Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia

RELTON ROMEIS DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* POR MAGNETOHIPERTERMIA DE PACLITAXEL EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS MAGNÉTICAS.

Goiânia – 2013

RELTON ROMEIS DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* POR MAGNETOHIPERTERMIA DE PACLITAXEL EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS MAGNÉTICAS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientação: Profa. Dra. Eliana Martins Lima

Goiânia – 2013

Folha de Aprovação

“Daria tudo que sei pela metade do que ignoro.”

René Descartes

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por vibrar dentro do meu mundo intimo de forma muito intensa em todos os momentos de minha vida convidando-me a desafios capazes de me tornar um homem melhor.

Aos meus pais, Tarso e Maria Ivone, pela competência de conseguir transmitir amor, confiança e respeito através do exemplo, trabalho, dedicação, responsabilidade e sabedoria.

À minha esposa Glácia Macedo Rocha pelo companheirismo, amor, dedicação e paciência nesses momentos em que o tempo não permite o lazer, mas exige que o dever seja cumprido.

Em especial à Profa. Dra. Eliana Martins Lima que, com sua competência exacerbada, e sensibilidade de mãe foi capaz de me proporcionar um crescimento imensurável nos últimos anos.

Ao Professor Dr. Andris Figueiroa Bakuzis pela co-orientação brilhante nesse trabalho me proporcionado aprendizado, crescimento profissional, além do exemplo de disciplina e otimismo.

Imensamente agradecido a alguns nomes que colaboraram de forma impar para o cumprimento desse estudo como Maiulle Pacheco do FarmaTec, Marcus Carrião e Luiz Cezar Branquinho do Instituto de Física.

A todos meus amigos verdadeiramente irmãos que sempre me incentivam no caminho que busco.

Em especial, aos meus amigos do FarmaTec que desempenharam papel fundamental para que eu conseguisse concretizar esse trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

2 REVISÃO DE LITERATURA 17

2.1 O CANCER 17

2.2 TERAPIAS CONVENCIONAIS PARA O TRATAMENTO DO CANCER 18

2.3 PACLITAXEL 19

2.4 NANOTECNOLOGIA 21

2.4.1 Considerações gerais 21

2.4.2 Sistemas nanotecnológicos 22

2.4.3 Mecanismos de liberação de fármaco por sistemas nanoestruturados 22

2.4.4 Vetorização de fármacos para sítios alvo específicos 24

2.5 PROPRIEDADES MAGNÉTICAS 25

2.5.1 Magnetohipertermia 25

2.6 INOVAÇÃO NANOTECNOLÓGICA E PERSPECTIVAS 27

3 OBJETIVOS 30

3.1 OBJETIVOS GERAIS 30

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 30

4 MATERIAL E MÉTODOS 31

4.1 MATERIAL 31

4.2 MÉTODOS 31

4.2.1 Preparação de nanopartículas magnéticas (PM) 31

4.2.2 Preparação de nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas (NLSM) 31

4.2.2.1 Método da diluição da microemulsão 31

4.2.2.2. Método da emulsificação evaporação de solvente 32

4.3 CARACTERIZAÇÕES 33

4.3.1 Difratometria de Raios-X (DRX) 33

4.3.2 Propriedades magnéticas 34

4.3.3 Quantificação do paclitaxel 34

4.3.4 Eficiência de encapsulação (E.E.%) e recuperação do paclitaxel 34

4.3.5 Estudo morfológico e distribuição de tamanho das NLSM 35

4.3.6 Estudo de liberação *in vitro* do PTX 35

4.3.6.1 Ensaio de liberação do PTX por difusão em membrana de diálise 35

4.3.6.2. Ensaio de liberação do PTX por magnetohipertermia 35

4.3.7 Estudo de estabilidade das NLSM 36

4.3.7.1 Estabilidade em suspensão 36

4.3.7.2 Estabilidade em amostras Liofilizadas 36

4.3.8 Estudo de magnetohipertermia (MH) 37

4.3.9 Análise térmica 37

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 38

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO NANOSISTEMA 38

5.1.1 Estudo morfológico, diâmetro médio e distribuição de tamanho das NLSM 38

5.1.2 Recuperação, carga e eficiência de encapsulação do paclitaxel.....41

5.1.3 Estudo de estabilidade das NLSM 42

5.1.3.1Estabilidade de NLSM em suspensão.....42

5.1.3.2 Estabilidade de NLSM liofilizada.....43

5.1.4 Ensaio de liberação *in vitro* do PTX por método de difusão em membrana de diálise..... 44

5.1.5 Análise térmica.....45

5.2 CARACTERIZAÇÃO MAGNÉTICA DO NANOSSISTEMA.....47

5.2.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 por difratometria de raios..... 47

5.2.2 Estudo das propriedades magnéticas do nanossistema por magnetometria..... 47

5.3 ESTUDO DE MAGNETOHIPERTERMIA (MH).....50

5.3.1 Avaliação do comportamento do nanossistema frente ao campo alternado..... 50

5.3.2 Estudo da liberação do paclitaxel via magnetohipertermia 51

6 CONCLUSÕES.....54

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS 55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de crescimento de massa tumoral. 18

Figura 2: Geometria estrutural plana da molécula do paclitaxel. 20

Figura 3: Formulações convencionais de paclitaxel utilizadas no mercado para tratamento quimioterápico. 20

Figura 4: Representação esquemática da cristalinidade dos lipídeos em NLS. 23

Figura 5: Representação esquemática da (a) vetorização de PM e (b) aquecimento por magnetohipertermia via campo magnético externo. 25

Figura 6: Representação esquemática do sistema de magnetohipertermia. Uma corrente alternada passa por uma bobina condutora. Ocorre a geração de um campo magnético no interior da bobina. Materiais com propriedades de magnetismo inseridos no interior da bobina sofrerão interação com esse campo. 26

Figura 7: Representação esquemática do mecanismo de formação de NLSM. 29

Figura 8: Representação esquemática tridimensional da possível estrutura da NLSM contendo paclitaxel. 29

Figura 9: Representação esquemática do preparo de NLSM pelo método de diluição da microemulsão. Lipídeos, PTX e Tensoativos são fundidos, e pela adição de água, forma a microemulsão que é então diluída sob agitação. 32

Figura 10: Representação esquemática do preparo de NLSM pelo método de emulsificação-difusão de solvente. 33

Figura 11: Representação esquemática do ensaio de liberação de paclitaxel em NLSM por difusão em membrana de diálise. As amostras foram mantidas em incubadora com agitação orbital em temperatura constante por todo o tempo do ensaio. 36

Figura 12: Representação esquemática simplificada da técnica de AFM no modo não-contato. 38

Figura 13: Imagens de AFM de NLSM, secas sobre superfície de mica, realizadas no modo não contato. (A) Topografia (B) topografia tridimensional. 39

Figura 14: Histograma de distribuição tamanho de partículas obtido por técnica de AFM e DLS.....40

Figura 15: Estudo de estabilidade da formulação de NLSM por técnica de espalhamento de luz múltiplo, por 24h em temperatura ambiente. 43

Figura 16: Estabilidade da formulação de NLSM contendo PTX. As amostras liofilizadas foram armazenadas em dessecador, na temperatura ambiente. Após tempos programados foram ressuspendidas e o PTX foi quantificado por CLAE. 44

Figura 17: Perfil de liberação in vitro do PTX encapsulado em NLSM. O ensaio foi realizado nas temperaturas de 25, 37 e 43°C durante 50 horas. Alíquotas foram coletadas com reposição de meio e quantificadas por CLAE.....45

Figura 18: Curvas de DSC de NLSM liofilizada em comparação com as curvas dos componentes da formulação. Rampa de aquecimento de 0,5 ° C / min. Os demais componentes se comportaram como o PTX e foram omitidos para facilitar a visualização do gráfico. 46

Figura 19: Difratograma de raios-X de PM (Fe_3O_4), utilizando um feixe de raios-X monocromático em intervalo de 10 a 80°, ângulo (2θ), 40 kV e 30 mA.....47

Figura 20: Curva de magnetização obtida em temperatura ambiente do pó de PM seco a 70ºC.....48

Figura 21: Curvas de magnetização obtidas à temperatura ambiente de suspensões NLSM (Vermelho), NLS (verde) e o ajuste da magnetização sem a contribuição diamagnética (preto). 49

Figura 22: Curvas de magnetização obtidas à temperatura ambiente de NLSM diamagnética (vermelho).....49

Figura 23: Evolução temporal da variação de temperatura de NLSM e NLS liofilizada submetida a um campo magnético alternado.....50

Figura 24: Perfis de variação de temperatura de amostras liofilizadas de NLSM e NLS em campos gerados por diferentes correntes. 51

Figura 25: Perfil de aquecimento de NLSM pela aplicação de 24 pulsos de 180s sob corrente alternada de 149.8 A seguida de resfriamento de 420s após cada pulso. ..52

Figura 26: Ensaio de liberação do PTX por magnetohipertermia. A formulação de NLSM foi difidida em duas alíquotas e mantidas por 21h em repouso. Uma das alíquotas sofreu aplicação de pulsos de MH. 53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de força atômica (Atomic force microscopy)
C.F.	Carga de fármaco: expressa como uma razão em massa do paclitaxel e da matriz lipídica (MEG) em µg/mg.
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DLS	Espalhamento de luz dinâmico (Dynamic light scattering)
DSC	Calorimetria exploratória diferencial (Differential scanning calorimetry)
EE%	Eficiência de encapsulação
MEG	Monoestearato de glicerila
MH	Magnetohipertermia
mMEG	Massa de monoestearato de glicerila adicionada durante o preparo.
PM	Nanopartículas magnéticas
PdI	Indice de polidispersão (Polydispersity índex)
PTX	Paclitaxel
PTXa	Massa de paclitaxel adicionada durante o preparo.
PTXe	Massa de paclitaxel encapsulado no nanossistema
PTXrec	Quantidade total de paclitaxel recuperado da formulação final, expressa como uma percentagem de PTXa
NLS	Nanopartícula lipídicas sólida
NLSM	Nanopartícula lipídica sólida magnética

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas contendo paclitaxel para aplicação em magnetohipertermia. Nanopartículas magnéticas foram obtidas pelo método de co-precipitação de sais de Fe(II) e Fe(III) em meio alcalino. Nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas contendo paclitaxel foram preparadas pelo método de emulsificação-difusão de solvente. O sistema nanoestruturado foi caracterizado quanto à morfologia, diâmetro médio e distribuição de tamanho, eficiência de encapsulação do paclitaxel, estabilidade e propriedades magnéticas de magnetometria e magnetohipertermia. As nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas contendo paclitaxel apresentaram diâmetro médio de aproximadamente 200nm com índice de polidispersão de 0,189 e 67% de eficiência de encapsulação do PTX. O estudo de estabilidade realizado em amostras liofilizadas mostrou redução de aproximadamente 15% do paclitaxel encapsulado no período de 30 dias. Pelo estudo de magnetometria os nanocarreadores apresentaram curva de magnetização condizente com material em regime superparamagnético e o efeito de magnetohipertermia foi verificado pelo aumento da temperatura de aproximadamente 25ºC do nanocarreador. A taxa de liberação do paclitaxel foi aumentada em 3 vezes quando a temperatura foi elevada de 25ºC para 43ºC no ensaio de liberação *in vitro* indicando que o aquecimento dos nanocarreadores pode representar um mecanismo desencadeador do processo de liberação do fármaco, possibilitando a obtenção de sistemas de liberação controlada por magnetohipertermia.

Palavras-chave: Paclitaxel, nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas, hipertermia magnética

ABSTRACT

This work describes the development and characterization of magnetic solid lipid nanoparticles (SLNMP) containing paclitaxel for magnetohyperthermia applications. Magnetic nanoparticles were prepared by coprecipitation of Fe(II) and Fe(III) salts in an alkaline medium. SLNMP containing paclitaxel were prepared by emulsification – solvent diffusion. Characterization of the nanostructured system included morphology analysis, average diameter and size distribution, encapsulation efficiency for paclitaxel, stability and magnetic properties of magnetometry and magnetohyperthermia. Magnetic SLNMP containing paclitaxel exhibited an average diameter of 200nm with a polydispersity index of 0,189; which was confirmed by Atomic Force Microscopy. Stability studies conducted with lyophilized samples showed a decrease of approximately 15% in the amount of encapsulated paclitaxel in 30 days. Magnetometry data confirmed the superparamagnetic behavior of the nanocarriers and magnetohyperthermia effect was demonstrated by an increase of 25°C of the temperature of the nanocarrier. A three fold increase in the drug release rate was obtained when the temperature was raised from 25 to 43°C in the in vitro release assay. This indicated that temperature increase acts as a trigger mechanism for drug release, allowing the preparation of nanostructured controlled drug delivery systems controlled by magnetohyperthermia.

1 INTRODUÇÃO

Nanotecnologia é uma área interdisciplinar da ciência destinada ao desenvolvimento, construção e utilização de estruturas funcionais na escala nanométrica, na qual as características fundamentais dos materiais podem ser controladas sem que haja mudança na sua composição química (PARK et al., 2008). O desenvolvimento dessas estruturas tem sido bastante explorado para fins de liberação controlada de fármacos em sítios de ação específica permitindo a obtenção de faixa terapêutica e posologia ótimas para tratamento de diversas doenças (SOPPIMATH et al., 2001).

Sistemas nanoestruturados poliméricos (BERNARDI et al., 2009), lipossomais e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo fármaco encapsulado (VIDEIRA;ALMEIDA ;FABRA, 2012), e até nanopartículas magnéticas (PM) para o direcionamento e liberação controlada do fármaco em sítios específicos, tem sido alvo de exploração em nanotecnologia para tratamento de diversos tipos de doenças, particularmente o câncer (JOHANNSEN et al., 2006; ZHU et al., 2009).

Estudos recentes para terapia de câncer têm focado em sistemas de hipertermia magnética (GONZALES ;KRISHNAN, 2005; MING-HUANG;CHUNG-YU ;YU-CHUAN, 2008; MEENACH;HILT ;ANDERSON, 2010). A técnica tem demonstrado potencial para o desenvolvimento de métodos eficazes para tratamento do câncer em combinação com terapêuticas já bem desenvolvidas como irradiação e quimioterapia (FALK ;ISSELS, 2001). Através da magnetohipertermia é possível aumentar a temperatura do tumor entre 41 a 46°C minimizando danos às células normais (LI et al., 2010). O método consiste na introdução de nanopartículas magnéticas dentro do tumor, e a posterior aplicação de um campo magnético alternado externo.

Diferentes materiais têm sido explorados para o desenvolvimento de nanocarreadores de fármacos com nanopartículas magnéticas incorporadas em sua estrutura para uso em magnetohipertermia. Uma vez que PM inorgânicas podem ser facilmente incorporadas em sistemas lipídicos formando nanocarreadores de liberação controlada de fármacos, NLSM se tornam potencialmente funcionais para aplicação em magnetohipertermia (MÜLLER et al., 1996).

A possibilidade de aumentar o efeito terapêutico de fármacos em tratamentos combinados é hoje um dos grandes alvos da inovação terapêutica. Com este foco, o

objetivo deste projeto foi preparar NLSM contendo paclitaxel encapsulado na matriz lipídica e estudar sua liberação *in vitro*, utilizando a magnetohipertermia (MH) como fator desencadeador da liberação.

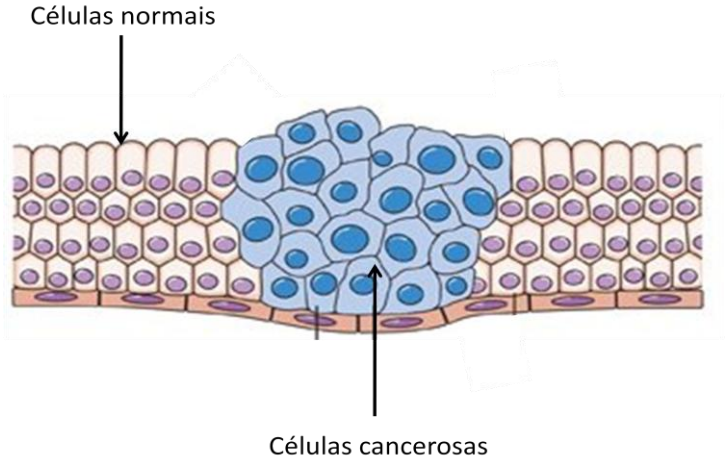
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CANCER

O câncer é uma doença avassaladora que tem causado milhares de mortes todos os anos. Segundo dados da OMS, Organização Mundial de Saúde, em 2007 foram catalogados 7,6 milhões de mortes causadas pelo câncer e provavelmente em 2030 serão 17 milhões de novos casos. Entre os tipos de cânceres mais comuns, alguns fatores de causa são devido a interações complexas e não modificáveis como susceptibilidade genética e envelhecimento. Outros são ocasionados por fatores de risco, modificáveis, tais como o uso do tabaco, agentes infecciosos, dieta e atividade física. Quando os fatores de risco são entrelaçados às diferenças de comportamentos individuais, crenças, práticas culturais, condições socioeconômicas e sistema de saúde torna-se possível enxergar as disparidades globais em sua incidência (KAMANGAR;DORES ;ANDERSON, 2006). Devido a essas disparidades é possível observar que o número de mortes nos países em desenvolvimento aumenta a cada dia enquanto que em países desenvolvidos, é possível ver decréscimo de mais de 1% na incidência nos últimos anos (SIEGEL;NAISHADHAM ;JEMAL, 2012). Vários tipos diferentes de cânceres são detectados todos os dias, aumentando assim o desafio da ciência que tem como um de seus objetivos fundamentais a erradicação dessa doença.

O câncer se dá pelo crescimento celular desordenado como ilustrado na Figura 1. Uma característica que o define é a multiplicação rápida de células anormais que crescem além de seus limites habituais, e que podem então migrar para tecidos adjacentes e se espalhar para outros órgãos. Este processo é referido como metástase, e é a principal causadora de morte (RANG, 2003). Muitos tipos de cânceres podem ser prevenidos, evitando a exposição a fatores de risco comuns. Além disso, uma proporção significativa da doença pode ser tratada por cirurgia, radioterapia, quimioterapia, transplante de medula e até técnicas inovadoras como, por exemplo, a nanotecnologia (LIANG et al., 2010).

Figura 1: Representação esquemática de crescimento de massa tumoral.



Fonte: http://www.cancerresearchuk.org

2.2 TERAPIAS CONVENCIONAIS PARA O TRATAMENTO DO CANCER

Segundo o INCA, Instituto Nacional do Câncer, várias técnicas são empregadas no tratamento da doença. Dentre as principais encontram-se a radioterapia e quimioterapia, acompanhadas geralmente de intervenções cirúrgicas. Outra técnica é a hipertermia por ablação, que pode ser gerada, por exemplo, a partir de radiofrequência, mas que tem sido menos utilizada por se tratar de técnica invasiva. Para alguns tipos de tumores é viável sua aplicação como parte integrante do tratamento, pois a técnica permite aumentar a temperatura do tumor tornando-o mais susceptível a ação de quimioterápicos (ARIAS et al., 2009).

A radioterapia consiste de um método capaz de destruir células tumorais, por feixe de radiações ionizantes. Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada, por tempo determinado, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas. Essa radiação pode ser externa se emitida por isótopos radioativos como césio e cobalto, quando a fonte de radiação provém de um equipamento. Ou interna quando a fonte de material radioativo é inserida em pequenas cápsulas junto ao tecido tumoral (WANG ;LI, 2003; SYLVESTER et al., 2007). Apesar de bons resultados obtidos por essa técnica foi possível observar alguns efeitos colaterais devido à ação da radiação em células normais, e também por erros de cálculo da quantidade de radiação a ser empregada para cada caso (SHAFIQ et al., 2009). Normalmente, os efeitos se relacionam com a dose total absorvida e com o

fracionamento utilizado. Todos os tecidos podem ser afetados, em graus variados, pela radiação. Dependendo do nível do tumor o tratamento radioterápico pode ser precedido ou seguido de quimioterapia.

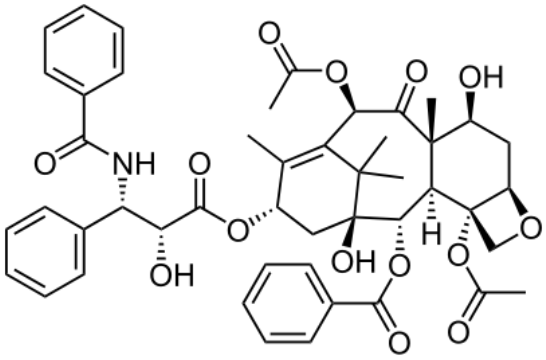
A quimioterapia foi descoberta em meados de 1900, pelo químico alemão, Paul Ehrlich desenvolvendo medicamentos para curar doenças infecciosas, e hoje exerce papel fundamental no declínio dos casos de morte em pacientes portadores de câncer (DEVITA ;CHU, 2008). A quimioterapia consiste da administração de fármacos antineoplásicos capazes de acarretar morte e impedir a proliferação e o crescimento celular. Vários trabalhos encontrados na literatura mostraram a ação de fármacos antineoplásicos no tratamento de carcinomas precocemente descobertos e até metastáticos com eficácia no tratamento (MILECKI et al., 2003; BUCCHERI ;FERRIGNO, 2004; IMAIZUMI, 2005; BANERJI et al., 2007; NORDLINGER et al., 2007). O grande problema associado à quimioterapia são as reações adversas que são provocadas muitas vezes por morte de células normais. Dentre os principais efeitos colaterais já foram observados quedas de cabelo, náuseas, perturbação do sono, problemas oculares, diarréias e etc. (LOVE et al., 1989). Das formulações convencionais utilizadas no mercado tem-se observado altas dosagens e baixa biodisponibilidade do fármaco levando muitas vezes o tratamento a resultados insatisfatórios.

2.3 PACLITAXEL

O Paclitaxel (PTX) empregado neste estudo é um dos fármacos mais utilizados na quimioterapia para tratamento de tumores sólidos metastáticos de mama, pulmão, ovário e bexiga. Sua molécula apresentada na Figura 2 é um triterpeno poliidroxilado. Ela foi isolada pela primeira vez em 1971 por Wall e colaboradores nos Estados Unidos. Um grande problema na extração do paclitaxel é que a planta, da espécie *Taxus brevifolia*, demora cerca de 100 a 200 anos para atingir a maturidade e encontra-se em extinção. Para contornar esse problema, desenvolveu-se um método de semi-síntese para obter o paclitaxel em poucas etapas. Uma molécula é extraída da espécie *Taxus baccata* e posteriormente convertida em paclitaxel por síntese orgânica (SOUZA, 2004). O mecanismo da atividade antitumoral envolve a inibição do crescimento celular por estabilização de microtúbulos formados através da ligação não covalente com tubulinas, impedindo à

despolimerização necessária a replicação celular, bloqueando assim, o processo de divisão (FENG et al., 2007).

Figura 2: Geometria estrutural plana da molécula do paclitaxel.



Fonte : http://www.drugbank.ca/drugs/DB01229

No mercado o PTX se encontra na forma de suspensões para infusão como mostrado na Figura 3.

O Taxol contem paclitaxel 6mg/mL formulado em uma mistura 1:1 v/v de cremophor e álcool desidratado, todavia está associado a uma série de inconvenientes como: morbidade, trombose, hipersensibilidade grave, vaso dilatação, hipotensão arterial, e até risco de infecção relacionado ao cateter empregado na infusão. Mas hoje já está bem estabelecido que vários desses efeitos sejam provenientes do cremophor (PELTIER et al., 2006).

Figura 3: Formulações convencionais de paclitaxel utilizadas no mercado para tratamento quimioterápico.

Fonte : Taxol, http://www4.carleton.ca/jmc/catalyst/2006s/e1.html; Abraxane, http://www.131.org.cn/article/show.php?itemid=72398.

O Abraxane por sua vez é uma forma de apresentação do paclitaxel ligado a partículas de albumina. O pó de albumina/paclitaxel é suspenso em soro fisiológico para infusão numa concentração do paclitaxel de 5mg/mL. Os efeitos tóxicos referentes ao cremophor são resolvidos e o tempo de infusão reduzido. Já foram observados efeitos adversos como alopecia, neurotoxicidade, mucosites, mas limitados pela dosagem (GREEN et al., 2006).

Tratamentos conjuntos hoje são amplamente utilizados no mundo inteiro como estratégia para o tratamento do câncer. Muitas vezes são necessárias intervenções cirúrgicas para retirada de massa tumoral já instalada em órgãos e tecidos, acompanhada de radioterapia e quimioterapia. Nesse caso a debilidade do paciente é um fator de risco durante o tratamento, e se faz necessário o acompanhamento nutricional e até psicológico (HUHMANN ;CUNNINGHAM, 2005; VASSARD et al., 2010).

2.4 NANOTECNOLOGIA

2.4.1 Considerações gerais

A ciência tem se preocupado intensamente com o bem estar do paciente durante e após o tratamento. Então, diversas estratégias são apresentadas todos os dias, como alternativa de tratamento. Dentre essas estratégias encontra-se a nanotecnologia, alvo de estudo nesse trabalho.

A nanotecnologia é uma área da ciência destinada ao desenvolvimento, construção e utilização de estruturas funcionais na escala nanométrica, na qual as características fundamentais dos materiais podem ser controladas sem que haja mudança na sua composição química (PARK et al., 2008). Estratégia nanotecnológica sugere aumento da biodisponibilidade do fármaco, pois sua liberação acontece preferencialmente no local de ação. Dessa forma o fármaco antineoplásico pode ter menor ação citotóxica sobre células normais. Por isso a liberação controlada de fármacos em um sítio de ação específico a uma faixa terapêutica e posologia ótimas tem sido uma das maiores metas no desenvolvimento dessas estruturas (SOPPIMATH et al., 2001).

2.4.2 Sistemas nanotecnológicos

Sistemas nanoestruturados de liberação controlada de fármacos apresentam diâmetro médio variando entre 50 e 1000nm e tem capacidade de incorporar fármacos hidrofílicos e lipofílicos dependendo da estratégia de síntese utilizada. Dentre os nanossistemas carreadores e de liberação controlada de fármacos mais utilizados estão os lipossomas, nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas sólidas.

Os lipossomas são vesículas multi ou unilamelares que contém um compartimento aquoso no interior de uma ou várias bicamadas lipídicas (BANGHAM ;HORNE, 1964; SHARMA ;SHARMA, 1997). As nanopartículas poliméricas se apresentam na forma de nanoesferas que são compostas de matriz de polímero biodegradável, ou nanocápsulas que são partículas que possuem um núcleo oleoso envolto por uma membrana polimérica (PINTO REIS et al., 2006; MORA-HUERTAS;FESSI ;ELAISSARI, 2010).

Nanopartículas lipídicas sólidas são nanoesferas de matriz lipídica sólida na temperatura ambiente (MULLER et al., 1995; SILVA et al., 2011) utilizadas como carreadores de fármacos lipofílicos e hidrofílicos. Dependendo da rota empregada no preparo da formulação e da afinidade do fármaco para com a matriz lipídica pode ocorrer internalização ou adsorção do mesmo na superfície da nanopartícula.

Vários métodos são empregados no preparo de nanopartículas lipídicas sólidas, tais como: homogeneização a alta pressão, diluição de microemulsão pré-formada, emulsificação-evaporação de solvente, e emulsificação-difusão de solvente (WISSING;KAYSER ;MÜLLER, 2004). Em todos os métodos é necessário o emprego de uma quantidade grande de energia na forma de agitação, ultrassom, alta pressão de homogeneização. Além do uso de tensoativos capazes de evitar a coalescência garantindo assim a estabilidade da suspensão.

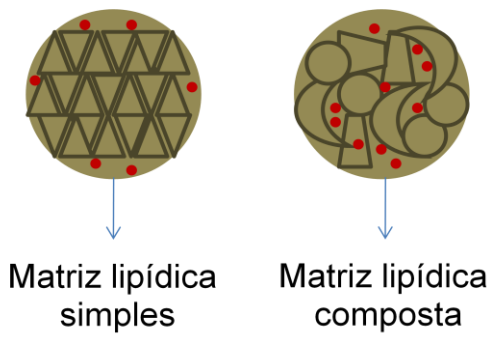
2.4.3 Mecanismos de liberação de fármaco por sistemas nanoestruturados

O mecanismo envolvido na liberação do fármaco encapsulado é individual para cada tipo diferente de nanossistema. Por exemplo, nos lipossomas a liberação está relacionada à interação do fármaco com sua bicamada lipídica, que por sua vez interage com a membrana celular transportando o fármaco pra dentro da célula (SHARMA ;SHARMA, 1997).

Em sistemas poliméricos nanoestruturados a liberação se dá pela biodegradação do polímero. Esses polímeros geralmente sofrem hidrólise, fragmentando-se em monômeros causando uma espécie de erosão na partícula. Essa erosão por sua vez expõe o fármaco que, de acordo com seu coeficiente de partição, pode se difundir para a fase aquosa, solubilizar-se na presença de alta concentração de tensoativos, ou precipitar (LAMPRECHT et al., 2001; PEREZ et al., 2001).

A modulação do controle de liberação de fármacos encapsulados em NLS se dá pela cristalinidade das cadeias lipídicas que por sua vez está relacionada com a natureza dos lipídeos utilizados na formulação. Fármacos hidrofóbicos, não necessariamente com alta lipofilicidade, tendem a encapsular-se no ambiente lipídico de NLS durante a preparação. Mas com a tendência natural de busca por menor energia livre, as cadeias lipídicas tendem a se organizar aumentando o grau de cristalinidade. Isso faz com que o fármaco aprisionado seja expulso para o ambiente externo. Conforme ilustrado na Figura 4, a escolha dos lipídeos é fundamental no desenvolvimento de formulações de nanopartículas lipídicas sólidas. Matriz lipídica simples, contendo somente um tipo de lipídeo, tende a ter maior cristalinidade, maior organização entre as cadeias lipídicas e por consequência menos espaço para encapsular fármacos. Matriz lipídica composta, que contenha dois ou mais tipos diferentes de lipídeo sólido e até uma proporção de lipídio líquido, tende a ter um empacotamento menos compacto, e como consequência disso mais espaço para encapsular fármacos. Esse modelo sugere a modulação da liberação, ou seja, quanto mais superficial o fármaco mais rápida a liberação e quanto mais internalizado mais lenta deve ser a liberação (MÜLLER;RADTKE ;WISSING, 2002).

Figura 4: Representação esquemática da cristalinidade dos lipídeos em NLS.



Fonte : Próprio autor, adaptado de Müller, 1996.

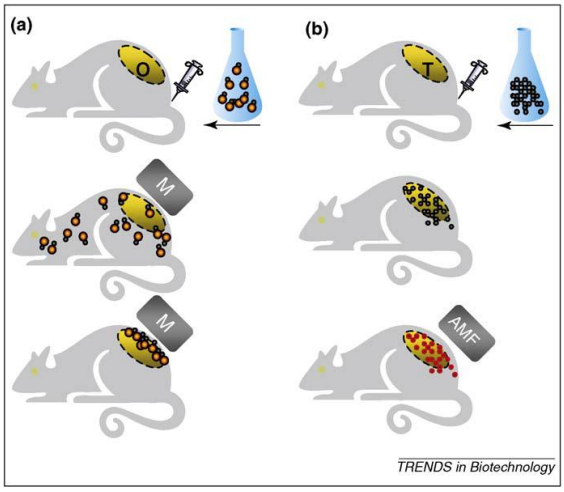
Quando a matriz lipídica é composta apenas por lipídeos sólidos o nanossistema é classificado como nanopartícula lipídica sólida. Se a matriz lipídica apresentar uma proporção de lipídeo líquido, então o nanossistema é classificado como carreador lipídico nanoestruturado (SOUZA et al., 2011).

2.4.4 Vetorização de fármacos para sítios alvo específicos

Muitos tumores sólidos apresentam uma característica única que não é observada em tecidos normais. O aumento da vasculatura na região do tumor, processo denominado como angiogênese, é um mecanismo utilizado por tumores sólidos para garantir a entrada de nutrientes e oxigênio. Porém, essa nova vasculatura geralmente apresenta fenestrações que possibilitam a passagem de macromoléculas e até nanopartículas para dentro do tecido tumoral. Conhecido como efeito EPR *(Enhanced Permeability and Retention),* que significa efeito de alta permeabilidade e retenção, este processo é responsável pela vetorização e acúmulo de macromoléculas e até nanopartículas no interior da massa tumoral (MAEDA et al., 2000; IYER et al., 2006).

Sendo o efeito EPR o principal mecanismo de vetorização passiva existente no organismo, diversos estudos estão voltados para o desenvolvimento de nanossistemas de vetorização ativa de fármacos antitumorais. Por exemplo, nanossistemas peguilados para administração sistêmica com intenção de evitar ação de macrófagos e fazer com que o fármaco se acumule no tecido tumoral (DADASHZADEH et al., 2010; DÍAZ-LÓPEZ et al., 2010), nanossistemas com anticorpos monoclonais ligados na superfície para vetorizar o fármaco ao tecido específico dentro do organismo (HASHIDA et al., 2008), e ainda nanossistemas contendo PM encapsuladas para que, sob ação de um campo magnético externo, sejam direcionadas e acumuladas em tecidos tumorais, como ilustrado na Figura 5 (CORCHERO ;VILLAVERDE, 2009). Estratégias de vetorização como as supracitadas combinadas com mecanismos de liberação de cada nanossistema específico podem trazer novas metodologias para tratamento do câncer.

Figura 5: Representação esquemática da (a) vetorização de PM e (b) aquecimento por magnetohipertermia via campo magnético externo.



Fonte: Corchero, 2009, pg. 472, *Trends in Biotechnology* Vol.27

2.5 PROPRIEDADES MAGNÉTICAS

Nanopartículas magnéticas têm sido amplamente utilizadas para fins biomédicos nos últimos anos. Agentes de contraste em ressonância magnética, biossensores, distribuição, vetorização de fármacos e magnetohipertermia (SHUBAYEV;PISANIC II ;JIN, 2009; HAO et al., 2010).

Devido a uma tendência natural de nanopartículas magnéticas formarem aglomerados é importante estabilizá-las com uma camada de cobertura. Têm sido citados na literatura vários métodos para estabilização de nanopartículas magnéticas com ácidos graxos (GYERGYEK;MAKOVEC ;DROFENIK, 2011), dextrana (LIU et al., 2011) e alguns íons (CABUIL et al., 2011). Devido à carga de superfície positiva proveniente dos íons ferro da nanopartícula magnética é simples e intuitiva a ligação de moléculas que apresentem uma extremidade polar ou íons com cargas negativas.

Com base nessa teoria é possível produzir nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com nanopartículas magnéticas para aplicação em magnetohipertermia.

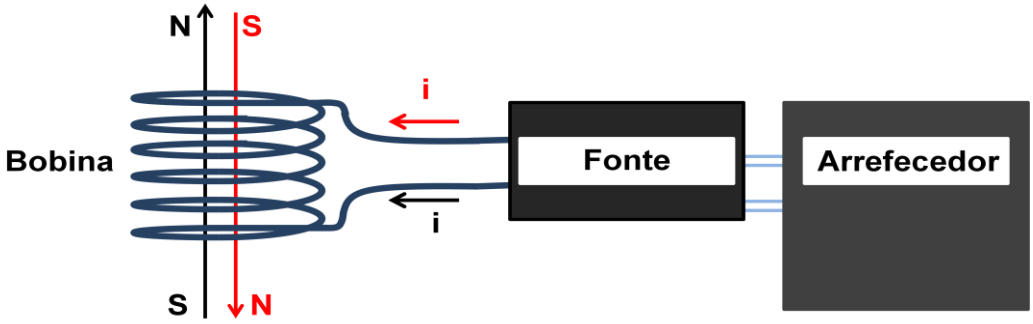
2.5.1 Magnetohipertermia

Conforme Figura 5 além da vetorização para tecidos alvo, um dos mecanismos importantes, inerentes à nanopartículas magnéticas, e alvo principal deste estudo é a magnetohipertermia.

Magnetohipertermia é o aumento da temperatura de sistemas magnéticos proveniente da interação de seus momentos magnéticos com um campo oscilante de alta frequência gerado por uma corrente alternada (Figura 6) (VERDE, LANDI, GOMES et al., 2012).

Ao aplicar um campo magnético externo em um material magnético, seus momentos magnéticos tendem a se alinhar a este campo. Invertendo o sentido do campo, esses momentos também invertem sua orientação e com isso podem dissipar certa quantidade de energia na forma de calor, dependendo de algumas propriedades do campo aplicado e do material que compõe o sistema.

Figura 6: Representação esquemática do sistema de magnetohipertermia. Uma corrente alternada passa por uma bobina condutora. Ocorre a geração de um campo magnético no interior da bobina. Materiais com propriedades de magnetismo inseridos no interior da bobina sofrerão interação com esse campo.



Fonte : Próprio autor.

Existem basicamente três processos de dissipação sob ação de campo alternado: a perda por histerese, a perda por correntes parasitas (ou *eddy currents*) e a perda anômala (JILES, 1993; 1994). A perda anômala está relacionada às mudanças de configurações nos domínios magnéticos dos materiais. No caso de sistemas monodomínio, como as nanopartículas estudadas neste trabalho, pode ser negligenciada. Já as perdas por correntes parasitas estão relacionadas à condutividade dos materiais expostos ao campo magnético alternado. A partir da Lei da Indução de Faraday é possível mostrar que a variação do campo magnético produz correntes na superfície dos materiais condutores e essas correntes dissipam energia pelo efeito Joule (SILVÉRIO, 2001). Dessa forma, embora as perdas por correntes parasitas não sejam o foco da aplicação de hipertermia magnética, entender e controlar esse processo é essencial para a correta interpretação dos

resultados. Por fim, a perda por histerese (palavra de origem grega que significa “retardo”, “atraso”) está relacionada à interação entre a magnetização do material e o campo alternado (JILES, 1994).

Na perda por histerese a magnetização tende a alinhar-se em direção ao campo aplicado, mas quando o tempo necessário para que esse alinhamento ocorra é maior que o tempo de oscilação do campo, surge uma diferença de fase. Essa diferença de fase provoca o surgimento de uma curva de histerese com uma determinada área. Esse processo é denominado histerese dinâmica (VERDE, LANDI, CARRIAO et al., 2012).

As nanopartículas magnéticas sintetizadas e caracterizadas nesse estudo conhecidas como magnetita e maghemita apresentam comportamento superparamagnético, pois sofrem interação de um campo magnético externo produzindo uma curva de magnetização, mas quando o campo é retirado não há magnetização remanente e o campo coercitivo é praticamente nulo. Ou seja, não apresentam curva de histerese, devido à relação entre a energia térmica e o volume da partícula (BROWN, 1963) esse efeito pode ocorrer, uma vez que as frequências de oscilação dos campos aplicados sejam muito altas.

Vários parâmetros podem afetar a capacidade de dissipação térmica de sistemas magnéticos como, tamanho, forma e modificação em sua superfície (JÓZEFCZAK ;SKUMIEL, 2007). Existem grupos de pesquisa ao redor do mundo que trabalham com diferentes descrições do fenômeno de hipertermia magnética. Alguns afirmam que as partículas ferromagnéticas geralmente aquecem devido à perda por histerese (HERGT et al., 1998) e partículas superparamagnéticas aquecem devido à perda por relaxação (ROSENSWEIG, 2002). Mas outros resultados indicam que a hipertermia magnética deve ser sempre descrita pelo processo de histerese dinâmica (LANDI ;BAKUZIS, 2012; VERDE, LANDI, CARRIAO et al., 2012; VERDE, LANDI, GOMES et al., 2012).

2.6 INOVAÇÃO NANOTECNOLÓGICA E PERSPECTIVAS

Esse trabalho está inserido em um ambiente de inovação tecnológica. Suas perspectivas podem ir além dos objetivos desse exposto quando são corelacionados os mecanismos de liberação controlada do PTX desencadeados por aquecimento proveniente da magnetohipertermia, com a própria técnica de MH que por si só pode

produzir ação antitumoral (JORDAN et al., 1999). É provável que a combinação desses dois mecanismos possa apresentar um modo eficaz para o tratamento de alguns tipos de tumores, mas vários estudos ainda serão realizados com o intuito de contribuir para o desenvolvimento e elucidação deste nanosistema. Os resultados apresentados e discutidos nessa dissertação se atêm aos objetivos propostos e especificados na seção 3.

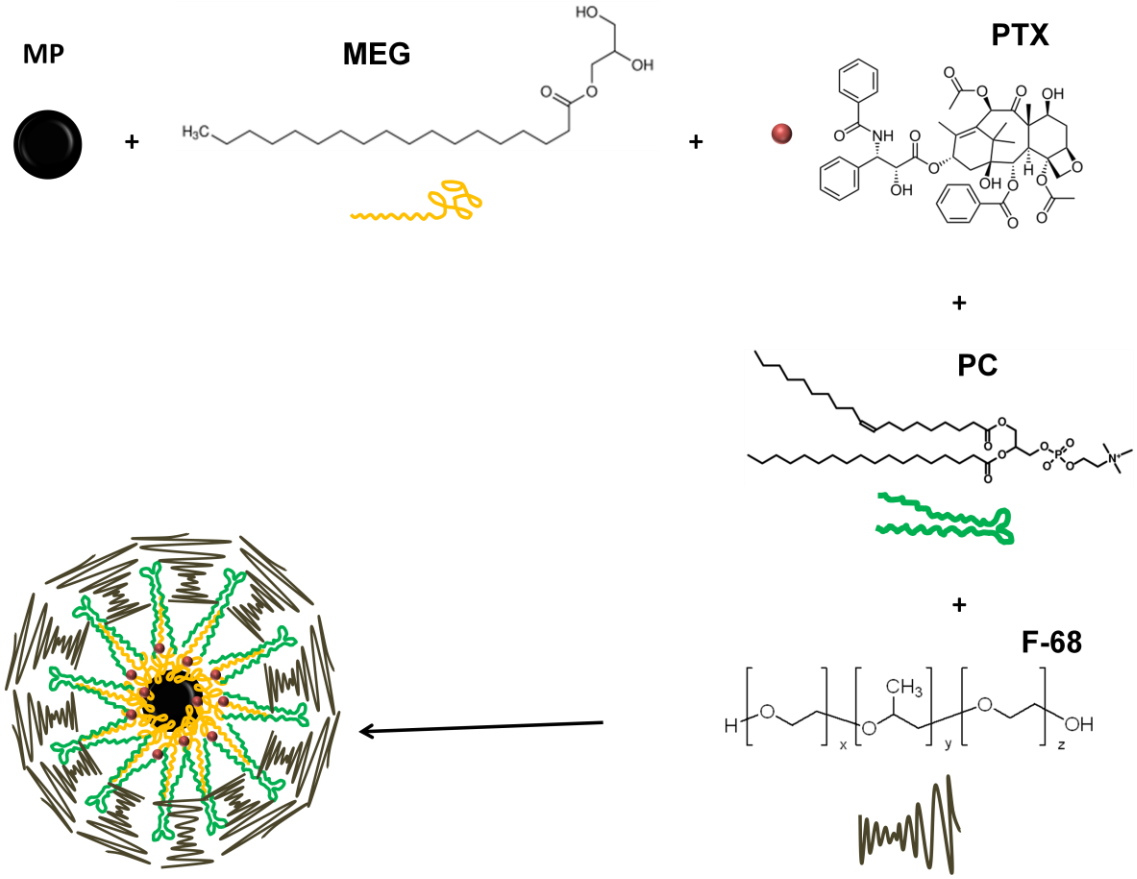
O revestimento de nanopartículas magnéticas com lipídeos de cadeia longa capazes de formar nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas é uma saída um tanto quanto promissora para a modulação da liberação controlada de fármacos em sítios específicos via magnetohipertermia. O baixo ponto de fusão desses lipídeos sugere a liberação do fármaco mediante aplicação de campo alternado pela possível fusão do lipídeo em temperaturas, um pouco acima da temperatura corporal (LI et al., 2010).

A Figura 7 é uma ilustração de um possível mecanismo de formação das nanopartículas lipídicas sólidas desenvolvidas e caracterizadas nesse trabalho. A partícula magnética nucleia a formação da nanopartícula lipídica sólida e o paclitaxel que apresenta uma hidrofobicidade alta tende a encapsular-se no arcabouço lipídico.

Essa representação esquemática é um corte plano de uma matriz esférica que tridimensionalmente pode ser ilustrada pela Figura 8, que apresenta um corte transversal, tentando explicitar o interior da nanopartícula lipídica sólida contendo partículas magnéticas e paclitaxel.

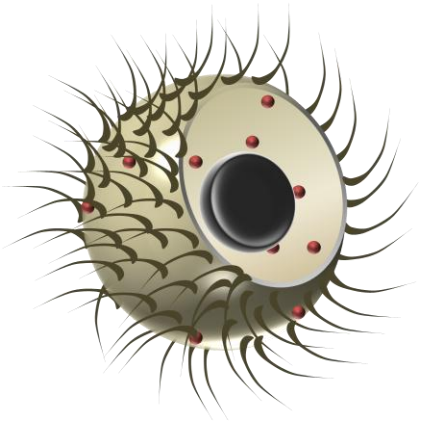
No âmbito das inovações nanotecnológicas com aplicações biológicas vários questionamentos são levantados em relação aos possíveis efeitos adversos. Um dos principais questionamentos relacionados ao uso de nanopartículas magnéticas está associado à sua citotoxicidade. Mas a literatura tem mostrado que Nanopartículas magnéticas apresentam boa tolerabilidade pelo organismo em quantidades adequadas, só desencadeando processos de citotoxicidade em células normais e acúmulo em alguns órgãos e tecidos em altas concentrações (ZHOU et al., 2006; JAFARI;SIMCHI ;KHAKPASH, 2010). Desta forma, a otimização da formulação é imprescindível para aplicações em ensaios futuros de culturas celulares *in vitro* e também para estudo *in vivo*, pois a carga de partículas magnéticas é determinante para garantir a magnetohipertermia que será responsável pelo desencadeamento da liberação do paclitaxel.

Figura 7: Representação esquemática do mecanismo de formação de NLSM.



Fonte : Próprio autor.

Figura 8: Representação esquemática tridimensional da possível estrutura da NLSM contendo paclitaxel.



Fonte : Próprio autor.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Desenvolver Nanopartículas Lipídicas Sólidas Magnéticas (NLSM) contendo paclitaxel encapsulado visando ação antitumoral pela liberação do fármaco desencadeada por magnetohipertermia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar PM e caracterizá-las quanto à morfologia, diâmetro médio e propriedades magnéticas.

- Preparar NLSM contendo PTX e caracterizá-las quanto à morfologia, diâmetro médio e distribuição de tamanho, eficiência de encapsulação do PTX e propriedades magnéticas do nanossistema.

- Avaliar a influência da temperatura no perfil de liberação *in vitro* do paclitaxel encapsulado no nanossistema.

- Avaliar a estabilidade química do paclitaxel encapsulado no sistema de NLSM e a estabilidade da formulação.

- Estudar as propriedades magnéticas no nanossistema e fazer o estudo de liberação do paclitaxel via magnetohipertermia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Água ultrapurificada, $FeCl_2.4H_2O$, $FeCl_3.6\ H_2O$, hidróxido de amônio 29%, fosfatidilcolina, monoestearato de glicerila, acido esteárico, tauro desoxicolato, poloxamer F-68, paclitaxel, etanol absoluto, acetona, metanol grau HPLC, acetonitrila grau HPLC.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação de nanopartículas magnéticas (PM)

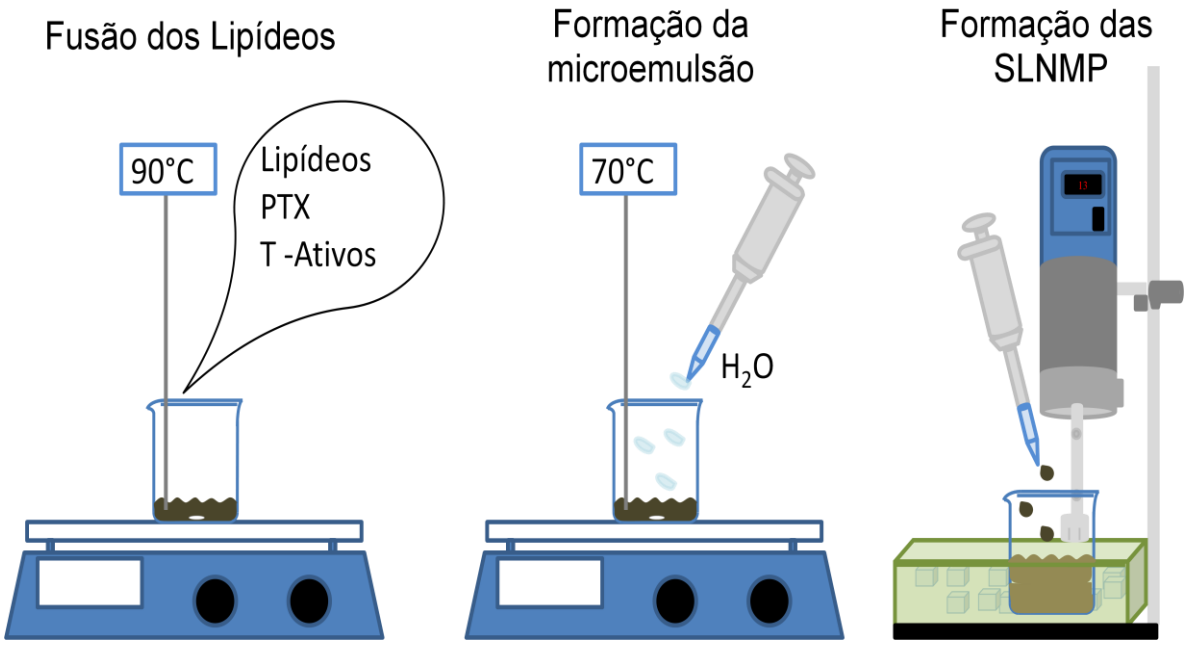
PM foram preparadas por método de co-precipitação em meio alcalino, pela adição de hidróxido de amônio em solução de sais de ferro II e III na proporção molar de 1:2 respectivamente (RUTNAKORNPITUK et al., 2009). Foram solubilizados 1,00g de $FeCl_2.4H_2O$ e 1,66g de $FeCl_3.H_2O$, separadamente em 20mL de água ultrapurificada. Após solubilização as soluções foram misturadas e homogeneizadas. Sob agitação constante foram adicionados 20mL de solução de NH_4OH 29%. A agitação foi mantida por mais 30minutos. Formou-se um precipitado preto de magnetita que foi lavado por duas vezes com água ultrapurificada e centrifugado no final a 5000 rpm por 5 minutos.

4.2.2 Preparação de nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas (NLSM)

4.2.2.1 Método da diluição da microemulsão

NLSM foram preparadas pelo método de diluição da microemulsão conforme descrito por (MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2010) com adição de nanopartículas magnéticas na etapa de fusão dos lipídeos (Figura 9). Foram aquecidos, até total fusão dos lipídeos, 30mg de PM, 400mg da matriz lipídica (ácido esteárico ou MEG), 200mg de fosfatidilcolina de soja e 50mg de Tauro desoxicolato. Foram adicionados 5mg de PTX aos lipídeos e o aquecimento foi mantido até total solubilização do fármaco na fase lipídica. A essa mistura foram adicionados 250µL de água ultrapurificada para formação da microemulsão. Essa microemulsão foi gotejada em água gelada sob agitação com ultra-turrax a aproximadamente 15000rpm por 10min. Com a diminuição da temperatura e agitação no turrax formam-se as NLSM.

Figura 9: Representação esquemática do preparo de NLSM pelo método de diluição da microemulsão. Lipídeos, PTX e Tensoativos são fundidos, e pela adição de água, forma a microemulsão que é então diluída sob agitação.

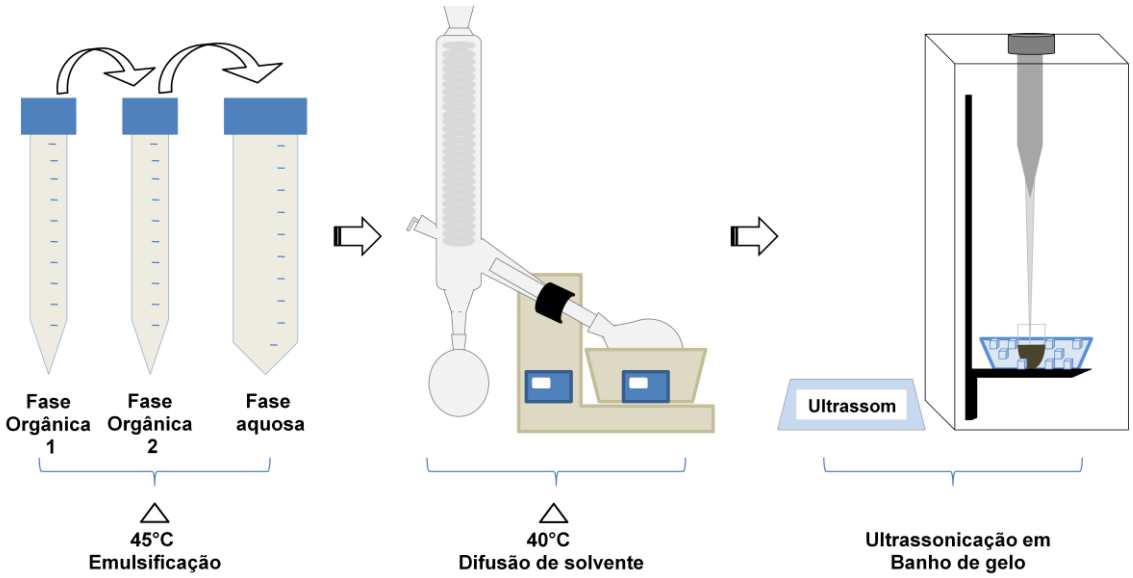


Fonte : Próprio autor. (legenda)

4.2.2.2 Método da emulsificação evaporação de solvente

NLSM foram preparadas pelo método de emulsificação-difusão de solvente conforme descrito por (PANG et al., 2007) com algumas modificações. Conforme Figura 10, 9mL de solução etanólica de fosfatidilcolina 2,56% (m/v) formam a fase orgânica 1. A fase orgânica 2 foi formada pela dispersão (m/v) de 2% de PM, 4% de MEG e 0,1% de PTX em 5mL de acetona P.A.. Já a fase aquosa foi constituída de 25mL de pluronic F-68 0,4% (m/v). Para formação da emulsão a fase orgânica 1 foi adicionada à fase orgânica 2 e deixada em banho de ultrassom por 5min. Em seguida a mistura foi vertida à fase aquosa e deixada em banho de ultrassom por mais 5min. Na etapa de difusão foi retirado todo o solvente orgânico e a suspensão foi concentrada para 10mL. Essa suspensão foi deixada por 5min em banho de gelo e então sonicada por 5mim em sonicador de probe. Após sonicação a amostra foi centrifugada por 30min a 2000rpm e 4°C para separação do fármaco livre.

Figura 10: Representação esquemática do preparo de NLSM pelo método de emulsificação-difusão de solvente.



Fonte : Próprio autor.

4.3 CARACTERIZAÇÕES

4.3.1 Difratometria de Raios-X (DRX)

A estrutura cristalina da magnetita, Fe_3O_4, foi examinada em difratômetro de raios-X, marca SHIMADZU, modelo XRD6000, na faixa de 10 a 80º e ângulo de 2θ, tendo como base o padrão de silício para cálculo do diâmetro médio das nanopartículas (MEEROD et al., 2008). Para cálculo do diâmetro médio foi utilizada a equação de Debye-Scherrer, Equação 1.

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos\Theta} \quad (1)$$

onde;

D - diâmetro médio das partículas

K - constante que depende da forma das partículas

λ - comprimento de onda da radiação eletromagnética

θ - ângulo de difração de Bragg

β – Largura do pico de difração a meia altura dada experimentalmente corrigido do dado experimental do padrão de silício.

4.3.2 Propriedades magnéticas

As propriedades magnéticas foram avaliadas por técnica de magnetometria em um magnetômetro de amostras vibrantes (VSM), modelo EV9, marca ADE-MAGNETICS, pela equipe de colaboradores do Instituto de Física (IF-UFG). Foram feitas análises da magnetita fluido e pó seco em estufa a 70°C. E também de formulações de NLS e NLSM em suspensão e secas por liofilização por 15h.

4.3.3 Quantificação do paclitaxel

A quantificação do paclitaxel foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo marca VARIAN, modelo Pro Star 410 equipado com detector de UV e coluna cromatográfica Varian C18 (150 x 4,6mm) 5µm SN. Foram injetados 20µL de amostra sob fluxo de 1mL/min da fase móvel de acetonitrila grau HPLC : metanol grau HPLC : água ultrapurificada (50 : 40 : 10) e detecção em 227nm. Para quantificação do PTX presente nas formulações de NLSM foi feita curva de calibração da matéria prima utilizada. O método cromatográfico foi empregado para quantificar PTX nos ensaios de recuperação, eficiência de encapsulação, estabilidade e ensaio de liberação.

4.3.4 Eficiência de encapsulação e recuperação do paclitaxel

A eficiência de encapsulação (E.E.%) e quantificação do paclitaxel livre foram realizadas por CLAE. O fármaco livre foi separado do encapsulado no final da preparação por centrifugação a 4°C, 2000rpm por 30min. Foram quantificados tanto o sobrenadante de NLSM, quanto o resíduo precipitado. O cálculo da eficiência de encapsulação foi dado pela Equação 2.

$$E.E.\% = \frac{\text{massa de paclitaxel encapsulado (mg)}}{\text{massa de paclitaxel inicial (mg)}} x\ 100 \quad (2)$$

A recuperação (Rec %) do paclitaxel na formulação foi quantificada por CLAE. O fármaco foi quantificado em cada etapa de preparo da formulação. A recuperação então foi dada pela Equação 3.

$$Rec\ \% = \frac{\sum \text{ paclitaxel em cada etapa } (mg)}{\text{massa de paclitaxel inicial (mg)}} x\ 100 \quad (3)$$

4.3.5 Estudo morfológico e distribuição de tamanho das NLSM

O estudo morfológico e distribuição de tamanho das NLSM foram realizados por técnicas de Microscopia de Força Atômica (AFM) e Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).

Para o estudo morfológico foi utilizado AFM, marca Agilent, modelo 5500, com ponta de silício. Foi empregado o modo não contato, sob força constante (k) de 42N.m^{-1} e frequência de ressonância de 252kHz. As amostras foram diluídas 50 vezes e gotejadas em superfície de mica, e após secar na temperatura ambiente foram submetidas à leitura.

Para o estudo do diâmetro médio e distribuição de tamanho das NLSM em suspensão foi empregada técnica de DLS em Zeta Sizer, marca MALVERN, modelo Nano series. As amostras foram diluídas 50 vezes.

Os dados de distribuição de tamanho obtidos pelas técnicas de AFM e DLS foram comparados.

4.3.6 Estudo de liberação *in vitro* do PTX

4.3.6.1 Ensaio de liberação do PTX por difusão em membrana de diálise

O ensaio de liberação *in vitro* do PTX encapsulado em NLSM foi realizado pelo método de difusão por membrana de diálise em temperaturas de 25, 37 e 43ºC por 48h, mantendo temperatura e agitação constantes em incubadora com agitação orbital. A Figura 11 mostra o esquema representativo do sistema empregado para este ensaio. O meio doador foi composto por 1mL de formulação de NLSM contendo cerca de 300µg de PTX, e o meio receptor foi composto por 20mL de solução salina 0,9%: Isopropanol (70:30), garantindo condição *sink* para o ensaio. Foram coletados 500µL do meio receptor em tempos programados, fazendo-se a reposição do volume. A fração coletada foi quantificada diretamente, sem diluição, por CLAE conforme descrito no iten 4.3.3.

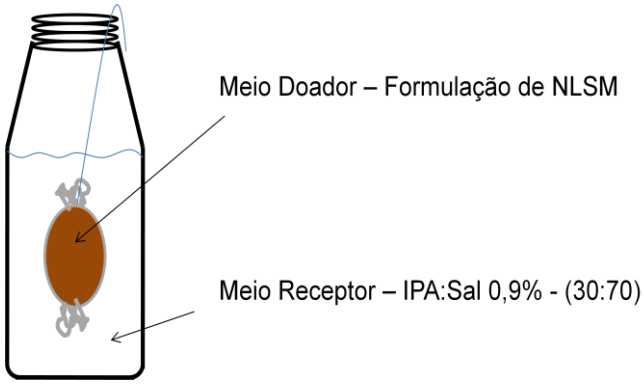
4.3.6.2 Ensaio de liberação do PTX por magnetohipertermia

Para o ensaio de liberação do PTX por magnetohipertermia a formulação de NLSM foi dividida em duas alíquotas de mesma concentração de PTX (300µg/mL). A alíquota (1), denominada controle foi mantida em repouso na temperatura ambiente (26ºC) por 21h. Já a alíquota tratada com MH foi mantida nas mesmas condições

também por 21h, mas durante as primeiras 4 horas de estudo houve aplicação de 24 pulsos de MH de 180s com correntes de 149,8 A e frequência de aproximadamente 300 kHz. Entre cada pulso houve um período de resfriamento de 420s. Durante este experimento, a temperatura da amostra foi monitorada por um pirômetro de sonda fluorescente.

Após 21h de repouso as amostras foram submetidas a 10 min de centrifugação a 2000rpm e 4ºC para separação do fármaco livre. O fármaco não liberado contido no sobrenadante foi quantificado por CLAE conforme item 4.3.3. e 4.3.4.

Figura 11: Representação esquemática do ensaio de liberação de paclitaxel em NLSM por difusão em membrana de diálise. As amostras foram mantidas em incubadora com agitação orbital em temperatura constante por todo o tempo do ensaio.



Fonte : Próprio autor.

4.3.7 Estudo de estabilidade das NLSM

4.3.7.1 Estabilidade em suspensão

A estabilidade da suspensão de NLSM foi avaliada quanto aos fenômenos físicos de sedimentação, floculação, coalescência e cremagem por técnica de espalhamento de luz múltiplo, em equipamento da marca FORMULACTION, modelo Turbscan Lab expert. As amostras foram deixadas em repouso por 24h em temperatura ambiente, e em tempos programados foram realizadas varreduras com um feixe de laser da base ao topo da cela. Vide Figura 15.

4.3.7.2 Estabilidade em amostras Liofilizadas

Para avaliar a estabilidade da formulação de NLSM na ausência do meio aquoso dispersante, foi realizada a liofilização da formulação com adição de trealose

como crioprotetor (SCHWARZ ;MEHNERT, 1997; MEHNERT ;MÄDER, 2001; SUBEDI;KANG ;CHOI, 2009). Foram testadas quantidades crescentes de trealose a partir de 1 até 20% da massa lipídica, tendo o MEG como referência. As amostras contendo 1mL de formulação e 1mL de solução de trealose na concentração desejada foram previamente congeladas a -20ºC e liofilizadas por 15h em liofilizador marca THERMO, modelo Micromodulyo. A concentração de trealose utilizada como padrão para o teste de estabilidade foi de 15%.

Após tempos programados as amostras foram ressuspendidas em 2mL de água ultrapurificada sob agitação por 30s em vórtex e 5min em ultrassonicador de probe em banho de gelo. Posteriormente foram centrifugadas por 10min a 1000rpm para separação do fármaco possivelmente extravasado no processo.

As NLSM ressuspendidas foram avaliadas quanto ao diâmetro médio e distribuição de tamanho por técnica de DLS e o sobrenadante foi quantificado por CLAE para verificar o PTX ainda encapsulado.

4.3.8 Estudo de magnetohipertermia (MH)

O estudo de MH foi realizado em equipamento marca Ambrell, modelo Easy Heat LI, partindo de amostras de PM, fluido e pó, e também das NLS e NLSM em suspensão e liofilizadas. A temperatura de aquecimento foi controlada por sonda óptica inserida dentro da amostra. Desta forma foi traçado o perfil de aquecimento do nanossistema para o estudo de liberação por magnetohipertermia descrito no item 4.3.6.2.

4.3.9 Análise térmica

A Formulação de NLSM liofilizada foi submetida à técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) em equipamento marca SHIMADZU, modelo 60A no intuito de avaliar a temperatura de fusão da formulação de NLSM frente aos seus componentes. Foram pesadas separadamente 2g de NLSM liofilizada e seus componentes. Todos foram submetidos a uma rampa de aquecimento de 0,5ºC/min em intervalo de 24 a 80ºC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO NANOSISTEMA

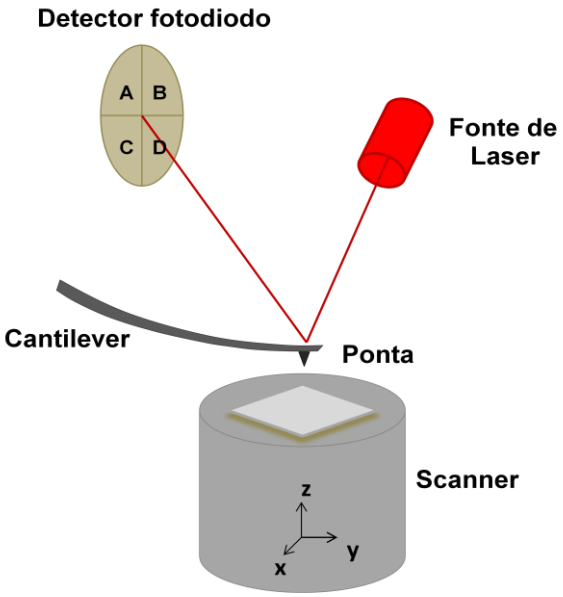
5.1.1 Estudo morfológico, diâmetro médio e distribuição de tamanho das NLSM

A morfologia, diâmetro médio e distribuição de tamanho das NLSM foram estudadas por Microscopia de Força Atômica (AFM) e técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).

Diferente das técnicas de microscopia eletrônica de varredura e transmissão à microscopia de força atômica é ideal para amostras “moles” como sistemas lipídicos, pois permite a visualização 3D de superfícies sem que haja danos na amostra.

Inserida em uma classe de microscópios de varredura de sonda, a técnica permite varrer uma superfície registrando ponto a ponto algum tipo de interação entre a sonda e a superfície.

Figura 12: Representação esquemática simplificada da técnica de AFM no modo não-contato.



Fonte : Próprio autor.

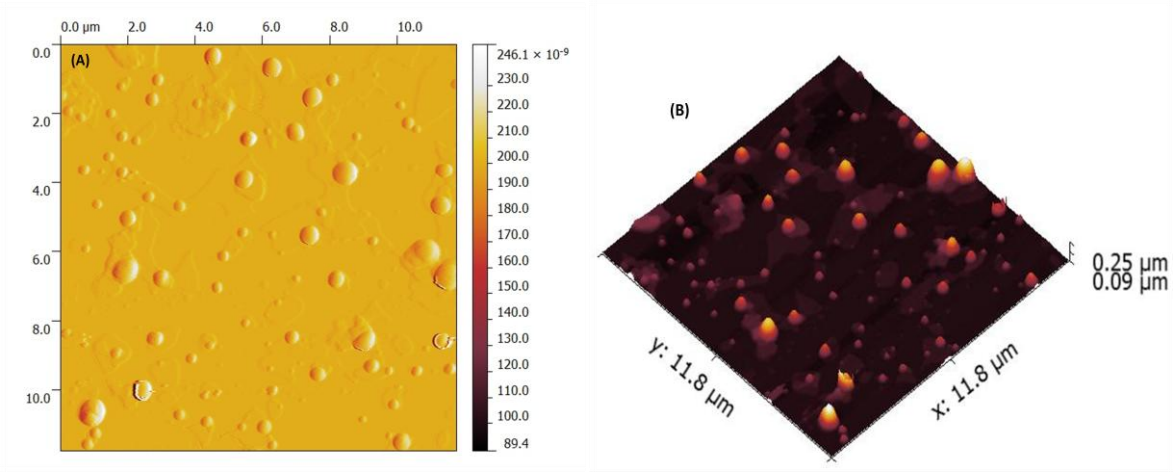
Como mostra a representação esquemática simplificada da Figura 12, um conjunto de piezoelétricos cerâmicos, denominado scanner, posiciona a amostra em relação à sonda permitindo a varredura. A sonda utilizada por essa técnica é um

cantilever flexível. Em uma das extremidades existe uma ponta muito fina que varre a superfície onde está a amostra com uma determinada amplitude de oscilação. Um laser é incidido no cantilever e refletido na direção de um detector fotodiodo que registra suas deflexões que é em seguida transformada em imagem por software específico.

O modo não-contato utilizado neste trabalho explora o regime de interações de Van der waals, atrativas entre os átomos da ponta e da amostra. O sistema de realimentação denominado, feedback, no intuito de controlar a posição vertical da ponta em relação a amostra mantém constante a amplitude de oscilação do cantilever.

Na imagem de topografia (Figura 13-A) é possível observar a forma esférica das NLSM medindo entre 100 e 600nm aproximadamente. Já em (B) há uma aparente discrepância no sentido z da estrutura tridimencional, onde pode ser observado uma diminuição de aproximadamente 2 vezes na altura da nanopartícula. Isso se deve provavelmente a dois motivos: Primeiro, um provável colapso (achatamento) do sistema lipídico em função de sua deposição sobre a mica. Em segundo, como o modo não contato utilizado é mediado por interações de Van der Waals, é possível que o cantilever se mova a uma altura que não condiz com a real altura da nanopartícula na busca de conservar a amplitude de oscilação do seu movimento (OLIVEIRA et al., 2012).

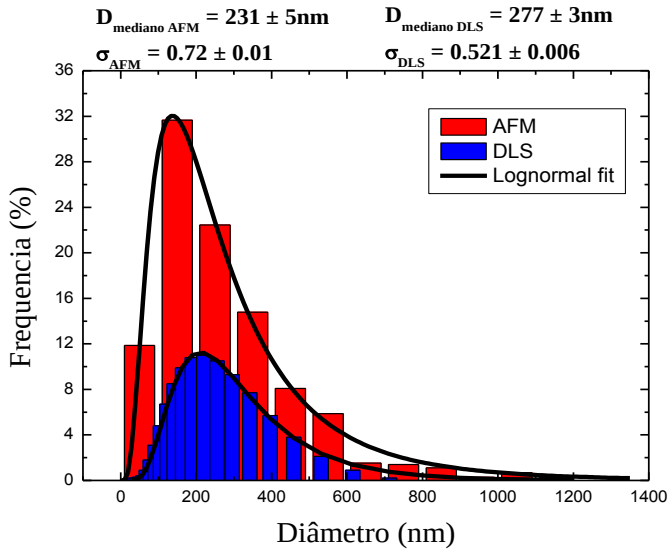
Figura 13: Imagens de AFM de NLSM, secas sobre superfície de mica, realizadas no modo não contato. (A) Topografia (B) topografia tridimensional.



Pela técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) também conhecida como espectroscopia de correlação fotônica é possível medir o diâmetro hidrodinâmico de nanopartículas em suspensão. Basicamente um feixe de luz monocromático (laser) é incidido em uma cela contendo uma dispersão. Ao chocar-se com as nanopartículas dispersas em movimento Browniano o laser é espalhado em todas as direções sofrendo uma alteração em seu comprimento de onda. Essa alteração está relacionada com o diâmetro das partículas, ou seja, partículas menores espalham mais luz que partículas maiores. Desta forma é gerada uma corelação da intensidade de luz espalhada no tempo. Através dessa correlação que gera uma curva de autocorrelação de 2ª ordem um software calcula o diâmetro médio e a distribuição de tamanho das partículas dessa dispersão.

As NLSM produzidas e caracterizadas nesse trabalho apresentaram diâmetro médio de aproximadamente 200nm com um Índice de polidispersão (PdI) de 0,189, indicando uma faixa estreita de distribuição.

Figura 14: Histograma de distribuição tamanho de partículas obtido por técnica de AFM e DLS.



A Figura 14 mostra uma comparação da distribuição de tamanho de NLSM entre a técnica de AFM e DLS acompanhadas do ajuste da função de distribuição log normal (Equação 4).

Onde:

D – Diâmetro das partículas

g(D) – Função de distribuição log normal

σ – Desvio padrão relacionado à polidispersão

$$g(D) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}D_{mediano}} exp\left[\frac{-ln(D/D_{mediano})^2}{2\sigma^2}\right] \quad (4)$$

Apesar do pequeno deslocamento na sobreposição dos dois histogramas, é muito próxima a distribuição e mostra que as duas técnicas corroboram para a elucidação desses dois parâmetros.

5.1.2 Recuperação, carga e eficiência de encapsulação do paclitaxel

Como mostra a Tabela 1, a recuperação, carga e eficiência de encapsulação do PTX foram aumentadas significativamente quando foi utilizado o método de emulsificação-difusão de solvente tendo o monoestearato de glicerila (MEG) como matriz lipídica. O ácido esteárico é amplamente utilizado na literatura como matriz lipídica de NLS contendo diversos fármacos lipofílicos (CAVALLI et al., 1995; GHADIRI et al., 2011; TROMBINO et al., 2013), porém para a encapsulação de PTX em NLS vários trabalhos têm reportado o uso de outros lipídeos como tripalmitim (FADDA et al., 2013), e monoestearato de glicerila (MIAO et al., 2013) devido a uma maior afinidade do PTX por esses lipídeos. Isso pode explicar as diferenças encontradas nos parâmetros avaliados na Tabela 1. Estudos complementares estão sendo realizados para verificar se há possibilidade de degradação ou decomposição do paclitaxel em temperaturas acima de 100ºC, que possam justificar a baixa eficiência de encapsulação e baixa recuperação pelo método da microemulsão.

Como mostra a Tabela 1 foi possível encapsular 17.1µg de paclitaxel por mg de matriz lipídica (MEG). A concentração de paclitaxel na formulação foi de aproximadamente 300µg/mL. Esta quantidade, embora relativamente pequena perante formulações convencionais, pode apresentar a vantagem de ser potencialmente mais biodisponível, devido à liberação sítio específica (SHEN et al., 2013) principalmente se for associado a algum tipo de biomarcador (GUPTA;JAIN ;JAIN, 2007). Ou seja, formulações nanotecnológicas sugerem aumento da eficácia

e melhora da biodistribuição devido à vetorização e mecanismo de liberação do fármaco, que propiciam ação sitio específica (CIRSTOIU-HAPCA et al., 2010). Em ensaios futuros será avaliada a citotoxicidade das NLSM contento paclitaxel e viabilidade celular para determinação de concentrações adequadas nos ensaios de magnetohiperthermia.

Tabela 1: Dados quantitativos de encapsulação de paclitaxel em NLSM obtidas por dois métodos distintos.

	Diluição da Microemulsão		Emulsificação-difusão de solvente	
Ác. Esteárico (mg)	**400.2 ± 0.8**	**-**	**200.2 ± 0.8**	**-**
mMEG (mg)	**-**	**400.6 ± 0.5**	**-**	**200.1 ± 0.4**
PTX_a (mg)	**5.2 ± 0.1**	**5.1 ± 0.3**	**5.1 ± 0.2**	**5.1 ± 0.1**
PTX_e (mg)	**1.0 ± 0.2**	**1.3 ± 0.1**	**1.0 ± 0.1**	**3.4 ± 0.1**
PTX_{rec} (%)	**47.2 ± 3.8**	**51.1 ± 4.0**	**95.4 ± 0.9**	**96.1 ± 0.4**
C.F. (µg/mg)	**2.5 ± 0.5**	**3.3 ± 0.4**	**5.2 ± 0.8**	**17.1 ± 0.4**
E.E.%	**19.4 ± 3.8**	**26.1 ± 2.4**	**20.1 ± 0.9**	**67.3 ± 1.2**

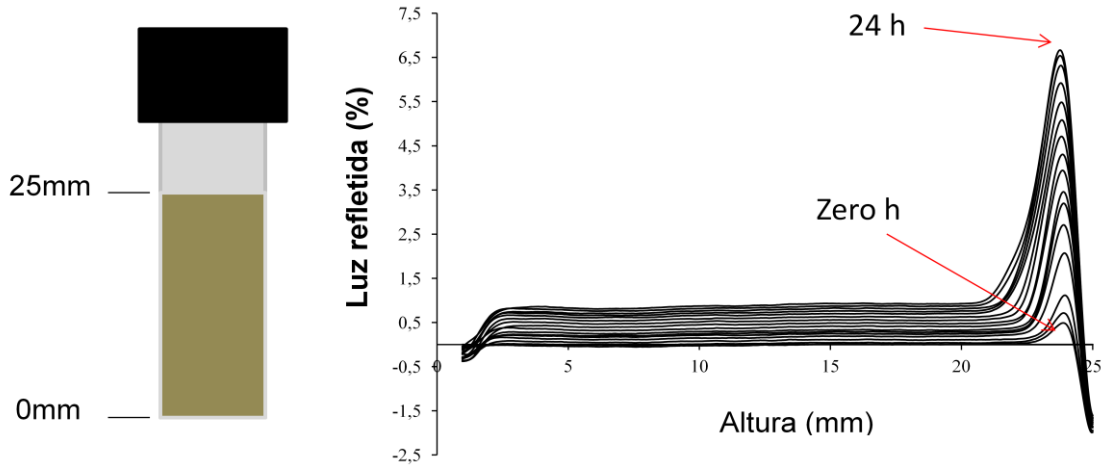
Nota: Os resultados estão expressos com média e Desvio padrão de três amostragens independentes (n = 3). Legenda na lista de abreviações.

5.1.3 Estudo de estabilidade das NLSM

5.1.3.1 Estabilidade de NLSM em suspensão

A suspensão de NLSM foi submetida a estudo de estabilidade por técnica de espalhamento de luz múltiplo em um período de 24h na temperatura ambiente. Conforme o gráfico da Figura 15, não foi observado, nesse período de estudo, variação de tamanho, floculação ou sedimentação, já que a relação entre a quantidade *de* luz refletida *(back scattering)* e luz transmitida foi praticamente a mesma em todo o período do estudo. Apenas houve a formação de cremagem que representa menos de 7%, e é um processo reversível. A literatura tem mostrado que nanopartículas lipídicas sólidas possuem uma particularidade de não serem estáveis em tempos prolongados quando em suspensão por processos de gelificação e cristalização do sistema (LEE;LIM ;KIM, 2007). Por esse motivo foi realizado estudo de estabilidade de NLSM liofilizada.

Figura 15: Estudo de estabilidade da formulação de NLSM por técnica de espalhamento de luz múltiplo, por 24h em temperatura ambiente.

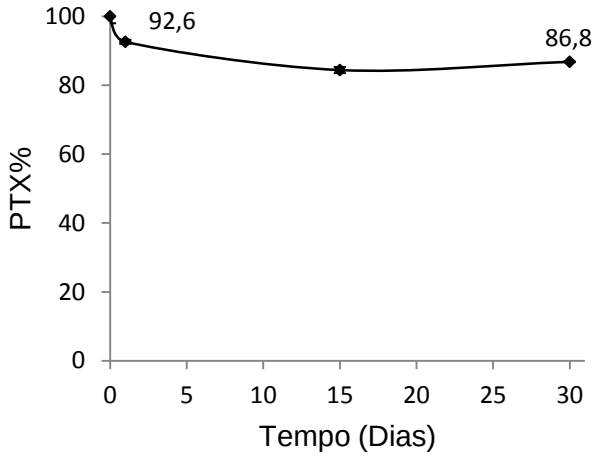


5.1.3.2 Estabilidade de NLSM liofilizada

Após 30 dias de estudo não houve variação significativa no diâmetro médio e PdI de amostras de NLSM, liofilizadas com 15% de trealose, ressuspendidas em água ultrapurificada.

A estabilidade química do PTX encapsulado foi determinada por CLAE. Como mostra o gráfico da Figura 16, após 30 dias houve expulsão de aproximadamente 14% do fármaco encapsulado, sendo que com 24 horas de estudo já foi detectada perda de 8% que provavelmente se deve ao fármaco associado à NLSM por mecanismos de adsorção e que não se diferenciam como fármaco livre antes da liofilização. Considerando esse fato, o fármaco verdadeiramente encapsulado após trinta dias sofre queda de cerca de 6%.

Figura 16: Estabilidade da formulação de NLSM contendo PTX. As amostras liofilizadas foram armazenadas em dessecador, na temperatura ambiente. Após tempos programados foram ressuspendidas e o PTX foi quantificado por CLAE.



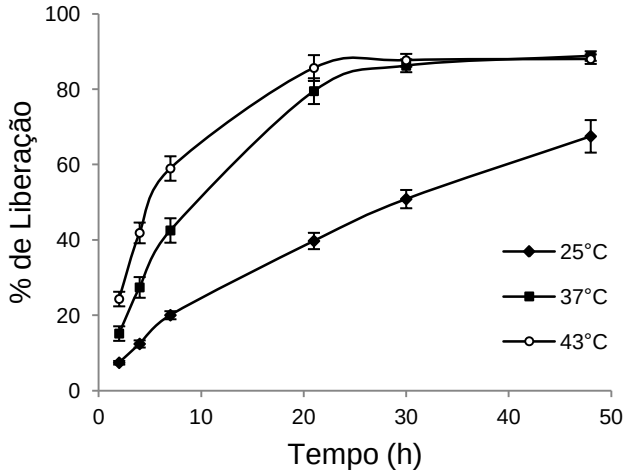
5.1.4 Ensaio de liberação *in vitro* do PTX por método de difusão em membrana de diálise

O estudo de liberação *in vitro* do PTX encapsulado em NLSM foi realizado por técnica de difusão por membrana de diálise. Método bastante utilizado em ensaios de liberação de nanosistemas. Porém a quantificação do fármaco se dá em um estágio de segunda ordem. Ou seja, após ser liberado pelo nanossistema o fármaco precisa se difundir por uma membrana (peneira molecular) e só depois pode ser quantificado no meio receptor. É evidente que não há diferença significativa entre o tempo da liberação e da difusão, pois o ensaio é realisado em condição sink e mantido em agitação constante.

As curvas de liberação do PTX estão apresentadas na Figura 17. O teste foi realizado nas temperaturas de 25, 37 e 43°C. As curvas mostram claramente a diferença no perfil de liberação do paclitaxel causada pelo aumento da temperatura. A partir da equação da reta da porção ascendente das primeiras 7 horas de ensaio foi possível calcular a cinética da liberação. Observa-se que a temperatura exerce um papel fundamental na cinética de liberação. Na temperatura de hipertermia (43ºC) são necessárias apenas 7h para liberação de 60% do fármaco encapsulado enquanto que na temperatura ambiente (25ºC) são necessárias aproximadamente 40h para a mesma liberação. A meia vida de liberação (t ½), ou tempo necessário

para que sejam liberados 50% do fármaco encapsulado, foi reduzida em aproximadamente 4 vezes quando a temperatura foi elevada de 25 para 43°C. O fato de não haver liberação de 100% se explica pelo equilíbrio estabelecido na difusão do meio doador para o receptor, ou seja, é uma variável da técnica empregada, mas que não significa falha do sistema de liberação.

Figura 17: Perfil de liberação in vitro do PTX encapsulado em NLSM. O ensaio foi realizado nas temperaturas de 25, 37 e 43°C durante 50 horas. Alíquotas foram coletadas com reposição de meio e quantificadas por CLAE.



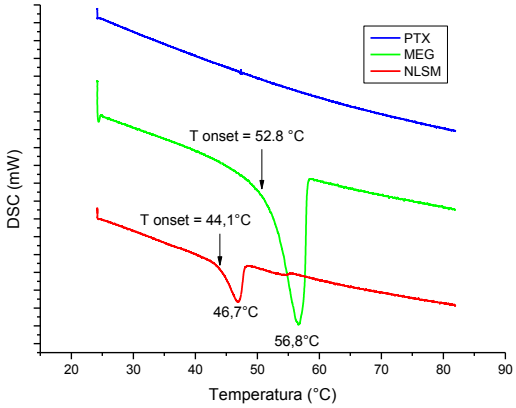
Aumento de temperatura é na verdade aumento do grau de agitação das moléculas de um sistema. Isso é obvio, e o resultado era esperado, mas como o foco deste estudo é a liberação do fármaco por magnetohipertermia, o dado é de suma importância. O aumento da temperatura dos centros de calor (NLSM) que compõem o nanosistema, provocado pela ação do campo magnético alternado externo, influenciará a modulação da liberação do fármaco pela provável fusão da matriz lipídica e aumento da difusibilidade do fármaco pelo meio receptor. Este argumento está mais explicado no item 5.5 intitulado análise térmica e provado no item 9.3.2 intitulado liberação do paclitaxel via magnetohipertermia.

5.1.5 Análise térmica

A Figura 18 mostra as curvas de análise térmica referentes à NLSM carregadas com PTX após liofilização em comparação com os componentes da formulação. Partículas magnéticas (PM), fosfatidilcolina (PC), poloxamer F-68 e

paclitaxel (PTX) não apresentaram picos de fusão dentro do intervalo de temperatura analisado. O monoestearato de glicerila (MEG) apresentou transição de fase em 56°C com a temperatura de início da fusão (T_{onset}) em 52,8ºC. Já a formulação de NLSM carregada com PTX seca por liofilização apresentou fusão a 46°C com T_{onset} em 44,1ºC.

Figura 18: Curvas de DSC de NLSM liofilizada em comparação com as curvas dos componentes da formulação. Rampa de aquecimento de 0,5 ° C / min. Os demais componentes se comportaram como o PTX e foram omitidos para facilitar a visualização do gráfico.



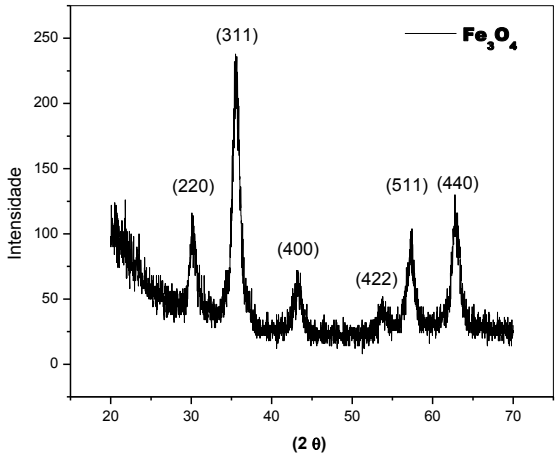
Esses dados corroboram com o estudo de liberação *in vitro* onde foi mostrado que na temperatura de 43ºC houve uma liberação 4 vezes maior do que na temperatura de 25ºC. Nessa temperatura, as nanopartículas lipídicas estão praticamente iniciando seu processo de fusão. Analisando essa afirmativa do ponto de vista de uma única partícula, é possível que o fármaco contido no interior de um sistema lipídico cristalino comece a ter maior mobilidade à medida que esse sistema aquece e amolece, podendo entrar em contato com o meio dispersante que envolve a partícula com mais facilidade. Ou seja, quão maior o grau de agitação do sistema maior a interação das partículas com a fase externa que por sua vez promove a solubilização e difusão do fármaco pela membrana.

5.2 CARACTERIZAÇÃO MAGNÉTICA DO NANOSSISTEMA

5.2.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 por difratometria de raios-X

Os padrões de difração de raios-X do pó de magnetita (Fe_3O_4) seco a 70ºC estão apresentados na Figura 19. Os picos de difração revelados pelo difratograma em (1 1 0), (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) e (4 4 0), são os picos característicos do cristal de Fe_3O_4 com uma estrutura em espinélio cúbico (YU et al., 2006).

Figura 19: Difratograma de raios-X de PM (Fe_3O_4), utilizando um feixe de raios-X monocromático em intervalo de 10 a 80°, ângulo (2θ), 40 kV e 30 mA.



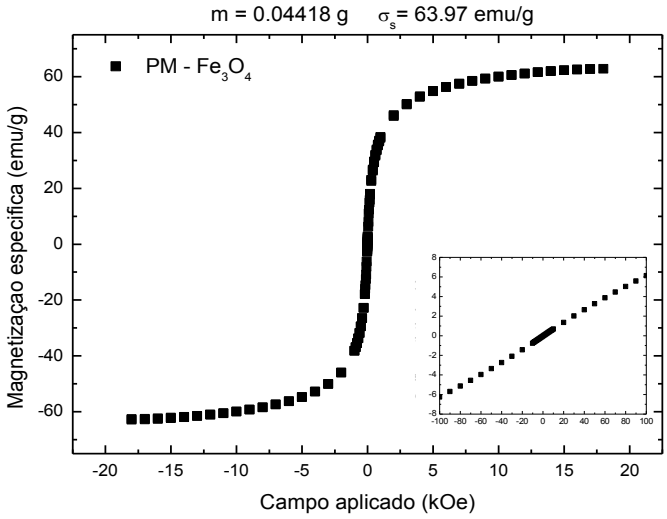
O diâmetro do cristal de nanopartículas magnéticas foi calculado pela equação de Debye-Scherrer (LI et al., 2008), d = (kλ / βcos θ) corrigido pelo padrão de silício. O diâmetro médio encontrado nas nanopartículas de Fe_3O_4 foi de 15,6 nm.

5.2.2 Estudo das propriedades magnéticas do nanossistema por magnetometria

As propriedades magnéticas foram avaliadas por técnica de magnetometria em magnetômetro de amostras vibrantes (VSM). A magnetização específica de saturação foi determinada e analisada a partir de curvas de magnetização das PM e da formulação de NLSM em temperatura ambiente. A Figura 20 mostra a magnetização específica de saturação do pó de PM seco a 70ºC em função do campo magnético aplicado. A curva de magnetização mostra claramente que as PM

entram em regime superparamagnético frente a aplicação de um campo, pois atinge uma magnetização específica de saturação de 63,97 emu/g, mas não há magnetização remanente e o campo coercitivo é praticamente nulo quando se retira o campo.

Figura 20:Curva de magnetização obtida em temperatura ambiente do pó de PM seco a 70ºC.



A Figura 21 mostra as curvas de magnetização da suspensão de NLSM e NLS contendo PTX. A magnetização específica de saturação (σ_s) da NLSM é dada pela resultante entre o regime superparamagnético da PM encapsulada e a contribuição diamagnética dos componentes não magnéticos da formulação. Esta contribuição diamagnética é evidenciada pela medida da NLS sem PM. Tanto na amostra em suspensão quanto liofilizada (Figura 22) aparecem as contribuições diamagnéticas, mas estas são superadas pelas contribuições ferrimagnéticas das nanopartículas de magnetita e maghemita que para estas condições experimentais (volume, temperatura, tempo de medida, etc) encontram-se no regime superparamagnético, já que não há campo remanente e os valores de coercitividade são muito baixos. Além disso, a análise dos dados de magnetização específica de saturação (σ_s) permite calcular a fração volumétrica (ϕ) das nanopartículas encapsuladas na NLSM.

Figura 21: Curvas de magnetização obtidas à temperatura ambiente de suspensões NLSM (vermelho), NLS (verde) e o ajuste da magnetização sem a contribuição diamagnética (preto).

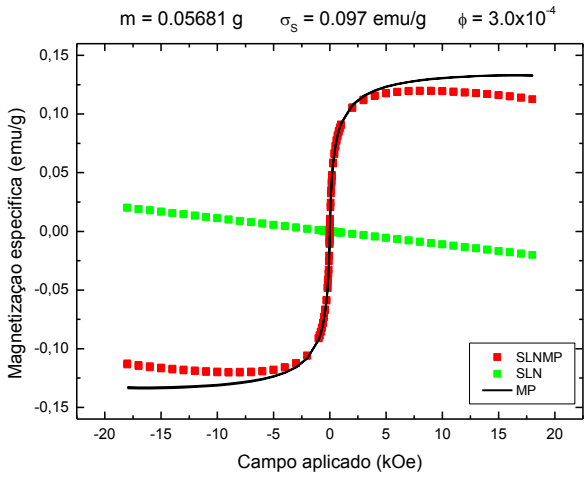
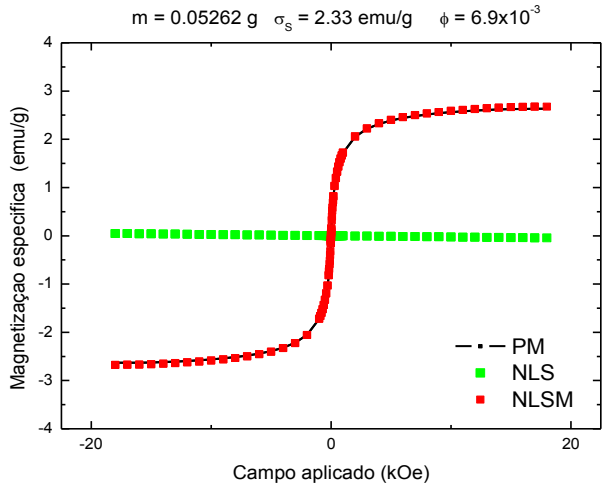


Figura 22: Curvas de magnetização obtidas à temperatura ambiente de liofilizado de NLSM (vermelho), NLS (verde) e o ajuste da magnetização sem a contribuição diamagnética (preto).



Para o nanocarreador em suspensão foi observada uma magnetização específica de saturação (σ_S) de 0,097emu/g e fração volumétrica (ϕ) da ordem de $3x10^{-4}$. Já o nanocarreador liofilizado, Figura 22, mostrou um aumento de aproximadamente 24 vezes dessa magnetização. Sendo encontrado σ_S = 2,33 emu/g, e $\phi = 6,9x10^{-3}$.

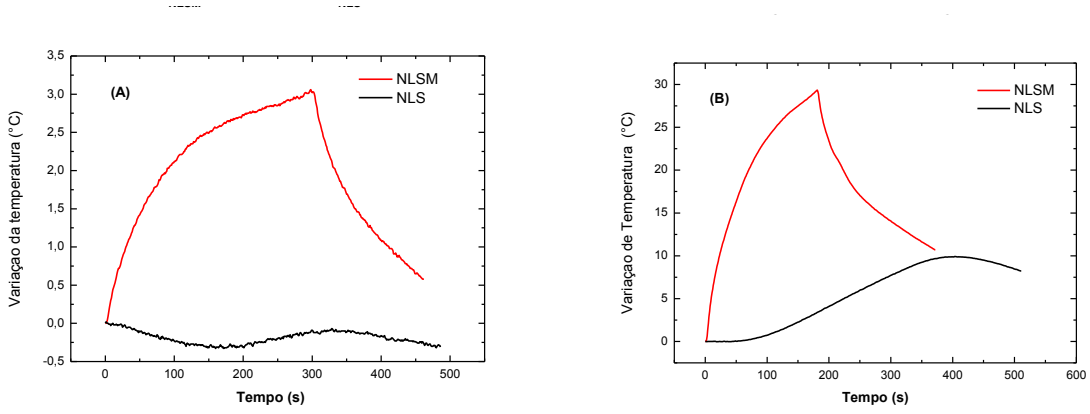
5.3 ESTUDO DE MAGNETOHIPERTERMIA (MH)

5.3.1 Avaliação do comportamento do nanossistema frente ao campo alternado

Como foi relatado na seção 2.4 nanopartículas magnéticas podem dissipar certa quantidade de calor quando estão sob a ação de um campo magnético alternado devido à perda por histerese. A proposta desse trabalho é utilizar esse calor para promover a fusão do lipídeo e a liberação do PTX encapsulado em NLSM.

Particularmente em um sistema de magnetohipertermia (Figura 6), além do calor gerado pelas PM há também o calor proveniente de todos os componentes do sistema como bobina e porta-amostra, que aquecem durante o experimento por efeitos que não são de magnetohipertermia, mas sim por outros efeitos como explicado na seção 2.4.1. Esses efeitos podem não ser ruins do ponto de vista da liberação do PTX, pois o aumento da temperatura do sistema leva a uma liberação mais rápida, como foi mostrado no item 9.1.4. Porém, para que consigamos provar o conceito de que a magnetohipertermia gera calor suficiente para a liberação do PTX é de suma importância separar os dois efeitos.

Figura 23: Evolução temporal da variação de temperatura de NLSM e NLS liofilizada submetida a um campo magnético alternado.

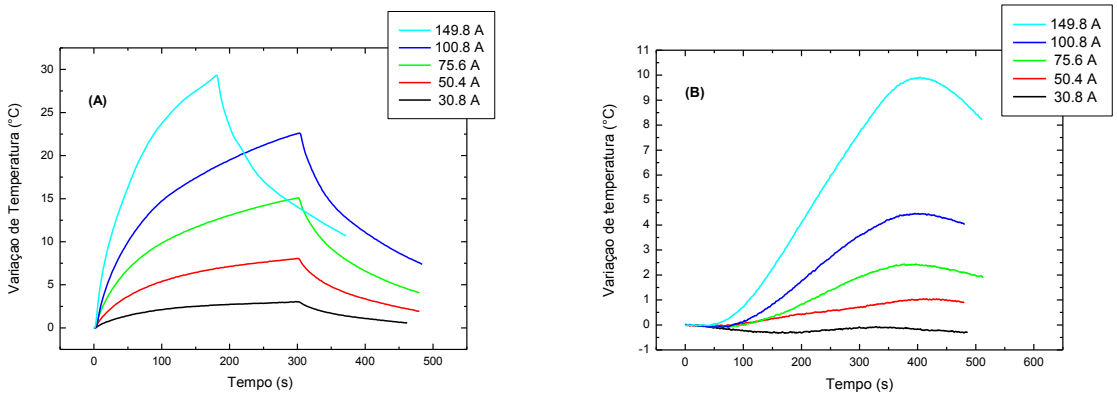


A Figura 23 (A) mostra a diferença no comportamento entre NLSM, que aquece por magnetohipertermia e NLS que não sofre interação com o campo gerado durante 300s para uma corrente de 30.8 A. Já na Figura 23 (B), onde há um aumento pronunciado do campo (corrente de 149,8A) surge um aquecimento que pode estar associado a correntes parasitas e transportes de calor da bobina e outros componentes do experimento, mostrando que, caso o campo seja aplicado por um

tempo prolongado, provavelmente haverá saturação do efeito de magnetohipertermia e nivelamento do aquecimento por efeito de outros tipos de transportes de calor.

Baseado nessas informações a intensidade do campo e o tempo necessário para gerar calor, especificamente por magnetohipertermia, foi otimizado. A Figura 24 (A) mostra o comportamento do calor gerado preferencialmente por magnetohipertermia, e a Figura 24 (B) mostra a variação de temperatura causada por transportes de calor de outros componentes do experimento.

Figura 24: Perfis de variação de temperatura de amostras liofilizadas de NLSM e NLS em campos gerados por diferentes correntes.

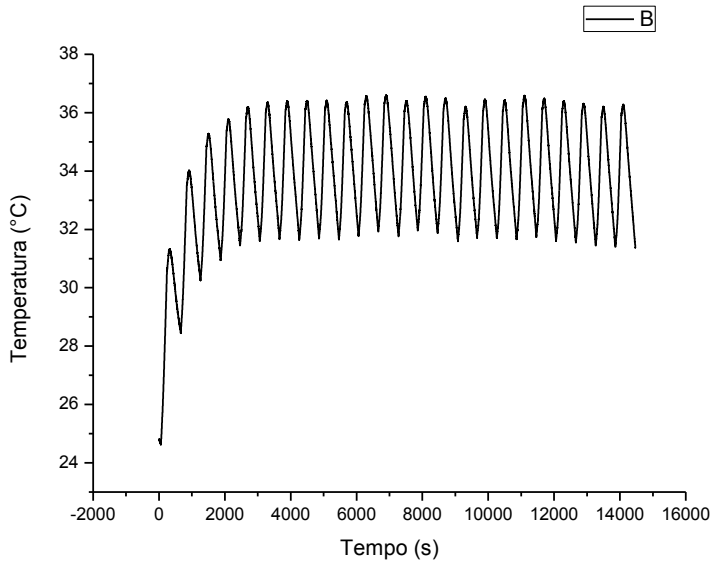


É possível observar, nos primeiros 200s do experimento, que a variação de temperatura provocada por magnetohipertermia é cerca de 7,5 vezes maior que o calor gerado por correntes parasitas e outros efeitos de transportes de calor. Esse dado sugere que a condição ideal para o experimento de liberação do PTX seja a aplicação de campos alternados em intervalos de no máximo 200s, já que esse objetivo é provar o conceito de liberação por magnetohipertermia, e não por efeitos adjacentes.

5.3.2 Estudo da liberação do paclitaxel via magnetohipertermia

Com base nos resultados apresentados no item anterior, o experimento de liberação do PTX por magnetohipertermia foi estabelecido na forma de aplicação de campo em pulsos de 180s, e intervalos de 420s para resfriamento do sistema na intenção de evitar ação de outros processos de aquecimento além da dissipação histerética.

Figura 25: Perfil de aquecimento de NLSM pela aplicação de 24 pulsos de 180s sob corrente alternada de 149.8 A seguida de resfriamento de 420s após cada pulso.

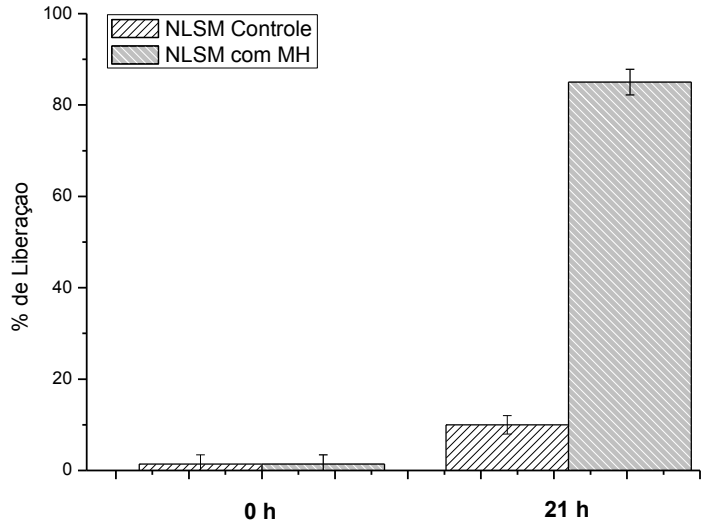


O estudo de liberação de PTX por ação de MH foi realizado seguindo o procedimento descrito na seção 4.3.6.2. Conforme mostra a Figura 25 a partir do quarto pulso, a amostra atingiu uma situação estacionária variando sua temperatura entre 31,5 e 36,5 ºC (média 34ºC).

Por se tratar de amostra em suspensão a temperatura medida pela sonda não condiz com a realidade dos centros de calor formado pelas nanopartículas magnéticas, já que a sonda ótica utilizada para aferição da temperatura mede o calor do meio. Neste caso, os centros de calor, representados pelas nanopartículas magnéticas devem atingir valores temperaturas próximas as da amostra liofilizada (Figura 24A curva azul claro. Corrente de 149.8A). Desta forma o mecanismo de liberação do PTX provavelmente se dê por transferência de calor do núcleo magnético que aquece em altas temperaturas (entre 50 e 55ºC) suficientes para provocar o amolecimento da matriz lipídica e a liberação do fármaco para o meio externo.

O gráfico da Figura 24 reafirma, pelo dado experimental, o conceito de que a MH desencadeia a liberação do PTX encapsulado em NLSM. É possível observar que para a alíquota da amostra controle (EL sem MH) há liberação de apenas 11% do PTX encapsulado em 21h, enquanto que a amostra tratada com campo alternado liberou cerca de 85% do fármaco encapsulado.

Figura 26: Ensaio de liberação do PTX por magnetohipertermia. A formulação de NLSM foi difidida em duas alíquotas e mantidas por 21h em repouso. Uma das alíquotas sofreu aplicação de pulsos de MH.



Apesar da quantificação pontual do PTX ter sido realisada em um intervalo de 21h é possível que a liberação tenha acontecido durante a aplicação do campo (4 primeiras horas) devido a diferença no percentual de PTX liberado. Para melhor elucidação desse mecanismo, já que esse trabalho visa continuidade, estudos complementares serão realizados com o intuito de otimizar o tempo e quantidade de pulsos necessários para que ocorra a liberação controlada do PTX.

6 CONCLUSÕES

Nanopartículas magnéticas foram sintetizadas e caracterizadas quanto ao diâmetro médio e distribuição de tamanho, bem como suas propriedades magnéticas e o perfil de aquecimento por magnetohipertermia.

As NLSM preparadas neste estudo foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio, morforlogia e distribuição de tamanho. Foi possível visualizar a forma esférica por técnica de AFM, e correlacionar o diâmetro médio e distribuição de tamanho pelas técnicas de AFM e DLS.

O estudo de liberação *in vitro* realizado em três temperaturas revelou que o perfil de liberação do paclitaxel neste sistema sofre marcada influência da temperatura na cinética de liberação.

Através do perfil de aquecimento por magnetohipertermia apresentado pelas NLSM foi possível definir o método de liberação do paclitaxel e inferir que essa técnica permitirá o controle da liberação do fármaco encapsulado neste sistema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ARIAS, F.; OTERO, J. M.; GUERRERO, C.; CARDONA, A. F.; VARGAS, C. A.; CARRANZA, H.; CASTRO, C.; MORA, M.; GUERRA, B.; OJEDA, K.; RAMÍREZ, H.; REVEIZ, L.; BIJELIC, L.; ZAPPA, L.; SUGARBAKER, P. Pseudomixoma peritoneal: primeros casos tratados en Colombia con peritonectomía radical y quimioterapia intraperitoneal hipertérmica. **Revista Colombiana de Cirugía,** v. 24, p. 184-194, 2009.

BANERJI, U.; KUCIEJEWSKA, A.; ASHLEY, S.; WALSH, G.; O'BRIEN, M.; JOHNSTON, S.; SMITH, I. Factors determining outcome after third line chemotherapy for metastatic breast cancer. **The Breast,** v. 16, n. 4, p. 359-366, 2007.

BANGHAM, A. D.; HORNE, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by. **Journal of molecular biology,** v. 8, p. 660-668, 1964.

BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, F.; EDELWEISS, M. I.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. O. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Letters,** v. 281, n. 1, p. 53-63, 2009.

BROWN, W. F. JR. Thermal Fluctuations of a Single-Domain Particle. **Physical Review,** v. 130, n. 5, p. 1677-1686, 1963.

BUCCHERI, G.; FERRIGNO, D. Second-line weekly paclitaxel in patients with inoperable non-small cell lung cancer who fail combination chemotherapy with cisplatin. **Lung Cancer,** v. 45, n. 2, p. 227-236, 2004.

CABUIL, V.; DUPUIS, V.; TALBOT, D.; NEVEU, S. Ionic magnetic fluid based on cobalt ferrite nanoparticles: Influence of hydrothermal treatment on the nanoparticle size. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials,** v. 323, n. 10, p. 1238-1241, 2011.

CAVALLI, R.; MOREL, S.; GASCO, M. R.; CHETONI, P.; SAETTONE, M. F. Preparation and evaluation in vitro of colloidal lipospheres containing pilocarpine as ion pair. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 117, n. 2, p. 243-246, 1995.

CIRSTOIU-HAPCA, A.; BUCHEGGER, F.; LANGE, N.; BOSSY, L.; GURNY, R.; DELIE, F. Benefit of anti-HER2-coated paclitaxel-loaded immuno-nanoparticles in the treatment of disseminated ovarian cancer: Therapeutic efficacy and biodistribution in mice. **Journal of Controlled Release,** v. 144, n. 3, p. 324-331, 2010.

CORCHERO, J. L.; VILLAVERDE, A. Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. **Trends in Biotechnology,** v. 27, n. 8, p. 468-476, 2009.

DADASHZADEH, S.; MIRAHMADI, N.; BABAEI, M. H.; VALI, A. M. Peritoneal retention of liposomes: Effects of lipid composition, PEG coating and liposome charge. **Journal of Controlled Release,** v. 148, n. 2, p. 177-186, 2010.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Research,** v. 68, n. 21, p. 8643-8653, 2008.

DÍAZ-LÓPEZ, R.; TSAPIS, N.; SANTIN, M.; BRIDAL, S. L.; NICOLAS, V.; JAILLARD, D.; LIBONG, D.; CHAMINADE, P.; MARSAUD, V.; VAUTHIER, C.; FATTAL, E. The performance of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent. **Biomaterials,** v. 31, n. 7, p. 1723-1731, 2010.

FADDA, P.; MONDUZZI, M.; CABOI, F.; PIRAS, S.; LAZZARI, P. Solid lipid nanoparticle preparation by a warm microemulsion based process: Influence of microemulsion microstructure. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 446, n. 1–2, p. 166-175, 2013.

FALK, M. H.; ISSELS, R. D. Hyperthermia in oncology. **International Journal of Hyperthermia,** v. 17, n. 1, p. 1-18, 2001.

FENG, S. S.; ZHAO, L.; ZHANG, Z.; BHAKTA, G.; YIN WIN, K.; DONG, Y.; CHIEN, S. Chemotherapeutic engineering: Vitamin E TPGS-emulsified nanoparticles of biodegradable polymers realized sustainable paclitaxel chemotherapy for 168 h in vivo. **Chemical Engineering Science,** v. 62, n. 23, p. 6641-6648, 2007.

GHADIRI, M.; VATANARA, A.; DOROUD, D.; ROHOLAMINI NAJAFABADI, A. Paromomycin loaded solid lipid nanoparticles: Characterization of production parameters. **Biotechnology and Bioprocess Engineering,** v. 16, n. 3, p. 617-623, 2011.

GONZALES, M.; KRISHNAN, K. M. Synthesis of magnetoliposomes with monodisperse iron oxide nanocrystal cores for hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials,** v. 293, n. 1, p. 265-270, 2005.

GREEN, M. R.; MANIKHAS, G. M.; ORLOV, S.; AFANASYEV, B.; MAKHSON, A. M.; BHAR, P.; HAWKINS, M. J. Abraxane®, a novel Cremophor®-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. **Annals of Oncology,** v. 17, n. 8, p. 1263-1268, 2006.

GUPTA, Y.; JAIN, A.; JAIN, S. K. Transferrin-conjugated solid lipid nanoparticles for enhanced delivery of quinine dihydrochloride to the brain. **Journal of Pharmacy and Pharmacology,** v. 59, n. 7, p. 935-940, 2007.

GYERGYEK, S.; MAKOVEC, D.; DROFENIK, M. Colloidal stability of oleic- and ricinoleic-acid-coated magnetic nanoparticles in organic solvents. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 354, n. 2, p. 498-505, 2011.

HAO, R.; XING, R.; XU, Z.; HOU, Y.; GAO, S.; SUN, S. Synthesis, Functionalization, and Biomedical Applications of Multifunctional Magnetic Nanoparticles. **Advanced Materials,** v. 22, n. 25, p. 2729-2742, 2010.

HASHIDA, N.; OHGURO, N.; YAMAZAKI, N.; ARAKAWA, Y.; OIKI, E.; MASHIMO, H.; KUROKAWA, N.; TANO, Y. High-efficacy site-directed drug delivery system using sialyl-Lewis X conjugated liposome. **Experimental Eye Research,** v. 86, n. 1, p. 138-149, 2008.

HERGT, R.; ANDRA, W.; D'AMBLY, C. G.; HILGER, I.; KAISER, W. A.; RICHTER, U.; SCHMIDT, H. G. Physical limits of hyperthermia using magnetite fine particles. **Magnetics, IEEE Transactions on,** v. 34, n. 5, p. 3745-3754, 1998.

HUHMANN, M. B.; CUNNINGHAM, R. S. Importance of nutritional screening in treatment of cancer-related weight loss. **The Lancet Oncology,** v. 6, n. 5, p. 334-343, 2005.

IMAIZUMI, M. Postoperative adjuvant cisplatin, vindesine, plus uracil-tegafur chemotherapy increased survival of patients with completely resected p-stage I non-small cell lung cancer. **Lung Cancer,** v. 49, n. 1, p. 85-94, 2005.

IYER, A. K.; KHALED, G.; FANG, J.; MAEDA, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. **Drug Discovery Today,** v. 11, n. 17–18, p. 812-818, 2006.

JAFARI, T.; SIMCHI, A.; KHAKPASH, N. Synthesis and cytotoxicity assessment of superparamagnetic iron–gold core–shell nanoparticles coated with polyglycerol. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 345, n. 1, p. 64-71, 2010.

JILES, D. C. Frequency dependence of hysteresis curves in 'non-conducting' magnetic materials. **Magnetics, IEEE Transactions on,** v. 29, n. 6, p. 3490-3492, 1993.

JILES, D. C. Modelling the effects of eddy current losses on frequency dependent hysteresis in electrically conducting media. **Magnetics, IEEE Transactions on,** v. 30, n. 6, p. 4326-4328, 1994.

JOHANNSEN, M.; THIESEN, B.; GNEVECKOW, U.; TAYMOORIAN, K.; WALDÖFNER, N.; SCHOLZ, R.; DEGER, S.; JUNG, K.; LOENING, S. A.; JORDAN, A. Thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external radiation in an orthotopic rat model of prostate cancer. **The Prostate,** v. 66, n. 1, p. 97-104, 2006.

JORDAN, A.; SCHOLZ, R.; WUST, P.; FÄHLING, H.; ROLAND, F. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials,** v. 201, n. 1–3, p. 413-419, 1999.

JÓZEFCZAK, A.; SKUMIEL, A. Study of heating effect and acoustic properties of dextran stabilized magnetic fluid. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials,** v. 311, n. 1, p. 193-196, 2007.

KAMANGAR, F.; DORES, G. M.; ANDERSON, W. F. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce

Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. **Journal of Clinical Oncology,** v. 24, n. 14, p. 2137-2150, 2006.

LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; YAMAMOTO, H.; SCHÄFER, U.; TAKEUCHI, H.; LEHR, C. M.; MAINCENT, P.; KAWASHIMA, Y. Design of rolipram-loaded nanoparticles: comparison of two preparation methods. **Journal of Controlled Release,** v. 71, n. 3, p. 297-306, 2001.

LANDI, G. T.; BAKUZIS, A. F. On the energy conversion efficiency in magnetic hyperthermia applications: A new perspective to analyze the departure from the linear regime. **Journal of Applied Physics,** v. 111, n. 8, p. 083915-083915-8, 2012.

LEE, M. K.; LIM, S. J.; KIM, C. K. Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxel-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles. **Biomaterials,** v. 28, n. 12, p. 2137-2146, 2007.

LI, G. Y.; JIANG, Y. R.; HUANG, K. L.; DING, P.; CHEN, J. Preparation and properties of magnetic Fe_3O_4 –chitosan nanoparticles. **Journal of Alloys and Compounds,** v. 466, n. 1–2, p. 451-456, 2008.

LI, Z.; KAWASHITA, M.; ARAKI, N.; MITSUMORI, M.; HIRAOKA, M.; DOI, M. Magnetite nanoparticles with high heating efficiencies for application in the hyperthermia of cancer. **Materials Science and Engineering: C,** v. 30, n. 7, p. 990-996, 2010.

LIANG, X. J.; CHEN, C.; ZHAO, Y.; WANG, P. Circumventing Tumor Resistance to Chemotherapy by Nanotechnology. In: ZHOU, J. (Ed.). **Multi-Drug Resistance in Cancer**: Humana Press, v.596, 2010. cap. 21, p. 467-488. (Methods in Molecular Biology). ISBN 978-1-60761-415-9.

LIU, G.; HONG, R. Y.; GUO, L.; LI, Y. G.; LI, H. Z. Preparation, characterization and MRI application of carboxymethyl dextran coated magnetic nanoparticles. **Applied Surface Science,** v. 257, n. 15, p. 6711-6717, 2011.

LOVE, R. R.; LEVENTHAL, H.; EASTERLING, D. V.; NERENZ, D. R. Side effects and emotional distress during cancer chemotherapy. **Cancer,** v. 63, n. 3, p. 604-612, 1989.

MAEDA, H.; WU, J.; SAWA, T.; MATSUMURA, Y.; HORI, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **Journal of Controlled Release,** v. 65, n. 1–2, p. 271-284, 2000.

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; DE ALMEIDA SANTANA, D. C.; TAVEIRA, S. F.; VERMEULEN, D. M.; MORAES DE OLIVEIRA, A. R.; DA SILVA, R. S.; LOPEZ, R. F. V. Development of nitrosyl ruthenium complex-loaded lipid carriers for topical administration: improvement in skin stability and in nitric oxide release by visible light irradiation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 53, n. 4, p. 843-851, 2010.

MEENACH, S. A.; HILT, J. Z.; ANDERSON, K. W. Poly(ethylene glycol)-based magnetic hydrogel nanocomposites for hyperthermia cancer therapy. **Acta Biomaterialia,** v. 6, n. 3, p. 1039-1046, 2010.

MEEROD, S.; TUMCHARERN, G.; WICHAI, U.; RUTNAKORNPITUK, M. Magnetite nanoparticles stabilized with polymeric bilayer of poly(ethylene glycol) methyl ether–poly(ε-caprolactone) copolymers. **Polymer,** v. 49, n. 18, p. 3950-3956, 2008.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 47, n. 2–3, p. 165-196, 2001.

MIAO, J.; DU, Y. Z.; YUAN, H.; ZHANG, X. G.; HU, F. Q. Drug resistance reversal activity of anticancer drug loaded solid lipid nanoparticles in multi-drug resistant cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 110, n. 0, p. 74-80, 2013.

MILECKI, P.; NAWROCKI, S.; SKONECZNA, I.; KWIAS, Z. Treatment of bladder cancer: the present and the future. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy,** v. 8, n. 1, p. 25-32, 2003.

MING-HUANG, H.; CHUNG-YU, L.; YU-CHUAN, S. Magnetic solid lipid nanoparticles as mediators for controlled hyperthermia. Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, 2008. NEMS 2008. 3rd IEEE International Conference on, 2008. 6-9 Jan. 2008. p.788-791.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 385, n. 1–2, p. 113-142, 2010.

MÜLLER, R. H.; MAAEN, S.; WEYHERS, H.; SPECHT, F.; LUCKS, J. S. Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 138, n. 1, p. 85-94, 1996.

MULLER, R. H.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. S.; SCHWARZ, C.; ZUR MUHLEN, A.; WEYHERS, H.; FREITAS, C.; RUHL, D. Solid lipid nanoparticles (SLN) - An alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 41, n. 1, p. 62-69, 1995.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 242, n. 1–2, p. 121-128, 2002.

NORDLINGER, B.; VAN CUTSEM, E.; ROUGIER, P.; KÖHNE, C.-H.; YCHOU, M.; SOBRERO, A.; ADAM, R.; ARVIDSSON, D.; CARRATO, A.; GEORGOULIAS, V.; GIULIANTE, F.; GLIMELIUS, B.; GOLLING, M.; GRUENBERGER, T.; TABERNERO, J.; WASAN, H.; POSTON, G. Does chemotherapy prior to liver resection increase the potential for cure in patients with metastatic colorectal cancer? A report from the European Colorectal Metastases Treatment Group. **European Journal of Cancer,** v. 43, n. 14, p. 2037-2045, 2007.

OLIVEIRA, R. R.; FERREIRA, F. S.; CINTRA, E. R.; BRANQUINHO, L. C.; BAKUZIS, A. F.; LIMA, E. M. Magnetic Nanoparticles and Rapamycin Encapsulated into Polymeric Nanocarriers. **Journal of Biomedical Nanotechnology,** v. 8, n. 2, p. 193-201, 2012.

PANG, X. J.; ZHOU, J.; CHEN, J. J.; YU, M. H.; CUI, F. D.; ZHOU, W. L. Synthesis of Ibuprofen Loaded Magnetic Solid Lipid Nanoparticles. **Magnetics, IEEE Transactions on,** v. 43, n. 6, p. 2415-2417, 2007.

PARK, J. H.; LEE, S.; KIM, J. H.; PARK, K.; KIM, K.; KWON, I. C. Polymeric nanomedicine for cancer therapy. **Progress in Polymer Science,** v. 33, n. 1, p. 113-137, 2008.

PELTIER, S.; OGER, J. M.; LAGARCE, F.; COUET, W.; BENOÎT, J. P. Enhanced Oral Paclitaxel Bioavailability After Administration of Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules. **Pharmaceutical Research,** v. 23, n. 6, p. 1243-1250, 2006.

PEREZ, C.; SANCHEZ, A.; PUTNAM, D.; TING, D.; LANGER, R.; ALONSO, M. J. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. **Journal of Controlled Release,** v. 75, n. 1–2, p. 211-224, 2001.

PINTO REIS, C.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine,** v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

RANG, H. P. D., M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Farmacologia. **Elsevier,** v. 5, 2003.

ROSENSWEIG, R. E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials,** v. 252, p. 370-374, 2002.

RUTNAKORNPITUK, M.; MEEROD, S.; BOONTHA, B.; WICHAI, U. Magnetic core-bilayer shell nanoparticle: A novel vehicle for entrapmentof poorly water-soluble drugs. **Polymer,** v. 50, n. 15, p. 3508-3515, 2009.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics,** v. 157, n. 2, p. 171-179, 1997.

SHAFIQ, J.; BARTON, M.; NOBLE, D.; LEMER, C.; DONALDSON, L. J. An international review of patient safety measures in radiotherapy practice. **Radiotherapy and Oncology,** v. 92, n. 1, p. 15-21, 2009.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 154, n. 2, p. 123-140, 1997.

SHEN, J.; SUN, H.; XU, P.; YIN, Q.; ZHANG, Z.; WANG, S.; YU, H.; LI, Y. Simultaneous inhibition of metastasis and growth of breast cancer by co-delivery of twist shRNA and paclitaxel using pluronic P85-PEI/TPGS complex nanoparticles. **Biomaterials,** v. 34, n. 5, p. 1581-1590, 2013.

SHUBAYEV, V. I.; PISANIC II, T. R.; JIN, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 61, n. 6, p. 467-477, 2009.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians,** v. 62, n. 1, p. 10-29, 2012.

SILVA, A. C.; GONZÁLEZ-MIRA, E.; GARCÍA, M. L.; EGEA, M. A.; FONSECA, J.; SILVA, R.; SANTOS, D.; SOUTO, E. B.; FERREIRA, D. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 86, n. 1, p. 158-165, 2011.

SILVÉRIO, C. A. **Eletromagnetismo**. 1. Rio de Janeiro: 2001.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release,** v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.

SOUZA, L. G.; SILVA, E. J.; MARTINS, A. L. L.; MOTA, M. F.; BRAGA, R. C.; LIMA, E. M.; VALADARES, M. C.; TAVEIRA, S. F.; MARRETO, R. N. Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 79, n. 1, p. 189-196, 2011.

SOUZA, M. V. N. D. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova,** v. 27, p. 308-312, 2004.

SUBEDI, R. K.; KANG, K. W.; CHOI, H. K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 37, n. 3–4, p. 508-513, 2009.

SYLVESTER, J. E.; GRIMM, P. D.; BLASKO, J. C.; MILLAR, J.; ORIO III, P. F.; SKOGLUND, S.; GALBREATH, R. W.; MERRICK, G. 15-Year biochemical relapse free survival in clinical Stage T1-T3 prostate cancer following combined external beam radiotherapy and brachytherapy; Seattle experience. **International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics,** v. 67, n. 1, p. 57-64, 2007.

TROMBINO, S.; CASSANO, R.; FERRARELLI, T.; BARONE, E.; PICCI, N.; MANCUSO, C. Trans-ferulic acid-based solid lipid nanoparticles and their antioxidant effect in rat brain microsomes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 109, n. 0, p. 273-279, 2013.

VASSARD, D.; OLSEN, M. H.; ZINCKERNAGEL, L.; VIBE-PETERSEN, J.; DALTON, S. O.; JOHANSEN, C. Psychological consequences of lymphoedema associated with breast cancer: A prospective cohort study. **European Journal of Cancer,** v. 46, n. 18, p. 3211-3218, 2010.

VERDE, E. L.; LANDI, G. T.; CARRIAO, M. S.; DRUMMOND, A. L.; GOMES, J. A.; VIEIRA, E. D.; SOUSA, M. H.; BAKUZIS, A. F. Field dependent transition to the non-linear regime in magnetic hyperthermia experiments: Comparison between maghemite, copper, zinc, nickel and cobalt ferrite nanoparticles of similar sizes. **AIP Advances,** v. 2, n. 3, p. 032120, 2012.

VERDE, E. L.; LANDI, G. T.; GOMES, J. A.; SOUSA, M. H.; BAKUZIS, A. F. Magnetic hyperthermia investigation of cobalt ferrite nanoparticles: Comparison between experiment, linear response theory, and dynamic hysteresis simulations. **Journal of Applied Physics,** v. 111, n. 12, p. 123902-123902-8, 2012.

VIDEIRA, M.; ALMEIDA, A. J.; FABRA, À. Preclinical evaluation of a pulmonary delivered paclitaxel-loaded lipid nanocarrier antitumor effect. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine,** v. 8, n. 7, p. 1208-1215, 2012.

WANG, J. Z.; LI, X. A. Evaluation of external beam radiotherapy and brachytherapy for localized prostate cancer using equivalent uniform dose. **Medical physics,** v. 30, n. 1, p. 34-40, 2003.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 56, n. 9, p. 1257-1272, 2004.

YU, W.; ZHANG, T.; ZHANG, J.; QIAO, X.; YANG, L.; LIU, Y. The synthesis of octahedral nanoparticles of magnetite. **Materials Letters,** v. 60, n. 24, p. 2998-3001, 2006.

ZHOU, J.; LEUSCHNER, C.; KUMAR, C.; HORMES, J. F.; SOBOYEJO, W. O. Sub-cellular accumulation of magnetic nanoparticles in breast tumors and metastases. **Biomaterials,** v. 27, n. 9, p. 2001-2008, 2006.

ZHU, W.; MASAKI, T.; CHEUNG, A. K.; KERN, S. E. **In-vitro Release of Rapamycin from a Thermosensitive Polymer for the Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation**. 2009. 3-12 ISBN 0975-0851. Disponível em: < http://www.biomedsearch.com/nih/In-vitro-Release-Rapamycin-from/20190878.html >.