

DIEGO JUSCELINO SANTOS DIAS

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA,
MORFOLOGICA E AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE DE
CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA (MCF-7) SUBMETIDAS À
NANOESFERAS DE PLGA CONTENDO CLORAMBUCIL**

BRASÍLIA

2012

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

DIEGO JUSCELINO SANTOS DIAS

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA,
MORFOLOGICA E AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE DE
CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA (MCF-7) SUBMETIDAS À
NANOESFERAS DE PLGA CONTENDO CLORAMBUCIL**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes

Co-Orientadora: Profa. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes

BRASÍLIA

2012

DIEGO JUSCELINO SANTOS DIAS

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MORFOLOGICA E AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA (MCF-7) SUBMETIDAS À NANOSFERAS DE PLGA CONTENDO CLORAMBUCIL

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Aprovado em: 17 / 12 / 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes – Presidente

Universidade de Brasília

Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento

Universidade de Brasília

No dia 22 de agosto de 2006 recebemos a pior das notícias. A pessoa que me forneceu todas as condições para que me formasse teria de se tratar de um câncer de mama. Graças a Deus, tudo ocorreu como gostaríamos! A minha mãe dedico não só esse, mas todos os meus esforços.

AGRADECIMENTOS

Claro que teria novamente de começar agradecendo a minha mãe! A ela serei eternamente grato por toda dedicação que teve ao longo de sua vida para comigo. A ela agradeço também pela inspiração, pois, é muito bom fazer um trabalho acreditando em um dia poder ajudar pessoas que passarão pelo que vivemos. Agradeço ao meu pai (José Dias), aos meus irmãos (Charles, Maione, Marlon e Elizabeth) e suas respectivas famílias pelos inúmeros momentos de distração que juntos convivemos ao longo desse e de muitos outros períodos. Não poderia também deixar de me lembrar de familiares muito importantes que estiveram ao meu lado em momentos difíceis, mas que precisei superar para chegar a esta conquista, como: minha amada Tia Camila, as amigas Teodomira, Eleuza, Glória, Marcília, Sinadia, meu padrinho João Batista, meus primos Alexandre, Nalbert, Jessica, meus sogros Regilane e Leonardo, meu cunhado João e minha namorada Laura.

Aos amigos de trabalho Jean, Evilásio, Douglas, Rafael, Leopoldo, Alisson(s) Fred, Marquinhos, Hugo, Sr Teles, Lorena, Nara, Rafaela, Elias, Leandra, Carla Juliana, Amanda, Leonardo, Patrícia e muitos outros, os de farra, como Edney, Eder e Vitor, agradeço pela companhia, amizade e por muitas vezes terem me ouvido quando estava angustiado e passando por momentos turbulentos de minha vida.

Pela paciência, atenção, dedicação e por conseguir aturar um orientando tão enrolado como eu, agradeço ao Professor Dr. Anderson de Jesus Gomes, que ao longo desses dois anos fez muito mais do que simplesmente me orientar. Com ele e a Professora Dra. Claire Nain Lunardi Gomes fui introduzido aos estudos nanobiotecnológicos, sendo-me fornecidas condições para ver todo sentido que havia nos conteúdos a mim ministrados durante a graduação e pós. Pretendo seguir seus passos, e quem sabe trilhar um caminho tão belo e vitorioso quanto o deles.

Ao Professor Dr. Luciano Paulino da Silva agradeço por me mostrar as técnicas de Microscopia de Força Atômica e de Microscopia Eletrônica de Varredura (através de seu orientando, no laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília). Agradeço pela estrutura disponibilizada por ele junto a Embrapa e principalmente por ele ter me apresentado à Professora Dra. Graziella Anselmo Joanitti. A ela agradeço imensamente pela atenção a mim dispensada nos vários dias (incluindo alguns finais de semana) em que nos

deslocamos ao laboratório de Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, onde o Professor Dr. Ricardo Bentes de Azevedo disponibilizou sua estrutura para realização dos meus ensaios biológicos.

A todos da Faculdade de Ceilândia agradeço em nome da Professora Dra. Diana Lúcia Moura Pinho e do Professor Dr. Araken dos Santos Werneck Rodrigues. Ambos fazem parte da história de uma região que tem sim condição de se desenvolver independente de Brasília, mas que para isso necessita de estrutura, como um campus universitário descentralizado e com reduzida influência elitista. A luta deles e de toda comunidade fez com que este braço da Universidade de Brasília já se despontasse como referência na formação de profissionais capacitados da área de saúde. Sou muito grato à faculdade, pois nela trabalho, estudo e agora pesquisa. Devido a sua gestão democrática, a mim foi concedida a oportunidade de poder concluir esse trabalho da melhor forma possível, com tempo e condições para pesquisar e escrever em suas dependências e em laboratórios externos ao campus.

Agradeço pelos comentários e dicas do Professor Dr. Juliano Alexandre Chaker sobre as minhas análises de infravermelho e pelas orientações de como proceder com a realização das análises térmicas fornecidas através de sua orientanda graduanda Geises Bel Costa Santos. A Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva agradeço pelas primeiras orientações sobre como realizar os ensaios biológicos de MTT durante o período em que acompanhei a graduanda Naiara Araújo de Oliveira nas análises de suas nanopartículas de PLGA contendo antitumoral. A esta aluna também agradeço por ter deixado que eu a acompanhasse no preparo e caracterização de suas nanopartículas.

Ao graduando Ricardo Marcelino da Silva Júnior agradeço pelo apoio e incentivo em momento difícil no qual que tive de acelerar meu trabalho iniciando os procedimentos experimentais. Incluo no agradecimento todos os alunos pertencentes ao grupo de pesquisa dos Professores Anderson e Claire, em especial, a também mestranda Tanira Viana Verissimo e aos graduandos Camyla Mara da Silva Ribeiro, Susan Suellen Barros, Ana Paula Vieira Araújo e João Bosco Ferreira da Conceição, que estiveram comigo durante a execução de vários experimentos, e ao final, se dispuseram a ouvir várias e várias vezes a prévia da minha apresentação.

Muito obrigado a todos, inclusive aos que possa ter me esquecido de mencionar e que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

“Hei de vencer!”
(Maria José, minha mãe)

RESUMO

Sendo uma doença de alta incidência no mundo e no Brasil, o câncer de mama causa temor e morte entre as mulheres. Visando uma melhoria da qualidade de vida do paciente e uma maior eficiência dos tratamentos, há uma busca constante por novos medicamentos e formas para transportá-los até os tumores. Neste trabalho, através dos procedimentos de simples e de dupla emulsificação foram sintetizadas nanopartículas poliméricas biodegradáveis de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) contendo o agente antitumoral clorambucil (CHB). Através do processo de nanoencapsulamento espera-se evitar a precipitação sistêmica do fármaco, efeitos adversos indesejados além de aumentar a seletividade e eficiência da quimioterapia. Após o preparo das nanopartículas, foram avaliados parâmetros físico-químicos, morfológicos e citotóxicos, onde se destacam as análises de: distribuição de tamanho, potencial zeta, perfil de liberação *in vitro*, eficiência de encapsulamento, análises térmicas diferenciais e termogravimétricas simultâneas, análises espectroscópicas de absorção eletrônica na região UV-vis, no infravermelho com transformada de Fourier e de fluorescência do clorambucil e fluoresceína, em solução e quando encapsulados na matriz polimérica. As técnicas de microscopia eletrônica de varredura e de espalhamento dinâmico da luz mostraram que as partículas apresentam forma esférica, não porosa, com distribuição de tamanho entre 235,0 e 345,0 nm. As estruturas produzidas apresentaram baixa tendência a se agregarem devido ao valor de potencial zeta (entre -23,0 e -5,90 mV). A eficiência de encapsulamento foi de até 92,0%. A citotoxicidade celular *in vitro* para células tumorais de mama (MCF-7) e para a linhagem de fibroblastos NIH-3T3 foi avaliada através de ensaios de viabilidade com MTT, sendo que, o sistema de liberação se apresentou mais eficiente do que o fármaco na forma livre em diversas concentrações para ambas as linhagens. Dessa forma, os sistemas de liberação produzidos apresentaram-se promissores DDS e poderão contribuir para o aumento da eficiência terapêutica, biodisponibilidade e redução de efeitos adversos.

Palavras chaves: nanopartículas; PLGA; clorambucil; sistema de entrega e liberação controlada de fármacos; método de evaporação do solvente; MCF-7.

ABSTRACT

Being a high incidence of disease in the world and in Brazil, breast cancer causes fear and death among women. With an aim of improving the live quality of patients and greater efficiency of the treatments there is a constant search for new drugs and ways to transport them to the tumor cells. Through the procedures single and double emulsification followed by solvent evaporation were synthesized biodegradable polymeric nanoparticles of poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid containing chlorambucil. This technique has been widely adopted to obtain particles containing hydrophobic drugs and its purpose is to prevent systemic precipitation of the drug, undesirable side effects, increase the selectivity and efficiency of chemotherapy. Were determined physicochemical parameters such as size, morphology and regularity of particles, zeta potential, *in vitro* release profile, encapsulation efficiency. simultaneous differential thermal and thermogravimetric analysis, differential scanning calorimetry, and electronic absorption spectra in the UV-vis region, FTIR spectroscopy and fluorescence of chlorambucil, fluorescein, polymeric matrix and nanoparticles containing these encapsulated compounds were obtained. Scanning electron microscopy which together with the technique of dynamic light scattering showed that the particles showed up spherical, non-porous, with homogeneous distribution in size and diameter up to 235.0-345.0 nm. The structures produced showed no tendency to aggregate due to their negative zeta potential (below -5.90 mV) and the encapsulation efficiency was up to 92.0%. The *in vitro* cell cytotoxicity to breast tumor cells (MCF-7) and the fibroblast line NIH-3T3 cells was evaluated by MTT viability assays, where the release system is made more effective than the free drug for both tumor and fibroblasts cells in several concentrations. Thus, the delivery systems manufactured as showed promising DDS which can contribute to increasing the therapeutic efficacy, bioavailability and reduced adverse effects of chlorambucil.

Key words: nanoparticles; PLGA; chlorambucil; Drug Delivery System; solvent evaporation method; MCF-7; controlled release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Taxas de incidência por 100 mil mulheres de neoplasia na mama estimadas para 2012, segundo Unidade da Federação [2].

Figura 2: Ciclo de replicação celular para células em mitose. Em destaque fases em que um agente alquilante atua impedindo a proliferação celular.

Figura 3: Fórmula estrutural do clorambucil e processo de alquilação do DNA a partir da posição N7 da guanina.

Figura 4: Concentração em função do tempo após administração do fármaco na forma livre em única e em variadas doses, e do fármaco na forma encapsulada em única dose.

Figura 5: Reação de hidrólise do PLGA resultando em seus monômeros ácido D,L-láctico e ácido glicólico.

Figura 6: Fórmula estrutural do sal de fluoresceína sódica.

Figura 7: Fluxograma do processo de obtenção das NPs pelos métodos de simples e dupla emulsão.

Figura 8: Diâmetro hidrodinâmico médio e potencial zeta de NPs de PLGA produzidas com diferentes concentrações de PVA pelo método de simples emulsão.

Figura 9: Curva de calibração para o PVA em água.

Figura 10: Concentração do PVA na solução sobrenadante durante procedimento de lavagem.

Figura 11: Diâmetro hidrodinâmico médio e PDI de NPs de PLGA produzidas com diferentes velocidades de emulsificação através do método de simples emulsão.

Figura 12: Curva de calibração para o CHB em solução água/etanol 1:1.

Figura 13: Curva de calibração para a fluoresceína em água.

Figura 14: Espectro de absorção eletrônica normalizado para CHB livre em água/álcool 1:1.

Figura 15: Espectro de absorção eletrônica normalizado para fluoresceína livre em água.

Figura 16: Espectro de absorção eletrônica normalizado para NPs vazias suspensas em água.

Figura 17: Espectro de absorção eletrônica normalizado para NPs encapsuladas com CHB suspensas em água.

Figura 18: Espectro de absorção eletrônica normalizado para as NPs NP.C&F.II suspensas em água.

Figura 19: Espectros de fluorescência em duas e três dimensões para CHB em água/álcool 1:1.

Figura 20: Espectros de fluorescência em duas e três dimensões para fluoresceína em água.

Figura 21: Espectros de fluorescência em duas e três dimensões para NPs da amostra NP.C&F.II suspensas em água.

Figura 22: Espectros normalizados de emissão de fluorescência para: CHB em água/álcool 1:1; NP.CHB.I suspensa em água e NP.CHB.II suspensa em água, no comprimento de onda de excitação ($\lambda_{exc.}$) igual a 258,0 nm.

Figura 23: Espectros normalizados de emissão de fluorescência para: CHB em solução água/álcool 1:1; NP.CHB.I suspensa em água e NP.CHB.II suspensa em água, $\lambda_{exc.} = 303,0$ nm.

Figura 24: Espectros normalizados de emissão de fluorescência para: fluoresceína em água e NP.C&F.II suspensa em água, $\lambda_{exc.} = 303,0$ nm.

Figura 25: Espectros normalizados de emissão de fluorescência para: fluoresceína em água, NP.C&F.II suspensa em água e NP.FSC.II suspensa em água $\lambda_{exc.} = 491,0$ nm.

Figura 26: Espectro de FTIR do fármaco CHB na forma livre em pastilha de KBr.

Figura 27: Espectro de FTIR da matriz polimérica em pastilha de KBr.

Figura 28: Espectro de FTIR das NPs de PLGA contendo CHB em pastilha de KBr.

Figura 29: Curvas TGA/DTA do fármaco CHB na forma livre.

Figura 30: Curvas TGA/DTA da matriz polimérica.

Figura 31: Curvas TGA/DTA do fármaco CHB encapsulado.

Figura 32: Curva DSC normalizada para o fármaco CHB na forma livre.

Figura 33: Curva DSC normalizada da matriz polimérica.

Figura 34: Curva DSC normalizada do CHB encapsulado.

Figura 35: Perfil de liberação obtido em triplicata durante sete dias para NPs da amostra NP.CHB.I, suspensas em PBS e mantidas em banho a 37,0° C.

Figura 36: Perfil de liberação obtido em triplicata durante sete dias para NPs da amostra NP.CHB.II, suspensas em PBS e mantidas em banho a 37,0° C.

Figura 37: Perfil de liberação obtido em triplicata durante sete dias para NPs da amostra NP.C&F.II, suspensas em PBS e mantidas em banho a 37,0° C.

Figura 38: Média para o perfil de liberação para as NPs das amostras NP.CHB.I, NP.CHB.II e NP.C&F.II.

Figura 39: Ensaio cinético contínuo realizado durante o período de 7 horas para as NPs das amostras NP.CHB.I e NP.CHB.II, suspensas em PBS e mantidas em banho a 37,0° C.

Figura 40: Perfil de liberação da fluoresceína obtido durante 9 dias para as NPs da amostra NP.C&F.II, suspensas em PBS e mantidas em banho a 37,0° C.

Figura 41: Análises de tamanho em função da intensidade das NPs suspensas em água para: A – NP.CHB.I (10 mg) e B – NP.CHB.II (10 mg).

Figura 42: Análises de tamanho em função da intensidade das NPs suspensas em água, para: A – NP.CHB.I (30 mg) e B – NP.CHB.II (30 mg).

Figura 43: Análises de tamanho em função da intensidade das NPs suspensas em água, para: A – NP.CHB.I (40 mg) e B – NP.CHB.II (40 mg).

Figura 44: Análises de tamanho em função da intensidade das NPs suspensas em água, para: A – NP.C&F.II (10 mg) e B – NP.FSC.II.

Figura 45: Variação do tamanho das NPs vazias suspensas em PBS durante o período de oito dias nas temperaturas: -2,0° C; 25,0° C e 37,0° C.

Figura 46: Variação do índice de polidispersão das NPs vazias suspensas em PBS durante o período de oito dias nas temperaturas: -2,0° C; 25,0° C e 37,0° C.

Figura 47: Variação do tamanho das NPs contendo CHB suspensas em PBS durante o período de oito dias nas temperaturas: -2,0° C; 25,0° C e 37,0° C.

Figura 48: Variação do índice de polidispersão das NPs contendo CHB suspensas em PBS durante o período de oito dias nas temperaturas: -2,0° C; 25,0° C e 37,0° C.

Figura 49: Análises de potencial zeta em triplicatas das NPs suspensas em água: A – NP.0.I e B – NP.0.II.

Figura 50: Análises de potencial zeta em triplicatas das NPs suspensas em água: A – NP.CHB.I (10 mg) e B – NP.CHB.II (10 mg).

Figura 51: Análises de potencial zeta em triplicatas das NPs suspensas em água: A – NP.CHB.I (30 mg) e B – NP.CHB.II (30 mg).

Figura 52: Análises de potencial zeta em triplicatas das NPs suspensas em água: A – NP.CHB.I (40 mg) e B – NP.CHB.II (40 mg).

Figura 53: Análises de potencial zeta em triplicatas das NPs suspensas em água: A – NP.C&F.II (10 mg) e B – NP.FSC.II.

Figura 54: Imagens de MEV obtidas com aumento de 10.000 vezes para as amostras: A – NP.0.I; B – NP.0.II; C – NP.CHB.I e D – NP.CHB.II.

Figura 55: Espectro de EDS das NPs da amostra NP.0.I e imagem de MEV utilizada para sua realização obtida com aumento de 10.000 vezes.

Figura 56: Espectro de EDS das NPs da amostra NP.CHB.I e imagem de MEV utilizada para sua realização obtida com aumento de 10.000 vezes.

Figura 57: Diâmetro das NPs estimado através da manipulação das imagens obtidas por MEV usando o programa ImageJ[®].

Figura 58: Ensaio de viabilidade empregando-se como tratamento NPs vazias em células das linhagens NIH-3T3 e MCF-7.

Figura 59: Ensaio de viabilidade empregando-se como tratamento CHB livre e NPs encapsuladas com CHB em células da linhagem NIH-3T3.

Figura 60: Ensaio de viabilidade empregando-se como tratamento CHB livre e NPs encapsuladas com CHB em células da linhagem MCF-7.

Figura 61: (A) Corte transversal em micro/nanoesfera de PLGA e (B) esquema de uma micro/nanoesfera com seus sítios de localização do fármaco.

Figura 62: Representação esquemática do potencial zeta [156].

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativa dos dez tipos de câncer mais incidentes em mulheres no Brasil em 2012.

Tabela 2: Identificação das NPs, seu(s) principal(ais) constituinte(s) e método de obtenção.

Tabela 3: Tamanho, PDI e potencial zeta em função da variação da velocidade de emulsificação.

Tabela 4: Rendimento médio obtido para o processo de obtenção das amostras estudadas.

Tabela 5: Eficiência de encapsulamento das NPs preparadas com CHB.

Tabela 6: Eficiência de encapsulamento das NPs preparadas com fluoresceína.

Tabela 7: Pico de emissão de fluorescência em função dos comprimentos e composto(s) excitado(s).

Tabela 8: Bandas de absorção no FTIR observadas para CHB livre; PLGA e CHB encapsulado.

Tabela 9: Eventos térmicos observados durante as análises simultâneas de TGA/DTA para as amostras de CHB Livre; PLGA e CHB encapsulado.

Tabela 10: Eventos térmicos observados durante as análises de DSC para as amostras de CHB Livre; PLGA e CHB encapsulado.

Tabela 11: Valores obtidos para média do diâmetro hidrodinâmico das NPs por DLS.

Tabela 12: Valores obtidos para média do potencial zeta das NPs

Tabela 13: Valores obtidos para média do tamanho das NPs através de MEV.

Tabela 14: Viabilidade obtida para as duas linhagens celulares (NIH-3T3 e MCF-7) nas diferentes concentrações de NPs de PLGA vazias.

Tabela 15: Viabilidade obtida para a linhagem celular NIH-3T3 nas diferentes concentrações de CHB utilizadas nos tratamentos com CHB na forma livre e CHB na forma encapsulada.

Tabela 16: Viabilidade obtida para a linhagem celular MCF-7 nas diferentes concentrações de CHB utilizadas nos tratamentos com CHB na forma livre e CHB na forma encapsulada.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\%_{(m/v)}$: Título em massa de soluto para volume de solvente

%EE: Porcentagem de Eficiência de Encapsulamento

ACS: American Chemical Society

ASTM: American Society for Testing and Materials

ATR: Attenuated Total Reflectance (refletância total atenuada)

CCNS: Cell Cycle-NonSpecific (ciclo celular não-específico)

CCS: Cell Cycle-Specific (ciclo celular específico)

CHB: Chlorambucil (clorambucil)

DDS: Drug Delivery System (sistemas transportadores de fármaco)

DLS: Dynamic Light Scattering (Espalhamento Dinâmico da Luz)

D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (meio Eagle modificado por Dulbecco)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Desoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)

DSC: Differential Scanning Calorimetry (calorimetria exploratória diferencial)

DTA: Differential Thermal Analysis (análise térmica diferencial)

Et al: e outros

EDS: Energy Dispersive Spectroscopic (espectroscopia de energia dispersiva)

EDTA: Ethylenediaminetetracetic acid disodium salt 2-hydrate (Ácido etilenodiaminotetraacético sal disódica 2-hidrato)

EUA: Estado Unidos da América

FDA: U.S. Food and Drug Administration

FSC: Fluoresceína

FTIR: Fourier Transform Infrared (infravermelho com transformada de Fourier)

IB/UnB: Instituto de Biologia/Universidade de Brasília

INCA: Instituto Nacional de Câncer

ISC: InterStrand Cross-link (ligações cruzadas interfilamentares)

JPN: Japan (Japão)

LCD: Liberação Controlada da Droga

MCF-7: Michigan Cancer Foundation - 7

MP(s): Micropartícula(s)

MS: Ministério da Saúde

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium

NCD: Non-Communicable Diseases (doenças não transmissíveis)

NIH: National Institutes of Health (Instituto de Saúde dos Estados Unidos)

NP.0.I: NP(s) somente de PLGA obtida(s) por simples emulsão

NP.0.II: NP(s) somente de PLGA obtida(s) por dupla emulsão

NP.C&F.II: NP(s) encapsulada(s) com clorambucil e fluoresceína

NP.CHB.I: NP(s) encapsulada(s) com clorambucil obtida por simples emulsão

NP.CHB.II: NP(s) encapsulada(s) com clorambucil obtida por dupla emulsão

NP.FSC.II: NP(s) encapsulada(s) somente com fluoresceína

NP(s): Nanopartícula(s)

P.A.: Para Análise

PBS: Phosphate Buffered Saline (Solução Tamponada de Fosfato)

PDI: PolyDispersity Index (índice de polidispersão)

PEG: PolyEthylene Glycol (polietileno glicol)

PGA: PolyGlycolic Acid (ácido poliglicólico)

pH: atividade do íon hidroxônio

pK_a : cologarítimo da constante de dissociação ácida

PL: Perfil de Liberação

PLA: PolyLactic Acid (ácido polilático)

PLGA: Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide Acid) (ácido poli(D,L-lático-co-glicólico))

PVA: PolyVinyl Alcohol (álcool polivinílico)

rpm: rotações por minuto

SBF: Soro Fetal Bovino

SD: Standard Deviation (desvio padrão)

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM, Scanning Electron Microscopy)

T_g : temperatura de transição vítrea

TGA: ThermoGravimetric Analysis (análise termogravimétrica)

UV-vis: Ultravioleta-visível

W/O: water/oil

WHO: World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

$\lambda_{exc.}$: Comprimento de onda de excitação

Φ_f : rendimento quântico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	O CÂNCER	20
1.1.1	O que é o Câncer	20
1.1.2	Incidência e Mortalidade no Brasil e no Mundo	21
1.1.3	O Câncer de Mama	22
1.2	O TRATAMENTO	24
1.2.1	Tratamentos Convencionais	24
1.2.2	Os Quimioterápicos	25
1.2.3	O Clorambucil	26
1.2.4	Efeitos Indesejados na Aplicação dos Quimioterápicos	28
1.3	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO	29
1.3.1	Matrizes Poliméricas	32
1.3.2	O PLGA	32
1.3.3	Métodos de Preparo de DDS Poliméricos	34
1.3.4	Sonda Fluorescente	38
1.3.5	Aplicação dos DDS no Tratamento/Diagnóstico do Câncer	39
2	OBJETIVOS	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	MATERIAIS	42
3.1.1	Reagentes	42
3.1.2	Equipamentos	44
3.2	SOLUÇÕES	45
3.2.1	Soluções Estoque de NaOH e HCl 0,1 mol/L	45
3.2.2	Soluções Estoque de Álcool Polivinílico	46

3.2.3	Solução Estoque de Água/Etanol 1:1	46
3.2.4	Solução Tampão Fosfato de Sódio	46
3.2.5	Solução de Azul de Tripán	46
3.2.6	Solução de MTT	47
3.2.7	Solução de Tripsina-EDTA.....	47
3.2.8	Solução de D-MEM	47
3.2.9	Solução de Soro Bovino Fetal.....	47
3.2.10	Meio Nutritivo Completo	48
3.3	CURVAS DE CALIBRAÇÃO	48
3.3.1	Curva do PVA	48
3.3.2	Curva do CHB.....	48
3.3.3	Curva da Fluoresceína.....	49
3.4	PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS.....	49
3.4.1	Simplem Emulsificação e Evaporação do Solvente	50
3.4.2	Produção de NPs Pelo Método de Dupla Emulsão.....	50
3.5	CARACTERIZAÇÃO DAS NPs	52
3.5.1	Medidas Espectroscópicas	52
3.5.1.1	<i>Espectroscopia de Fluorescência</i>	52
3.5.1.2	<i>Espectroscopia FTIR</i>	52
3.5.1.3	<i>Espectroscopia de Absorção Molecular – UV-vis</i>	53
3.5.2	Análises Térmicas.....	53
3.5.2.1	<i>Termogravimétrica/Diferencial Simultânea (TGA/DTA)</i>	53
3.5.2.2	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	54
3.5.3	Eficiência de Encapsulamento	54
3.5.4	Perfil de Liberação	55
3.5.5	Tamanho e Índice de Polidispersão	56
3.5.6	Potencial Zeta	57

3.6	ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS NPs	57
3.7	AVALIAÇÃO CITOTÓXICA	58
3.7.1	Descongelamento das Linhagens Celulares.....	58
3.7.2	Manutenção das Células.....	59
3.7.3	Transferência das Células	59
3.7.4	Contagem Celular	59
3.7.5	Congelamento de Células.....	60
3.7.6	Ensaio de Viabilidade	60
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS E GRÁFICAS.....	62
3.9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
4	RESULTADOS	63
4.1.	PARÂMETROS DE PRODUÇÃO DAS NPs	63
4.1.1	Concentração de PVA	63
4.1.2	Extração do PVA.....	64
4.1.3	Velocidade de Emulsificação	65
4.1.4	Rendimento do Processo.....	66
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS NPs	67
4.2.1	Eficiência de Encapsulamento	67
4.2.1.1	<i>Eficiência de Encapsulamento das NPs de CHB.....</i>	<i>67</i>
4.2.1.2	<i>Eficiência de Encapsulamento das NPs com FSC</i>	<i>68</i>
4.2.2	Análises Espectroscópicas das NPs.....	69
4.2.2.1	<i>Espectroscopia de Absorção Eletrônica</i>	<i>69</i>
4.2.2.2	<i>Espectroscopia de Fluorescência</i>	<i>72</i>
4.2.2.3	<i>Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)</i>	<i>77</i>
4.2.3	Análises Calorimétricas e Termogravimétricas	79
4.2.3.1	<i>TGA/DTA Simultâneos</i>	<i>79</i>
4.2.3.2	<i>DSC.....</i>	<i>81</i>

4.2.4	Perfil de Liberação	83
4.2.5	Diâmetro Hidrodinâmico e Distribuição de Tamanho.....	86
4.2.6	Estabilidade Física das NPs em Suspensão.....	89
4.2.7	Potencial Zeta	92
4.3.	ANÁLISE MORFOLÓGICA	95
4.4.	ENSAIO BIOLÓGICO.....	98
5	DISCUSSÃO	101
6	CONCLUSÃO.....	118
	REFERÊNCIAS.....	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER

1.1.1 O que é o Câncer

Câncer é um termo que descreve um grupo com mais de 100 doenças que podem afetar várias partes do corpo. É definido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, *World Health Organization*) e pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) como células que se diferenciam das demais crescendo rapidamente de forma desordenada (neoplasias), que podem formar tumores (acumulo de células cancerosas) e migrar para tecidos próximos ou mesmo órgãos distantes (metástase) [1-3].

No núcleo de uma célula estão contidos cromossomos compostos por genes os quais possuem toda a informação genética de um indivíduo. Através do ácido desoxirribonucleico (DNA, *Desoxyribonucleic Acid*) instruções são fornecidas para que ocorra a organização estrutural e o desempenho das funções celulares. Possuir o genoma completo em cada célula fornece versatilidade e autonomia, mas, se torna um risco, pois mutações genéticas que alteram o DNA podem ocorrer em células normais que passam a realizar suas funções de forma equivocada. Se essa alteração ocorrer em genes denominados proto-oncogenes, que a princípio são inativos em células normais, esses se transformam em oncogenes e as células em tumorais. O surgimento de células cancerosas também pode ocorrer das alterações do genoma em genes supressores de tumores, que controlem direta ou indiretamente a proliferação celular ou, inclusive, em alterações epigenéticas [4;5].

Os vários tipos de câncer provem dos diferentes tipos celulares, sendo que, quando se originam de células epiteliais o câncer é classificado como carcinoma (de maior incidência), e como sarcoma se sua origem for de células conjuntivas. As causas dessa origem são variadas, podendo ser externas (traumas, exposição a agentes químicos como as substâncias derivadas do cigarro, de alguns medicamentos, da poluição atmosférica, agentes biológicos como o contato com

determinados vírus) ou internas ao organismo (mudanças hormonais, hereditariedade, deficiência do sistema imunológico). Essa vasta combinação de mutações desencadeia outras patologias, tornando a cura do câncer um grande desafio. Após a célula cancerosa ser submetida aos carcinógenos oncopromotores, irreversivelmente ela irá se multiplicar mais rapidamente do que as células normais devido à ausência de resposta a fatores de inibição de crescimento e evasão ao processo de apoptose (morte celular “programada”). Elas também poderão produzir novos vasos sanguíneos (angiogênese) e invadir tecidos saudáveis [6].

Sendo as células tumorais pouco específicas em suas funções orgânicas, conseqüentemente, com o tempo os tecidos invadidos acabam perdendo suas funcionalidades e o órgão entra em falência. Resumidamente, esse é só o início do processo denominado carcinogênese que normalmente ocorre de forma lenta, podendo levar longos períodos até que as manifestações clínicas da doença sejam observadas [7].

1.1.2 Incidência e Mortalidade no Brasil e no Mundo

Relatório publicado em 2011 pela WHO contendo informações sobre o perfil das doenças não transmissíveis (NCD, *Non-Communicable Diseases*) de 193 países afirma que estas são as principais causas de morte no mundo, correspondendo a 63,0% das 57,0 milhões de mortes estimadas para 2008. Dentre as mais relevantes NCD estão as doenças descritas como câncer, que com aproximadamente 7,6 milhões de mortes em 2008 assumem o posto de segunda principal causa de mortes por NCD. Esses dados vêm crescendo com o tempo, e previsões indicam que em 2030 poderão ocorrer 27,0 milhões de casos incidentes, 17,0 milhões de mortes e 75,0 milhões de pessoas convivendo com a doença [1].

Acima da média mundial, o Brasil registrou em 2008 74,0% de mortes devidas alguma NCD, sendo que, dessas, 16,0% corresponderam a mortes causadas por câncer. O INCA estima que ocorram 518.510 novos casos de câncer no Brasil em 2012, e um valor similar em 2013. Trata-se de um problema de saúde pública que atinge diferentes regiões não distinguindo gênero ou classe social [2;3;8].

1.1.3 O Câncer de Mama

O câncer de mama é o segundo tipo mais frequente de câncer no mundo com 1,40 milhões de novos casos em 2008, sendo considerado o quinto mais fatal, com 458,0 mil óbitos e o mais comum entre as brasileiras. Cerca de 50,0 mil novos casos são diagnosticados anualmente no Brasil, com maior incidência entre mulheres acima de 50 anos [3]. As regiões Sul, Sudeste e o Distrito Federal apresentam os maiores índices desse tipo de câncer do país (figura 1), com elevadas taxas de mortalidade devido ao diagnóstico tardio [2;3;9].

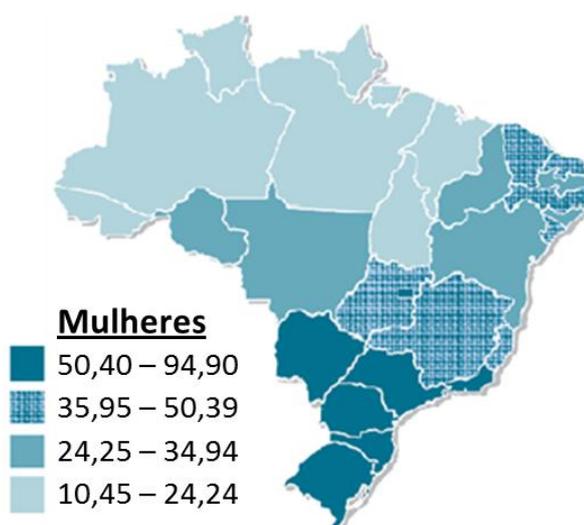


Figura 1: Taxas de incidência por 100 mil mulheres de neoplasia na mama estimadas para 2012, segundo Unidade da Federação [2].

Pesquisas indicam que a incidência dessa doença vem aumentando em países desenvolvidos e em desenvolvimento. O INCA contabilizou no ano de 2010 um total de 12.852 mortes, sendo que, dessas 98,80% ocorreram com mulheres. Projeções indicam que no Brasil deverão surgir 52.680 novos casos no ano de 2012 (tabela 1). Diagnosticado em sua fase inicial e empregando-se o tratamento adequado, estudos demonstram que a chance de cura desse tipo de câncer é elevada [2;9].

Tabela 1: Estimativa dos dez tipos de câncer mais incidentes em mulheres no Brasil em 2012.

Localização Primária	Novos Casos	Percentual
Mama feminina	52.680	27,9%
Colo de útero	17.540	9,3%
Cólon e reto	15.960	8,4%
Glândula tireoide	10.590	5,6%
Traqueia, brônquio e pulmão	10.110	5,3%
Estômago	7.420	3,9%
Ovário	6.190	3,3%
Corpo do útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema nervoso central	4.450	2,4%

Fonte: Estimativa 2012, Incidência de Câncer no Brasil, MS/INCA, 2011.

É um câncer que possui etiologia multifatorial sendo influenciado por fatores individuais, genéticos, ambientais, reprodutivos e hormonais. A gradual polarização celular é um dos indicativos de alterações neoplásicas em tecidos mamários. Nos casos mais comuns observam-se carcinomas originados de mutações do gene BRCA2 em células constituintes dos dutos galactóforos (carcinoma ductal) e dos lóbulos mamários (carcinomas lobulares), e com menos frequência, mas não menos agressivos, como mutações no gene BRCA1 associados aos carcinomas medulares [7].

Em 1970, células derivadas de metástase de carcinoma ductal invasivo foram isoladas de uma paciente e estabelecidas como uma linhagem celular permanente classificada como MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation - 7*). As células MCF-7 apresentam fenótipo tumoral e sua presença resulta na formação de espaços luminiais muito diferentes dos observados em células saudáveis. É uma linhagem que cresce de forma aderente ao substrato, responde positivamente à presença de estrógeno e não possui Caspase 3. Foi a linhagem celular derivada de câncer de mama utilizada neste estudo [10].

1.2 O TRATAMENTO

1.2.1 Tratamentos Convencionais

Sendo o câncer resultado de uma série de alterações genéticas que podem ocorrer ao acaso, não existem dois casos que sejam geneticamente idênticos. Cada tipo de câncer apresenta variados graus de malignidade e/ou agressividade de acordo com sua localização e os tipos celulares que lhe deram origem. Estes fatos conduzem a uma diversificação das medidas terapêuticas e/ou condutas clínicas a serem adotadas para o seu diagnóstico e tratamento. Sendo assim, o tratamento clínico a ser empregado para conter a evolução, disseminação e possível eliminação do câncer é variado e requer cuidadosa seleção de uma ou mais intervenções, tais como: cirurgia(s), radioterapia(s), quimioterapia(s), transplantes entre outros [11;12].

Para determinados casos, o tratamento cirúrgico pode ser uma opção para controle ou cura do câncer. Entre seus riscos encontram-se os comuns aos diversos procedimentos cirúrgicos como complicações durante a operação, alterações fisiológicas e mutilações. No caso do câncer de mama, as cirurgias consistem na remoção total ou parcial da mama e de nódulos linfáticos adjacentes. Esse procedimento pode causar efeitos colaterais como: diminuição da autoestima, fraqueza e incomodo no braço adjacente a cirurgia, suor nas mãos entre outros [11].

Na radioterapia, variadas fontes de radiação ionizante (eletromagnéticas ou corpusculares) são utilizadas visando extirpar ou impedir o crescimento tumoral em consequência da ocorrência de diversas reações químicas que restrinjam a multiplicação e/ou o funcionamento normal das células. Podem ser realizadas de forma externa ou cirúrgica (braquiterapia). No tratamento com radiação externa, um aparelho (elétrico, acelerador linear ou contendo radioisótopos) emite radiação sobre a região onde se encontra o tumor. Na braquiterapia a radiação é aplicada através da introdução de um radioisótopo em região próxima ao tumor. A impossibilidade de seletividade faz com que em ambos os tratamentos radioterápicos tecidos saudáveis circunvizinhos ao(s) tumor(es) sejam atingidos, causando indesejados efeitos adversos como anovulação, azoospermia, epitelites, mucosites, mielodepressão, atrofia, fibrose entre outros [13].

As quimioterapias são tratamentos voltados para combater e eliminar tumores através do uso de antineoplásicos variados que causam efeitos citotóxicos em células tumorais inibindo a evolução do tumor através do ataque a passos metabólicos essenciais à proliferação celular. Frequentemente são aplicados pela via venosa, mas também podem ser administrados via oral, intramuscular, subcutânea, tópica, intratecal e outras. Quando administrados, os antineoplásicos se misturam aos fluidos corporais e são distribuídos sistemicamente [14;15;16].

O tratamento quimioterápico que utiliza o antitumoral clorambucil será melhor descrito a seguir. Serão apresentados alguns dos efeitos adversos observados atualmente após a administração deste e de outros fármacos semelhantes. Em seguida será apresentada uma proposta para sua nanoestruturação visando maior eficiência e redução de respostas adversas em tratamentos clínicos quimioterápicos.

1.2.2 Os Quimioterápicos

Antineoplásicos podem agir diretamente sobre células tumorais em seu ciclo de replicação celular (fase G₁, S, G₂ ou M da figura 2), sendo denominados fármacos ciclo-celular específicos (CCS, *Cell Cycle-Specific*). Eles podem também atacar as células independentemente delas estarem ou não se proliferando (todas as fases da figura 2) sendo denominados fármacos ciclo-celular não-específicos (CCNS, *Cell Cycle-NonSpecific*) [4;17-19;23].

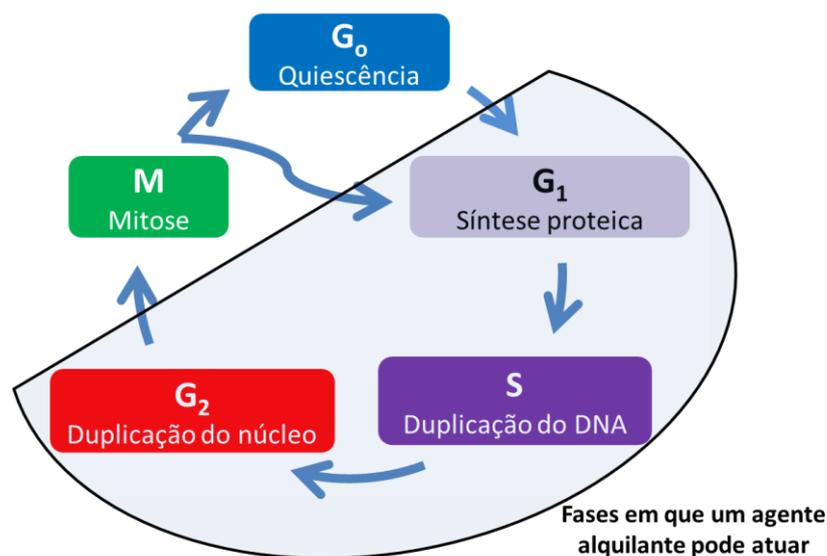


Figura 2: Ciclo de replicação celular para células em mitose. Em destaque fases em que um agente alquilante atua impedindo a proliferação celular.

Devido à presença de grupos eletrofílicos, agentes alquilantes podem interagir com centros nucleofílicos da macromolécula do DNA formando ligações intra/interfilamentares. As ligações cruzadas interfilamentares (ISC, *Interstrand Cross-link*) são mais citotóxicas do que as provindas da alquilação de um único filamento de DNA, pois, são mais difíceis de serem reparadas exigindo mecanismos complexos. Essas ISC podem inibir a replicação do DNA e assim impedir a multiplicação celular. O principal sítio de alquilação no DNA é o grupo amina da guanina localizado na posição 7 (N7), porém, com menor frequência, outras bases nitrogenadas também podem ser alquiladas, como a adenina pelas posições N1 e N3, a citosina pela posição N3 e a carbonila da guanina na posição 6 (O6). Grupos fosfato e proteínas associadas ao DNA também podem ser alvo desse processo [4;23;44;148].

As mostardas nitrogenadas são moléculas alquilantes muito estudadas e administradas como antineoplásicos. São metabolizadas no fígado pelas fosfamidasas resultando em metabólitos alquilantes que formam ISC no DNA principalmente durante a ocorrência das fases G1, S e G2 do ciclo celular (região em destaque da figura 2). São antitumorais clássicos que podem ser representados pelos fármacos mecloretamina, ciclofosfamida, isofosfamida, melfalam e clorambucil (fármaco utilizado nesse trabalho) [4;149;159;160].

1.2.3 O Clorambucil

O ácido 4-[4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil]butanoico denominado clorambucil (CHB, *chlorambucil*) é conhecido clinicamente como Leukeran[®] (figura 3A) e foi sintetizado pela primeira vez por Everett *et al* [147]. Este agente alquilante bidentado é lipofílico, possui pK_a de 5,80 e em meio aquoso é hidrolisado [17-19]. Após sua administração, o composto é metabolizado e as cadeias de 2-cloroetil de seus metabólitos passam por um processo de ciclização intramolecular com a liberação do cloro (como Cl⁻). Esse processo resulta em um derivado altamente eletrofílico denominado etileno imônio (figura 3B). A instabilidade do anel formado faz com que ele se abra formando o íon carbocátion (figura 3C) que é altamente reativo e pode reagir com qualquer centro nucleofílico presente no meio celular, mas principalmente, com a guanina do DNA em sua posição N7 gerando 7-alkilguanina

(figura 3D). O entrecruzamento resultando na formação das ISC ocorre quando ambos os grupos cloreto reagem através desse processo [17-21].

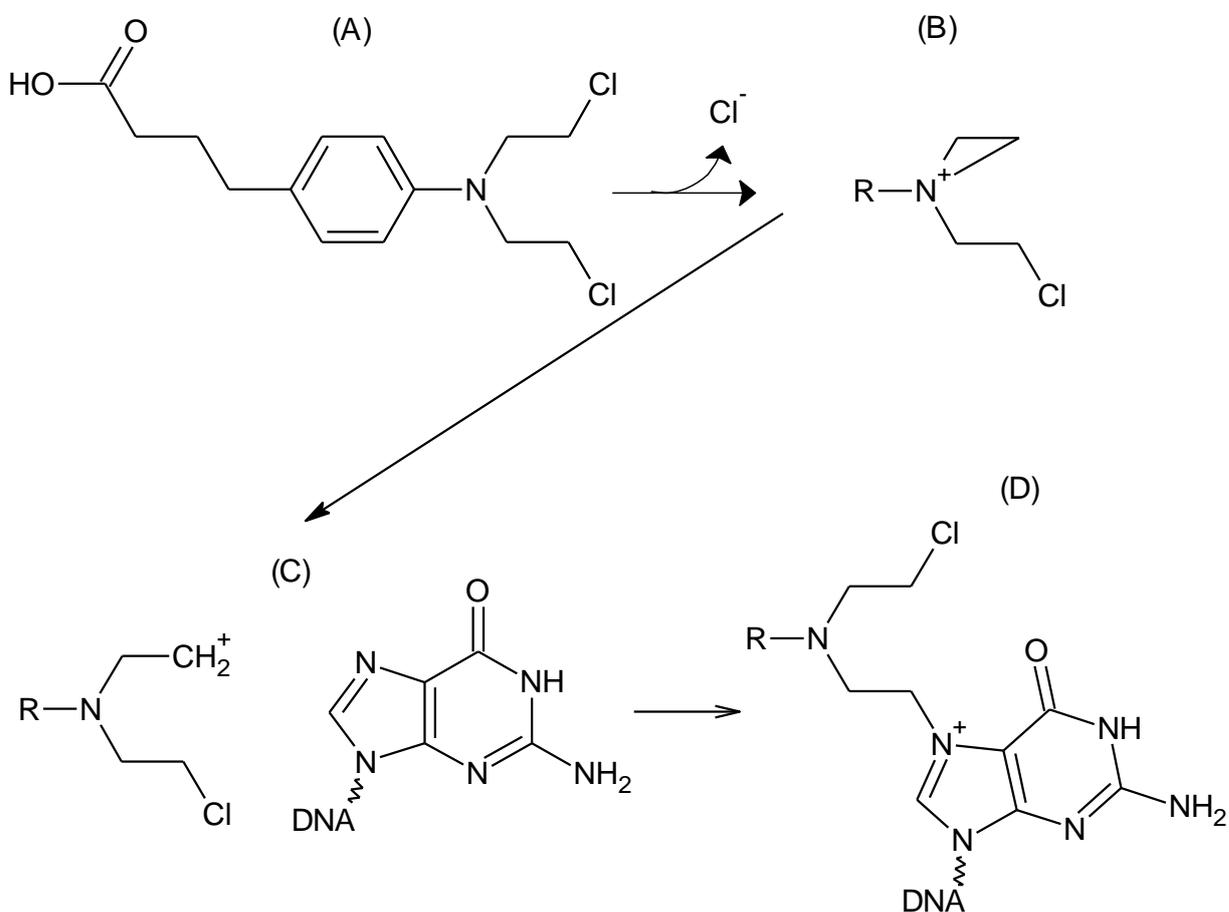


Figura 3: Fórmula estrutural do cloramubicil (A) e processo de alquilação do DNA a partir da posição N7 da guanina. Na sequência, após metabolização do CHB e processo de oxidação que resulta na perda de um grupo cloreto, ocorre a ciclização intramolecular do grupamento bis(cloretoil)amina (B) e a formação de um carbocátion instável (C) que reage com a guanina em N7 (D).

Um dos efeitos dessa alquilação é a remoção da guanina e consequentemente o rompimento da cadeia principal do DNA. Pode ocorrer também o pareamento da alquil-guanina com timina em vez de guanina com citosina. Sua atuação ocorre principalmente quando algumas regiões do DNA não estão pareadas e mais suscetíveis a alquilação. A fase S apresenta essas características, resultando a alquilação nesse processo no bloqueio da fase G2 e consequentemente na morte celular por apoptose [18;20-23;147-149].

O CHB tem sido utilizado clinicamente contra leucemia linfóide crônica, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, câncer avançado de ovário, de testículo, de mama e outros. Comumente é administrado por via oral através de comprimidos

contendo cada 2,0 ou 5,0 mg do composto. É absorvido no trato gastrointestinal e metabolizado principalmente pelo fígado, ambos de forma rápida e eficiente. O CHB e seus metabólitos ligam-se facilmente às proteínas do plasma e tecidos e vem se mostrado causador de danos em cromossomos [19;21;149;159;160].

Apesar de sua valiosa contribuição no tratamento do câncer, há fortes evidências de que dentre os efeitos indesejáveis ocasionados pelo CHB encontra-se a própria carcinogênese através da indução de leucemia não-linfocítica ocasionada pela supressão prolongada da medula óssea e câncer na bexiga. Foi listado como agente cancerígeno em humanos desde 1985 no quarto relatório anual sobre carcinógenos, e também como um agente mutagênico, teratogênico e que pode induzir a esterilidade humana temporária ou permanente (redução da gametogênese), principalmente em homens. Outros fatores que reforçam a limitação da aplicabilidade do CHB são: reações alérgicas, hepatotoxicidade, convulsões, transtornos gastrointestinais, fibrose pulmonar e toxicidades ocasionadas pela sua insolubilidade plasmática [11;21;160].

1.2.4 Efeitos Indesejados na Aplicação dos Quimioterápicos

A administração de um fármaco da forma convencional pode não atingir seu alvo pré-estabelecido (ou não atingir somente esse alvo) e a distribuição sistêmica pode não ocorrer da forma como desejada [22]. Nessas condições o fármaco atua em células tumorais e em células saudáveis causando vários efeitos adversos. Seus efeitos terapêuticos também podem não ser plenamente alcançados sendo requisitadas doses em elevadas concentrações. Sob essas condições, por exemplo, um fármaco hidrofóbico como o CHB pode precipitar formando agregados no meio fisiológico resultando em efeitos tóxicos [23]. Além disso, entre o local da administração e o tecido alvo há uma série de obstáculos de natureza anatômica, química e/ou biológica que podem bloquear a ação do medicamento [24]. Há também a possibilidade do composto ser rapidamente metabolizado pelo organismo dificultando a aprovação de promissores fármacos para aplicação imediata em quimioterapias. Outro problema a ser enfrentado é a aquisição pela célula tumoral de resistência ao fármaco [22-24].

Visando contornar esses e outros problemas, sistemas que transportem agentes ativos e que apresentem fácil acesso às células comprometidas, vem sendo desenvolvidos para o diagnóstico, tratamento e prevenção de inúmeras doenças. Alguns desses sistemas serão apresentados a seguir, juntamente com o material formador de sua estrutura (matriz polimérica) e possíveis modos de produção.

1.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO

Através da micro/nanoestruturação são produzidos filmes, fios, partículas, lipossomas, micelas, dendrímeros, eritrócitos isolados, entre outros, com propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas e químicas bastante diferentes das observadas ao nível macroscópico [25-27]. Devido essas estruturas apresentarem tamanho comparável ao de entidades biológicas, como células, vírus, moléculas, proteínas e até mesmo genes e DNA [28-32], torna-as adequadas para serem utilizadas como sistemas de liberação de fármaco (DDS – *Drug Delivery Systems*). Através de um DDS pode-se transportar uma grande quantidade de fármaco sem que os problemas mencionados no tópico anterior ocorram [33-35].

Dessa forma, pode-se superar defesas naturais como células do sistema imune e a degradação oxidativa prematura do fármaco protegendo-o, por exemplo, do trato gastrointestinal [36]. Sem alterar a estrutura química do fármaco, em um DDS o agente ativo pode ser mais estável do que quando administrado na forma livre, convertido da forma líquida em sólida, ter sua volatilidade reduzida, seu odor e/ou sabor mascarado(s) [37-41].

Outra vantagem que os DDS podem apresentar é a liberação controlada da droga (LCD) de forma sustentada e prolongada, evitando super ou subdosagens (figura 4). A LCD eleva a biodisponibilidade do fármaco e resulta em efeito terapêutico prolongado dentro de uma faixa segura, com alta eficácia e baixa toxicidade [42-44]. Dessa forma, o tratamento pode apresentar menores custos (menor quantidade de fármaco será necessária) e maiores índices de aceitação pelo paciente (menos doses serão aplicadas em maiores intervalos de tempo).



Figura 4: Concentração em função do tempo após administração do fármaco na forma livre em única (— verde) e em variadas doses (— azul), e do fármaco na forma encapsulada em única dose (— vermelho).

A LCD pode ocorrer de forma gradual pela difusão do agente ativo através dos poros da matriz polimérica [38;45] ou pela fragmentação da matriz polimérica biodegradável ocasionada por variações físico-químicas do meio em que os DDS se encontram (temperatura, pH, hidrólise) [22;33;34]. Resumidamente, a liberação do fármaco depende de quatro diferentes fatores:

- Dessorção do fármaco da superfície;
- Difusão do fármaco através da matriz polimérica;
- Erosão da matriz polimérica;
- E a combinação desses processos (dessorção, difusão e erosão).

O tamanho das partículas tem relação inversa com o perfil de LCD, e sistemas menores liberam quantidades maiores de fármaco em períodos curtos, devido o pequeno espaço de difusão e a alta área superficial. Métodos como difusão em sacos de diálise, ultracentrifugação, filtração a pressão reduzida e ultrafiltração seguida de centrifugação têm sido utilizados para estimar esse perfil [27-30;49-53].

A funcionalização da superfície dessas partículas fixando um ligante que tenha interação com receptores específicos de determinado tecido pode otimizar a administração do ativo transportando-o até o sítio de ação desejado de forma seletiva. Através desse procedimento pode-se simultaneamente obter uma melhora farmacológica e uma redução de efeitos adversos. Componentes que podem ser adicionados aos DDS para direcioná-los a uma região específica são anticorpos monoclonais, peptídeos, compostos magnéticos, hormônios, proteínas, lecitinas, entre outros [18;26-28;30-35;50].

A adsorção do ligante polietilenoglicol (PEG) reduz a hidrofobicidade da superfície das partículas. No entanto, a adição de PEG ao DDS pode resultar na redução da eficiência de encapsulação de fármacos, devido ao seu impedimento estérico [46-49].

Há grande controvérsia quanto à classificação dessas nanoestruturas em relação a sua escala de tamanho. Neste trabalho, partículas que apresentaram diâmetro menor do que 1,0 μm foram consideradas como nanopartículas (NPs) e partículas com diâmetro superior à 1.000,0 nm foram classificadas como micropartículas (MPs) [24;33;51]. Os DDS que apresentam dimensões nanométricas são adequados para serem administrados através de diferentes vias como oral, parenteral, endovenosa e tópica [52-56]. Sabe-se que a biodistribuição de partículas com diâmetro entre 0,01 e 1,0 μm é facilmente conduzida através dos vasos sanguíneos [57;58]. As MPs/NPs poliméricas, biodegradáveis ou não, utilizadas como DDS podem ser classificadas de duas formas que se diferenciam principalmente pela composição e estrutura [24;59;60].

- MICRO/NANOESFERA: sólido esférico formado por um emaranhado polimérico;
- MICRO/NANOCAPSULA: reservatório vesicular formado por filme polimérico que circunda um núcleo fluídico.

Nas partículas esféricas o agente ativo encontra-se homogeneamente disperso no interior da matriz polimérica enquanto que nas capsulas o ativo pode estar em seu núcleo (sólido ou líquido) ou em seu invólucro (“casca”) [24;33]. Ao contrário de lipossomas e de micro/nanocápsulas que possuem núcleos fluídicos, nas micro/nanoesferas poliméricas o fármaco pode estar agregado ou disperso dentro de sua matriz, ligado quimicamente ou adsorvido à sua superfície. Vários são os compostos que podem ser transportados nesses DDS, dentre os quais, anticancerígenos, anti-hipertensivos, antibióticos, antifúngicos, anti-inflamatórios, analgésicos, hormônios, vitaminas, macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, peptídeos, anticorpos, enzimas, agentes fototóxicos, de diagnóstico, magnéticos e entre outros [24;34;61].

O alto custo do desenvolvimento de novos fármacos torna os DDS uma ferramenta extremamente promissora para a indústria farmacêutica [62;63]. Através

desses mecanismos pode-se, por exemplo, gerar novas patentes e resgatar fármacos promissores que após vultosos investimentos durante seu desenvolvimento foram descartados em função de seus efeitos colaterais e/ou sua baixa biodisponibilidade [64;65]. Outras áreas também se interessam pela micro/nanoestruturação como a de produção de pesticidas, de materiais menos nocivos ao meio ambiente, de cosméticos, alimentícias, entre outras [52;66-71].

1.3.1 Matrizes Poliméricas

A escolha do tipo de DDS a ser utilizado recai principalmente sobre sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, compatibilidade física e química com a droga e a via de administração a ser empregada. Sendo assim, a matriz utilizada para preparo de um DDS não deve causar respostas inflamatórias e/ou tóxicas após sua administração e deve ser facilmente metabolizada e/ou eliminada pelo organismo [72]. Vários são os polímeros investigados como materiais biodegradáveis e biocompatíveis a serem utilizados no preparo de MP/NPs [73;74]. Essas matrizes podem ser obtidas pela extração a partir de produtos naturais orgânicos como polissacarídeos (quitosana, celulose), lecitinas, poliaminoácidos ou inorgânicos (como a hidroxiapatita, silicatos, fosfatos, metais como o ouro) [75-77;77;78;78-81]. Porém, comumente prefere-se a utilização de polímeros sintéticos por apresentarem comportamento previsível e serem fornecidos como matéria-prima regular [82]. Há grande interesse pela utilização de matrizes poliméricas sintéticas que incluem materiais relativamente hidrofóbicos como os polianidridos, policaprolactonas, poliamidas, poli(acrilamidas), poliuretanos, polialquícianacrilatos e principalmente por matrizes de poliésteres como o ácido poliglicólico (PGA, *poly(glycolic) acid*) e o ácido poliláctico (PLA, *poly(lactic) acid*) [83-85].

1.3.2 O PLGA

O ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA, *poly(D,L-lactide-co-glycolide acid)*) é um copolímero do ácido poliláctico com o ácido poliglicólico. É a melhor definição de matriz polimérica a ser utilizada no preparo de um DDS, sendo aprovado a mais de três décadas para o uso em humanos pela U.S. Food and Drug

Administration (FDA) [86]. Corresponde a um termoplástico pertencente à classe mais antiga, mais aplicada clinicamente e mais estudada de polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e atóxicos. Possui alta habilidade para formar MPs/NPs compatíveis com uma série de agentes ativos, e geralmente apresenta boa estabilidade, elevada permeação à água, temperatura de transição vítrea (T_g) acima da temperatura fisiológica (37°C), sendo, portanto considerados de natureza vítrea e exibindo estruturas em cadeia rígidas [87;88].

É formado por ligações ésteres passíveis à degradação por hidrólise (figura 5), resultando nos seus monômeros que são absorvíveis pelo organismo através de vias naturais, como o ciclo de Krebs. O processo de biodegradação envolve a clivagem hidrolítica da ligação entre suas unidades monoméricas de modo enzimático, não enzimático ou ambos [89].

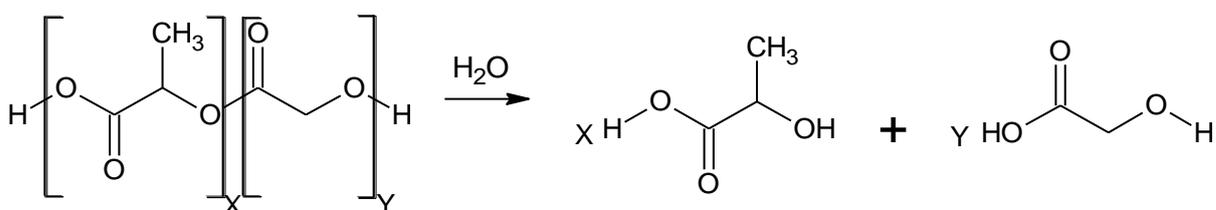


Figura 5: Reação de hidrólise do PLGA resultando em seus monômeros ácido D,L-láctico e ácido glicólico.

A estimativa do seu tempo de biodegradação depende da massa molecular, da razão entre seus monômeros, do tamanho dos DDS, da temperatura de armazenamento, da exposição à água, entre outros fatores [90]. Sendo assim, são possíveis variados perfis até que haja completa LCD. O ácido glicólico é mais suscetível à hidrólise do que o ácido láctico, e o PLGA apresenta tempo de degradação intermediário entre as matrizes PGA e PLA. Como regra geral, maiores proporções de PGA levam a taxas mais rápidas de degradação. A única exceção corresponde a proporção 50:50, que exibe a mais rápida degradação em relação as demais [24]. As MPs/NPs formadas com esse copolímero podem oferecer outras vantagens, como:

- Manutenção das características físico-químicas inalteradas por longo período;
- São possíveis de serem produzidas em escala industrial;
- São endocitadas por diferentes tipos de células;

- Apresentam seletividade quando revestidas com ligantes específicos;
- Podem incorporar agentes hidrofílicos e/ou hidrofóbicos;
- Possuem menor custo do que fosfolipídios utilizados em lipossomas.

Dentre os compostos transportáveis pelas NPs de PLGA encontram-se variados fármacos, compostos fotossensíveis, de diagnóstico, macromoléculas como DNA, peptídeos e proteínas, vacinas, hormônios, fatores de crescimento, citocinas e outros compostos utilizados para o tratamento de diversas doenças [91-93].

Devido suas características, o mecanismo de ação de MPs/NPs de PLGA apresenta-se vantajoso como DDS em vias citoplasmáticas. Ao contrário de outros DDS feitos com lipídios catiônicos ou estruturas poliméricas, as NPs de PLGA apresentam-se catiônicas apenas no compartimento endossomal e não desestabilizam as células durante o procedimento de fagocitose [27]. Este comportamento reduz a toxicidade associada comumente a compostos utilizados no preparo desses tipos de sistemas e permite o transporte eficiente do fármaco para o interior das células [94].

1.3.3 Métodos de Preparo de DDS Poliméricos

Existem vários métodos para produção de MPs/NPs e a escolha da técnica mais adequada requer conhecimento prévio de propriedades físico-químicas da matriz polimérica e do agente ativo que se pretende transportar [33;95]. Por exemplo, no caso das micro/nanocápsulas a escolha do método de preparo mais adequado é feita dependendo das solubilidades do agente ativo aos materiais constituintes do núcleo e da membrana envoltória, e entre os constituintes dessas duas estruturas [57;61;86]. É através do procedimento adotado no preparo de um DDS e de sua otimização que se determina como será sua estrutura interna e externa, capacidade de incorporação do ativo, taxas e formas de liberação, tamanho, carga e área superficial [96]. Considerando-se apenas a forma como se obtém a matriz polimérica, genericamente os métodos podem ser classificados como: polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou precipitação de polímeros pré-formados. Já as tentativas em classificar as técnicas empregadas na preparação de MPs/NPs não delimitam com precisão os métodos existentes [33;57;86]. Numa

classificação primária os procedimentos adotados para obtenção de DDS podem ser agrupados em técnicas: mecânicas, químicas ou físico-químicas.

Dentre os métodos que adotam as técnicas mecânicas mais empregadas em processos industriais [40], encontra-se:

- **SUSPENSÃO NO AR:** o agente ativo é disperso como partículas mantidas em suspensão através de uma corrente ciclizada de ar enquanto que o material de revestimento é atomizado sobre ele. Sendo esse um processo cíclico, quanto maior o tempo em que as partículas são mantidas em suspensão maior será sua camada de revestimento. Ao final os DDS obtidos apresentam-se secos e com tamanho igual ou superior a 35 μm [67].
- **CENTRIFUGAÇÃO COM MULTIORIFÍCIOS:** através de força centrífuga o agente ativo é lançado em membrana polimérica envoltória. As partículas de DDS formadas são submetidas a corrente de ar quente para secagem e endurecimento [57;67].
- **REVESTIMENTO EM TURBINAS:** partículas do agente ativo são colocadas em uma turbina em movimento e sobre elas o material de revestimento é aplicado. Os DDS são obtidos após as partículas serem submetidas a uma corrente de ar quente para remoção dos solventes utilizados [24;85].
- **ATOMIZAÇÃO E SECAGEM:** o agente ativo é disperso em solução contendo a matriz polimérica e essa suspensão é atomizada sobre contracorrente de ar quente que evapora rapidamente o solvente e promove a solidificação dos DDS com tamanho da ordem de 600 μm [24].

Já os procedimentos que envolvem técnicas químicas fundamentam-se na ocorrência de reações na interface entre fase aquosa e fase orgânica. Alguns desses processos estão brevemente descritos a seguir:

- **POLICONDENSAÇÃO INTERFACIAL:** Os DDS são formados como filmes poliméricos contendo o fármaco durante reação química que ocorre entre dois monômeros diferentes na interface (água-óleo). Para isso, prepara-se uma emulsão na qual em uma das fases há o princípio

ativo e um monômero e na outra fase um monômero diferente e um tensoativo [24;97;98].

Uma subclasse desse procedimento corresponde à incorporação do agente ativo através de sua interação com a matriz polimérica após ser adicionado a uma suspensão de microesferas pré-formadas. É um método que permite apenas adsorção inespecífica e apresenta baixa eficiência de encapsulamento [24;97].

- **GELIFICAÇÃO:** O material constituinte do núcleo é disperso em alginato de sódio que é gelificado após adição de cloreto de cálcio. As gotículas são transferidas para uma solução de um polímero catiônico (normalmente polilisina) que desloca os íons Ca^{2+} . Isso faz com que a membrana se torne mais rígida. Em seguida, o gel do interior da microcápsula pode ser liquefeito por adição de citrato de sódio, que desloca o Ca^{2+} remanescente. O método é particularmente utilizado para microencapsular insulina e material celular [24;99].

Já os métodos que adotam as técnicas físico-químicas utilizam modificações das propriedades poliméricas para obtenção dos DDS. Dentre os procedimentos mais adotados com essa técnica encontram-se:

- **FUSÃO-EMULSIFICAÇÃO:** Os DDS são formados por solidificação através do resfriamento da emulsão de partículas contendo o agente ativo solubilizado na matriz polimérica em seu estado fundido. A separação dessas partículas pode ser feita por filtração ou centrifugação. Há dificuldades quanto a sua utilização devida instabilidade térmica de agentes ativos em temperatura elevada [24;100].
- **COACERVAÇÃO OU SEPARAÇÃO DE FASES:** Nesse procedimento a produção de DDS é baseada no fenômeno de desolvatação de macromoléculas conduzindo a separação de fases em soluções coloidais inicialmente homogêneas (separação líquido-líquido). O princípio ativo constitui núcleos que são inicialmente suspensos em solução aquosa contendo o material polimérico solubilizado. Em seguida, mediante alteração das condições da fase contínua como alteração do pH, da temperatura ou adição de um solvente miscível em

água ou de um tensoativo, o polímero torna-se insolúvel formando uma camada rígida sobre o agente ativo. Isso faz com que o polímero migre para a superfície das partículas dispersas, levando à formação de um filme enrijecido sobre o princípio ativo. Gelatina e/ou goma arábica são comumente utilizados nesse processo. Essa técnica apresenta dificuldades na aplicação devido a necessidade de extremo controle das condições experimentais e regularidade do tamanho das partículas [67]

- **EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE:** O agente ativo é solubilizado ou suspenso em fase constituída pela matriz polimérica solubilizada em solvente orgânico volátil. Essa fase é emulsionada aplicando elevada homogeneização em meio aquoso imiscível contendo um tensoativo. À medida que o solvente orgânico evapora MPs/NPs estáveis são formadas. Os DDS obtidos por esse processo apresentam tamanho regular e podem ser separados por meio de centrifugação ou filtração e desidratados através de operações como liofilização ou aspersão [24;85;101].

O procedimento de evaporação do solvente é um dos métodos mais empregados na produção de MPs/NPs esféricas. Corresponde a um procedimento que ocorre com precipitação de polímeros pré-formados. Os solventes orgânicos hidrofóbicos voláteis mais utilizados são diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e tetrahidrofurano. Surfactantes como polietilenoglicol (PEG) e álcool polivinílico (PVA) são utilizados [102]. O procedimento de evaporação do solvente pode ser dividido em dois tipos de procedimento: simples e dupla (ou multiemulsões). Brevemente, no procedimento de simples emulsão, o polímero e o ativo são solubilizados em fase orgânica imiscível e emulsionados uma única vez com a fase aquosa (W/O, water/oil). Sendo o agente ativo hidrossolúvel, é realizado o procedimento de dupla (ou multi) emulsificação (W/O/W, water/oil/water) afim de que haja uma melhor incorporação do composto nas MPs/NPs. Em ambos os procedimentos a escolha do solvente e da taxa de agitação influenciam diretamente na eficiência de encapsulamento e no tamanho final das partículas [54-58;120;136-138;152-155].

Através de simples (W/O) e de dupla (W/O/W) emulsificação em procedimento de evaporação do solvente foram produzidos os DDS obtidos e caracterizados neste trabalho.

1.3.4 Sonda Fluorescente

As NPs podem ser utilizadas pra transportar agentes de contraste podendo assim auxiliar no diagnóstico oncológico e na compreensão de como ocorre o processo de internalização das NPs nas células através de técnicas de imageamento *in vivo* (como ressonância magnética nuclear e fluorescência) ou *in vitro* através de técnicas de separação e seleção como citometria de fluxo, microscopia confocal e de fluorescência [46;103-106].

Durante o preparo das NPs contendo CHB produzidas neste trabalho foi adicionada uma sonda fluorescente para posterior análise de como ocorre a internalização das NPs e a localização delas nas células. Esse composto correspondeu à fluoresceína (FSC, figura 6), que pertence à classe dos xantenos e foi sintetizado por Bayer em 1871. É um composto que apresenta alta solubilidade em meio aquoso e suas propriedades fluorescentes são muito estudadas e utilizadas em ensaios biológicos. Em meio fisiológico prevalece sua estrutura diânionica que é a que apresenta maior emissão de fluorescência em meio aquoso, com Φ_f igual a 0,93. Apresenta baixa toxicidade e quando em circulação pode ser transportada de forma livre ou complexada às proteínas [107].

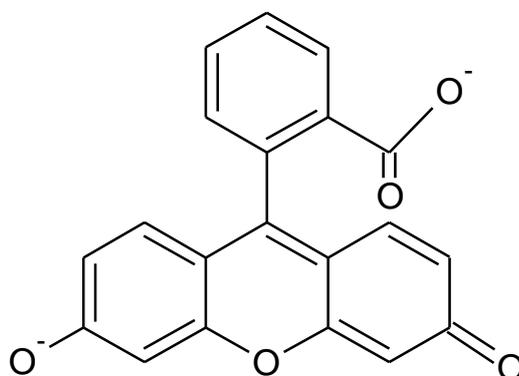


Figura 6: Fórmula estrutural da fluoresceína em sua forma diânionica.

Através da formação de gradientes de pH entre o meio intracelular (que apresenta pH neutro ou ligeiramente alcalino) e o meio extracelular (pH ligeiramente ácido) espera-se que as NPs se acumulem no interior das células principalmente próximo das mitocôndrias, dos lisossomos e do núcleo. Dessa forma, com esse marcador fluorescente será possível de se identificar as organelas celulares onde haverá maiores concentrações de NPs produzidas e administradas em sistema biológico de estudo [107;108].

1.3.5 Aplicação dos DDS no Tratamento/Diagnóstico do Câncer

Tecidos tumorais e órgãos como fígado, baço e medula óssea, apresentam paredes capilares descontínuas, ausência de lâmina basal e grande número de poros que favorecem o uso dos DDS [109-111]. Tecidos tumorais não possuem sistema linfático, conseqüentemente, após a partícula penetrar, dificilmente ela será eliminada antes que ocorra a completa liberação do fármaco [112]. A alteração de propriedades físico-químicas como hidrofobicidade permite aumentar a penetração e o acúmulo do fármaco na vasculatura de tumores sólidos, como melanomas, e mantém as MPs/NPs no sistema sanguíneo por maiores períodos, possibilitando, por exemplo, o combate a leucemia [113].

Procedimentos que empregam nanoestruturação para o tratamento do câncer também se baseiam em terapias fotodinâmicas [114-116]. Basicamente, consistem no transporte de um princípio ativo fotossensível através de MPs/NPs até o tumor e, após seu acúmulo, a incidência local de luz em determinado comprimento de onda faz com que sejam produzidas espécies citotóxicas *in situ* (oxigênio singlete e radicais livres), fazendo com que haja necrose ou apoptose das células tumorais [117].

Para eliminar ou reduzir tumores, MPs/NPs magnéticas podem ser utilizadas em procedimentos terapêuticos de hipertermia [118;119]. Nesse procedimento o calor é gerado através da alternância dos polos de partículas ferromagnéticas ou superparamagnéticas aplicadas próximo ao tumor através de um campo magnético externo de corrente alternada [120-122]. Partículas magnéticas de óxido de ferro cobertas com uma camada de polissacarídeo também são utilizadas como agentes de contraste.

Alguns DDS já foram aprovados pelo FDA para uso clínico. Porém, apesar da promissora aplicação desses sistemas contendo fármacos anticancerígenos, terapias com MPs/NPs ainda não chegam às clínicas com a mesma intensidade que as terapias convencionais, novos fármacos, hipertermia e radioterapia [123]. Isso porque, embora a microestrutura porosa dos vasos tumorais seja favorável à infiltração das MPs/NPs às regiões extravascularizadas, geralmente essas estruturas precipitam em regiões próximas aos vasos, resultando em uma distribuição heterogênea do ativo no tumor [124]. A superação desse e de outros problemas como a rejeição pelo sistema imunológico e a baixa seletividade ainda são impedimentos para aplicação clínica das MPs/NPs [125;126].

Inúmeras pesquisas são desenvolvidas para que materiais biocompatíveis sejam cada vez mais aplicados como DDS [111;127;128]. Almejando reduzir os efeitos adversos promovidos pela administração de fármacos antitumorais e elevar sua eficiência terapêutica e biodisponibilidade, contornando várias das dificuldades encontradas em quimioterapias convencionais, nesse trabalho o quimioterápico clorambucil foi incorporado à nanoesferas biodegradáveis de PLGA produzidas através da técnica de evaporação do solvente [129-131].

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consiste em desenvolver um sistema nanoestruturado biodegradável constituído por ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico), o qual deve incorporar eficientemente o antineoplásico clorambucil (CHB). Este sistema será caracterizado com relação a suas propriedades físico-químicas e morfológicas, além de se avaliar a sua possível aplicabilidade citotóxica em uma linhagem celular tumoral (MCF-7) e em uma linhagem normal (NIH-3T3).

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Preparar NPs com tamanhos e características superficiais adequados para aplicação *in vivo*;
- Avaliar as NPs quanto ao comportamento de liberação do fármaco e o potencial citotóxico *in vitro* em células de linhagens tumorais e não-tumorais;
- Caracterizar as NPs quanto aos seus parâmetros físico-químicos, como tamanho, eficiência de encapsulamento, potencial zeta, e morfológicos;
- Otimizar características físico-químicas e morfológicas das NPs, elevando sua especificidade de ação e estabilidade;
- Acrescentar fluoresceína à formulação para posterior avaliação do processo de difusão inter/intracelular das NPs.

Pretende-se com este trabalho, melhorar a biodisponibilidade, reduzir efeitos colaterais e aumentar os níveis terapêuticos do fármaco clorambucil através do seu encapsulamento em um sistema de liberação controlada (DDS).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

Foram utilizados os reagentes abaixo listados para a produção, caracterização e demais análises das NPs:

- Ácido clorídrico 32% P.A., HCl, MM 36,46 g/mol, teor entre 31 e 33%, 1,16 kg/L, marca Vetec Química Fina[®];
- Ácido etilenodiaminotetraacético sal disódica 2-hidrato P.A. ACS, EDTA, *Ethylenediaminetetracetic acid disodium salt 2-hydrate*, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, 372,24 g/mol, teor entre 99,0 e 101,0%, marca Vetec Química Fina[®];
- Ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico), PLGA, $[C_3H_4O_2]_x[C_2H_2O_2]_y$, proporção 50:50, MM entre 40.000-75.000 g/mol, grau de pureza acima de 99,9%, marca Sigma-Aldrich[®];
- Álcool etílico P.A. ACS, C_2H_6O , MM 46,07 g/mol, dosagem mínima 95,0%; densidade 0,81 g/mL, marca Vetec Química Fina[®];
- Álcool polivinílico, PVA (*Polyvinyl Alcohol*), $[-CH_2CHOH-]_n$, MM entre 13.000-23.000 g/mol, hidrolisado entre 87-89,0%, marca Sigma-Aldrich[®];
- Azul de tripan, $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$, 960,79 g/mol, grau de pureza acima de 99,9%, marca Sigma-Aldrich[®];
- Bicarbonato de sódio P.A. ACS, $NaHCO_3$, MM 84,01 g/mol, teor entre 99,7 e 100,3%, marca Sigma-Aldrich[®];
- Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium, MTT, $C_{18}H_{16}BrN_5S$, 414,32 g/mol, grau de pureza acima de 98,0%, marca Sigma-Aldrich[®];

- Clorambucil, CHB, $C_{14}H_{19}Cl_2NO_2$, MM 304,20 g/mol, grau de pureza acima de 98,0%, marca Sigma-Aldrich®;
- Cloreto de sódio P.A. ACS, NaCl, MM 58,44 g/mol, teor acima de 99,0%, marca Vetec Química Fina®;
- Diclorometano P.A., CH_2Cl_2 , grau analítico de pureza, teor acima de 99,0%, marca Dinâmica®;
- Dimetilsulfóxido P.A., DMSO, C_2H_6OS , 78,13 g/mol, grau biológico de pureza, teor acima de 99,9%, marca Sigma-Aldrich®;
- D-MEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, com alta concentração de glicose, em forma de pó liofilizado, marca Gibco®;
- Fosfato de sódio bibásico dihidratado P.A., $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, MM 177,99 g/mol, grau de pureza acima de 99,0%, marca Vetec Química Fina®;
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A., $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, MM 137,99 g/mol, grau de pureza acima de 98,0%, marca Vetec Química Fina®;
- Hidróxido de sódio em micropérolas P.A., NaOH, 39,99 g/mol, grau analítico de pureza, dosagem mínima de 98,0%, marca Vetec Química Fina®;
- Mistura de antibióticos, 5 mg/mL de penicilina, 5 mg/mL de estreptomicina e 10 mg/mL de neomicina em solução salina, marca Gibco®;
- Sal de fluoresceína sódica, FSC, $C_{20}H_{10}Na_2O_5$, MM 376,28 g/mol, grau de pureza acima de 99,0%, marca Sigma-Aldrich®;
- Soro fetal bovino, SBF, certificado, originado dos EUA, nível de endotoxinas abaixo de 5 unidades/mL e nível de hemoglobina abaixo de 10 mg/dL, marca Gibco®;
- Tripsina de pâncreas bovino, pó liofilizado, 23,30 kDa, acima de 7.500 unidades BAEE/mg, marca Sigma-Aldrich®.

Os demais reagentes utilizados neste trabalho possuíam grau analítico de pureza e não foram submetidos a procedimento extra de purificação.

3.1.2 Equipamentos

Encontram-se listados abaixo os equipamentos que foram utilizados durante a execução desse projeto:

- Agitador de tubos tipo vortex, marca Logen Scientific[®], modelo LSM56-III e marca IKA[®] modelo labdance;
- Autoclave vertical marca Phoenix Luferco[®], modelo av sd 30;
- Balança analítica marca Marte[®], modelo AY 220;
- Capela de fluxo laminar unidirecional marca Veco[®], modelos CFLV 09 e CFLV 12;
- Centrifuga refrigerada de bancada para microtubos marca Hettich Lab Technology[®], modelo Mikro 200R e centrifuga de bancada para microtubos marca Eppendorf[®], modelo MiniSpin;
- Chapa de agitação e aquecimento marca Logen Scientific[®], modelo LS61-220;
- Dispersador de alto desempenho Ultraturrax, marca IKA[®], modelos T25, equipado com os elementos de dispersão S25N-25F ou S25N-18G;
- Dispersador de alto desempenho Ultraturrax, marca IKA[®], modelos T10, equipado com o elemento de dispersão S10N-5G;
- Espectrofotômetro de fluorescência marca Hitachi High-Technologies Corporation[®], modelo F-7000;
- Espectrofotômetro Infravermelho com transformada de Fourier, marca Shimadzu[®], modelo IRPrestige-21;
- Espectrofotômetro para microplacas marca SpectraMax[®], modelo M2;
- Espectrofotômetro UV-vis marca Hitachi High-Technologies Corporation[®], modelo U-3900H;
- Estufa incubadora de CO₂ marca Thermo Scientific[®], modelo 8000 WJ;
- Medidor de tamanho e potencial zeta, Zetasizer Nano ZS Series, marca Malvern Instruments Limited[®], modelo ZEM 3600;

- Micropipetas automáticas com escalas variáveis de 2-20 μL , 20-200 μL e 100-1000 μL , marca Capp[®], modelo Ecopipette;
- Microscópio eletrônico de varredura marca Jeol[®], modelo 840 A;
- Microscópio óptico de luz invertido marca Olympus[®], modelo CK2;
- Instrumento para medida simultânea de análise termogravimétrica (TGA) e térmica diferencial (DTA), marca Shimadzu[®], modelo DTG-60A;
- Instrumento para análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) marca Shimadzu[®], modelo DSC-60A.

3.2 SOLUÇÕES

Medidas de massa foram realizadas em triplicata em ambiente climatizado, tarando-se a balança antes de cada medição e adotando-se o uso de luvas, pinças e espátulas. Soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura obtida de um sistema ultrapurificador de água da marca Elga[®], modelo Purelab Classic DI MK2, operado a 18,20 $\text{m}\Omega\cdot\text{cm}$. Com a finalidade de dar mais agilidade ao processo de produção dos sistemas nanoestruturados e aumentar a reprodutibilidade dos ensaios propostos foram preparadas as soluções estoque descritas a seguir.

3.2.1 Soluções Estoque de NaOH e HCl 0,1 mol/L

A solução aquosa alcalina de NaOH na concentração 0,10 mol/L foi preparada em béquer de plástico solubilizando 0,40 g de NaOH em 100,0 mL de água ultrapura. Após o conteúdo ser completamente solubilizado e resfriado foi estocado em frasco plástico e armazenado a temperatura ambiente.

A solução aquosa ácida de HCl na concentração 0,10 mol/L foi preparada em béquer de vidro adicionando-se 980,0 μL de HCl 32,0% em 9,02 mL de água ultrapura. Após misturar, a solução foi estocada em frasco plástico e armazenado a temperatura ambiente. Ambas as soluções foram utilizadas para ajuste de pH e preparo de outras soluções.

3.2.2 Soluções Estoque de Álcool Polivinílico

Soluções estoque de PVA nas concentrações de 2,00 e 0,20%_(m/v) foram preparadas pela adição de 5,00 e 0,50 g de PVA em béqueres de vidro contendo 250,0 mL de água aquecida (à temperatura inferior a 60,0° C) e sob agitação branda até completa solubilização. Quando prontas, as soluções foram filtradas em membrana de 0,22 µm, transferidas para recipientes plásticos esterilizados e armazenadas em congelador a aproximadamente -2,0° C.

3.2.3 Solução Estoque de Água/Etanol 1:1

Solução água-etanol 1:1 foi utilizada para solubilizar o CHB nos ensaios de perfil de liberação e eficiência de encapsulamento. A mistura foi preparada com 0,5260 L de etanol 95,0%_(v/v) e 0,4740 mL de água ultrapura em um balão volumétrico de 1,0 L. A solução obtida foi alíquotada em frascos plásticos e mantida sob refrigeração (-2,0° C) até o momento de seu uso.

3.2.4 Solução Tampão Fosfato de Sódio

Para preparo de um litro de solução tampão fosfato (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) 0,10 mol/L, com pH 7,40, foram medidas as seguintes massas: 9,000 g de cloreto de sódio, 0,520 g de fosfato de sódio monobásico e 2,300 g de fosfato de sódio bibásico. Esses compostos foram solubilizados em 1,0 L de água ultrapura. Mediu-se o pH da solução, sendo necessário, ajustou-se o mesmo utilizando solução de HCl 0,10 mol/L ou de NaOH 0,10 mol/L.

3.2.5 Solução de Azul de Tripán

Solução de azul de tripan foi preparada na concentração de 0,40%_(m/v) em solução de PBS. Após ser filtrada em membrana 0,22 µm sob pressão positiva, alíquotas de 1,0 mL foram transferidas para microtubos e armazenadas sobre refrigeração a -2,0° C protegidas da luz.

3.2.6 Solução de MTT

Essa solução foi preparada solubilizando 75,0 mg de MTT em 15,0 mL de solução de PBS. A solução obtida foi filtrada através de membrana 0,22 µm sob pressão positiva, transferida para um tubo falcon de 15,0 mL e estocada protegida da luz em refrigerador a -2,0° C.

3.2.7 Solução de Tripsina-EDTA

A solução de tripsina pancreática bovina 0,05%_(m/v) obtida em meio salino e EDTA 0,020%_(m/v) foi preparada em solução de HCl diluída à 0,001 mol/L e armazenada a -2,0° C.

3.2.8 Solução de D-MEM

O meio mínimo essencial Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) foi a solução nutritiva utilizada para o crescimento celular nos ensaio de viabilidade. Este meio é composto por uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e demais componentes essenciais para as células. Uma embalagem contendo aproximadamente 9,10 g de D-MEM em pó foi solubilizada mediante agitação em 1,0 L de água ultrapura mantida entre 15,0 e 20,0° C. A essa solução foram acrescentados 3,70 g de bicarbonato de sódio, e quando necessário o seu pH foi ajustado para 7,40 utilizando solução de HCl 0,10 mol/L ou de NaOH 0,10 mol/L. Ao final, a solução foi filtrada através de membrana 0,22 µm sob pressão positiva, transferida para frasco de vidro selado e armazenada em câmara fria a -5,0° C.

3.2.9 Solução de Soro Bovino Fetal

Uma mistura composta basicamente por insulina, hormônios e outros fatores de crescimento foi solubilizada em solução de PBS para obtenção da solução de SBF. Essa solução foi aquecida a 56,0° C para inativação enzimática, fracionada em alíquotas de 10,0 mL e acondicionada sob refrigeração a -2,0° C.

3.2.10 Meio Nutritivo Completo

Considerou-se como sendo meio nutritivo completo, a mistura da solução estoque de D-MEM com solução estoque de SBF na proporção de 9:1 respectivamente. A essa solução era adicionado a mistura de antibióticos obtendo-se ao final a concentração de 1,0%_(v/v).

As soluções estoque de D-MEM, SBF, azul de tripan, MTT e tripsina foram gentilmente preparadas e fornecidas pelo grupo técnico do laboratório do Departamento de Genética e Morfologia do IB/UnB.

3.3 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Em alguns dos ensaios realizados foram necessárias às determinações das concentrações dos compostos em análise. Através de medidas espectrofotométricas na região UV-vis foram obtidas curvas de calibração para o agente emulsificante (PVA) solubilizado em água ultrapura, o fármaco antitumoral CHB solubilizado em solução água/álcool 1:1 e a sonda fluorescente utilizada (fluoresceína) solubilizada em água ultrapura.

3.3.1 Curva do PVA

Para construção da curva do PVA foi considerada a absorvância no comprimento de onda 282,5 nm. Foram consideradas 9 medidas nas quais a concentração do agente surfactante variou entre 0,30 e 2,0%_(m/v).

3.3.2 Curva do CHB

O CHB apresentou alta solubilidade em etanol e em diclorometano e baixa solubilidade em acetona. Apesar de hidrofóbico, o composto mostrou-se bastante solúvel em solução água/etanol 1:1. Para obtenção da curva de calibração do CHB considerou-se medidas da absorvância no comprimento de onda 303,0 nm para

soluções de CHB em água/etanol 1:1. Foram consideradas 13 medidas, nas quais a concentração do fármaco variou entre $1,50 \times 10^{-5}$ à $3,80 \times 10^{-4}$ mol/L.

3.3.3 Curva da Fluoresceína

A fluoresceína (FSC) foi o marcador fluorescente utilizado no preparo de NPs de PLGA contendo o antineoplásico CHB. Esse composto apresentou elevada solubilidade em meio aquoso. Espectros foram obtidos a partir da diluição seriada de uma solução aquosa de fluoresceína com concentração inicial de 750,0 mg/L. Foram observadas quatro regiões de absorção para o composto, sendo que, considerou-se para construção da curva a utilização da absorbância obtidas na região de 491,0 nm entre as concentrações de $7,0 \times 10^{-6}$ à $3,0 \times 10^{-5}$ mol/L.

3.4 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS

Neste trabalho foi proposta a incorporação do fármaco antineoplásico CHB conjugado ou não a uma sonda fluorescente (fluoresceína) na matriz de PLGA. Esses compostos foram incorporados em NPs esféricas obtidas através dos métodos de dupla emulsificação e evaporação do solvente, indicado para o encapsulamento de compostos hidrofílicos e o de simples emulsificação e evaporação do solvente, muito utilizado para o encapsulamento de compostos hidrofóbicos. As amostras produzidas estão listadas na tabela 2, sendo em seguida detalhados os procedimentos adotados para obtenção das NPs.

Tabela 2: Identificação das NPs, seu(s) principal(ais) constituinte(s) e método de obtenção.

Denominação	Constituinte(s) Principal(ais)	Método de Preparo
NP.0.I	Copolímero (PLGA)	Simplem Emulsão
NP.0.II	Copolímero (PLGA)	Dupla Emulsão
NP.CHB.I	PLGA e Clorambucil	Simplem Emulsão
NP.CHB.II	PLGA e Clorambucil	Dupla Emulsão
NP.FSC.II	PLGA e Fluoresceína	Dupla Emulsão
NP.C&F.II	PLGA, Clorambucil e Fluoresceína	Dupla Emulsão

3.4.1 Simples Emulsificação e Evaporação do Solvente

Através desse método foram produzidas as NPs denominadas como NP.CHB.I e NP.0.I. Inicialmente aproximadamente 0,050 g do polímero PLGA 50:50, foi solubilizado em 10,0 mL de diclorometano. Em seguida, foram adicionadas diferentes quantidades do fármaco (10,0; 30,0 ou 40,0 mg) à solução contendo o polímero. Essa solução orgânica foi emulsificada a 17.000 rpm em 10,0 mL de solução de PVA 2,0%_(m/v). Após a emulsificação, a solução foi submetida à agitação magnética até a total evaporação do solvente orgânico e a precipitação de glóbulos de finas partículas fármaco/polímero. A seguir, as NPs foram centrifugadas a 15.000 rpm por 20 minutos e lavadas quatro vezes com água ultrapura. Essas NPs foram ressuspensas em um volume de aproximadamente 1,0 mL de PBS e estocadas em freezer à -2,0° C. A NP.0.I foi obtida pelo mesmo procedimento, diferenciando-se somente pela não inclusão da solução contendo o fármaco [132-135].

3.4.2 Produção de NPs Pelo Método de Dupla Emulsão

Para a produção das NPs da amostra NP.CHB.II foi realizado o método de dupla emulsão. A primeira emulsão (água/óleo) foi formada entre uma solução orgânica de polímero e fármaco (0,50 mg de PLGA e 10,0; 30,0 ou 40,0 mg de CHB) solubilizados em 10,0 mL de diclorometano e 10,0 mL de solução aquosa de PVA 2,0%_(m/v), as quais foram submetidas a elevada agitação mecânica de 17.000 rpm. A segunda emulsão foi resultado da adição da emulsão primária a 10,0 mL de solução de PVA 0,20%_(m/v) sob vigorosa agitação de 17.000 rpm. Após a emulsificação, a solução foi submetida à agitação magnética até a total evaporação do solvente orgânico e a precipitação de glóbulos de finas partículas fármaco/polímero. A seguir as NPs foram centrifugadas a 15.000 rpm por 20 minutos e lavadas quatro vezes com água. As NPs resultantes foram ressuspensas em um volume de aproximadamente 1,0 mL de PBS e estocadas em freezer à -2,0° C [136].

A NP.0.II foi obtida pelo mesmo procedimento descrito neste tópico diferenciando-se somente pela não inclusão da solução contendo o fármaco. Sendo a fluoresceína um composto hidrofílico, para o preparo das amostras NP.FSC.II, e

NP.C&F.II foram medidas alíquotas de 1,50 mg deste composto, que foram adicionadas à fase aquosa do procedimento realizado para o preparo das NP.0.II e NP.CHB.II, respectivamente.

Ao final do processo de obtenção das partículas pode-se determinar seu rendimento através da seguinte equação:

$$Rendimento (\%) = \left(\frac{Massa \text{ das } NPs \text{ Obtidas}}{Massa \text{ dos Reagentes Adicionados}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

Para facilitar a compreensão do procedimento executado durante o preparo das NPs um fluxograma do processo de produção de cada amostra pelos métodos de simples e dupla emulsificação, pode ser visualizado na figura 7.

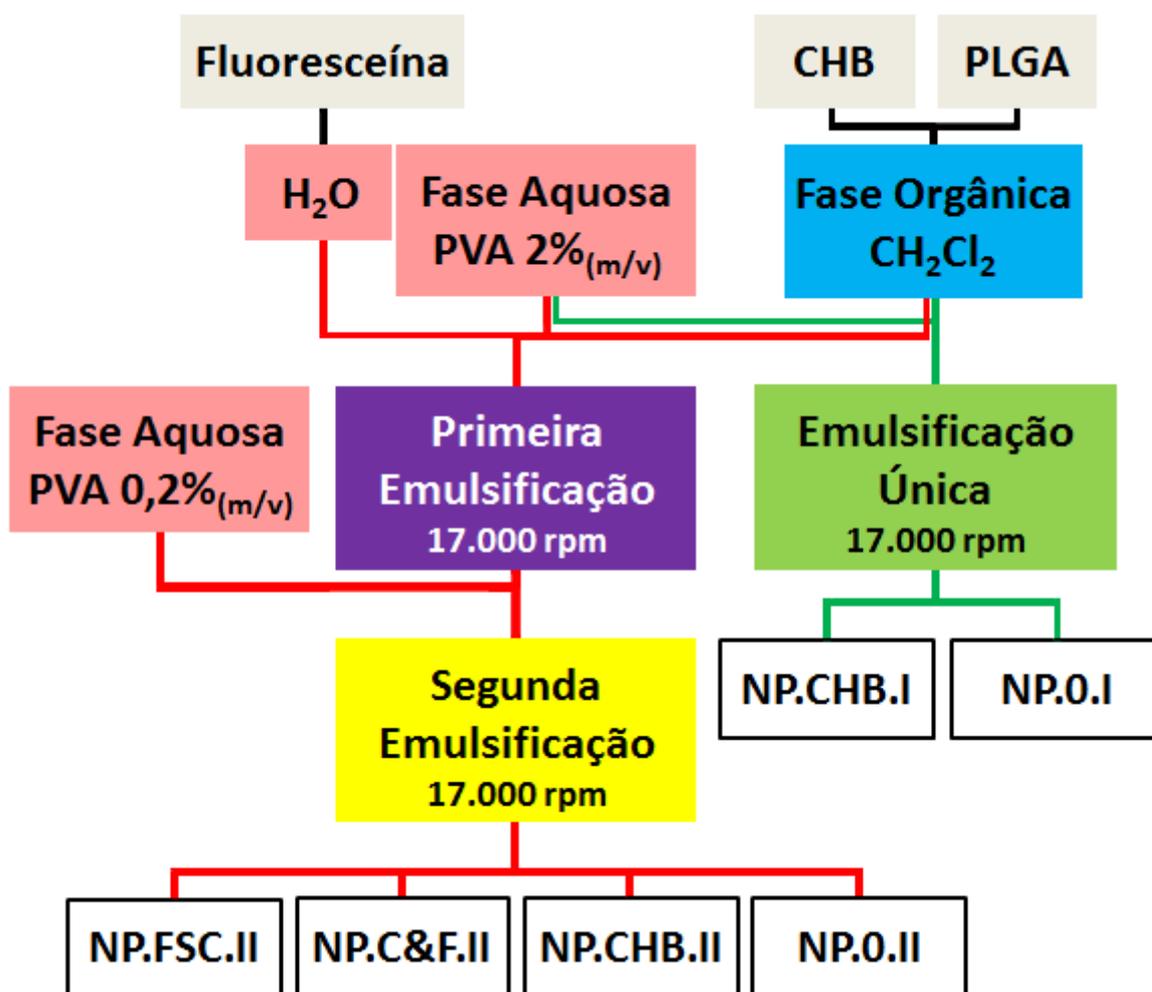


Figura 7: Fluxograma do processo de obtenção das NPs pelos métodos de simples (— verde) e dupla (— vermelha) emulsão.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NPs

Dentre os procedimentos de caracterização utilizados nesse trabalho destacam-se análises espectroscópicas e calorimétricas das NPs e seus constituintes, medidas de distribuições de tamanho das amostras através das técnicas de Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*), a determinação da carga superficial das NPs através de medidas de potencial zeta, avaliação da quantidade de fármaco encapsulada, estudo da cinética de liberação do fármaco, da estabilidade em função do tempo/temperatura das suspensões e da liberação, avaliação morfológica dos sistemas realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/SEM, *Scanning Electron Microscopy*) e estudos sobre a citotoxicidade das NPs produzidas [5;59;88;137-139].

3.5.1 Medidas Espectroscópicas

3.5.1.1 *Espectroscopia de Fluorescência*

Espectros de fluorescência em três dimensões e medidas de fluorescência estacionária foram obtidos para os compostos em estudo utilizando-se um espectrofotômetro modelo F-7000 da marca Hitachi[®]. Os registros foram realizados utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, contendo o meio em estudo (soluções ou suspensões). Os espectros foram registrados de maneira a cobrir uma faixa espectral de 200,0 a 800,0 nm, sob temperatura ambiente, escaneamento com velocidade de 1.200,0 nm/min e janelas de emissão e excitação com 5,0 nm de abertura. Os dados foram tratados com o software FL Solutions 2.1[®] e transferidos para o programa de construção de gráficos GraphPad Prism 5.0[®].

3.5.1.2 *Espectroscopia FTIR*

Espectros de infravermelho do fármaco em estudo na forma livre e encapsulada e da matriz polimérica pura foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro FTIR (*Fourier Transform Infrared*), modelo IR Prestige 21 da

marca Shimadzu[®]. Para leitura foram utilizadas pastilhas de brometo de potássio (KBr, Shimadzu[®], JPN) com massa média de 30,0 mg preparadas com aproximadamente 5,0% de amostra, prensadas a 80,0 kN por 3,0 minutos. Para cada leitura foram obtidos 45,0 registros, com resolução de 4,0 cm⁻¹ na região compreendida entre 4.000,0 e 400,0 cm⁻¹ no modo de porcentagem de transmitância. Análises também puderam ser realizadas utilizando o módulo de refletância total atenuada (ATR, *Attenuated Total Reflectance*). Os dados foram tratados com o software IR Solution 1.50[®] e transferidos para o programa de construção gráfica GraphPad Prism 5.0[®].

3.5.1.3 *Espectroscopia de Absorção Molecular – UV-vis*

Espectros de absorção eletrônica dos sistemas em estudo foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro UV-vis (ultravioleta-visível) de duplo feixe, duplo monocromador, com fotomultiplicador da marca Hitachi[®], modelo 3900H. Adotou-se nas medidas fenda para passagem de luz 2,0 nm, cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e temperatura constante em 37,0^o C. Antes do início das leituras obtinha-se a linha de base e em seguida, posicionava-se a cela contendo a amostra solubilizada ou em suspensão aquosa no compartimento adequado obtendo-se medidas de absorbância através do modo de varredura dentro da faixa espectral de 190,0 a 800,0 nm, com velocidade de escaneamento de 600,0 nm/min. Os dados obtidos foram tratados com o software UV Solutions 3.0[®] e transferidos para o programa GraphPad Prism 5.0[®].

3.5.2 Análises Térmicas

3.5.2.1 *Termogravimétrica/Diferencial Simultânea (TGA/DTA)*

Para obtenção das curvas TGA/DTA*, amostras com massa entre 3,0 e 7,0 mg foram medidas cuidadosamente e transferidas para um cadinho de platina.

* Análise termogravimétrica (TGA, *Thermogravimetric Analysis*) / Análise térmica diferencial (DTA, *Differential Thermal Analysis*).

Os ensaios foram realizados em sistema de Análise Térmica Diferencial e Termogravimétrica Shimadzu DTG-60A[®] sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 20,0 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 5,0^o C.min⁻¹, no intervalo de temperatura de 35,0 a 600,0^o C. O equipamento de TGA/DTA foi calibrado previamente utilizando como padrão oxalato de cálcio monohidratado conforme norma ASTM 1582-93. As curvas obtidas foram tratadas usando o software TA-60WS[®] e transferidas para o programa de construção de gráficos Origin 6.0[®].

3.5.2.2 *Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)*

Para obtenção das curvas de DSC (*Differential Scanning Calorimetry*), amostras contendo massas entre 3,0 e 6,0 mg foram cuidadosamente medidas e transferidas para um cadinho de alumínio, que foi posteriormente selado através de uma prensa. Os ensaios foram realizados em um aparelho da marca Shimadzu[®] modelo DSC-60A sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 20,0 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 5,0^o C.min⁻¹, no intervalo de temperatura de 35,0 a 500,0^o C. O equipamento de DSC foi previamente calibrado com índio metálico (pureza acima de 99,99%; T_{fusão} = 156,4^o C). A caracterização dos eventos térmicos das amostras foram identificados nas curvas obtidas que foram tratadas utilizando o software TA-60WS[®] e transferidas para o programa GraphPad Prism 5.0[®].

3.5.3 Eficiência de Encapsulamento

A avaliação da eficiência de encapsulamento (%EE) visa determinar a porcentagem de fármaco incorporada ao sistema de liberação [140]. A quantidade de fármaco que havia nas NPs foi determinada através do método direto empregando-se medidas espectroscópicas no máximo de absorção de cada composto, em triplicatas, e aplicando os valores obtidos nas equações 8 ou 9. Para cada uma das medidas, aproximadamente 10,0 mg de NPs foram adicionadas a microtubos juntamente com 1,0 mL de diclorometano. Para facilitar a dissolução das NPs, esse conteúdo foi colocado em um vortex e mantido sob forte agitação durante dois minutos e posteriormente em um banho ultrassônico à temperatura de 37,0^o C por 5 minutos. Após as NPs serem destruídas o solvente orgânico foi

completamente evaporado no interior de um dessecador a pressão reduzida e temperatura ambiente durante um período de 24 horas. Adicionou-se 1,0 mL de solução estoque água/ etanol 1:1 às NPs que haviam sido produzidas com CHB, havendo assim a solubilização apenas do fármaco precipitado. Para determinação da %EE das NPs preparadas com fluoresceína adicionava-se 1,0 mL de água ultrapura. Essas soluções foram analisadas no espectrofotômetro UV-vis obtendo-se uma estimativa da concentração do composto e conseqüentemente do quanto havia sido encapsulado. A quantificação da eficiência de encapsulamento foi determinada utilizando-se a seguinte equação:

$$\%EE (\%) = \left(\frac{\text{Quantidade de Fármaco Incorporado}}{\text{Quantidade Inicial de Fármaco}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

O método indireto para determinação da eficiência de encapsulamento também foi empregado como um ensaio confirmatório. Para obter essa estimativa, a quantidade incorporada de fármaco foi indiretamente determinada através da quantificação da concentração de fármaco presente na fase aquosa após a primeira centrifugação durante o preparo das NPs. Através de fórmula semelhante à equação 2 foram obtidos valores sempre inferiores, mas próximos, aos encontrados pelo método direto.

3.5.4 Perfil de Liberação

A determinação do perfil de liberação (PL) foi realizada para as NPs contendo o fármaco CHB utilizando-se a técnica de espectroscopia de absorção molecular [140]. Transferiu-se aproximadamente 10,0 mg de NPs para um microtubo seguida da adição de 2,0 mL de solução tampão PBS, essa solução foi suspensa através do emprego de um homogeneizador mecânico (T10) em seu nível de velocidade 6 (aproximadamente 30.000 rpm) pelo período de 1 minutos. Após esse procedimento, alíquotas de 50,0 µL foram transferidas para trinta e seis compartimentos de uma placa de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 100,0 µL de solução tampão PBS e a placa foi colocada em banho aquecido à 37,0° C, resguardada da luz. Por uma semana, em intervalos de tempo previamente determinados a quantidade de CHB liberado foi determinada através de medidas de absorbância de 40,0 µL de

solução retirada de cada poço. Para se determinar a concentração do fármaco, essas medidas foram aplicadas na equação da curva do CHB. Os resultados obtidos foram apresentados na forma de porcentagem de liberação cumulativa do composto ao longo do tempo utilizando-se a seguinte equação:

$$CHB \text{ Liberado } (\%) = \left(\frac{\text{Quantidade de CHB Liberado}_t}{\text{Quantidade de CHB Encapsulado}} \right) \times 100\% \quad (3)$$

Utilizando-se dessa equação, para cada momento t (sendo $t = 1; 3; 6; 12$ horas; 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 dias) a quantidade de fármaco liberada foi dividida pela quantidade de fármaco que havia sido determinada como incorporada através dos cálculos de eficiência de encapsulamento (equação 2). O ensaio foi realizado com diferentes amostras e a média de cada triplicata foi considerada para construção das curvas em função do tempo. Este ensaio também foi realizado para se determinar o perfil de liberação das NPs contendo fluoresceína.

Um estudo cinético contínuo do comportamento de liberação das amostras NP.CHB.I e NP.CHB.II (30 mg) foi realizado durante as primeiras horas de liberação. Para isso, em uma cubeta de quartzo selada contendo 40,0 μL da suspensão de NPs preparadas para determinação do perfil de liberação foram adicionados 1.960 μL de solução tampão PBS. O procedimento foi realizado mediante agitação constante e temperatura de 37,0° C durante o período de 7,0 horas.

3.5.5 Tamanho e Índice de Polidispersão

Para realizar a caracterização dos parâmetros distribuição de tamanho e potencial zeta foi utilizado um equipamento de espalhamento dinâmico de luz Nano-Zetasizer ZS, modelo ZEN3600 da Malvern Instruments®. O equipamento possui fonte de luz (laser vermelho de 5 mW, He-Ne, com comprimento de onda em 633 nm) e as medidas foram realizadas do detector posicionado em ângulo fixo de 173° em relação ao ângulo de incidência. Para realização das medições, aproximadamente 10,0 mg de NPs desidratadas foram transferidas para um microtubo e ressuspensas em 1,0 mL de água ultrapura com auxílio de um homogeneizador mecânico (T10) em seu nível 6 de velocidade (~30.000 rpm) pelo período de 1 minuto. Desse volume, apenas 100,0 μL foram transferidos para uma

cubeta de poliestireno com 1,0 cm de caminho óptico, juntamente com 900,0 µL de água ultrapura (1,0 mg/mL de NPs). Para cada amostra de NPs preparada foram realizadas três medidas de tamanho e PDI (*PolyDispersity Index*), sendo que, para cada medida foram executadas 30 leituras. Os dados foram coletados a 25,0° C e tratados com o software Zetasizer 6.20[®].

3.5.6 Potencial Zeta

Para determinar o potencial zeta das NPs, 1,0 mL da suspensão coloidal preparada para medida de tamanho foi transferida para uma célula eletroforética e as medidas foram realizadas utilizando-se o mesmo Zetasizer Nano ZS utilizado para medidas de tamanho, alterando a configuração do equipamento do modo size para o modo zeta. Como anteriormente, os dados foram coletados a 25,0° C e tratados com o software Zetasizer 6.20[®].

3.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS NPs

Para realização das medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), aproximadamente 10,0 mg de NPs desidratadas foram transferidas para um microtubo e suspensas em 1,0 mL de água ultrapura com o homogeneizador mecânico (T10) em seu nível 6 de velocidade (~30.000 rpm) pelo período de 1 minuto. Em uma lamínula circular limpa e esterilizada depositou-se 30,0 µL dessa suspensão, a qual foi introduzida no interior de um dessecador a temperatura ambiente e pressão reduzida por 24 horas. Optou-se por não realizar qualquer tipo de fixação química adicional. Após desidratação, a lâmina foi fixada com fita adesiva condutora dupla-face sobre um suporte de alumínio (stub). Devido à baixa condutividade elétrica das NPs, uma fina camada de ouro foi depositada revestindo as amostras através de um processo de metalização em atmosfera de argônio. Esse procedimento foi realizado utilizando um equipamento da marca Balzers[®], modelo SCD-050. As amostras foram examinadas e fotografadas nos aumentos entre 250 a 30.000 vezes, operado em tensão de aceleração de 15,0 kV no modo de detecção de elétrons secundários. Durante a obtenção das imagens no equipamento de MEV

foram registrados espectros de energia dispersiva (EDS, *Energy Dispersive Spectroscopic*) para as amostras em estudo.

Informações com respeito ao tamanho puderam ser extraídas das imagens obtidas através do tratamento delas com o software ImageJ[®], versão 1.46r, fornecido gratuitamente pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH, *National Institutes of Health*) através do site <http://imagej.nih.gov/ij/>. Usando a escala fornecida pelo microscópio junto às imagens pode-se estimar a área das partículas em seu estado não-solvatado (porém, metalizado) e obter uma média da distribuição de seu tamanho. Esses resultados puderam ser comparados com os valores obtidos por DLS.

3.7 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados em laboratório do Departamento de Genética e Morfologia do IB/UnB, sempre sob a inestimável supervisão da Dra. Graziella Anselmo Joanitti. A avaliação citotóxica foi realizada com células tumorais de mama da linhagem MCF-7 e células não-tumorais da linhagem NIH-3T3. Essa segunda linhagem foi utilizada como controle e corresponde a células de fibroblastos imortalizados, muito utilizados desde 1962, quando foram extraídas de embriões de ratos albinos. Foram utilizados materiais esterilizados e sempre que possível o procedimento foi executado no interior de uma câmara de fluxo laminar da marca Veco, modelos CFLV 12, cuja luz ultravioleta permaneceu ligada por pelo menos 20,0 minutos antes do início do procedimento.

3.7.1 Descongelamento das Linhagens Celulares

Alíquotas de 500,0 µL de culturas de células com índice de mortalidade inferior a 3,0% e concentração superior a $2,0 \times 10^6$ células/mL mantidas em nitrogênio líquido foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37,0° C. Em seguida essas células foram centrifugadas a 1.000 rpm por 2 minutos, ressuspensas em 10,0 mL de meio de cultura completo, adicionadas a frascos de cultura com base de 75,0 cm². Esses frascos foram então incubados por 48 horas em estufa da marca Thermo Scientific[®], modelo 8.000 WJ, com 5,0% de CO₂, mantida úmida e a 37° C.

3.7.2 Manutenção das Células

Para assegurar a qualidade das células utilizadas, a cada 48 horas descartava-se o meio “antigo” e adicionava-se 10,0 mL de meio fresco. Usando um microscópio óptico invertido da marca Olympus[®], modelo CK2, foi possível avaliar periodicamente condições celulares como crescimento, aspectos morfológicos, presença de contaminantes além de realizar a contagem celular.

3.7.3 Transferência das Células

Atingido o estágio de confluência (aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células/mL) o meio de cultura contido na garrafa era descartado e as células removidas do frasco pela adição de 6,0 mL de solução estoque de tripsina-EDTA. O frasco era colocado na estufa por aproximadamente 3 minutos e observando no microscópio que as células estavam suspensas adicionava-se 6,0 mL de D-MEM para neutralizar a ação da tripsina e o conteúdo era então transferido para um tubo falcon de 15,0 mL e centrifugado a 1.000 rpm por 2 minutos. Descartava-se o sobrenadante e as células precipitadas eram suspensas em 1,0 mL de meio completo. Em seguida, realizava-se a contagem celular e distribuía as células em placas de 96 poços ou em novas garrafas contendo 10,0 mL de meio de cultura completo e aproximadamente $5,0 \times 10^5$ células/mL. Esse último procedimento tinha a finalidade de manter uma quantidade adequada de matrizes da linhagem utilizada para estudos posteriores.

3.7.4 Contagem Celular

Para contagem das células, 10,0 μ L da suspensão de células obtidas no procedimento anterior foram transferidos para um microtubo juntamente com 40,0 μ L de solução estoque de azul de tripan. Oito microlitros dessa mistura foram inseridos em uma câmara de Neubauer que foi visualizada no microscópio óptico invertido. Considerando-se apenas as células encontradas nos quatro quadrantes dos extremos (maiores laterais) obteve-se uma estimativa da concentração celular após inserir o valor encontrado na equação 4.

$$n^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{\text{células contadas}}{4} \times 5 \times 10^4 \quad (4)$$

Cientes de que as células cultivadas se encontravam em seu estágio logarítmico de crescimento, um volume contendo 10,0% das células foi transferido para um frasco de cultura e guardado na estufa, e com os outros 890,0 μL de suspensão celular remanescente dava-se prosseguimento ao ensaio de viabilidade celular.

3.7.5 Congelamento de Células

Para procedimento de congelamento as células foram lavadas com PBS e desaderidas do frasco pela adição de solução de tripsina-EDTA. O meio contendo as células foi transferido para um tubo falcon, o qual foi centrifugado a 1.200 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 300,0 μL de meio de cultura completo, sendo transferidas para um tubo criogênico previamente resfriado com gelo seco. Em seguida, foram adicionados ao tubo criogênico, 600,0 μL de SBF e 100,0 μL de dimetilsulfóxido em grau biológico (DMSO). O tubo criogênico foi levado imediatamente ao freezer a $-80,0^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e então armazenado em nitrogênio líquido.

3.7.6 Ensaio de Viabilidade

Para esse ensaio foram utilizadas placas de cultura de 96 poços, sendo adotada a concentração padrão de $1,0 \times 10^4$ células/poço. O volume de suspensão celular que deveria ser transferido para cada poço foi determinado inserindo o dado da concentração obtido com a equação 4 na seguinte equação:

$$\text{volume de suspensão celular em mL/poço} = \frac{1,0 \times 10^4 \text{ células}}{n^{\circ} \text{ de células/mL}} \quad (5)$$

Após adicionar em cada poço o volume de suspensão celular determinado pela equação 5 (procedimento de plaqueamento) as placas foram acondicionadas

na estufa pelo período de 24 horas. Em seguida, o meio de cultura contido nas placas foi descartado e em seu lugar adicionado 200 µL de suspensão ou solução contendo a amostra em estudo, sendo assim iniciada a fase de tratamento.

Nessa fase foram avaliadas suspensões contendo as NPs das amostras NP.0.I, NP.0.II, NP.CHB.I, NP.CHB.II e CHB solubilizado em água/etanol 1:1 em variadas concentrações. Para cada concentração foi realizado uma triplicata e após o tratamento as células foram mantidas incubadas em estufa pelo período de 72 horas.

Para preparar as amostras em suspensão, 10,0 mg de NPs desidratadas foram transferidas para microtubos e suspensas em 1,0 mL de D-MEM com o auxílio do homogeneizador mecânico (T10) em seu nível 6 de velocidade (~30.000 rpm) pelo período de 1 minuto. Para a amostra de CHB em solução, media-se a massa de 1,0 mg do fármaco e solubilizava-o em 50 µL de solução água/etanol 1:1 e posteriormente adicionava-se 950,0 µL de D-MEM. Como controle, foi preparada uma solução contendo 50 µL de solução água/etanol 1:1 em 950,0 µL de D-MEM.

Passado o período de incubação, removia-se cuidadosamente o meio contendo o material em estudo e adicionava-se em seu lugar 15,0 µL de solução estoque de MTT e 135,0 µL de meio de cultura fresco. As placas foram novamente introduzidas na estufa de CO₂ por três horas. Entre os produtos formados pelo metabolismo celular na presença do MTT encontra-se a púrpura de formazano. Após esse período, removeu-se o meio de cultura que continha o MTT e adicionava-se em seu lugar 150 µL de DMSO. Homogeneizava-se o sistema com o emprego de uma micropipeta para que os cristais de formazano formados fossem completamente solubilizados no DMSO. Através de um leitor de microplacas da marca SpectraMax[®], modelo M2, foi possível realizar a identificação espectroscópica deste composto na região do comprimento de onda de 570,0 nm, e conseqüentemente, assim realizar uma estimativa do quanto os sistemas em análise seriam viáveis para as células em estudo. Para cada placa utilizada no ensaio havia um grupo controle. Nos poços desse grupo havia células que não foram submetidas a nenhum tipo de tratamento, mas que tiveram as mesmas influências ambientais causadas pela manipulação que as células tratadas. A viabilidade dessas células foi considerada como máxima (100,0%) e a porcentagem de células viáveis que haviam sido submetidas a algum

dos tratamentos foi determinada a partir dessa consideração. A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Células viáveis (\%)} = \left(\frac{\text{Absorbância para grupo tratado}}{\text{Absorbâncias para grupo controle}} \right) \times 100\% \quad (6)$$

Os dados coletados através desse ensaio foram obtidos em triplicata para cada concentração. Para cada linhagem celular serão apresentados gráficos que comparam os resultados obtidos com as células tratadas com o fármaco na forma livre em relação às células tratadas com o fármaco encapsulado nas NPs. Devido as NPs vazias terem apresentado altos valores para morte celular nas maiores concentrações, comparou-se também as duas linhagens celulares tratadas com as NPs vazias. Os demais controles analisados não apresentaram variação significativa em relação ao controle das placas, por isso, foram omitidos.

As células que seriam desprezadas assim como todo material que foi utilizado durante o ensaio receberam adição de hipoclorito de sódio e detergente e foram lavados ou descartados após 24 horas.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E GRÁFICAS

Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados numéricos apresentados como uma média \pm desvio padrão (SD, *Standard Deviation*). As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism[®], versão 5.0. A diferença estatística entre grupos foi determinada pela ANOVA e pelo teste t de Student, sendo considerado estatisticamente significativo $P < 0,0001$. Para auxílio da construção dos gráficos também foram empregados os softwares Origin[®], versão 6.0, e Excel[®], versão 2010.

3.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências apresentadas neste trabalho foram geradas empregando-se o programa Reference Manager[®], versão 12 da ISI Researchsoft – Thomson Scientific.

4 RESULTADOS

4.1. PARÂMETROS DE PRODUÇÃO DAS NPs

A primeira etapa deste estudo consistiu na otimização das condições experimentais a serem adotadas para o preparo das NPs (concentração de PVA, velocidade de emulsificação, número de lavagens, tempo e temperatura de centrifugação). Para isso, foram obtidas amostras produzidas através de procedimentos similares aos descritos nos tópicos 3.4.1 e 3.4.2 variando-se o parâmetro a ser avaliado.

4.1.1 Concentração de PVA

Foram produzidas NPs com diferentes concentrações de agente emulsificante (entre 0,20 e 5,00%_(m/v)). Essas NPs foram analisadas no equipamento Zetasizer Nano ZS e apresentaram um comportamento variável quanto à distribuição de tamanho e potencial zeta mostrado na figura 8.

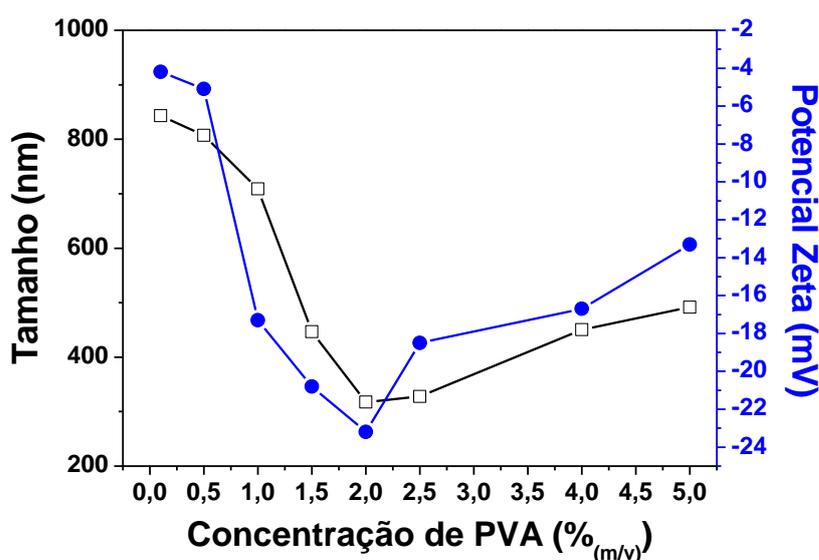


Figura 8: Diâmetro hidrodinâmico médio (— preta) e potencial zeta (— azul) de NPs de PLGA produzidas com diferentes concentrações de PVA pelo método de simples emulsão.

4.1.2 Extração do PVA

Para determinação da concentração de PVA em soluções aquosas a seguinte curva de calibração (figura 9) foi obtida como descrito no tópico 3.3.1.

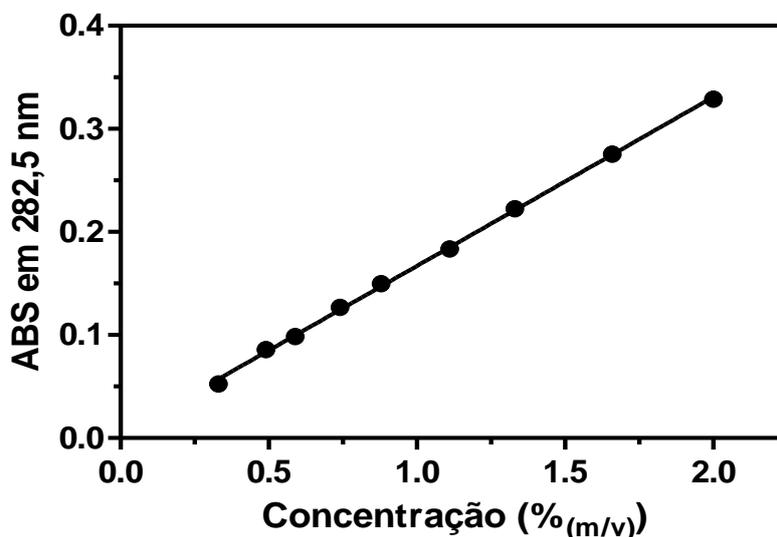


Figura 9: Curva de calibração para o PVA em água.

O índice de correlação (r^2) obtido para esta curva foi de 0,9992 e a equação obtida para determinação da concentração de PVA é apresentada a seguir.

$$\text{Concentração de PVA } (\%_{(m/v)}) = \frac{\text{Absorbância} + 0,003}{0,164} \quad (7)$$

Durante a obtenção das NPs de PLGA foram realizadas medidas espectroscópicas das soluções sobrenadantes obtidas durante procedimento de lavagem. Foi possível identificar os picos desse composto e assim estimar indiretamente a concentração de PVA remanescente aderido as NPs após cinco centrifugações utilizando a equação 7. Dessa forma, pode-se construir um perfil de extração do agente surfactante durante o procedimento de lavagem (figura 10).

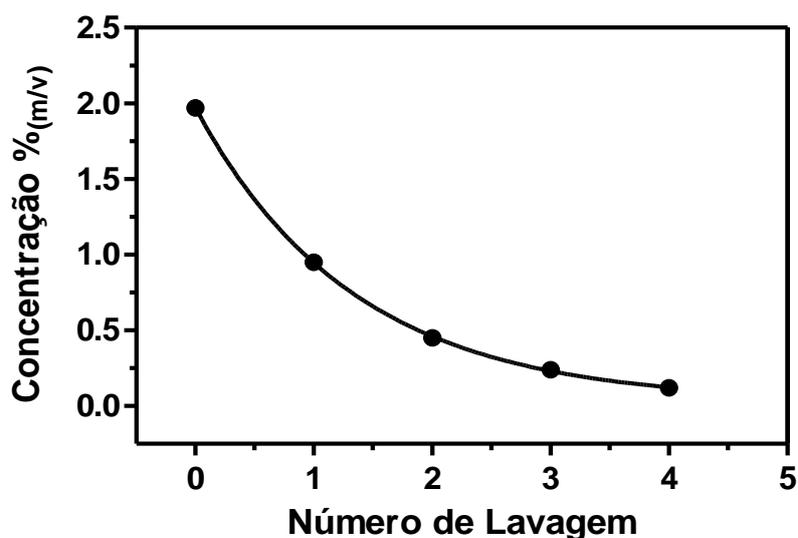


Figura 10: Concentração do PVA na solução sobrenadante durante procedimento de lavagem.

4.1.3 Velocidade de Emulsificação

A velocidade de emulsificação adotada no procedimento de preparo de NPs vazias foi variada entre 1.000 e 17.000 rpm (figura 11). Os valores obtidos para tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta durante a realização desse experimento encontram-se listados na tabela 3.

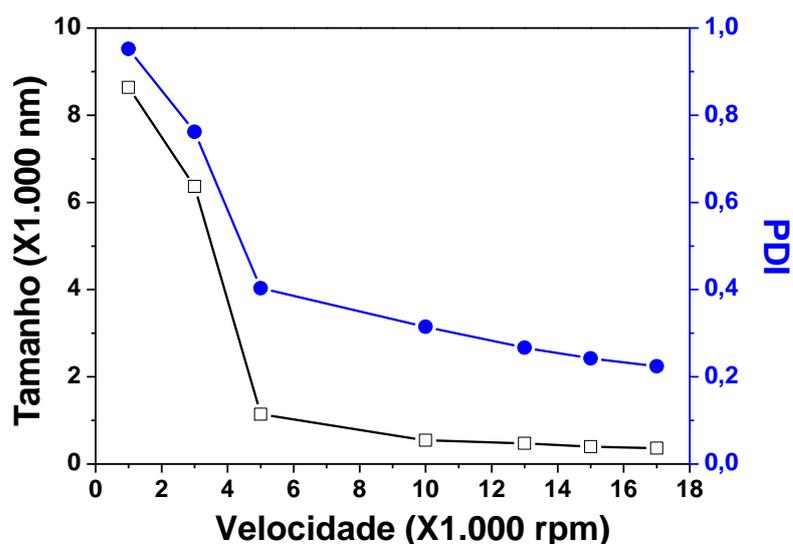


Figura 11: Diâmetro hidrodinâmico médio (— preta) e PDI (— azul) de NPs de PLGA produzidas com diferentes velocidades de emulsificação através do método de simples emulsão.

Tabela 3: Tamanho, PDI e potencial zeta em função da variação da velocidade de emulsificação.

Velocidade (rpm)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
1.000	8637,9	0,952	-12,0±7,0
3.000	6365,3	0,762	-14,1±4,0
5.000	1141,0	0,403	-15,4±4,1
10.000	544,5	0,315	-15,9±3,6
13.000	399,5	0,267	-16,1±4,3
15.000	471,3	0,242	-16,2±4,0
17.000	361,4	0,224	-18,0±3,5

4.1.4 Rendimento do Processo

O rendimento das amostras foi determinado aplicando-se a equação 1 como mencionado no tópico 3.4.2, sendo os resultados obtidos listados na tabela 4.

Tabela 4: Rendimento médio obtido para o processo de obtenção das amostras estudadas.

Amostra	PLGA (mg)	CHB (mg)	FSC (mg)	NPs (mg)	Rendimento (%)
NP.0.I	49,25±0,10	-	-	26,90±0,20	54,60±0,70
NP.0.II	49,25±0,10	-	-	27,50±0,10	55,80±0,40
NP.CHB.I (10)	50,20±0,10	12,30±0,10	-	15,90±0,10	25,40±0,80
NP.CHB.I (30)	53,60±0,10	27,20±0,10	-	40,20±0,20	49,80±0,50
NP.CHB.I (40)	49,00±0,10	43,80±0,10	-	56,00±0,10	60,30±0,20
NP.CHB.II (10)	50,20±0,10	10,80±0,10	-	15,70±0,10	25,70±0,90
NP.CHB.II (30)	53,60±0,10	29,00±0,10	-	41,50±0,10	50,20±0,30
NP.CHB.II (40)	49,00±0,10	44,10±0,10	-	57,00±0,10	61,20±0,20
NP.C&F.II (30)	52,70±0,10	29,60±0,10	1,90±0,10	53,00±0,10	64,40±5,30
NP.FSC.II	52,70±0,10	-	1,90±0,10	18,10±0,10	33,20±5,30

Pode-se relacionar a variação desses resultados com os parâmetros adotados durante a centrifugação das suspensões de NPs durante sua produção.

Dessa forma foram determinados quais seriam os parâmetros mais adequados a serem adotados durante o preparo das NPs. Em seguida, foram realizados os experimentos de caracterização das partículas produzidas.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NPs

4.2.1 Eficiência de Encapsulamento

Para determinar a eficiência de encapsulamento, alíquotas contendo aproximadamente 10,0 mg de todas as amostras produzidas foram destruídas pela adição de diclorometano como descrito no item 3.5.3.

4.2.1.1 *Eficiência de Encapsulamento das NPs de CHB*

Para determinar a concentração do fármaco CHB nos ensaios de perfil de liberação e de eficiência de encapsulamento uma curva de calibração (figura 12) foi obtida como descrito no tópico 3.3.2.

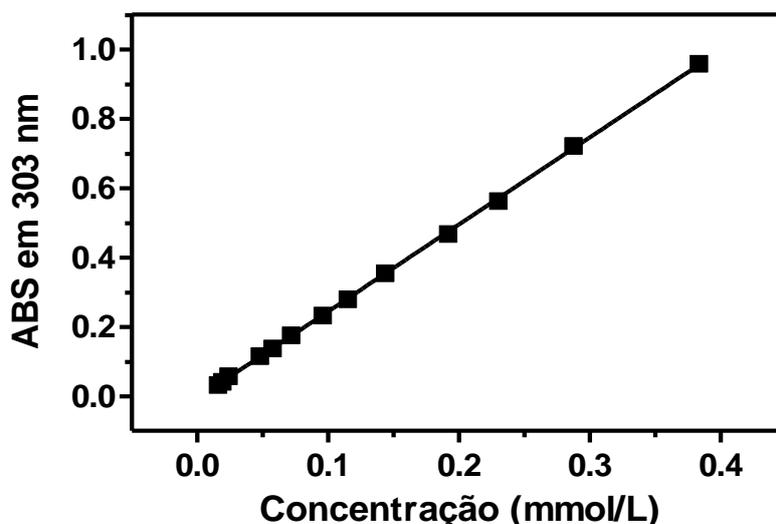


Figura 12: Curva de calibração para o CHB em solução água/etanol 1:1.

O índice de correlação (r^2) obtido para esta curva correspondeu a 0,9998 e a equação utilizada para determinar a concentração das soluções de CHB foi:

$$\text{Concentração de CHB (mol/L)} = \frac{\text{Absorbância} + 0,007}{2.509,3} \quad (8)$$

A %EE dessas NPs foi calculada de acordo com a equação 2 e os valores obtidos variaram entre 48,80 e 94,70% e estão listados na tabela 5.

Tabela 5: Eficiência de encapsulamento das NPs preparadas com CHB.

Amostra	CHB adicionado (mg)	CHB encapsulado (mg)	%EE
NP.CHB.I (10 mg)	10,10±0,10	9,40±0,10	93,60±1,10%
NP.CHB.I (30 mg)	28,30±0,10	21,40±0,10	75,60±0,50%
NP.CHB.I (40 mg)	43,80±0,10	21,60±0,10	49,30±0,50%
NP.CHB.II (10 mg)	9,80±0,10	8,90±0,10	92,60±1,10%
NP.CHB.II (30 mg)	29,00±0,10	21,40±0,10	73,80±0,50%
NP.CHB.II (40 mg)	44,00±0,10	24,90±0,10	56,60±0,50%
NP.C&F.II (30 mg)	29,60±0,10	20,20±0,10	68,30±0,50%

4.2.1.2 *Eficiência de Encapsulamento das NPs com FSC*

Para determinar a concentração de fluoresceína nos ensaios de perfil de liberação e de eficiência de encapsulamento uma curva de calibração (figura 13) foi obtida como descrito no tópico 3.3.3.

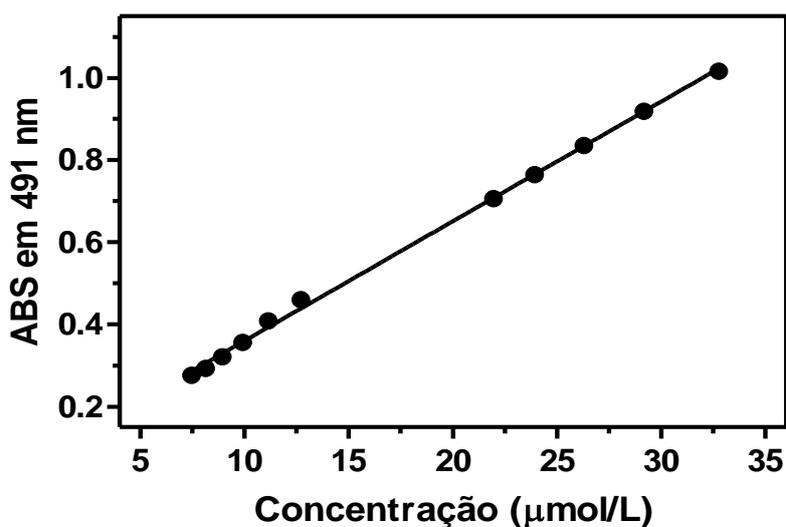


Figura 13: Curva de calibração para a fluoresceína em água.

O índice de correlação (r^2) obtido para essa curva foi de 0,9986 e a equação utilizada para determinação das concentrações de fluoresceína correspondeu a:

$$\text{Concentração de FSC (mol/L)} = \frac{\text{Absorbância} + 0,069}{29.117} \quad (9)$$

Nos procedimentos de dupla emulsificação realizados para obtenção das amostras que deveriam possuir fluoresceína foram adicionados $1,90 \pm 0,10$ mg deste composto em todas as formulações. A eficiência de encapsulamento deste composto correspondendo à $10,80 \pm 1,13\%$ como pode ser visto na tabela 6.

Tabela 6: Eficiência de encapsulamento das NPs preparadas com fluoresceína.

Amostra	FSC adicionada (mg)	FSC encapsulada (mg)	%EE
NP.C&F.II	$1,90 \pm 0,10$	$0,22 \pm 0,10$	$11,60 \pm 45,50\%$
NP.FSC.II	$1,90 \pm 0,10$	$0,19 \pm 0,10$	$10,00 \pm 52,60\%$

4.2.2 Análises Espectroscópicas das NPs

4.2.2.1 *Espectroscopia de Absorção Eletrônica*

Espectros de absorção na região UV-vis para o CHB, a fluoresceína e NPs de PLGA vazias foram registrados como descrito no item 3.5.1.3. O CHB apresentou picos de absorção com máximos em 204,0 nm, 258,0 nm e 303,0 nm (figura 14).

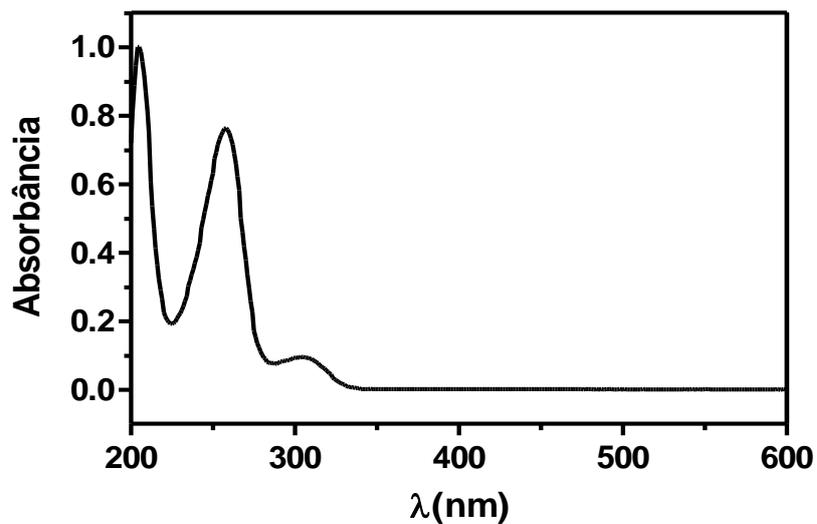


Figura 14: Espectro de absorção eletrônica normalizado para CHB livre em água/álcool 1:1.

A fluoresceína apresentou quatro picos de absorção com máximos em 238,5 nm, 289,0 nm, 323,0 nm e 491,0 nm (figura 15).

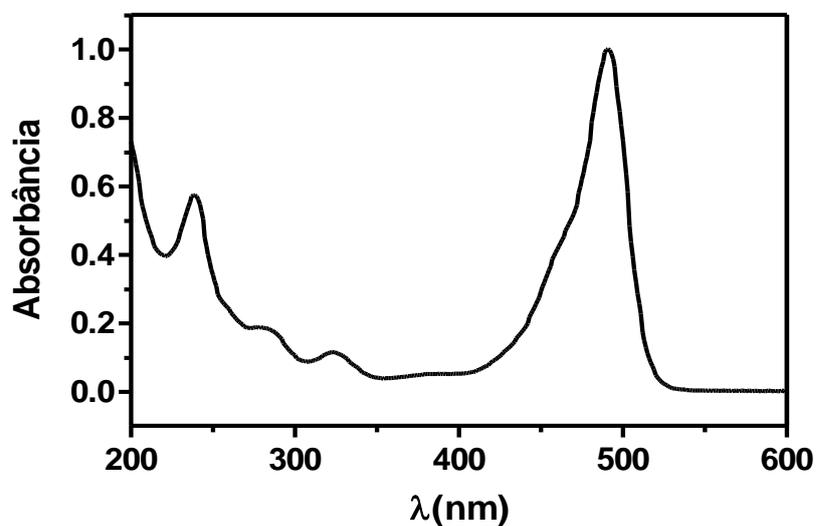


Figura 15: Espectro de absorção eletrônica normalizado para fluoresceína livre em água.

As NPs de PLGA vazias produzidas por ambos os métodos apresentaram um comportamento de absorção decrescente de 200 à 600 nm (figura 16).

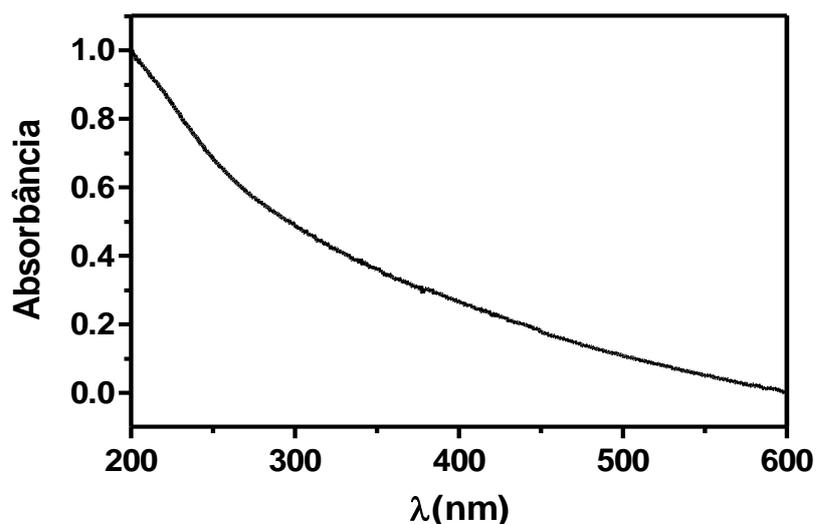


Figura 16: Espectro de absorção eletrônica normalizado para NPs vazias suspensas em água (NP.0.I e NP.0.II).

Os espectros de absorção eletrônica das NPs em suspensão aquosa contendo o fármaco e/ou o fluoróforo encapsulados apresentaram um perfil de absorção misto com característica da matriz polimérica e dos compostos encapsulados. As NPs preparadas com CHB apresentaram um pico de absorbância nas mesmas regiões observadas para o fármaco livre em 205,0 nm, 257,0 nm e em 303,0 nm e seguido de absorbância decrescente até 600 nm (figura 17).

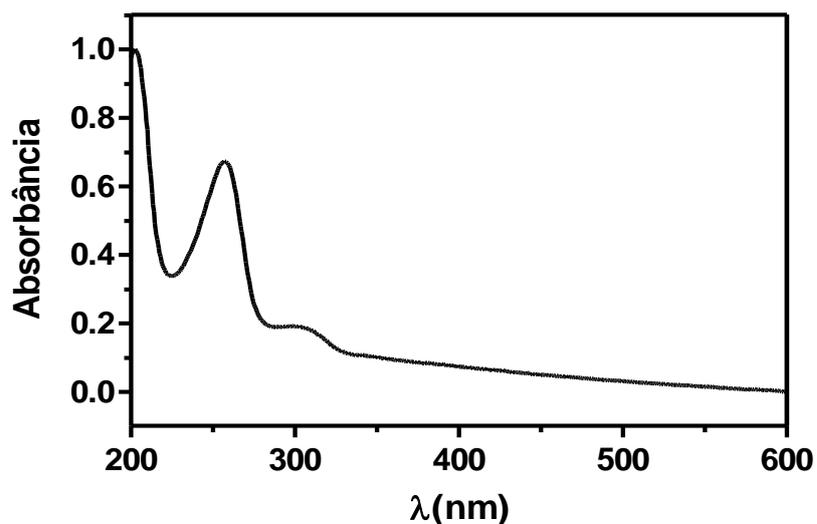


Figura 17: Espectro de absorção eletrônica normalizado para NPs encapsuladas com CHB suspensas em água (NP.CHB.I e NP.CHB.II).

As NPs produzidas com fluoresceína e CHB apresentaram picos com máximo de absorção em 205,0 nm, 260,0 nm, 305,0 nm e 480,0 nm que coincidem com as regiões de absorção dos picos mais intenso do fármaco e do fluoróforo (figura 18).

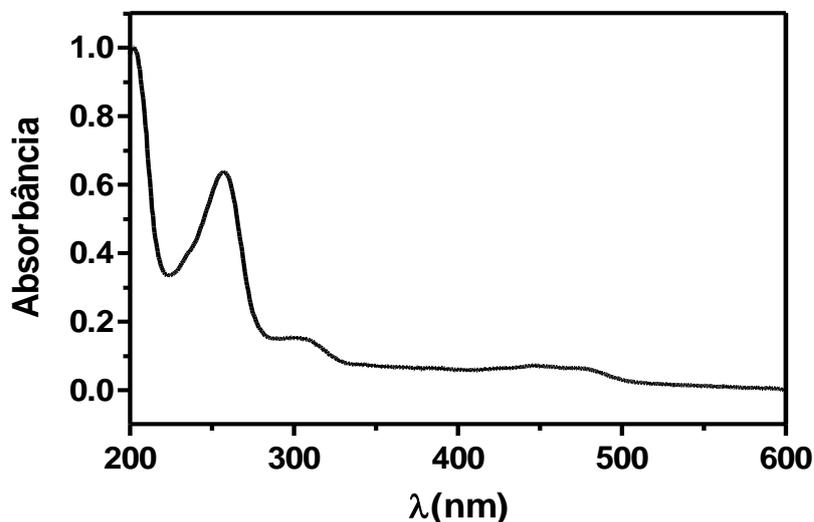


Figura 18: Espectro de absorção eletrônica normalizado para as NPs NP.C&F.II suspensas em água.

4.2.2.2 *Espectroscopia de Fluorescência*

Inicialmente foram identificadas as regiões nas quais a excitação das amostras resultava na emissão de fluorescência. Para isso, foram obtidos espectros de fluorescência em três dimensões de soluções de CHB e de fluoresceína, e de suspensões da matriz polimérica e de NPs encapsuladas com esses compostos. Pôde-se observar que a excitação da solução de CHB (figura 19) no comprimento de onda de 260 nm resultou em emissão máxima de fluorescência em 370,0 nm.

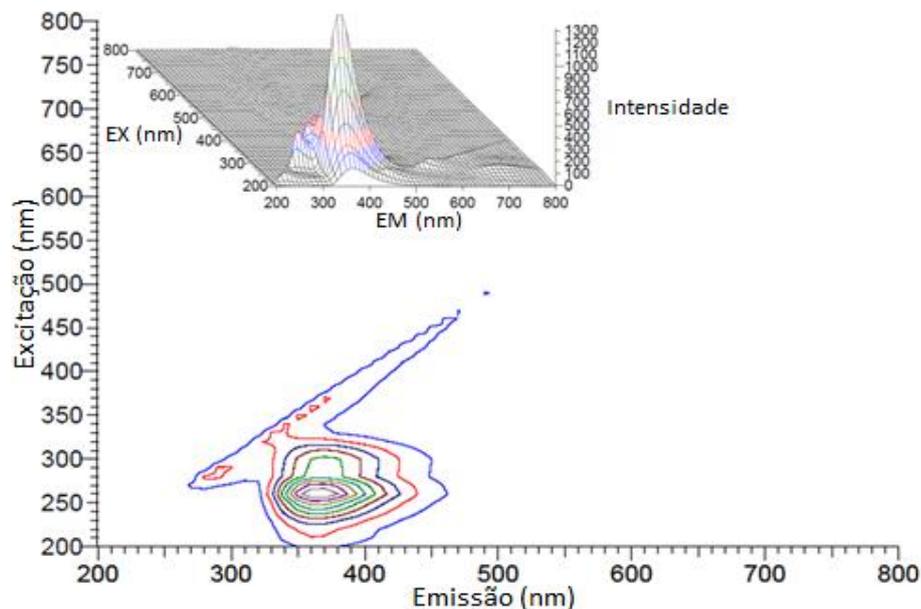


Figura 19: Espectros de fluorescência em duas e três dimensões para CHB em água/álcool 1:1.

Para a solução de fluoresceína a excitação nos comprimentos de onda de 230 e 490 nm resultou na emissão máxima de fluorescência em 515,0 nm (figura 20).

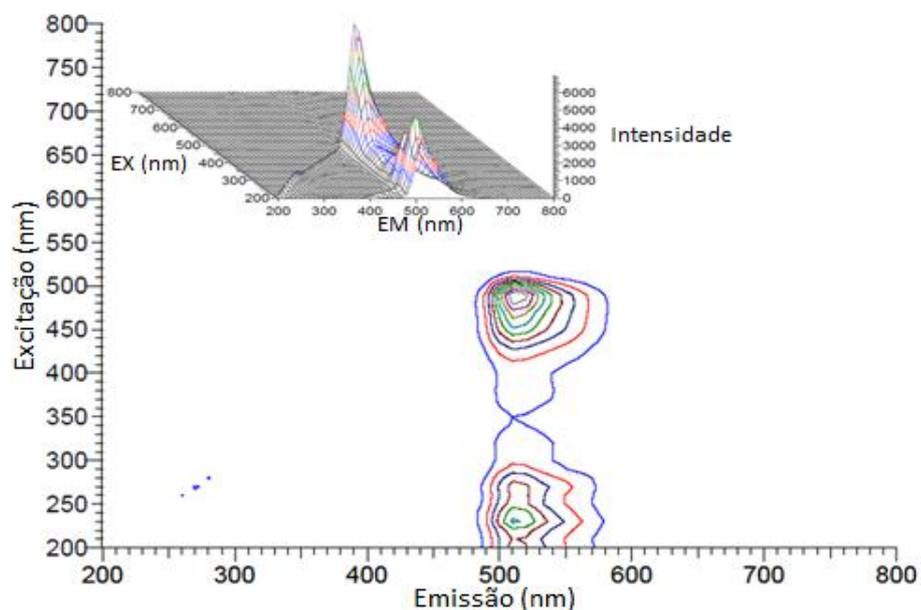


Figura 20: Espectros de fluorescência em duas e três dimensões para fluoresceína em água.

A matriz polimérica não apresentou emissão significativa de fluorescência e foi possível a identificação das propriedades de fluorescência dos compostos encapsulados nas NPs conjugadas com o fármaco e/ou o fluoróforo como mostrado para a amostra NP.C&F.II na figura 21.

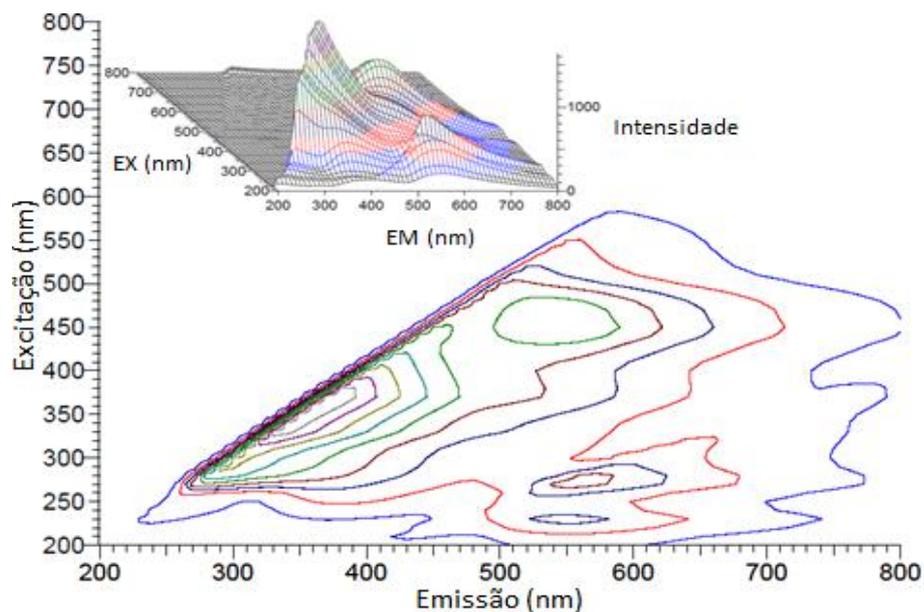


Figura 21: Espectros de fluorescência em duas e três dimensões para NPs da amostra NP.C&F.II suspensas em água.

Em seguida, foram obtidas medidas estacionárias de fluorescência excitando as amostras nos comprimentos de onda de máxima absorção observados nos espectros UV-vis para o clorambucil (258,0 e 303,0 nm) e para a fluoresceína (491,0 nm). Excitando as amostras em 258 nm observou emissão para o composto CHB nas amostras de CHB Livre (emissão em 354,0 nm), NP.CHB.I (emissão em 362,0 nm) e NP.CHB.II (emissão em 352,0 nm) como visto na figura 22.

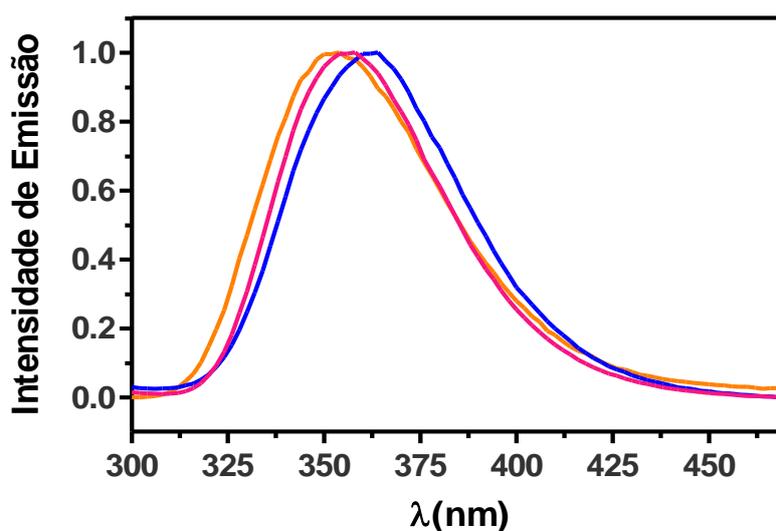


Figura 22: Espectros normalizados de emissão de fluorescência para: CHB em água/álcool 1:1 (— laranja); NP.CHB.I suspensa em água (— azul) e NP.CHB.II suspensa em água (— rosa), no comprimento de onda de excitação ($\lambda_{exc.}$) igual a 258,0 nm.

Excitando em 303 nm foi observada emissão para o CHB nas amostras de CHB livre (emissão em 354,0 nm), NP.CHB.I (emissão em 362,0 nm), NP.CHB.II (emissão em 352,0 nm) como visto na figura 23.

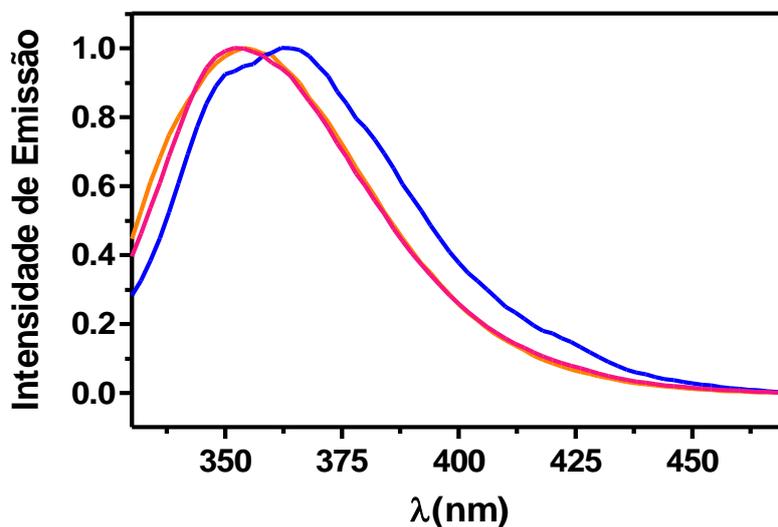


Figura 23: Espectros normalizados de emissão de fluorescência para: CHB em solução água/álcool 1:1 (— laranja); NP.CHB.I suspensa em água (— azul) e NP.CHB.II suspensa em água (— rosa), $\lambda_{exc.} = 303,0$ nm.

Para a excitação das amostras em 303 nm foi observada ainda a emissão para a fluoresceína nas amostras de fluoresceína livre (emissão em 528,0 nm) e de NP.C&F.II (emissão em 510,0 nm) como visto na figura 24.

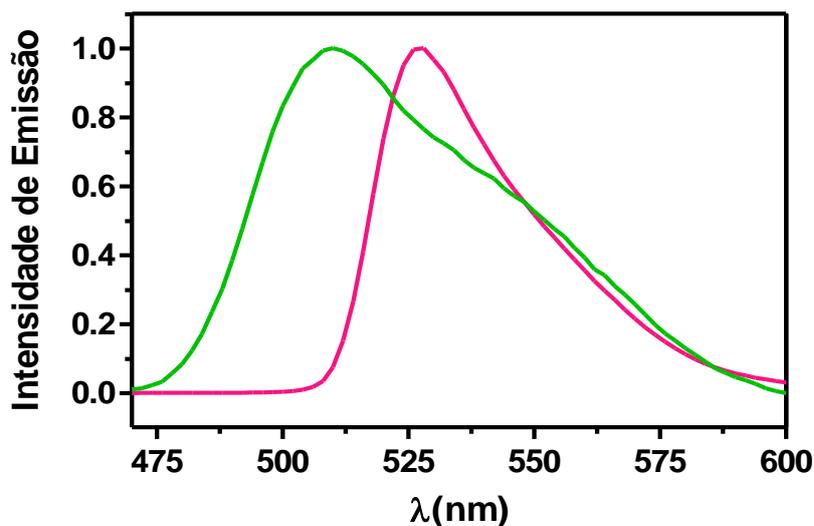


Figura 24: Espectros normalizados de emissão de fluorescência para: fluoresceína em água (— rosa) e NP.C&F.II suspensa em água (— verde), $\lambda_{exc.} = 303,0$ nm.

Já na excitação das amostras em 491 nm foi observada emissão de fluorescência para a FSC nas amostras de fluoresceína livre (emissão em 528,0 nm), e das NPs suspensas em água das amostras NP.C&F.II e NP.FSC.II (ambas com pico de emissão em 510,0 nm) como visto na figura 25.

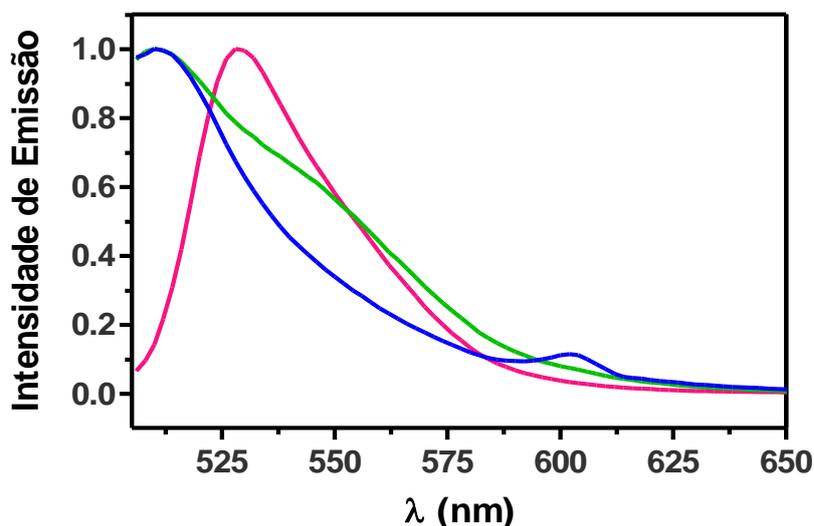


Figura 25: Espectros normalizados de emissão de fluorescência para: fluoresceína em água (— rosa), NP.C&F.II suspensa em água (— verde) e NP.FSC.II suspensa em água (— azul) $\lambda_{exc.} = 491,0$ nm.

Os comprimentos de onda de máxima emissão para os picos encontrados nos espectros das figuras 22, 23, 24 e 25 foram listados na tabela 7 junto do composto que foi excitado em determinado comprimento de onda.

Tabela 7: Pico de emissão de fluorescência em função dos comprimentos de excitação e composto(s) excitado(s).

Excitação	258,0 nm		303,0 nm		491,0 nm	
	CHB	FSC	CHB	FSC	CHB	FSC
CHB Livre	354 nm	-	354 nm	-	-	-
FSC Livre	-	-	-	528 nm	-	528 nm
NP.CHB.I	362 nm	-	362 nm	-	-	-
NP.CHB.II	352 nm	-	352 nm	-	-	-
NP.C&F.II	350 nm	-	350 nm	510 nm	-	510 nm
NP.FSC.II	-	-	-	-	-	510 nm

4.2.2.3 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Espectros de absorção molecular na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro do tipo FTIR como descrito no item 3.5.1.2. Foram analisadas amostras do fármaco na forma livre e encapsulada, e da matriz polimérica (figuras 26, 27 e 28). Os principais picos identificados nos espectros das amostras foram listados na tabela 8 juntamente com suas interações moleculares.

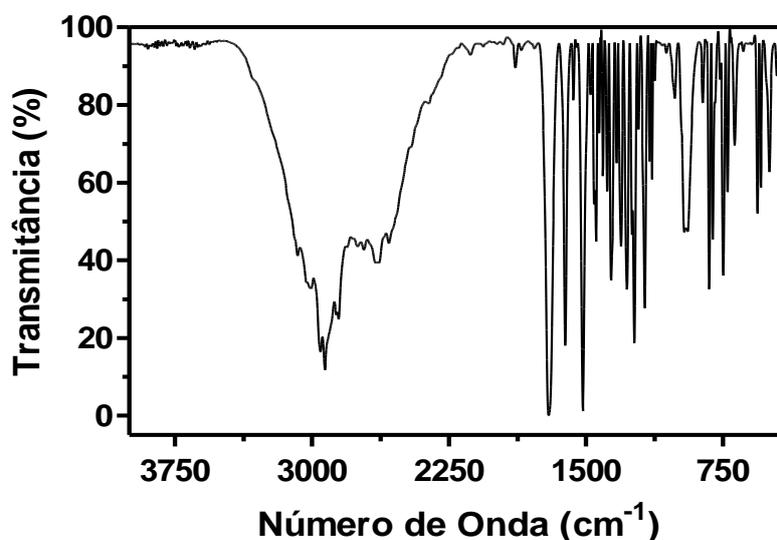


Figura 26: Espectro de FTIR do fármaco CHB na forma livre em pastilha de KBr.

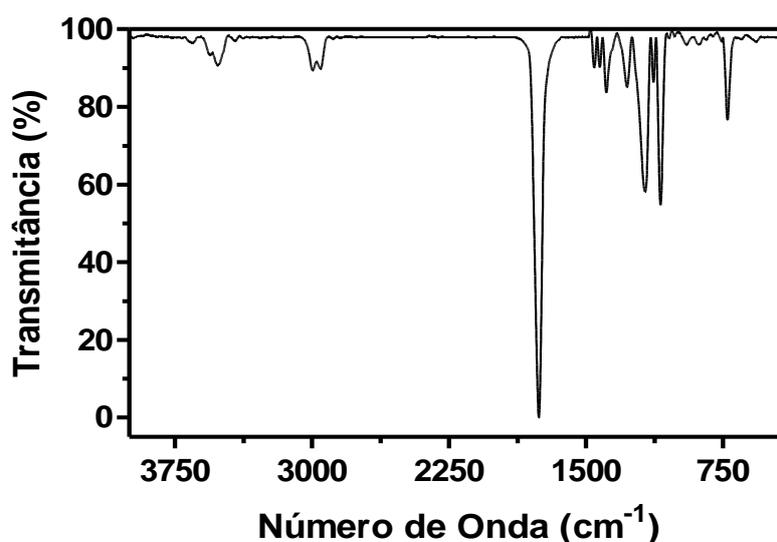


Figura 27: Espectro de FTIR da matriz polimérica (NP.0.I e NP.0.II) em pastilha de KBr.

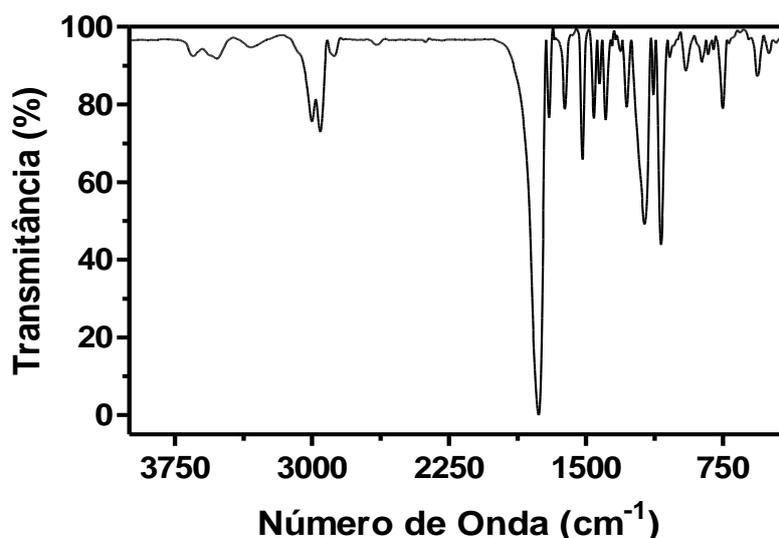


Figura 28: Espectro de FTIR das NPs de PLGA contendo CHB (NP.CHB.I e NP.CHB.II) em pastilha de KBr.

Tabela 8: Bandas de absorção no FTIR observadas para CHB livre; PLGA e CHB encapsulado.

Pico (cm ⁻¹)	Espectro			Interação
	CHB	PLGA	NPs de CHB	
3000		X	X	Deformação axial C-H (CH ₂)
2954		X	X	Deformação axial C-H (CH ₃)
1760		X	X	Deformação axial C=O do PLGA
1705	X		X	Deformação axial C=O do CHB
1615	X		X	Deformação axial C=C
1518	X		X	Deformação angular assimétrica H-C-H
1455		X	X	Deformação angular assimétrica do CH ₃
1426		X	X	Deformação angular O-H no plano
1391		X	X	Deformação angular simétrica do CH ₃
1277	X		X	Deformação axial C-N
1180		X	X	Deformação axial C-O
1131		X	X	Deformação axial assimétrica de C-C-O
1092		X	X	Deformação axial assimétrica de C-O-C
940	X		X	Deformação angular simétrica de C-N-C
827	X		X	Deformação angular simétrica de C-C-N
806	X		X	Deformação angular do H-C-H
746	X	X	X	Deformação axial do C-H
560	X		X	Deformação axial do C-Cl
544	X		X	Deformação angular simétrica do C-C-C

4.2.3 Análises Calorimétricas e Termogravimétricas

4.2.3.1 TGA/DTA Simultâneos

Termogramas do tipo TGA/DTA simultâneos foram obtidos para diferentes amostras como descrito no item 3.5.2.1. As interpretações dos resultados encontram-se sumarizados na tabela 9. Para a amostra de CHB livre foram identificadas as suas temperaturas de fusão (pico DTA em 68,0° C), de combustão (inflexão TGA em 248,0° C) e de ebulição (inflexão TGA em 425,0° C) (figura 29).

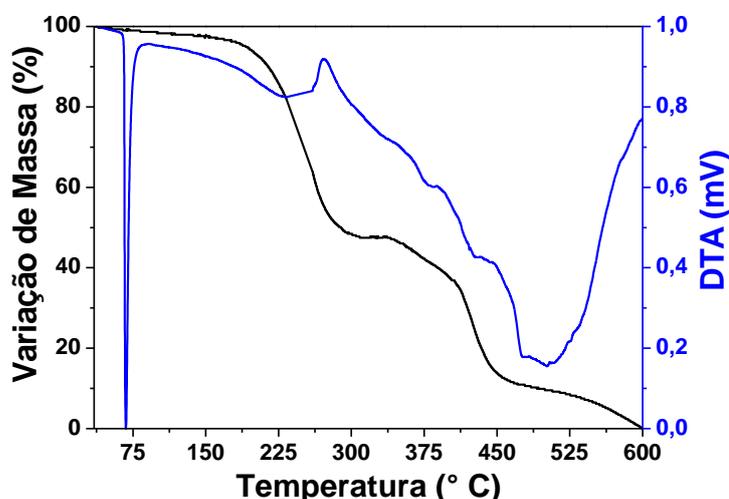


Figura 29: Curvas TGA (— preta) /DTA (— azul) do fármaco CHB na forma livre (4,27 mg de CHB).

Na amostra de PLGA livre foram identificadas as suas temperaturas de transição vítrea (pico DTA em 44,0° C) e de decomposição (pico DTA/inflexão TGA em 304,0° C) como visto na figura 30.

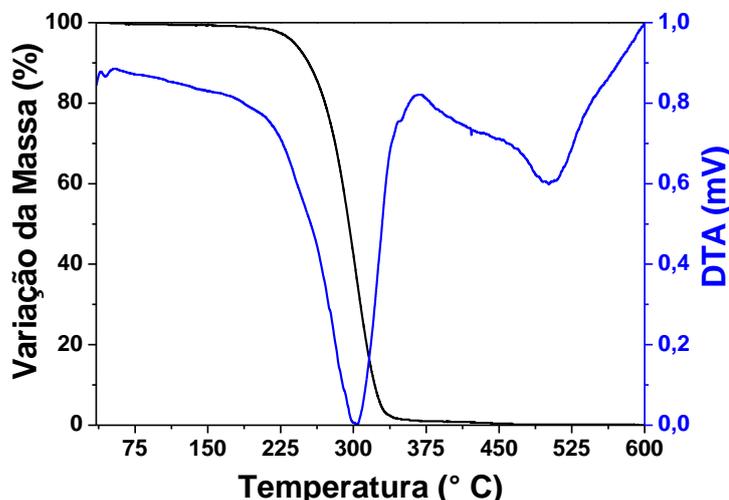


Figura 30: Curvas TGA (— preto) /DTA (— azul) da matriz polimérica (5,72 mg de NP.0.II).

Os termogramas das amostras contendo CHB encapsulado apresentaram um perfil térmico misto, com características do fármaco e da matriz polimérica. Nessas amostras foram identificadas as temperaturas de transição vítrea do copolímero (pico DTA em 42,0° C), de fusão do fármaco (pico DTA em 65,0° C), de inflamação do fármaco (pico DTA em 241,0° C), de decomposição do copolímero (pico DTA/inflexão TGA em 335,0° C) e de ebulição do fármaco (pico DTA/perda de massa TGA em 431,0° C) como visto na figura 31.

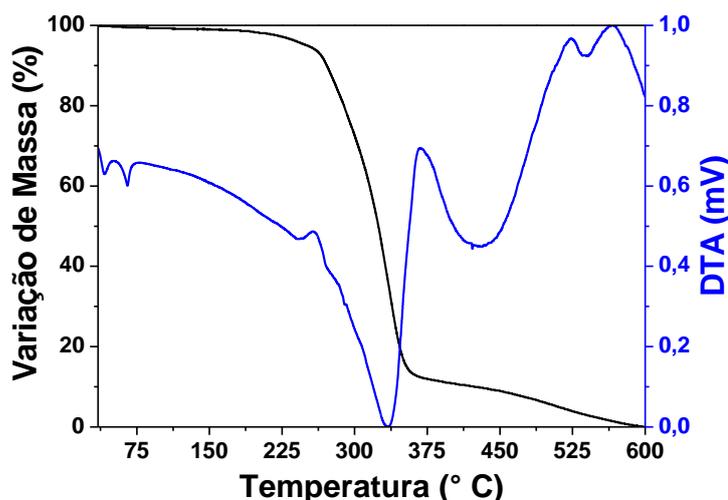


Figura 31: Curvas TGA (— preto) /DTA (— azul) do fármaco CHB encapsulado (4,40 mg de NP.CHB.II).

Tabela 9: Eventos térmicos observados durante as análises simultâneas de TGA/DTA para as amostras de CHB Livre; PLGA e CHB encapsulado.

Amostra	Pico/Inflexão (°C)	Região (°C)	Evento
CHB Livre	67,74	60,0-70,0	Fusão do fármaco
CHB Livre	247,57	185,0-300,0	Inflamação do fármaco
CHB Livre	425,45	380,0-460,0	Ebulição do fármaco
PLGA	44,38	40,0 – 50,0	Transição vítrea do copolímero
PLGA	303,55	235,0-345,0	Decomposição do copolímero
CHB encapsulado	41,82	35,0-50,0	Transição vítrea do copolímero
CHB encapsulado	65,42	55,0-75,0	Fusão do fármaco
CHB encapsulado	241,25	185,0-255,0	Inflamação do fármaco
CHB encapsulado	334,52	265,0-360,0	Decomposição do copolímero
CHB encapsulado	431,30	380,0-500,0	Ebulição do fármaco

4.2.3.2 DSC

As amostras analisadas por TGA/DTA simultâneo também foram analisadas por DSC de acordo com o procedimento descrito no item 3.5.2.2. Apesar de terem sido coletadas informações entre 35,0 e 500,0° C, a título de discussão foram escolhidos apenas os dados contidos dentro da faixa de 35,0 à 80,0° C. Neste intervalo, para a amostra de CHB livre foi identificada a sua temperaturas de fusão (pico em 64,0° C), como visto na figura 32.

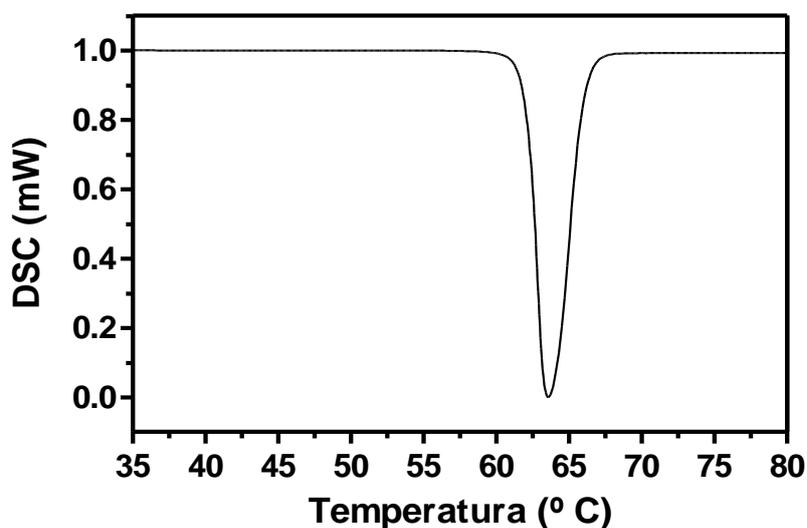


Figura 32: Curva DSC normalizada para o fármaco CHB na forma livre (3,20 mg de CHB).

No mesmo intervalo foi identificada a temperatura de transição vítrea (pico em 46,0° C) para a amostra de PLGA livre (figura 33).

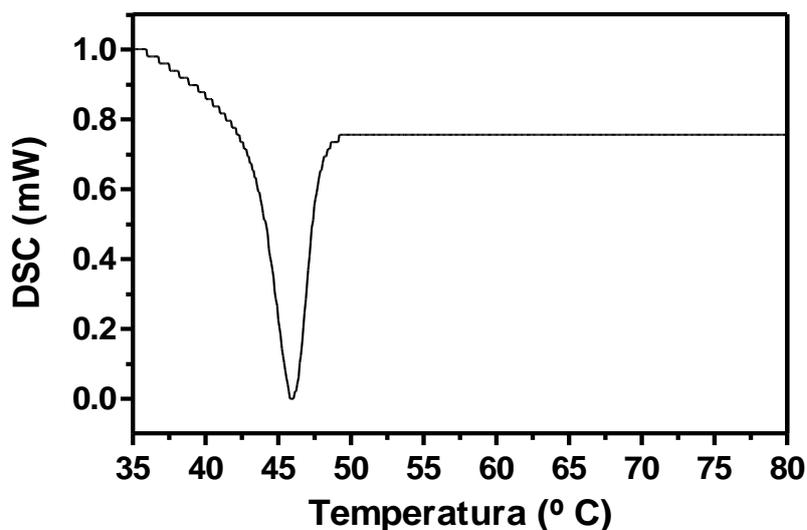


Figura 33: Curva DSC normalizada da matriz polimérica (4,50 mg de NP.0.I).

As análises de DSC das amostras contendo CHB encapsulado apresentaram um perfil térmico misto, com características do fármaco e da matriz polimérica. Foram identificadas nas amostras as temperaturas de transição vítrea do copolímero (pico em 40,0° C) e de fusão do CHB (pico em 62,0° C) como visto na figura 34.

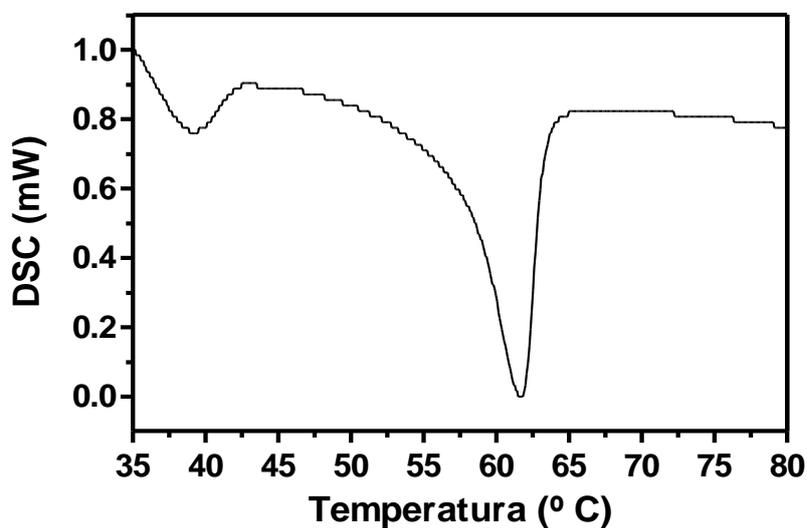


Figura 34: Curva DSC normalizada do CHB encapsulado (3,90 mg de NP.CHB.I).

A interpretação dos resultados obtidos encontra-se descritos na tabela 10.

Tabela 10: Eventos térmicos observados durante as análises de DSC para as amostras de CHB Livre; PLGA e CHB encapsulado.

Amostra	Pico/Inflexão (°C)	Região (°C)	Evento
CHB Livre	63,60	61,0-66,0	Fusão do fármaco
PLGA	45,94	35,0-49,0	Transição vítrea do polímero
CHB encapsulado	39,81	35,0-42,0	Transição vítrea do polímero
CHB encapsulado	61,69	52,0-65,0	Fusão do fármaco

4.2.4 Perfil de Liberação

Durante o período de sete dias foram realizadas medidas em triplicata do perfil de liberação para o fármaco CHB nas amostras NP.CHB.I, NP.CHB.II e NP.C&F.II como descrito no item 3.5.4. As matrizes poliméricas produzidas apresentaram comportamento semelhante, com uma liberação acentuada do fármaco durante as primeiras vinte e quatro horas (média de $79,1 \pm 4,5\%$ de CHB liberado), seguido pela liberação de forma sustentada até às 120 horas (média de $87,0 \pm 1,2\%$ de CHB liberado) e um novo salto até às 168 horas (média de $100,6 \pm 0,9\%$ de CHB liberado). Nas figuras 35, 36 e 37 são apresentadas as médias (\pm SD) de liberação diária obtidas para as amostras NP.CHB.I, NP.CHB.II e NP.C&F.II, respectivamente.

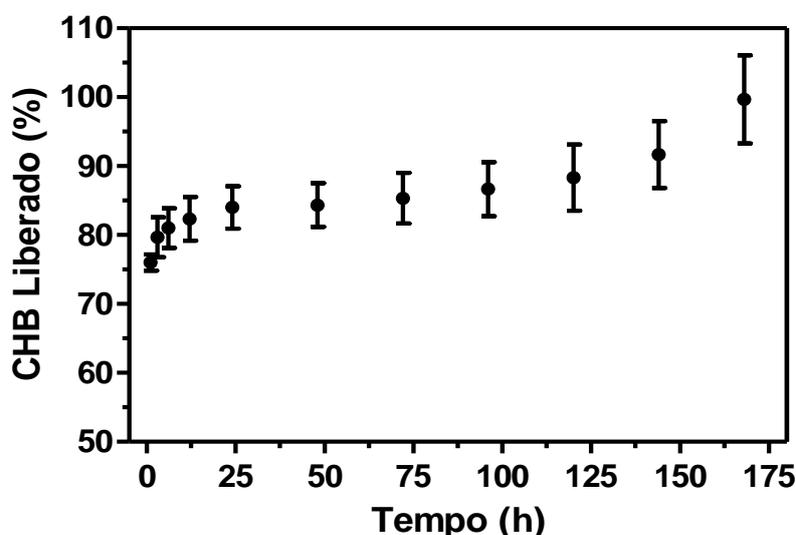


Figura 35: Perfil de liberação obtido em triplicata durante sete dias (168 horas) para NPs da amostra NP.CHB.I, suspensas em PBS e mantidas em banho a $37,0^\circ\text{C}$.

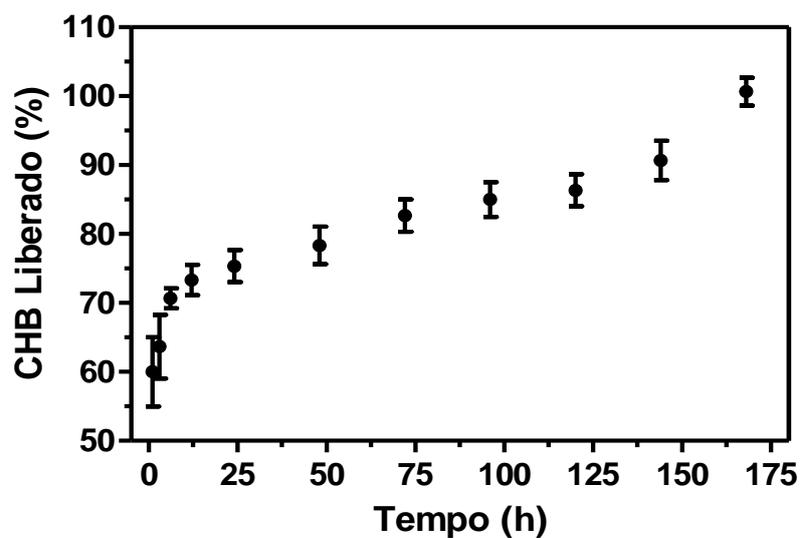


Figura 36: Perfil de liberação obtido em triplicata durante sete dias (168 horas) para NPs da amostra NP.CHB.II, suspensas em PBS e mantidas em banho a 37,0° C.

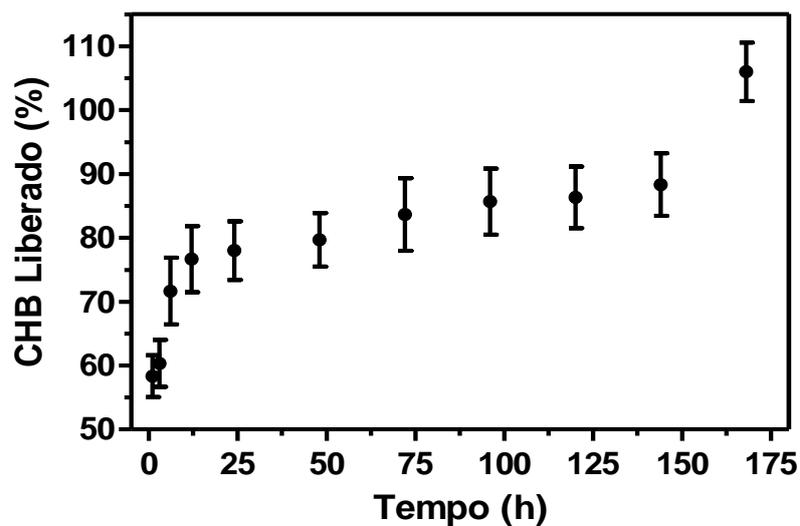


Figura 37: Perfil de liberação obtido em triplicata durante sete dias (168 horas) para NPs da amostra NP.C&F.II, suspensas em PBS e mantidas em banho a 37,0° C.

Na figura 38 são apresentados os perfis de liberação dos três sistemas de liberação controlada produzidos com CHB encapsulado.

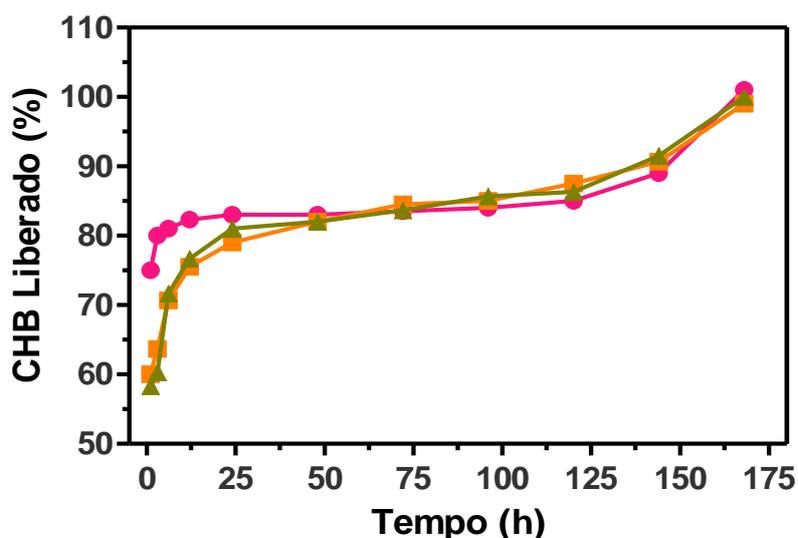


Figura 38: Média para o perfil de liberação para as NPs das amostras NP.CHB.I (— rosa), NP.CHB.II (— laranja) e NP.C&F.II (— verde).

O ensaio cinético realizado durante as sete primeiras horas comprovou o que havia sido observado com as leituras pontuais para o mesmo período. Através de um comportamento linear, a NP.CHB.II apresentou liberação variando entre 59,0 e 71,0% para o período compreendido entre 1,0 e 7,0 horas da suspensão de NPs mantidas sob agitação e temperatura constantes (37,0° C). Já a NP.CHB.I mantida sob as mesmas condições apresentou para este período liberação variando entre 76,0 e 86,0%. Ambos os resultados encontram-se descritos na figura 39.

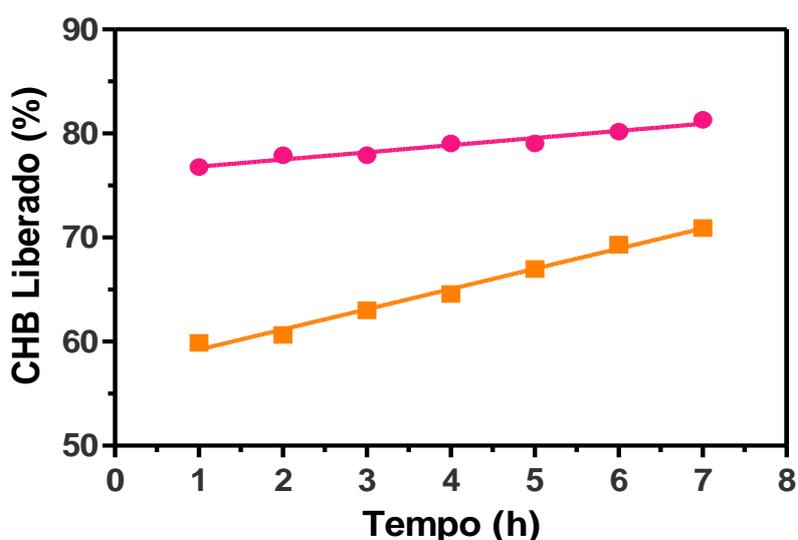


Figura 39: Ensaio cinético contínuo realizado durante o período de 7 horas para as NPs das amostras NP.CHB.I (— rosa) e NP.CHB.II (— laranja), suspensas em PBS e mantidas em banho a 37,0° C.

Foi obtido também o perfil de liberação da fluoresceína para a amostra NP.C&F.II mantida em suspensão durante 9 dias. Houve acentuada liberação nas primeiras 24 horas ($93,0 \pm 4,6\%$) sendo observada completa liberação do composto próximo ao quarto dia (figura 40).

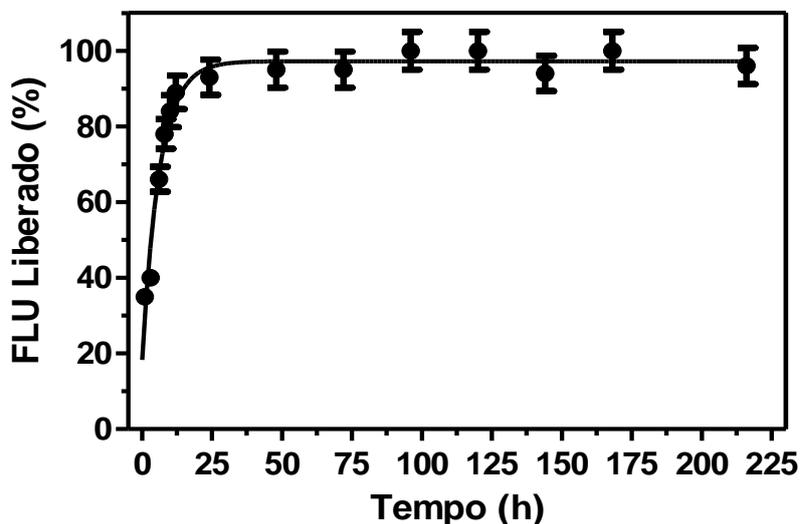


Figura 40: Perfil de liberação da fluoresceína obtido durante 9 dias (216 horas) para as NPs da amostra NP.C&F.II, suspensas em PBS e mantidas em banho a $37,0^{\circ}\text{C}$.

4.2.5 Diâmetro Hidrodinâmico e Distribuição de Tamanho

As NPs produzidas tiveram seu diâmetro avaliado pela técnica de espalhamento de luz em seu modo dinâmico (DLS). As amostras de NPs vazias e encapsuladas com CHB, com a adição de 10,0 mg do fármaco, apresentaram diâmetros entre 238,0 e 334,0 nm e PDI entre 0,120 e 0,260 como observado nos gráficos da figura 41.

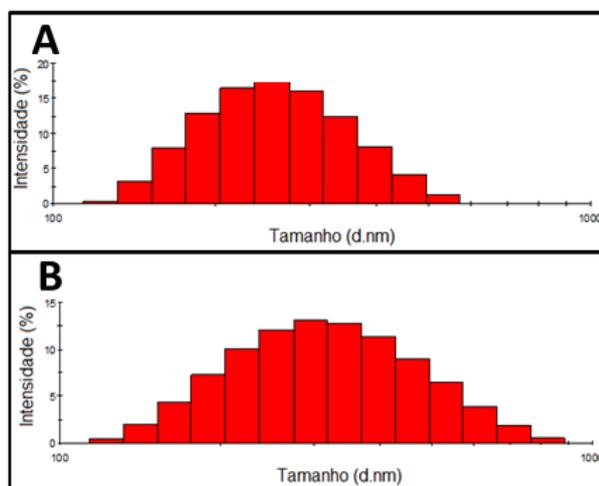


Figura 41: Análises de tamanho em função da intensidade das NPs suspensas em água para: A – NP.CHB.I (10 mg) e B – NP.CHB.II (10 mg).

Análises insatisfatórias quanto aos parâmetros de tamanho e índice de polidispersão foram obtidas para as NPs de CHB preparadas com as concentrações maiores de fármaco (30,0 e 40,0 mg). As médias obtidas para os diâmetros dessas NPs variaram entre 1080,0 e 1428,0 nm, e o PDI entre 0,759 e 0,944, como pode ser visto nas figuras 42 e 43.

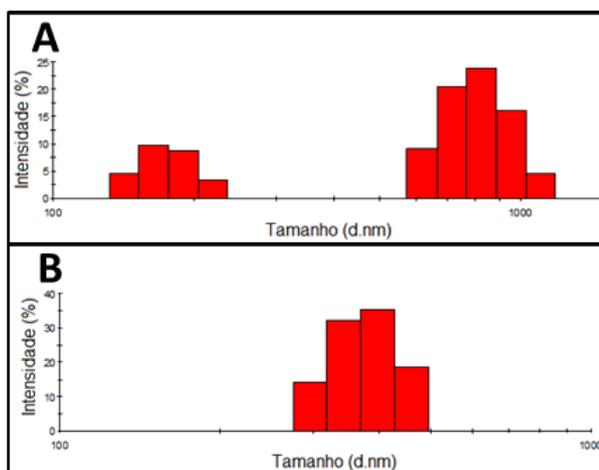


Figura 42: Análises de tamanho em função da intensidade das NPs suspensas em água, para: A - NP.CHB.I (30 mg) e B - NP.CHB.II (30 mg).

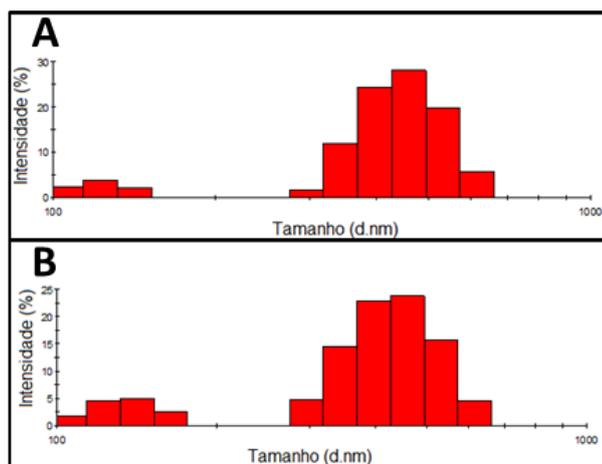


Figura 43: Análises de tamanho em função da intensidade das NPs suspensas em água, para: A - NP.CHB.I (40 mg) e B - NP.CHB.II (40 mg).

Os resultados obtidos para as NPs contendo fluoresceína apresentaram diâmetros entre 630,70 e 854,90 nm, com valores de PDI entre 0,446 e 0,595 (figura 44).

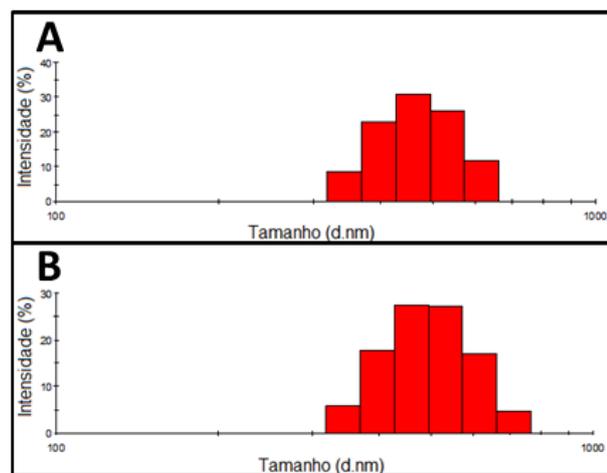


Figura 44: Análises de tamanho em função da intensidade das NPs suspensas em água, para: A - NP.C&F.II (10 mg) e B - NP.FSC.II.

Os valores médios obtidos para todas as análises encontram-se listados na tabela 11.

Tabela 11: Valores obtidos para média do diâmetro hidrodinâmico das NPs através de DLS.

Amostra	Tamanho Médio (nm)	PDI
NP.0.I	288,90±1,80	0,131±0,028
NP.0.II	238,40±2,40	0,118±0,025
NP.CHB.I (10 mg)	250,30±1,40	0,155±0,031
NP.CHB.I (30 mg)	1326,00±38,00	0,759±0,274
NP.CHB.I (40 mg)	1428,00±388,40	0,944±0,094
NP.CHB.II (10 mg)	334,40±9,80	0,263±0,026
NP.CHB.II (30 mg)	1271,00±254,90	0,842±0,045
NP.CHB.II (40 mg)	1080,00±131,40	0,813±0,040
NP.C&F.II (30 mg)	630,70±102,60	0,446±0,026
NP.FSC.II	854,90±79,11	0,595±0,055

4.2.6 Estabilidade Física das NPs em Suspensão

A estabilidade dos sistemas obtidos foi avaliada mediante a determinação da variação da média de tamanho e de índice de polidispersão das NPs mantidas em suspensão e acondicionadas em três diferentes temperaturas (-2,0; 25,0 e 37,0° C) durante 192,0 horas. Alíquotas contendo aproximadamente 10,0 mg das amostras NP.0.I e NP.CHB.I (10 mg) foram suspensas em 1,0 mL de solução tampão PBS e a cada 48,0 horas foram realizadas leituras em triplicatas no equipamento de DLS, como descrito no tópico 3.5.5. Para a NP.0.I foi observado um comportamento crescente do seu tamanho até o quarto dia (de 289,0 nm à 1.685,0 nm em -2,0° C / 2.091,0 nm em 25,0° C / 2.837,0 nm em 37,0° C) e posteriormente decrescente até o oitavo dia (1.038,0 nm em -2,0° C / 1.380,0 nm em 25,0° C / 2.014,0 nm em 37,0° C), como apresentado na figura 45.

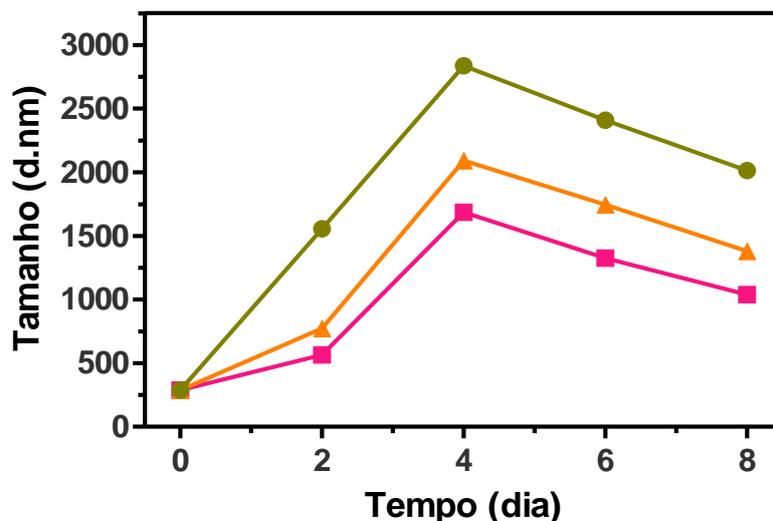


Figura 45: Variação do tamanho das NPs vazias (NP.0.I) suspensas em PBS durante o período de oito dias nas temperaturas: -2,0° C (— rosa); 25,0° C (— laranja) e 37,0° C (— verde).

Para a mesma amostra foi observado um comportamento crescente do seu índice de polidispersão até o quarto dia (de 0,125 a 0,600 em -2° C / 0,813 em 25° C / 0,850 em 37° C) e posteriormente estável até o oitavo dia (0,650 em -2° C / 0,794 em 25° C / 0,840 em 37° C), como apresentado na figura 46.

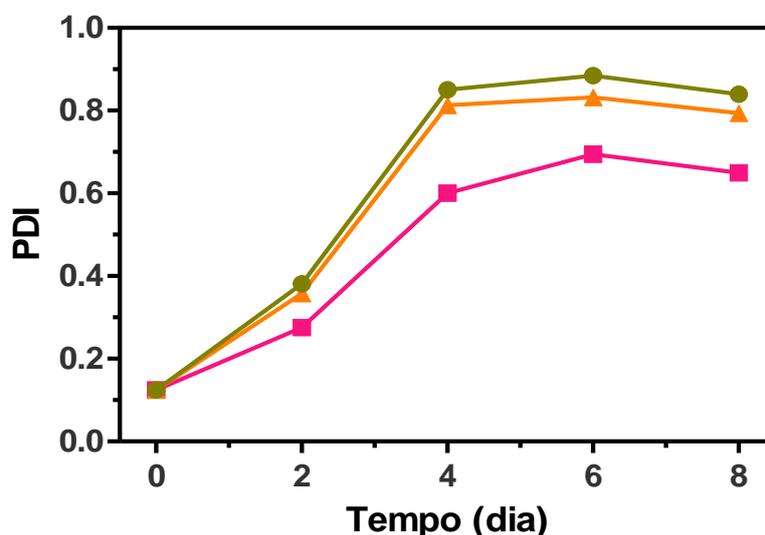


Figura 46: Variação do índice de polidispersão das NPs vazias (NP.0.I) suspensas em PBS durante o período de oito dias nas temperaturas: -2,0° C (— rosa); 25,0° C (— laranja) e 37,0° C (— verde).

Para a amostra NP.CHB.I (10 mg) foi observado um comportamento crescente do seu tamanho até o sexto dia (de 292,0 nm a 1.610,0 nm em -2° C /

2.030,0 nm em 25° C / 2.433,0 nm em 37° C) e aparentemente estável até o oitavo dia (1.411,0 em -2° C / 1.966,0 em 25° C / 2.145,0 em 37° C) (figura 47).

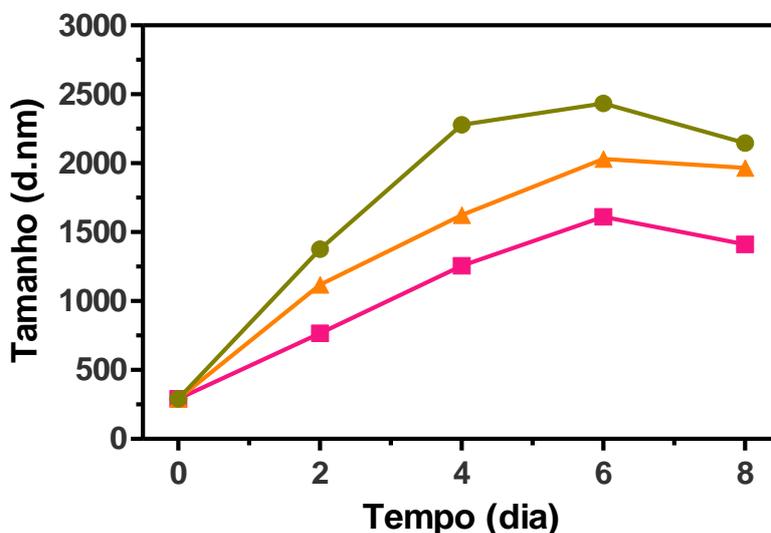


Figura 47: Variação do tamanho das NPs contendo CHB (NP.CHB.I, 10 mg) suspensas em PBS durante oito dias nas temperaturas: -2,0° C (— rosa); 25,0° C (— laranja) e 37,0° C (— verde).

Os valores de PDI obtidos para o ensaio de estabilidade da amostra NP.CHB.I apresentaram um salto do primeiro para o segundo dia (de 0,209 à 0,670 em -2,0° C / 0,810 em 25,0° C / 0,863 em 37,0° C) e posteriormente um crescimento moderado até o oitavo dia (0,954 em -2,0° C / 1,000 em 25,0° C / 1,000 em 37,0° C) (figura 48).

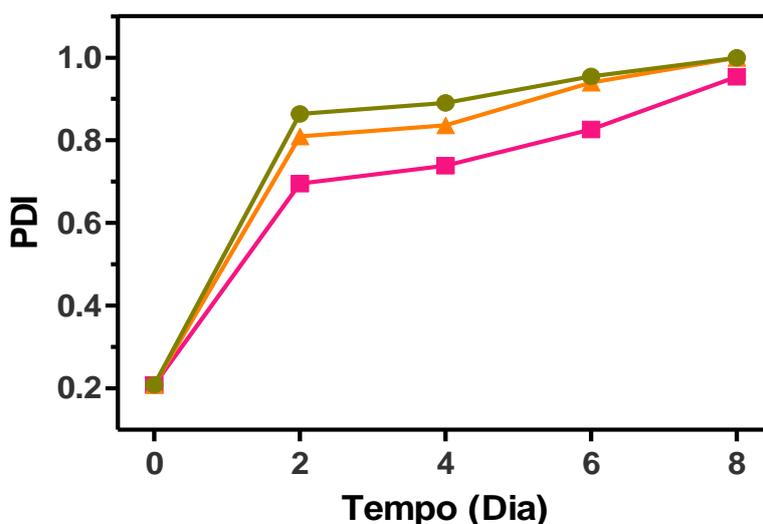


Figura 48: Variação do índice de polidispersão das NPs contendo CHB (NP.CHB.I, 10 mg) suspensas em PBS durante o período de oito dias nas temperaturas: -2,0° C (— rosa); 25,0° C (— laranja) e 37,0° C (— verde).

4.2.7 Potencial Zeta

Após obter o diâmetro hidrodinâmico das NPs como descrito no item 3.5.5, as amostras foram utilizadas para determinar o potencial zeta de acordo com o procedimento do item 3.5.6. As amostras de NPs vazias apresentaram os menores valores para potencial zeta (-26,0 mV para a amostra NP.0.I e -23,5 mV para a amostra NP.0.II), com pode ser visto na figura 49.

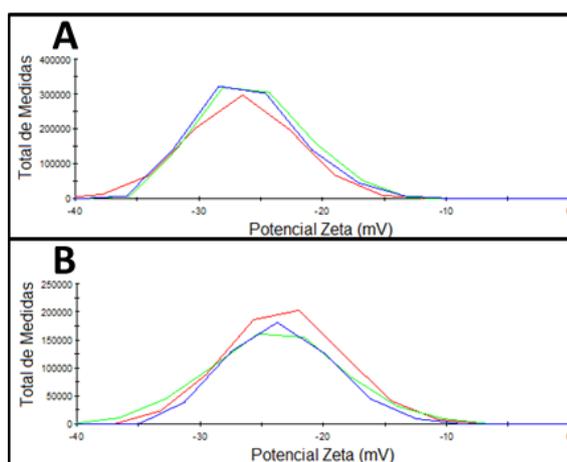


Figura 49: Análises de potencial zeta em triplicatas das NPs suspensas em água: A – NP.0.I e B – NP.0.II.

Já as amostras de NPs contendo o CHB apresentaram comportamento crescente para os valores de potencial zeta na medida em que houve o acréscimo da quantidade de fármaco adicionada à formulação das NPs (10,0; 30,0 e 40,0 mg) em ambos os métodos de produção, como pode ser visualizado nos gráficos das figuras 50, 51 e 52.

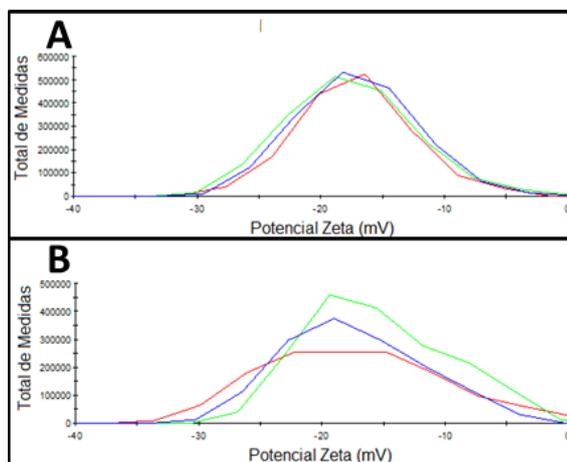


Figura 50: Análises de potencial zeta em triplicatas das NPs suspensas em água: A – NP.CHB.I (10 mg) e B – NP.CHB.II (10 mg).

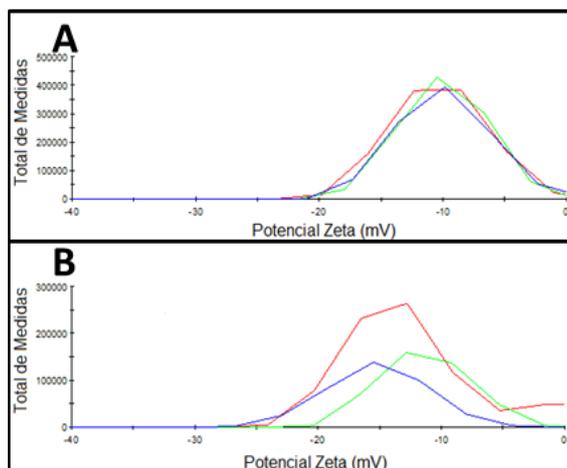


Figura 51: Análises de potencial zeta em triplicatas das NPs suspensas em água: A – NP.CHB.I (30 mg) e B – NP.CHB.II (30 mg).

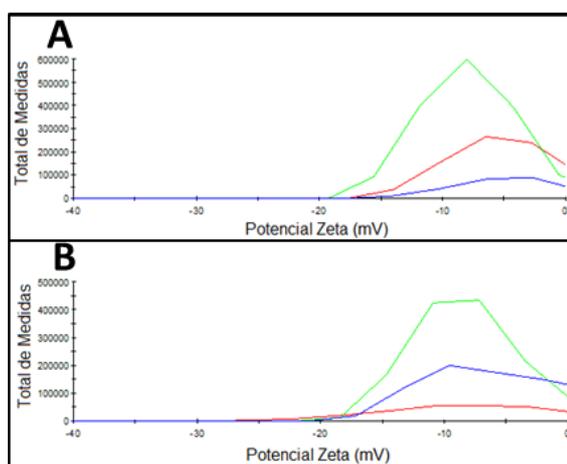


Figura 52: Análises de potencial zeta em triplicatas das NPs suspensas em água: A – NP.CHB.I (40 mg) e B – NP.CHB.II (40 mg).

As NPs preparadas com CHB e/ou fluoresceína (NP.C&F.II / NP.FSC.II) apresentaram valores de potencial zeta negativos, como pode ser visto na figura 53.

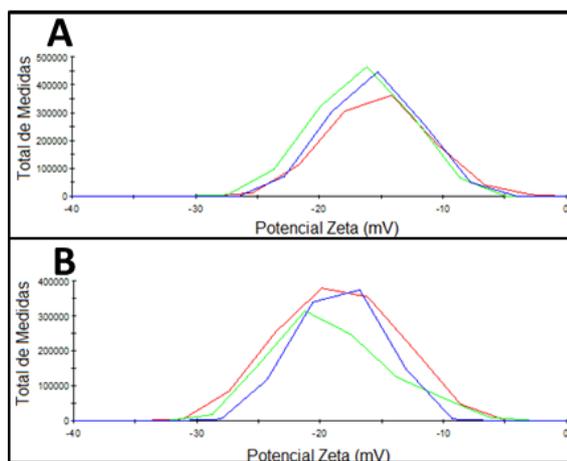


Figura 53: Análises de potencial zeta em triplicatas das NPs suspensas em água: A – NP.C&F.II (10 mg) e B – NP.FSC.II.

As medidas obtidas com as análises de todas essas amostras encontram-se listadas na tabela 12.

Tabela 12: Valores obtidos para média do potencial zeta das NPs

Amostra	Potencial Zeta Médio (mV)
NP.0.I	-26,00±0,45
NP.0.II	-23,50±0,35
NP.CHB.I (10 mg)	-17,30±0,21
NP.CHB.I (30 mg)	-10,10±0,18
NP.CHB.I (40 mg)	-7,05±1,37
NP.CHB.II (10 mg)	-16,70±1,07
NP.CHB.II (30 mg)	-12,30±2,57
NP.CHB.II (40 mg)	-5,99±1,76
NP.C&F.II (30 mg)	-15,80±0,70
NP.FSC.II	-18,70±0,36

ANÁLISE MORFOLÓGICA

Para realização da análise morfológica foram obtidas imagens através de MEV de acordo com o procedimento descrito no item 3.6. Na figura 54 encontram-se as imagens de maior resolução obtidas para o aumento de 10.000 vezes das amostras de NPs vazias (NP.0.I e NP.0.II) e de NPs encapsuladas com CHB (NP.CHB.I e NP.CHB.II).

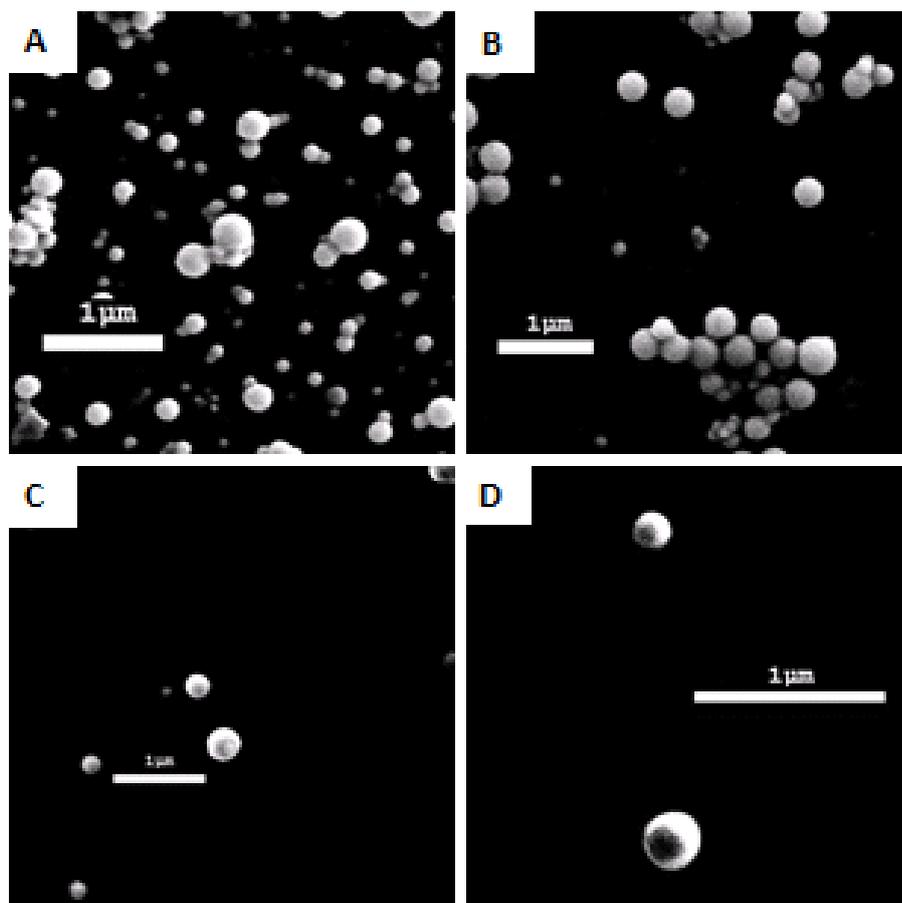


Figura 54: Imagens de MEV obtidas com aumento de 10.000 vezes para as amostras: A – NP.0.I; B – NP.0.II; C – NP.CHB.I (40 mg) e D – NP.CHB.II (40 mg).

A partir de imagens ampliadas em 10.000 vezes foram obtidos espectros de energia dispersiva (EDS) para as amostras NP.0.I e NP.CHB.I (40 mg) (figuras 55 e 56).

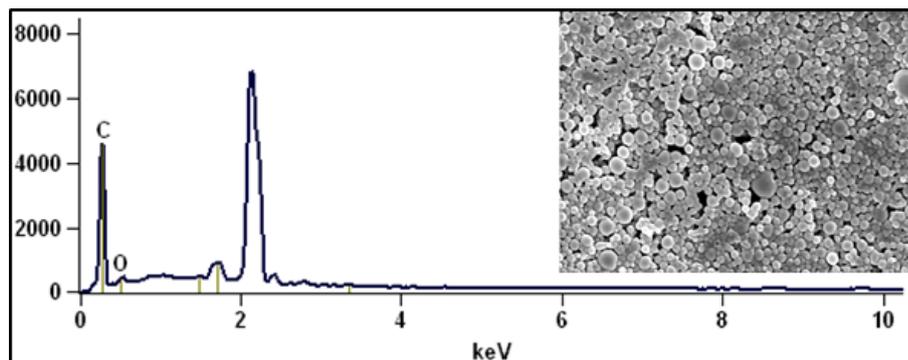


Figura 55: Espectro de EDS das NPs da amostra NP.0.I e imagem de MEV utilizada para sua realização obtida com aumento de 10.000 vezes (canto superior direito).

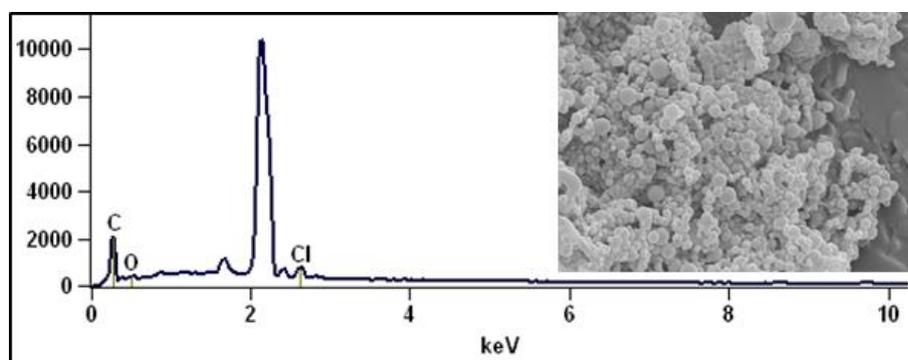


Figura 56: Espectro de EDS das NPs da amostra NP.CHB.I (40 mg) e imagem de MEV utilizada para sua realização obtida com aumento de 10.000 vezes (canto superior direito).

Através da manipulação das imagens obtidas com o programa ImageJ[®] pode-se determinar uma média e seu desvio para o tamanho das NPs. As amostras de NPs vazias (NP.0.I e NP.0.II) apresentaram um diâmetro médio de 288,50 nm e a NPs encapsulados com CHB (NP.CHB.I e NP.CHB.II) apresentaram diâmetro médio de 278,60 nm, como pode ser visto na figura 57.

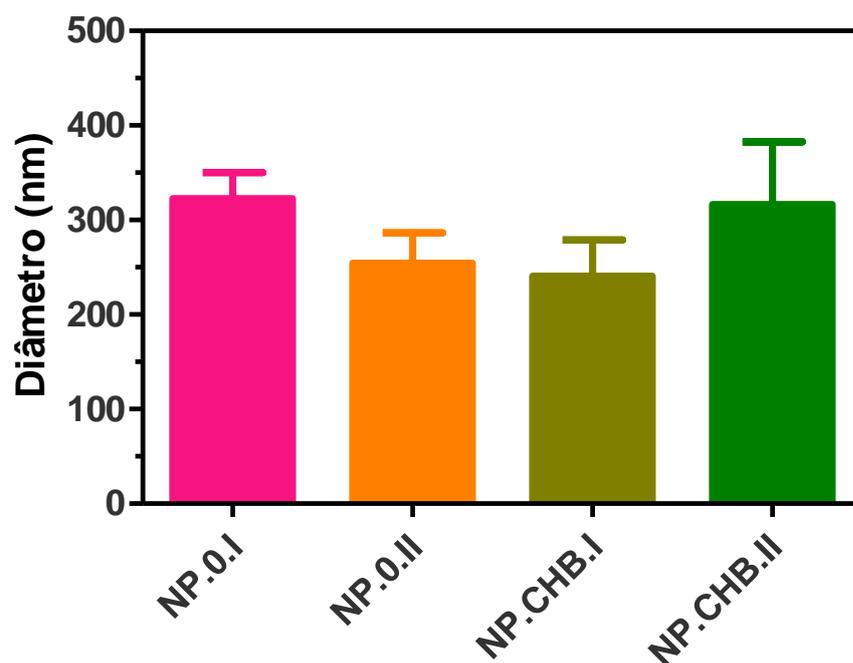


Figura 57: Diâmetro das NPs estimado através da manipulação das imagens obtidas por MEV usando o programa ImageJ®.

Os dados obtidos para tamanho das NPs por MEV e apresentados na figura 57 encontram-se descritos na tabela 13. Para comparação, os valores apresentados anteriormente, obtidos através da técnica de DLS, foram reescritos nessa tabela.

Tabela 13: Valores obtidos para média do tamanho das NPs através de MEV.

Amostra	Tamanho Médio (nm) MEV	Tamanho Médio (nm) DLS
NP.0.I	322,70±86,30	288,90±1,80
NP.0.II	254,20±101,70	238,40±2,40
NP.CHB.I	240,80±120,60	250,30±1,40
NP.CHB.II	316,40±210,10	334,40±9,80

4.3. ENSAIO BIOLÓGICO

Como descrito no item 3.7.6, o ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando-se de uma linhagem de fibroblastos (NIH-3T3) e de uma linhagem tumoral de mama (MCF-7), sendo considerado o controle da placa como 100,00% viável. Os resultados obtidos no ensaio biológico realizado com ambas as linhagens celulares (NIH-3T3 e MCF-7) utilizando variadas concentrações de NPs de PLGA vazias podem ser visualizados na figura 58 e na tabela 14.

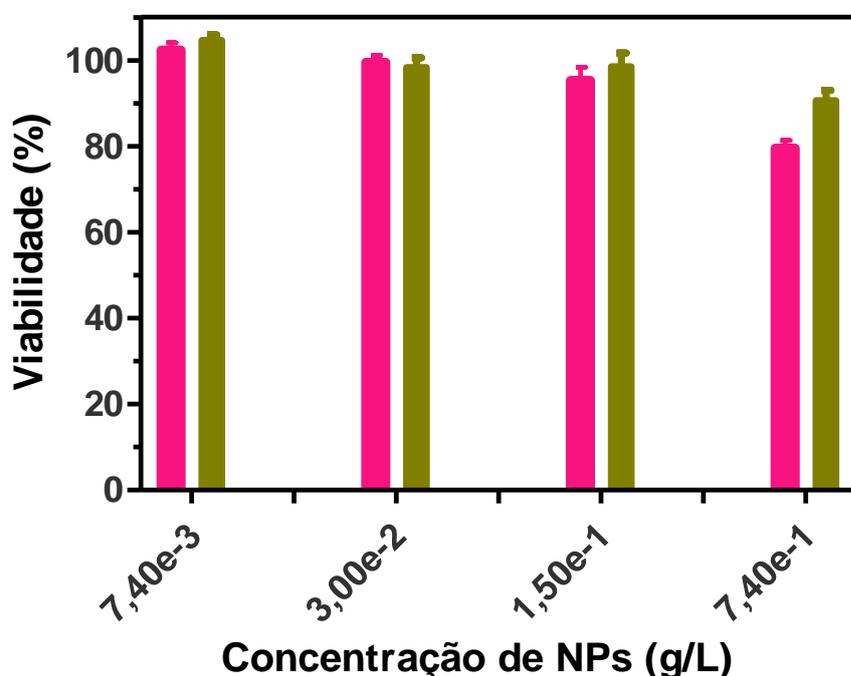


Figura 58: Ensaio de viabilidade empregando-se como tratamento NPs vazias (NP.0.I e NP.0.II) em células das linhagens NIH-3T3 (■ rosa) e MCF-7 (■ verde).

Tabela 14: Viabilidade obtida para as duas linhagens celulares (NIH-3T3 e MCF-7) nas diferentes concentrações de NPs de PLGA vazias (NP.0.I e NP.0.II).

Concentração de NPs (g/L)	% de Viabilidade	
	NIH-3T3	MCF-7
$7,40 \times 10^{-3}$	102,37 ± 1,70	104,61 ± 1,36
$3,00 \times 10^{-2}$	99,47 ± 1,67	98,32 ± 2,27
$1,50 \times 10^{-1}$	95,30 ± 3,13	98,53 ± 3,13
$7,40 \times 10^{-1}$	79,49 ± 1,87	90,63 ± 2,34

Os resultados obtidos no ensaio biológico realizado com as células da linhagem NIH-3T3 utilizando variadas concentrações do fármaco nas formas livre e encapsulada estão dispostos na figura 59 e na tabela 15.

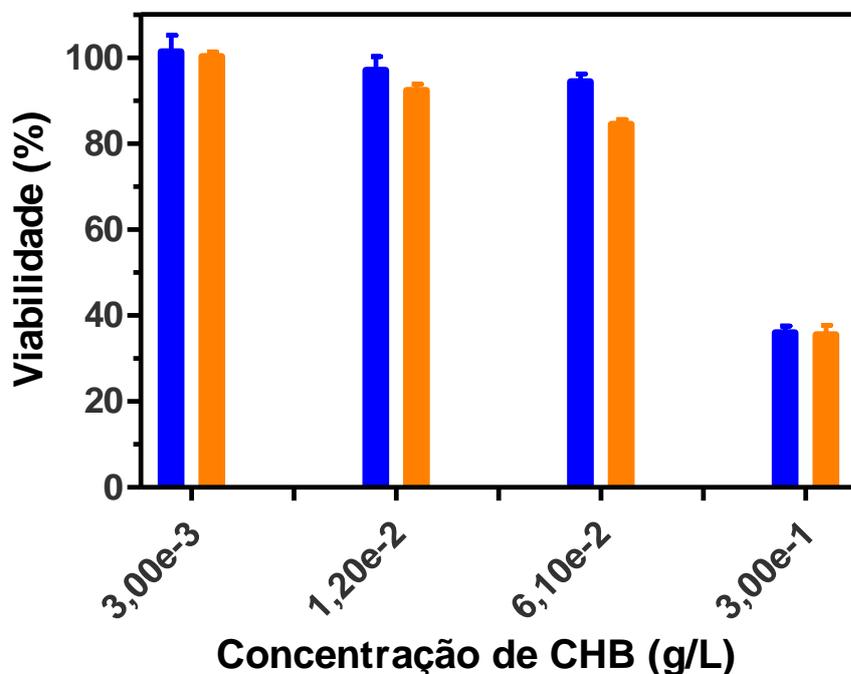


Figura 59: Ensaio de viabilidade empregando-se como tratamento CHB livre (■ azul) e NPs encapsuladas com CHB (■ laranja, NP.CHB.I e NP.CHB.II) em células da linhagem NIH-3T3.

Tabela 15: Viabilidade obtida para a linhagem celular NIH-3T3 nas diferentes concentrações de CHB utilizadas nos tratamentos com CHB na forma livre e CHB na forma encapsulada.

Concentração de CHB (g/L)	% de Viabilidade	
	CHB Livre	CHB Encapsulado
$3,00 \times 10^{-3}$	101,33 ± 3,84	100,21 ± 1,12
$1,20 \times 10^{-2}$	97,00 ± 3,22	92,39 ± 1,45
$6,10 \times 10^{-2}$	94,33 ± 1,86	84,45 ± 1,09
$3,00 \times 10^{-1}$	36,00 ± 1,53	35,48 ± 2,27

Os resultados obtidos no ensaio biológico realizado com as células da linhagem MCF-7 utilizando variadas concentrações do fármaco nas formas livre e encapsulada podem ser visualizados na figura 60 e na tabela 16.

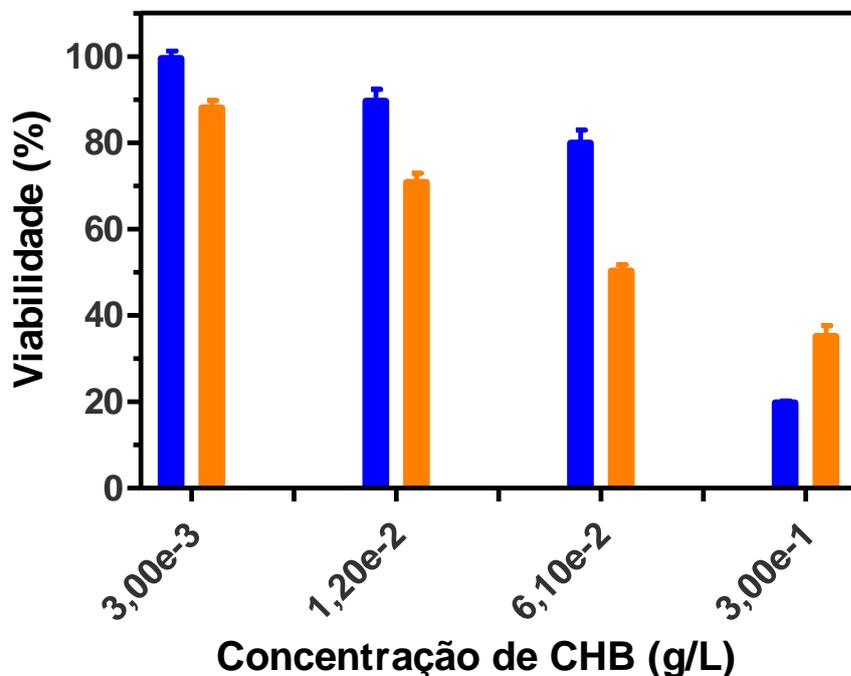


Figura 60: Ensaio de viabilidade empregando-se como tratamento CHB livre (■ azul) e NPs encapsuladas com CHB (■ laranja, NP.CHB.I e NP.CHB.II) em células da linhagem MCF-7.

Tabela 16: Viabilidade obtida para a linhagem celular MCF-7 nas diferentes concentrações de CHB utilizadas nos tratamentos com CHB na forma livre e CHB na forma encapsulada.

Concentração de CHB (g/L)	% de Viabilidade	
	CHB Livre	CHB Encapsulado
$3,00 \times 10^{-3}$	99,53±1,71	88,04±1,77
$1,20 \times 10^{-2}$	89,64±2,70	70,79±2,10
$6,10 \times 10^{-2}$	79,91±3,05	50,25±1,47
$3,00 \times 10^{-1}$	19,71±0,53	35,19±2,47

Na sequência será apresentada a discussão sobre os resultados apresentados neste capítulo.

5 DISCUSSÃO

Parâmetros de produção das NPs

Para a otimização das condições experimentais a serem adotadas durante o preparo das NPs contendo CHB foram avaliados importantes parâmetros como concentração do surfactante, velocidade de emulsificação, relação droga/polímero, número de lavagens, tempo e temperatura de centrifugação. A avaliação de tais parâmetros permitiu a produção de um sistema nanoestruturado de transporte de fármacos com dimensões adequadas para aplicação endovenosa *in vivo* com excelente eficiência de encapsulamento [141].

Concentração de PVA

Foi constatado que a concentração de PVA utilizada no preparo de NPs é um dos principais fatores para controle do tamanho das partículas. Através da produção de NPs de PLGA vazias foi possível constatar que a concentração de surfactante (PVA) no meio aquoso até determinada concentração mostra-se inversamente proporcional ao tamanho das NPs produzidas [142]. Ao utilizar diferentes concentrações de agente emulsificante (entre 0,20 e 5,00%_(m/v)) foi observado que aumentando-se a concentração de PVA até 2,0%_(m/v) conduz a uma redução nas dimensões das NPs produzidas devido a redução das forças atrativas entre elas, o que pode ser atribuído ao aumento em módulo do potencial zeta (figura 8). Porém não foi a solução de PVA em maior concentração que forneceu os menores valores para tamanho e potencial zeta. Foi observado que para as concentrações de PVA acima de 2,0%_(m/v) as NPs produzidas passaram a exibir dimensões maiores, as quais estão associadas à redução do potencial zeta, o que aumenta a tendência de agregação entre as partículas e também devido ao aumento da viscosidade do meio. A partir deste experimento observou-se que a concentração de PVA que forneceu os melhores resultados em termos de diâmetro médio e de potencial zeta foi a solução

de PVA 2,0%_(m/v). Essa solução foi considerada como sendo a mais adequada para produção dos sistemas de liberação a serem estudados.

Extração do PVA

Como discutido no item anterior, o agente surfactante é de suma importância para a produção de NPs com tamanho e estado de agregação adequado [141]. No entanto, sendo este um agente tensoativo, o PVA poderia interagir com a membrana fosfolipídica das células durante o ensaio de viabilidade e sua presença aderida às NPs poderia interferir de forma inadequada nas demais análises realizadas. Desta forma, antes da aplicação *in vitro* ou *in vivo*, se fez necessária a remoção eficiente deste composto após a produção das NPs. Para isso, foi executado o procedimento de lavagens sucessivas das NPs, e após a realização desse experimento controle foi constatado que quatro ciclos de lavagem seriam necessários para remoção de aproximadamente 99,0% do surfactante adicionado inicialmente no processo de produção das NPs.

Velocidade de Emulsificação

Outro fator que está relacionado diretamente às dimensões das partículas produzidas através do método físico-químico de emulsificação seguido pela evaporação do solvente é a velocidade de homogeneização [143]. No experimento controle realizado para determinar a velocidade de homogeneização adequada para produção das NPs variou-se este parâmetro entre 1.000 e 17.000 rpm (figura 11). Observou-se que a velocidade de agitação é inversamente proporcional ao tamanho das partículas, ou seja, quanto maior a velocidade empregada para sua produção menores eram as NPs obtidas. Tal comportamento se explica devido a produção de gotículas menores da fase orgânica que se formam aplicando-se velocidades maiores [85]. Sendo assim, a velocidade que forneceu os menores valores de tamanho, PDI, e potencial zeta (tabela 3) foi de 17.000 rpm. Após análise do tamanho, da polidispersão e do potencial zeta das NPs obtidas, concluiu-se que a velocidade de 17.000 rpm seria a mais adequada para a produção de NPs.

Rendimento do processo

O rendimento do processo de produção das NPs (tabela 4) foi otimizado aumentando-se a velocidade de centrifugação de 12.000 até 15.000 rpm e reduzindo-se a temperatura de 4,0 para 0,0° C. Estas condições favorecem a precipitação das nanoestruturas aumentando a eficiência do processo através de seu rendimento. As amostras NP.CHB.I (10); NP.CHB.II (10) e NP.FSC.II foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 10 minutos e 4,0° C e apresentaram um rendimento médio de $28,10 \pm 4,42\%$. Já as amostras NP.CHB.I (30) e NP.CHB.II (30) foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 10 minutos e 4,0° C, apresentando ao final um rendimento médio de $50,00 \pm 0,28\%$. O maior valor de rendimento foi obtido para as amostras NP.0.I, NP.0.II, NP.CHB.I (40), NP.CHB.II (40) e NP.C&F.II (30) (média de $59,30 \pm 1,40\%$) que foram centrifugadas a 15.000 rpm, por 20 minutos e 0° C [61;144].

Assim, ao final da primeira etapa deste trabalho foi determinado que os parâmetros mais adequados a serem adotados para o preparo das NPs são: $2,0\%_{(m/v)}$ para concentração de agente surfactante (PVA), quatro lavagens para extração do PVA residual, velocidade de homogeneização de 17.000 rpm, centrifugação a 15.000 rpm, por 20 minutos e 0° C.

Caracterização das NPs

Após serem determinadas as condições ótimas de trabalho, procedeu-se com a produção e caracterização dos sistemas em estudo.

Eficiência de Encapsulamento

A estimativa da %EE foi realizada através do método direto, no qual a concentração total do fármaco foi determinada após total dissolução de certa quantidade de NPs em diclorometano e pode ser facilmente calculada pela diferença entre a quantidade de fármaco adicionada inicialmente no processo pela quantidade de fármaco associado [5;98;143;145;146]. Sabe-se que diversos parâmetros influenciam a eficiência de encapsulamento do fármaco, dentre os quais:

características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, solubilidade do polímero na fase orgânica, solubilidade da fase orgânica em água, concentração do polímero e interação do fármaco com o polímero, as características da superfície das partículas, a quantidade de fármaco adicionada à formulação, a ordem de adição do fármaco no preparo das NPs e o tipo de surfactante utilizado.

As NPs contendo CHB foram obtidas através dos métodos de simples e dupla emulsificação, e foram preparadas com três diferentes concentrações do fármaco (aproximadamente 10; 30 e 40 mg). Desta forma, através da determinação da %EE pode-se avaliar a produção de NPs de mesma composição obtidas por diferentes métodos e como esses sistemas reagiram à adição de diferentes quantidades de fármaco ao processo [17]. A %EE das NPs foi calculada de acordo com a equação 2, e os valores obtidos variaram entre 48,80 e 94,70% (tabela 5). Esta grande variação na %EE está associada a relação droga/polímero, ou seja, quando se utiliza CHB em concentrações superiores a 10 mg/mL observa-se que não existe polímero suficiente na preparação para o encapsulamento do fármaco, com isto a %EE cai nas concentrações de 30 e 40 mg/mL. Não houve diferença significativa entre os valores obtidos para %EE de NPs obtidas por diferentes métodos com a mesma quantidade de fármaco.

NPs de PLGA com fluoresceína resultaram em valores para %EE inferiores a 12,0% (tabela 6). A redução da %EE pode ser atribuída à natureza hidrofílica desta sonda fluorescente. Como é bem estabelecido na literatura, compostos hidrofílicos tendem a migrar para a fase aquosa durante o processo de produção de NPs, com isto reduzindo a eficiência de encapsulamento. Por outro lado, substâncias hidrofóbicas como o CHB tendem a migrar para a fase orgânica onde se encontra o copolímero, com isto, este tipo de composto apresenta frequentemente elevada %EE [5;17;98;143].

Espectroscopia de Absorção nas regiões UV-vis e FTIR

Os espectros de absorção na região UV-vis para o CHB e fluoresceína tanto na forma livre quanto encapsulada e de NPs de PLGA vazias são apresentados nas figuras 14-18. Tais espectros nos fornecem o indicativo de que os compostos em estudo foram eficientemente encapsulados nas NPs produzidas. Apresentando picos

característicos com máximos em 204,0; 258,0 e 303,0 nm, no caso do CHB e 238,5; 289,0; 323,0; e 491,0 nm para fluoresceína, concordantes com aqueles apresentados na literatura [5;98;147;148].

Outra análise realizada para confirmação do encapsulamento do fármaco CHB nas nanopartículas de PLGA foi a obtenção dos espectros de absorção molecular na região do infravermelho por transformada de Fourier das amostras de CHB livre, NPs de PLGA vazias e CHB encapsulado (figuras 26-28). Os principais picos identificados foram listados na tabela 8. Após sua análise, pode-se afirmar que houve encapsulamento eficiente do fármaco CHB nas NPs produzidas [139;149-151].

Espectroscopia de Fluorescência

Os experimentos de espectroscopia de fluorescência estática foram realizados para avaliar se a quantidade de sonda fluorescente encapsulada nas NPs era suficiente para produzir um sinal de emissão de fluorescência apreciável. Isso porque, pretende-se em experimentos futuros realizar novos ensaios através de microscopia confocal e de fluorescência *in vivo* para avaliar o tráfego e a localização destas NPs em meio biológico. Os resultados apresentados nas figuras 22–25 e na tabela 7 mostram que as nanopartículas produzidas apresentam potencial aplicabilidade tanto para o transporte de fármacos antitumorais quanto como sonda fluorescente para avaliação do tráfego celular [84;152].

Nesta análise foi observado um deslocamento de Stokes de 18 nm comparando-se a fluoresceína na forma livre com relação à forma encapsulada. Este fenômeno provavelmente ocorre devido haver considerável interação do fluoróforo com a matriz polimérica. Comportamento similar foi observado para o CHB, porém com menor intensidade.

TGA/DTA Simultâneos e DSC

As análises térmicas foram realizadas em equipamentos capazes de controlar a variação da temperatura a qual as amostras foram submetidas e monitorar

instantaneamente as transformações que nelas ocorriam (figuras 29-34 e tabelas 9 e 10) [139;145;146;151;153].

Em uma termobalança foram obtidas análises de TGA estabelecendo-se as faixas de temperatura em que as amostras se desidrataram, passaram para fase gasosa ou se decompuseram. Através das análises termogravimétricas pode-se constatar que o composto antitumoral CHB estava apenas encapsulado às NPs produzidas. Desta forma pode-se afirmar que não houve reação do fármaco com a matriz polimérica ou com os demais reagentes utilizados durante o processo de obtenção das NPs, sendo assim o encapsulamento ocorreu sem alteração da estrutura do fármaco.

Através das técnicas de DSC e DTA foi possível analisar o fluxo de energia associado às alterações físicas e químicas capazes de causar variações de calor das amostras, tais como transições de fase (fusão e ebulição) ou reações de desidratação, de inflamação (oxidação) e de decomposição. As transições de fase observadas no experimento de DTA relatados no tópico 4.2.3.1 (fusão, decomposição, oxidação, ebulição) apresentaram efeitos endotérmicos e se mostraram coerentes com os resultados encontrados simultaneamente por TGA.

Ambas as técnicas (DTA e DSC) permitiram avaliar as transições que envolviam variações de entropia (transições de segunda ordem) representadas pela transição vítrea do polímero. Ambas as análises mostraram que a presença de fármaco encapsulado a matriz polimérica resultou no aumento da desordem do retículo cristalino da matriz polimérica, isso porque, o valor médio encontrado para a T_g das NPs vazias correspondeu a $45,16 \pm 1,01^\circ \text{C}$ enquanto que a T_g das NPs contendo CHB encapsulado apresentaram média inferior ($40,81 \pm 1,42^\circ \text{C}$). Foi observada diferença significativa entre os valores encontrados para temperatura de fusão do fármaco entre os diferentes métodos ($T_{\text{Fusão,CHB,DTA}} = 66,58 \pm 1,64^\circ \text{C}$ e $T_{\text{Fusão,CHB,DSC}} = 62,64 \pm 1,35^\circ \text{C}$) porém não foi observada variação desta temperatura entre os resultados encontrados para o fármaco encapsulado e o fármaco na forma livre.

Perfil de Liberação

A determinação do perfil de liberação do CHB através de método espectrofotométrico na região UV-vis é simples, porém trabalhosa, pois fármacos hidrofóbicos quando liberados em meio aquoso não apresentam sinal apreciável [44]. Assim, em intervalos de tempo pré-determinados, amostras foram recolhidas, separadas, desidratadas e reconstituídas em fase orgânica apropriada (no caso deste fármaco, solução água/álcool 1:1) para que a leitura fosse realizada da forma adequada. Durante o período de sete dias foram realizadas medidas em triplicata do perfil de liberação para o fármaco CHB e a sonda fluorescente (fluoresceína), produzidos pelos métodos de simples e de dupla emulsificação.

Nos casos estudados contendo CHB as matrizes poliméricas apresentaram comportamento semelhante, com uma liberação acentuada do fármaco durante as primeiras vinte e quatro horas ($79,1 \pm 4,5\%$ de liberação), seguido pela liberação de forma sustentada até às 120 horas ($87,0 \pm 1,2\%$ de liberação) e aparentemente um novo salto após as 168 horas ($100,6 \pm 0,9\%$ de liberação) como apresentado nas figuras 35-38. Este comportamento demonstra que os três sistemas poliméricos que continham CHB apresentaram aspecto bifásico para LCD [17;154]. Para se compreender como se dá esse comportamento deve-se lembrar do que foi mencionado no tópico 1.3 da introdução deste trabalho, que diz: a LCD a partir de NPs poliméricas biodegradáveis depende de fatores como a dessorção do composto da superfície das partículas, a difusão do composto através da matriz polimérica a erosão da matriz polimérica e a combinação dos processos de difusão e erosão [155].

Na primeira fase ocorreu uma rápida liberação das moléculas de CHB que se encontravam principalmente associadas à superfície das NPs. Em seguida, em uma segunda etapa, o perfil de liberação apresentou uma forma sustentada, muito lenta, com uma cinética global de primeira ordem. Nesta etapa estão acessíveis apenas as moléculas que se encontram na superfície ou nos poros próximos à superfície da NP. Em seguida, essa liberação passa a ser de forma lenta, dependente das características do sistema, que pode hidrolisar de forma lenta em pH fisiológico. Resumidamente, a primeira fase correspondeu a dessorção da fração de ativo adsorvida à superfície das NPs, e a segunda fase à difusão do ativo através da

matriz polimérica e à erosão desta. Este comportamento ainda pode ser compreendido após análise da figura 61, que mostra um corte transversal de uma micro/nanoesfera polimérica (A) e um desenho onde podem ser observados os poros internos com diferentes localidades onde o fármaco pode ser encontrado (inclusive a superfície).

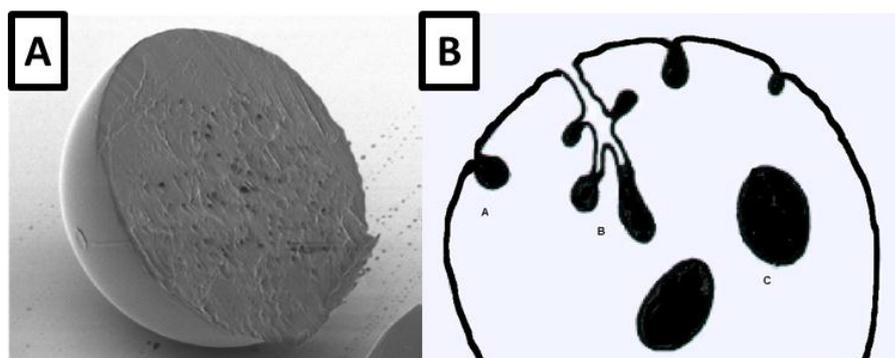


Figura 61: (A) Corte transversal em micro/nanoesfera de PLGA e (B) esquema de uma partícula com os sítios de localização do fármaco.

Importante ressaltar que as partículas produzidas possuíam tamanho na faixa de 300 nm o que também favorece uma rápida LCD devido a grande área superficial que se tem. Apresentando as NPs de PLGA produzidas a capacidade de liberar de forma lenta o fármaco após uma semana de experimentos *in vitro*, (espera-se que *in vivo* também) pode-se classifica-las como possíveis DDS. Pretende-se posteriormente realizar a funcionalização da superfície dessas NPs para que elas se apresentem seletivas quanto ao seu alvo de ação. Em experimentos futuros pretende-se demonstrar que estes sistemas podem alcançar um alvo específico, com menor frequência de administração e maior biodisponível do fármaco, reduzindo a incidência de efeitos colaterais ocasionados na administração do fármaco na forma livre [151].

Diâmetro Hidrodinâmico e Distribuição de Tamanho

Nesse estudo foram avaliados o diâmetro médio e a distribuição de tamanho das diferentes formulações de NPs contendo o fármaco antitumoral CHB. A análise do tamanho e da polidispersividade das partículas pode ser realizada por diferentes metodologias como: espectroscopia de correlação de fótons, microscopia de luz,

difração de laser, DLS, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Microscopia de Força Atômica (AFM, *Atomic Force Microscopy*), MEV, entre outros [17].

O método de análise da distribuição de tamanho das partículas realizada neste trabalho teve inicialmente como base um equipamento de DLS. O princípio desta técnica baseia-se na utilização do movimento randômico (browniano) e da velocidade das partículas em uma suspensão coloidal. O movimento das partículas causa uma variação na intensidade de luz dispersa quando um feixe de luz incide sobre a suspensão. Esta variação tem relação direta com o tamanho das partículas, pois quanto maior elas forem mais lento será o seu movimento, e conseqüentemente, menor será a flutuação da luz dispersa. Sendo assim, a informação detectada pelo equipamento é convertida em tamanho utilizando a relação de Stokes-Einstein. Essa é uma técnica que analisa as MPs/NPs em uma suspensão que pode se assimilar ao meio no qual os sistemas permanecerão após serem administradas em meio biológico. Procedimentos adotados para preparo de amostras que serão analisadas por MEV, MET ou AFM podem alterar ou até mesmo destruir as MPs/NPs. Ao final, obtém-se uma média do diâmetro de esferas que se difundem a uma velocidade igual ao das partículas submetidas à medição e um índice de polidispersão (PDI) que varia entre 0,0 e 1,0 e que indica sua distribuição de tamanho.

As amostras de NPs vazias e encapsuladas com CHB, com a adição de 10,0 mg do fármaco, apresentaram diâmetros entre 238,0 e 334,0 nm e PDI entre 0,120 e 0,260 como observado na figura 41. Esses resultados demonstram que a totalidade da população de partículas obtidas apresenta-se com dimensões inferiores a 500,0 nm de diâmetro, o que torna irrestrita a sua aplicabilidade. De acordo com estudos realizados por Chen e colaboradores [37], ao se trabalhar com micropartículas pode-se encontrar dois problemas fundamentais no que diz respeito ao tamanho. MPs de tamanho elevado, maiores do que 5 μm são de difícil injeção *in vivo* na forma endovenosa, podendo ser administradas na forma oral e intramuscular. Partículas menores apresentam uma baixa capacidade de encapsulamento e dificuldades para liberação do fármaco. Não obstante, um tamanho diminuto é de vital importância, quando se pretende administrar a micropartícula *in vivo*, uma vez que partículas com tamanho acima de 6 μm acabariam por obstruir os capilares, causando no local uma necrose [37].

Durante o preparo das NPs, a presença do fármaco no meio reacional pode ou não interferir no tamanho das NPs obtidas através do método de polimerização *in situ*. O fármaco pode interferir no processo de nucleação, conduzindo a partículas maiores com ampla distribuição de tamanho. As NPs de CHB preparadas com as concentrações maiores de fármaco (30,0 e 40,0 mg) apresentaram estruturas com dimensões entre 1080,0 e 1428,0 nm, e PDI entre 0,759 e 0,944, como pode ser visto nas figuras 42 e 43. Esse salto elevado no valor do tamanho das partículas preparadas com as maiores quantidades de fármaco vai de encontro com o que havia sido observado nas análises de eficiência de encapsulamento para essas amostras. A adição de mais fármaco a formulação fez com que não houvesse total incorporação pelas NPs do CHB. Consequentemente, o fármaco hidrofóbico em excesso precipitou como cristais em meio às NPs durante o processo de lavagem. Análises obtidas por MEV também complementam essa hipótese. Apesar da emissão de fluorescência ser um efeito que influencia de forma negativa na qualidade das análises de DLS, as amostras de NPs contendo fluoresceína também foram analisadas e apresentaram diâmetros entre 630,70 e 854,90 nm, e valores para PDI entre 0,446 e 0,595 (figura 44). Essas análises de DLS demonstraram que a presença de fluoresceína no meio reacional pode sim ter resultado em alteração das condições de formação das NPs.

Estabilidade Física das NPs em Suspensão

O desenvolvimento de sistemas biodegradáveis requer o controle de algumas variáveis, pois a cinética de degradação do copolímero *in vivo* deve permanecer constante para que ocorra uma liberação controlada da substância [151]. Fatores difíceis de serem controlados como pH e temperatura podem promover um aumento ou uma redução na velocidade de degradação do sistema e devem ser levados em consideração [38]. A estabilidade dos sistemas obtidos foi avaliada mediante a determinação da variação da média de tamanho e do índice de polidispersão das NPs mantidas em suspensão e acondicionadas em três diferentes temperaturas (-2,0; 25,0 e 37,0° C) durante 192,0 horas [61;143].

Pode-se constatar com o ensaio de estabilidade física das NPs produzidas com e sem CHB suspensas em meio tamponado por oito dias, que a temperatura

em que o meio foi mantido teve relação direta com a estabilidade das NPs. Quanto maior a temperatura em que o meio foi mantido mais rapidamente ele apresentou aumento de tamanho e perda de estabilidade. No caso, mantendo as NPs suspensas a 37,0° C (temperatura fisiológica) fez com que elas mais rapidamente variassem e aumentassem de tamanho em relação às mesmas NPs mantidas a 25,0° C, e ainda mais evidente, para as mantidas a -2,0° C.

Outra observação que pode ser constatada é de que ambos os sistemas analisados, independente da temperatura na qual tenha sido mantido, apresentaram inicialmente um crescimento acentuado seguido por uma redução moderada do tamanho das NPs. Este fato se justifica devido provavelmente terem sido formados aglomerados de NPs em suspensão (tamanho crescente) e em seguida ocorrido a fragmentação da matriz polimérica devida hidrólise.

A concentração das suspensões preparadas correspondeu à 10,0 mg de NPs por mL de suspensão, o que corresponde a um valor muito superior ao que foi testado em meio biológico (igual ou abaixo de $7,40 \times 10^{-1}$ g/L). Acredita-se que este efeito possa ser atenuado realizando esse ensaio com as suspensões sendo preparadas com concentrações menores de NPs. Durante a realização dos ensaios (principalmente, no ensaio biológico) observou-se claramente a ocorrência da sedimentação rápida das NPs. Como relatado, isso ocorre devido provavelmente com o tempo as NPs apresentarem a tendência natural à se agregarem resultando assim na mudança significativa do tamanho das partículas. Pretende-se em experimento futuros otimizar a estabilidade física e de armazenamento dessas NPs e monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas otimizadas através da análise da alteração do seu potencial zeta e do pH do meio em que elas são mantidas suspensas com o tempo e as condições de armazenamento

Potencial Zeta

Quase todos os materiais microscópicos ou particulados em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície. Entre a superfície das NPs e o líquido disperso forma-se uma diferença de potencial que varia de acordo com a distância. O potencial formado entre o plano deslizante e a superfície das NPs é chamado o potencial zeta (figura 62).

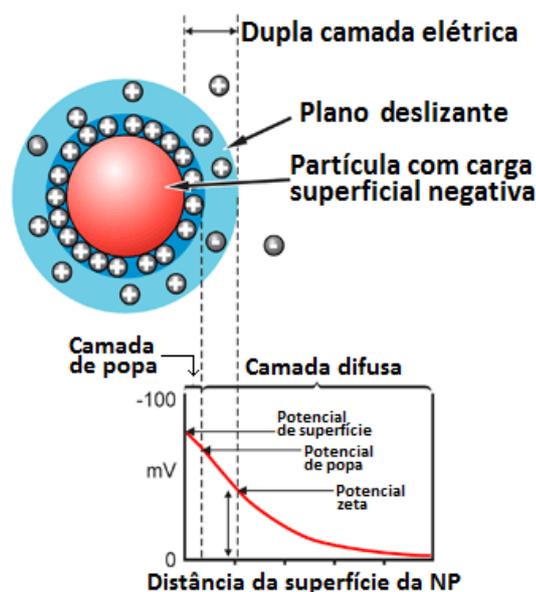


Figura 62: Representação esquemática do potencial zeta [156].

O potencial zeta é mensurado através da medida do quão rápido uma partícula se move em um líquido quando um campo elétrico é aplicado à suspensão. Identificando-se a velocidade das NPs, o campo elétrico aplicado e conhecendo-se a viscosidade e a constante dielétrica da amostra pode-se determinar o seu valor de potencial zeta.

Essa carga superficial esta relacionada diretamente às mudanças na interface com o meio dispersante em razão da dissociação de grupos funcionais da superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão [151]. O potencial zeta é um indicador útil dessa carga e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. Valores de potencial zeta elevados em módulo são considerados importantes para que haja uma boa estabilidade físico-química das suspensões coloidais, devido surgirem forças repulsivas que evitam a ocorrência de agregações entre NPs adjacentes. O potencial zeta da amostra irá determinar se as NPs em suspensão tendem ou não a se agregarem e foi utilizado para avaliar se a emulsão permanecerá ou não estável no ambiente em que vai ser usado (no caso, meio biológico) [139;141;157].

Nos experimento realizados para determinação da carga superficial a medida do potencial zeta é a chave para compreender os processos de dispersão e agregação das NPs em solução. Foram observados para todas as amostras valores negativos para o potencial zeta, variando entre -26,5 e -5,99 mV. Isso se justifica

devido a matriz polimérica utilizada no preparo das NPs deste trabalho ter sido o poliéster PLGA, que é o principal constituinte capaz de afetar o valor de potencial zeta, sendo que, frequentemente apresenta valores negativos para este potencial.

As NPs vazias apresentaram valores inferiores a -23,0 mV como apresentado na figura 49. Já as amostras de NPs contendo o CHB obtidas através de ambos os métodos em concentrações crescentes (10, 30 e 40 mg) tiveram os valores de potencial zeta reduzidos (-17,3; -10,1 e -7,1 mV para NP.CHB.I e -16,7; -12,3 e -6,0 mV para NP.CHB.II, respectivamente) como pode ser visualizado nos gráficos das figuras 50, 51 e 52 e na tabela 11. Este comportamento pode ser atribuído à saturação da superfície da nanopartículas com os cristais do fármaco, que por sua vez reduziram a carga superficial das partículas e diminuíram a mobilidade dos mesmos em suspensão. Tais resultados indicam fraca tendência à agregação das partículas em solução, o que foi observado através de MEV (figura 54).

Análise morfológica

Após obtenção das NPs, deseja-se que essas apresentem um formato homogêneo e uma distribuição uniforme com baixos índices de polidispersão. A avaliação morfológica das NPs geralmente é realizada através de MEV, MET ou AFM que são técnicas que fornecem importantes informações tridimensionais relativas à forma e ao tamanho das NPs. A caracterização topográfica das NPs obtidas nesse trabalho foi realizada através de MEV. Os estudos foram efetuados em um equipamento da marca Jeol[®], modelo 840 A, consistindo em um sistema, no qual um feixe de elétrons é emitido por uma fonte, sendo colimado por lentes eletromagnéticas para um ponto ou uma região da amostra. A interação entre o feixe e a amostra provoca a emissão de elétrons retro-espalhados e secundários que são coletados por um conjunto de detectores e amplificados para formar a imagem.

Essa técnica permitiu a visualização da morfologia externa das NPs e de sua distribuição de tamanho (figura 54) [135]. Após análise das imagens obtidas pode-se afirmar que as partículas produzidas possuíam aspecto esférico e de diâmetro inferior a 500 nm. Com a magnificação usada observou-se que não havia poros sobre a superfície das NPs. Observou-se através da manipulação das imagens obtidas com o programa ImageJ[®] que o tamanho médio das NPs (figura 57) era

concordante com aqueles obtidos por DLS, com uma diferença entre os valores que variaram entre 3,9 e 10,4% (Tabela 13). Sendo assim não foi verificada diferença significativa entre medidas realizadas por diferentes métodos (DLS e MEV). Imaginava-se que este fenômeno iria ocorrer, pois, enquanto a técnica de microscopia fornece imagens das partículas isoladas, a medida espectroscópica obtida por DLS determina o diâmetro hidrodinâmico das partículas em suspensão.

Outra correlação que pode ser feita com as imagens obtidas por MEV diz respeito ao potencial zeta. Foi mencionado anteriormente que as NPs produzidas apresentaram uma baixa tendência à agregação (figuras 49 à 53), e este fato pode ser confirmado com as imagens de MEV.

O perfil de liberação do fármaco, também apresentado anteriormente nas figuras 35-38 nos mostrou uma rápida liberação do fármaco nas primeiras horas, seguida de uma liberação controlada pelo período de uma semana. Este resultado está de acordo com o que foi observado no MEV, ou seja, a baixa porosidade das partículas demonstra que a liberação inicial correspondeu apenas a migração das moléculas de CHB que se encontravam na superfície, e não em poros superficiais. O tamanho reduzido das NPs também faz com que haja uma grande área superficial para liberação. Partículas com baixa porosidade fazem com que em um primeiro instante ocorra liberação do composto que está associado a superfície da partícula, para que em seguida ocorra a liberação do fármaco que se encontra na matriz polimérica através de processos de difusão e erosão justificando-se assim o comportamento bifásico apresentado pelos sistemas [17;57;59;151;158].

No mesmo equipamento foram obtidos espectros do tipo EDS para as amostras. Foram identificados os picos do ouro (2,18 keV), do carbono (0,27 keV) e do oxigênio (0,51 keV) em todas as amostras. As amostras de NPs produzidas com CHB apresentaram além desses, um pequeno pico correspondente aos átomos de cloro (2,62 keV) (figuras 55 e 56), sendo assim novamente confirmada a presença do fármaco adsorvido nas NPs das amostras.

Ensaio biológico

De uma maneira geral, o cultivo celular pode ser definido como um conjunto de técnicas que permitem a manutenção de células *in vitro*, conservando ao máximo suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e genéticas. Tanto as células normais

quanto às células cancerígenas podem ser cultivadas *in vitro* em laboratório. Entretanto, elas possuem comportamentos diferentes. As células normais passam por um número limitado de divisões celulares (cerca de 50) antes de sua destruição natural. Isto ocorre provavelmente devido à sua inabilidade de sintetizar telomerase em quantidade apreciável. As células de câncer, por sua vez, podem se proliferar indefinidamente em cultura, uma vez que essas produzem telomerase. A enzima telomerase tem a função de repetir a sequência 5' final de uma fita de DNA. As células normais, quando colocadas em uma placa de meio de cultura, proliferam até quando a superfície do recipiente estiver coberta por uma única camada de células, tocando umas nas outras. Assim ocorre a interrupção do processo mitótico. Esse processo é conhecido por inibição por contato. As células de câncer, por outro lado, não apresentam inibição por contato. Uma vez que a superfície é coberta, a célula continua a se dividir com a formação de uma nova camada sobre a primeira [1-3;5;10;14].

As linhagens celulares estudadas nesse trabalho foram a de fibroblastos (NIH-3T3) e uma linhagem tumoral de mama (MCF-7), sendo considerado o controle da placa como 100,00% viável. A determinação dos efeitos citotóxicos *in vitro* do CHB em solução e encapsulada foi realizada através do ensaio de MTT. Este ensaio é apropriado para se determinar espectrofotometricamente o número de células vivas com atividade mitocondrial. O método do MTT é simples e confiável e produz resultados reprodutíveis. O componente chave é o brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium, que dissolvido em meio ou soluções salinas balanceadas sem vermelho de fenol, apresenta coloração amarelada. A desidrogenase mitocondrial das células viáveis quebra o anel tetrazolium, produzindo cristais de purpura de formazano, os quais são insolúveis em solução aquosa. Os cristais são dissolvidos em DMSO, resultando em uma solução púrpura que é espectrofotometricamente medida. Um aumento ou diminuição no número de células resulta em uma mudança concomitante na quantidade do formazano formado, indicando o grau de citotoxicidade causado pelo teste do material [7;60;104].

Inúmeros trabalhos descrevem a influência de condições físicas das NPs como tamanho, morfologia, superfície, tempo de incubação para que a maioria delas sejam completamente internalizadas pelas células. Relatos sugerem que para cada

linhagem celular o tempo de incubação é um importante parâmetro para ser investigado visando obter melhores resultados durante o tratamento.

Foi estabelecido como sendo o tempo ideal para tratamento das células com as amostras em estudo o período de 72 horas, pois neste período as NPs já haveriam liberado acima de 80% da quantidade de fármaco que havia encapsulado. Este tempo também correspondeu ao período máximo que as células poderiam ser mantidas com o mesmo meio de tratamento [157].

Em experimentos controle realizados para se avaliar a toxicidade do sistema de liberação sem a presença do fármaco (NPs de PLGA vazias) nas duas linhagens celulares estudadas, observou-se que a adição das NPs mantinha a viabilidade próxima a $99,8 \pm 3,2\%$ para as menores concentrações ($7,40 \times 10^{-3}$; $3,00 \times 10^{-2}$ e $1,50 \times 10^{-1}$ g/L). No entanto a adição de grandes quantidades de material nanoestruturado ($7,40 \times 10^{-1}$ g/L) ocasionou 20,50% de morte celular para NIH-3T3 e 9,40% para células da linhagem MCF-7, como pode ser visualizado na figura 58 e na tabela 13. Este resultado não é atribuído à toxicidade do polímero (PLGA), o qual é bem descrito na literatura como sendo atóxico e biocompatível, sendo decomposto no ciclo de Krebs em dióxido de carbono e água, mas sim a grande quantidade de partículas precipitadas impedindo a troca de nutrientes entre as células e o meio [89].

Houve redução da viabilidade de 92,50 para 35,50% nas células da linhagem NIH-3T3 tratadas com as NPs encapsuladas com CHB entre as três maiores concentrações de fármaco ($1,20 \times 10^{-2}$; $6,10 \times 10^{-2}$ e $3,00 \times 10^{-1}$ g/L). Não ocorreu morte celular para o tratamento com as NPs contendo o fármaco para a concentração de CHB igual a $3,00 \times 10^{-3}$ g/L (viabilidade de 100,21%). As células tratadas com CHB na forma livre apresentaram comportamento similar ao observado nos tratamentos realizados com as NPs carregadas com o fármaco, porém de forma menos acentuada (viabilidade de $99,20 \pm 3,00\%$ para as duas menores concentrações e uma redução entre as duas maiores concentrações de 94,30 para 36,00% de viabilidade). Estes resultados estão dispostos na figura 59 e na tabela 14.

Para o tratamento realizado nas células da linhagem MCF-7 a redução de viabilidade foi observada a partir da menor concentração de fármaco encapsulado às NPs (88,00% de células viáveis para $3,00 \times 10^{-3}$ g/L), ocorrendo de modo linear e alcançando 35,20% de viabilidade para a maior concentração ($3,00 \times 10^{-1}$ g/L). Já as

células dessa mesma linhagem tratadas com CHB na forma livre apresentaram nas três menores concentrações uma redução linear da viabilidade celular, de 99,50 para 79,90%. A única exceção à ação mais eficiente das NPs de CHB em relação ao CHB livre correspondeu ao tratamento realizado com a maior concentração. Neste caso o CHB na forma livre matou mais células, havendo 19,70% de células viáveis, enquanto que as NPs contendo o CHB teve mortalidade de 64,80%. Estes resultados podem ser visualizados na figura 60 e na tabela 15.

Excetuando-se o último ponto da figura 60, o comportamento geral observado nas Figuras 59 e 60 consiste na maior eficiência citotóxica do fármaco CHB na forma encapsulada do que na forma livre. Tais resultados nos indicam a possível aplicabilidade deste sistema nanoestruturado produzido para aplicação *in vivo*, uma vez que o processo de encapsulamento protege o princípio ativo de redutases biológicas, evitando sua degradação antes de atingirem o sítio de ação desejado fazendo com que o fármaco mantenha a sua concentração terapêutica [159;160]

Pretende-se no futuro realizar novos ensaios biológicos com as NPs contendo o fármaco e que foram conjugadas com fluoresceína (uma sonda fluorescente) produzida nesse trabalho. Espera-se obter imagens que venham a fornecer dados em tempo real, que demonstrem a eficácia dos tratamentos, o mecanismo de ação do fármaco na forma encapsulada, a degradação das NPs em meio fisiológico, a avaliação das nanoestruturas com melhor poder de permeabilidade a células-alvo, entre outras.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi apresentada uma forma para se realizar a incorporação do fármaco antitumoral clorambucil em nanopartículas esféricas constituídas pelo copolímero biodegradável ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico). As partículas foram produzidas através do método de simples/dupla emulsão seguido pela evaporação do solvente.

Este método foi otimizado determinando-se as condições ideais para concentração de agente surfactante, velocidade de homogeneização, quantidade de fármaco adicionado à formulação, número de lavagens e condições de centrifugação. Após a realização destes experimentos controle concluiu-se que os melhores parâmetros para a produção de nanopartículas contendo clorambucil foram: velocidade de homogeneização de 17.000 rpm, concentração de surfactante 2,0%_(m/v), 4 lavagens para eliminação do PVA residual, velocidade de centrifugação 15.000 rpm e temperatura de centrifugação 0° C.

O encapsulamento ocorreu de forma eficiente sendo sua determinação realizada através de método direto no qual as NPs foram destruídas com solvente orgânico e a porcentagem de fármaco encapsulado foi determinada através de medidas espectrofotométricas através das quais foram constatadas altas taxas de incorporação do fármaco. A presença do fármaco incorporado nas partículas foi confirmada através da realização de diversas medidas espectroscópicas das partículas produzidas (UV-vis, FTIR, emissão de fluorescência, EDS).

Através de análises termogravimétricas (TGA, DTA e DSC) o fármaco encapsulado na estrutura polimérica foi analisado com relação a sua cristalinidade e interação com a matriz. Foi demonstrado que não houve a ocorrência de modificações nas estruturas químicas desses dois compostos. Isso significa que, durante a produção das nanopartículas o fármaco não reagiu com nenhum dos compostos utilizados ou se degradou. Dessa forma, pode-se afirmar que suas características farmacológicas foram mantidas após nanoestruturação.

Por outro lado, a internalização do fármaco na estrutura da nanopartícula resultou em considerável variação da característica estrutural da matriz polimérica,

tendo sido aumentada sua desordem cristalina. Este fato pode ser constatado devido à redução da temperatura de transição vítrea do copolímero quando conjugado ao fármaco.

As nanopartículas produzidas apresentaram características que se mostram favoráveis a sua utilização como DDS. Elas apresentaram diâmetro em escala nanométrica (inferior a 500 nm), podendo assim ser administradas através de diferentes vias. Possuindo carga superficial negativa e valor em módulo relativamente elevado, podendo-se afirmar que quando administradas, as partículas não tendem a se agregarem, e assim, não irão precipitar em meio biológico. O procedimento de produção das partículas se mostrou reprodutível, apresentado estreita faixa de distribuição de tamanho.

Em ensaio de estabilidade física das partículas, foi constatado que quando elas foram mantidas em suspensão em meio tamponado seu tamanho e polidispersão apresentam relação direta com a temperatura em que o meio era mantido. Pode-se afirmar também que as nanopartículas apresentaram medidas crescentes de tamanho com o tempo, seguido pela redução moderada devido fragmentação em consequência da hidrólise da matriz polimérica.

A liberação controlada da droga foi avaliada em meio tamponado e apresentou um comportamento bifásico, havendo alta liberação nas primeiras horas, seguido pela liberação sustentada em período intermediário e após um novo salto até completa liberação. Esse comportamento é típico de matrizes poliméricas biodegradáveis utilizadas em DDS e demonstra que a adequação desses sistemas ao uso clínico pode aumentar a biodisponibilidade do fármaco reduzindo-se assim a frequência de doses e consequentemente a ocorrência de taxas de concentração tóxicas ou subterapêuticas.

Através da análise morfológica realizada com MEV, pode-se constatar que as partículas produzidas apresentaram-se esféricas, pouco porosas e de tamanho regular. A análise das imagens confirmou vários dos resultados obtidos durante os ensaios de caracterização, como dimensão e polidispersão, tendência a não formação de agregados e, devido à característica não-porosa da superfície das partículas, confirmar a forma como ocorreu o comportamento de liberação do fármaco.

Em ensaio de viabilidade, pode-se verificar que quando incorporado o fármaco se apresentou mais eficiente do que sua forma não nanoestruturada. Isso demonstra que as nanopartículas apresentaram-se como uma alternativa para aumentar a eficiência terapêutica do fármaco protegendo-o de sua degradação em meio biológico. As partículas não se mostraram seletivas, pois ambas as linhagens celulares avaliadas (tumoral e não-tumoral) apresentaram comportamento semelhante.

Em experimentos futuros espera-se realizar a funcionalização da superfície dessas nanopartículas e assim contornar esse atual problema. Com essa funcionalização espera-se também que se obtenha seletividade dos sistemas aplicados *in vivo* vindo assim a reduzir inúmeros dos efeitos adversos observados atualmente com a aplicação deste fármaco em sua forma livre. Constatou-se que altas concentrações de nanopartículas podem causar a morte celular, devido à sedimentação delas sobre as células impedindo que haja fluxo entre meio nutritivo e células.

Uma sonda fluorescente foi eficientemente conjugada às nanopartículas contendo o fármaco para que em experimentos futuros possam ser avaliadas as condições de internalização, localização e atuação da nanopartículas no meio celular.

Conclui-se assim que houve êxito no encapsulamento do fármaco CHB na matriz polimérica de ácido poliláctido e poliglicólico a qual pretende-se aplicar em ensaios futuros.

REFERÊNCIAS

- 1 WHO: Noncommunicables Diseases Country Profiles 2011. 2011.
- 2 INCA, MS, BRASIL: Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil. ed 2011, 2011.
- 3 INCA, MS, BRASIL: Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. 2009.
- 4 Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MPT: Câncer E Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos E Ciclo-Celular Não Específicos Que Interagem Com O Dna: Uma Introdução; 2005, pp 118-129.
- 5 Grobmyer SR, Moudgil BM: Cancer Nanotechnology: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology); 2010, pp 1-3.
- 6 da Silva THA, Butera AP, Leal DHS, Alves RJ: Agentes antitumorais inibidores da angiogênese - Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina; 2007, pp 1-17.
- 7 Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, Ramus SJ, Spurdle A, Robson M, Sherman M, Mulligan AM, Couch FJ, Engel C, McGuffog L, Healey S, Sinilnikova OM, Southey MC, Terry MB, Goldgar D, O'Malley F, John EM, Janavicius R, Tihomirova L, Hansen TVO, Nielsen FC, Osorio A, Stavropoulou A, Benitez J, Manoukian S, Peissel B, Barile M, Volorio S, Pasini B, Dolcetti R, Putignano AL, Ottini L, Radice P, Hamann U, Rashid MU, Hogervorst FB, Krieger M, van der Luijt RB, Peock S, Frost D, Evans DG, Brewer C, Walker L, Rogers MT, Side LE, Houghton C, Weaver J, Godwin AK, Schmutzler RK, Wappenschmidt B, Meindl A, Kast K, Arnold N, Niederacher D, Sutter C, Deissler H, Gadzicki D, Preisler-Adams S, Varon-Mateeva R, Schonbuchner I, Gevensleben H, Stoppa-Lyonnet D, Belotti M, Barjhoux L, Isaacs C, Peshkin BN, Caldes T, de la

Hoya M, Canadas C, Heikkinen T, Heikkila P, Aittomaki K, Blanco I, Lazaro C, Brunet J, Agnarsson BA, Arason A, Barkardottir RB, Dumont M, Simard J, Montagna M, Agata S, D'Andrea E, Yan M, Fox S, Rebbeck TR, Rubinstein W, Tung N, Garber JE, Wang XS, Fredericksen Z, Pankratz VS, Lindor NM, Szabo C, Offit K, Sakr R, Gaudet MM, Singer CF, Tea MK, Rappaport C, Mai PL, Greene MH, Sokolenko A, Imyanitov E, Toland AE, Senter L, Sweet K, Thomassen M, Gerdes AM, Kruse T, Caligo M, Aretini P, Rantala J, von Wachenfeld A, Henriksson K, Steele L, Neuhausen SL, Nussbaum R, Beattie M, Odunsi K, Sucheston L, Gayther SA, Nathanson K, Gross J, Walsh C, Karlan B, Chenevix-Trench G, Easton DF, Antoniou AC: Pathology of Breast and Ovarian Cancers among BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2012;21:134-147.

8 da Costa JSD, Victora CG: O que é "um problema de saúde pública"?; 2006, pp 144-146.

9 INCA, MS, BRASIL: Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional. ed 2010, 2010.

10 Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M: Human Cell Line from A Pleural Effusion Derived from A Breast Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 1973;51:1409-1416.

11 Chiattonne CS: Tratamento de primeira linha da leucemia linfóide crônica; 2006, pp 276-279.

12 de Araújo APS, Galvão DCA: Câncer ósseo: enfoque sobre a biologia do câncer; 2010, pp 359-363.

13 Schmid TE, Multhoff G: Radiation-Induced Stress Proteins - the Role of Heat Shock Proteins (HSP) in Anti-Tumor Responses. *Current Medicinal Chemistry* 2012;19:1765-1770.

- 14 Izrailit J, Reedijk M: Developmental pathways in breast cancer and breast tumor-initiating cells: Therapeutic implications. *Cancer Letters* 2012;317:115-126.
- 15 Seigneuric R, Markey L, Nuyten DSA, Dubernet C, Evelo CTA, Finot E, Garrido C: From Nanotechnology to Nanomedicine: Applications to Cancer Research. *Current Molecular Medicine* 2010;10:640-652.
- 16 Serpe L: Conventional Chemotherapeutic Drug Nanoparticles for Cancer Treatment; 2006, pp 01-39.
- 17 Yordanov GG, Bedzhova ZA, Dushkin CD: Preparation and physicochemical characterization of novel chlorambucil-loaded nanoparticles of poly(butylcyanoacrylate). *Colloid and Polymer Science* 2010;288:893-899.
- 18 Guaragna A, Chiaviello A, Paoletta C, D'Alonzo D, Palumbo G, Palumbo G: Synthesis and Evaluation of Folate-Based Chlorambucil Delivery Systems for Tumor-Targeted Chemotherapy. *Bioconjugate Chemistry* 2012;23:84-96.
- 19 Bielawski K, Bielawska A, Muszynska A, Poplawska B, Czarnomysy R: Cytotoxic activity of G3 PAMAM-NH₂ dendrimer-chlorambucil conjugate in human breast cancer cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2011;32:364-372.
- 20 Pettersson-Fernholm T, Vilpo J, Kosonen M, Hakala K, Hovinen J: Reactions of 4-bis(2-chloroethyl)aminophenylacetic acid (phenylacetic acid mustard) in physiological solutions. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* 1999;2183-2187.
- 21 Florea-Wang D: Reactions of Chlorambucil and its main metabolite, Phenylacetic Acid Mustard, with 2'-deoxyribonucleosides and Calf Thymus DNA; 2009, pp 1-60.
- 22 Muthu MS: Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer an overview; 2009, pp 266-273.

- 23 Sharma P, Ganta S, Denny WA, Garg S: Formulation and pharmacokinetics of lipid nanoparticles of a chemically sensitive nitrogen mustard derivative: Chlorambucil. *International Journal of Pharmaceutics* 2009;367:187-194.
- 24 Oliveira AG, Scarpa MV, Bueno JHF, Evangelista RC: Micro e nanocápsulas: Um eficiente sistema, com dimensões reduzidas, para liberação controlada e direcionamento de fármacos encapsulados. *Revista de Ciências Farmacêuticas* 1992;14:37-49.
- 25 Thrall JH: Nanotechnology and medicine. *Radiology* 2004;230:315-318.
- 26 Hilder TA, Hill JM: Carbon nanotubes as drug delivery nanocapsules. *Current Applied Physics* 2008;8:258-261.
- 27 Briones E, Colino CI, Lanao JM: Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. *Journal of Controlled Release* 2008;125:210-227.
- 28 Crommelin DJA, Storm G, Jiskoot W, Stenekes R, Mastrobattista E, Hennink WE: Nanotechnological approaches for the delivery of macromolecules. *Journal of Controlled Release* 2003;87:81-88.
- 29 Wu Y, Wang WW, Chen YT, Huang KH, Shuai XT, Chen QK, Li XX, Lian GD: The investigation of polymer-siRNA nanoparticle for gene therapy of gastric cancer in vitro. *International Journal of Nanomedicine* 2010;5:129-136.
- 30 Fattal E, Vauthier C, Aynie I, Nakada Y, Lambert G, Malvy C, Couvreur P: Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides. *Journal of Controlled Release* 1998;53:137-143.
- 31 Khatri K, Goyal AK, Gupta PN, Mishra N, Vyas SP: Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B. *International Journal of Pharmaceutics* 2008;354:235-241.

- 32 Peek LJ, Middaugh CR, Berkland C: Nanotechnology in vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008;60:915-928.
- 33 Andréo-Filho N, Oliveira AG: Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. *Infarma* 1999;9:18-21.
- 34 Jain KK: The role of nanobiotechnology in drug discovery. *Drug Discovery Today* 2005;10:1435-1442.
- 35 Gelperina S, Kisich K, Iseman MD, Heifets L: The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2005;172:1487-1490.
- 36 Tang BC, Dawson M, Lai SK, Wang YY, Suk JS, Yang M, Zeitlin P, Boyle MP, Fu J, Hanes J: Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:19268-19273.
- 37 Chen W, Lu DR: Carboplatin-loaded PLGA microspheres for intracerebral injection: formulation and characterization. *Journal of Microencapsulation* 1999;16:551-563.
- 38 Garcia JT, Fariña JB, Munguía O, Llabrés M: Comparative degradation study of biodegradable microspheres of poly(DL-lactide-co-glycolide) with poly(ethyleneglycol) derivatives. *Journal of Microencapsulation* 1999;16:83-94.
- 39 Hendricks JL, Chikar JA, Crumling MA, Raphael Y, Martin DC: Localized cell and drug delivery for auditory prostheses. *Hearing Research* 2008;242:117-131.
- 40 Magill M: Microencapsulation for the personal care industry. *Cosmetics & Toiletries* 1990;105:59-62.
- 41 Shahidi F, Han XQ: Encapsulation of Food Ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1993;33:501-547.

- 42 Jori G, Reddi E: The Role of Lipoproteins in the Delivery of Tumor-Targeting Photosensitizers. *International Journal of Biochemistry* 1993;25:1369-1375.
- 43 Tighiouart M, Rogatko A: Dose Finding with Escalation with Overdose Control (EWOC) in Cancer Clinical Trials. *Statistical Science* 2010;25:217-226.
- 44 Zhou YY, Guo Z, Zhang YW, Huang W, Zhou YF, Yan DY: Hyperbranched Polyamidoamines Containing beta-Cyclodextrin for Controlled Release of Chlorambucil. *Macromolecular Bioscience* 2009;9:1090-1097.
- 45 Budhian A, Siegel SJ, Winey KI: Production of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles for extended controlled drug release of haloperidol. *Journal of Microencapsulation* 2005;22:773-785.
- 46 Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, Levy-Nissenbaum E, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC: Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials* 2007;28:869-876.
- 47 Green AE, Rose PG: Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer. *International Journal of Nanomedicine* 2006;1:229-239.
- 48 Gryparis EC, HatziaPOSTOLOU M, Papadimitriou E, Avgoustakis K: Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007;67:1-8.
- 49 Garinot M, Fievez V, Pourcelle V, Stoffelbach F, des Rieux A, Plapied L, Theate I, Freichels H, Jerome C, Marchand-Brynaert J, Schneider YJ, Preat V: PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *Journal of Controlled Release* 2007;120:195-204.

50 Lee KC, Lee YJ, Kim WB, Cha CY: Monoclonal Antibody-Based Targeting of Methotrexate-Loaded Microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 1990;59:27-33.

51 Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM: Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release* 2008;125:193-209.

52 Li SD, Huang L: Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* 2008;5:496-504.

53 Cui F, Shi K, Zhang LQ, Tao AJ, Kawashima Y: Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: Preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release* 2006;114:242-250.

54 Jiang WL, Gupta RK, Deshpande MC, Schwendeman SP: Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005;57:391-410.

55 Cheng JJ, Teply BA, Jeong SY, Yim CH, Ho D, Sherifi I, Jon S, Farokhzad OC, Khademhosseini A, Langer RS: Magnetically responsive polymeric microparticles for oral delivery of protein drugs. *Pharmaceutical Research* 2006;23:557-564.

56 Rekha MR, Sharma CP: Synthesis and evaluation of lauryl succinyl chitosan particles towards oral insulin delivery and absorption. *Journal of Controlled Release* 2009;135:144-151.

57 Kawashima Y: Preface nanoparticulate systems for improved drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001;47:1-2.

58 Kranz H, Bodmeier R: Structure formation and characterization of injectable drug loaded biodegradable devices: In situ implants versus in situ microparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008;34:164-172.

59 Jawahar N, Venkatesh DN, Sureshkumar R, Senthil V, Ganesh GNK, Vinoth P, Sood S, Samanta MK: Development and charecterization of PLGA-nanoparticles containing carvedilol; 2009, pp 123-128.

60 Leite EA, Grabe-Guimaraes A, Guimaraes HN, Machado-Coelho GLL, Barratt G, Mosqueira VCF: Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. *Life Sciences* 2007;80:1327-1334.

61 Jain RA: The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 2000;21:2475-2490.

62 Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B, Menei P, Benoit JP: A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Molecular Cancer Therapeutics* 2006;5:1710-1722.

63 Rawat M, Singh D, Saraf S, Saraf S: Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2006;29:1790-1798.

64 Kayser O, Lemke A, Hernandez-Trejo N: The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2005;6:3-5.

65 Patlak M: Nanotechnology Takes a New Look at Old Drugs. *Journal of the National Cancer Institute* 2010;102:1753-1755.

66 Fairhurst D, Mitchnick M: Submicron encapsulation of organic sunscreens. *Cosmetics & Toiletries* 1995;110:47-50.

67 Re MI: Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology* 1998;16:1195-1236.

68 Dreher KL: Health and environmental impact of nanotechnology: Toxicological assessment of manufactured nanoparticles. *Toxicological Sciences* 2004;77:3-5.

69 Siegrist M, Cousin ME, Kastenholz H, Wiek A: Public acceptance of nanotechnology foods and food packaging: The influence of affect and trust. *Appetite* 2007;49:459-466.

70 Gonzalez-Melendi P, Fernandez-Pacheco R, Coronado MJ, Corredor E, Testillano PS, Risueno MC, Marquina C, Ibarra MR, Rubiales D, Perez-De-Luque A: Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: Assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues. *Annals of Botany* 2008;101:187-195.

71 Quina FH: Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos; 2004, pp 1028-1029.

72 Guhagarkar SA, Malshe VC, Devarajan PV: Nanoparticles of Polyethylene Sebacate: A New Biodegradable Polymer. *Aaps Pharmscitech* 2009;10:935-942.

73 Vasir JK, Labhasetwar V: Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007;59:718-728.

74 Solaro R, Chiellini F, Signori F, Fiumi C, Bizzarri R, Chiellini E: Nanoparticle systems for the targeted release of active principles of proteic nature. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2003;14:705-711.

75 Xu DS, Yu YX, Zheng M, Guo GL, Tang YQ: Electrochemical fabrication of one-dimensional silica nanostructures. *Electrochemistry Communications* 2003;5:673-676.

76 Yin LC, Ding JY, He CB, Cui LM, Tang C, Yin CH: Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery. *Biomaterials* 2009;30:5691-5700.

77 Gates AT, Fakayode SO, Lowry M, Ganea GM, Murugesu A, Robinson JW, Strongin RM, Warner IM: Gold nanoparticle sensor for homocysteine thiolactone-induced protein modification. *Langmuir* 2008;24:4107-4113.

78 Moos PJ, Chung K, Woessner D, Honegger M, Cutler NS, Veranth JM: ZnO Particulate Matter Requires Cell Contact for Toxicity in Human Colon Cancer Cells. *Chemical Research in Toxicology* 2010;23:733-739.

79 Fernandez-Urrusuno R, Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ: Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 1999;16:1576-1581.

80 de Salamanca AE, Diebold Y, Calonge M, Garcia-Vazquez C, Callejo S, Vila A, Alonso MJ: Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: Toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006;47:1416-1425.

81 da Cruz AC, Meireles CS, Ribeiro SD, Filho GR, de Assunção RMN, Cerqueira DA, Poletto P: Utilização do acetato de celulose produzido a partir da celulose extraída do caroço de manga como matriz para produção de sistemas microparticulados; 2011, pp 385-389.

82 Kim DH, Wiler JA, Anderson DJ, Kipke DR, Martin DC: Conducting polymers on hydrogel-coated neural electrode provide sensitive neural recordings in auditory cortex. *Acta Biomaterialia* 2010;6:57-62.

83 Wang C, Ge Q, Ting D, Nguyen D, Shen HR, Chen JZ, Eisen HN, Heller J, Langer R, Putnam D: Molecularly engineered poly(ortho ester) microspheres for enhanced delivery of DNA vaccines. *Nature Materials* 2004;3:190-196.

- 84 Chawla JS, Amiji MM: Cellular uptake and concentrations of tamoxifen upon administration in poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles. *Aaps Pharmsci* 2003;5.
- 85 Wada R, Hyon SH, Ike O, Watanabe S, Shimizu Y, Ikada Y: Preparation of Lactic-Acid Oligomer Microspheres Containing Anti-Cancer Drug by 0/0-Type Solvent Evaporation Process. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 1988;196:169-MSE.
- 86 Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Ruzinski WE: Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* 2001;70:1-20.
- 87 Stevanovic M, Uskokovic D: Poly(lactide-co-glycolide)-based Micro and Nanoparticles for the Controlled Drug Delivery of Vitamins. *Current Nanoscience* 2009;5:1-14.
- 88 Gomes AJ, Lunardi LO, Caetano FH, Machado AEH, Oliveira-Campos AMF, Bendhack LM, Lunardi CN: Biodegradable Nanoparticles Containing Benzopsoralens: An Attractive Strategy for Modifying Vascular Function in Pathological Skin Disorders. *Journal of Applied Polymer Science* 2011;121:1348-1354.
- 89 Jain AK, Das M, Swarnakar NK, Jain S: Engineered PLGA Nanoparticles: An Emerging Delivery Tool in Cancer Therapeutics. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 2011;28:1-45.
- 90 Pandey R, Sharma A, Zahoor A, Sharma S, Khuller GK, Prasad B: Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003;52:981-986.

- 91 Tamber H, Johansen P, Merkle HP, Gander B: Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005;57:357-376.
- 92 Scholl I, Kopp T, Bohle B, Jensen-Jarolim E: Biodegradable PLGA particles for improved systemic and mucosal treatment of type I allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2006;26:349-+.
- 93 Ronco C, Nissenson AR: Does nanotechnology apply to dialysis? *Blood Purification* 2001;19:347-352.
- 94 Igarashi E: Factors affecting toxicity and efficacy of polymeric nanomedicines. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008;229:121-134.
- 95 Lee LJ: Polymer nanoengineering for biomedical applications. *Annals of Biomedical Engineering* 2006;34:75-88.
- 96 Yih TC, Al-Fandi M: Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006;97:1184-1190.
- 97 Jalil R, Nixon JR: Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *Journal of Microencapsulation* 1990;7:297-325.
- 98 Xie H, Smith JW: Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system; 2010, pp 1-7.
- 99 Reis CP, Neufeld RJ, Vilela S, Ribeiro AJ, Veiga F: Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal of Microencapsulation* 2006;23:245-257.
- 100 Anton N, Gayet P, Benoit JP, Saulnier P: Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. *International Journal of Pharmaceutics* 2007;344:44-52.

- 101 Bilati U, Allemann E, Doelker E: Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues. *Aaps Pharmscitech* 2005;6.
- 102 van Vlerken LE, Vyas TK, Amiji MM: Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. *Pharmaceutical Research* 2007;24:1405-1414.
- 103 Devalapally H, Duan ZF, Seiden MV, Amiji MM: Modulation of drug resistance in ovarian adenocarcinoma by enhancing intracellular ceramide using tamoxifen-loaded biodegradable polymeric nanoparticles. *Clinical Cancer Research* 2008;14:3193-3203.
- 104 Mailander V, Landfester K: Interaction of Nanoparticles with Cells. *Biomacromolecules* 2009;10:2379-2400.
- 105 Pepper C, Thomas A, Tucker H, Hoy T, Bentley P: Flow cytometric assessment of three different methods for the measurement of in vitro apoptosis. *Leukemia Research* 1998;22:439-444.
- 106 Sartori RA, de Morais LC, Consolin-Filho N, Marques DD, Gessner F: Adsorção do corante azul de metileno em partículas de argilominerais: análise dos tamanhos das partículas; 2011, pp 584-588.
- 107 Bourges JL, Gautier SE, Delie F, Bejjani RA, Jeanny JC, Gurny R, BenEzra D, Behar-Cohen FF: Ocular drug delivery targeting the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2003;44:3562-3569.
- 108 Falleiros JPB, Brandl AL, da Fonseca ARA: Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer; 2011, pp 151-170.
- 109 Park JH, von Maltzahn G, Xu MJ, Fogal V, Kotamraju VR, Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ: Cooperative nanomaterial system to sensitize, target, and treat

tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010;107:981-986.

110 Kim SH, Jeong JH, Lee SH, Kim SW, Park TG: Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. Journal of Controlled Release 2008;129:107-116.

111 Davis ME, Chen Z, Shin DM: Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. Nature Reviews Drug Discovery 2008;7:771-782.

112 Yezhelyev MV, Gao X, Xing Y, Al-Hajj A, Nie SM, O'Regan RM: Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. Lancet Oncology 2006;7:657-667.

113 Sinha R, Kim GJ, Nie SM, Shin DM: Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. Molecular Cancer Therapeutics 2006;5:1909-1917.

114 Gomes AJ, Lunardi CN, Lunardi LO, Pitol DL, Machado AEH: Identification of psoralen loaded PLGA microspheres in rat skin by light microscopy. Micron 2008;39:40-44.

115 Gomes AJ, Lunardi LO, Marchetti JM, Lunardi CN, Tedesco AC: Indocyanine green nanoparticles useful for photomedicine. Photomedicine and Laser Surgery 2006;24:514-521.

116 Gomes AJ, Lunardi CN, Tedesco AC: Characterization of biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with bacteriochlorophyll-a for photodynamic therapy. Photomedicine and Laser Surgery 2007;25:428-435.

117 Zhou CN: Mechanisms of tumor necrosis induced by photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B 1989;3:299-318.

118 Primo FL, Rodrigues MMA, Simioni AR, Bentley MVLB, Morais PC, Tedesco AC: In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2008;320:E211-E214.

119 Narita I, Oku T, Tokoro H, Suganuma K: Synthesis and structures of iron nanoparticles coated with boron nitride nanomaterials. *Journal of Electron Microscopy* 2006;55:123-127.

120 Pouponneau P, Leroux JC, Martel S: Magnetic nanoparticles encapsulated into biodegradable microparticles steered with an upgraded magnetic resonance imaging system for tumor chemoembolization. *Biomaterials* 2009;30:6327-6332.

121 Nguyen A, Marsaud V, Bouclier C, Top S, Vessieres A, Pigeon P, Gref R, Legrand P, Jaouen G, Renoir JM: Nanoparticles loaded with ferrocenyl tamoxifen derivatives for breast cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutics* 2008;347:128-135.

122 Byrappa K, Ohara S, Adschiri T: Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology - towards biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008;60:299-327.

123 Allard E, Hindre F, Passirani C, Lemaire L, Lepareur N, Noiret N, Menei P, Benoit JP: Re-188-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2008;35:1838-1846.

124 Gwinn MR, Vallyathan V: Nanoparticles: Health effects - Pros and cons. *Environmental Health Perspectives* 2006;114:1818-1825.

125 Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW: Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology* 2007;150:552-558.

- 126 Bivas-Benita M, Romeijn S, Junginger HE, Borchard G: PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004;58:1-6.
- 127 Lu JM, Wang XW, Marin-Muller C, Wang H, Lin PH, Yao QZ, Chen CY: Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2009;9:325-341.
- 128 El-Ansary A, Al-Daihan S: On the Toxicity of Therapeutically Used Nanoparticles: An Overview; 2008, pp 1-9.
- 129 Kaparissides C, Alexandridou S, Kotti K, Chaitidou S: Recent Advances in Novel Drug Delivery Systems; 2006, pp 1-11.
- 130 Lehr CM: Nanomedicine for the improved Delivery of Drugs Across Biological Barriers; 2007, pp 34-39.
- 131 Granada A, Nemen D, Dora CL, Neckel GL, Lemos-Senna E: O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados; 2007, pp 129-139.
- 132 Gomes AJ, Lunardi LO, Marchetti JM, Lunardi CN, Tedesco AC: Photobiological and ultrastructural studies of nanoparticles of poly(lactic-co-glycolic acid)-containing bacteriochlorophyll-a as a photosensitizer useful for PDT treatment. *Drug Delivery* 2005;12:159-164.
- 133 Gomes AJ, Assuncao RMN, Rodrigues G, Espreafico EM, Machado AED: Preparation and characterization of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles containing 3-(benzoxazol-2-yl)-7-(N,N-diethyl amino) chromen-2-one. *Journal of Applied Polymer Science* 2007;105:964-972.

- 134 Gomes AJ, Faustino AS, Lunardi CN, Lunardi LO, Machado AEH: Evaluation of nanoparticles loaded with benzopsoralen in rat peritoneal exudate cells. *International Journal of Pharmaceutics* 2007;332:153-160.
- 135 Kim DH, Martin DC: Sustained release of dexamethasone from hydrophilic matrices using PLGA nanoparticles for neural drug delivery. *Biomaterials* 2006;27:3031-3037.
- 136 Gomes AJ, Barbougli PA, Espreafico EM, Tfouni E: trans-[Ru(NO)(NH₃)₄(py)](BF₄)₃•H₂O encapsulated in PLGA microparticles for delivery of nitric oxide to B16-F10 cells: Cytotoxicity and phototoxicity. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2008;102:757-766.
- 137 Tfouni E, Doro FG, Gomes AJ, da Silva RS, Metzker G, Benini PGZ, Franco DW: Immobilized ruthenium complexes and aspects of their reactivity. *Coordination Chemistry Reviews* 2010;254:355-371.
- 138 Gomes AJ, Faustino AS, Machado AEH, Zaniquelli MED, Rigoletto TD, Lunardi CN, Lunardi LO: Characterization of PLGA microparticles as a drug carrier for 3-ethoxycarbonyl-2H-benzofuro[3,2-f]-1-benzopyran-2-one. Ultrastructural study of cellular uptake and intracellular distribution. *Drug Delivery* 2006;13:447-454.
- 139 Motta AC, Duek EAR: Síntese, Caracterização e Degradação "in vitro" do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico); 2006, pp 340-350.
- 140 Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS: PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release* 1999;57:171-185.
- 141 Dailey LA, Wittmar M, Kissel T: The role of branched polyesters and their modifications in the development of modern drug delivery vehicles. *Journal of Controlled Release* 2005;101:137-149.

- 142 Mondal N, Samanta A, Pal TK, Ghosal SK: Effect of different formulation variables on some particle characteristics of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 2008;128:595-601.
- 143 Kumari A, Yadav SK, Yadav SC: Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2010;75:1-18.
- 144 Silva C, Ribeiro A, Ferreira D, Veiga F: Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação; 2003, pp 1-20.
- 145 Rezende CA, Duek EAR: Blendas de Poli (Ácido Lático-co-ácido Glicólico)/Poli (Ácido Lático): Degradação in vitro; 2003, pp 36-44.
- 146 Martins GS, Iozzi AM, Martins MA, Mattoso LHC: Caracterização Mecânica e Térmica de Compósitos de Poli (Cloreto de Vinila) Reforçados com Fibras de Sisal; 2004, pp 326-333.
- 147 Everett JL, Roberts JJ, Ross WCJ: Aryl-2-Halogenoalkylamines .12. Some Carboxylic Derivatives of Nn-Di-2-Chloroethylaniline. *Journal of the Chemical Society* 1953;2386-2392.
- 148 Liu YY, Fan XD, Hu H, Tang ZH: Release of chlorambucil from poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with beta-cyclodextrin moieties. *Macromolecular Bioscience* 2004;4:729-736.
- 149 Gunasekaran S, Kumaresan S, Balaji RA, Anand G, Seshadri S: Vibrational spectra and normal coordinate analysis on structure of chlorambucil and thioguanine. *Pramana-Journal of Physics* 2008;71:1291-1300.
- 150 Nahar M, Jain NK: Preparation, Characterization and Evaluation of Targeting Potential of Amphotericin B-Loaded Engineered PLGA Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 2009;26:2588-2598.

- 151 Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR: Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos; 2003, pp 726-737.
- 152 Gomes AD, Lunardi CN, Caetano FH, Lunardi LO, Machado AED: Phagocytosis of PLGA microparticles in rat peritoneal exudate cells: A time-dependent study. *Microscopy and Microanalysis* 2006;12:399-405.
- 153 Rosa DS, Penteado DF, Calil MR: Propriedades Térmicas e Biodegradabilidade de PCL e PHB em Pool de Fungos; 2000, pp 75-80.
- 154 Yadav AK, Mishra P, Mishra AK, Mishra P, Jain S, Agrawal GP: Development and characterization of hyaluronic acid-anchored PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* 2007;3:246-257.
- 155 Choi Y, Joo JR, Hong A, Park JS: Development of Drug-Loaded PLGA Microparticles with Different Release Patterns for Prolonged Drug Delivery. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 2011;32:867-872.
- 156 Freire JM, Domingues MM, Matos J, Melo MN, Veiga AS, Santos NC, Castanho MARB: Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 2011;40:481-487.
- 157 Makadia HK, Siegel SJ: Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier; 2011, pp 1377-1397.
- 158 Moreno D, Zalba S, Colom H, Troconiz IF, de Ilarduya CT, Garrido MJ: Biopharmaceutic and pharmacodynamic modeling of the in vitro anti proliferative effect of new controlled delivery systems of cisplatin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009;37:341-350.

159 Song HL, Nie SF, Yang XG, Li N, Xu HT, Zheng LY, Pan WS: Characterization and in vivo evaluation of novel lipid-chlorambucil nanospheres prepared using a mixture of emulsifiers for parenteral administration. *International Journal of Nanomedicine* 2010;5:933-942.

160 Ganta S, Paxton JW, Baguley BC, Garg S: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorambucil delivered in parenteral emulsion. *International Journal of Pharmaceutics* 2008;360:115-121.