3) solução padrão MTX (15 µg/mL).76
- Figura 3 - Espectros obtidos na avaliação da especificidade do método analítico por CLAE. (1) NPs branca, (2) NPs com MTX (15 µg/mL) e (3) solução padrão MTX (15 µg/mL).76
- Figura 4 - Gráfico de Pareto.....78
- Figura 5 - Curva média e equação da reta obtidas para o MTX em PBS pH 7,4.80
- Figura 6 - Curva média e equação da reta obtidas para o MTX em PBS pH 5,4.80
- Figura 7- Gráficos obtidos na modelagem matemática das NPs em pH 5,4. (a) modelo monoexponencial e (b) modelo biexponencial.....81
- Figura 8- Gráficos obtidos na modelagem matemática das NPs em pH 7,4. (a) modelo monoexponencial e (b) modelo biexponencial.
- Figura 9 - Gráficos indicativos da ordem de reação para MTX livre na UVA (a), NP MTX na UVC (b) e MTX livre na UVC (c).83

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Tabela 1 - Caracterização físico-química das NPs.....	47
Tabela 2 - Valores obtidos na análise da modelagem matemática para as NPs com MTX nos pHs 5,4 e 7,4.	50
Tabela 3 - Caracterização das NPs liofilizadas.	51
Tabela 4 - Estabilidade das NPs liofilizadas contendo MTX.....	51

RESULTADOS COMPLEMENTARES

Tabela 1 - Condições dos testes de fase móvel.	68
Tabela 2 - Otimização da fase móvel.	68
Tabela 3 - Condições dos testes de fase móvel.	69
Tabela 4 - Otimização da formulação de nanopartículas através do método de nanoprecipitação utilizando o polímero PCL e os tensoativos Span 60 e Tween 80.	69
Tabela 5 - Otimização da formulação de nanopartículas através do método de emulsão evaporação do solvente utilizando o polímero PCL e acetona como solvente orgânico..	70
Tabela 6 - Otimização da formulação de nanopartículas através do método de dupla emulsão utilizando o polímero PCL e acetato de etila como solvente orgânico.	71
Tabela 7 - Otimização da formulação de nanopartículas através do método de nanoprecipitação utilizando o polímero PCL e o tensoativo poloxâmico.	72
Tabela 8 - Otimização da formulação de nanopartículas através do método de nanoprecipitação com adição de MTX solubilizado em ácido clorídrico (0,1M).	73
Tabela 9 - Otimização da formulação de nanopartículas através do método de nanoprecipitação utilizando o polímero PLGA e o tensoativo poloxâmico.	73
Tabela 10 - Otimização da formulação de nanocápsulas através do método de nanoprecipitação.....	74
Tabela 11 - Valores médios da área obtida para o MTX em função da concentração.	75
Tabela 12 - Parâmetros avaliados pela ANOVA para $p = 0,05$	75
Tabela 13 - Valores médios obtidos na avaliação da precisão do método.	77
Tabela 14 - Resultados obtidos na avaliação da exatidão.....	77
Tabela 15 - Parâmetros avaliados para determinação da robustez.	78
Tabela 16 - Valores médios da área obtida para o MTX em função da concentração em PBS pH 7,4.	79
Tabela 17 - Valores médios da área obtida para o MTX em função da concentração em PBS pH 5,4.	79
Tabela 18 - Valores obtidos pela modelagem monoexponencial para as NPs com MTX nos pHs 5,4 e 7,4.....	81
Tabela 19 - Caracterização das NPs liofilizadas durante 24 horas.....	82
Tabela 20 - Teor do MTX após fotodegradação UVA e UVC.	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

77 KL	N ^α ,N ^ε - dioctanoil lisina com contra-íon lítio
ACN	Acetonitrila
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
DHFR	Dihidrofolato-redutase
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EE	Eficiência de encapsulação
FBS	Soro fetal bovino
FM	Fase móvel
HaCaT	Linhagem celular de queratinócitos
HepG2	Linhagem celular de câncer hepático
HCl	Ácido clorídrico
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
MTX	Metotrexato
NPs	Nanopartículas
NRU	Corante vermelho neutro
PBS	Tampão fosfato salino
PCL	Poli (ε-caprolactona)
PDI	Índice de polidispersão
PEG	Poli(etilenoglicol)
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
PVA	Poli álcool vinílico
PZ	Potencial zeta
r	Coefficiente de correlação
r ²	Coefficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
THF	Tetrahidrofurano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 CÂNCER.....	21
3.2 METOTREXATO	22
3.2.1 Metodologias analíticas para quantificação de MTX	24
3.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	25
3.3.1 Polímeros.....	25
3.3.2 Tensoativos	26
3.3.3 Métodos de preparação de nanopartículas	28
3.3.4 Nanopartículas na terapia anticancerígena	29
3.4 LIOFILIZAÇÃO	32
3.5 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA IN VITRO DE NPS	33
4 ARTIGO CIENTÍFICO	35
1 INTRODUÇÃO	38
2 MATERIAIS E METODOS.....	39
2.1 MATERIAIS.....	39
2.2 TENSOATIVO COM PROPRIEDADES PH-DEPENDENTES ADICIONADO ÀS NPS	39
2.3 PREPARAÇÃO DAS NPS.....	40
2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NPS.....	40
2.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	41
2.6 LIBERAÇÃO IN VITRO DO FÁRMACO NANOENCAPSULADO.....	42
2.6.1 Modelagem matemática.....	43
2.7 LIOFILIZAÇÃO	43
2.8 ENSAIO DE HEMOCOMPATIBILIDADE	43
2.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PH-DEPENDENTE DAS NPS	44
2.10 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	44
2.11 FOTOESTABILIDADE	45
2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.1 PREPARAÇÃO DAS NPS.....	46
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NPS.....	46
3.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	48
3.3 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO IN VITRO	48
3.3.1 Modelagem matemática.....	49
3.4 LIOFILIZAÇÃO	50
3.5 ENSAIO DE HEMOCOMPATIBILIDADE	52
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PH-DEPENDENTE DAS NPS	53
3.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	55
3.8 FOTOESTABILIDADE	59
4 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62

5 RESULTADOS COMPLEMENTARES	67
5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO	67
5.2 DESENVOLVIMENTO DAS NPS	69
5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	74
5.3.1 Linearidade.....	74
5.3.2 Especificidade.....	76
5.3.3 Precisão	77
5.3.4 Exatidão	77
5.3.5 Robustez.....	77
5.4 LIBERAÇÃO	78
5.4.1 Modelagem matemática.....	80
5.5 LIOFILIZAÇÃO DAS NPS	82
5.6 FOTOESTABILIDADE	82
6 DISCUSSÃO GERAL	85
7 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma enfermidade altamente complexa, causada por um grupo de distúrbios heterogêneos, com propriedades biológicas diferentes, que se caracteriza pelo crescimento rápido de células anormais (FEINBERG; OHLSSON; HENIKOFF, 2006; WHO, 2014).

O metotrexato (MTX) vem sendo utilizado desde 1940 no tratamento de tumores sólidos e leucemias e, mais recentemente, como um agente imunossupressor em transplantes de órgãos e no tratamento de doenças autoimunes, tais como reumatismo e psoríase. O MTX caracteriza-se por ser um fármaco antineoplásico, análogo ao ácido fólico, que exerce ação farmacológica através da inibição competitiva da diidrofolato redutase (DHFR) (RUBINO, 2001).

Os tratamentos mais comuns para o câncer estão limitados à quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Entretanto, a eficácia clínica destes tratamentos segue sendo um desafio importante para o século XXI, devido à resistência do tumor aos fármacos utilizados e ainda pela ocorrência de inúmeros efeitos colaterais (JABIR et al., 2012; MISRA; ACHARYA; SAHOO, 2010). Neste contexto, há uma grande necessidade de desenvolvimento de tecnologias inovadoras que possam ajudar na obtenção de um tratamento mais eficiente contra as células cancerígenas.

A nanotecnologia tem sido utilizada com êxito em diferentes áreas especialmente, no desenvolvimento de carreadores para a administração de fármacos; demonstrando-se uma ferramenta útil para solucionar uma série de desafios que, no caso da tecnologia farmacêutica e da administração de fármacos, estão associados a baixa biodisponibilidade, estabilidade e solubilidade, efeitos adversos, entrega inespecífica, baixa eficácia terapêutica, níveis sanguíneos inconstantes e doses frequentes (ROCO, 2003). As nanopartículas poliméricas preparadas com polímeros sintéticos ou naturais são interessantes devido a sua estabilidade e facilidade de modificação de superfície. Portanto, é possível controlar a liberação do fármaco através da mudança das características do polímero e da superfície química do nanomaterial (SINGH; LILLARD, 2009). Além disso, o pH levemente ácido do tecido tumoral quando comparado ao tecido normal pode ser utilizado para desenvolver sistemas nanoestruturados pH-dependentes com maior potencial para liberar o fármaco no tecido tumoral, melhorando a especificidade da terapia anticancerígena (GANTA et al., 2008).

Desta maneira, o presente trabalho foi motivado pela necessidade de uma terapia antitumoral que atue de modo mais específico na célula cancerígena, sem prejudicar as células normais que circundam a região comprometida e que não promova o desenvolvimento de resistência pelo tecido tumoral. Nesse sentido, foram desenvolvidas nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) e poloxâmero 407 contendo metotrexato, sendo que essa associação para o desenvolvimento de nanoesferas é inédita na literatura. Além disso, foi adicionado às NPs o 77KL, um adjuvante com propriedades pH-dependentes, já que este pode promover uma maior eficiência para a liberação do fármaco a nível intracelular (pH ~ 6,6 e 5,4) (AKAGI; KIM; AKASHI, 2010; NOGUEIRA et al., 2011a, 2014b) e/ou a nível do espaço extracelular do tecido tumoral (pH_e ~ 6,6) (LEE et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2013). O sistema desenvolvido foi testado quanto a sua atividade sobre diferentes células tumorais utilizando modelos *in vitro*, a fim de obter resultados expressivos que possam contribuir diretamente para o desenvolvimento de vetores mais específicos, com menor incidência de efeitos adversos e menor desenvolvimento de resistência pelas células tumorais.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como principal objetivo preparar e caracterizar nanopartículas (NPs) de poli- ϵ -caprolactona (PCL) contendo metotrexato (MTX), como potenciais vetores para a terapia antitumoral. Além disso, objetivou-se desenvolver e validar um método analítico para quantificação do MTX nas NPs e, por fim, determinar sua atividade biológica utilizando métodos *in vitro* baseados em modelos celulares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Otimizar as NPs através de um estudo de formulação;
- b. Preparar NPs contendo MTX a partir do polímero PCL;
- c. Modificar a estrutura das NPs com um agente anfifílico biocompatível com propriedades pH-dependentes;
- d. Caracterizar as NPs quanto ao seu pH, diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta;
- e. Desenvolver e validar método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para quantificação do MTX nas NPs;
- f. Avaliar a estabilidade, a eficiência de encapsulação e o perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das NPs em diferentes valores de pH, utilizando o método analítico validado;
- g. Determinar a fotoestabilidade do fármaco nanoencapsulado, através da exposição das NPs às radiações UVA e UVC;
- h. Avaliar a atividade pH-dependente das NPs contendo o agente anfifílico, utilizando o eritrócito como modelo de membrana endossomal;
- i. Avaliar a hemocompatibilidade das NPs empregando o ensaio de hemólise;
- j. Estudar a atividade antitumoral das NPs de forma comparativa com o fármaco não encapsulado, utilizando modelos *in vitro* baseados em linhagens celulares tumorais e não-tumorais (controle negativo da atividade antitumoral) e diferentes ensaios de viabilidade celular;
- k. Liofilizar as NPs, a fim de melhorar sua estabilidade.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CÂNCER

Câncer é o termo genérico utilizado para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Esse se caracteriza pela multiplicação rápida de células anormais que se estendem além de seus limites habituais, podendo invadir tecidos adjacentes e se disseminar para outros órgãos (metástases). O crescimento tumoral é acompanhado pelo recrutamento e ativação cada vez maior de células anteriormente quiescentes, resultando na progressão da doença (WHO, 2014).

Acredita-se que em 2025 o número de novos casos de câncer ultrapasse os 20 milhões. O aumento no número de casos (14 milhões em 2012) pode ser atribuído às mudanças demográficas e no estilo de vida, como hábitos alimentares pouco saudáveis, tabagismo e sedentarismo. Deste modo, o câncer vem se tornando a maior causa de morte prematura (de 30 a 69 anos) entre doenças não transmissíveis e, em países com alto índice de desenvolvimento humano, já é a principal causa. No Brasil, é a segunda principal causa, sendo que estima-se para 2016/2017 a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer (INCA, 2015; WHO, 2014).

O tecido tumoral possui composição celular e bioquímica diferente do tecido normal. Seu crescimento é estimulado pela produção de citocinas e fatores de crescimento, que também promovem a formação de novas redes vasculares. Diferentemente dos vasos sanguíneos normais, os vasos do tecido tumoral são dilatados, tortuosos e estão distribuídos heterogeneamente. Sendo assim, frequentemente ocorrem oscilações do fluxo sanguíneo associadas a períodos de hipóxia (WHO, 2014). Como resultado, ocorre um aumento da atividade glicolítica e, conseqüentemente, um aumento da produção de lactato, resultando em um espaço extracelular levemente ácido (GATENBY; GILLIES, 2008).

Os tratamentos mais comuns do câncer envolvem a combinação de diferentes terapias como cirurgia, radioterapia e quimioterapia (RAMAKRISHNAN; GABRILOVICH, 2013; SINGHAL; NIE; WANG, 2010).

A quimioterapia tem sido um dos pilares da terapia antineoplásica (CONKLIN, 2000). Sua eficácia é limitada pela toxicidade dos fármacos antitumorais em tecidos

normais e devido a baixa seletividade pelo tecido tumoral (JAIN; JAIN, 2008). Além da ação inespecífica dos antitumorais, baixas concentrações de fármaco no local do tumor e desenvolvimento de resistência aos fármacos são alguns dos desafios encontrados pela terapia quimioterápica (MISRA; ACHARYA; SAHOO, 2010).

3.2 METOTREXATO

Os antimetabólitos são uma das classes mais antigas de fármacos anticancerígenos cujo mecanismo de ação se baseia na interação com vias de biossíntese essenciais (NUSSBAUMER et al., 2011). Dentre eles, o metotrexato (MTX), um análogo do ácido fólico, tem como principal ação farmacológica a inibição competitiva da dihidrofolato-redutase (DHFR), uma enzima intracelular que reduz o ácido fólico a tetrahidrofolatos, que são intermediários em várias vias metabólicas importantes como a biossíntese de purinas e de timina. Nas células em proliferação, como nas células tumorais, a falta de purinas e de timina leva a um bloqueio da síntese de DNA e RNA, podendo causar morte celular (ESPINOSA-MANSILLA et al., 2002; GRIM; CHLÁDEK; MARTÍNKOVÁ, 2003; RUBINO, 2001).

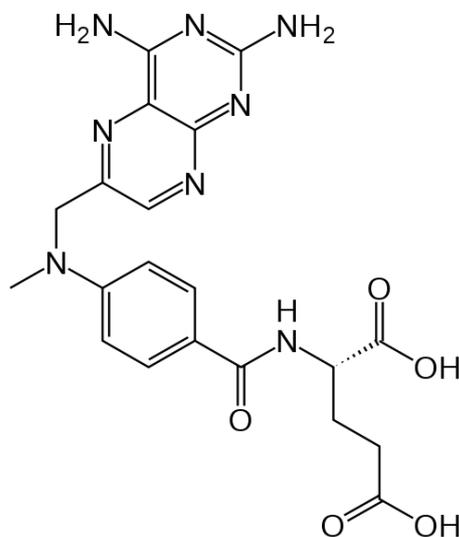
O MTX é utilizado no tratamento de leucemia linfoblástica aguda, coriocarcinoma, linfoma não Hodgkin e em diversos tumores sólidos. Além disso, também é utilizado no tratamento de doenças autoimunes como psoríase, artrite reumatoide e lúpus (NUSSBAUMER et al., 2011). Uma vez que inibe uma função celular fundamental, o MTX é um composto muito citotóxico, afetando principalmente células de rápida multiplicação. Sua atividade citotóxica, portanto, não afeta apenas as células neoplásicas, mas também tem como alvo outros tecidos, podendo causar mielossupressão, inflamação do trato gastrointestinal superior (mucosite) e ulceração gastrointestinal com potencial dano aos rins e ao fígado, exigindo assim, monitoramento cuidadoso, especialmente em pacientes tratados com as doses mais elevadas empregadas a fim de melhorar a eficácia do tratamento (NUSSBAUMER et al., 2011; RUBINO, 2001).

O MTX pode ser administrado tanto por via oral quanto parenteral. Enquanto doses baixas de MTX ($< 25 \text{ mg/m}^2$ de superfície corporal) são facilmente absorvidas pelo trato gastrointestinal, doses elevadas (até 3 g/m^2) não são completamente absorvidas por esta via e são administradas por infusão intravenosa. Devido a sua alta polaridade, o MTX está presente principalmente em sua forma aniônica no pH

neutro dos fluidos biológicos. Deste modo, atravessa a membrana celular com dificuldade e, portanto, é transportado para dentro das células através de dois diferentes mecanismos. O primeiro envolve um transportador de folato reduzido (RFC), que é capaz de transportar os análogos de ácido fólico, como o MTX. O segundo é uma proteína ligante de folato (FBP) que possui afinidade tanto para folatos reduzidos quanto para ácido fólico (GENESTIER et al., 2000; GRIM; CHLÁDEK; MARTÍNKOVÁ, 2003; RUBINO, 2001).

O MTX é um pó cristalino amarelo, seu log P (octanol/água) é -1,8. Quanto a solubilidade, é praticamente insolúvel em água, etanol, clorofórmio e éter, e muito solúvel em soluções diluídas de hidróxidos e carbonatos (CLARKE'S, 2011). Quimicamente, o MTX (Figura 1) é constituído por uma porção heterocíclica (anel pterínico 2,4- diamino-substituído) ligada a uma porção p-aminobenzoil que, por sua vez, está ligada a uma unidade de ácido glutâmico. A molécula é um polieletrólito com dois grupos carboxílicos cujas constantes de dissociação (pKa) são de 3,36 (α -carboxil) e 4,70 (γ -carboxil), além de uma variedade de funções nitrogenadas, onde a mais básica é provavelmente o grupamento N-1 guanídico do anel pterina (pKa 5,71). A principal diferença estrutural do MTX em relação ao seu análogo ácido fólico é a substituição de uma hidroxila por uma amina no C² e uma metilação no N¹⁰ (RUBINO, 2001).

Figura 1 - Estrutura química do fármaco antitumoral metotrexato.



3.2.1 Metodologias analíticas para quantificação de MTX

Diversas metodologias analíticas foram desenvolvidas e validadas para quantificação de MTX e seus metabólitos em urina, plasma, soro e solução aquosa. Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) com detector de massas, UV e fluorescência; eletroforese capilar com detector UV e espectrofotometria UV-Vis são alguns dos métodos utilizados para separação e quantificação do MTX (BOUQUIÉ et al., 2014; DE ABREU et al., 2015; NAGULU et al., 2010; RODRÍGUEZ FLORES et al., 2005; SANTOS et al., 2013; UCHIYAMA et al., 2012). Além disso, metodologias analíticas para quantificação de MTX em comprimidos, solução injetável e matéria prima estão disponíveis nas Farmacopeias Americana e Europeia, enquanto que a Farmacopeia Britânica apresenta metodologia apenas para quantificação de MTX em comprimidos e solução injetável. O método proposto pela farmacopeia para quantificação da matéria prima de MTX é a CLAE, utilizando uma coluna C18, e detector UV no comprimento de onda de 302 nm. A fase móvel é constituída por uma solução tampão pH 6,0 e acetonitrila (90:10) com um fluxo de 1,2 mL/min (USP, 2009). O método descrito pela farmacopeia europeia utiliza como fase estacionária coluna C18, e a fase móvel é constituída por duas soluções denominadas A e B eluídas em gradiente no fluxo de 1,5 ml/min. A solução A é composta por ACN e tampão fosfato de sódio pH 6,0 (5:95) e a solução B também por ACN e tampão fosfato de sódio pH 6,0, porém na proporção (50:50) (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2014).

Para quantificação de MTX em nanocápsulas de PLA, Sartori e colaboradores (2008) desenvolveram e validaram um método por CLAE. Utilizaram uma coluna C18 Shimadzu Shim-pack CLC-ODS (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) e detector UV no comprimento de onda de 313 nm. A fase móvel foi constituída por água ajustada a pH 3,0 com ácido perclórico, acetonitrila e tetrahidrofurano (65:35:5 v/v/v), eluída em fluxo isocrático de 0,8mL/min. O método provou ser linear, específico, exato e preciso de acordo com os padrões do ICH.

Musmade e colaboradores (2014) desenvolveram um método analítico para quantificação de MTX em NPs de PLGA. Empregaram CLAE por fase reversa (coluna Grace Vydac C18), sendo a fase móvel constituída por solução tampão pH 6,0 e acetonitrila (90:10), eluída em um fluxo de 1 mL/min. A quantificação foi

realizada utilizando um detector UV no comprimento de onda de 307 nm. O método foi validado conforme os parâmetros do ICH.

3.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas (NPs) poliméricas são estruturas sólidas, com propriedades coloidais, e com tamanho de 10 a 1000 nm (SINGH; LILLARD, 2009). As NPs podem ser nanoesferas ou nanocápsulas. As nanocápsulas são sistemas vesiculares, constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo líquido, que pode ser aquoso ou oleoso, desta forma o fármaco pode estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, são estruturas sólidas, geralmente esféricas, formadas por uma matriz polimérica, podendo o fármaco estar retido ou adsorvido na matriz (RAO; GECKELER, 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003).

As NPs são empregadas na agricultura, física, ciência forense, robótica e ainda são amplamente estudadas com foco na terapia medicamentosa, para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e específicos, que proporcionem uma liberação de fármacos sustentada durante períodos maiores, de dias, semanas ou meses (FARAJI; WIPF, 2009; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; SINGH; LILLARD, 2009). Portanto, a utilização de NPs na terapia medicamentosa é considerada uma das aplicações que obteve maior sucesso (WILCZEWSKA et al., 2012).

Além disso, as nanoestruturas possuem características físico-químicas e propriedades biológicas únicas devido ao seu tamanho reduzido, o que faz com que sejam capazes de ultrapassar barreiras celulares e teciduais (WILCZEWSKA et al., 2012).

3.3.1 Polímeros

Para o desenvolvimento de NPs poliméricas geralmente são usados polímeros orgânicos devido a sua elevada biocompatibilidade celular e biodegradabilidade. Estes polímeros podem ser naturais; naturais modificados, aos quais se inserem grupamentos polares a fim de diminuir o tempo de degradação; e os sintéticos (JAIN, 2000).

Alguns polímeros como poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL) foram considerados seguros para utilização em humanos segundo o FDA (XIAO et al., 2014). Dentre eles, a PCL caracteriza-se por ser um poliéster alifático sintético, altamente hidrofóbico, biodegradável e biocompatível. De maneira geral, é formada pela polimerização de monômeros de ϵ -caprolactona, ou seja, é sintetizada mediante polimerização, através da abertura do anel de seu monômero (CHAWLA; AMIJI, 2002; DASH; KONKIMALLA, 2012; SÁEZ-FERNÁNDEZ; RUIZ; ARIAS, 2009).

Em temperatura ambiente, a PCL é solúvel em clorofórmio, diclorometano, benzeno, tolueno, ciclohexano e 2-nitropropano. Por outro lado, é pouco solúvel em acetona, 2-butanona, acetato de etila e insolúvel em água, álcool, petróleo e éter (SÁEZ-FERNÁNDEZ; RUIZ; ARIAS, 2009). Sendo assim, quando a PCL é utilizada para formulação de nanopartículas, geralmente utiliza-se aquecimento para melhorar sua solubilidade em acetona (ALMEIDA et al., 2010; CATTANI et al., 2010; FIGUEIRO et al., 2015).

Além disso, a PCL se torna uma opção interessante por apresentar degradação mais lenta que outros polímeros biodegradáveis disponíveis como poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e PLA. Este fato pode ser atribuído a uma possível resistência à hidrólise química devido à sua alta hidrofobicidade e cristalinidade (CHAWLA; AMIJI, 2002; SÁEZ-FERNÁNDEZ; RUIZ; ARIAS, 2009; XIAO et al., 2014).

3.3.2 Tensoativos

Os tensoativos são utilizados para estabilizar a suspensão de NPs durante sua preparação. Desta forma, na fase externa (aquosa) são adicionados tensoativos do tipo O/A (como PVA e poloxâmero) (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). Além disso, os tensoativos podem ser utilizados a fim de reduzir as interações imunológicas e também intermoleculares entre os grupos químicos da superfície das NPs, neste caso utilizam-se tensoativos não iônicos no revestimento de NPs poliméricas (WILCZEWSKA et al., 2012).

O copolímero em bloco Pluronic (também conhecido como poloxâmero) é constituído por uma molécula central de polioxipropileno com cadeias hidrófilas de polioxietileno em ambos os lados (BATRAKOVA; KABANOV, 2008; MOGHIMI;

HUNTER, 2000). Esse caráter anfifílico confere ao poloxâmero propriedades de um tensoativo. Possuindo capacidade de interagir com superfícies hidrofóbicas e membranas biológicas (BATRAKOVA; KABANOV, 2008). Portanto, a incorporação de poloxâmero em preparações farmacêuticas ou em combinação com veículos particulados de liberação de fármacos pode levar ao aumento da biodisponibilidade do fármaco, bem como à acumulação de fármaco em seu sítio de ação (MOGHIMI; HUNTER, 2000).

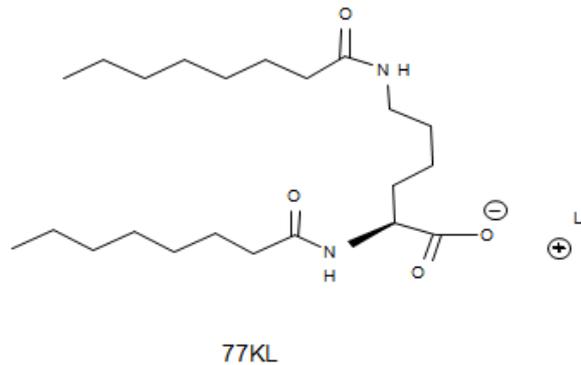
Ekambaram e colaboradores (2011) desenvolveram NPs de ramipril, um fármaco utilizado no tratamento da hipertensão, a fim de diminuir seus efeitos colaterais e aumentar sua biodisponibilidade. Para preparação das NPs foram testados os tensoativos tween 80, poloxâmero 188 e span 20 em diferentes concentrações. Observou-se que o aumento da concentração de tensoativos causou aumento da eficiência de encapsulação (EE). Além disso, as NPs com poloxâmero apresentaram maior EE, enquanto que as com span foram as com menor EE.

Além disso, os efeitos do poloxâmero em tumores com resistência a múltiplos fármacos consistem em um complexo mecanismo que foi cuidadosamente elucidado, dentre eles destacam-se a inibição do efluxo de fármacos, a fluidificação da membrana celular e diminuição nos níveis de ATP, fundamental em vários mecanismos de resistência. A capacidade em inibir múltiplos mecanismos de resistência torna o poloxâmero um agente promissor para utilização no tratamento de tumores com resistência a múltiplos fármacos (BATRAKOVA; KABANOV, 2008; KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002).

O tensoativo N^α,N^ε- dioctanoil lisina com contra-íon lítio (77KL) (figura 2) é um tensoativo aniônico sintetizado a partir da lisina segundo o procedimento descrito por Vives e colaboradores (1999). Possui grande importância por suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradação (MORAN et al., 2010). Estudos prévios demonstraram que o 77KL apresenta baixa citotoxicidade (NOGUEIRA et al., 2011b). Além disso, esse composto demonstrou uma atividade lítica de membrana dependente do pH do meio (NOGUEIRA et al., 2011a), o que sugere sua possível aplicação como adjuvante em formulações destinadas à liberação intracelular de fármacos. Dessa maneira, tanto o 77KL quanto o 77KS, que é um tensoativo semelhante, porém com contra-íon sódio, já foram adicionados a NPs e apresentaram resultados promissores quanto sua atividade pH-dependente

(NOGUEIRA-LIBRELOTTO et al., 2016; NOGUEIRA et al., 2013, 2016; SCHEEREN et al., 2016).

Figura 2 - Estrutura química do tensoativo aniônico 77 KL.



3.3.3 Métodos de preparação de nanopartículas

Existem diversos métodos descritos na literatura que podem ser utilizados para preparação de NPs, esses podem ser classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros e ou precipitação de polímeros pré-formados (RAO; GECKELER, 2011).

Dentre eles, a nanoprecipitação consiste basicamente na dissolução do polímero e do fármaco em um solvente orgânico miscível em água, geralmente acetona (fase orgânica). Essa é vertida, sob agitação, à fase aquosa contendo um tensoativo e, imediatamente, o solvente orgânico difunde-se na água, dando origem a uma suspensão coloidal, sendo que a obtenção das NPs é evidenciada pela formação de uma dispersão leitosa. Por fim, as suspensões são submetidas à evaporação a fim de remover o solvente orgânico (FESSI et al., 1988). Portanto, a nanoprecipitação é considerada um método simples, rápido e reprodutível, amplamente utilizado tanto para preparação de nanoesferas quanto de nanocápsulas (PINTO REIS et al., 2006; RAO; GECKELER, 2011).

3.3.4 Nanopartículas na terapia anticancerígena

Acredita-se que a maioria das NPs seja capaz de se acumular no tecido tumoral, devido à alta permeabilidade dos vasos sanguíneos, resultado da angiogênese rápida e defeituosa destas células. Além disso, o tumor se caracteriza por possuir drenagem linfática disfuncional, o que pode ajudar na retenção das NPs no tumor durante tempo suficiente para permitir a liberação do fármaco para as células tumorais (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011; MISRA; ACHARYA; SAHOO, 2010).

Diversos sistemas nanoestruturados vêm sendo desenvolvidos a fim de melhorar a terapia antitumoral, utilizando MTX e também outros fármacos antitumorais como tamoxifeno, doxorrubicina, paclitaxel e 5-fluorouracil; com diferentes polímeros (CHAWLA; AMIJI, 2002; CUI et al., 2013; HASHAD et al., 2016; KARIMI et al., 2017; ÖCAL et al., 2014).

Trapani e colaboradores (2011) desenvolveram nanopartículas de quitosana e glicoquitosana contendo MTX com o objetivo de determinar se a presença de Tween 80 na formulação interfere na liberação do fármaco para as células. As NPs foram preparadas segundo o método de gelificação iônica. O tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e EE obtidos estiveram entre 125-263 nm, 0,11-0,54, 16-30 mV e 19-48%, respectivamente. Estudos de viabilidade celular demonstraram atividade citotóxica, sendo que as NPs de glicoquitosana com MTX foram mais citotóxicas em relação as NPs de quitosana com MTX. Além disso, não foram evidenciadas diferenças na liberação do MTX para as células, entre as formulações com e sem Tween 80.

Nanocápsulas com núcleo lipídico contendo MTX foram desenvolvidas por Figueiro e colaboradores (2015). As NPs foram obtidas através do método de nanoprecipitação utilizando PCL como polímero, os tensoativos Tween 80 e Span 60 e triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico para formação do núcleo lipídico. As NPs apresentaram EE de 47%. Seus potenciais efeitos antitumorais foram avaliados através de dois diferentes modelos de glioblastoma. Primeiramente, *in vitro* foi utilizado MTT para avaliar a viabilidade celular de células de glioma de rato, foi demonstrado que as nanocápsulas de MTX apresentaram maior citotoxicidade comparadas ao MTX livre. Além disso, o MTX livre não causou apoptose celular, diferente do fármaco encapsulado que gerou aumento da apoptose. Esse resultado

foi confirmado através da quantificação da caspase-3, em que obteve-se aumento dos níveis desta proteína na presença da nanoestrutura. *In vivo* foram implantadas células de glioma em ratos e observou-se uma diminuição no tamanho do tumor e aumento da apoptose ao administrar a formulação, porém também foi observada diminuição do número de leucócitos.

Gorjikhah e colaboradores (2016) desenvolveram nanopartículas de PLGA e β ciclodextrina contendo MTX a fim de aumentar a solubilidade e estabilidade do MTX. As NPs foram obtidas através do método de dupla emulsão utilizando o tensoativo poli álcool vinílico (PVA). Para confirmar a estabilidade do MTX nas NPs foi utilizada espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, indicando que o polímero foi sintetizado corretamente e que o MTX foi encapsulado (EE de 80%). Os efeitos antiproliferativos do MTX foram avaliados para o MTX livre e para as NPs contendo MTX na linhagem celular T47D, de câncer de mama. O ensaio de MTT demonstrou que as NPs contendo MTX são mais citotóxicas em comparação ao MTX livre, nas mesmas condições.

Nanopartículas de PLGA com metotrexato foram desenvolvidas por Musmade e colaboradores (2014). Para o desenvolvimento da nanoformulação foram testados os tensoativos PVA, Pluronic F 68 e Pluronic F 127. As NPs foram preparadas pelo método de emulsificação-evaporação do solvente utilizando o tensoativo PVA na concentração de 0,5% e apresentaram tamanho de partícula, potencial zeta e eficiência de encapsulação de 199,7 nm, -22,2 mV e 15,45%, respectivamente. A presença de MTX na formulação foi evidenciada pela análise por DSC, através da comparação da formulação com o fármaco livre. Os resultados do estudo de liberação *in vitro* mostraram uma rápida liberação inicial de MTX, seguida por uma liberação prolongada, indicando que as NPs de PLGA foram capazes de controlar a liberação prolongada do MTX. Também foram realizados estudos de citotoxicidade em células de câncer cerebral humano, que indicaram que as NPs poliméricas liberaram o MTX mais lentamente e ficaram mais retidas nas células tumorais quando comparadas ao fármaco livre, resultando, portanto, em uma citotoxicidade superior a do MTX livre.

Nanocápsulas de PCL com MTX foram desenvolvidas por Boechat e colaboradores (2015) utilizando os tensoativos Span 60 e Tween 80 e como núcleo oleoso triglicerídeos de cadeia média (TCM). Macroscopicamente as NPs sem MTX apresentaram aparência branca leitosa, e as NPs com MTX amarela opaca, ambas

homogêneas. O tamanho, PDI, PZ e EE obtidos para as NPs com MTX foram de 215 nm, 0,11, - 8 mV e 20%, respectivamente.

Seo e colaboradores (2009) prepararam nanopartículas poliméricas de MTX utilizando poli(etilenoglicol) e quitosana, com o objetivo de obter um sistema de liberação de MTX para ser utilizado por via intravenosa que proporcionasse menos efeitos colaterais e maior especificidade para as células tumorais. Foram obtidas NPs com tamanho de partícula entre 50-300 nm e com formato esférico quando analisadas em microscópio eletrônico de transmissão. As NPs apresentaram eficiência de encapsulação entre 65,2 e 94%. O RMN de hidrogênio indicou que o MTX se complexou com a quitosana. No entanto, o estudo de citotoxicidade demonstrou que as NPs formadas foram menos citotóxicas que o fármaco livre. Visando aumentar a especificidade dos vetores nanoestruturados, compostos com propriedades pH-dependente são fonte de constante estudo no campo do desenvolvimento de nanoestruturas. Sabe-se que o pH dos tecidos tumorais e saudáveis é diferente (\sim pH_e 6,6 e 5,4) e, portanto, cada vez mais vem sendo estudada a preparação de formulações sensíveis ao pH, buscando assim uma liberação controlada do fármaco e uma menor incidência de efeitos adversos (BAZBAN-SHOTORBANI et al., 2017; WILCZEWSKA et al., 2012). Devido à sua capacidade de mudar de conformação e bioatividade a pH ácido, compostos pH-sensíveis podem constituir-se adjuvantes tecnológicos capazes de melhorar a eficiência de liberação de fármacos a partir das NPs tanto a nível intracelular (pH \sim 6,6 e 5,4) (AKAGI; KIM; AKASHI, 2010; NOGUEIRA et al., 2011a, 2014b) como a nível do espaço extracelular do tecido tumoral (pH_e \sim 6,6) (LEE et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2014b).

Nesse sentido, o 77 KL foi utilizado como adjuvante em NPs de quitosana com MTX por Nogueira e colaboradores (2013). As NPs foram obtidas pelo método de gelificação iônica e apresentaram comportamento pH-dependente, apresentando liberação acelerada e atividade lítica da membrana maior nos pHs ácidos (6,5 e 5,4). A citotoxicidade das NPs também foi avaliada em duas linhagens celulares tumorais (HeLa, câncer cervical epitelial e MCF-7, câncer de mama) e demonstraram maior citotoxicidade em ambas linhagens celulares quando comparadas ao MTX livre. A citotoxicidade também foi avaliada em pH ácido (6,6) e a citotoxicidade causada pelas NPs foi superior a encontrada no pH fisiológico (NOGUEIRA et al., 2013).

Nogueira e colaboradores (2016) desenvolveram NPs pH-dependentes de quitosana com o tensoativo aniônico sintetizado a partir da lisina (77KS) contendo MTX. As NPs foram obtidas pelo método de gelificação iônica. A presença do 77KS conferiu a formulação um comportamento pH-sensível apresentando uma liberação mais rápida nos pHs ácidos e atividade lítica da membrana de modo pH-dependente. Além disso, a citotoxicidade das NPs em linhagem celular MCF-7 e HeLa foi maior do que a do MTX livre.

NPs de quitosana modificadas com polietilenoglicol (PEG) e poloxâmero 188 utilizando o 77KS como adjuvante também foram desenvolvidas por Scheeren e colaboradores (2016) para a encapsulação de doxorrubicina. As NPs apresentaram características físico-químicas adequadas e observou-se maior fotoestabilidade para formulação liofilizada. Todas as formulações tiveram um liberação dependente do pH, com liberação mais lenta no pH fisiológico (pH 7,4) e acelerada no pH do sítio de ação (pH 6,6 e 5,4). Além disso, o ensaio de citotoxicidade demonstrou diminuição da viabilidade de células HeLa na presença das NPs.

3.4 LIOFILIZAÇÃO

A liofilização consiste na remoção da água de um produto sólido através da sublimação a vácuo (FRANKS, 1998). É considerada uma técnica eficiente para aumentar a estabilidade das NPs, sendo a baixa estabilidade desses sistemas em meio aquoso um dos grandes problemas que impedem seu uso clínico (ABDELWAHED et al., 2006).

Antes de serem liofilizadas, as NPs são submetidas ao congelamento, processo esse que pode causar estresse mecânico e conseqüentemente desestabilizar as formulações. Por isso, antes de seu congelamento, devem ser adicionados à suspensão de nanopartículas excipientes especiais (crioprotetores) (ABDELWAHED et al., 2006; ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006). Os crioprotetores mais comumente utilizados para a liofilização de NPs são os açúcares, dentre eles, trealose, sacarose, lactose, glicose e manitol. Sendo assim, após a liofilização, as NPs devem preservar suas características físicas (tamanho e eficiência de encapsulação) e ter um tempo de reconstituição curto (ABDELWAHED et al., 2006). A reconstituição completa das NPs pode ser realizada imediatamente

através da adição de água, ou pode ser associada a agitação magnética, vortex ou mesmo ultrassom (FONTE; REIS; SARMENTO, 2016).

Hirsjärvi e colaboradores (2009) liofilizaram nanoesferas de PLA obtidas pelo método de nanoprecipitação, utilizando como crioprotetores trealose, sacarose, lactose e glicose em diferentes concentrações. Trealose e sacarose, 5 e 2% (p/v), respectivamente, apresentaram melhor proteção (com pequena variação no tamanho e baixo PDI).

Nanoesferas de PCL e PLGA com ciclosporina foram liofilizadas com diferentes crioprotetores (glicose, sacrose, trealose, lactose, manitol, dextran, gelatina e sorbitol), a fim de determinar qual deles proporcionaria melhor proteção para as NPs. Glicose e sacarose a 20% foram os melhores crioprotetores para as NPs de PCL e PLGA, respectivamente, porém, em ambos os casos, ocorreu um leve aumento no tamanho de partícula das NPs (SAEZ et al., 2000).

3.5 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* DE NP_s

O eritrócito como modelo de membrana endossomal, associado à utilização do ensaio de hemólise, é amplamente utilizado para o estudo de interação de tensoativos com as membranas celulares e como esta varia em função do pH do meio (CHEN et al., 2009; WANG; XU; LU, 2009). Sendo assim, o ensaio de hemólise é bastante utilizado a fim de verificar se diferentes nanocarreadores possuem uma atividade lítica pH-dependente.

A utilização de modelos *in vitro*, baseados em cultivos celulares, vêm ganhando destaque no estudo da atividade e do perfil toxicológico de novas nanotecnologias (MINAEI et al., 2016; SOHAEBUDDIN et al., 2010; TAVANO et al., 2013). O emprego desse tipo de metodologia justifica-se, especialmente, nas fases iniciais de desenvolvimento de uma nova formulação, pelo fato de que os testes de toxicidade em animais são extremamente caros e devem ser reduzidos por razões éticas inegáveis (HARTUNG, 2010). Além disso, os métodos *in vitro* também apresentam vantagens como a possibilidade de demonstração dos efeitos primários em células alvo, assim como identificação dos mecanismos envolvidos na atividade tóxica e/ou terapêutica na ausência de fatores fisiológicos e compensatórios que confundem a interpretação dos estudos utilizando modelos animais (HUANG; WU; ARONSTAM, 2010).

4 ARTIGO CIENTÍFICO

“Desenvolvimento e avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* de nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) pH-sensíveis contendo metotrexato “

O manuscrito será submetido ao periódico AAPS PharmSciTech (Fator de impacto: 2,451, WebQualis B1)

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE POLI (ϵ -CAPROLACTONA) pH-SENSÍVEIS CONTENDO METOTREXATO

Letícia Bueno Macedo^{a,b}, Daniele Rubert Nogueira-Librelo^{a,b}, Francieli Bellé^a, Josiele de Vargas^a, Laís Engroff Scheeren^{a,b}, Clarice Madalena Bueno Rolim^{a,b}

^a Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

RESUMO

A utilização de sistemas nanoestruturados com atividade pH-dependente é uma alternativa promissora para tornar a terapia antitumoral mais específica. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi associar o adjuvante derivado da lisina, N^α,N^ε-dioctanoil lisina com contra-íon lítio (77 KL), que possui propriedades pH-dependentes, a nanopartículas (NPs) de poli(ε-caprolactona) (PCL) contendo o fármaco antitumoral metotrexato (MTX). Além disso, as NPs foram desenvolvidas utilizando o tensoativo poloxâmero 407, devido a sua capacidade de inibir mecanismos de resistência em tumores com resistência a múltiplos fármacos. As NPs foram obtidas pelo método de nanoprecipitação e apresentaram tamanho médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação de 178,5 nm, 0,135, -1,98 mV, 20,52%, respectivamente. A atividade pH-dependente das NPs foi demonstrada através da atividade lítica de membrana, que foi superior em pH levemente acidificado, característico dos endossomas. A atividade antiproliferativa *in vitro* das NPs contendo MTX foi superior à obtida pelo fármaco livre nas linhagens celulares tumorais MCF-7 e, em menor grau, nas HepG2. O MTX nanoencapsulado também apresentou atividade antiproliferativa superior ao MTX livre em meio levemente acidificado, característico do espaço extracelular do tecido tumoral. Portanto, os resultados obtidos evidenciaram que as NPs apresentam atividade pH-dependente, bem como maior ação antitumoral *in vitro* em comparação ao fármaco livre, sugerindo sua potencial utilização como carreadores de MTX para o tratamento do câncer.

Palavras chave: Nanopartículas pH-dependentes. Poli(ε-caprolactona). Poloxâmero 407. Metotrexato. Tensoativo derivado da lisina. Atividade antitumoral *in vitro*.

1 INTRODUÇÃO

O metotrexato (MTX) é um fármaco utilizado no tratamento de leucemia linfoblástica aguda, carcinoma, linfoma não Hodgkin e diversos tumores sólidos (NUSSBAUMER et al., 2011). Por ser um análogo do ácido fólico, exerce seu mecanismo de ação através da inibição competitiva da dihidrofolato-redutase (DHFR), impedindo a biossíntese de purinas e timinas e, conseqüentemente a síntese de DNA e RNA, causando morte celular. Porém, o MTX não tem ação específica para o tecido tumoral e pode causar uma série de efeitos colaterais, principalmente em pacientes tratados com altas doses de MTX (RUBINO, 2001). Nesse sentido, os sistemas nanoestruturados podem ser utilizados como alternativa para melhorar a especificidade dos fármacos antitumorais e diminuir seus efeitos colaterais.

A poli (ϵ -caprolactona) (PCL) é um dos polímeros que podem ser utilizados para o desenvolvimento de nanopartículas (NPs) poliméricas, sendo que sua utilização em humanos foi considerada segura pelo FDA (XIAO et al., 2014). Ainda, o tensoativo poloxâmico vem sendo bastante utilizado no desenvolvimento de NPs, pois é um agente promissor no tratamento de tumores resistentes a múltiplos fármacos, sendo capaz de inibir diversos mecanismos de resistência (BATRAKOVA; KABANOV, 2008).

Como o pH do tecido normal (pH 7,4) e do tecido tumoral (\sim pH_e 6,6 e 5,4) são diferentes, o desenvolvimento de sistemas micro ou nanoestruturados com ação pH-dependente pode ser utilizado como uma estratégia a fim de tornar a terapia anticancerígena mais específica (BAZBAN-SHOTORBANI et al., 2017). Nesse contexto, o tensoativo aniônico derivado da lisina, N^α,N^ε- dioctanoil lisina com contra-íon lítio (77KL), que possui atividade pH-dependente, pode ser um adjuvante promissor. Estudos prévios demonstraram que o 77KL apresenta baixa citotoxicidade (NOGUEIRA et al., 2011b) e atividade lítica de membrana dependente do pH do meio (NOGUEIRA et al., 2011a). Além disso, o 77KL apresentou resultados promissores quando adicionado a NPs de quitosana contendo MTX, as quais demonstraram atividade pH-dependente, apresentando liberação acelerada e atividade lítica da membrana maior nos pHs ácidos (6,5 e 5,4), bem como citotoxicidade em pH ácido (6,6) superior a encontrada em pH fisiológico (NOGUEIRA et al., 2013).

Frente ao exposto, neste estudo objetivou-se desenvolver NPs contendo MTX a partir do polímero PCL, empregando como tensoativos o poloxâmero e o 77KL. As NPs foram caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e eficiência de encapsulação. Além disso, o processo de liofilização foi empregado a fim de melhorar sua estabilidade. O perfil de liberação das NPs e a atividade lítica de membrana foram avaliados em diferentes valores de pH. A fotoestabilidade do MTX livre e nanoencapsulado foi avaliada frente às radiações UVA e UVC. Ainda, desenvolveu-se um método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação do MTX. Por fim, a atividade antiproliferativa do MTX livre e nanoencapsulado foi avaliada utilizando modelos celulares *in vitro*.

2 MATERIAIS E METODOS

2.1 MATERIAIS

A matéria-prima do metotrexato (pureza de 100,1%; lote, 1504478) foi comprada da SM Empreendimentos Farmacêuticos Ltda. (São Paulo, SP, Brasil). O polímero poli(ϵ -caprolactona) (massa molecular 70.000-90.000), Pluronic F – 127 (poloxâmero 407), brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), corante vermelho neutro (NRU), tampão fosfato salino (PBS) e solução de tripsina-EDTA (0,5 g tripsina porcina e 0,2 g EDTA sódico por litro de solução salina balanceada de Hanks) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Acetonitrila grau HPLC foi obtida da Tedia (Fairfield, USA) e o fosfato de potássio da Merck (Darmstadt, Germany). Soro fetal bovino (FBS) e Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com l-glutamina (584 mg/L) e antibiótico/antimicótico (50 mg/mL sulfato de gentamicina e 2 mg/L anfotericina B), foram obtidos da Vitrocell (Campinas, SP, Brasil). A trealose foi obtida da Tovani Bezaquem (Consolação, SP, Brasil).

2.2 TENSOATIVO COM PROPRIEDADES PH-DEPENDENTES ADICIONADO ÀS NP_s

O tensoativo aniônico N^α,N^ε- dioctanoil lisina com contra-íon lítio (77KL) foi adicionado à formulação. O 77KL foi sintetizado a partir da lisina como descrito

anteriormente (VIVES et al., 1999). Possui peso molecular de 405,6 g/mol e concentração micelar crítica de 2,9 µg/mL (NOGUEIRA et al., 2011a; SÁNCHEZ et al., 2007).

2.3 PREPARAÇÃO DAS NPS

As nanopartículas poliméricas de poli-ε-caprolactona contendo metotrexato foram preparadas pelo método de nanoprecipitação descrito por Fessi e colaboradores (1988), e modificadas com um tensoativo biocompatível e pH-sensível derivado de lisina (77KL) (NOGUEIRA et al., 2011a).

Para a elaboração da nanoformulação com MTX (NP MTX), primeiramente, foi preparada fase orgânica contendo 40 mg de PCL, 2,5 mg de MTX (previamente solubilizado em 100 µL de DMSO) e 12 mL de acetona, a qual permaneceu sob aquecimento (40°C) e agitação magnética durante 1 hora. Do mesmo modo, a fase aquosa que teve seu pH ajustado em 3,0, contendo 24 mL de uma solução de poloxâmero 407 (1%), e 3 mg de 77KL, previamente solubilizado em 300 µL de água, foi aquecida a 40°C sob agitação magnética durante 30 minutos. A fase orgânica foi então vertida sob a fase aquosa e mantida sob agitação magnética por 10 min. Por fim, levou-se a suspensão de NPs ao rotaevaporador a fim de eliminar o solvente orgânico e concentrar a formulação em um volume final de 10mL. Da mesma forma, foram preparadas as formulações brancas (NP Br), porém sem adicionar o fármaco.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NPS

As NPs foram caracterizadas quanto ao valor de pH, utilizando potenciômetro previamente calibrado. O tamanho médio de partícula e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados através de espalhamento da luz dinâmico (Zetasizer® Nano-ZS ZEN3600, Malvern), e o potencial zeta (PZ), através de medições da mobilidade eletroforética (Zetasizer® Nano-ZS ZEN3600, Malvern). Para as determinações descritas anteriormente, as NPs foram diluídas na proporção 1:500 (v/v) em água ultrapurificada (tamanho e PDI) ou NaCl 10mM (PZ).

A eficiência de encapsulação (EE) foi realizada utilizando dispositivo de ultracentrifugação Amicon® Ultra-0,5 MWCO 10.000 Da (Millipore), sendo que o

percentual de fármaco encapsulado foi determinado através do método analítico previamente validado, conforme descrito na seção 2.5. A purificação das NPs foi realizada a fim de eliminar o fármaco não encapsulado utilizando o procedimento de diálise (membrana com MWCO de 10.000 Da). Para purificar 2 mL de NPs, a diálise foi realizada por 4,5 h utilizando 150 mL de água destilada.

2.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Para o desenvolvimento do método analítico por Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), utilizou-se sistema Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com bomba, injetor automático, e detector UV. Inicialmente, foram estabelecidas as condições analíticas, como coluna, fase móvel, fluxo, volume de injeção, comprimento de onda e concentração das soluções do fármaco. Como indicadores de adequabilidade do sistema, foram usados parâmetros analíticos como pratos teóricos, assimetria do pico e resolução. O método foi então otimizado com fase móvel (FM) constituída por tampão fostato de potássio 15 mM pH 3,0 e acetonitrila (85:15, v/v), eluída em fluxo isocrático de 0,6 mL/min. Além disso, empregou-se uma coluna de fase reversa, Gemini NX C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) da Phenomenex e o comprimento de onda utilizado para realização das leituras foi de 303 nm.

Para quantificação do MTX na formulação, foi otimizada uma extração das NPs em metanol na proporção 1:3 (v/v), seguido por 10 min de agitação a 1300 rpm no vortex e centrifugação por 5 min a 10000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi diluído em FM.

O método desenvolvido foi validado de acordo com os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, segundo o ICH Q2 R1 (2005). A linearidade foi avaliada através do valor do coeficiente de correlação, de três curvas analíticas nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20 e 30 μ g/ml. Além disso, os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA). A precisão foi avaliada realizando medições de soluções amostras (na concentração de 15 μ g/ml) em um mesmo dia e por um mesmo analista (repetibilidade), e a precisão intermediária foi avaliada em dois dias diferentes e com dois analistas. Realizou-se o teste de recuperação para a determinação da exatidão do método. Prepararam-se três soluções nas seguintes

concentrações: 80, 100 e 120% todas com 10 µg/mL de amostra e 2, 5 e 8 µg/mL de padrão, respectivamente. Os resultados obtidos foram comparados com uma solução padrão e com uma amostra não fortificada, a fim de avaliar a recuperação obtida. Na avaliação da especificidade, o cromatograma da nanopartícula branca foi comparado ao cromatograma da nanopartícula contendo MTX e ao cromatograma do MTX livre, a fim de verificar se algum dos componentes da formulação interfere na detecção do fármaco. A robustez foi determinada utilizando um modelo fatorial, através do Software Minitab 17, avaliando-se três fatores em dois níveis (2^3), sendo eles, percentual de solvente orgânico ($\pm 1\%$), pH ($\pm 0,2$) e volume de injeção ($\pm 10 \mu\text{L}$).

2.6 LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO FÁRMACO NANOENCAPSULADO

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados utilizando a técnica de diálise (NOGUEIRA et al., 2013) em membranas com MWCO de 10.000 Da. O meio utilizado para execução destes estudos foi o tampão fosfato salino (PBS) nos pHs 5,4 e 7,4. O perfil de liberação foi analisado durante 24 horas com agitação magnética a 150 rpm e o meio foi mantido a 37 °C. Para cada meio, foram construídas três curvas analíticas nas concentrações de 0,2; 1; 2; 3; 4 e 5 µg/mL, e a linearidade foi analisada pelo coeficiente de correlação das curvas analíticas e também através da ANOVA.

O estudo foi realizado para o MTX livre e para as NPs MTX com 77KL. As NPs foram purificadas (concentração de 50 µg/mL) e a solução de MTX livre foi preparada na mesma concentração e diluída em PBS. Foram adicionados 4 mL de formulação no saco de diálise, e utilizados 50 mL de meio. Foram coletados 2 mL do meio em intervalos de tempo pré-determinados, seguido por filtração em membrana de 0,45 µm, para então proceder com a quantificação dos percentuais de MTX liberado através do método analítico previamente validado, utilizando as curvas analíticas preparadas para cada um dos meios. Volumes equivalentes de meio foram repostos após as coletas, para manter a condição *sink*.

2.6.1 Modelagem matemática

As equações monoexponencial ($C = C_0e^{-kt}$), biexponencial ($C = ae^{-k_1t} + be^{-k_2t}$) e Korsmeyer–Peppas ($ft = at^n$) foram utilizadas para avaliar o perfil de liberação do MTX através do *software* MicroMath® Scientist (versão 2.01, USA). Nestas equações considera-se que k é a constante de velocidade de liberação do modelo monoexponencial e k_1 e k_2 do biexponencial, C_0 a concentração inicial do monoexponencial, e a e b do biexponencial. Na equação de Korsmeyer–Peppas, n corresponde ao expoente que caracteriza o mecanismo de liberação e a é uma constante que relaciona as características estruturais e geométricas do transportador (PEPPAS; SAHLIN, 1989; RITGER; PEPPAS, 1987a; SCHEEREN et al., 2016).

2.7 LIOFILIZAÇÃO

Com o objetivo de melhorar a estabilidade das NPs, optou-se por recorrer ao método de liofilização que é muito eficaz e comumente utilizado para melhorar a estabilidade de formulações de base nanotecnológica (CHUNG; LEE; LEE, 2012). Para evitar a agregação das partículas, testaram-se como crioprotetores a lactose e a trealose nas concentrações de 2, 5, 10 e 15% (p/v). Os crioprotetores foram dissolvidos nas NPs sob agitação magnética por 20 min, seguido por congelamento das formulações a -20°C durante 48 horas. As NPs congeladas foram levadas ao liofilizador (Liotop L101, Liobras, São Carlos, Brasil) para remoção da água através da sublimação sob vácuo durante 48 horas. As NPs liofilizadas foram resuspendidas com água ultrapura e submetidas a agitação magnética durante 20 min e ultrassom por 10 min. O rendimento foi determinado através do peso teórico que deveria ser recuperado em cada condição, correspondente a massa das NPs e a quantidade adicionada de crioprotetor. Além disso, foram avaliadas as características físico-químicas das formulações obtidas.

2.8 ENSAIO DE HEMOCOMPATIBILIDADE

Quando um nanomaterial é destinado à administração sistêmica, é de extrema importância a avaliação de sua biocompatibilidade com o sangue

(NOGUEIRA et al., 2014). Para isso, foi avaliada a atividade hemolítica das NPs com e sem MTX na presença de 77KL em pH fisiológico. A suspensão de eritrócitos foi preparada em tampão PBS a partir de sangue proveniente de amostras de descarte do Hospital Universitário de Santa Maria. O percentual de hemólise foi determinado através da leitura da absorbância da hemoglobina em 540 nm utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japan).

2.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PH-DEPENDENTE DAS NPS

O potencial das NPs em romper as membranas celulares de modo pH-dependente foi determinado através o ensaio de hemólise. As NPs com o fármaco ou o MTX livre foram incubados com 25 μ L da suspensão de eritrócitos, nas concentrações de 1, 5, 10 e 15 μ g/mL de MTX, diluídas em PBS pH 7,4, 6,6 e 5,4 (para volume final de 1 mL), durante 60 minutos. As NPs brancas foram submetidas ao mesmo procedimento e diluídas na mesma proporção das NPs com MTX. O controle negativo foi realizado utilizando 25 μ L da suspensão de eritrócitos em 975 μ L PBS (pH 7,4, 6,6 e 5,4), enquanto que para o controle positivo foi utilizado 975 μ L de água. Após o tempo de incubação, o percentual de hemólise foi determinado através da leitura da absorbância da hemoglobina em 540 nm utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japan).

2.10 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Os ensaios *in vitro* para avaliação da atividade antitumoral foram realizados utilizando linhagens de células tumorais de origem humana (HepG2, câncer hepático e MCF-7, câncer de mama). Além disso, foram utilizadas células não-tumorais (HaCaT, queratinócitos) a fim de avaliar a atividade inespecífica das NPs. A atividade antitumoral das NPs foi avaliada em comparação ao fármaco não encapsulado, a fim de determinar se a veiculação do fármaco é capaz de potencializar sua atividade. As linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM (4,5 g/L glicose) com 10% (v/v) de FBS, a 37°C e com 5% de CO₂.

Foram semeados 100 μ L das linhagens celulares (concentração 1×10^5 células/mL para HepG2 e MCF-7, e $7,5 \times 10^4$ células/mL para HaCaT) nos 60 poços centrais de uma placa de cultivo celular de 96 poços. As placas foram incubadas por

24 horas a 37°C em 5% de CO₂ e, posteriormente, o meio foi substituído por 100 µL dos tratamentos (MTX livre, NP MTX ou NP branca) nas concentrações de 0,5, 1, 2,5 e 5 µg/mL, diluídos em meio DMEM contendo 5% (v/v) de FBS. Nas células do controle foram adicionados 100 µL do meio contendo 5% (v/v) de FBS. Após 48 horas de incubação, determinou-se a atividade citotóxica e antiproliferativa utilizando os ensaios de viabilidade celular MTT e NRU. Para o MTT, o meio foi removido e substituído por 100 µL de MTT diluído em meio DMEM sem FBS na concentração de 0,5 mg/mL, preparado a partir de uma solução de MTT 5 mg/mL em PBS. Do mesmo modo, para o ensaio de NRU, foi adicionado 100 µL de NRU diluído com meio sem FBS (50 mg/mL). As placas foram incubadas por 3 horas a 37°C em 5% de CO₂. Para o MTT, o meio foi removido e substituído por 100 µL de DMSO para dissolver os cristais de formazan. Já no ensaio de NRU, o meio foi removido e a placa foi lavada uma vez com 100 µL de PBS seguido pela adição de 100 µL de uma solução contendo etanol, água e ácido acético (50:49:1, v/v/v). Após 10 min de agitação a 400 rpm, a absorbância em 550 nm foi determinada usando leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China). (NOGUEIRA et al., 2013, 2014)

Além disso, tendo em vista as propriedades pH-dependente do tensoativo 77KL, a atividade antitumoral das NPs foi avaliada em meio levemente ácido (pH_e ~ 6,6), característico do microambiente do espaço extracelular do tecido tumoral. Para isso, o meio de cultivo celular foi acidificado com tampão HEPES 1 M pH 6,2 (NOGUEIRA et al., 2013).

2.11 FOTOESTABILIDADE

A fotoestabilidade das NPs purificadas foi estudada através de sua exposição à radiação UVA (365 nm) e UVC (254 nm), comparando o MTX livre com as NPs contendo MTX encapsulado, a fim de verificar se a encapsulação é capaz de proteger o fármaco da degradação fotolítica. As formulações foram quantificadas nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas através do método por CLAE previamente validado.

A ordem de reação foi determinada pelo método gráfico. Foram plotados três gráficos, sendo o primeiro relacionando teor e tempo (ordem zero), o segundo ln do teor e tempo (primeira ordem) e o último 1/teor e tempo (segunda ordem). A ordem

de reação é determinada de acordo com o gráfico que apresentar melhor coeficiente de correlação.

2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância (ANOVA), seguida por teste post-hoc de Tukey, ou pelo teste t de Student, utilizando o programa estatístico SPSS® (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A robustez do método foi verificada utilizando o Minitab 17 (MINITAB® Statistical Software, Release 17, Minitab Inc. State College, PA, USA). Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes. Quando $p < 0,05$, considerou-se diferença significativa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PREPARAÇÃO DAS NP_s

As NPs foram apropriadamente preparadas através do método de nanoprecipitação (FESSI et al., 1988). Como o MTX não é solúvel em acetona, optou-se por solubilizar o MTX em DMSO e após adicioná-lo à acetona (CHEN et al., 2012a, 2012b). A fim de diminuir a difusão do MTX para fase externa, o pH da fase aquosa foi ajustado para 3,0 (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012), pois nesse pH o MTX está na sua forma não ionizada (pK_a 3,36; 4,70 e 5,71) que apresenta menor afinidade pela fase aquosa (RUBINO, 2001). Utilizando essa estratégia, a eficiência de encapsulação de NPs de PLGA contendo cloridrato de procaína foi aumentada de 11 para 58% (GOVENDER et al., 1999).

3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NPS

As NPs apresentaram tamanho adequado entre 170,6 e 178,5 nm, e PDI abaixo de 0,135, indicando que possuem uma distribuição de tamanho uniforme (tabela 1). O PZ negativo pode ser atribuído a carga da PCL, e o baixo valor em módulo ao poloxâmero, que é um tensoativo não iônico, que se deposita na superfície das NPs e protege parcialmente a carga das NPs, reduzindo assim o PZ (YAN et al., 2010). Além disso, o PZ representa a carga da partícula em relação ao

meio, portanto, não é a medida real da carga de superfície individual, mas sim a medida da dupla carga elétrica produzida pelos íons presentes em solução que pode ser alterada por vários fatores como, pH, força iônica e concentração (BERG et al., 2009; BHATTACHARJEE, 2016). Sendo assim, o baixo valor de PZ também pode ser atribuído ao pH ácido do meio (fase aquosa das NPs foi ajustada para pH 3,0), que possui maior concentração de H⁺, que neutralizam a carga negativa do polímero. Além disso, a EE das NPs determinada através do dispositivo de ultracentrifugação Amicon foi de 20,52% ± 0,72, semelhante às obtidas em outros estudos para NPs de PCL contendo MTX (BOECHAT et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2013).

As NPs demonstraram características adequadas durante os 21 dias de análises, porém, as NPs que continham o tensoativo 77KL, apresentaram um precipitado em 72 horas que não foi observado nas NPs sem o tensoativo. Portanto, o precipitado foi atribuído ao 77KL que possui pK_a de 6,2 e, portanto em pH ácido (fase aquosa), está menos ionizado fazendo com que sua solubilidade em água diminua (NOGUEIRA et al., 2013). Após os 21 dias, as NPs que continham MTX começaram a apresentar formação de um precipitado amarelo. A fim de melhorar a estabilidade das NPs optou-se por liofilizar a formulação.

Tabela 1 - Caracterização físico-química das NPs.

Tempo (dias)	Formulação	Tamanho (nm)	PDI	PZ (mV)	pH
0	NP Br	170,6 ± 1,25	0,064 ± 0,02	-2,34 ± 0,08	2,94
	NP Br 77KL	174,1 ± 2,30	0,070 ± 0,06	-2,10 ± 0,13	3,07
	NP MTX	174,1 ± 0,35	0,101 ± 0,04	-2,15 ± 0,08	3,25
	NP MTX 77KL	178,5 ± 2,12	0,135 ± 0,01	-1,98 ± 0,17	3,37
7	NP Br	182,7 ± 2,12	0,141 ± 0,01	-2,25 ± 0,13	2,68
	NP Br 77KL	174,0 ± 1,32	0,082 ± 0,02	-1,95 ± 0,10	2,77
	NP MTX	206,6 ± 2,47	0,208 ± 0,03	-2,09 ± 0,16	2,71
	NP MTX 77KL	195,6 ± 0,28	0,167 ± 0,01	-2,08 ± 0,05	2,88
14	NP Br	186,9 ± 2,56	0,185 ± 0,01	-1,75 ± 0,10	2,72
	NP Br 77KL	190,1 ± 2,66	0,199 ± 0,02	-1,94 ± 0,11	2,81
	NP MTX	206,9 ± 3,72	0,229 ± 0,01	-1,93 ± 0,28	2,88
	NP MTX 77KL	179,6 ± 1,83	0,173 ± 0,02	-2,17 ± 0,07	2,93
21	NP Br	173,0 ± 2,42	0,078 ± 0,02	-1,43 ± 0,21	2,70
	NP Br 77KL	173,8 ± 1,78	0,113 ± 0,02	-1,33 ± 0,19	2,83
	NP MTX	246,7 ± 2,55	0,232 ± 0,02	-1,71 ± 0,72	2,76
	NP MTX 77KL	251,0 ± 3,19	0,247 ± 0,02	-1,49 ± 0,17	2,96

3.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

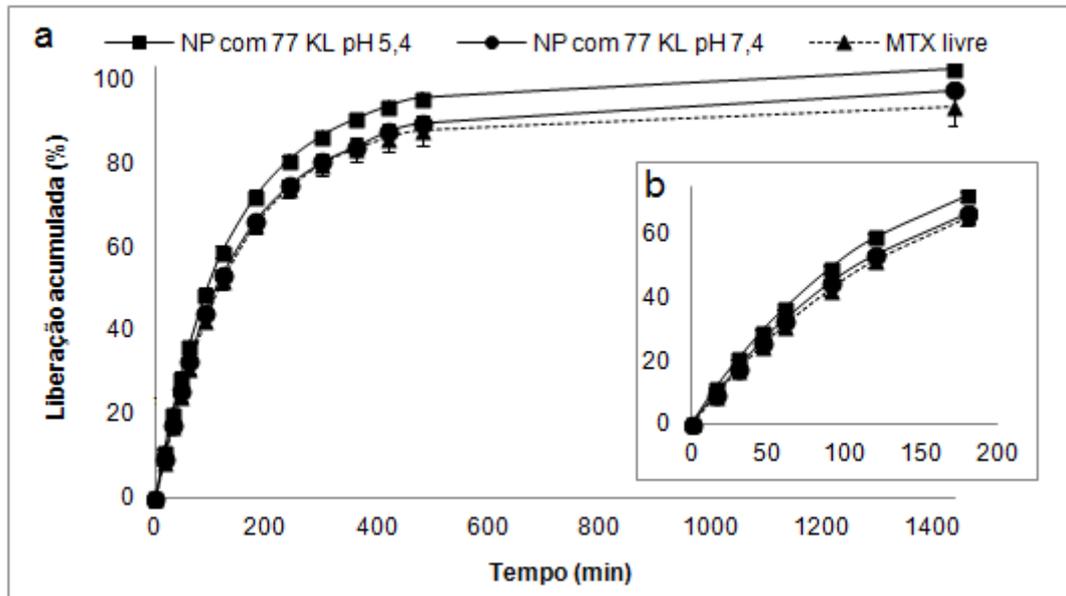
O método desenvolvido demonstrou ser linear na faixa de trabalho especificada (1-30 µg/mL), com coeficiente de correlação de 0,99996. Através da ANOVA, comprovou-se que o método apresentou regressão linear ($p < 0,05$) e não apresentou desvio de linearidade ($p > 0,05$). A especificidade foi determinada pela comparação do cromatograma obtido para MTX livre, NP MTX e NP branca, sendo que os componentes das NPs não apresentaram interferência no tempo de retenção do MTX no comprimento de onda utilizado. Além disso, para confirmar a ausência de interferências no método, a avaliação da pureza do pico foi realizada utilizando um detector de arranjo de diodos (DAD) em que o pico do MTX apresentou índice de pureza de pico superior a 0,9999. O DPR inferior a 2% confirmou a precisão do método, sendo, o DPR da repetibilidade, precisão entre dias e entre analistas de, respectivamente, 1,72, 0,08 e 0,42%. A exatidão foi comprovada através do teste de recuperação, que apresentou teores entre 98 e 102% (100,81%). O método é robusto para as variáveis testadas, pois não ocorreram mudanças significativas nos teores ($p > 0,05$). Além disso, foram determinados os valores dos limites de detecção (0,2 µg/mL) e quantificação (0,73 µg/mL) do método.

3.3 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Os estudos de liberação foram realizados com as NPs contendo MTX e 77KL em PBS pH 7,4 e 5,4. Como meio de comparação, a liberação do MTX livre também foi realizada (figura 1). Foi possível observar que o MTX possui rápida liberação inicial independente da condição testada. A liberação rápida do MTX das NPs pode ser explicada pelas características do próprio MTX, que por ser um fármaco hidrofílico, tem mais afinidade pelo meio aquoso e, portanto, possui uma liberação inicial mais rápida se comparada a fármacos lipofílicos (DASH; KONKIMALLA, 2012). Além disso, já foi observado que o poloxâmico pode aumentar a velocidade de liberação, uma vez que NPs de tamoxifeno preparadas na ausência de poloxâmico apresentaram uma liberação inicial significativamente menor (CHAWLA; AMIJI, 2002). Observou-se que as NPs apresentaram um perfil de liberação no pH 5,4 ligeiramente superior ao obtido no pH 7,4 e para o MTX livre. Essa diferença foi demonstrada através da análise de variância multivariada (MANOVA) ($p = 0,037$) e

pode ser atribuída ao tensoativo 77KL, que apresenta comportamento pH-dependente.

Figura 1 - Perfil de liberação do MTX livre e encapsulado nos pHs 7,4 e 5,4. (a) perfil completo e (b) perfil com zoom nos tempos iniciais, até 180 min. A estatística foi realizada usando MANOVA ($p < 0,05$).



3.3.1 Modelagem matemática

A fim de determinar o mecanismo de liberação do MTX das NPs foi realizada a modelagem matemática do estudo de liberação *in vitro*. Através da análise dos valores de MSC (critério de seleção do modelo) e do coeficiente de correlação (r), sugere-se que a liberação do MTX seja biexponencial, em ambos os pHs (tabela 2). A constante de velocidade da primeira fase da liberação (k_1) foi de 0,0144 e 0,0081 h^{-1} , para os pHs 5,4 e 7,4 respectivamente. A segunda parte da liberação ocorreu com uma constante (k_2) de 0,0075 e 0,0068 h^{-1} , respectivamente, para os pHs 5,4 e 7,4. Além disso, os valores de a e b sugerem que 99% do MTX está na parte interna das NPs e apenas 1% está adsorvido na superfície.

A equação de Korsmeyer–Peppas sugere que o MTX é liberado das NPs seguindo o modelo não fickiano (n entre 0,43 e 0,85), no qual a liberação do fármaco ocorre pelo relaxamento das cadeias poliméricas e posterior difusão do fármaco (RITGER; PEPPAS, 1987b).

Tabela 2 - Valores obtidos na análise da modelagem matemática para as NPs com MTX nos pHs 5,4 e 7,4.

	NPs MTX pH 5,4	NPs MTX pH 7,4
Biexponencial		
R	0,99	0,99
MSC	9,31	8,17
k_1 (h^{-1})	0,0144	0,0081
$t_{1/2} k_1$ (h^{-1})	48,12	85,55
k_2 (h^{-1})	0,0075	0,0068
$t_{1/2} k_2$ (h^{-1})	92,40	101,91
A	0,01	0,01
B	0,99	0,99
Korsmeyer–Peppas		
R	0,99	0,99
A	0,02	0,02
N	0,68	0,70

3.4 LIOFILIZAÇÃO

As condições as quais são submetidas os produtos durante o processo de liofilização podem causar danos ao produto final. Quando esse dano ocorre em estágios iniciais, como durante o congelamento, pode aumentar significativamente nas etapas seguintes do processo (FONTE; REIS; SARMENTO, 2016). Portanto, os crioprotetores foram adicionados às NPs para garantir a redispersão adequada e evitar a cristalização da suspensão durante o congelamento (PINTO REIS et al., 2006). Várias das condições testadas apresentaram recuperação em torno de 100% (tabela 3). Porém, apenas as NPs liofilizadas com trealose 10 e 15% mantiveram tamanho semelhante ao inicial com relação T_f/T_0 de 1,002 e 0,928, respectivamente. Além disso, após a liofilização apresentaram teor de 94,40 e 93,94% semelhantes ao inicial que foi 96,22%. Dentre elas, decidiu-se utilizar a condição com 10% de trealose. A trealose é um dos crioprotetores mais utilizados e possui algumas vantagens em relação a outros açúcares, principalmente a ausência de ligações internas de hidrogênio, que permite a formação de ligações de hidrogênio mais flexíveis com as NPs durante a liofilização, baixa higroscopicidade e baixa reatividade química (CROWE; REID; CROWE, 1996).

Tabela 3 - Caracterização das NPs liofilizadas.

	Rendimento (%)	Tamanho inicial (nm)	Tamanho final (nm) ^a	Relação T_f/T_0	PDI inicial	PDI final ^a
Lactose 2%	87,50	184,2	421,8	2,290	0,112	0,618
Lactose 5%	99,45	184,2	267,5	1,452	0,112	0,348
Lactose 10%	103,06	184,2	248,9	1,351	0,112	0,243
Lactose 15%	98,50	199,6	273,7	1,371	0,215	0,314
Trealose 2%	82,20	199,6	212,9	1,067	0,215	0,223
Trealose 5%	82,86	199,6	283,6	1,421	0,215	0,366
Trealose 10%	85,84	195,9	196,3	1,002	0,211	0,190
Trealose 15%	96,76	195,9	181,7	0,928	0,211	0,120

^a Determinado após o processo de liofilização das nanopartículas

Além disso, foi avaliada a manutenção das características iniciais na suspensão de nanoesferas branca que apresentou recuperação de 91,88% e 30 dias após ser liofilizada a relação T_f/T_0 foi de 1,1094 e o PDI de 0,178 (PDI inicial 0,137). A estabilidade da NP com MTX também foi avaliada (tabela 4). As NPs mantiveram suas características iniciais durante os 60 dias (T_f/T_0 de 1,0834). O teor final em 60 dias diminuiu apenas 6,39% enquanto que em 30 dias o teor das NPs sem liofilizar diminuiu em 52,74%, demonstrando que a liofilização foi eficiente em aumentar a estabilidade das NPs. A EE também não diminuiu significativamente, em 60 dias passou de 20,12 para 18,36%.

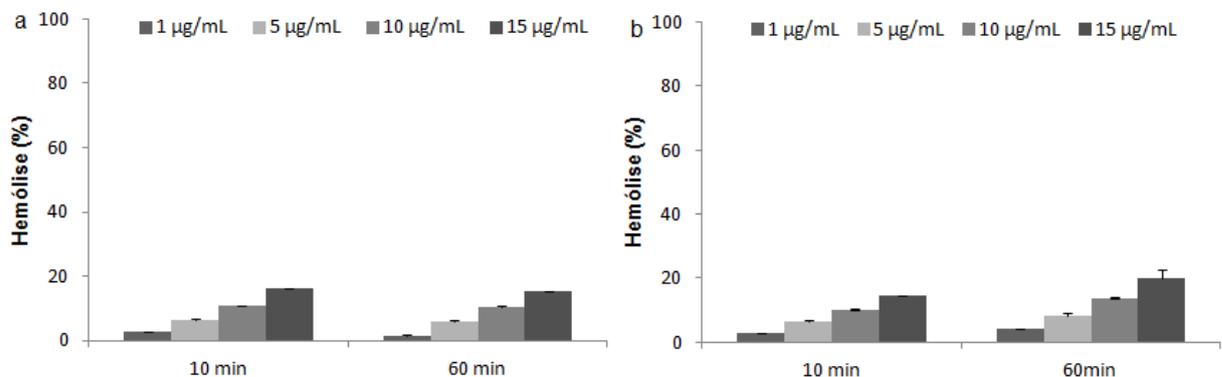
Tabela 4 - Estabilidade das NPs liofilizadas contendo MTX

Tempo (dias)	Relação T_f/T_0	Teor (%)	EE (%)
0	1,0912	90,25	20,12
30	1,1011	89,23	18,77
60	1,0834	83,86	18,36

3.5 ENSAIO DE HEMOCOMPATIBILIDADE

A relevância clínica da avaliação do impacto da administração sistêmica de nanopartículas sobre os componentes sanguíneos pode ser evidenciada pelo crescente número de estudos de hemocompatibilidade de vetores nanoestruturados (KUZNETSOVA et al., 2012). Nesse contexto, a hemocompatibilidade das NPs com e sem MTX na presença de 77KL foi avaliada através do ensaio de hemólise, em que a hemoglobina é quantificada para estimar os danos causados ao eritrócito (figura 2). As NPs sem MTX apresentaram baixa hemólise nas concentrações mais baixas (menor que 11%), enquanto que na mais alta observou-se hemólise ligeiramente superior independente do tempo de incubação. As NPs brancas foram diluídas na mesma proporção das NPs com MTX. Da mesma forma, as NPs com MTX demonstraram percentual hemolítico de no máximo 12% nas concentrações mais baixas, chegando na concentração mais alta a um máximo de 19,83% no tempo de incubação de 1 hora. Sendo assim, os resultados obtidos sugerem que as NPs desenvolvidas são hemocompatíveis até a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, a qual já apresenta uma atividade antiproliferativa significativa evidenciada nos estudos da atividade antitumoral *in vitro* (ver seção 3.7).

Figura 2 - Percentual de hemólise obtido pelas NPs com 77KL após 10 e 60 min de incubação com eritrócitos humanos em que (a) NPs sem MTX (concentrações equivalentes às NPs contendo o fármaco) e (b) NPs com MTX. Cada valor corresponde a média \pm DP de três experimentos independentes.



3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PH-DEPENDENTE DAS NPS

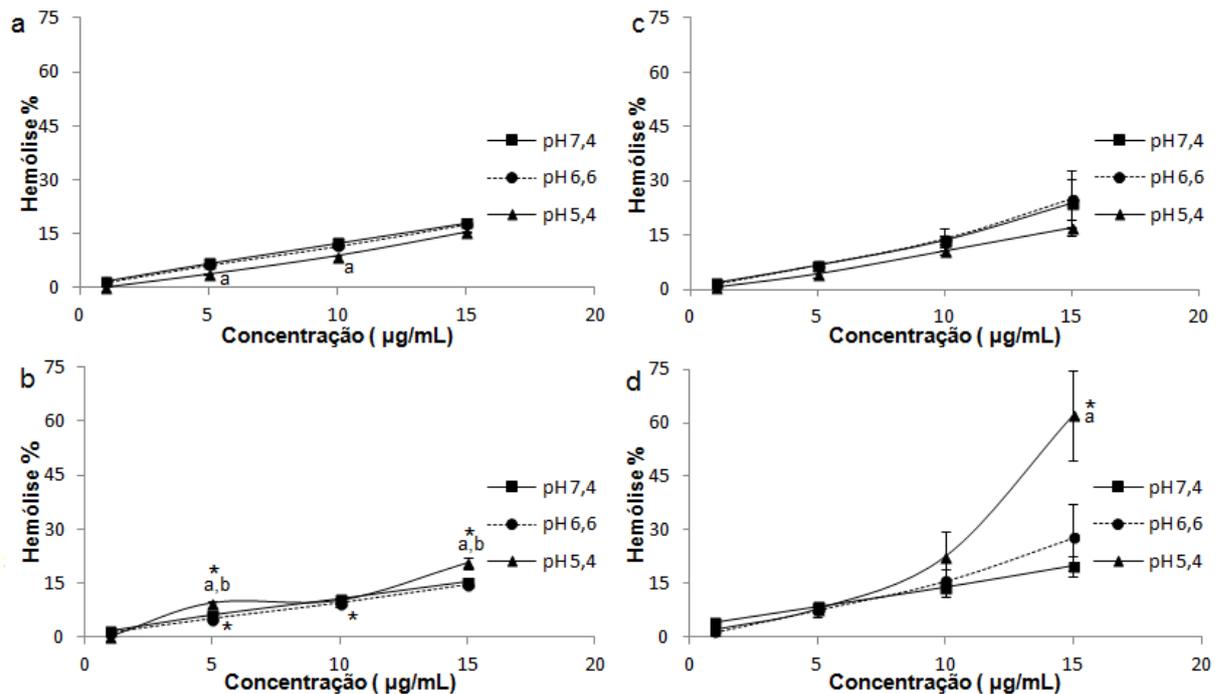
O ensaio de hemólise, que utiliza o eritrócito como modelo de membrana endossomal, foi realizado a fim de avaliar se a presença do 77KL confere às NPs um comportamento lítico pH-dependente. Primeiramente, foi observado o comportamento hemolítico das NPs brancas, com e sem 77KL (figura 3). Em pH fisiológico, essas NPs apresentaram hemólise em torno de 16% na concentração de 15 µg/mL. No pH 5,4, a NP sem 77 KL manteve seu percentual de hemólise, enquanto que as NPs com 77 KL apresentaram hemólise de 20,46% (5,14% maior, $p < 0,05$). Nessa mesma concentração, as NPs com 77KL também apresentaram diferença entre o pH 6,6 e 5,4 (5,96% maior para pH 5,4, $p < 0,05$). Essa diferença também foi observada entre as NPs com e sem 77KL no pH 5,4, em que as NPs com 77KL apresentaram percentual de hemólise maior que as sem 77KL ($p < 0,05$). Na concentração de 5 e 10 µg/mL foram obtidos valores de hemólise superiores no pH 7,4 que no 5,4 ($p < 0,05$) para as NPs sem 77KL, por outro lado as NPs com 77KL demonstraram maior percentual de hemólise no pH 5,4 em comparação ao pH 7,4, na concentração de 5 µg/mL.

Foram preparadas NPs com MTX com e sem 77KL, as quais também foram submetidas às mesmas condições de ensaio. Nas concentrações mais baixas não foram observadas diferenças estatísticas entre os percentuais de hemólise obtidos para as NPs com e sem 77KL. Porém, na concentração de 15 µg/mL observou-se que a NP com 77KL apresentou hemólise 3,67 vezes superior a obtida com as NPs sem 77KL (45,23% menor, $p < 0,05$), no pH 5,4. Além disso, as NPs com 77KL apresentaram diferença significativa entre a taxa de hemólise obtida nos diferentes valores de pH, sendo esta até 42,35% maior no pH 5,4 ($p < 0,05$).

Portanto, conforme esperado, o 77 KL conferiu à formulação um comportamento lítico pH-dependente, evidenciando-se que no pH 5,4 houve um aumento significativo no percentual de hemólise. Esses resultados indicam que as NPs desenvolvidas possuem uma potencial capacidade para promover a liberação intracelular do fármaco encapsulado de modo pH-dependente, promovendo a ruptura dos endosomas, que apresentam um ambiente levemente ácido (pH ~6,6 e 5,4 nos endossomas primários e secundários, respectivamente). Sendo assim, o comportamento pH-dependente pode ser atribuído ao grupo carboxílico do 77 KL, que em condições ácidas parece tornar-se protonado, fazendo com que se torne não

iônico e, portanto, mais hidrofóbico. Estes segmentos hidrofóbicos podem se inserir em regiões lipofílicas da bicamada lipídica das membranas celulares, causando sua solubilização ou alteração de sua permeabilidade e, assim, induzir a lise da membrana (NOGUEIRA et al., 2016). Além disso, as concentrações utilizadas no ensaio seriam facilmente atingidas *in vivo*, visto que essas são bastante inferiores a concentração máxima de MTX no soro que é cerca de 354 $\mu\text{g/mL}$ (GLANTZ et al., 1998).

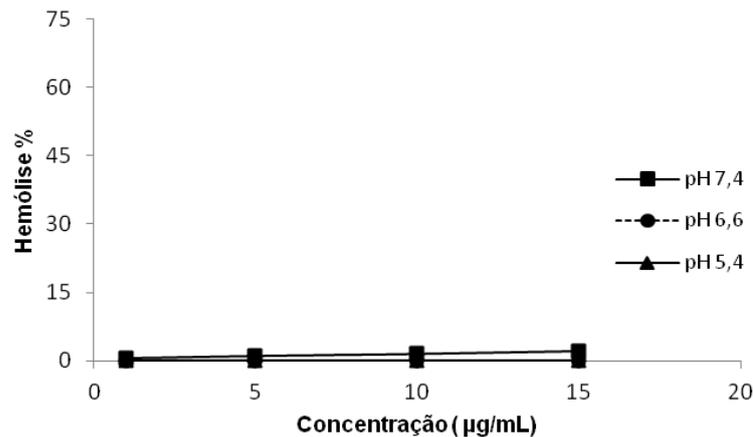
Figura 3 - Atividade lítica pH-dependente para as NPs com e sem MTX e 77KL, onde (a) NPs brancas sem 77KL, (b) NPs brancas com 77KL, (c) NPs com MTX sem 77KL e (d) NPs com MTX e com 77KL. Os resultados correspondem a média de três experimentos independentes \pm DP. A estatística foi realizada usando ANOVA seguida do teste de Tukey. ^a diferença significativa em relação ao pH 7,4 ($p < 0,05$) e ^b diferença significativa em relação ao pH 6,6 ($p < 0,05$). * diferença significativa em relação às NPs sem 77KL ($p < 0,05$).



A atividade lítica da membrana também foi avaliada para o MTX livre, o qual não apresentou hemólise significativa em nenhum dos pHs, independentemente da concentração testada (figura 4). Sendo assim, foi observado um efeito sinérgico da atividade pH-dependente do MTX quando nanoencapsulado na presença de 77KL. Na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ no pH 5,4 foram obtidos percentuais de hemólises de

0,00; 16,95 e 62,18%, para MTX livre, NP MTX sem 77KL e NP MTX com 77KL, respectivamente.

Figura 4 - Atividade lítica do MTX livre. Os resultados correspondem a média de três experimentos independentes \pm DP.



3.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Primeiramente, a atividade antitumoral *in vitro* do MTX livre e das NPs com MTX e 77KL foram determinadas em duas linhagens celulares tumorais, MCF-7 e HepG2. Ainda foi utilizada uma linhagem não tumoral HaCaT a fim de determinar se as NPs possuem atividade específica para o tecido tumoral (figura 5). No ensaio MTT, as NPs apresentaram maior citotoxicidade nas linhagens tumorais quando comparadas ao MTX livre, e essa atividade foi dependente da concentração, quanto maior a concentração de NPs maior a citotoxicidade. A viabilidade das células HepG2 após tratamento com o MTX livre foi de 61,93%, enquanto que o tratamento com as NP MTX resultou em uma viabilidade de 30,79% na concentração de 5 µg/mL (a viabilidade foi 31,14% menor, $p < 0,05$). Essa diferença ficou ainda mais evidente nas células MCF-7, sendo que na mesma concentração, a viabilidade celular diminuiu de 81,81% com o MTX livre para 36,29% com as NPs MTX (viabilidade 45,52% menor, $p < 0,005$). A diminuição da viabilidade após tratamento com as NPs também foi observada com as células MFC-7 nas concentrações de 2,5 e 1 µg/mL ($p < 0,05$).

O ensaio NRU foi menos sensível para detectar os efeitos citotóxicos do MTX livre e encapsulado nas células MCF-7. Por outro lado, nas HepG2 o NRU

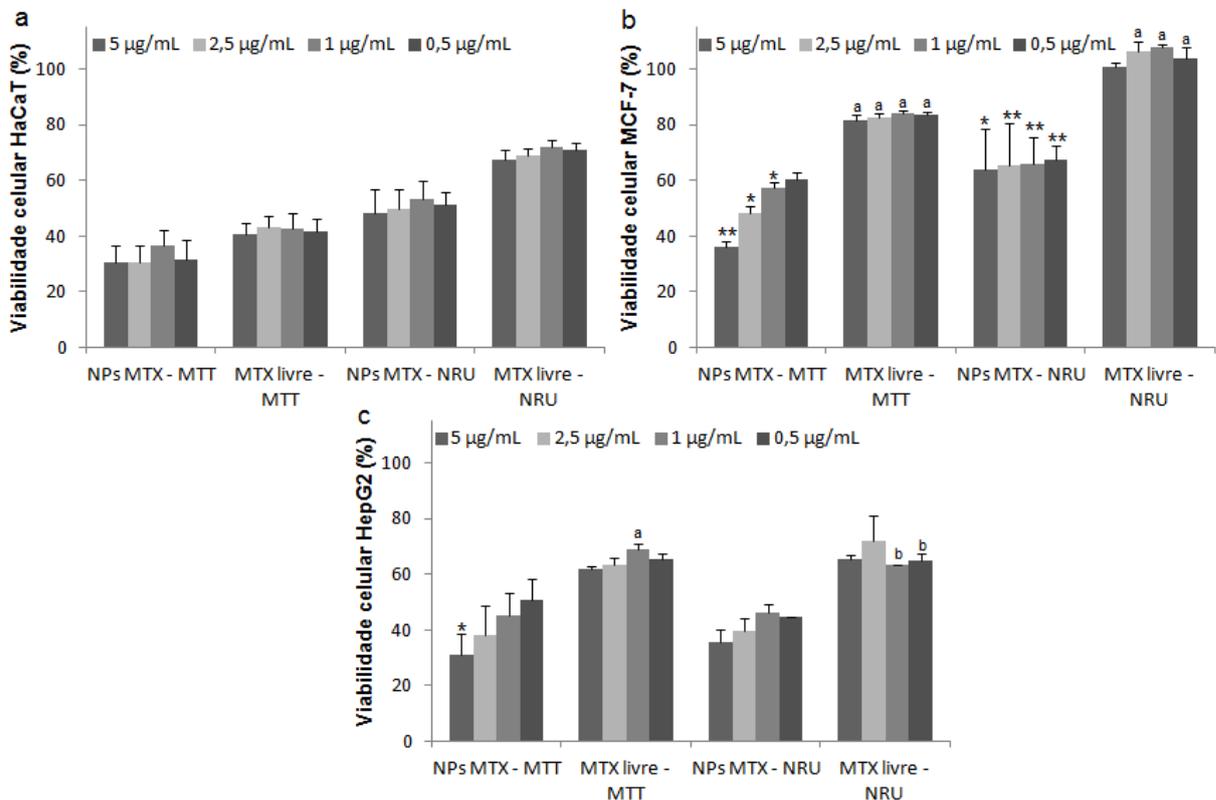
demonstrou sensibilidade semelhante ao MTT, tanto para o MTX livre como encapsulado. Mesmo assim, não foram observadas diferenças significativas nas HepG2. Nas células MCF-7, a viabilidade diminuiu de 100,63% com o MTX livre, para 64,04% com as NPs MTX, na concentração de 5 µg/mL (viabilidade 36,59% menor, $p < 0,05$). Essa diferença também foi observada nas outras concentrações testadas (na concentração 2,5 µg/mL, $p < 0,005$; 1 µg/mL, $p < 0,005$ e 0,5 µg/mL, $p < 0,005$). Neste ensaio também ficou evidente que a linhagem HepG2 é mais sensível a ação do MTX livre quando comparada a MCF-7, sendo a diferença da viabilidade entre elas de 44,57% ($p < 0,005$) e 38,73% ($p < 0,005$) nas concentrações de 1 e 0,5 µg/mL, respectivamente.

Os ensaios realizados utilizando a linhagem não-tumoral HaCaT demonstraram que as NPs não apresentam uma atividade específica nas células tumorais, uma vez que também causaram citotoxicidade nessa linhagem de queratinócitos, a qual foi independente da concentração de MTX livre e encapsulado. Porém, observou-se que as HaCaT são mais sensíveis à ação do MTX livre, apresentando no MTT uma diferença significativa da viabilidade celular, que foi de 82,32% nas MCF-7 e diminuiu para 42,75% nas HaCaT (viabilidade foi 39,57% menor, $p < 0,005$), na concentração de 1 µg/mL. O mesmo foi observado em relação às células HepG2, que na mesma concentração apresentaram viabilidade de 68,86% (26,11% superior às HaCaT, $p < 0,05$). Além disso, em nenhuma das concentrações testadas observou-se diferença significativa entre a viabilidade obtida pelo MTX livre e encapsulado, evidenciando que a citotoxicidade encontrada para as NPs de MTX pode ser atribuída a sensibilidade das HaCaT ao MTX. Conforme observado anteriormente, o ensaio de NRU foi menos sensível para demonstrar os efeitos citotóxicos, ainda assim foi observada diferença significativa entre a viabilidade celular obtida para o MTX livre na MCF-7 e na HaCaT nas concentrações de 2,5; 1 e 0,5 µg/mL (diminuição da viabilidade em 37,57%, $p < 0,05$; 36,04%, $p < 0,05$ e 32,72% $p < 0,005$, respectivamente).

O MTT foi mais sensível para detectar possíveis efeitos citotóxicos, independentemente da linhagem celular. Isso pode ser devido ao MTT determinar atividade metabólica mitocondrial e, portanto, a nível dos compartimentos intracelulares, enquanto que o NRU determina danos na integridade da membrana celular (NOGUEIRA et al., 2016). Isso pode ser atribuído ao mecanismo de ação do MTX, que exerce sua ação farmacológica através da inibição da enzima DHFR, uma

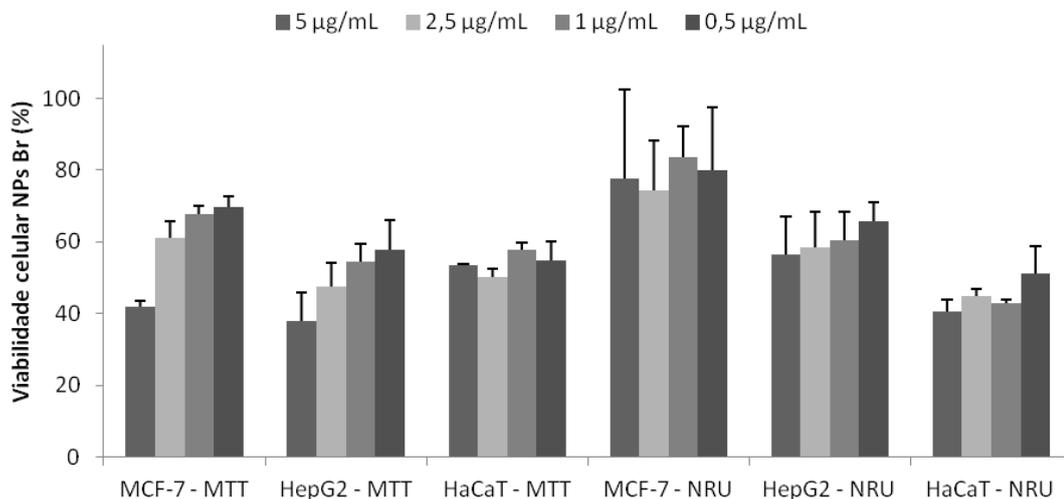
enzima intracelular que produz intermediários para síntese de purinas e timina, essências para síntese de DNA e RNA (RUBINO, 2001). Além disso, em pH fisiológico o MTX está em sua forma aniônica que atravessa a membrana celular com dificuldade e, portanto, entra nas células através de transportadores específicos, e acaba não causando danos à membrana celular (GENESTIER et al., 2000; RUBINO, 2001). Desta forma, os efeitos citotóxicos causados pelas NPs, obtidos pelo ensaio de NRU, podem também estar relacionados à ação do poloxâmico, que causa alterações drásticas na microviscosidade das membranas celulares através da sua adsorção e consequente alteração da estrutura das bicamadas lipídicas (KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002).

Figura 5 - Efeitos citotóxicos do MTX livre e encapsulado em diferentes concentrações e ensaios de viabilidade (MTT e NRU). Os gráficos representam as viabilidades encontradas nas células (a) HaCaT, (b) MCF-7 e (c) HepG2. Os resultados correspondem a média de três experimentos independentes \pm DP. A estatística foi realizada usando ANOVA seguida do teste de Tukey. ^a diferença significativa em relação às células HaCaT ($p < 0,05$) e ^b diferença significativa em relação às células MCF-7 ($p < 0,05$). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ para diferença significativa em relação ao MTX livre.



A citotoxicidade das NPs brancas também foi verificada diluindo-as na mesma proporção em que foram diluídas as NPs com MTX (figura 6). Através do MTT foi possível verificar que essas apresentaram citotoxicidade dependente da concentração nas HepG2 e MCF-7, enquanto que o ensaio MTT nas HaCaT e o NRU nas três linhagem demonstraram citotoxicidade independente da dose. Ainda assim, a viabilidade das NPs brancas foi superior às obtidas para as NPs com MTX. A citotoxicidade das NPs brancas já foi descrita anteriormente (SURNAR; SHARMA; JAYAKANNAN, 2015; VALÉRIO et al., 2015; ZHAO et al., 2009). Essa citotoxicidade pode ser explicada pelo fato de que, apesar das NPs serem formuladas com componentes biodegradáveis e biocompatíveis, suas propriedades como concentração dos componentes, população, estrutura e tipo de nanoestrutura, podem interferir na estabilidade da membrana celular, provocando desequilíbrio entre os íons intra e extra celulares, proteínas e moléculas necessárias para manter as função celulares normais (MENDES et al., 2015).

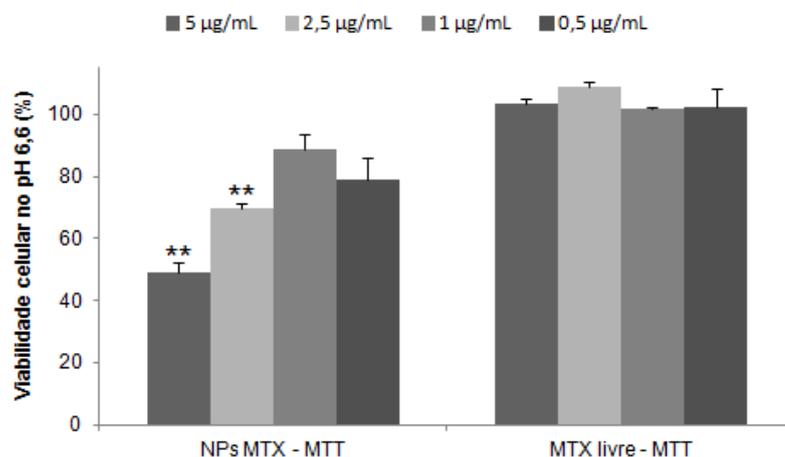
Figura 6 - Citotoxicidade obtida para as NPs brancas utilizando MTT e NRU nas linhagens celulares MCF-7, HepG2 e HaCaT.



Além disso, a fim de verificar a atividade pH-dependente do 77KL, foi avaliada a citotoxicidade das NP com MTX e do MTX livre nas MCF-7 no pH 6,6 (figura 7). Na concentração de 5 µg/mL foi possível verificar uma diminuição significativa da viabilidade obtida com o MTX livre (103,60%) e com a NP MTX (49,05%) (viabilidade 54,55% menor $p < 0,005$). Na concentração de 2,5 µg/mL, essa diferença também

se manteve, sendo a viabilidade 39,31% menor para a NP MTX ($p < 0,005$). Esses resultados corroboram os obtidos por (NOGUEIRA et al., 2013) em que foram desenvolvidas NPs de quitosana contendo MTX e 77 KL que também demonstraram citotoxicidade em pH levemente acidificado.

Figura 7 - Viabilidade celular encontrada para as MCF-7 no pH 6,6. Os resultados correspondem a média de três experimentos independentes \pm DP. A estatística foi realizada usando ANOVA seguida do teste de t. ** diferença significativa em relação ao MTX livre ($p < 0,005$).



3.8 FOTOESTABILIDADE

Através dos resultados obtidos (figura 8), pode-se observar que em ambas condições de ensaio o MTX livre sofreu maior degradação em comparação ao MTX nanoencapsulado, o que sugere que a formulação é capaz de reduzir os danos causados pela fotodegradação, sendo que esse comportamento pode ser explicado pela capacidade das NPs em espalhar luz (MORABITO et al., 2011). O teor em 8h da nanoformulação foi cerca de 30% superior ao do MTX livre após exposição às radiações UVA e UVC. Esses resultados foram analisados pelo teste t de Student, comprovando a diferença estatística entre os teores de MTX livre e nanoencapsulado nas duas condições do ensaio ($T_{\text{calculado}} > T_{\text{tabelado}}$; $p < 0,05$). Além disso, foram utilizados controles escuros em cada uma das condições para confirmar que a degradação foi atribuída à radiação e não a fatores externos, como aquecimento. Além disso, o cromatograma obtido para o MTX livre na UVC em 8h está demonstrado na figura 9 onde é possível verificar que o método

desenvolvido foi capaz de quantificar o MTX mesmo na presença de seus produtos de degradação.

Figura 8 - Teores obtidos após exposição do MTX livre e nanoencapsulado (NP MTX) à radiação UVA (a) e UVC (b).

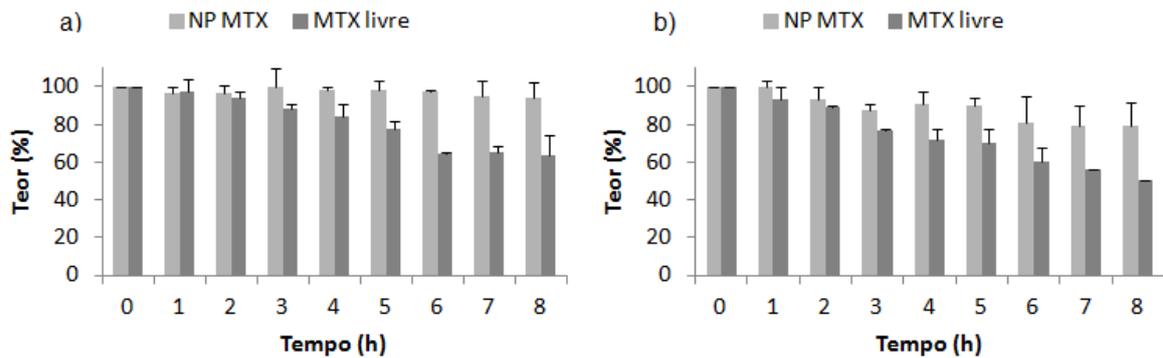
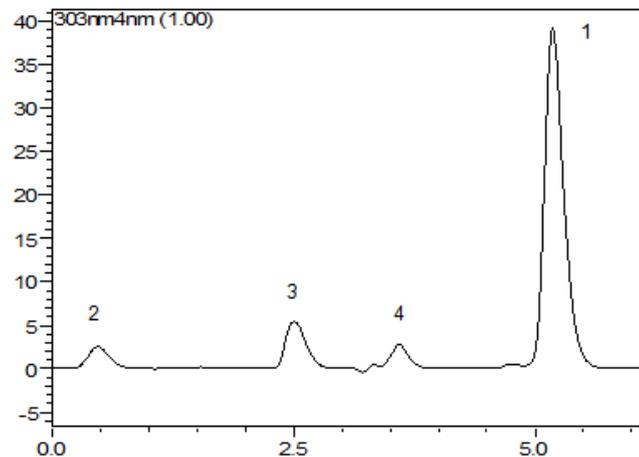


Figura 9 - Cromatograma obtido para fotodegradação do MTX livre na UVC em 8h onde (1) é o MTX e (2, 3 e 4) produtos de degradação.



O MTX livre apresentou uma reação de ordem zero ($r = 0,9775$) quando exposto a radiação UVA, que se caracteriza por manter a velocidade de degradação constante independentemente da concentração do reagente; logo, o fator limitante é outro, como por exemplo a absorção da luz (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). A constante de degradação (k), determinada através da equação da reta, foi $5,19 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foi de 9,6 h, e o t_{90} 1,9 h, ambos calculados a partir do valor de k . A ordem de reação do MTX nanoencapsulado na

UVA não pôde ser determinada, pois a degradação não foi suficiente para construir os gráficos, sendo o teor obtido após 8 h de degradação de 93,84 %.

Na radiação UVC, tanto o MTX livre quanto o nanoencapsulado apresentaram reações de primeira ordem ($r = 0,9933$ e $0,9470$, respectivamente), em que a velocidade da reação é diretamente proporcional a concentração do reagente (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). A k do MTX livre foi de $0,09 \text{ h}^{-1}$, o $t_{1/2}$ calculado foi 8,1 h e o t_{90} 1,2 h, semelhantes aos teores encontrados experimentalmente, em 8 h 50,60% e em 1 h 93,22%. Por outro lado, a NP MTX apresentou k $0,03 \text{ h}^{-1}$, $t_{1/2}$ de 22 h (superior ao maior tempo testado, 8 h) e t_{90} de 1,2 h, que difere do encontrado experimentalmente em 1 h, no qual obteve-se um teor de 100%. Essa diferença pode ser atribuída a baixa degradação sofrida pelo MTX nanoencapsulado, que torna o cálculo de ordem de reação menos preciso (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

4 CONCLUSÃO

As NPs desenvolvidas apresentaram características físico-químicas adequadas e permaneceram estáveis após a liofilização. O perfil de liberação das NPs foi ligeiramente acelerado no pH 5,4, comparado ao pH 7,4. A inclusão do tensoativo 77KL conferiu a formulação uma atividade pH-dependente observada pelo ensaio de hemólise. A nanoencapsulação do MTX foi capaz de proteger o fármaco tanto da degradação induzida pela radiação UVA quanto UVC. O método desenvolvido demonstrou-se eficiente para quantificar o MTX, mesmo na presença de produtos de degradação. Além disso, as NPs apresentaram atividade antiproliferativa maior que o MTX livre nas MCF-7, e em menor grau nas HepG2. Essa atividade também foi observada em meio levemente acidificado ($\text{pH}_e \sim 6,6$), característico do microambiente do espaço extracelular do tecido tumoral. Portanto, os resultados obtidos sugerem que a inclusão do 77KL conferiu às NPs atividade pH-dependente, tornando-as promissoras para utilização na terapia antitumoral. Porém, ainda são necessários outros estudos *in vivo* para comprovar sua atividade.

REFERENCIAS

- BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. 2, p. 98–106, set. 2008.
- BAZBAN-SHOTORBANI, S. et al. Revisiting structure-property relationship of pH-responsive polymers for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, v. 253, p. 46–63, maio 2017.
- BERG, J. M. et al. The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations. **Nanotoxicology**, v. 3, n. 4, p. 276–283, 30 dez. 2009.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.
- BOECHAT, A. L. et al. Methotrexate-loaded lipid-core nanocapsules are highly effective in the control of inflammation in synovial cells and a chronic arthritis model. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 6603, 2015.
- CHAWLA, J. S.; AMIJI, M. M. Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1–2, p. 127–138, dez. 2002.
- CHEN, A. Z. et al. Formation of methotrexate-PLLA-PEG-PLLA composite microspheres by microencapsulation through a process of suspension-enhanced dispersion by supercritical CO₂. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 3013–3022, 2012a.
- CHEN, A. Z. et al. Nanonization of methotrexate by solution-enhanced dispersion by supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 67, p. 7–13, 2012b.
- CHUNG, N.-O.; LEE, M. K.; LEE, J. Mechanism of freeze-drying drug nanosuspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 437, n. 1–2, p. 42–50, nov. 2012.
- CROWE, L. M.; REID, D. S.; CROWE, J. H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? **Biophysical Journal**, v. 71, n. 4, p. 2087–2093, out. 1996.
- DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 1, p. 15–33, fev. 2012.
- FESSI, H. et al. **Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de nanoparticules.** French patent, 1988.
- FONTE, P.; REIS, S.; SARMENTO, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 225, p.

75–86, mar. 2016.

GENESTIER, L. et al. Mechanisms of action of methotrexate. **Immunopharmacology**, v. 47, n. 2–3, p. 247–257, maio 2000.

GLANTZ, M. J. et al. High-dose intravenous methotrexate for patients with nonleukemic leptomeningeal cancer: is intrathecal chemotherapy necessary? *Journal of Clinical Oncology*, v. 16, n. 4, p. 1561–1567, abr. 1998.

GOVENDER, T. et al. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release**, v. 57, n. 2, p. 171–185, 1999.

International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q2 R1: Guideline on Validation of Analytical Procedure. **Methodology**, 2005.

KABANOV, A. V; BATRAKOVA, E. V; ALAKHOV, V. Y. Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 5, p. 759–779, set. 2002.

KUZNETSOVA, N. R. et al. Hemocompatibility of liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan in the lipid bilayer. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 160, n. 2, p. 394–400, 10 jun. 2012.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

MENDES, L. P. et al. Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: The number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 29, n. 6, p. 1268–74, set. 2015.

MORABITO, K. et al. Review of sunscreen and the emergence of non-conventional absorbers and their applications in ultraviolet protection. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 5, p. 385–390, 2011.

NOGUEIRA, D. R. et al. The role of counterions in the membrane-disruptive properties of pH-sensitive lysine-based surfactants. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2846–56, jul. 2011a.

NOGUEIRA, D. R. et al. Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for in vitro cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 51–58, nov. 2011b.

NOGUEIRA, D. R. et al. In vitro antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, n. 11, p. 2758–72, abr. 2013.

NOGUEIRA, D. R. et al. Lysine-based surfactants in nanovesicle formulations: the role of cationic charge position and hydrophobicity in in vitro cytotoxicity and intracellular delivery. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 4, p. 404–21, 26 jun. 2014.

NOGUEIRA, D. R. et al. Inclusion of a pH-responsive amino acid-based amphiphile in methotrexate-loaded chitosan nanoparticles as a delivery strategy in cancer therapy. **Amino Acids**, v. 48, n. 1, p. 157–168, 2016.

NUSSBAUMER, S. et al. Analysis of anticancer drugs: A review. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2265–2289, 2011.

OLIVEIRA, C. P. et al. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, n. 4, p. 1141–1150, 2013.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 169–172, 1989.

PINTO REIS, C. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. a Simple Equation for Description of Solute Release. **J Control Drug Release**, v. 5, p. 23–36, 1987a.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37–42, jun. 1987b.

RUBINO, F. M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 764, n. 1–2, p. 217–254, 2001.

SÁNCHEZ, L. et al. The biological properties of lysine-derived surfactants. **Amino Acids**, v. 32, n. 1, p. 133–136, 2007.

SCHEEREN, L. E. et al. PEGylated and poloxamer-modified chitosan nanoparticles incorporating a lysine-based surfactant for pH-triggered doxorubicin release. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 138, p. 117–27, 1 fev. 2016.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101–106, 2012.

SURNAR, B.; SHARMA, K.; JAYAKANNAN, M. Core–shell polymer nanoparticles for prevention of GSH drug detoxification and cisplatin delivery to breast cancer cells. **Nanoscale**, v. 7, n. 42, p. 17964–17979, 2015.

VALÉRIO, A. et al. Synthesis of PEG-PCL-based polyurethane nanoparticles by

miniemulsion polymerization. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 135, p. 35–41, 1 nov. 2015.

VIVES, M. A. et al. Erythrocyte hemolysis and shape changes induced by new lysine-derivate surfactants. **Chemico-Biological Interactions**, v. 118, n. 1, p. 1–18, 1999.

XIAO, Y. et al. Functional Poly(ϵ -caprolactone) Based Materials: Preparation, Self-assembly and Application in Drug Delivery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 781–818, 31 mar. 2014.

YAN, F. et al. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 170–178, 2010.

ZHAO, J. et al. Preparation, characterization, and in vitro cytotoxicity study of cationic PCL-pluronic-PCL (PCFC) nanoparticles for gene delivery. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 90, n. 2, p. 506–13, ago. 2009.

5 RESULTADOS COMPLEMENTARES

5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

A maioria dos métodos disponíveis na literatura para quantificação de MTX por CLAE utiliza como fase estacionária coluna C18 e como fase móvel uma fase aquosa de pH 3,0 ou 6,0 e um solvente orgânico, geralmente acetonitrila (ACN) (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2014; MUSMADE et al., 2014; SARTORI et al., 2008; USP, 2009).

Neste estudo, todos os testes foram realizados utilizando uma coluna de fase reversa Gemini NX C18 (150 x 4,6 mm; 5µm) da Phenomenex, e o comprimento de onda de escolha foi 303 nm, que foi o de maior absorção do MTX.

Os primeiros testes foram realizados utilizando água acidificada a pH 3,0 com ácido acético e acetonitrila (ACN) Tabela 1. Nessas condições o tempo de retenção do fármaco foi muito baixo (entre 1 e 2 min) e, portanto, diminuiu-se a proporção de solvente orgânico e o fluxo, a fim de retardar o pico do MTX. Na condição H₂O pH 3,0:ACN (90:10) com fluxo 0,8 mL/min, o tempo de retenção foi de 4 min, porém ocorreu a divisão do pico. Posteriormente, foram testadas como fase móvel água ajustada a pH 6,0 e ACN e também H₂O pH 3,0 com 5% de tetrahydrofurano (THF) e ACN, conforme Sartori e colaboradores (2008) (tabela 1). Da mesma forma que nas condições anteriores o tempo de retenção obtido foi baixo (entre 1,5 e 2,5 min).

Em busca de uma alternativa, testou-se como fase móvel tampão fosfato 50mM pH 3,2 e ACN, segundo Nogueira e colaboradores (2014) (tabela 1). O tempo de retenção obtido (4,5 min) foi considerado adequado. Porém, foram realizados mais testes a fim de diminuir a concentração de tampão na fase móvel (tabela 2). Utilizou-se tampão fosfato pH 3,0 nas concentrações de 25 e 15 mM. Dentre as condições analisadas, as que apresentaram maior tempo de retenção foram tampão 15 e 25 mM:ACN (85:15), fluxo 0,6 mL/min. Portanto, essas condições foram avaliadas em um HPLC com detector PDA, a fim de determinar a pureza do pico, ao mesmo tempo que também estudaram-se os parâmetros cromatográficos como assimetria do pico e pratos teóricos. Como não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros cromatográficos, escolheu-se utilizar o tampão 15 mM para validação do método, por utilizar uma menor concentração de tampão.

Portanto, a condição utilizada foi tampão fosfato 15 mM pH 3,0: ACN (85:15) e fluxo de 0,6 mL/min.

Tabela 1 - Condições dos testes de fase móvel.

	Proporção da fase móvel	Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção (min)
H ₂ O pH3,0:ACN	50:50	0,8	1,4
H ₂ O pH3,0:ACN	50:50	0,5	2
H ₂ O pH3,0:ACN	65:35	1	1
H ₂ O pH3,0:ACN	75:25	0,8	1
H ₂ O pH3,0:ACN	90:10	0,8	4
H ₂ O pH6,0:ACN	50:50	0,6	2
H ₂ O pH6,0:ACN	50:50	0,5	2,5
H ₂ O pH6,0:ACN	60:40	0,5	2,5
H ₂ O pH6,0:ACN	75:25	0,8	2
H ₂ O pH6,0:ACN	90:10	0,8	2
H ₂ O pH 3,0 5% THF:ACN	75:25	0,8	1,5
H ₂ O pH 3,0 5% THF:ACN	70:30	0,8	1,5
H ₂ O pH 3,0 5% THF:ACN	80:20	0,6	2,1
H ₂ O pH 3,0 5% THF:ACN	85:15	0,6	2,2
Tampão 50mM pH 3,2:ACN	86:14	1	4,5

Tabela 2 - Otimização da fase móvel.

	Proporção da fase móvel	Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção (min)
Tampão 25mM pH 3,0:ACN	85:15	0,8	4,6
Tampão 25mM pH 3,0:ACN	85:15	0,6	4,7
Tampão 25mM pH 3,0:ACN	84:16	0,8	3,5
Tampão 25mM pH 3,0:ACN	82:18	0,6	3,6
Tampão 25mM pH 3,0:ACN	81:19	0,6	3,3
Tampão 25mM pH 3,0:ACN	80:20	0,6	3,1
Tampão 15mM pH 3,0:ACN	85:15	0,6	5
Tampão 15mM pH 3,0:ACN	82:18	0,6	4
Tampão 15mM pH 3,0:ACN	81:19	0,6	3,5
Tampão 15mM pH 3,0:ACN	80:20	0,6	3,2

Finalmente, realizou-se uma análise de 12 replicatas de uma mesma solução padrão, a fim de verificar se o método mantinha os parâmetros previamente demonstrados na condição escolhida (tabela 3). Os resultados foram considerados adequados, sendo que o DPR das áreas obtidas foi de 0,76%.

Tabela 3 - Condições dos testes de fase móvel.

	Tempo de retenção	Área	Pratos teóricos	Fator de capacidade	Assimetria
1	5,280	23.932.400	5746	9,56085	1,18327
2	5,232	24.004.381	5636	9,46379	1,19367
3	5,212	23.765.649	5516	9,42496	1,20221
4	5,203	23.629.856	5664	9,40556	1,21798
5	5,159	23.869.884	5680	9,31819	1,19931
6	5,140	23.879.973	5673	9,27936	1,20856
7	5,101	23.523.485	5588	9,20171	1,21627
8	5,111	24.223.742	5650	9,22112	1,18848
9	5,077	24.027.887	5579	9,15317	1,20654
10	5,077	23.896.228	5622	9,15315	1,17420
11	5,072	23.847.511	6058	9,14347	1,21735
12	5,057	23.925.369	5652	9,11435	1,20514
Média	5,14	23.877.197,08	5.657,83	9,29	1,20
DP	0,07	182.004,48	85,50	0,15	0,01
DPR	1,43 %	0,76 %	1,51 %	1,58%	1,16%

5.2 DESENVOLVIMENTO DAS NP_s

A fim de obter uma suspensão de NPs com características físico-químicas adequadas e boa eficiência de encapsulação, realizou-se um estudo de formulação. Primeiramente, foram testadas NPs de PCL com os tensoativos Span 60 e Tween 80 através do método de nanoprecipitação utilizando diferentes proporções dos componentes (tabela 4). Todas as NPs foram preparadas para volume final de 10 mL. O MTX foi previamente solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO), pois é insolúvel em acetona.

Tabela 4 - Otimização da formulação de nanopartículas através do método de nanoprecipitação utilizando o polímero PCL e os tensoativos Span 60 e Tween 80.

	Fase orgânica				Fase aquosa		
	PCL (mg)	Span 60 (mg)	MTX (mg)	Acetona (mL)	Tween 80 (mg)	pH	Água (mL)
NP 1	100	60	10	30	60	—	60
NP 2	100	60	5	30	60	—	30
NP 3	100	60	2,5	30	60	—	60
NP 4	40	40	2,5	10	30	5,0	20
NP 5	40	40	2,5	10	40	3,0	20
NP 6	40	40	2,5	15	40	3,0	15

NP 7	40	40	2,5	12	40	3,0	24
NP 8	40	40	2,5	12	40	_____	24

Nas formulações em que foram utilizados 100 mg de PCL (NP 1, 2 e 3), observou-se a formação de um precipitado branco. As NP 2 e 6, com proporção 1:1 de fase orgânica e aquosa, precipitaram logo após a fase orgânica ser vertida sobre a aquosa. Ainda, as formulações que continham maior concentração de MTX (NP 1 e 2) ou que não tiveram o pH da fase aquosa ajustado para 3,0 (NP 3, 4 e 8), apresentaram um precipitado amarelo. O tamanho da NP 5 no tempo zero foi de 205 nm, porém após cinco dias apresentou precipitação e seu tamanho passou para 400 nm, portanto foi considerada instável. Já a NP 7 demonstrou ser estável, apresentando tamanho de 203 nm no tempo zero e 215 nm no dia 6, portanto foi realizada sua eficiência de encapsulação (EE) que foi de 5,01%. Como a EE foi baixa decidiu-se desenvolver NPs de PCL utilizando o método de emulsão evaporação do solvente (tabela 5).

Tabela 5 - Otimização da formulação de nanopartículas através do método de emulsão evaporação do solvente utilizando o polímero PCL e acetona como solvente orgânico.

	Fase aquosa primária		Fase orgânica			Fase aquosa secundária		
	PVA (%)	Água (mL)	PCL (mg)	Span 60 (mg)	Acetona (mL)	Tween 80 (mg)	PVA (%)	Água (mL)
NP 9	_____	0,5	40	_____	5	2,5	_____	5
NP 10	_____	0,5	40	_____	5	_____	2,5	5
NP 11	_____	0,5	40	_____	5	_____	1	5
NP 12	_____	0,5	40	_____	6	_____	1	5
NP 13	_____	1	40	40	6	_____	1	10
NP 14	_____	1	40	30	6	_____	_____	_____
NP 15	_____	1	40	20	6	_____	_____	_____
NP 16	_____	1	40	10	6	_____	_____	_____
NP 17	_____	1	40	_____	6	_____	_____	_____
NP 18	_____	2	40	_____	7	_____	_____	_____
NP 19	_____	0,5	40	_____	7	_____	1	10
NP 20	1	1	40	40	6	_____	_____	_____
NP 21	1	1	40	_____	6	_____	_____	_____
NP 22	_____	1	40	_____	10	_____	_____	_____

As formulações NP 9, 10, 11 e 12 precipitaram logo após seu preparo, enquanto a NP 13 permaneceu estável por 24 horas, sendo que então

observou-se um precipitado. Portanto, nas NPs 14, 15 e 16 foi diminuída a concentração de Span 60, porém, após verter a fase aquosa na orgânica ocorreu a precipitação do polímero, sendo que o mesmo ocorreu nas NPs 17 e 18. Ainda, a NP 19 precipitou após sua concentração no volume final de 10 mL. Como alternativa, decidiu-se por utilizar álcool polivinílico (PVA) na fase aquosa primária, porém as formulações NP 20, 21 e 22 precipitaram na formação da primeira emulsão.

Portanto, foram realizados testes substituindo a acetona por acetato de etila (tabela 6). As formulações NP 23, 24 e 25 precipitaram após a formação da emulsão secundária. A NP 26 permaneceu estável e, desse modo, foi preparada uma formulação adicionando o MTX (2,5 mg/mL), entretanto essa permaneceu estável somente 24 horas. Sendo assim, foi realizado um teste aumentando a concentração de PVA na fase aquosa secundária (NP 27), e outro aumentando o volume de acetato de etila (NP 28), ambos sem sucesso.

Tabela 6 - Otimização da formulação de nanopartículas através do método de dupla emulsão utilizando o polímero PCL e acetato de etila como solvente orgânico.

	Fase aquosa primária		Fase orgânica		Fase aquosa secundária	
	PVA (%)	Água (mL)	PCL (mg)	Acetato de etila (mL)	PVA (%)	Água (mL)
NP 23	—	1	40	2	1	10
NP 24	5	1	40	2	0,3	50
NP 25	5	0,5	40	2	0,3	50
NP 26	5	1	40	2	1	10
NP 27	5	1	40	2	2	10
NP 28	5	1	40	4	—	—

Devido aos resultados insatisfatórios obtidos pelo método de dupla emulsão, decidiu-se testar novamente a técnica de nanoprecipitação utilizando o poloxâmero 407 como tensoativo (tabela 7). As NPs foram obtidas a partir da proporção da formulação testada inicialmente, pelo método de nanoprecipitação, que havia permanecido estável (NP 7). As formulações que continham Span 60 (NP 30 e 32) apresentaram precipitação logo após serem evaporadas a seu volume final (10 mL), além disso, quando o pH da fase aquosa não foi ajustado, observou-se a precipitação do MTX em aproximadamente 48 horas (NP 29, 30, 31 e 32). Deste modo, foram preparadas formulações sem Span 60 e com o pH da fase aquosa

ajustada (NP 33 e 34), sendo que ambas permaneceram estáveis e apresentaram tamanho médio de partícula de 182,9 e 187,7 nm, e PDI 0,135 e 0,119, respectivamente. A EE do MTX na NP 33 foi determinada, apresentando uma taxa de associação de 20%. Já a NP 34 não teve sua EE determinada, pois precipitou no dia 5.

Foram realizados testes aumentando a concentração de PCL com diferentes concentrações de MTX (NP 35, 36 e 37) e também alterando pH da fase aquosa para 5,0 (NP 38), porém todas precipitaram após serem evaporadas ao volume final. Dessa forma, foi aumentada a concentração de MTX utilizando a NP 33 como base (NP 39 e 40), mas essas permaneceram estáveis apenas 48 horas.

Tabela 7 - Otimização da formulação de nanopartículas através do método de nanoprecipitação utilizando o polímero PCL e o tensoativo poloxâmero.

	Fase orgânica				Fase aquosa		
	PCL (mg)	Span 60 (mg)	MTX (mg)	Acetona (mL)	Poloxâmero (%)	pH	Água (mL)
NP 29	40	—	2,5	12	1	—	24
NP 30	40	40	2,5	12	1	—	24
NP 31	40	—	2,5	12	0,2	—	24
NP 32	40	40	2,5	12	0,2	—	24
NP 33	40	—	2,5	12	1	3,0	24
NP 34	40	—	2,5	12	0,2	3,0	24
NP 35	100	—	2,5	30	1	3,0	60
NP 36	100	—	5	30	1	3,0	60
NP 37	100	—	10	30	1	3,0	60
NP 38	40	—	2,5	12	1	5,0	24
NP 39	40	—	5	12	1	3,0	24
NP 40	40	—	10	12	1	3,0	24

Além disso, foram realizados testes solubilizando o MTX em ácido clorídrico diluído (0,1M) (tabela 8). Apenas as NP 41, 44 e 45, preparadas utilizando as mesmas proporções da NP 33, permaneceram estáveis, sendo que o pH da fase aquosa da NP 44 não foi ajustado e o da NP 45 foi ajustado para 8,0. As formulações NP 41 e 44 apresentaram tamanho médio de partícula de 186,0 e 180,8 nm, e PDI 0,145 e 0,113, respectivamente. A EE obtida foi de 14 e 20%, respectivamente, porém a NP 44 precipitou em 5 dias. Já a NP 45 apresentou EE de 8,54%.

Tabela 8 - Otimização da formulação de nanopartículas através do método de nanoprecipitação com adição de MTX solubilizado em ácido clorídrico (0,1M).

	Fase orgânica			Fase aquosa		
	PCL (mg)	MTX (mg)	Acetona (mL)	Poloxâmero (%)	pH	Água (mL)
NP 41	40	2,5	12	1	3,0	24
NP 42	40	5	24	1	3,0	24
NP 43	100	2,5	30	1	3,0	60
NP 44	40	2,5	12	1	—	24
NP 45	40	2,5	12	1	8,0	24

Os seguintes testes foram realizados utilizando PLGA (poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)) como polímero (tabela 9). Na NP 46 ocorreu precipitação ao adicionar o MTX, solubilizado em HCl, na solução do polímero em acetona, provavelmente, causada por alguma incompatibilidade entre o ácido e o polímero. Isso não aconteceu nas NP 47, 48, 49 e 50, em que o MTX foi solubilizado em DMSO, porém as NP 47 e 48 precipitaram em 48 horas. Já as NP 49 e 50 permaneceram estáveis e apresentaram EE de, respectivamente, 20,22 e 20,99%. A proporção utilizada para preparar as NP 46, 47, 49 e 50 baseou-se na utilizada por Barichello e colaboradores (1999).

Tabela 9 - Otimização da formulação de nanopartículas através do método de nanoprecipitação utilizando o polímero PLGA e o tensoativo poloxâmero.

	Fase orgânica			Fase aquosa		
	PLGA (mg)	MTX (mg)	Acetona (mL)	Poloxâmero (%)	pH	Água (mL)
NP 46	50	2,5	5	—	—	—
NP 47	50	2,5	5	0,5	—	15
NP 48	50	2,5	12	1	3,0	24
NP 49	50	2,5	5	0,5	3,0	15
NP 50	50	2,5	5	0,5	8,0	15

Ainda, foram preparadas nanocápsulas de PCL utilizando o óleo de TCM (triglicerídeos de cadeia média) (tabela 10). As NP 51 e 52, baseadas nas nanocápsulas desenvolvidas por Boechat e colaboradores (2015), assim como a NP 53, precipitaram após serem evaporadas ao volume final. Da mesma forma, a NP

60, que teve o pH da fase aquosa ajustado, precipitou. Modificando a proporção dos componentes obtiveram-se as formulações NP 54 que, como as anteriores, precipitou, e as NP 55 e 56, que permaneceram estáveis, mas apresentaram formação de micropartículas junto às NPs. O mesmo ocorreu com as NPs 57, 58 e 59, sendo a primeira baseada nas nanocápsulas desenvolvidas por Faria e colaboradores (2005). Já a NP 61, que foi preparada na mesma proporção da NP 60, porém substituindo o Tween 80 por poloxâmero, precipitou após ser concentrada ao volume final.

Tabela 10 - Otimização da formulação de nanocápsulas através do método de nanoprecipitação.

	Fase orgânica					Fase aquosa		
	PCL (mg)	TCM (mg)	Span 60 (mg)	MTX (mg)	Acetona (mL)	Tween 80 (mg)	pH	Água (mL)
NP 51	100	160	38	2,5	27	77	—	53
NP 52	100	160	38	—	27	77	—	53
NP 53	100	160	—	—	30	77	—	60
NP 54	100	160	60	—	30	60	—	30
NP 55	100	160	60	—	30	60	—	60
NP 56	100	160	60	2,5	30	60	—	60
NP 57	40	125	40	2,5	10	30	5,0	20
NP 58	100	160	75	—	30	75	—	60
NP 59	100	160	75	2,5	30	75	—	60
NP 60	100	160	75	2,5	30	75	3,0	60

Entre os testes realizados, as formulações que permaneceram estáveis foram a NP 7, 33, 41, 45, 49 e 50. Dessas, destacam-se as NP 33, 49 e 50, que apresentaram melhores percentuais de EE (~ 20%). Sendo assim, optou-se por dar continuidade ao trabalho com a NP 33, pois as outras NPs possuem PLGA na formulação, que tornaria os custos da produção das NPs maior.

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5.3.1 Linearidade

A curva média, obtida a partir da média de três curvas construídas nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20 e 30 µg/mL, a equação da reta e o coeficiente de

determinação (r^2) obtidos estão demonstrados na figura 1. O valor do coeficiente de correlação ($r = 0,99996$), próximo a 1, demonstra a existência de uma relação linear entre as concentrações e as áreas obtidas. A média dos valores de área obtidos para as diferentes concentrações analisadas estão demonstrados na tabela 11. Além disso, a linearidade foi comprovada através da ANOVA ($p = 0,05$) (tabela 12), em que método apresentou regressão linear significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$) e não apresentou desvio de linearidade ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$).

Figura 1 - Curva média e equação da reta obtidas para o MTX pelo método desenvolvido.

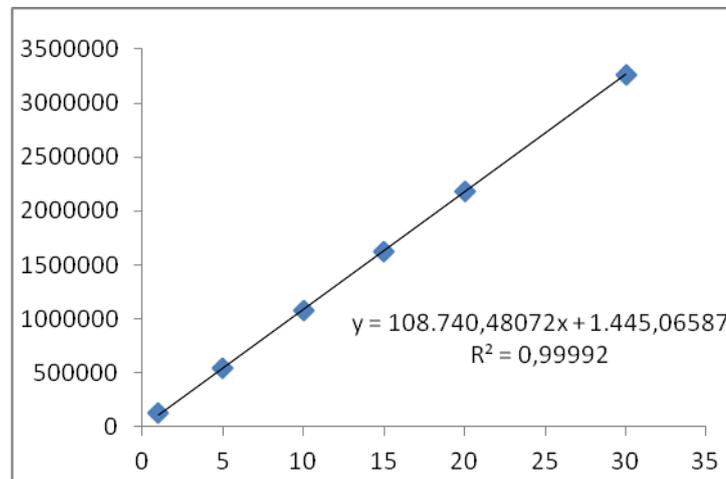


Tabela 11 - Valores médios da área obtida para o MTX em função da concentração.

Concentração (µg/mL)	Área ± DP	DPR (%)
1	123535,67 ± 7917,06	6,41
5	538868,17 ± 1532,97	0,28
10	1076841,17 ± 8707,27	0,81
15	1626399,83 ± 16446,89	1,01
20	2186483,67 ± 13328,22	0,61
30	3264520,83 ± 24367,96	0,75

Tabela 12 - Parâmetros avaliados pela ANOVA para $p = 0,05$.

	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Regressão linear	100321,44	4,75
Desvio de linearidade	1,92	3,26

5.3.2 Especificidade

A especificidade foi avaliada através da pureza do pico, da comparação dos cromatogramas e espectros obtidos para as NPs brancas, NPs com MTX e MTX livre (figuras 2 e 3). Os resultados obtidos evidenciaram que os componentes da nanoformulação não interferem no tempo de retenção do pico do MTX.

Figura 2 - Cromatogramas obtidos na avaliação da especificidade do método analítico por CLAE. (1) NPs branca, (2) NPs com MTX (15 µg/mL) e (3) solução padrão MTX (15 µg/mL).

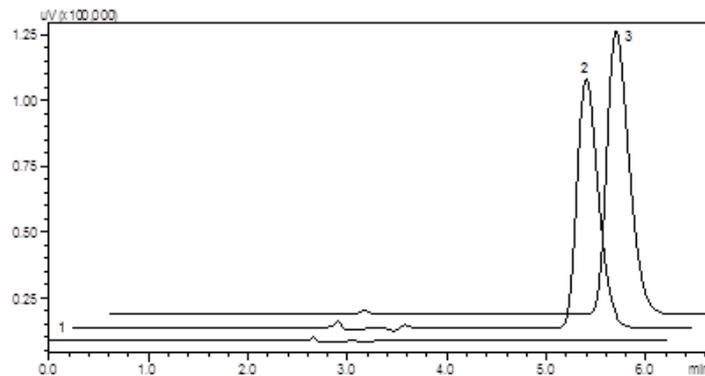
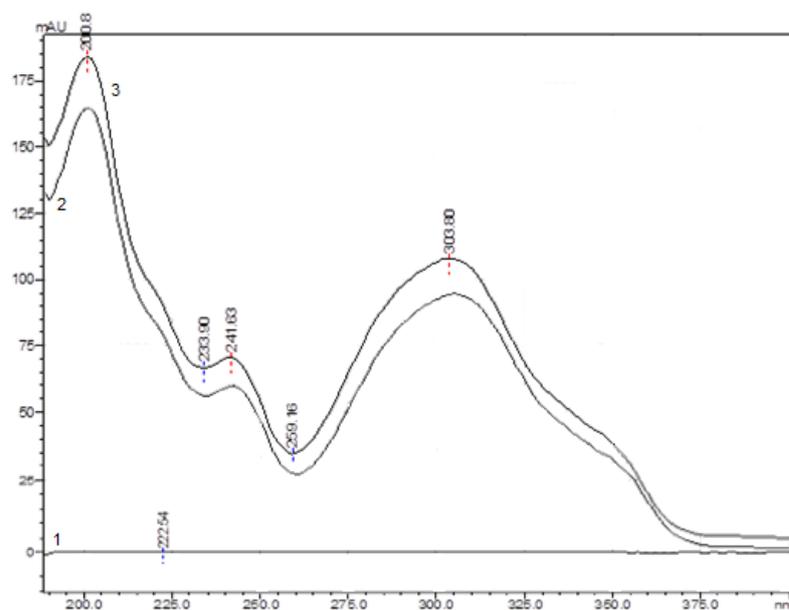


Figura 3 - Espectros obtidos na avaliação da especificidade do método analítico por CLAE. (1) NPs branca, (2) NPs com MTX (15 µg/mL) e (3) solução padrão MTX (15 µg/mL).



5.3.3 Precisão

A repetibilidade foi avaliada através da quantificação de seis amostras independentes em um mesmo dia, enquanto que a precisão intermediária foi avaliada pela análise de três amostras em dois dias diferentes e ainda três amostras quantificadas por dois analistas distintos (tabela 13).

Tabela 13 - Valores médios obtidos na avaliação da precisão do método.

		Teor (%) \pm DP	Média do teor (%) \pm DP	DPR (%)
Repetibilidade		97,13 \pm 1,67		1,72
Entre dias	Dia 1	97,13 \pm 0,01	97,08 \pm 0,001	0,08
	Dia 2	97,02 \pm 0,02		
Entre analistas	Analista 1	93,06 \pm 0,02	92,78 \pm 0,004	0,42
	Analista 2	92,51 \pm 0,03		

5.3.4 Exatidão

O teste de recuperação foi utilizado para avaliar a exatidão do método. O percentual de recuperação foi avaliado a 80, 100 e 120% da concentração de trabalho (15 $\mu\text{g/ml}$). O método foi considerado exato, pois apresentou recuperações entre 98 e 102% (tabela 14) (SHABIR, 2003).

Tabela 14 - Resultados obtidos na avaliação da exatidão.

Concentração		Teor (%) \pm DP	DPR (%)
Adicionada ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperada ($\mu\text{g/ml}$)		
2	2,02	100,95 \pm 9011,37	0,72
5	5,04	100,86 \pm 5255,92	0,33
8	8,05	100,61 \pm 26742,78	1,40

5.3.5 Robustez

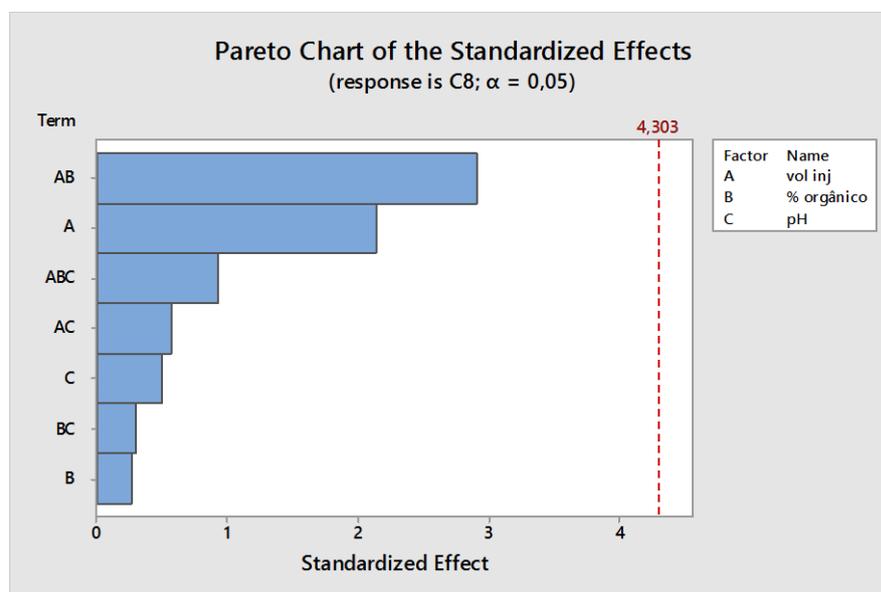
A robustez foi avaliada utilizando um modelo fatorial completo em dois níveis e variando três fatores (2^3) com adição de três pontos centrais (c) através do Software Minitab 17. Os fatores avaliados nos níveis superior (+) e inferior (-), condições 1 a 8, e nos pontos centrais, condições 9 a 11, estão disponíveis na tabela 15.

Tabela 15 - Parâmetros avaliados para determinação da robustez.

Condições	Volume de injeção		Acetonitrila		pH		Teor (%)
	Nível	(μL)	Nível	(%)	Nível		
1	-	10	-	84	-	2,8	96,54
2	+	30	-	84	-	2,8	96,42
3	-	10	+	86	-	2,8	96,13
4	+	30	+	86	-	2,8	97,14
5	-	10	-	84	+	3,2	96,58
6	+	30	-	84	+	3,2	96,26
7	-	10	+	86	+	3,2	95,48
8	+	30	+	86	+	3,2	97,34
9	c	20	c	85	c	3,0	96,00
10	c	20	c	85	c	3,0	96,53
11	c	20	c	85	c	3,0	96,79

Através da análise do gráfico de Pareto (figura 4) comprovou-se que o método é robusto, pois nenhum dos parâmetros ou combinação de parâmetros alterados apresentou efeito maior que o efeito crítico (4,303, para $p < 0,05$).

Figura 4 - Gráfico de Pareto.



5.4 LIBERAÇÃO

Foram construídas três curvas analíticas para verificar a linearidade do método previamente validado nos dois meios de liberação utilizados, sendo que

essas foram posteriormente utilizadas para quantificar o MTX liberado no meio. As curvas foram preparadas a partir de uma solução estoque de MTX em PBS na concentração de 100 µg/mL. As médias das áreas obtidas para as três curvas construídas em PBS pH 7,4 e 5,4 estão disponíveis nas tabelas 16 e 17, respectivamente.

Tabela 16 - Valores médios da área obtida para o MTX em função da concentração em PBS pH 7,4.

Concentração (µg/mL)	Área ± DP	DPR (%)
0,2	24693,00 ± 2030,62	8,22
1	105678,83 ± 2514,08	2,38
2	207648,50 ± 3156,04	1,52
3	312084,67 ± 3938,05	1,26
4	416976,00 ± 3497,52	0,84
5	522126,17 ± 7618,77	1,46

Tabela 17 - Valores médios da área obtida para o MTX em função da concentração em PBS pH 5,4.

Concentração (µg/mL)	Área ± DP	DPR (%)
0,2	22182,83 ± 1380,57	6,22
1	100168,17 ± 691,75	0,69
2	200012,83 ± 2627,19	1,31
3	302428,83 ± 2989,85	0,99
4	404810,33 ± 3916,06	0,97
5	506852,17 ± 5255,75	1,04

As curvas médias obtidas para as condições testadas com equação da reta e coeficiente de determinação estão demonstradas nas figuras 5 e 6 para PBS pH 7,4 e 5,4, respectivamente. O coeficiente de correlação para as curvas obtidas nos pHs 7,4 e 5,4 foram de respectivamente 0,99997 e 0,99996, indicando a relação linear entre as concentrações analisadas e as áreas obtidas. Além disso, a linearidade foi comprovada através da ANOVA, sendo que ambas as curvas apresentaram regressão linear ($F_{cal} 30144,33 > F_{tab} 4,75$ e $F_{cal} 49807,94 > F_{tab} 4,75$ para os PBSs pH 7,4 e 5,4, respectivamente) e não apresentaram desvio de linearidade ($F_{cal} 0,44 < F_{tab} 3,26$ e $F_{cal} 0,89 < F_{tab} 3,26$ para os PBSs pH 7,4 e 5,4, respectivamente).

Figura 5 - Curva média e equação da reta obtidas para o MTX em PBS pH 7,4.

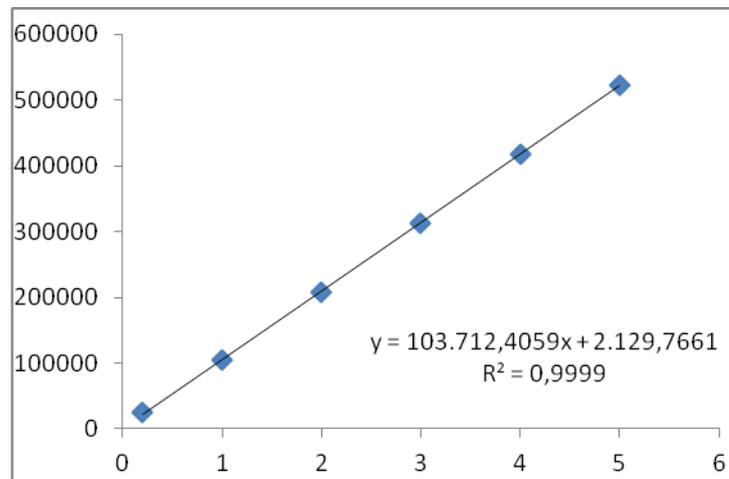
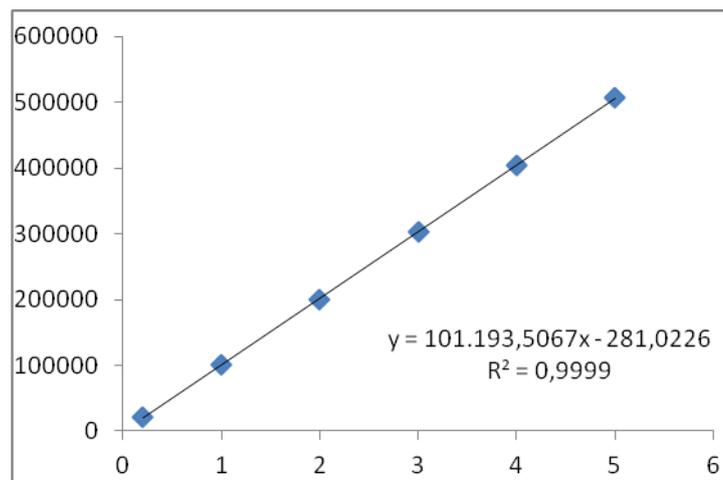


Figura 6 - Curva média e equação da reta obtidas para o MTX em PBS pH 5,4.



Ainda, foram calculados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Para o PBS pH 7,4 o LD foi de 0,04 $\mu\text{g/mL}$ e o LQ de 0,12 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que para o PBS pH 5,4 o LD também foi de 0,04 $\mu\text{g/mL}$ e o LQ de 0,13 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando a alta sensibilidade do método.

5.4.1 Modelagem matemática

Na tabela 18 estão demonstrados os resultados da modelagem matemática obtidos segundo o modelo monoexponencial. Além disso, as figuras 7 e

8 representam os gráficos obtidos pelos modelos mono e biexponencial para liberação das NPs em pH 5,4 e 7,4, respectivamente.

Tabela 18 – Valores obtidos pela modelagem monoexponencial para as NPs com MTX nos pHs 5,4 e 7,4.

	NPs MTX pH 5,4	NPs MTX pH 7,4
Monoexponencial		
r	0,99	0,99
MSC	6,88	6,20
k_1 (h^{-1})	0,0074	0,0063

Figura 7 – Gráficos obtidos na modelagem matemática das NPs em pH 5,4. (a) modelo monoexponencial e (b) modelo biexponencial.

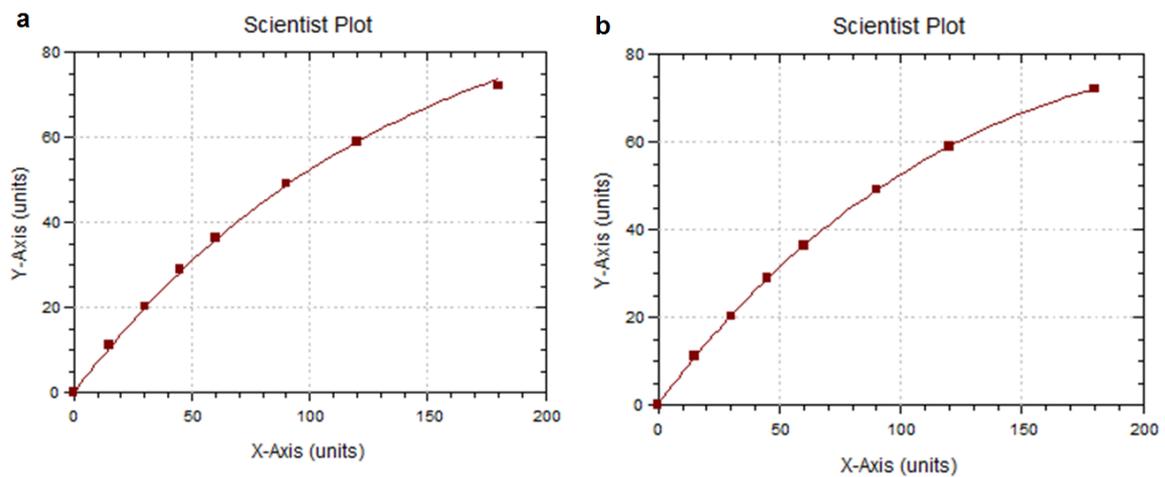
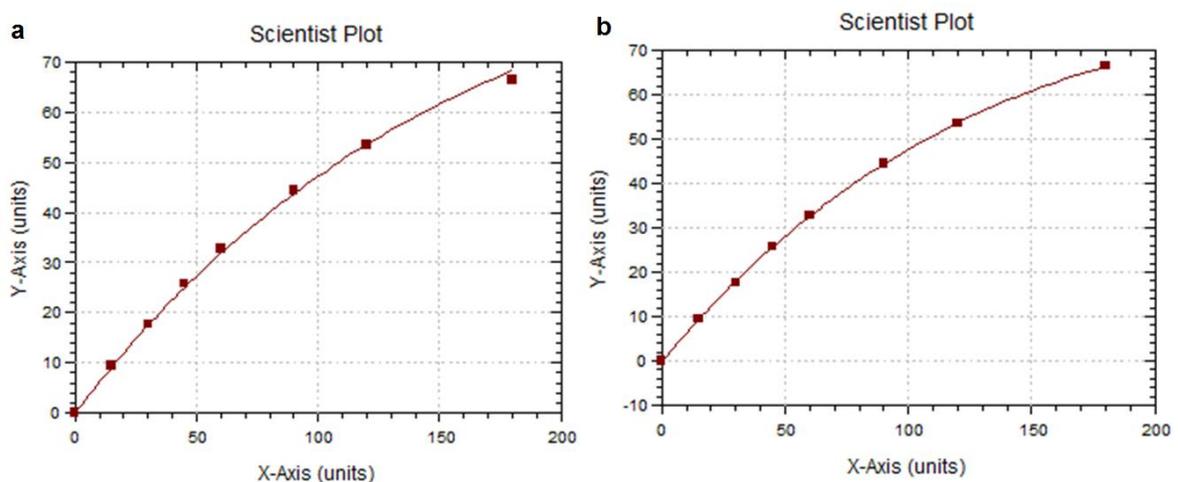


Figura 8 – Gráficos obtidos na modelagem matemática das NPs em pH 7,4. (a) modelo monoexponencial e (b) modelo biexponencial.



5.5 LIOFILIZAÇÃO DAS NP_s

A liofilização também foi testada utilizando 48 horas de congelamento e 24 horas no liofilizador. Porém essa condição foi ineficiente para estabilizar as NPs que apresentaram tanto tamanho quanto PDI elevados (tabela 19). Nessa condição, da mesma forma que nos estudos nos quais as NPs foram submetidas a 48 horas de liofilização, as condições que apresentaram características mais semelhantes às iniciais foram as NPs liofilizadas com 10 e 15% de trealose. No entanto, após a liofilização o teor obtido foi de 88,92 e 88,86%, respectivamente, aproximadamente 10% menor que o teor inicial (98,84%). Por outro lado, na condição em que as NPs foram liofilizadas por 48 horas, o teor obtido foi 94,40 e 93,94% para as NPs liofilizadas com 10 e 15% de trealose, respectivamente, sendo apenas 2,30% inferior ao teor inicial de 96,22%.

Tabela 19 - Caracterização das NPs liofilizadas durante 24 horas.

	Recuperação (%)	Tamanho antes (nm)	Tamanho depois (nm)	Relação T_f/T_0	PDI antes	PDI depois
Lactose 2%	86,75	184,0	280,0	1,522	0,204	0,424
Lactose 5%	87,10	184,0	402,3	2,186	0,204	0,591
Lactose 10%	97,99	184,0	426,8	2,320	0,204	0,463
Lactose 15%	101,04	197,2	434,9	2,205	0,211	0,585
Trealose 2%	75,07	197,2	649,4	3,293	0,211	0,514
Trealose 5%	62,61	197,2	638,4	3,237	0,211	0,521
Trealose 10%	95,41	195,7	239,3	1,223	0,226	0,238
Trealose 15%	98,25	195,7	235,1	1,201	0,226	0,246

5.6 FOTOESTABILIDADE

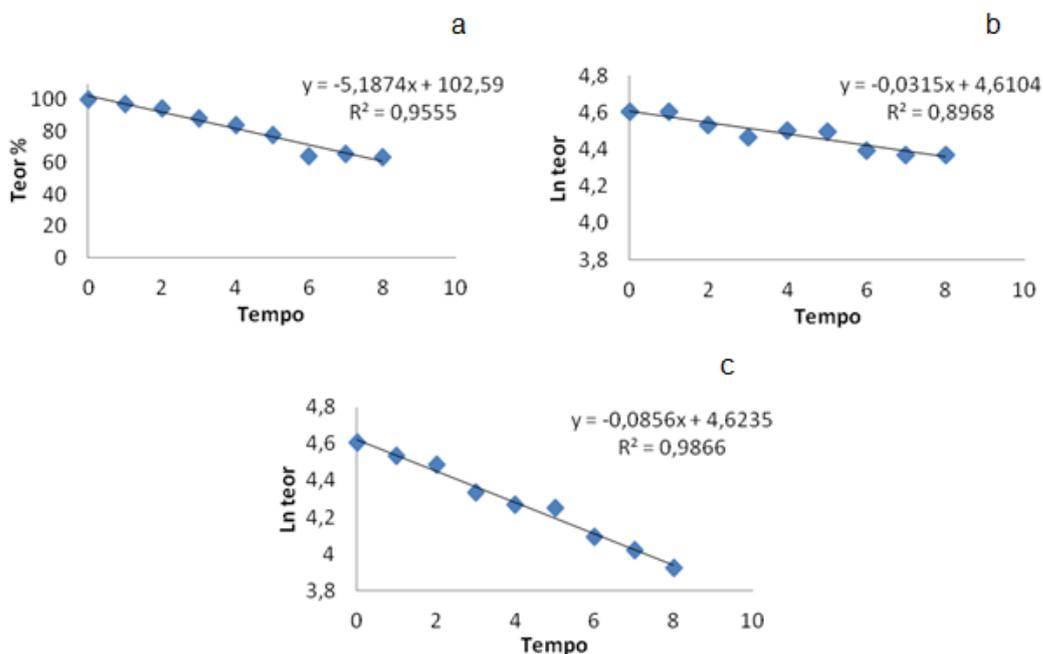
Os teores obtidos após a fotodegradação UVA e UVC para o MTX livre e nanoencapsulado (NP MTX) estão disponíveis na tabela 20. Conforme esperado, a radiação UVC causou maior degradação, por ser mais energética que a UVA. Para cada uma das condições, determinou-se a ordem de reação através do método gráfico, sendo que esta é obtida verificando o melhor coeficiente de correlação. O

MTX livre na UVA sofreu fotodegradação seguindo uma reação de ordem zero, enquanto a NP MTX e MTX livre na UVC seguiram uma reação de primeira ordem. Não foi possível calcular a ordem de reação para NP MTX na UVA, pois o MTX não sofreu degradação suficiente. Os gráficos com melhor coeficiente de correlação, e, portanto, indicativos da ordem reação nas condições de ensaio estão disponíveis na figura 9.

Tabela 20 - Teor do MTX após fotodegradação UVA e UVC.

	UVA Teor (%)		UVC Teor (%)	
	NP MTX	MTX livre	NP MTX	MTX livre
0	100,00	100,00	100,00	100,00
1	96,34	97,60	100,17	93,22
2	96,93	94,55	93,09	88,93
3	99,89	88,42	87,38	76,58
4	98,58	84,31	90,49	71,67
5	98,06	77,53	90,06	70,12
6	97,18	64,71	81,22	59,97
7	94,77	65,51	79,15	55,86
8	93,84	63,90	79,05	50,60
CE	97,45	97,80	100,50	98,48

Figura 9 - Gráficos indicativos da ordem de reação para MTX livre na UVA (a), NP MTX na UVC (b) e MTX livre na UVC (c).



6 DISCUSSÃO GERAL

Durante os estudos iniciais para o desenvolvimento da nanoformulação, utilizaram-se dois métodos de preparação, nanoprecipitação e dupla emulsão. Além disso, foram testados dois polímeros, a PCL e o PLGA, bem como os tensoativos Tween 80, Span 60, poloxâmero e PVA. De maneira geral, observou-se que concentrações maiores de polímero (> 40 mg) e MTX (> 2,5 mg) causavam precipitação na formulação. Considerando todos os testes realizados, as formulações que permaneceram estáveis utilizando PCL foram a NP 7, 33, 41 e 45 (ver Capítulo 2), e dentre elas a que apresentou maior EE foi a NP 33, sendo que sua única diferença para a NP 7 é o tensoativo utilizado. Na NP 7 utilizou-se Tween 80 e Span 60, enquanto que na NP 33 adicionou-se o poloxâmero. Essa mudança de tensoativo na NP 33 causou aumento da EE em 3,99 vezes. Corroborando os resultados encontrados neste estudo, destaca-se que o aumento na EE de fármacos com a utilização de poloxâmero já foi observado em outras formulações (EKAMBARAM; A, 2011; JAIN et al., 2017). Além disso, as formulações NP 49 e 50, ambas formuladas com PLGA, também permaneceram estáveis, e apresentaram EE semelhante a obtida pela NP 33. Deste modo, optou-se por desenvolver o restante do trabalho com a NP 33, que por utilizar PCL na formulação, torna o custo da formulação menor.

A liberação eficaz de fármacos anticancerígenos a partir de carreadores de base nanotecnológica depende da capacidade da formulação de armazenar e estabilizar o fármaco em pH fisiológico, promovendo sua liberação no pH levemente ácido do tecido alvo. Uma estratégia que pode ser utilizada para conferir às NPs um comportamento pH-dependente é a adição de compostos com grupamentos ionizáveis, como, aminas, ácidos fosfóricos e ácidos carboxílicos. A mudança de pH pode ser capaz de ionizar esses grupamentos, alterando suas características físico-químicas e, portanto, resultando na liberação do fármaco (LIU et al., 2014). Sendo assim, incorporou-se às nanopartículas o 77KL, um tensoativo biocompatível e pH-dependente, que possui um grupamento carboxílico em sua estrutura química, a fim de torná-la mais específica para o tecido tumoral. No entanto, a adição do 77KL causou a desestabilização do sistema, diminuindo sua estabilidade quando em suspensão aquosa. Deste modo, optou-se por liofilizar as NPs para melhorar sua

estabilidade. O processo de liofilização foi eficiente, mantendo as NPs estáveis por 60 dias.

Tanto a adição do 77 KL, quanto a liofilização, não alteraram a EE obtida para as NPs que foi de $20,52\% \pm 0,72$. Considerando que o MTX é um fármaco hidrofílico, pode-se considerar satisfatória a EE obtida. Resultados semelhantes foram obtidos para o MTX em nanocápsulas de PCL (BOECHAT et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2013). A dificuldade na encapsulação do MTX também foi descrita ao incorporá-lo em NPs de PLGA desenvolvidas por Musmade e colaboradores (2014), que obtiveram uma EE de 15,45%.

Os perfis de liberação das NPs obtidos nos meios com valores de pH 7,4 e 5,4 sugerem que o MTX é liberado seguindo uma reação biexponencial, que possui duas velocidades de reação. Além disso, o modelo não-fickiano demonstra que a liberação do MTX a partir das NPs ocorre devido ao relaxamento das cadeias poliméricas (RITGER; PEPPAS, 1987).

Do mesmo modo, observou-se que as NPs com 77 KL induziram hemólise superior em meios com pH acidificado, enquanto que essa atividade não foi observada de modo significativo com as NPs sem 77 KL. Portanto, sugere-se que o 77 KL conferiu às NPs atividade lítica pH-dependente.

No ensaio de citotoxicidade observou-se que as NPs MTX foram mais citotóxicas que o fármaco livre nas MCF-7 e em menor grau nas HepG2. Além disso, o ensaio MTT foi o mais sensível em detectar os efeitos citotóxicos em relação ao NRU. A atividade antiproliferativa também foi avaliada em pH levemente acidificado e as NPs também apresentaram citotoxicidade superior ao MTX livre. Como as NPs também apresentaram citotoxicidade na linhagem não-tumoral (HaCaT), considera-se que não possuem atividade específica em células tumorais. Porém, os efeitos citotóxicos induzidos pelas NPs não apresentou diferença significativa em relação a obtida pelo MTX livre, sugerindo, portanto, que essa citotoxicidade pode ser atribuída a uma sensibilidade maior das células HaCaT ao MTX.

Através da exposição do MTX livre e nanoencapsulado às radiações UVA e UVC, observou-se que as NPs foram capazes de proteger o MTX da degradação fotolítica em ambas radiações. Esse comportamento pode ser justificado, provavelmente, devido a capacidade das NPs em espalhar luz. Além disso, esse comportamento pode ser relacionado aos resultados da modelagem do estudo de

liberação, que indicaram que 99% do MTX está adsorvido na parte interna das NPs e apenas 1% está presente na superfície.

Por fim, o método otimizado foi validado e utilizado para quantificação do MTX. Esse demonstrou-se eficiente para a determinação de MTX tanto na presença dos excipientes das NPs, quanto na de produtos de degradação obtidos na fotodegradação. Além disso, verificou-se que o método foi sensível para quantificar o MTX no meio de liberação, no qual foram obtidos valores de LQ de 0,12 e 0,13 $\mu\text{g/mL}$ para os pHs 7,4 e 5,4, respectivamente.

7 CONCLUSÕES

- O método de nanoprecipitação mostrou-se eficiente para o desenvolvimento de nanopartículas contendo MTX a partir do polímero PCL e do tensoativo poloxâmero, as quais apresentaram tamanho na faixa nanométrica e características físico-químicas adequadas;
- Incorporou-se nas nanopartículas o 77KL, um agente anfifílico biocompatível que conferiu propriedades pH-dependentes aos nanocarreadores;
- O método por cromatografia a líquido de alta eficiência desenvolvido foi validado e mostrou-se específico, linear, preciso, exato e robusto para quantificação do MTX nas NPs de PCL. O método foi adequado para a determinação da eficiência de encapsulação, análise de teor, estudos de estabilidade e fotoestabilidade e liberação *in vitro*;
- O processo de liofilização foi eficiente para melhorar a estabilidade da suspensão de nanopartículas;
- O perfil de liberação *in vitro* do MTX a partir das nanopartículas foi ligeiramente superior em pH 5,4, quando comparado ao pH 7,4;
- A modelagem matemática dos perfis de liberação sugere que a liberação do MTX ocorre de maneira biexponencial seguindo um modelo não-fickiano;
- A nanoencapsulação foi eficaz para aumentar a fotoestabilidade do MTX frente às radiações UVA e UVC;
- A atividade pH-dependente das nanopartículas contendo o agente anfifílico 77KL foi evidenciada utilizando o eritrócito como modelo de membrana endossomal;
- A hemocompatibilidade das nanopartículas foi observada até a concentração de 5 µg/mL, utilizando o ensaio de hemólise;
- A atividade antitumoral *in vitro* do MTX nanoencapsulado foi superior a atividade do fármaco livre nas linhagens celulares tumorais MCF-7 e HepG2;
- As nanopartículas contendo MTX não apresentaram atividade específica ao tecido tumoral, pois também apresentaram efeitos citotóxicos em uma linhagem não-tumoral (queratinócitos HaCaT). No entanto, essa atividade não apresentou diferença estatística em comparação a obtida com o MTX livre;
- A atividade antitumoral do MTX nanoencapsulado também foi evidenciada em pH levemente acidificado ($pH_e \sim 6,6$);

- Portanto, os resultados obtidos sugerem que as nanopartículas desenvolvidas são promissoras para a liberação de fármacos a nível intracelular e também do espaço extracelular do tecido tumoral, evidenciando sua potencial aplicação como novos carreadores para a terapia antitumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688–1713, 2006.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1–2, p. 178–188, 2006.

AKAGI, T.; KIM, H.; AKASHI, M. pH-Dependent Disruption of Erythrocyte Membrane by Amphiphilic Poly(amino acid) Nanoparticles. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 21, n. 3, p. 315–328, jan. 2010.

ALMEIDA, J. S. et al. Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, n. 10, p. 1603–1610, 2010.

BARICHELLO, J. M. et al. Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 4, p. 471–476, 1999.

BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. 2, p. 98–106, set. 2008.

BAZBAN-SHOTORBANI, S. et al. Revisiting structure-property relationship of pH-responsive polymers for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, v. 253, p. 46–63, maio 2017.

BOECHAT, A. L. et al. Methotrexate-loaded lipid-core nanocapsules are highly effective in the control of inflammation in synovial cells and a chronic arthritis model. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 6603, 2015.

BOUQUIÉ, R. et al. A fast LC-MS/MS assay for methotrexate monitoring in plasma: validation, comparison to FPIA and application in the setting of carboxypeptidase therapy. **Anal. Methods**, v. 6, n. 1, p. 178–186, 2014.

CATTANI, V. B. et al. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 1–3, p. 116–124, 2010.

CHAWLA, J. S.; AMIJI, M. M. Biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1–2, p. 127–138, dez. 2002.

CHEN, R. et al. The role of hydrophobic amino acid grafts in the enhancement of

membrane-disruptive activity of pH-responsive pseudo-peptides. **Biomaterials**, v. 30, n. 10, p. 1954–1961, abr. 2009.

CLARKE'S. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 4. ed. London, UK: Pharmaceutical Press, 2011.

CONKLIN, K. A. Dietary Antioxidants During Cancer Chemotherapy: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness and Development of Side Effects. **Nutrition and Cancer**, v. 37, n. 1, p. 1–18, maio 2000.

CUI, Y. et al. Transferrin-conjugated magnetic silica PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin and paclitaxel for brain glioma treatment. **Biomaterials**, v. 34, n. 33, p. 8511–8520, nov. 2013.

DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 1, p. 15–33, fev. 2012.

DE ABREU, C. C. et al. Development and validation of HPLC method to determination of Methotrexate in children oncologic patients. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 19, n. 8, p. 1373–80, abr. 2015.

DE FARIA, T. J.; MACHADO DE CAMPOS, A.; LEMOS SENNA, E. Preparation and Characterization of Poly(D,L-Lactide) (PLA) and Poly(D,L-Lactide)-Poly(Ethylene Glycol) (PLA-PEG) Nanocapsules Containing Antitumoral Agent Methotrexate. **Macromolecular Symposia**, v. 229, n. 1, p. 228–233, nov. 2005.

EKAMBARAM, P.; A, A. H. S. Formulation and Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles of Ramipril. **Journal of Young Pharmacists**, v. 3, n. 3, p. 216–220, 2011.

ESPINOSA-MANSILLA, A. et al. Kinetic fluorimetric determination of the antineoplastic methotrexate (MTX) in human serum. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 5, p. 851–858, 2002.

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, n. 3, p. 136–151, 2011.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950–2962, abr. 2009.

FARMACOPEIA EUROPEIA. EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.3. In: 8^o ed. Strasbourg: Council of Europe, 2014. p. 4381–4383.

FEINBERG, A. P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 1, p. 21–33, jan. 2006.

FESSI, H. et al. **Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de nanoparticules**. French patent, 1988.

FIGUEIRO, F. et al. Pharmacological improvement and preclinical evaluation of methotrexate-loaded lipid-core nanocapsules in a glioblastoma model. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 10, p. 1808–1818, 2015.

FONTE, P.; REIS, S.; SARMENTO, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 225, p. 75–86, mar. 2016.

FRANKS, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, n. 3, p. 221–229, maio 1998.

GANTA, S. et al. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 126, n. 3, p. 187–204, 2008.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. A microenvironmental model of carcinogenesis. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 1, p. 56–61, 2008.

GENESTIER, L. et al. Mechanisms of action of methotrexate. **Immunopharmacology**, v. 47, n. 2–3, p. 247–257, maio 2000.

GORJIKHAH, F. et al. Preparation and characterization of PLGA- β -CD polymeric nanoparticles containing methotrexate and evaluation of their effects on T47D cell line. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 1401, n. November, p. 1–9, 2016.

GRIM, J.; CHLÁDEK, J.; MARTÍNKOVÁ, J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methotrexate in Non-Neoplastic Diseases. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 2, p. 139–151, 2003.

HARTUNG, T. Food for thought ... on alternative methods for chemical safety testing. **ALTEX**, v. 27, n. 1, p. 3–14, 2010.

HASHAD, R. A. et al. Methotrexate loading in chitosan nanoparticles at a novel pH: Response surface modeling, optimization and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 630–639, 2016.

HIRSJÄRVI, S.; PELTONEN, L.; HIRVONEN, J. Effect of sugars, surfactant, and tangential flow filtration on the freeze-drying of poly(lactic acid) nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p. 488–94, 21 jun. 2009.

HUANG, Y.-W.; WU, C.; ARONSTAM, R. S. Toxicity of Transition Metal Oxide Nanoparticles: Recent Insights from in vitro Studies. **Materials**, v. 3, n. 10, p. 4842–4859, 2010.

INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2015.

JABIR, N. R. et al. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 4391–408, ago. 2012.

JAIN, A. et al. Methotrexate and beta-carotene loaded- lipid polymer hybrid nanoparticles : a preclinical study for breast cancer. **Nanomedicine**, v. 12, n. 15, p. 1851–1872, 2017.

JAIN, A.; JAIN, S. K. In vitro and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, n. 5, p. 404–416, 2008.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2475–2490, 2000.

KABANOV, A. V; BATRAKOVA, E. V; ALAKHOV, V. Y. Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 5, p. 759–779, set. 2002.

KARIMI, Z. et al. Pegylated and amphiphilic Chitosan coated manganese ferrite nanoparticles for pH-sensitive delivery of methotrexate: Synthesis and characterization. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 504–511, 2017.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

LEE, E. S. et al. Tumor pH-responsive flower-like micelles of poly(l-lactic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(l-histidine). **Journal of Controlled Release**, v. 123, n. 1, p. 19–26, out. 2007.

LIU, J. et al. pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 693–710, jul. 2014.

MINAEI, A. et al. Co-delivery with nano-quercetin enhances doxorubicin-mediated cytotoxicity against MCF-7 cells. **Molecular Biology Reports**, v. 43, n. 2, p. 99–105, 2016.

MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 19–20, p. 842–850, 2010.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. **Trends in biotechnology**, v. 18, n. 10, p. 412–20, out. 2000.

MORAN, C. et al. Amino Acids, Lactic Acid and Ascorbic Acid as Raw Materials for Biocompatible Surfactants. In: **Surfactants from Renewable Resources**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010. p. 85–107.

MUSMADE, K. P. et al. Methotrexate-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, characterization and evaluation of its cytotoxic potential against U-343 MGa human neuronal glioblastoma cells. **Bulletin of Materials Science**, v. 37, n. 4,

p. 945–951, 8 jun. 2014.

NAGULU, M. et al. Development and Validation of Rapid and Sensitive HPLC Method for the Determination of Methotrexate in Human Serum. **Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 8–13, 12 ago. 2010.

NOGUEIRA-LIBRELOTTO, D. R. et al. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles functionalized with a pH-responsive amphiphile improved the in vitro antineoplastic effects of doxorubicin. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 147, p. 326–35, 1 nov. 2016.

NOGUEIRA, D. R. et al. The role of counterions in the membrane-disruptive properties of pH-sensitive lysine-based surfactants. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2846–56, jul. 2011a.

NOGUEIRA, D. R. et al. Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for in vitro cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 51–58, nov. 2011b.

NOGUEIRA, D. R. et al. In vitro antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, n. 11, p. 2758–72, abr. 2013.

NOGUEIRA, D. R. et al. Determination of Methotrexate in pH-Sensitive Chitosan Nanoparticles by Validated RP-LC and UV Spectrophotometric Methods. p. 59–67, 2014a.

NOGUEIRA, D. R. et al. Lysine-based surfactants in nanovesicle formulations: the role of cationic charge position and hydrophobicity in in vitro cytotoxicity and intracellular delivery. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 4, p. 404–21, 26 jun. 2014b.

NOGUEIRA, D. R. et al. Inclusion of a pH-responsive amino acid-based amphiphile in methotrexate-loaded chitosan nanoparticles as a delivery strategy in cancer therapy. **Amino Acids**, v. 48, n. 1, p. 157–168, 2016.

NUSSBAUMER, S. et al. Analysis of anticancer drugs: A review. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2265–2289, 2011.

ÖCAL, H. et al. 5-Fluorouracil-loaded PLA/PLGA PEG–PPG–PEG polymeric nanoparticles: formulation, in vitro characterization and cell culture studies. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 4, p. 560–567, 18 abr. 2014.

OLIVEIRA, C. P. et al. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, n. 4, p. 1141–1150, 2013.

PINTO REIS, C. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.

RAMAKRISHNAN, R.; GABRILOVICH, D. I. Novel mechanism of synergistic effects

of conventional chemotherapy and immune therapy of cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 62, n. 3, p. 405–410, 2013.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37–42, jun. 1987.

ROCO, M. C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 337–346, jun. 2003.

RODRÍGUEZ FLORES, J. et al. Capillary electrophoretic determination of methotrexate, leucovorin and folic acid in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 819, n. 1, p. 141–147, maio 2005.

RUBINO, F. M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 764, n. 1–2, p. 217–254, 2001.

SÁEZ-FERNÁNDEZ, E.; RUIZ, M.; ARIAS, J. Drug delivery systems based on poly (ϵ -caprolactone) for cancer treatment. **ARS Pharmaceutica**, v. 50, n. 2, p. 83–96, 2009.

SAEZ, A. et al. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(d,l -lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 3, p. 379–387, nov. 2000.

SANTOS, C. M. et al. Development and Validation of Spectrophotometric method for determination of Methotrexate Incorporated into PLGA Implants. **International Journal of Drug Development & Research**, v. 5, n. 1, p. 154–160, 2013.

SARTORI, T. et al. Development and validation of a fast RP-HPLC method for determination of methotrexate entrapment efficiency in polymeric nanocapsules. **Journal of chromatographic science**, v. 46, n. 6, p. 505–9, jul. 2008.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, out. 2003.

SCHEEREN, L. E. et al. PEGylated and poloxamer-modified chitosan nanoparticles incorporating a lysine-based surfactant for pH-triggered doxorubicin release. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 138, p. 117–27, 1 fev. 2016.

SEO, D. H. et al. Methotrexate-incorporated polymeric nanoparticles of methoxy poly(ethylene glycol)-grafted chitosan. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 69, n. 2, p. 157–163, 2009.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1–2, p. 57–66, fev. 2003.

SINGH, R.; LILLARD, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, n. 3, p. 215–223, 2009.

SINGHAL; NIE; WANG. Nanotechnology applications in surgical oncology. **Annual Review of Medicine**, v. 61, p. 359–373, 2010.

SOHAEBUDDIN, S. K. et al. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 22, 2010.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101–106, 2012.

TAVANO, L. et al. Transferrin-Conjugated Pluronic Niosomes as a New Drug Delivery System for Anticancer Therapy. **Langmuir**, v. 29, n. 41, p. 12638–12646, 15 out. 2013.

TRAPANI, A. et al. Methotrexate-Loaded Chitosan- and Glycolchitosan-Based Nanoparticles: A Promising Strategy for the Administration of the Anticancer Drug to Brain Tumors. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 4, p. 1302–1311, 2011.

UCHIYAMA, M. et al. Simple and sensitive HPLC method for the fluorometric determination of methotrexate and its major metabolites in human plasma by post-column photochemical reaction. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 1, p. 76–80, jan. 2012.

USP. **United States Pharmacopeia**. 32. ed. Washington: U.S. Pharmacopeia, 2009.

VIVES, M. A. et al. Erythrocyte hemolysis and shape changes induced by new lysine-derivate surfactants. **Chemico-Biological Interactions**, v. 118, n. 1, p. 1–18, 1999.

WANG, X.-L.; XU, R.; LU, Z.-R. A peptide-targeted delivery system with pH-sensitive amphiphilic cell membrane disruption for efficient receptor-mediated siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 134, n. 3, p. 207–213, mar. 2009.

WHO. **World cancer report 2014**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014. v. 44

WILCZEWSKA, A. Z. et al. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 5, p. 1020–1037, set. 2012.

XIAO, Y. et al. Functional Poly(ϵ -caprolactone) Based Materials: Preparation, Self-assembly and Application in Drug Delivery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 781–818, 31 mar. 2014.