

Maria João Rodrigues de Sousa Cardoso

Nanopartículas de lecitina revestidas de polissacarídeos para o aumento da biodisponibilidade oral de antineoplásicos.

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde / Escola Superior de Saúde

Porto, 2009

Maria João Rodrigues de Sousa Cardoso

Nanopartículas de lecitina revestidas de polissacarídeos para o aumento da biodisponibilidade oral de antineoplásicos.

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde / Escola Superior de Saúde

Porto, 2009

Maria João Rodrigues de Sousa Cardoso

Nanopartículas de lecitina revestidas de polissacarídeos para o aumento da biodisponibilidade oral de antineoplásicos.

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de licenciada em Ciências Farmacêuticas.

Glossário

Siglas

DLS - *Dynamic Light Scattering*

PALS - *Phase Analysis Light Scattering*

TEM - *Transmission Electronic Microscopy*

ADN - *Ácido DesoxirriboNucleico*

FDA - *Food and Drug Administration*

SEM - *Scanning Electron Microscopy*

PALS - *Phase Analysis Light Scattering*

EE - *Eficácia da Encapsulação*

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

Sumário

O desenvolvimento de diversas estratégias terapêuticas para administração oral de substâncias antitumorais tem registado resultados interessantes no tratamento de certos tumores. Todavia, muitas destas substâncias têm características limitantes, como por exemplo, o facto de serem absorvidas de forma incompleta e pouco reprodutível ao nível do tracto gastrointestinal.

A produção de micro e nanopartículas, nas quais o fármaco antitumoral é encapsulado e veiculado, parece ser uma alternativa promissora, pois promovem uma melhor absorção da dose ou, em alternativa, direccionam-se para o sistema linfático. Desta forma, garante-se um melhor controlo da concentração do fármaco ao nível sanguíneo, bem como o seu efeito terapêutico, a isto se acresce uma melhor adesão do doente à terapia.

O estudo, que se apresenta nesta monografia, teve como objectivo a preparação de um pó, constituído por nano e micropartículas contendo um fármaco anti-tumoral, designadamente, o Tamoxifeno, passível de ser administrado oralmente, de forma a otimizar a biodisponibilidade e /ou favorecendo a captação do fármaco pelo sistema linfático. A formulação estudada permite a dispersão do fármaco em matrizes poliméricas e lipídicas, formando um vector de dimensões submicrométricas e com estrutura matricial. É de salientar o facto de os polímeros e lipídeos favorecem a biodisponibilidade do Tamoxifeno, permitindo controlar o local e a sua velocidade de libertação.

Inicialmente procedeu-se à produção e caracterização das nano e micropartículas e, posteriormente à produção de um pó, de forma a tornar o fármaco passível de ser administrado oralmente.

As nanopartículas, contendo o Tamoxifeno, foram preparadas utilizando um polissacarídeo (quitosano) como sistema matricial e por um fosfolípideo (lecitina) como agente tensioactivo. A produção foi feita através da injeção de 8 ml de uma solução metanólica de lecitina (25 mg/ml) e Tamoxifeno (0-1,2 mg/ml) numa solução diluída de quitosano (0,1% m/m, 103 cPs e com grau de desacetilação de 95%). As nanopartículas obtidas foram caracterizadas segundo a sua dimensão e carga eléctrica de superfície através da técnica de análise dimensional

usando *Dynamic Light Scattering* (DLS) e *Phase Analysis Light Scattering* (PALS). Verificou-se que, à medida que se aumentava a concentração de Tamoxifeno, evidenciava-se uma diminuição da dimensão das nanopartículas de valores de aproximadamente 300 nm (para uma concentração de Tamoxifeno de 50 $\mu\text{g/ml}$) para pouco mais de 100 nm (para concentrações acima de 200 $\mu\text{g/ml}$). Já no que respeita à carga eléctrica de superfície, esta permanecia constante, positiva e acima de 25 mV. Relativamente à análise das características morfológicas das nanopartículas, na análise por *Transmission Electronic Microscopy* (TEM), observou-se uma estrutura multilaminar que não era distinguível nos sistemas desprovidos de fármaco. A melhor eficácia de encapsulação (80% m/m) foi registada para uma concentração de Tamoxifeno baixa (50 $\mu\text{g/ml}$). Foi então possível verificar que, com o aumento da concentração do fármaco, ocorre uma redução da eficácia de encapsulação para valores que rondavam os 50%. Já para a determinação da capacidade de carga de fármaco foi registado um aumento para valores superiores a 25%.

*É com o carinho que dedico a minha
Monografia à minha “**Pequenina**” a minha
irmã Filipa Rodrigues Sousa Cardoso*

Agradecimentos

Aos meus pais, Esperança Cardoso e José Cardoso pelo amor, pela confiança e apoio que me deram, não só durante estes anos de Licenciatura mas ao longo da vida.

À minha irmã Filipa Cardoso que, apesar dos seus seis anos, me proporcionou aprendizagens, vivências e momentos que só são passíveis de serem sentidos e não descritos.

Aos meus avós e restante família pelo carinho demonstrado e por acreditarem em mim.

Ao meu namorado, André Vila Real, pelo apoio, ajuda, amizade e carinho demonstrado ao longo deste tempo.

À minha amiga, Rita Cunha, pela amizade, companheirismo e presença constantes. Pela experiência de vida partilhada, que em muito contribuiu para a minha formação como pessoa.

Aos meus grandes amigos Joana Costa, Miguel Alves e José Alberto pelo carinho, disponibilidade e amizade que contribuiu bastante para a conclusão desta Licenciatura.

Aos Professores desta Faculdade, que hoje preservo como amigos, pela enorme ajuda e disponibilidade sempre prestada.

À Professora Doutora Eliana Souto, orientadora deste trabalho, por me ter guiado até aqui e pela sua ajuda, ideias e críticas construtivas a este documento.

Índice

I Introdução.....	12
II Material e Métodos.....	22
1 Material.....	22
1.1 Quitosano.....	22
1.2 Lecitina.....	22
1.3 Citrato de Tamoxifeno (C ₃₂ H ₃₇ NO ₈).....	22
1.4 Outros reagentes.....	22
2 Métodos.....	23
2.1 Preparação da solução de lecitina/metanol (25mg/ml).....	23
2.2 Preparação da solução de quitosano a 1%.....	23
2.3 Preparação das nanopartículas de lecitina/quitosano.....	23
2.4 Preparação das nanopartículas de lecitina/quitosano contendo Citrato de Tamoxifeno.....	24
2.5 Pó obtido por secagem em leite fluido.....	24
2.6 Análise do Sistema Coloidal.....	27
2.6.1 Análise dimensional usando Dispersão Dinâmica de Luz (DLS).....	27
2.6.2 Potencial Zeta (ζ).....	31
2.6.3 Análise por Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM).....	33
2.7 Caracterização das nanopartícula.....	35
2.7.1 Dimensão e Potencial Zeta.....	35
2.7.2 Eficácia de Encapsulamento (EE%) e Análise da capacidade de carga do citrato de Tamoxifeno.....	36
2.7.3 Quantificação do citrato de Tamoxifeno usando a Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).....	37
III Resultados e Discussão.....	38
IV Conclusão.....	43
VBibliografia.....	44

Índice de Gráficos

Gráfico 1- Intensidade da variação da dispersão da luz dinâmica em função do Tempo.....	28
Gráfico 2- Representativo da função de autocorrelação.....	29
Gráfico 3 - Representativo dos valores de Γ	30
Gráfico 4 - Representativo da curva de calibração para o citrato de Tamoxifeno.....	37
Gráfico 5 – Correlação entre a variação da Dimensão e Potencial Zeta em função da concentração de Tamoxifeno.....	39
Gráfico 6 - Eficácia de Encapsulação (%) e capacidade de carga (%) das nanopartículas dependendo da concentração de citrato de Tamoxifeno.....	41

Índice de Figuras

Figura 1 - Exemplos das diferentes formas farmacêuticas: (A) esfera (sistema matricial) e (B) cápsula (sistema reservatório).....	16
Figura 2 - Estrutura do Tamoxifeno e os seus principais metabolitos.....	18
Figura 3 - Estrutura química da lecitina.....	20
Figura 4 - Estrutura química do quitosano.....	20
Figura 5 - Trajecto dos electrões no microscópio electrónico de varrimento (SEM).....	26
Figura 6 - Demonstração esquemática do Potencial Zeta.....	32
Figura 7 - Esquema representativo do trajecto dos electrões (em amarelo) através do microscópio electrónico de transmissão (TEM).....	35
Figura 8 - Imagens TEM das nanopartículas sem citrato de Tamoxifeno.....	39
Figura 9 - Imagens TEM das nanopartículas contendo citrato de Tamoxifeno.....	40
Figura 10 - Representativas do Sistema Coloidal.....	42
Figura 11 - Nanopartículas observadas através de SEM.....	42

I. Introdução

Embora ainda não tenham revolucionado inteiramente o nosso quotidiano, os nanomateriais são os componentes chaves no mercado futuro da alta tecnologia. Assim sendo, a nanotecnologia é a ciência, engenharia e manufactura de sistemas de tamanho nano ($1\text{nm} = 10^{-9}$ metros ou 1 bilionésimo de metro) que podem desempenhar funções específicas como eléctricas, mecânicas, biológicas, químicas ou tarefas computacionais (Sahoo et al., 2003).

A investigação científica, no âmbito da Nanotecnologia, tem criado grande interesse no mundo dos materiais e das ciências da vida surgindo, conseqüentemente, o termo Nanobiotecnologia. Desta forma, a Nanobiotecnologia tornou-se, nos últimos anos, numa importante técnica para o progresso e desenvolvimento, no que respeita ao tratamento de diversas doenças mais severas, como os tumores malignos. (Felt et al., 1998).

A tecnologia de libertação controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares, e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana. Assim, a aplicação da Nanotecnologia Farmacêutica é especialmente interessante quando usada em formulações orais, uma vez que aumentam a sua biodisponibilidade sem qualquer tipo de alteração da estrutura química do fármaco. Assim, o uso de preparações coloidais, nas quais o fármaco é encapsulado e vectorizado, aumentam a modificação da absorção e conseqüente distribuição do fármaco melhorando a sua biodisponibilidade, na maioria dos casos este tipo de tecnologia tem ainda associada a vantagem de solucionar problemas relacionados com a toxicidade e estabilidade do fármaco. Adicionalmente, tem sido descrito que, após a administração oral de nanopartículas, estas são absorvidas. Esta forma de absorção pode ocorrer de três formas distintas, designadamente: (i) pelas células gastrointestinais, ou seja, células M existentes nos nódulos linfáticos que se encontram nas placas de peyer (o mecanismo pelo qual isto acontece ainda não se encontra perfeitamente esclarecido); (ii) por passagem intracelular através dos enterócitos; (iii) por passagem paracelular entre os enterócitos (Sonvico et al., 2006; Brannon-Peppas et al., 2004)

As perspectivas para esta via são, certamente, promissoras especialmente se tivermos em atenção os fármacos que são sensíveis à degradação química e/ou enzimática como, ADN, peptídeos, proteínas macromoléculas e moléculas fotossensíveis para os quais a administração

por via oral não era considerada como opção devido aos valores de biodisponibilidade visivelmente reduzidos. Neste caso, a encapsulação do Tamoxifeno em nanopartículas pode proporcionar uma maior resistência à absorção uma vez que vai ser “mascarado” escapando, assim, ao ataque químico e enzimático que ocorre a nível gastrointestinal. Desta forma, consegue-se atingir um aumento da sua concentração a nível plasmático. Aumentando a absorção gastrointestinal é previsível que ocorra, também um aumento da biodisponibilidade do Tamoxifeno quando libertado pelas nanopartículas (Memisoglu-Bilensoy et al, 2005; Chawala et al, 2006).

Os novos sistemas de Libertação Controlada de Fármaco (também designado de Vectorização ou *Drug Delivery*) combinam várias áreas como é o caso da ciência polimérica, farmacêutica, química de bioconjugação e biologia molecular. Assim, a utilização destes sistemas de libertação controlada de fármacos envolvem um vasto campo de estudos e tem reunido muitos esforços na área das nanopartículas. Estes esforços estão representados pelas novas estratégias para a vectorização de fármacos, os quais incluem aplicações importantes da ciência de polímeros e de soluções de agente tensoactivo e a preparação de espécies coloidais, administração de vacinas de ADN, além da utilização de técnicas transdérmicas (Jung et al, 2000; Zhang et al, 2004).

O desenvolvimento deste tipo de sistemas tem como principal objectivo manter a concentração do fármaco entre dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem. Assim sendo, melhoram-se e controlam-se problemas relacionados com a farmacocinética, farmacodinâmica, toxicidade não específica (pois esta diminui significativamente apesar do maior tempo de permanência na circulação) imunogenicidade e bioreconhecimento dos fármacos. Consequentemente, melhora a sua eficácia devido a uma libertação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz. É ainda de salientar que este tipo de sistemas permite o uso de veículos com uma natureza e composição variada e, ao contrário do que se poderia esperar, não há predominio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bio-inactivação prematura), a sua administração é considerada segura (sem reacções inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses) (Brannon-Peppas et al., 2004; Panyam et al., 2003) .

Adicionalmente, os sistemas de Vectorização e Veiculação de fármacos (este último também conhecido como *Targetting*) que têm sido desenvolvidos permitem reduzir, significativamente, a degradação e/ou perda de fármaco levando, desta forma, a uma diminuição dos efeitos secundários, reacções adversas e promovendo um aumento da sua biodisponibilidade. Os sistemas de transporte de fármacos, também recorrentemente designados de *Drug Carriers*, incluem vários sistemas, nomeadamente, micro e nanopartículas, micro e nanocápsulas, lipoproteínas, lipossomas e micelas, as quais se tornam susceptíveis de serem arquitectadas de forma a sofrerem uma degradação lenta, reagirem a um estímulo ou até mesmo tornarem-se específicas para determinado local. Relativamente aos mecanismos de veiculação, estes podem ainda ser subdivididos em passivos e activos. Neste projecto foi utilizada a estratégia passiva, ou seja, foi preterida uma acumulação do agente quimioterapêutico na massa tumoral, que teve por base as diferenças de vascularização existente neste tipo de tecido quando comparado com o tecido saudável. (Jung et al, 2000; Zhang et al, 2004)

O termo nanopartículas aplicado à libertação controlada de fármacos é amplo e refere-se a dois tipos de estruturas diferentes, nanoesferas e nanocápsulas, ambas com notável capacidade de absorção e/ou encapsulação de determinado fármaco, protegendo-o tanto da degradação química como enzimática (fig.1). No que respeita às nanocápsulas, estas constituem os chamados sistemas do tipo reservatório, onde é possível identificar-se um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. Neste caso, a substância encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo. Contrariamente, denominam-se nanoesferas aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica. Desta forma, obtém-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado (Avgoustakis et al., 2002; Chandy et al.,1993; Couvreur et al., 1996).

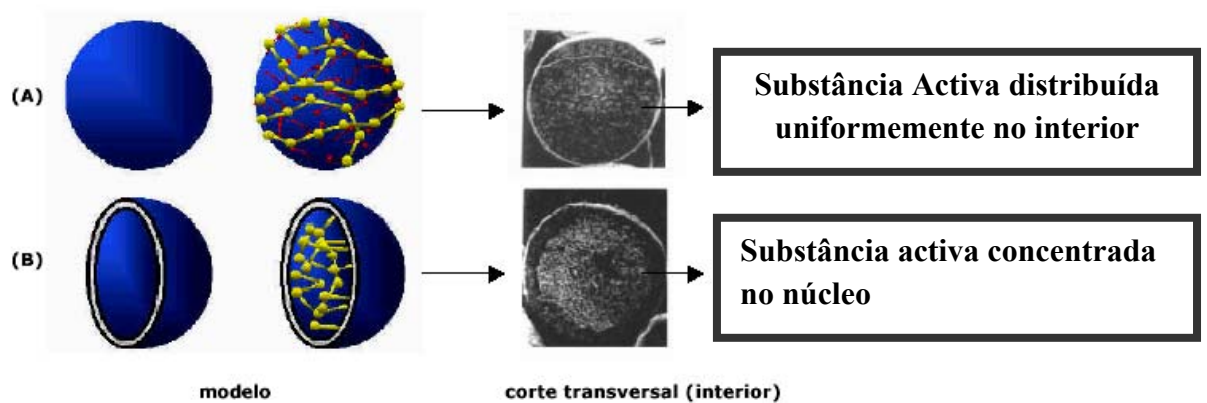


Figura 1: Exemplos das diferentes formas farmacêuticas: (A) esfera (sistema matricial) e (B) cápsula (sistema reservatório).

As nanopartículas produzidas recorrendo-se a polímeros biodegradáveis e, posteriormente, administradas via *per os* têm sido alvo de interesse em vários estudos, especialmente, no que respeita à libertação controlada de fármaco. Este tipo de libertação promove o direccionamento do fármaco a locais-alvo específicos do organismo uma vez que não é reconhecido por macrófagos do sistema reticuloendotelial de defesa (dependendo de algumas modificações da superfície) (Brigger et al., 2002).

Apesar de se considerar a via oral como a principal forma de administração de fármacos (por ter uma elevada aceitabilidade e adesão por parte do doente), esta possui desvantagens, muitas vezes incontornáveis, como a ineficaz e a não eficiente acção dos mesmos. Assim sendo, a dificuldade em atravessar a superfície das mucosas e /ou membranas biológicas, a hidrólise ácida estomacal, a degradação enzimática, entre outras, são alguns dos exemplos que condicionam, à partida, o êxito da terapia. A aposta na nanotecnologia tem, então, como intuito colmatar estas inviabilidades, uma vez que esta via tem, também, vantagens como o baixo custo quer na manufacturação quer na administração. O uso desta via levanta questões quanto à biodegradabilidade das nanopartículas no organismo humano. Se a matriz polimérica não se degrada *in vivo*, deverá ser, por isso, cirurgicamente removida, implicando um alto custo e risco para o doente. Assim, as matrizes poliméricas biodegradáveis são biocompatíveis, isto é, degradam-se *in vivo* em fragmentos menores que podem ser excretados pelo corpo. Estes produtos de degradação não são tóxicos, e não devem criar qualquer resposta inflamatória. Outra característica importante é a sua degradação ocorrer num

razoável período de tempo, requerido pela aplicação (Brigger et al., 2002; Sonvico et al., 2006; Brannon-Peppas et al., 2004).

Os sistemas de liberação controlada do tipo polimérico são classificados de acordo com vários mecanismos, já conhecidos há algum tempo. Os sistemas controlados por difusão são os mais comuns e encontram-se descritos dois tipos. No primeiro, o fármaco forma uma partícula interna envolvida por uma barreira de difusão inerte. Estes sistemas incluem membranas, cápsulas, nanocápsulas, lipossomas e fibras ocas. O segundo tipo é um sólido monolítico, onde o fármaco é disperso ou dissolvido num polímero inerte, sendo a sua difusão a etapa limitante, enquanto que a taxa de libertação depende da escolha do polímero (Dong et al., 2004; Jung et al, 2000).

Os sistemas controlados quimicamente fazem uso da bioerosão de polímeros, resultando na absorção dos resíduos pelo organismo. O fármaco, também pode estar ligado covalentemente ao polímero e ser liberado por cisão da ligação por acção da água ou de enzimas. Nos sistemas controlados por solvente, o fármaco está dissolvido ou disperso na matriz polimérica e não se difunde através da matriz. Para que ocorra a difusão, o polímero deve intumescer-se (por exemplo, com água), tornando o material mais plástico. Deste modo, o fármaco contido na matriz pode difundir-se para o meio externo.

Como já foi referido, o Tamoxifeno é um fármaco amplamente usado em quimioterapia que pertence à classe dos derivados não esteroides do trifeniletileno e é considerado como o primeiro modelador selectivo dos receptores de estrogénio. Este, sob a forma de base livre, é hidrófobo enquanto o citrato do Tamoxifeno, que é o fármaco presente nos medicamentos existentes no mercado, apresenta uma certa solubilidade em água (Shin et al., 2006; Chawala et al., 2003).

Este fármaco foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1977 como profilático e, também, para tratamento do cancro da mama (10-20 mg duas vezes ao dia). É de referenciar o elevado impacto, a nível mundial, desta neoplasia uma vez que é o mais comum em mulheres no mundo ocidental (Osborne et al., 1998; Jin et al., 2005).

Uma vez que o Tamoxifeno actua como anti-estrogénio, a sua eficácia é comprovada tanto numa fase inicial como numa fase avançada do tipo de cancro estrogénio-dependente em mulheres pré e pós-menopausa. O seu mecanismo de acção consiste numa inibição competitiva dos receptores do estrogénio que, conseqüentemente, restringe a expressão dos genes reguladores do estrogénio diminuindo, desta forma, o tumor (Shin et al., 2006; Osborne et al., 1998; Jin et al., 2005).

No que respeita ao comportamento do Tamoxifeno, no organismo, este é rapidamente absorvido após administração oral decorrendo uma extensa metabolização hepática com subsequente excreção biliar dos seus metabolitos. Desta forma, a sua biodisponibilidade é largamente afectada pelo efeito de primeira passagem, pelas bombas de efluxo existentes no fígado e intestino. Esta biometabolização é amplamente catalizada pelo citocromo P450 3A e 2D6 levando à produção de N-desmetiltamoxileno e 4-hidroxitamoxileno, respectivamente (fig.2). Um facto comprovado é que, além de estes metabolitos produzidos serem potentes anti-estrogénios, o 4- hydroxitamoxifeno é aproximadamente 100 vezes mais potente que o próprio Tamoxifeno (Shin et al., 2006; Osborne et al., 1998; Jin et al., 2005).

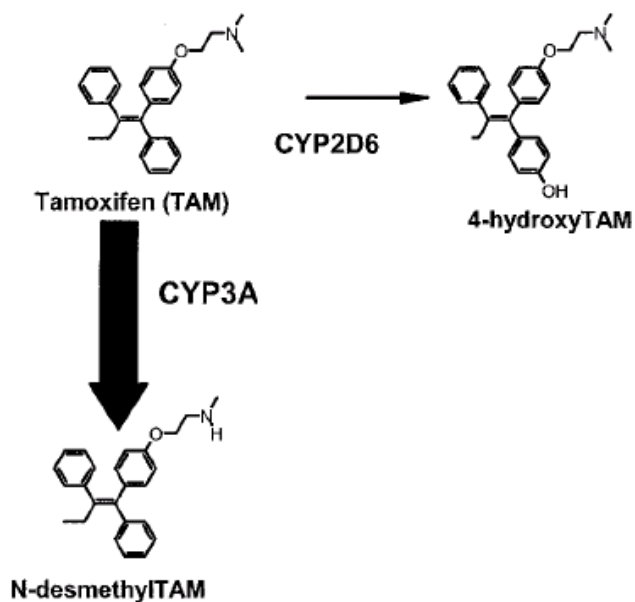


Fig. 2 Estrutura do Tamoxifeno e os seus principais metabolitos

O seu tempo de semi-vida, bem como dos seus metabolitos varia entre os 7-14 dias. No entanto, essas substâncias podem ser detectadas no soro durante várias semanas e no tecido tumoral durante alguns meses após cessar o tratamento (Osborne et al., 1998).

Infelizmente, como a maioria dos fármacos usados em terapias anti-cancerígenas, em que o Tamoxifeno não é uma exceção, demonstram uma diminuída e variável biodisponibilidade e eficácia devido à suas propriedades físico-químicas (lenta absorção e efeito da primeira passagem). Evidenciou-se, igualmente, que existia uma elevada variabilidade intra-específica, ou seja verificaram que existiam diferenças significativas da sua concentração no soro de doente para doente. Esta elevada variabilidade tem repercussões não apenas na eficácia terapêutica do fármaco mas, principalmente, na sua toxicidade (Memisoglu-Bilensoy et al., 2005; Shin et al., 2006).

Contudo, o Tamoxifeno é um dos fármacos que possui uma toxicidade e efeito nocivo menos acentuado da gama de medicamentos usados em quimioterapia. De qualquer forma, estão comprovados efeitos adversos, como sintomas menopausais (afrontamentos e vaginite atrófica), menstruação irregular, toxicidade ocular (retinopatia, opacidade da cornea), distúrbios tromboembólicos, trombocitopenia ou leucopenia. Podem ainda, ocorrer alguns problemas ginecológicos como hiperplasia endometrial, pólipos quistos nos ovários e, mais raramente, cancro endometrial (Shin et al., 2006; Osborne et al., 1998; Jin et al., 2005; Memisoglu-Bilensoy et al., 2005).

Um dado recente demonstra que, em alguns casos, evidencia-se um certo tipo de resistência ao fármaco mas o seu mecanismo não se encontra totalmente conhecido (Chawala et al., 2003).

No laboratório do Departamento de Farmácia na Universidade de Parma foi desenvolvido um sistema híbrido de nanopartículas, cujo é composto por lipídeos e polissacarídeos. Neste sistema, a formação de nanopartículas ocorre devido a uma interacção supra-molecular auto-organizada entre a carga positiva do polissacarídeo (quitosano) e a carga negativa do fosfolípido (lecitina) (Sonvico et al., 2006).

A lecitina é uma mistura lipídica que contém principalmente fosfolipídeos, triglicerídeos e glicolipídeos (fig. 3). É considerada uma substância bem tolerada e não tóxica, frequentemente usada para a produção de lipossomas e micelas (Sonvico et al., 2006).

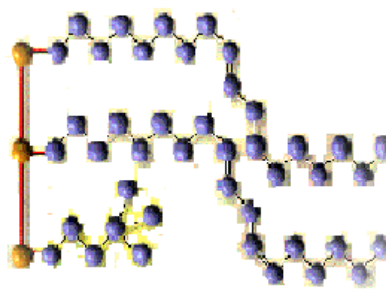


Fig.3 Estrutura química da lecitina

O quitosano, por sua vez, é um polissacarídeo linear composto por β -(1,4) e D- glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, apresentando uma estrutura similar à celulose (fig. 4). É obtido a partir da quitina, sendo esta a principal componente do esqueleto dos crustáceos, que posteriormente, sofre um processo de desacetilação. É usado, especialmente, para administração de moléculas sensíveis, como é o caso das proteínas e peptídeos. No que respeita às suas características, o quitosano é insolúvel em água e relativamente solúvel em ácido diluído. Quando a pH inferior a 6,5, o polissacarídeo adquire uma carga positiva, possibilitando assim a formação de ligações iônicas (Illum et al., 1998; Agnihotri et al., 2004; Borchard et al., 2001; Zhao et al., 2003).

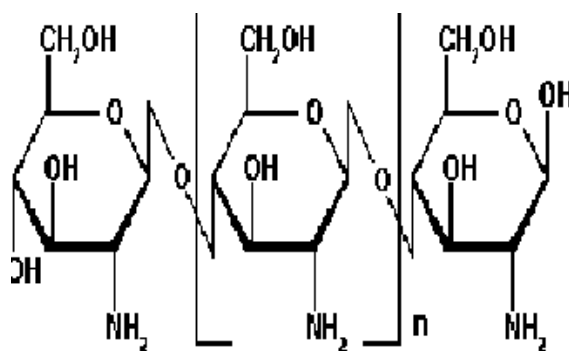


Fig. 4 Estrutura química do quitosano

Foi recentemente comprovado que a camada (também conhecida como *coating*) de lecitina e quitosano promove uma maior estabilidade aos nanosistemas, devido à mucoadesividade que confere após administração oral. Um estudo reporta o efeito benéfico de uma camada hidrófila usando quitosano, que é considerado biodegradável, biocompatível e seguro, tem ainda a vantajosa característica de adesão às mucosas, promovendo a permeabilização através da alteração, reversível, das junções adesivas celulares (Sonvico et al., 2006; Arai et al., 1968).

O objectivo deste trabalho foi incorporar o citrato de Tamoxifeno em nanopartículas de lecitina/quitosano de forma a investigar a sua eficácia de encapsulação, assim como a possível influência de determinados parâmetros de processamento na estrutura, as propriedades físico-químicas das nanopartículas, de forma a resolver problemas biofarmacêuticos, farmacocinéticos e de toxicidade.

Adicionalmente, procedeu-se à transformação da suspensão de nanopartículas em micropartículas secas, sem perda das originais propriedades físico-químicas do sistema coloidal, possibilitando assim a produção de uma dosagem sólida apta a ser administrada por via *per os*.

II. Material e Métodos

1. Material

1.1. Quitosano

Quitosano (Chitoclear®) foi obtido através da Primex (Singlufjordur, Island). Os lotes do polímero têm as seguintes especificações: percentagem de desacetilação é de 95% e viscosidade de 103 cPs em 1% m/m em ácido acético.

1.2. Lecitina

A lecitina Lipoid S45 (lote nº 745260-3) foi adquirida à Lipoid AG (Cham, Switzerland). As misturas de fosfolídeos contêm 47,6 % de fosfatidilcolina e 16,4% de fosfatidiletanolamina. A composição lipídica residual não foi analisada.

1.3. Citrato de Tamoxifeno (C₃₂H₃₇NO₈)

O citrato de Tamoxifeno tem um peso molecular de 563,6, sendo um pó branco ou quase branco e cristalino. É ligeiramente solúvel em água e acetona, mais solúvel numa solução de ácido clorídrico a 0,02 N, e extremamente solúvel em etanol e metanol. Este foi fornecido pela SolMag contendo o número de lote 0640284.

1.4. Outros reagentes utilizados

A água usada neste trabalho foi destilada e filtrada por um filtro 0,45µm de acetato de celulose, cujo foi obtido ao Albert® (Barcelona, Spain). Todos os outros reagentes usados apresentavam grau analítico de qualidade.

2. Métodos

2.1. Preparação da solução de lecitina/metanol (25 mg/ml)

A lecitina foi dissolvida em metanol na quantidade de 2,5% (m/v) e sonicada, alguns segundos, até completa solubilização

2.2. Preparação da solução de quitosano a 1%

Foi dissolvido 1g de quitosano numa solução de 1% de ácido clorídrico, de forma a preparar uma solução a 1% (m/v). A solução foi deixada em agitação por 24h para completa dissolução do polímero. Esta solução (10 mg/ml) foi guardada a uma temperatura de 4°C até ser usada.

2.3. Preparação das nanopartículas de lecitina/quitosano

A suspensão de nanopartículas foi produzida através de um sistema de injeção automática (modelo 200, KD Scientifics Inc., Holliston, MA, USA). Injectando, através de uma pipeta de vidro (diâmetro interno de 0,5 mm e taxa de injeção de 40 ml/min), 16 ml da solução de lecitina/metanol (25 mg/ml) em 184 ml da solução de quitosano, agitada mecanicamente (Ultra-Turrax® TP 25 basic, com uma cabeça S25 NK-19G, 2 cm de diâmetro, uma velocidade de 11000 rpm; IKA Labortechnik, staufen, Germany).

A solução de quitosano foi preparada por diluição, com água destilada, de 1% (m/v) da solução de quitosano em HCL 1%.

A suspensão final tinha um volume de 200 ml contendo constantes volumes de solução de lecitina/metanol (16 ml) e solução aquosa de quitosano (184 ml).

2.4. Preparação das nanopartículas de lecitina/quitosano contendo citrato de Tamoxifeno

O citrato de Tamoxifeno foi incorporado nas nanopartículas de lecitina/quitosano através da técnica descrita no procedimento anterior e dissolvendo o citrato de Tamoxifeno na solução de lecitina/metanol. Os lotes que foram produzidos tinham um volume final de 200 ml. As concentrações de citrato Tamoxifeno em estudo foram de 600 e 1200 µg/ml.

2.5 Pó obtido por secagem em leito fluido

A produção do pó foi conseguida através do uso “mini Spray-Dryer Buchi” mod 191 (Buchi Laboratoriums-Techink, Switzerland)

Esta técnica tem sido usada com o intuito de obter pós micronizados a partir de soluções coloidais.

O spray e secagem é uma tecnologia inovadora que permite a obtenção de um produto desidratado partindo de um líquido, independentemente, de este ser uma solução, suspensão ou emulsão. A secagem em meio fluido (também designado como *Spray Drying*), como o nome indica, é um dispositivo de secagem, utilizando um pulverizador. É um método rápido e eficaz de produção, mesmo em pequenas quantidades, de substâncias na forma de pó. As vantagens deste tipo de método de secagem, quando comparado com outros métodos, por exemplo a liofilização, são a taxa e o tempo de produção. O curto tempo de residência, bem como o efeito da refrigeração resultante da evaporação, torna possível o manuseamento até de substâncias termossensíveis (Broadhead et al., 1992). Adicionalmente, esta técnica é usada em variados processos tecnológicos tais como:

1. Modificação do tamanho da partícula
2. Aglomeração de nanopartículas
3. Secagem de suspensões

4. Revestimento de partículas

5. Fixação de líquido e sólidos em matrizes

6. Produção de micropartículas

Este aparelho realiza a absorção inicial do líquido, contido no gobelé, usando uma bomba peristáltica. Sucessivamente, é produzida a pulverização do líquido através de um aparelho adequado. A massa líquida pulverizada passa por um orifício de saída de diâmetro conhecido (0,7 mm ou 1 mm) sob o efeito de um fluxo de ar comprimido. Ao sair deste orifício dentro do cilindro (câmara de secagem), o líquido é disperso em gotas, as quais são aquecidas e secas formando partículas sólidas. Posteriormente, as partículas recém-formadas saem da câmara de secagem directamente para o local onde vão ser separadas. Esta é a última parte do procedimento, uma vez que consiste num ciclone, e um turbilhão de ar que direcciona as partículas para o frasco de recolha (Shaw et al., 1990; Broadhead et al., 1992)

Não foi possível usar apenas a suspensão coloidal para a produção de nanopartículas de Tamoxifeno, sob a forma de pó seco, não só devido à baixa percentagem de sólido na solução coloidal, mas também pela perda de material durante o processo. Na tentativa de resolver este problema, foram utilizados vários excipientes como diluente, sendo que o processo com melhor rendimento foi aquele em que se usou a β -cyclodextrina. Esta substância forma complexos de inclusão com fármacos pouco solúveis.

O pó foi obtido por secagem em meio fluido usando um sistema coloidal (nanopartículas contendo citrato de Tamoxifeno) com uma concentração de 600 $\mu\text{g/ml}$. Os parâmetros que foram mantidos constantes durante cada processo são os seguidamente descritos:

- Aspiração = 100 %
- Fluxo = 600 L/h
- Diâmetro do orifício de saída = 0.7 mm

As imagens do pó foram obtidas através de uma Microscopia Electrónica de Varrimento (técnica também designada de *Scanning Electron Microscopy* -SEM)

À semelhança da Microscopia Electrónica de Transmissão, a SEM emprega um feixe de electrões, mas estes, em vez de atravessarem a amostra, colidem com a superfície desta, previamente metalizada, e libertam electrões secundários. É a partir destes electrões, que se obtém uma imagem num monitor de vídeo. O feixe de electrões primários é móvel e varre a superfície da amostra. Daí obter-se uma imagem completa da superfície do objecto a observar (Varela et al., 2005).

O poder de resolução, deste tipo de microscópios, é da ordem dos 10 nm, e a ampliação atinge valores da ordem de 20.000x.

A preparação do material, para ser observado em SEM, requer duas etapas fundamentais: a desidratação e a metalização. Esta última consiste na deposição de uma fina camada de um metal, empregando-se, geralmente, o ouro. Para tal, o metal é aquecido sob vácuo e, ao vaporizar-se, deposita-se sobre a amostra (Varela et al., 2005).. A figura 5 representa o trajecto de um feixe de electrões no microscópio.

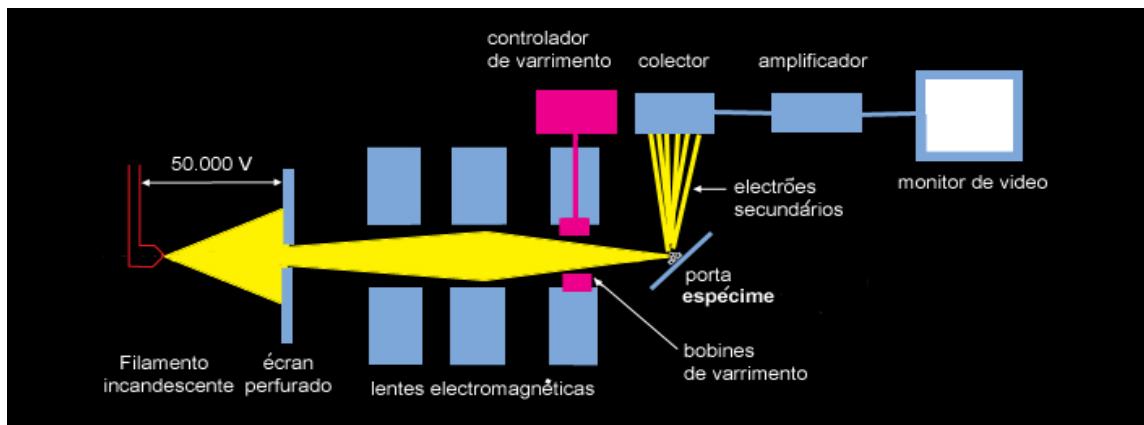


Fig. 5 Trajecto dos electrões no microscópio electrónico de varrimento (SEM)

2.6. Análise do sistema coloidal

2.6.1. Análise dimensional usando Dispersão Dinâmica de Luz (DLS)

No passado, acreditava-se que moléculas em solução não tinham movimento, a menos que fosse aplicada uma força externa. Mais tarde, já se considerava o movimento molecular como sendo evidente. Em 1914, com a publicação de uma teoria por Leon Brillouin surge a utilização do feixe de luz para a determinação da dimensão das partículas, designadamente a *Dynamic Light Scattering* (DLS).

A DLS (ZetaPALS, Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, USA) é uma técnica, amplamente, usada para determinar o tamanho de partícula na região submicrométrica. Esta técnica baseia-se na análise da variação de intensidade, durante um período de tempo, da luz medida num ângulo fixo. Quando o tamanho da partícula possui a mesma ordem de magnitude de comprimento de onda (λ) da luz incidente, a intensidade da luz dispersa muda em função do ângulo. Desta forma, é possível saber o diâmetro da partícula. Assim, se esta tiver um diâmetro inferior a 1/10 do comprimento de onda da luz incidente, em vez disto, é possível fazer uma aproximação através da aplicação da lei de Ray, em que prevê, principalmente, uma dispersão de luz isotrópica (Xu et al., 2002; Montoncello et al., 2003).

A luz será espalhada por uma partícula em solução, se a primeira tiver uma polarizabilidade diferente da do meio ao redor. Nesse caso, o momento dipolar induzido pelo campo eléctrico da radiação incidente irá espalhar luz em todas as direcções. A intensidade da luz dispersa está relacionada com a direcção de polarização da luz incidente (I), do ângulo de espalhamento (α) e de parâmetros da solução (d).

$$I \alpha d^6$$

As partículas dispersas, num meio líquido, movem-se ao acaso, ou seja, beneficiam dos movimentos Brownianos. Este movimento causa flutuações de concentração num dado volume da solução em função do tempo. Na dispersão dinâmica de luz a intensidade da dispersão (em curtos intervalos de tempo) é registada como função do tempo (Gráfico 1), e

flutuações nessa intensidade de dispersão são observadas como variações de concentração no volume de dispersão. O tempo necessário para as flutuações na intensidade de luz dispersa acontecerem é a característica mais importante do sinal, uma vez que esse tempo contém informação sobre as propriedades dinâmicas das moléculas do soluto (Tuchin., 2000).

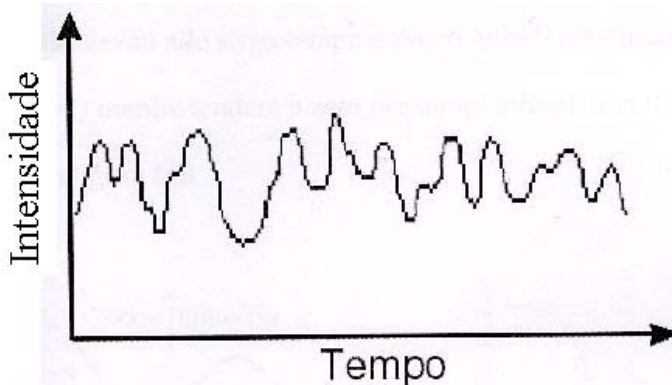


Gráfico 1- Intensidade da variação da dispersão da luz dinâmica em função do Tempo

A informação mais simples obtida é o coeficiente de difusão translacional que, para uma partícula esférica é relacionada ao raio hidrodinâmico (r_h) de acordo com a relação de Stokes-Einsten:

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta r_h}$$

k_B é a constante de Boltzman;

T é a temperatura absoluta (constante);

η é a viscosidade;

Assim, uma partícula maior terá coeficiente de difusão menor do que uma partícula pequena e as flutuações irão ocorrer mais vagarosamente.

Existe uma relação entre a velocidade de flutuação da luz dispersa e o coeficiente de difusão das partículas. Há, também, uma função de autocorrelação da intensidade de luz dispersa.

O gráfico 2 permite visualizar, um exemplo de uma função de autocorrelação, $G(\tau)$.

$$G(\tau) = \langle I(t_0) \times I(t_0 + \tau) \rangle$$

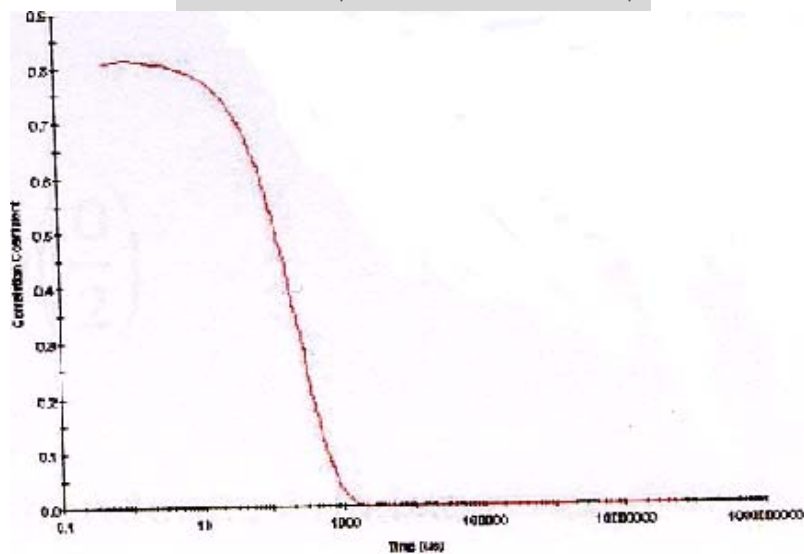


Gráfico 2 - Representativo da função de autocorrelação

Onde $I(t_0)$ e $I(t_0 + \tau)$ são as intensidades de luz dispersa nos instantes t_0 e $(t_0 + \tau)$, respectivamente. No tempo $t = t_0 = 0$, a intensidade de dispersão e a função de autocorrelação possui um valor máximo. Com o passar do tempo, a intensidade de dispersão em um tempo $(t_0 + \tau)$ terá cada vez menor correlação com a intensidade de espalhamento inicial, e a média sobre os produtos das intensidades, que é $G(\tau)$, tende a zero.

Normalmente, admite-se que $G(\tau)$ decresce, exponencialmente, em função do tempo. Para partículas esféricas e monodispersas, $G(\tau)$ é expresso por:

$$G(\tau) = Ae^{-2T\tau} + B$$

Desta forma, sendo A e B constantes, Γ é a constante de decaimento da curva exponencial gerada pela função de autocorrelação. Por sua vez, Γ é dada por:

$$\tau = Dq^2$$

D é o coeficiente de difusão das partículas;

q é o vector de onda da luz dispersa;

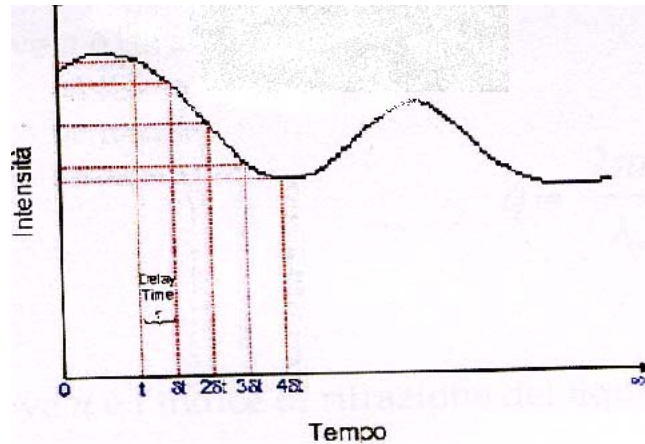


Gráfico 3 - Representativo dos valores de Γ

Por sua vez, q é dado pela equação abaixo:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2}$$

n é o índice de refração do líquido que dispersa as partículas;

θ é o ângulo de detecção da luz dispersa;

λ_0 é o comprimento de onda da luz incidente.

Uma dispersão dinâmica de luz permite, a partir da função de autocorrelação, obter uma curva exponencial e, desta obter o valor da constante de decaimento (Γ). Tendo-se esse valor, a partir da 4ª equação, obtém-se o valor do coeficiente de difusão. O coeficiente de difusão, por sua vez, está relacionado com o raio hidrodinâmico através da 1ª equação. Desta forma, obtém-se o valor do raio hidrodinâmico de partículas (Xu et al., 2002; Montoncello et al., 2003; Tuchin., 2000).

No entanto, é importante salientar que, como pode ser observado na 1ª equação, o coeficiente de difusão não depende, exclusivamente, do raio hidrodinâmico das partículas. Depende, igualmente, de outros factores, que podem estar relacionados com as interações intermoleculares. Para a obtenção do raio hidrodinâmico, é necessário extrapolar a concentração da solução a zero, para eliminar os outros factores que poderiam interferir na

determinação do raio hidrodinâmico(Xu et al., 2002; Montoncello et al., 2003; Tuchin., 2000).

2.6.2. Potencial Zeta (ζ)

Quase todos os materiais, tanto macroscópicos como sob a forma de nanopartícula, quando em contacto com um líquido adquirem uma carga eléctrica superficial. Essa carga pode aparecer de várias formas, tais como a dissociação de grupos ionogénicos (grupos fixos que estão ionizados ou são ionizáveis dissociando-se em iões fixos e iões móveis) na superfície da partícula bem como a adsorção diferencial de iões da solução na superfície da partícula. A carga efectiva, na superfície da partícula, afecta a distribuição de iões na sua vizinhança, aumentando assim a concentração de contra-iões (iões com transporte contra o gradiente de concentração) junto à superfície. Assim, forma-se uma dupla camada eléctrica na interface da partícula com o líquido (Elimelech et al.,1994).

A teoria da dupla camada eléctrica considera que a carga iónica à volta das partículas é constituída por duas regiões, sendo elas:

- Uma região interna ligada à superfície, que inclui iões fortemente ligados à superfície;
- Uma região externa, na qual a distribuição dos iões é determinada por um equilíbrio entre as forças electrostáticas e os movimentos térmicos. Desta forma, nesta região, o potencial decresce à medida que aumenta a distância da superfície das partículas, até uma distância suficientemente grande, em que atinge um determinado valor na solução (normalmente convencionado como potencial zero);

Num campo eléctrico, como em microelectroforese, cada partícula e ião fortemente ligados à superfície movem-se, dentro da solução, como uma unidade, que é designada de unidade electrocinética. Considerando a existência de um plano de quebra (também designada de *Cutting Surface*) que separa a unidade electrocinética do resto da solução, assim o potencial eléctrico gerado entre essa superfície e o meio circundante é chamado potencial zeta, que pode ser visualizado na figura 6 (Elimelech et al.,1994; Childress et al., 1996).

Quando uma camada de macromoléculas é adsorvida na superfície da partícula, ela move o plano de quebra para longe da superfície e altera o potencial zeta. Pode então, considerar-se que o potencial zeta é função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda.

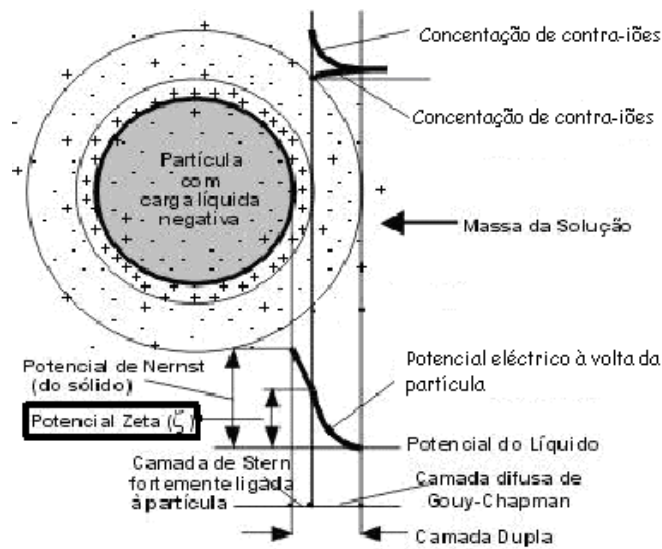


Fig.6 Demonstração esquemática do Potencial Zeta

Este potencial pode ser determinado experimentalmente e, como ele reflecte a carga efectiva nas partículas, correlaciona-se com a repulsão electrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão. Assim, para uma medição experimental deste potencial, tira-se partido da microelectroforese. Desta forma, numa corrente eléctrica a carga das partículas, de um sistema disperso, move-se para o pólo oposto da sua própria carga e a velocidade de movimento depende, exclusivamente, do valor do potencial zeta (Elimelech et al.,1994; Childress et al., 1996).

Numa suspensão coloidal é necessário o uso de uma técnica mais específica como *Phase Analysis Light Scattering* (PALS) que é uma técnica mais evoluída. A PALS não mede a diferença de frequência, mas sim a diferença de fase entre o sinal de luz modelado, dado para uma determinada frequência (normalmente 250 Hz) e o sinal obtido da combinação de dois raios. Esta medição aumenta a sensibilidade cerca de 100 vezes comparado com a forma tradicional de determinação de potencial zeta.

2.6.3. Análise por Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM)

Esta técnica, *Transmission Electron Microscopy* (TEM), desenvolveu-se nos anos 30 e os primeiros cientistas a utilizá-la em Biologia, foram Albert Claude, Keith Porter e George Palade, nos anos 40 e 50.

O microscópio electrónico é composto por uma fonte de electrões, um sistema ocular, um sistema designado objectiva e outro condensador. Estes sistemas são constituídos por lentes (bobinas) electromagnéticas que actuam sobre o feixe de electrões, reproduzindo a maior parte dos sistemas ópticos clássicos: lentes convergentes, lentes divergentes, espelhos, prismas, entre outros (Williams et al., 1996; Reimer et al., 1995).

A fonte consiste num filamento metálico tornado incandescente pelo efeito de Joule. Este encontra-se inserido num campo eléctrico em que os electrões emitidos pelo filamento são atraídos para um alvo. A atracção é gerada pela diferença de potencial (50 a 100 KV) criada entre o próprio filamento, que neste contexto desempenha o papel de cátodo, e o alvo (ânodo). Consequentemente, os electrões deslocam-se a uma velocidade elevada. Para que tal ocorra o alvo tem de ser perfurado centralmente (ecrãs perfurado). Os electrões que passam através deste orifício, constituem um feixe apertado mas de tendência divergente. Este feixe é condensado pela lente condensadora e incide sobre a preparação a ser examinada (amostra) (Williams et al., 1996; Reimer et al., 1995).

Ao atravessar a preparação, os electrões são desviados uns mais do que outros. O feixe de electrões, com os desvios introduzidos pela preparação, é dispersado pela lente objectiva. Parte desse feixe é, por sua vez, dispersado por outro campo magnético que age como lente de projecção (fig 7).

Uma vez que o olho humano não é sensível aos electrões, a imagem é projectada sobre um ecrã fosforescente de sulfureto de zinco. Neste, os pontos onde embate um electrão, emitem fotões. Consequentemente, pode ver-se a imagem, indirectamente, através da “descodificação” realizada pela matéria fluorescente do ecrã. A mesma imagem pode ser projectada sobre uma película fotográfica, ou ainda captada por um sistema de vídeo, e posteriormente, digitalizada por um computador. No objecto a observar, as zonas mais densas

aos electrões, que induzem, conseqüentemente, maiores desvios ou mesmo absorção, aparecerão menos luminosas no ecrã. Pelo contrário, as zonas menos densas, darão origem a imagens mais brilhantes no ecrã, isto é, escuras no negativo e claras no positivo fotográfico. Assim, pode dizer-se que a imagem que se observa é a sombra electrónica do objecto (Williams et al., 1996; Reimer et al., 1995).

Contrariamente aos fotões, os electrões não podem colidir com quaisquer átomos ou moléculas. Por esta razão, o interior do microscópio electrónico encontra-se em vazio quase absoluto, facto que inviabiliza a observação de seres vivos.

A análise TEM foi efectuada usando um Philips EM2085 com um sistema de vídeo MegaView II. Para proceder a esta análise, a amostra foi preparada por diluição da solução (1:4) de um sistema coloidal previamente produzido, a qual foi depositada num suporte (S162-3 formvar/carbon 300 mesh Cu - Agar Scientific). A amostra foi deixada a fixar durante 60 segundos e, de forma contínua, foi seca lateralmente com um papel de filtro. Adicionou-se, sucessivamente, uma gota de solução de acetato de urano (2% m/v), de forma a colorar e fixar a amostra durante 20 segundos. Depois disto, o excesso de amostra e de colorante foram removidos com papel absorvente.

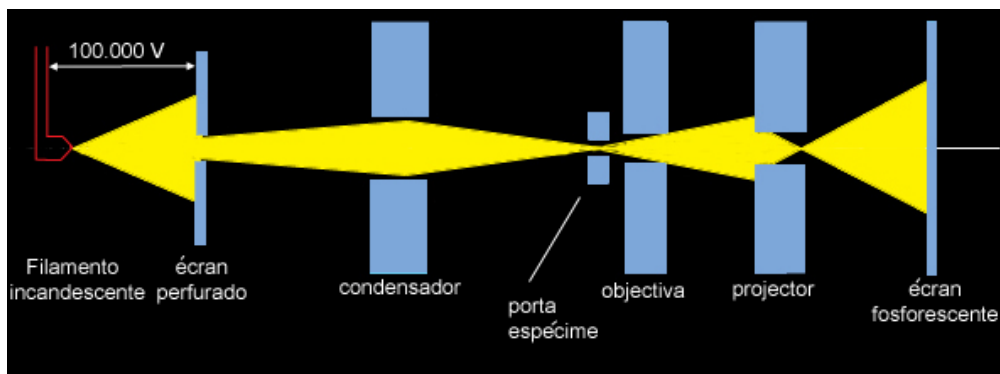


Fig. 7 Esquema representativo do trajecto dos electrões (em amarelo) através do microscópio electrónico de transmissão (TEM)

2.7. Caracterização das Nanopartículas

2.7.1. Dimensão e Potencial Zeta

As nanopáticas foram caracterizadas ao nível da dimensão (recorrendo ao DLS) e do Potencial Zeta (pela PALS) usando uma Brookhaven ZetaPALS (Brookhaven Instrument Co., Holtsville, NY, USA) com um BI-MAS *software* para a análise DLS.

Para cada formulação de nanopáticas foram preparados 3 lotes diferentes e para cada um foi determinado o diâmetro e a derivação padrão relativa. Para cada análise foi usado como controlo de eficiência do sistema, nanosferas padrão em latex (Duke Scientific Co., Palo Alto, CA, USA).

Para as medições de DLS, as amostras foram diluídas com água destilada e filtrada (filtro de 0,45 µm). As amostras foram diluídas até o valor da intensidade da luz dispersa rondar os 50-150 kcps (Parsec (pc) é uma unidade de distância usada em trabalhos científicos, neste caso é usada a unidade quiloparsecs (kpc)) de forma a evitar um espalhamento múltiplo devido à elevada concentração da amostra.

Na determinação do potencial zeta, para cada formulação de nanopáticas foram produzidos três lotes diferentes, como controlo de eficiência foi usada uma solução coloidal padrão BI-ZR3 (Brookhaven Instrument Co., Holtsville, NY, USA).

2.7.2. Eficácia de Encapsulamento (EE%) e Análise da capacidade de carga do citrato de Tamoxifeno

A eficácia da encapsulação (EE) do fármaco foi determinada como a razão entre a quantidade de fármaco encapsulado nas nanopáticas e a quantidade total de fármaco introduzido no sistema coloidal (quantidade total de fármaco).

$$EE\% = \frac{(QuantidadeFármacoEncapsuladoNanopáticas)}{(QuantidadeFármacoTotal)} \times 100$$

A quantidade de fármaco encapsulado nas nanopáticas foi determinado a partir da centrifugação de 10 ml da suspensão de nanopáticas, a 5000 rpm (~2200×g) durante 10

min., de forma a separar os cristais de Citrato de Tamoxifeno que se poderiam ter formado durante o processo de preparação.

O precipitado foi liofilizado e dissolvido em 10 ml de metanol, desta forma a quantidade de citrato de Tamoxifeno foi avaliada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*).

O sobrenadante foi, ainda, ultracentrifugado a 43000 rpm ($\sim 120,000 \times g$) durante 120 minutos a 20°C, de forma a separar as nanopartículas da solução. O sobrenadante foi recuperado e usado para o doseamento do citrato de Tamoxifeno dissolvido.

O sedimento contendo o citrato de Tamoxifeno, incorporado nas nanopartículas, foi liofilizado, pesado e disperso em metanol. Antes da quantificação, por HPLC, o liofilizado foi sonificado durante alguns segundos.

A capacidade de carga (%) foi obtida como a razão entre a quantidade calculada de fármaco encapsulado nas nanopartículas e a quantidade total de massa do sistema.

$$\text{Capacidade De Carga } a\% = \frac{(\text{Quantidade Fármaco Encapsulado Partículas})}{(\text{Quantidade Total Massa Sistema})} \times 100$$

2.7.3. Quantificação do citrato de Tamoxifeno usando a Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

A quantificação do citrato de Tamoxifeno foi obtida por HPLC de fase reversa em eluição isocrática. O sistema de HPLC (Shimadzu LC-10AT, Italy) é composto por um amostrador automático (Waters 717 plus). As áreas dos picos foram integradas usando um *software* Cromatoplus. A coluna usada para a separação foi uma Discovery® C18, 4,6 x 250 mm (Supelco, Italy) a 25°C.

A fase móvel era uma mistura de 40 volumes de acetonitrilo e 60 volumes de água (contendo 0,9 g/l de dihidrogenofato de sódio e 4,8 g/l de N,N-dimetiloctalamina ajustada a pH 3.0 com ácido fosfórico) desgaseificada e filtrada (filtro de 0,45 μm) ajustada a uma taxa de fluxo

de 1,2 ml/min, com 10 µl de volume de injeção e um detector com um comprimento de onda (λ) de 240 nm.

A curva de calibração usada para este método foi obtida dissolvendo-se 7,585 mg de citrato de Tamoxifeno em 100 ml de fase móvel. A partir da solução inicial, foram feitas diluições sucessivas, com uma concentração conhecida (0,5;1;2;5;10;25 µg/ml). Após a obtenção dos resultados, estes foram integrados graficamente obtendo-se a equação da recta $y = 208,8x$ (Fig. 11).

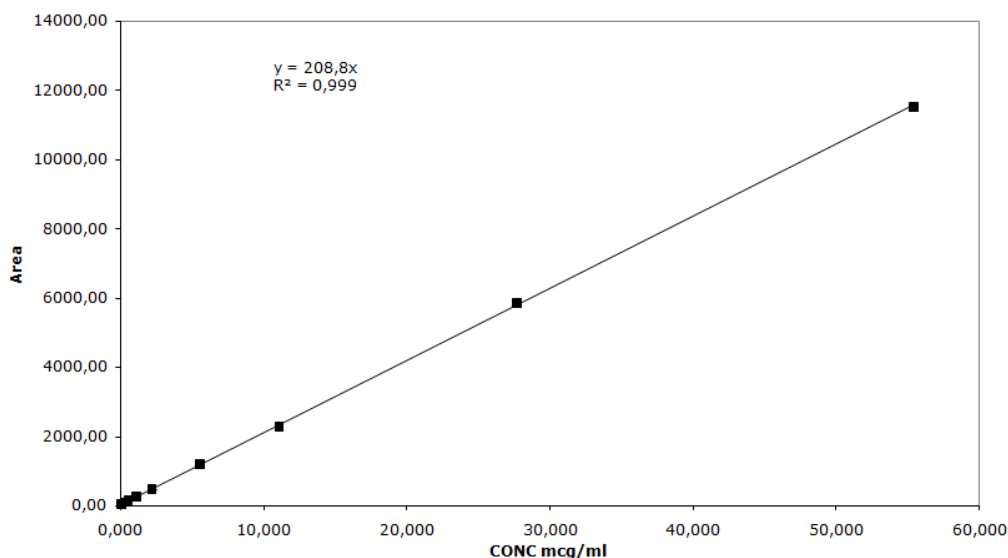


Gráfico 4 - Representativo da curva de calibração para o citrato de Tamoxifeno

III. Resultados e Discussão

A injeção de uma solução de lecitina em metanol e, seguidamente, em uma solução aquosa ácida de quitosano levou à auto-organização de nanopartículas, processo este que pode ser descrito como uma estrutura própria estabilizada pela interação electrostática entre a carga negativa da lecitina e carga positiva do quitosano.

As nanopartículas de lecitina/quitosano/Tamoxifeno foram caracterizadas segundo o seu tamanho, carga superficial, eficácia de encapsulação e capacidade de carga de acordo com a variação de quantidade de citrato de Tamoxifeno adicionado às preparações.

O sistema coloidal foi caracterizado pelo potencial zeta e dimensão da partícula de acordo com a concentração de Tamoxifeno no sistema.

Para cada lote, as diferentes concentrações foram analisadas usando a tecnologia DLS e PALS para análise dimensional e de potencial zeta, respectivamente.

Visualizando o gráfico representado, este evidencia os valores de diâmetro e de potencial zeta em função da concentração do citrato de Tamoxifeno, é possível verificar que a carga das nanopartículas não altera significativamente, ou seja, é avaliado em torno de um valor constante positivo de cerca de 35-45 mV. Contrariamente, à medida em que se aumentava a concentração de citrato de Tamoxifeno entre 50 e 200µg/ml, o tamanho da partícula diminuiu substancialmente. Para valores mais elevados, o tamanho das partículas foi constante, estando compreendido entre 100 e 150nm.

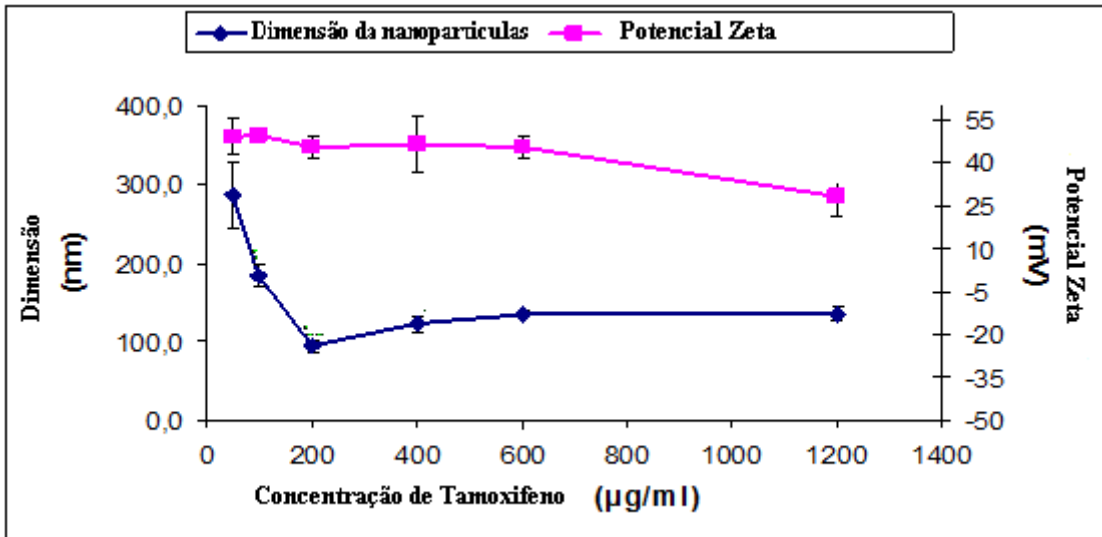


Gráfico 5 – Correlação entre a variação da Dimensão e Potencial Zeta em função da concentração de Tamoxifeno

Para compreender melhor o que acontece nas nanopartículas quando se incorpora o fármaco, visualizaram-se as amostras, com alta resolução, recorrendo à técnica TEM, pois permite caracterizar os colóides morfologicamente. Recorrendo ao uso de acetato de urânio, este permite uma visualização mais clara da organização das nanopartículas.

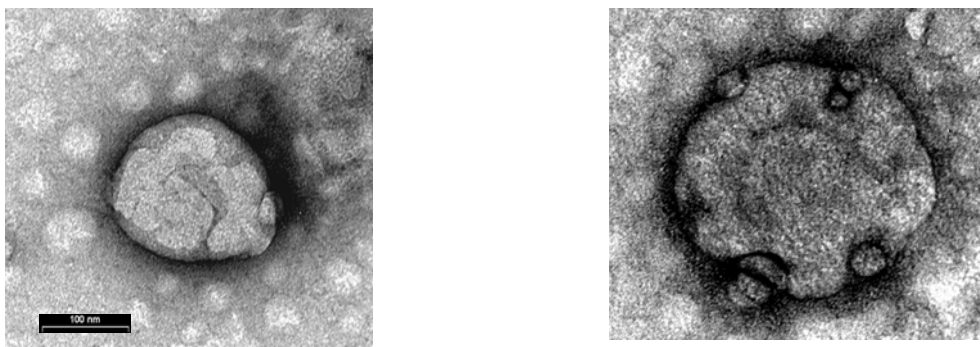


Fig. 8 Imagens TEM das nanopartículas sem citrato de Tamoxifeno

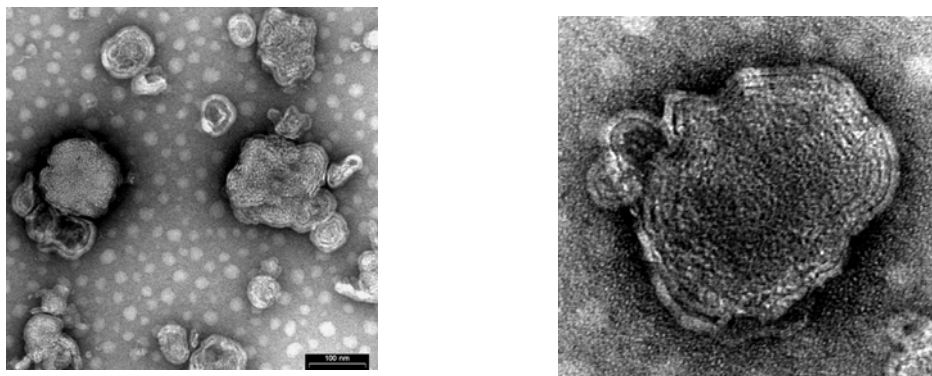


Fig 9 Imagens TEM das nanopartículas contendo citrato de Tamoxifeno.

As nanopartículas sem Tamoxifeno assemelham-se a uma “rocha”, uma vez que se visualiza uma estrutura com um aspecto rígido. Esta deve-se ao facto de ter na sua constituição o quitosano, polímero carregado positivamente que se liga, electrostaticamente, com a carga negativa da lecitina.

Comparando as imagens de nanopartículas sem fármaco com aquelas contendo Tamoxifeno, é visível a existência de uma estrutura completamente diferente. Estas evidenciam a formação de um sistema menos rígido, pois os contornos das nanopartículas parecem mais deformáveis, (considerando que estas são secas e sob vácuo), de salientar é ainda o facto de estas formarem uma estrutura em multicamadas

Analisando os resultados obtidos, é então possível concluir que a variação tanto no tamanho como na morfologia das nanopartículas está, intrinsecamente, associada à presença do fármaco, uma vez que este obriga a que ocorra uma alteração estrutural significativa. Desta forma, com a menos rígida e multilaminar aparência das partículas e a diminuição hidrodinâmica do diâmetro, pode assumir-se que possa estar associado ao quitosano, pois sendo este o componente mais externo, parece estar menos envolvido no processo de formação das nanopartículas quando o fármaco também se encontra incorporado. Isto pode ocorrer devido à interacção electrostática entre a carga negativa da lecitina e o citrato Tamoxifeno, pois esta carrega positivamente um grupo-amino na cadeia lateral alifática. Concluindo, ao incorporar na estrutura da nanopartícula o citrato Tamoxifeno, este parece substituir em parte o quitosano. Claramente, verifica-se a grande influência do fármaco na estrutura das nanopartículas preparadas contendo lecitina e quitosano.

Quanto à capacidade do sistema em solubilizar e veicular o citrato de Tamoxifeno (o qual é moderadamente solúvel em água), verifica-se uma alta eficácia de encapsulação (para valores mais elevados de concentração de fármaco, os valores de eficácia de encapsulação não são superiores a 50-60 %), enquanto a capacidade de carga do fármaco, calculada para o peso efectivo das nanopartículas secas e não para o teoricamente calculado, forneceu resultados muito promissores, atingindo uma elevada percentagem de fármaco, na quantidade total dos constituintes, que ronda os 30%.

Observando os resultados ao pormenor e, de acordo com a figura 17, a eficácia de encapsulação do citrato de Tamoxifeno para a concentração de 1200µg/ml decresce de 80% para 50%.

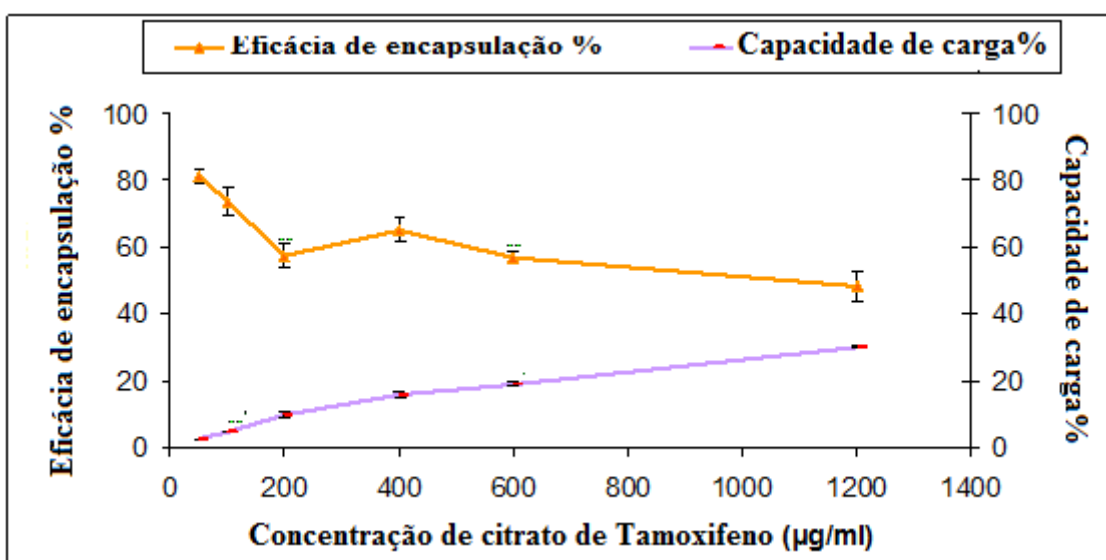


Gráfico 6 - Eficácia de Encapsulação (%) e capacidade de carga (%) das nanopartículas dependendo da concentração de citrato de Tamoxifeno

Relativamente à capacidade de carga, é possível concluir que aumentando a quantidade de citrato de Tamoxifeno no sistema total, aumenta, igualmente, a percentagem (m/m) deste fármaco dentro das nanopartículas.

Através da técnica de secagem em leito fluido, o pó foi obtido usando um sistema coloidal de nanopartículas com citrato de Tamoxifeno incorporado, com uma concentração igual a 600 $\mu\text{g/ml}$.



Fig. 10 - Sistema Coloidal.

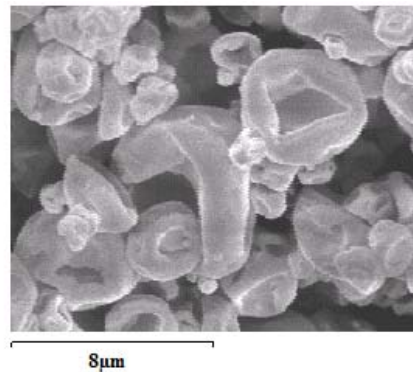


Fig. 11 - Nanopartículas observadas através de SEM.

O único objectivo desta técnica foi o de produzir um pó que fosse reprodutível, de forma a obter-se uma dosagem sólida passível de ser administrada oralmente.

O excipiente, β -ciclodextrina, usado nesta formulação foi determinante para a obtenção dos melhores resultados tanto ao nível do rendimento do processo como na obtenção de boas propriedades tecnológicas, como por exemplo, uma boa fluidez.

O pó produzido foi analisado morfológicamente usando a técnica de SEM, de forma a visualizar-se como o excipiente modificava o aspecto e o tipo de nanopartículas (fig.10 e 11). Devido à sua forma, estas nanopartículas parecem ter agregado (devido ao vácuo criado pelo instrumento), uma vez que aparecem vazias, ocas ou, possivelmente com baixa densidade e superfície aparentemente lisa.

IV. Conclusão

Este estudo permitiu caracterizar nanopartículas, de lecitina/quitosano com citrato de Tamoxifeno encapsulado, tanto ao nível da distribuição por tamanho bem como da sua carga superficial. Procedeu-se, ainda a uma preliminar investigação para possível produção de um pó passível de ser administrado oralmente em que tenha uma correcta dosagem no estado sólido.

Foi possível otimizar uma concentração de fármaco para ser encapsulado nas nanopartículas de forma a obter a melhor capacidade de carga, que neste caso foi de 30% (m/m)

Um fármaco cristalino e com muito baixa solubilidade em água como o citrato de Tamoxifeno pode ser, efectivamente, solubilizado e passivamente veiculado (devido à reduzida dimensão da partícula que permite usufruir da vantagem de ser reconhecido pelo órgão/local alvo por um mecanismo designado *Enhanced Permeability and Retention effect* (EPR)

Este tipo de nanopartículas têm ainda a vantagem de poderem permear a mucosa gastrintestinal, característica esta que é conferida pelo quitosano que, uma vez ligado à lecitina pode aumentar, significativamente, esta permeabilidade.

De salientar é, ainda, a grande vantagem existente ao nível da produção, pois o processo requerido para este tipo de nanopartículas é dotado de uma grande simplicidade. Apresenta-se como um método mais rápido que a maioria dos métodos comuns, pois os tradicionais requerem um procedimento mais elaborado inviabilizando, desta forma, a sua evolução até à escala industrial.

V. Bibliografia

Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., Aminabhavi, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Control. Rel.*, v. 100, p. 5-28.

Arai K., Kinumaki T., Fujita T. (1968). Toxicity of Chitosan. *Bull Tokai feg. Fish. Res. Lab.*56, p. 89-95.

Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Karydas, A. G., Ithakissios, D. S. (2002). PLGA – mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J. Control. Rel.*, v. 79, p. 123-135.

Borchard, G.; Junginger, H.E. (2001). Modern drug delivery applications of chitosan. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.52, p.103.

Brannon-Peppas L., Blanchette J.O. (2004). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Del. Rev.* 56 , p.1649-1659.

Brigger, I.; Dubernet, C.; Covreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 54, p. 631 – 651.

Broadhead J., Rouan S.K.E. and Rhodes C.T. (1992). The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 18, p.1169-1206.

Chandy, T.; Sharma, C.P. (1993). Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin. *Biomaterials*, v.14, p.939-944.

Chawala, Jugminder S. and Amiji, Mansoor M., (2003). Cellular uptake and concentrations of tamoxifen upon administration in poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles. *AAPS PharmaSci*, 51.

Childress, A.E., Elimelech, M., (1996). Effect of Solution Chemistry on the Surface Charge of Polymeric Reverse Osmosis and Nanofiltration Membranes, *Journal of Membrane Science*, v.119, p. 253-258.

Colombo P., Castellani P.L., Gazzaniga A., Menegatti E., Vidale E., (2004). *Principi di tecnologie farmaceutiche*. Milano, Casa Editrice Ambrosiana.

Couvreur P. et al., (1988). New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carriers. *Diabetes* 37, p. 246-251.

Couvreur, P., Courrage, G., Devinaguet, J-P., Puisieux, F., (1996). Nanoparticles: Preparation and Characterization. *In: Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*. New York, p.183-184.

Dong, Y.; Feng, S-S. (2004). Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, v. 25, p. 2843 – 2849.

Elimelech, M., Chen, W. H., Waypa, J. J., (1994). Measuring the zeta (electrokinetic) potential of reverse osmosis membranes by a streaming potential analyzer. *Desalination*, 95, p. 269-286.

Felt, O.,Buri, P., Gurny, R.,(1998). Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev. Ind.Pharm.*, v.24, p. 979 - 993,

Illum, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm.Res.*, v.15, p.1326-1331.

Jin, Yan et al., (2005). CYP2D6 Genotype, antidepressant use, and Tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 97, p.30-31.

Jung T. et al., (2000). Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, v..50, p. 147-160

Memisoglu-Bilensoy, Erem et al., (2005). Tamoxifen citrate loaded amphiphilic β -cyclodextrin nanoparticles: in vitro characterization and cytotoxicity. *International Journal of Pharmaceutics*, v.104, p. 489-496.

Montoncello, F., (2003). Theory of Spin Resonance and Brillouin Light Scattering in ferromagnetic nanoparticles, *tesi di dottorato di ricerca*, Università di Ferrara.

Osborne, C. Kent., (1998). Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, v. 339, p.609-618.

Panyam, J.; Labhasetwar, V., (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Del. Rev.*, v. 55, p. 329 – 347.

Reimer, L., (1995). *Energy Filtering Transmission Electron Microscopy*, Ed. Springer Series in Optical Science, New York.

Sahoo, Sanjeeb K. and Labhasetwar, Vinod., (2003). Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Research Focus*, v.8, p.1112-1120.

Shaw F.V. (1990) Spray-drying: A traditional process for advanced applications, *Ceramic Bulletin*, v.69, p.1484-1488.

Shin, Sang-Chul et al., (2006). Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v.313, p.144-149.

Sonvico, F. et al, (2006). Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *International Journal of Pharmaceutics*, v.324, p. 67-73.

Tuchin V., (2000). Tissue Optics: Light scattering Methods and Instruments for medical diagnosis, *SPIE Press*, v.38.

Varela, M., Lupini, A.R., van Bentham, K., Borisevich, A.Y.; Shibata, N. (2005). Material Characterization in the Aberration – corrected Scanning Transmission Electron Microscope, *Rev. Master* v.35, p.539-569.

Williams, D. B., Carter, C. B. (1996). Transmission Electron Microscopy; *Plenum Press: New York*.

Xu, R., (2002). Particle Characterization: Light Scattering Methods; *Kluwer*, p.323-341

Zhang Q. et al., (2004). Bioavailability and pharmacokinetics of cyclosporine A-loaded pH-sensitive nanoparticles for oral administration. *J. Contr. Rel.*, p.421-429.

Zhao, L.; Mitomo, H.; Nagasawa, N.; Yoshi, F.; Kume, T., (2003). Radiation synthesis and characteristic of the hydrogels based on carboxymethylated chitin derivatives. *Carbohydr. Pol.*, v.51, p.169-175.