

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

DANIEL HENRIQUE DO AMARAL CORRÊA

**CITOTOXICIDADE DA DESIDROCROTONINA LIVRE E
VEICULADA EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA:
NANOESFERAS DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO-CO-GLICÓLICO
(PLGA) E COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM
CICLODEXTRINAS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Daniel Henrique do
Amaral Corrêa
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, área de concentração:
Bioquímica.

Patricia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia da Silva Melo

**Departamento de Bioquímica – IB
UNICAMP**

**Campinas – São Paulo
2005**

100

IDE _____

AMADA _____

UNICAMP

C817c

EX

BC/ 67194

16.123-06

☐ ☒

14.00

02/13/06

ID: 375934

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C817c

Corrêa, Daniel Henrique do Amaral
Citotoxicidade da desidrocrotonina livre e veiculada
em sistemas de liberação controlada: nanoesferas de
ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) e complexos de
inclusão com ciclodextrinas / Daniel Henrique do Amaral
Corrêa. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Patrícia da Silva Melo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ciclodextrinas. 2. Citotoxicidade de mediação
celular. 3. Tecnologia de liberação controlada. I.
Melo, Patrícia da Silva. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Cytotoxicity of free dehydrocrotonin and dehydrocrotonin-loaded controlled delivery systems: poly-lactide-co-glycode acid (PLGA) nanospheres and inclusion complexes with cyclodextrins.

Palavras-chave em inglês: Cyclodextrins; Cell-mediated cytotoxicity; Controlled release technology.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Patrícia da Silva Melo, Sérgio Marangoni, Ana Olívia de Souza.

Data da defesa: 18/11/2005.

Data da Defesa: 18/11/2005

BANCA EXAMINADORA:

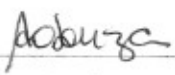
Profª. Drª Patrícia da Silva Melo (Orientadora)

UNICAMP – Instituto de Biologia – Depto. de Bioquímica


Assinatura

Profª. Drª. Ana Olívia de Souza

BUTANTAN – Laboratório de Bioquímica e Biofísica


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

UNICAMP – Instituto de Biologia – Depto. de Bioquímica


Assinatura

Prof. Dr. Armino Antônio Alves

UNIARARAS – Química e Bioquímica

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos

UNICAMP – Instituto de Biologia – Depto. de Bioquímica

Assinatura

Aos meus pais João Batista e Carmem, pelo amor, carinho, dedicação e pela confiança na concretização de meus objetivos.

Aos meus irmãos Fábio e Gustavo, companheiros de toda vida.

A minha esposa Fernanda, meu porto seguro e grande amor da minha vida e em especial ao nosso filho Otávio, razão do meu crescimento e fortaleza para superar todos e quaisquer obstáculos. Para meus sogros Jorge (*In Memoriam*) e Elizabete, por me terem como um filho.

Dedico

“A ciência tem as raízes amargas, mas os frutos são muito doces!”

Aristóteles

“A dúvida é o começo da sabedoria!”

Segus

“É impossível para um homem aprender aquilo que ele acha que já sabe”

Epíteto

“De tudo ficam três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela vida, por ter me conduzido neste caminho de sabedoria tão agradável e desafiador, e pelas condições indispensáveis que me ofereceu para que tudo fosse concretizado.

À Dra. Patrícia da Silva Melo e Dra. Nora Marcela Haun Quíros, todos e quaisquer comentários são poucos frente à essencial orientação durante o trabalho, simpatia, boa vontade, incentivo, por toda estrutura laboratorial fornecida, além da grande amizade, conhecimentos transmitidos e pela sinceridade de suas palavras sempre valiosas!

À minha amada esposa Fernanda, pelo amor, carinho, paciência, conselhos, por compreender os momentos de ausência e pelo constante incentivo para sempre continuar e nunca desistir dos meus sonhos. Amo muito você!

Agradeço a toda minha família que sempre será a maior fonte de inspiração e apoio para a realização dos meus sonhos. Ao meu pai e a minha mãe que forneceram todo o apoio inicial, tornando possível a realização dos meus objetivos e por terem me dado todo conforto e compreensão nas horas mais difíceis.

Ao pessoal do Laboratório de Cultura de Células e Biofármacos: Maristella, pelas discussões sadias, auxílio e amizade; João Batista (“Netão”), pelo auxílio técnico, amizade, bom humor e companheirismo; Lucas, Paula e Iasmim, pela amizade, auxílio e companheirismo. Muito obrigado a todos vocês!

A todos do departamento de Bioquímica que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho. Ao técnico Paulo Baldasso (Paulinho), pelo auxílio, amizade e, sobretudo pela agradável convivência!

Às secretárias do Departamento de Bioquímica e da Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular – Marina A. da Cruz e Andréia Ap. Vigilato – por toda ajuda dispensada e amizade.

Aos Profs. que muito me engrandeceram através de seus conhecimentos e conselhos: Lucia Pereira da Silva, Nelson Durán, Eneida de Paula e Sônia Valéria P.M.M. Fernandes.

Ao pessoal do Laboratório de Química Biológica de responsabilidade do Prof. Nelson Duran, pela convivência e troca de experiências acadêmicas.

Aos Profs. Sérgio Marangoni, Carlos Henrique Inácio Ramos, Armino Antônio Alves e Ana Olívia de Souza pela correção da tese e pelas importantes críticas colocadas na banca prévia.

Ao Prof. Armino Antônio Alves por ser um dos responsáveis direto da minha vinda à UNICAMP em busca da vida acadêmico-científica, pelos bons momentos no início desses mais de dois anos, pelas inúmeras caronas Araras-Campinas-Araras e pelos excelentes conselhos. Valeu “Armindinho”!

Ao pessoal do Laboratório de Bioseparação e de Propriedades Reológicas e Coloidais, do Prof. Dr. César Costapinto Santana, no Departamento de Processos Biotecnológicos, na Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP. Agradeço pelo auxílio na realização do experimento de medida do tamanho e distribuição do tamanho das nanoesferas de PLGA pela técnica de espalhamento de luz laser.

Aos funcionários do Laboratório de Microscopia Eletrônica (UNICAMP), sob supervisão da bióloga Adriane Cristina S. Sprogis, pela ajuda na obtenção das imagens de microscopia eletrônica das nanoesferas de PLGA.

Ao pessoal do Laboratório de Tecnologia de Partículas (Instituto de Pesquisas Tecnológicas S.A. – IPT, USP), Departamento de Agrupamento de Processos Químicos, sob responsabilidade da Dra. Maria Inês Ré, pela realização do experimento de determinação do potencial zeta das nanoesferas de PLGA.

Agradeço a Dra. Mariângela Burgos Martins de Azevedo, da STQ (Serviços em Tecnologia Química – CIETEC – USP) pela colaboração no preparo e caracterização dos complexos de inclusão.

A todos os amigos de longa data por tornar o trabalho tão extasiante e pelas palavras de apoio.

À CNPq pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

<i>ABREVIATURAS</i>	<i>xi</i>
<i>RESUMO</i>	<i>xiii</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xiv</i>
<i>I- INTRODUÇÃO</i>	<i>1</i>
<i>I.1. DESIDROCROTONINA</i>	<i>1</i>
<i>I.2. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA</i>	<i>4</i>
<i>I.2.1. Sistemas Poliméricos-Partículas de Ácido poli-láctico-glicólico (PLGA)</i>	<i>4</i>
<i>I.2.2. Ciclodextrinas</i>	<i>11</i>
<i>I.3. CITOTOXICIDADE</i>	<i>16</i>
<i>I.4. CÉLULAS V79</i>	<i>18</i>
<i>I.5. HEPATÓCITOS E BIOTRANSFORMAÇÃO</i>	<i>19</i>
<i>II- OBJETIVOS</i>	<i>24</i>
<i>III- MÉTODOS/EXPERIMENTAL</i>	<i>25</i>
<i>III.1. NANOESFERAS DE PLGA CONTENDO DESIDROCROTONINA</i>	<i>25</i>
<i>III.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOESFERAS DE PLGA</i>	<i>26</i>
<i>III.2.1. Tamanhos das nanoesferas</i>	<i>26</i>
<i>III.2.2. Morfologia da superfície das nanoesferas</i>	<i>27</i>
<i>III.2.3. Potencial zeta</i>	<i>27</i>
<i>III.2.4. Eficiência de encapsulação</i>	<i>28</i>
<i>III.2.5. Cinética de liberação da DHC in vitro</i>	<i>28</i>
<i>III.3. COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE DHC COM βCDs</i>	<i>29</i>
<i>III.4. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM βCDs</i>	<i>29</i>

<i>III.4.1. Difração de raios X por pó.....</i>	<i>29</i>
<i>III.4.2. Calorimetria diferencial de varredura e Análise termogravimétrica.....</i>	<i>30</i>
<i>III.4.4. Microscopia eletrônica de varredura.....</i>	<i>31</i>
<i>III.5. CULTURA DE CÉLULAS V79.....</i>	<i>31</i>
<i>III.6. ANIMAIS.....</i>	<i>32</i>
<i>III.7. CULTURA PRIMÁRIA DE HEPATÓCITOS.....</i>	<i>33</i>
<i>III.8. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....</i>	<i>34</i>
<i>III.9. NÍVEIS DE GSH, PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CITOCROMOS P450 EM HEPATÓCITOS.....</i>	<i>36</i>
<i>III.10. TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....</i>	<i>41</i>
<i>IV.RESULTADOS.....</i>	<i>42</i>
<i>V. DISCUSSÃO.....</i>	<i>80</i>
<i>VI.</i>	<i>99</i>
<i>CONCLUSÕES.....</i>	
<i>VII. PERSPECTIVAS.....</i>	<i>101</i>
<i>VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</i>	<i>102</i>

ABREVIATURAS

α -CD	Alfa ciclodextrina
ANOVA	Análise de variância entre grupos
β -CD	Beta ciclodextrina
CD(s)	Ciclodextrina(s)
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CP450	Citocromo p450
DHC	Desidrocrotonina
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food Drug Administration
γ -CD	Gama ciclodextrina
GPx	Glutathione peroxidase
GSSG // GSH	Glutathione oxidada // reduzida
HP- β -CD	Hidroxipropil beta ciclodextrina
IC ₅₀	Concentração inibitória em 50%
LD ₅₀	Dose letal a 50% da população testada
MDA	Malonaldeído
Me- β -CD	Metil beta ciclodextrina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MOC	7-metoxicoumarina
MOR	7-metoxiresorufina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio)
NAD(P) ⁺ // NAD(P)H	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada // reduzida
NAD ⁺ // NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada // reduzida
PBS	Tampão fosfato salina

PCL	Poli- ϵ -caprolactona
PGA	Ácido poli-glicólico
PLA	Ácido poli-lático
PLGA	Ácido poli-lático-co-glicólico
PVA	Polivinil álcool
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TGA	Análise termogravimétrica
TNB	5-tio-2-nitobenzoato
XRD	Difração de raios-X

RESUMO

A droga desidrocrotonina (DHC), isolada da planta *Croton cajucara*, é conhecida pelas suas atividades biológicas, entretanto apresenta uma vasta e conhecida toxicidade. Neste trabalho foram preparadas formulações contendo DHC associada a polímeros (PLGA) ou ciclodextrinas (beta, metil-beta e hidroxipropil-beta) para obter nanopartículas poliméricas e complexos de inclusão, respectivamente. Objetivamos neste trabalho a preparação das formulações de veiculação de DHC, sua caracterização e avaliação de parâmetros de toxicidade *in vitro* visando o estudo comparativo dos efeitos da DHC livre e veiculada. Células V79 e hepatócitos de ratos, sistemas celulares bem estabelecidos, permitiram avaliar alvos celulares como lisossomos, mitocôndrias e ácidos nucleicos frente aos possíveis danos tóxicos causados pela DHC. Nos hepatócitos, além dos parâmetros citados acima, também foi avaliada a quantidade de GSH existente nessas células, bem como a quantificação da peroxidação lipídica através da formação de TBARS e a atividade enzimática de enzimas do sistema de metabolização de drogas após tratamento com DHC livre e veiculada nos sistemas de liberação controlada – nanoesferas de PLGA e complexos de inclusão com ciclodextrinas.

Nossos estudos em forma geral, indicam que os polímeros ou complexos de inclusão são estruturas que conferem estabilidade à DHC, provocam liberação controlada e diminuição dos efeitos tóxicos da DHC.

ABSTRACT

The drug dehydrocrotonin (DHC), isolated from *Croton cajucara* plant, is known for its biological activities, however presenting a well-known toxicity. In this work, we produced complexes containing DHC associated with polymers (PLGA) or with cyclodextrins (beta, methyl-beta and hydroxypropyl-beta) to obtain polymeric nanoparticles and inclusion complexes respectively. We aimed in this work to produce DHC-loaded formulations, to characterize these formulations and to evaluate the *in vitro* toxicity parameters through the comparative study of the effects of the free DHC and DHC-loaded. V79 cells and rat hepatocytes, well-established cellular systems, had allowed us to evaluate cellular targets as the lysosomes, mitochondrias and nucleic acids against the possible toxic effects caused by DHC. In hepatocytes, beyond the above-listed parameters, the amount of GSH in these cells was also evaluated, as well as the quantification of lipid peroxidation through the formation of TBARS and the enzymatic activity of the enzymes from the drug metabolization system after treatment with DHC in its free state and associated with controlled release systems – nanospheres of PLGA and cyclodextrins inclusion complexes.

Our studies indicates that the polymers or inclusion complexes are structures that confer stability to DHC, causing controlled release and reduction of the toxic effects of DHC.

I. INTRODUÇÃO

I.1. DESIDROCROTONINA

A espécie *Croton cajucara* Benth (família Euphorbiaceae) é uma planta nativa e endêmica da região Amazônica, principalmente no Estado do Pará, onde é popularmente conhecida como “sacaca” e muito utilizada na medicina popular sob a forma de chás da casca e das folhas no tratamento de diversas doenças (Di Stasi *et al.*, 1989). Dentre essas se destaca o uso nos distúrbios hepáticos e renais, diabetes, diarreia, gastralgia, febre, icterícia, hepatite viral e malária (Van Den Bergh, 1982; Martins, 1989; Di Stasi *et al.*, 1994). Porém, evidências de ocorrência de hepatite tóxica também foram relatadas, principalmente no Estado do Pará, onde seu consumo é mais intenso (Maciel *et al.*, 1998a).

Estudos revelaram a presença de esteróides, flavonóides e diterpenos tipo clerodane nas folhas e cascas de *Croton cajucara* (Maciel *et al.*, 1998b, 2000), com atividades biológicas diversas, tais como antibiótica, anti-tumoral (McChesney *et al.*, 1991; Hagiwara *et al.*, 1995) e anti-inflamatória (Maciel *et al.*, 2000).

Dentre os compostos encontrados em espécies de plantas do gênero *Croton*, a desidrocrotonina (DHC) (**Figura 1**) é o nor-diterpeno, tipo clerodane, presente em maior quantidade no extrato da casca de *Croton cajucara*, tendo como nome pelas regras da IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada): (5-(3-furânil)-2', 3', 4, 4', 4'a, 5, 8', 8'a-octaidro-2', 5'-dimetil-[1'alfa(R*), 2'alfa, 4'a-alfa, 8'a-beta]espiro[furan-3(2H), 1'(7'H)-naftaleno]-2,7'dione), de fórmula molecular C₁₉H₂₂O₄ e 314,38 Da de massa molecular. A DHC possui atividades biológicas comprovadas, tais como: hipoglicemiante (Farias *et al.*, 1997), anti-ulcerogênica (Hiruma-Lima *et al.*, 1999, 2002), antiestrogênica

(Costa *et al.*, 1999) e anti-tumoral (Grynberg *et al.*, 1999). Recentes estudos indicaram atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* em modelos experimentais: Sarcoma 180 (S180), tumor ascítico de Ehrlich (Grynberg *et al.*, 1999; Maciel *et al.*, 2000) e células da leucemia promielocítica humana (HL60) (Freire *et al.*, 2003; Anazetti *et al.*, 2001; 2002; 2003; 2004).

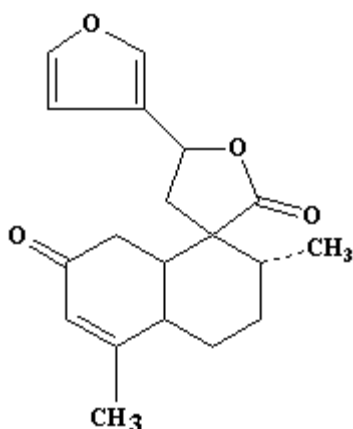


Figura 1. Estrutura química da desidrocrotonina (DHC).

Segundo Grynberg e colaboradores (1999), a DHC induz apoptose *in vitro* e a produção de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) em cultura de células do tumor de Ehrlich. Em uma revisão de agentes antineoplásicos oriundos de plantas, cerca de 50 sesquiterpeno lactonas foram avaliadas em relação ao potencial inibitório do crescimento de células neoplásicas em diversos modelos tumorais (Hartwell & Abbott, 1969). Estudos correlacionando estrutura e atividade biológica de diversas sesquiterpeno-lactonas evidenciaram que as lactonas, incluindo a DHC, que apresentam citotoxicidade e/ou atividade biológica, possuem três grupos moleculares funcionais (Narasimhan *et al.*, 1985): uma α -metileno- γ -lactona, uma α,β -ciclopentenona insaturada e um sistema com os grupos conjugados $O=C-C=CH_2$, sendo este último, por exemplo, um centro de alquilação

essencial (Giordano *et al.*, 1992). O grupo funcional α -metileno- γ -lactona participa de uma reação do tipo Michael com nucleófilos biológicos, devido às características químicas, podendo alquilar grupos nucleófilos em enzimas envolvidas no processo de divisão celular (Rodriguez *et al.*, 1976). Freire e colaboradores (2003) demonstraram que a DHC apresenta efeitos citotóxicos em células da leucemia mielóide humana HL60, com possível envolvimento de estresse oxidativo.

Em estudos anteriores foram avaliados os efeitos toxicológicos da DHC *in vitro* e *in vivo*. A observação de citotoxicidade dependente da atividade do citocromo P450 em cultura de hepatócitos sugeriu que a biotransformação hepática produz compostos mais tóxicos. Adicionalmente, verificou-se em experimentos de toxicidade sub-crônica alterações hepáticas em ratos após o tratamento com a DHC. Dentre estas se incluem o aumento significativo no peso do fígado, alterações histopatológicas como tumefação turva, degeneração microvascular, alterações nucleares e aumento da atividade da enzima gama-glutamil transpeptidase. Em contrapartida, a avaliação dos efeitos tóxicos da DHC em fibroblastos da linhagem V79 demonstrou uma citotoxicidade do tipo basal (inespecífica). Portanto, apesar da atividade anti-ulcerogênica comprovada, os resultados acima sugerem que o uso da DHC por períodos prolongados pode induzir a lesões hepáticas, representando um efeito tóxico seletivo (Rodriguez & Haun, 1999; Melo *et al.*, 2000).

I.2. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

Os sistemas de liberação controlada podem ser definidos como modificações farmacotécnicas que permitem alterar as propriedades cinéticas ou dinâmicas de um fármaco (Chellat *et al.*, 2005; Brigger *et al.*, 2001). O controle da liberação de fármacos em sítios específicos, através da utilização de vetores capazes de permitirem a otimização da atividade terapêutica do fármaco tem sido uma área de intensa pesquisa na última década. Dentre os vetores, incluem-se as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas) (Schaffazick *et al.*, 2003).

Buscando a otimização da resposta farmacológica, vários estudos vêm sendo realizados no intuito de controlar esta propriedade dos fármacos. Este controle da ação farmacológica pode ser alcançado de duas maneiras, em geral: através de modificações químicas do fármaco ou pela formulação de uma forma farmacêutica capaz de controlar sua liberação (Jain *et al.*, 1998).

I.2.1. SISTEMAS POLIMÉRICOS – PARTÍCULAS DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO-CO-GLICÓLICO (PLGA)

A utilização de carreadores poliméricos capazes de favorecer uma ação mais seletiva e controlada das taxas de liberação de fármacos é uma das alternativas para a obtenção de um sistema de liberação controlada (Langer, 1998). As nanopartículas constituídas por polímeros biodegradáveis têm atraído maior atenção dos pesquisadores, em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas e à maior estabilidade nos fluidos biológicos como também durante o armazenamento (Whittlesey & Shea, 2004;

Soppimath *et al.*, 2001). As vantagens desses sistemas são: (1) manutenção do nível terapêutico do fármaco no sangue; (2) diminuição de reações adversas; (3) diminuição da quantidade de fármaco necessária para o tratamento; (4) melhora do esquema posológico através da diminuição do número de doses, levando a uma maior aceitação e colaboração do paciente e (5) facilitação da administração de fármacos com baixa meia-vida plasmática (Langer, 1998).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam um diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (**Figura 2**). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso no qual o fármaco pode estar dissolvido ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam núcleo oleoso em sua

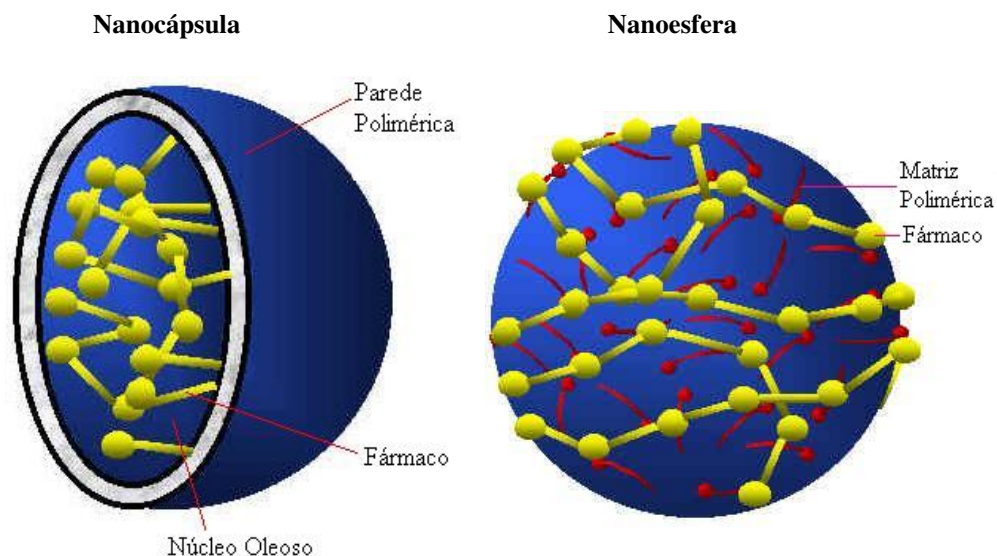


Figura 2. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso de nanocápsula; b) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente em matriz polimérica de nanoesfera.

composição, são formadas por uma matriz polimérica onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (Zhang & Feng, 2005; Puisieux *et al.*, 1994).

Estes sistemas têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo planejados, principalmente, para administração parenteral, oral ou oftálmica. Uma das áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas é a vetorização de fármacos anticancerígenos e de antibióticos (Brigger *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2000), principalmente através de administração parenteral, almejando uma distribuição mais seletiva dos mesmos e assim, um aumento do índice terapêutico (Schaffazick *et al.*, 2003) – índice ou número que reflete a segurança relativa de um medicamento; geralmente calculado a partir da Curva Dose/Resposta obtida em animais de experimentação, se referindo a relação DL_{50}/DE_{50} , ou seja, a razão entre a dose requerida para produzir efeito letal em 50% da população e a dose que produz o efeito farmacológico desejado em 50% da população estudada.

Vários são os métodos descritos na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, a grande maioria baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilatos de alquila) (Lambert *et al.*, 2000) ou na precipitação de pré-polímeros, tais como ácido poli-láctico (PLA), ácido poli-láctico-co-ácido glicólico (PLGA), poli- ϵ -caprolactona (PCL) e, ainda, os copolímeros de ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico (Santos-Magalhães *et al.*, 2000).

Diversos estudos demonstram que polímeros biodegradáveis são veículos apropriados para a incorporação de agentes quimioterápicos, liberando estes últimos diretamente ao sítio alvo. Muitos carreadores particulados foram desenvolvidos para sistemas de liberação controlada em fluidos corpóreos, como por exemplo, sangue e linfa

(Chandy *et al.*, 2000). Uma grande variedade de polímeros biodegradáveis sintéticos ou naturais vem sendo estudada para o direcionamento específico de fármacos nos seus sítios de ação (vetorização) ou para a liberação controlada dos mesmos, entretanto poucos preenchem os pré-requisitos de biocompatibilidade. Os naturais, à base de proteínas, como as albuminas bovina e humana, de colágeno e de gelatina, apresentam uso restrito por conterem pureza questionável e, em alguns casos, atividade antigênica marcante. O uso de polímeros biodegradáveis sintéticos representados pelas poliamidas, poliaminoácidos, polialquilcianacrilatos, poliésteres, poliortoésteres, poliuretanos e poliacrilamidas, têm apresentado crescente interesse para a aplicação em sistemas de liberação de drogas por não apresentarem a maioria dos problemas associados aos polímeros naturais. Os polímeros biodegradáveis atualmente mais utilizados são os poliésteres, tais como policaprolactona (PCL), ácido poli-láctico (PLA) e copolímeros derivados do ácido láctico e glicólico (PLGA), sendo que os dois últimos são os mais empregados (Gomes & Reis, 2004; Jain *et al.*, 1998).

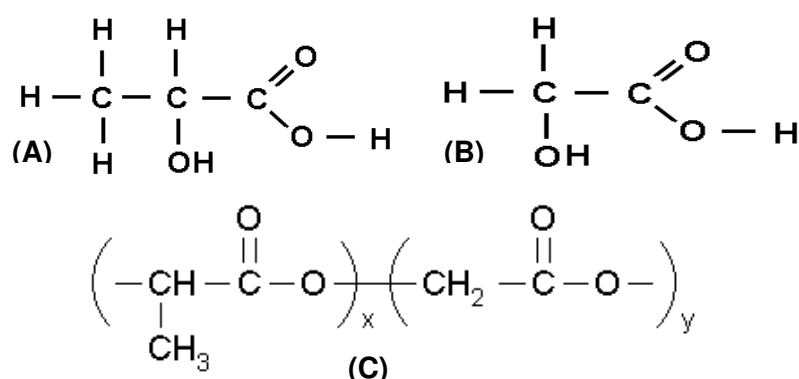


Figura 3. Estrutura molecular do ácido láctico (A), ácido glicólico (B) e PLGA (c).

Os polímeros de ácido glicólico e ácido láctico (**Figura 3**) são muito vantajosos devido as suas propriedades mecânica, baixa imunogenicidade e toxicidade, ótima

biocompatibilidade e uma cinética de biodegradação que leva a uma adequada liberação controlada do fármaco veiculado (Pistner *et al.*, 1993). Inúmeros sistemas de liberação controlada utilizando PLA, PGA e PLGA, tais como, micro/nanoesferas, micro/nanocápsulas, pellets, implantes e filmes, são preparados utilizando-se esses polímeros (Chandy *et al.*, 2000). Esses sistemas já são usados desde os anos 70 na preparação de fios cirúrgicos para suturas por que são reabsorvidos pelo organismo e estão aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso em humanos.

Nestes polímeros é possível modificar a superfície para, por exemplo, permitir o direcionamento de fármacos ao órgão alvo, proporcionar aumento da especificidade de agentes anti-tumorais e da eficácia terapêutica. Como exemplo, tem-se o paclitaxel (Taxol[®]), uma droga antineoplásica eficiente contra vários tipos de câncer, especialmente contra tumores ovarianos e de mama, altamente hidrofóbica. Devido a esta alta hidrofobicidade é necessária a utilização de um adjuvante na administração clínica, embora acarretando sérios efeitos colaterais como as reações de hipersensibilidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade (Sharma *et al.*, 1996). Feng & Huang (2001) estudaram diversas preparações do Taxol[®] em nanoesferas de PLGA, possibilitando a administração subcutânea e intramuscular, minimizando os efeitos colaterais sistêmicos e aumentando a eficácia terapêutica (Singla *et al.*, 2002).

Os polímeros e copolímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico são sintetizados por uma reação de condensação, através da abertura do anel dos dímeros cíclicos (ácido láctico e/ou ácido glicólico). A polimerização geralmente ocorre durante um período de duas a seis horas, sob temperatura de aproximadamente 175° C, utilizando como catalisador

o cloreto estanhoso. Durante o processo pode ser adicionado álcool laurílico para controlar a massa molecular do polímero (Fialho *et al.*, 2003).

O ácido láctico possui um carbono quiral beta assimétrico que permite a obtenção de polímeros do mesmo na forma levógira (L-PLA), dextrógira (D-PLA) e racêmica (D,L-PLA), sendo que as formas levógira e dextrógira são semicristalinas graças à elevada regularidade da cadeia polimérica, e a forma racêmica é amorfa por apresentar irregularidade na estrutura da cadeia do polímero (Merkli *et al.*, 1998). Logo, prefere-se a utilização de D,L-PLA já que esta forma permite uma dispersão mais homogênea da droga na matriz polimérica.

O mecanismo de biodegradação desses polímeros não está bem estabelecido na literatura, devendo ocorrer, possivelmente, por erosão, por clivagem da cadeia polimérica (hidrólise), liberando os ácidos láctico e glicólico, não implicando em qualquer atividade enzimática (Jain, 2000). Os ácidos láctico e glicólico, por serem metabólitos naturais do organismo, são oxidados no ciclo de Krebs a CO_2 e H_2O (Athanasίου *et al.*, 1996). O papel de atuação das enzimas na biodegradação do PLGA, PGA e PLA ainda não se encontram bem definido, embora dados da literatura afirmem que o processo de degradação não implica em qualquer atividade enzimática, sendo a hidrólise o único mecanismo envolvido.

A presença do grupo metila (CH_3) no PLA confere a este uma maior hidrofobicidade quando comparado ao polímero do ácido glicólico (PGA). Em razão da interferência estérica do grupamento metila, a ligação éster do PLA é menos susceptível à hidrólise, fazendo com que o tempo de degradação do PLA seja maior com relação ao PGA e PLGA (Wong & Mooney, 1997). Além disso, a massa molecular e o grau de cristalinidade podem influenciar as propriedades mecânicas, a capacidade de hidrólise e a velocidade de degradação desses polímeros (Blanco-Prieto *et al.*, 1998).

Os principais fatores responsáveis por alterações no período de degradação dos polímeros biodegradáveis são: estrutura química e composição do sistema; distribuição da massa molecular dos polímeros; presença de monômeros e oligômeros; tamanho e forma da superfície do sistema; morfologia dos componentes do sistema (amorfo, semicristalino, cristalino) e mecanismo de hidrólise. A temperatura de transição vítrea (Tg) dos polímeros PLGA, PLA e PGA é um importante fator que interfere na velocidade de degradação dos mesmos (Jain *et al.*, 1998). A Tg é uma propriedade dos materiais, trata-se da temperatura de passagem do estado vítreo para um estado “maleável”, sem ocorrência de uma mudança estrutural, isto é, uma transição termodinâmica de segunda ordem que afeta variáveis termodinâmicas secundárias. Algumas propriedades mudam com a Tg e, portanto, podem ser utilizadas para a sua determinação (Junior, 2004). Diferenças de temperatura de Tg estão relacionadas ao grau de cristalinidade e organização das cadeias poliméricas, sendo assim o polímero com maior Tg tem menor velocidade de hidrólise dos monômeros, ou seja, o polímero tem uma biodegradação mais lenta (**Tabela 1**).

Tabela 1. Propriedades dos polímeros e copolímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico*

Polímero ou copolímero	Transição vítrea (Tg)	Cristalinidade	Tempo de degradação aproximado (meses) [♦]
L-PLA	60-67°C	Cristalino	18-24
D,L-PLA	57-59°C	Amorfo	12-16
PGA	35-40°C	Cristalino	2-4
♦♦PLGA 50:50	40-55°C	Amorfo	2
♦♦PLGA 85:15	50-55°C	Amorfo	5
* Adaptada de Lewis (1990).			
♦ O tempo de degradação, <i>in vitro</i> , varia de acordo com a área superficial, porosidade e massa molecular do sistema;			
♦♦ Os números se referem, respectivamente, à proporção dos monômeros do ácido láctico e glicólico no co-polímero.			

A parte amorfa do material (parte onde as cadeias moleculares estão desordenadas) é a responsável pela caracterização da Tg. Abaixo da Tg, o material não tem energia interna suficiente para permitir deslocamento de uma cadeia com relação à outra por mudanças

conformacionais. Portanto, quanto mais cristalino for o material, menor será a representatividade da Tg (Junior, 2004). A temperatura de transição vítrea dos diferentes PLA e PLGA se encontra acima da fisiológica (37°C) e, nessa condição, eles se encontram na forma cristalina. Desse modo, a cadeia se apresenta como uma estrutura relativamente rígida, proporcionando uma força mecânica significativa e permitindo que sejam formulados como sistemas de liberação de drogas (Jain *et al.*, 1998). Essa característica é também um fator determinante na velocidade de degradação dos polímeros já que está relacionada ao grau de cristalinidade e à organização das cadeias poliméricas. O PGA é bastante sensível à hidrólise e possui baixa temperatura de transição vítrea, esses fatores fazem com que sua biodegradação seja rápida, tornando-o, portanto, inadequado como material de confecção de sistemas de liberação de drogas de longa duração. É conveniente, portanto, à associação dos dois polímeros – PLA e PGA – para formar o PLGA, já que a presença do PLA aumenta a hidrofobicidade, diminuindo a capacidade de absorção de água, conseqüentemente diminuindo a velocidade de degradação.

1.2.2. CICLODEXTRINAS

A primeira proposta de sistemas de liberação de fármacos consistia na liberação de uma determinada quantidade do mesmo no sítio alvo durante um período de tempo necessário e de forma eficiente e precisa. Assim sendo, a utilização de materiais carreadores que superem as propriedades indesejáveis dos fármacos tornaram-se os mais adequados para a formulação desses sistemas (Hirayama & Uekama, 1999; Szenté & Szejtli, 1999).

Ciclodextrinas (CDs) são grupos de oligossacarídeos obtidos a partir da degradação enzimática do amido e são conhecidas por modificarem as propriedades farmacológicas de vários fármacos através da formação de complexos de inclusão (Ren *et al.*, 2002; Durán *et al.*, 2003). Devido a esta habilidade, as ciclodextrinas tornaram-se candidatas potenciais como sistema de liberação de fármacos (Ren *et al.*, 2002).

As α -, β -, e γ -ciclodextrinas (**Figura 4**) são amplamente utilizadas e consistem de seis, sete e oito resíduos de D-glicose, respectivamente, unidas por ligações α -1,4 glicosídicas em um macrociclo.

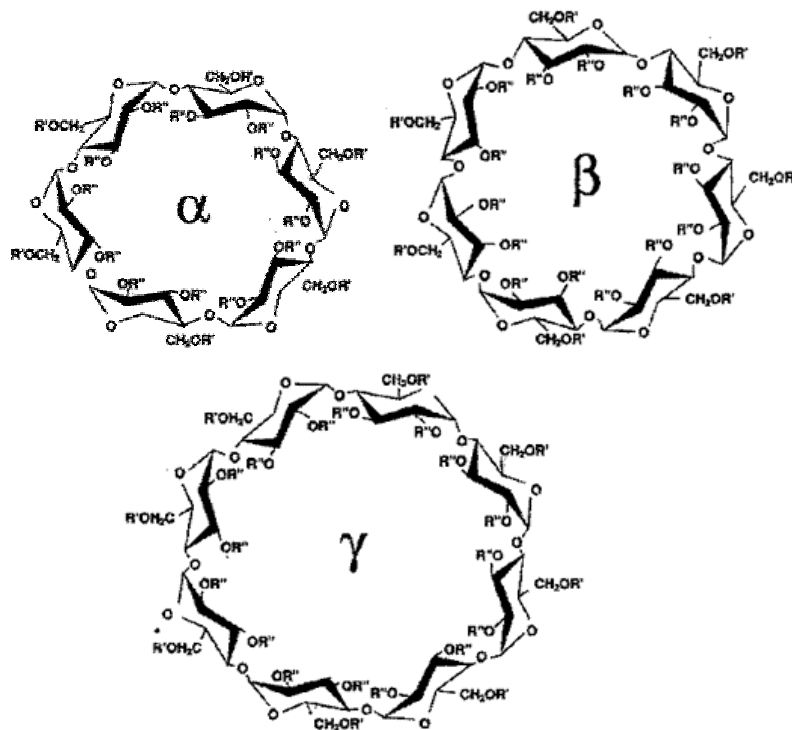


Figura 4. Estrutura molecular das ciclodextrinas naturais.

A primeira referência sobre Ciclodextrinas foi publicada por Villiers (1891) quando ao estudar a digestão do amido com *Bacillus amylobacter* isolou 3 gramas de uma substância cristalina, de composição $(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3H_2O$, a qual nomeou de “celulosine”

devido à semelhança com a celulose. Nos anos posteriores diversos grupos trabalharam na caracterização física e química das CDs. O primeiro grupo foi do pesquisador Schardinger (1904) no início do século 20. Na década de 50, Cramer (1954) direcionou os estudos para as propriedades dos complexos de inclusão formados com as CDs.

As CDs são moléculas cristalinas homogêneas, não higroscópicas (Brito *et al.*, 1999). Topologicamente são descritas como um cone truncado (Thompson, 1997). Suas estruturas foram estabelecidas por estudos de difração de raios-X, através dos quais foi determinado que estas moléculas possuem grupos hidroxilas primários na parte mais estreita do cone e grupos hidroxilas secundários na parte mais larga do cone. As hidroxilas das extremidades tornam as ciclodextrinas solúveis em água, enquanto o interior da cavidade apresenta caráter hidrofóbico devido ao alinhamento dos hidrogênios C(3)-H e C(5)-H e pela ligação éter entre carbono e oxigênio (Linder & Saenger, 1982).

CDs em solução aquosa podem formar complexos de inclusão específicos com uma ampla variedade de moléculas, limitados apenas por restrições estereoquímicas da cavidade interna rígida e do comportamento da molécula hóspede (Loftsson *et al.*, 2004). A cavidade das CDs proporciona uma matriz hidrofóbica em um ambiente hidrofílico, proporcionando às moléculas inseridas algumas mudanças nas suas propriedades físico-químicas, tais como, alteração na velocidade das reações (agindo a CD como uma “enzima artificial”) e das propriedades espectroscópicas (com modificação das intensidades de absorbância, emissão e/ou deslocamento de bandas) (Fatin-Rouge & Bünzli, 1999).

As principais vantagens das CDs naturais, como carreadoras de fármacos, são: (1) estrutura química bem definida, proporcionando muitos sítios potenciais para modificação química ou conjugação; (2) disponibilidade de diferentes tamanhos de cavidades dependendo da ciclodextrina; (3) baixa toxicidade e atividade farmacológica; (4) certa

solubilidade em água; (5) proteção às drogas incluídas/conjugadas à biodegradação (Thompson, 1997). As dimensões das cavidades das CDs variam conforme o número de moléculas de D-glicose que as formam (**Tabela 2**) (Ferreira *et al.*, 1999; Uekama, 2004).

β -Ciclodextrina (β -CD), a mais comum ciclodextrina natural, tem 21 grupos hidroxilas, sendo 7 primários e 14 secundários. Uma visualização topológica dessa molécula (**Figura 5**) a apresenta como um cone truncado, no qual o aro estreito ($\sim 6,4\text{\AA}$) comporta o grupo primário de hidroxilas, enquanto o aro longo ($\sim 15,4\text{\AA}$) comporta grupos hidroxilas secundários.

Tabela 2. Propriedades das ciclodextrinas naturais.

CDs	Massa (g/mol)	d_1^* ($\text{\AA}$)	d_2^* ($\text{\AA}$)	d_3^* ($\text{\AA}$)	h^* ($\text{\AA}$)	Volume da cavidade ($\text{\AA}^3$)
α -CD	972	5,3	4,2	8,8	7,9	$\cong 174$
β -CD	1135	6,4	5,6	10,8	7,9	$\cong 262$
γ -CD	1297	8,3	6,8	12	7,9	$\cong 427$

* d_1 , d_2 , d_3 e h estão representados abaixo.

Adaptado de Ferreira *et al* (1999) e Uekama (2004)

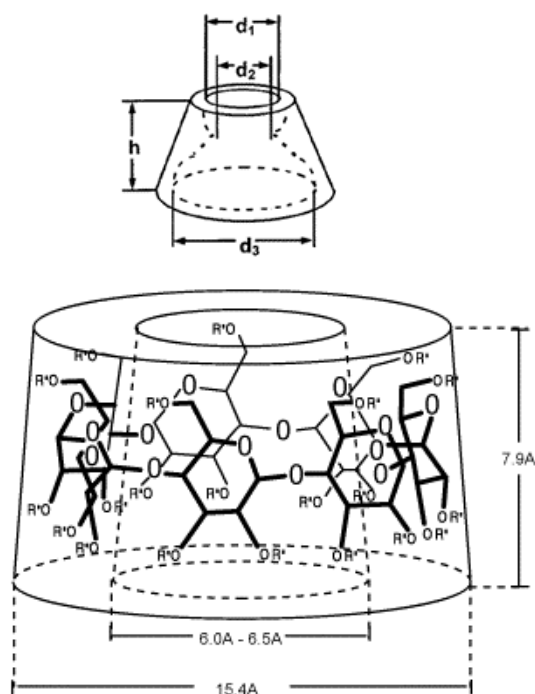


Figura 5. Visão topológica de β -ciclodextrina.

Visto que não há presença de grupo hidroxila axial na cavidade toroidal da β -CD, a cavidade tem um caráter hidrofóbico pronunciado (Loftsson *et al.*, 2004), enquanto que a superfície externa é hidrofílica, permitindo a esta ciclodextrina atuar como hospedeira para uma ampla variedade de drogas lipofílicas (Zhao *et al.*, 2002).

A β -CD possui baixa toxicidade, sendo prejudicial somente quando aplicada em altas doses, devido a sua degradação e fermentação por bactérias do cólon, podendo produzir excesso de gases juntamente a quadros de diarreia. A LD₅₀ oral e intravenosa em ratos é >5g/kg (>4,41mmol/kg) e 450-750 mg/kg (0,4-0,66 mmol/kg), respectivamente (Del Valle, 2004). Apesar das vantagens, o uso prático das ciclodextrinas naturais como carreadores de fármacos é restrito pela baixa solubilidade aquosa das mesmas, particularmente da β -CD (1,85g/100mL). Para solucionar os problemas de solubilidade da β -CD, os grupamentos hidroxilas podem ser metilados ou hidroxialquilados (Uekama, 2004).

A introdução de um grupamento metila na β -CD melhora em muito a solubilidade aquosa desse derivado – denominado Metil- β -Ciclodextrina (Me- β -CD) – quando comparado a β -CD natural. A solubilidade aquosa aumenta na medida em que o número de grupos metila se aproxima de 13-14 e posteriormente decresce na medida em que a metilação aproxima-se de 21 grupos metila por β -CD (Szente & Szejtli, 1999). O derivado hidroxipropilado de β -CD (HP- β -CD) é o mais estudado dos derivados hidroxialquilados de β -CD; de grande solubilidade aquosa (50g/100mL), é objeto de numerosas experimentações clínicas em humanos, além de um grande número de experimentos tecnológicos na área toxicológica e farmacêutica, sendo que uma formulação utilizando esse carreador (SporanoxTM, Janssen-Cilag, Ltd.) já está aprovada pela FDA há anos

(Szente & Szejtli, 1999). Estes derivados hidrofílicos de β -CD podem modificar a taxa de liberação de drogas pouco hidrofílicas, bem como, aumentar a absorção de drogas através de barreiras biológicas (Uekama, 2004).

I.3. CITOTOXICIDADE

Toxicidade é um evento complexo que apresenta um amplo espectro de efeitos, desde simples morte celular até aberrações metabólicas complexas. A neuro, hepato e/ou nefrotoxicidade são exemplos de alterações funcionais e não necessariamente de morte celular. Por isso, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* devem abranger vários parâmetros que avaliem alvos diferentes (Melo *et al.*, 2000). Estudos *in vitro* fornecem importantes ferramentas para ampliar os conhecimentos sobre os efeitos citotóxicos causados por agentes químicos e para estimar estes efeitos em humanos (Eisenbrand *et al.*, 2002).

Muitas drogas apresentam inconvenientes para sua utilização em tratamentos terapêuticos, seja por possíveis instabilidades em sistemas biológicos *in vivo* ou ainda pela necessidade de alta dosagem dessa droga. Outras exibem sérios efeitos tóxicos em células normais (Honma *et al.*, 1998). Além disso, como descrito por Freshney (1994), a toxicidade é um fator limitante na liberação e consumo de fármacos e, portanto, a análise de toxicidade *versus* atividade biológica de um composto é fundamental para determinar sua aplicação, estabelecendo-se o índice terapêutico. Por motivos éticos e financeiros, em se tratando de utilização de animais para estudos toxicológicos, considera-se mais vantajoso o estudo *in vitro* de toxicidade (Melo *et al.*, 2001). A possibilidade de trabalhar com linhagens estabelecidas solucionou o problema da reprodutibilidade dos experimentos, uma vez que

se pode utilizar uma mesma população celular por um longo período de tempo. Assim, além de resolver os problemas éticos e técnicos, os ensaios em culturas de células são ainda vantajosos pela rapidez de obtenção de resultados e pela reduzida quantidade do composto teste utilizado. Assim, uma grande variedade de testes, empregando culturas celulares, foi descrita nos últimos anos (Melo *et al.*, 2000).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* permitem a determinação da citotoxicidade basal, assim como o estabelecimento de uma faixa de concentração biologicamente ativa para um determinado agente (Eisenbrand *et al.*, 2002). Citotoxicidade basal é definida pelos danos decorrentes da injúria química a uma ou mais das estruturas ou das funções celulares básicas comuns às células dos mamíferos (Barile & Cardona, 1998). Nos fenômenos associados à citotoxicidade basal todos os tipos celulares apresentam uma sensibilidade similar e os valores de IC₅₀ obtidos nos ensaios de citotoxicidade, avaliando diferentes alvos celulares, geralmente se encontram próximos (Clemenson *et al.*, 2002). Alguns testes, como por exemplo, o conteúdo de ácidos nucléicos, a exclusão do azul de tripan, a redução do sal de tetrazólio MTT [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] e a incorporação do corante Vermelho Neutro (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenazina) adquiriram considerável atenção como marcadores de citotoxicidade. Esses ensaios fornecem informações sobre diferentes funções ou compartimentos celulares (Aoyama *et al.*, 2000; Babich & Borefreund, 1990; Loveland *et al.*, 1992; Renzi *et al.*, 1993).

A quantificação de ácidos nucléicos é um ensaio para a determinação direta, proporcional, do número de células (Aoyama *et al.*, 2000). A exclusão do corante azul de tripan, juntamente com observações morfológicas, permite avaliar a integridade estrutural da membrana plasmática celular. Este ensaio mede a capacidade das células viáveis, com

membrana plasmática intacta, em excluir o corante, permitindo a quantificação do número de células vivas após tratamento (Loveland *et al.*, 1992; Renzi *et al.*, 1993).

A redução do MTT revela o correto funcionamento do sistema enzimático mitocondrial, principalmente a atividade de desidrogenases. O MTT é um corante amarelo que é reduzido a um composto azul chamado formazan (insolúvel em água) por células que mantêm a integridade mitocondrial. A quantidade de formazan pode ser determinada espectroscopicamente após solubilização em etanol absoluto (Denizot & Lang, 1986).

O ensaio de incorporação do corante Vermelho Neutro é utilizado para estudos de citotoxicidade de vários compostos (Babich & Borefreund, 1991). O ensaio é baseado na capacidade de células viáveis incorporarem e ligarem o Vermelho Neutro, um corante vital, ligeiramente catiônico, que penetra na membrana celular por difusão passiva não-iônica e concentra-se nos lisossomos, nos quais se fixa através de ligações eletrostáticas a grupos aniônicos, inclusive fosfatos hidrofóbicos da matriz lisossomal (Repetto & Sanz, 1993).

I.4. CÉLULAS V79

Das várias linhagens celulares disponíveis existe a linhagem V79, oriunda de fibroblasto de pulmão de Hamster Chinês (*Cricetulus griseus*), um tipo celular muito utilizado em ensaios de citotoxicidade e mutagenicidade (Clemenson *et al.*, 1996). Originalmente usada na descoberta dos danos induzidos por raios-X em cultura de células de mamíferos (Elkind & Sutton, 1959), estas células possuem algumas características que justificam o seu uso nos ensaios de citotoxicidade, como por exemplo, a alta velocidade de proliferação, eficiência de clonagem, estabilidade do cariótipo e manutenção das características iniciais após criopreservação (Rodriguez & Haun, 1999). Em decorrência

dessas propriedades as células V79 têm sido utilizadas para a avaliação da toxicidade de novas formulações cosméticas, matérias primas, pesticidas e fármacos em geral. Os resultados obtidos através desta linhagem celular asseguram uma toxicidade do composto sem metabolização pela via do sistema citocromo P450.

I.5. HEPATÓCITOS E BIOTRANSFORMAÇÃO

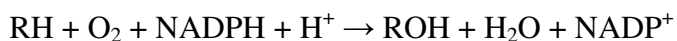
A grande capacidade de biotransformação do fígado permite uma eficiente eliminação de compostos tóxicos, mas também faz do fígado o principal órgão lesado devido à toxicidade dos mesmos (Melo *et al.*, 2002; Rodrigues & Haun, 1999). Muitos sistemas experimentais *in vitro* que utilizam preparações de fígado foram e continuam sendo desenvolvidas, sendo que atualmente os hepatócitos podem ser isolados de diversas espécies de animais. Este sistema *in vitro* possibilita a realização de estudos de toxicidade, biotransformação, farmacocinética, mecanismo de ação toxicológica e farmacológica de substâncias químicas, entre outros (Blaauboer *et al.*, 1994; Pailard *et al.*, 1999).

Todos os organismos vivos estão expostos a várias substâncias endógenas e exógenas. A eliminação dessas substâncias, nocivas ou não, é comumente realizada pela via renal, na forma de metabólitos hidrossolúveis, processo esse denominado biotransformação (Parkinson, 1998). As reações de biotransformação de xenobióticos são divididas em reações de FASE I e II. Reações de FASE I envolvem hidrólise, redução e oxidação. Essas reações introduzem um grupo funcional (-OH, -NH₂, -SH ou -COOH) que usualmente convertem a droga lipofílica em um metabólito intermediário mais polar e hidrofílico que pode ser ativo e potencialmente hepatotóxico. As reações de FASE II envolvem glicuronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com glutatona e ou

aminoácidos. Essas reações resultam em um aumento da hidrofiliabilidade promovendo a excreção das substâncias químicas exógenas. As reações de FASE II podem ou não ser precedidas das de FASE I (Parkinson, 1998). Diversas famílias enzimáticas catalisam as reações de biotransformação, tais como, UDPGTs (UDP-glicuroniltransferases) e enzimas da família do citocromo P450 (CP450).

As famílias de enzimas do CP450 são as principais catalisadoras das reações de Fase I. Todo mamífero possui em seus microsomas hepáticos diferentes enzimas do CP450, cada uma destas, específica para uma determinada reação. O CP450 refere-se a um grupo de hemoproteínas que contêm um grupamento heme (anel de porfirina ligado a um íon férrico – Fe^{3+}). Quando reduzido ao estado ferroso – Fe^{2+} , o CP450 se liga ao O_2 ou ao monóxido de carbono (CO), sendo que o complexo CP450-CO apresenta um espectro de absorção com pico máximo em 450 nm, sendo esta propriedade a justificativa da denominação 450 (Omura & Sato, 1964). As enzimas do CP450 são responsáveis pelo processo de oxidação de diversos compostos químicos, tais como: a) substâncias endógenas; b) fármacos; c) poluentes e muitos outros xenobióticos de caráter lipofílico (Morel *et al.*, 1990). Entre os xenobióticos encontram-se mais de 250.000 substratos potenciais, podendo ser indutores e ou inibidores de alguma isoforma de CP450 (Guengerich, 1992).

O complexo CP450 é ligado à membrana, principalmente do retículo endoplasmático e da mitocôndria, sendo constituído pelo próprio CP450, NADPH-citocromo P450 redutase, NADH-citocromo b5 redutase, citocromo b5 e fosfolípidos (Bondy & Naderi, 1994). A reação básica realizada pelo CP450 é uma monooxigenação, na qual um átomo de oxigênio é incorporado em um substrato, geralmente designado de RH, e o segundo átomo de oxigênio é reduzido à água com conseqüente oxidação de um NADPH:



Um substrato RH reage com a forma oxidada do CP450 (Fe^{3+}) para formar o complexo CP450-RH. O heme é reduzido, passando do estado férrico (Fe^{3+}) para o ferroso (Fe^{2+}), através da enzima NADPH-citocromo P450 redutase (no decorrer da reação, o CP450 se liga diretamente ao substrato e ao oxigênio molecular, entretanto não interage diretamente com o NADPH/NADH; Parkinson, 1998) que transfere elétron do NADPH ao CP450. O complexo CP450-RH reduzido (Fe^{2+}) reage com o O_2 formando o complexo Fe^{2+} -OOH pela adição de um próton (H^+) e um segundo elétron. A introdução do elétron cliva o complexo Fe^{2+} -OOH produzindo H_2O e $(\text{FeO})^{3+}$, sendo que este último transfere o átomo de oxigênio para o substrato RH. Em seguida o substrato oxidado (ROH) é liberado e o CP450 é recuperado (Reen, 1993). A expressão e função das enzimas do CP450 podem ser alteradas por vários fatores, tais como: medicamentos, alimentos, fatores sociais (nicotina, álcool), poluentes ambientais, fatores patológicos (infecções, processos inflamatórios, doenças hepáticas) e fatores genéticos (Rogiers *et al.*, 1995).

Nas reações de Fase II da biotransformação (reações de conjugação), os cofatores reagem com grupos funcionais presentes em xenobióticos ou com metabólitos gerados pelas reações de Fase I, conjugando ao grupo funcional um composto polar endógeno para em seguida serem excretados (LaBella, 1991). As reações de Fase II incluem glicuronidação, sulfatação, acetilação, metilação e conjugação com glutathione e aminoácidos. A maioria das enzimas de biotransformação de Fase II são encontradas no citosol, com exceção das UGTs (UDP-glicuroniltransferases) que são enzimas microsossomais (Parkinson, 1998).

Durante as reações de biotransformação o sistema CP450 pode produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem inativá-lo, sendo considerados iniciadores de processos de lipoperoxidação (Gutteridge *et al.*, 1979). Quando há um desequilíbrio entre espécies oxidantes produzidas e sistema de defesa antioxidante do organismo, ocorre o stress oxidativo. Entre os danos oxidativos causados nas células, a peroxidação de lipídeos é a mais bem conhecida. Todas as células aeróbias geram EROs como: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet OH$) (Farber *et al.*, 1990).

O metabolismo de diversos xenobióticos também pode gerar EROs (Yu, 1994). Substâncias que neutralizam os efeitos deletérios dos radicais livres são integrantes do sistema de defesa antioxidante. Entre esses se destaca a glutathiona reduzida (GSH). A glutathiona é um tripeptídeo formado por resíduos de glutamato, cisteína e glicina (γ -glutamilcisteínilglicina) presente em todas as células de mamíferos, em especial em grandes quantidades nos hepatócitos (Kosower & Kosower, 1978).

A peroxidação lipídica é uma deterioração oxidativa de lipídeos poliinsaturados por meio da reação com radicais livres como o radical hidroxila ($\bullet OH$). Esses radicais reagem com ácidos graxos poliinsaturados e formam radical lipídico ($L^{\bullet}$) que posteriormente na presença de oxigênio (O_2) forma o radical peroxil lipídico ($LOO^{\bullet}$). Esse radical peroxil lipídico é reativo e oxida outra molécula de ácido graxo convertendo-se em hidroperóxido lipídico ($LOOH$) que é instável, fragmentando-se em produtos de baixo peso molecular. Durante o processo peroxidativo ocorre a formação de compostos intermediários reativos que podem interagir com outros ácidos graxos poliinsaturados e propagar o processo. Dessa forma, o radical hidroxila desencadeia um processo de autocatálise dos ácidos graxos (Rosser & Gores, 1995). Entre as diversas substâncias geradas no processo de peroxidação

lipídica, tem-se o malonaldeído (MDA). A formação de MDA pode ser quantificada através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) produzindo um cromóforo quantificável que é um marcador de peroxidação lipídica (Plaa *et al.*, 1976). Assim, a formação e quantificação deste cromóforo (marcador) são utilizadas para a detecção do processo de peroxidação lipídica *in vitro* (Guillouzo, 1998).

A GSH está envolvida em diversas funções, tais como: proteção das células contra danos causados por eletrólitos reativos, radicais livres e intermediários reativos de O_2 (Morton *et al.*, 1985). A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 . O H_2O_2 gerado pode ser convertido enzimaticamente a água pela glutathione peroxidase (GPx) e ou pela catalase (Yu, 1994). Nesse processo a GSH é oxidada a GSSG, sendo que esse último pode ser reduzido enzimaticamente a GSH via GSH redutase, usando NADPH como cofator, mantendo assim a concentração de GSH intracelular (Rosser & Gores, 1995). A glutathione interage com os radicais ($O_2^{\bullet-}$) e ($\bullet OH$) produzidos durante o estresse oxidativo (Witerbourn & Metodiewa, 1994). Essas reações protegem as células neutralizando essas moléculas reativas, em especial o radical hidroxila ($\bullet OH$) que é considerado o mais danoso (Yu, 1994). A GSH também participa dos processos de detoxificação de vários fármacos e xenobióticos através de reações catalisadas pela enzima glutathione-S-transferase (Morton *et al.*, 1985).

II. OBJETIVOS

O enfoque geral deste trabalho foi investigar de forma comparativa a citotoxicidade da desidrocrotonina (DHC) livre com suas formas veiculadas em sistemas carreadores de fármacos (copolímero do ácido láctico e glicólico (PLGA), β -CD, HP- β -CD e Me- β -CD) utilizando células sem capacidade de metabolização através do sistema P450 (células V79) e em células com capacidade de biotransformação (cultura primária de hepatócitos).

Dos objetivos específicos deste trabalho destacamos:

- Confecção de nanoesferas de PLGA incorporando a DHC e de complexos de inclusão de DHC com β -CDs;
- Caracterização das nanoesferas e dos complexos de inclusão;
- Avaliação – em cultura de células V79 e hepatócitos – da citotoxicidade da DHC veiculada comparativamente à forma livre utilizando biomarcadores específicos de análise da viabilidade celular (redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos);
- Estudo dos efeitos da DHC veiculada paralelamente com a forma livre em cultura primária de hepatócitos em experimentos *in vitro* através da avaliação da atividade do sistema de metabolização de drogas (citocromos P4501A1 e P4502B1), determinação e quantificação da glutatona na forma reduzida (GSH) e peroxidação de lipídios.

III. METODOS/EXPERIMENTAL

III.1. NANOESFERAS DE PLGA CONTENDO DESIDROCROTONINA

A desidrocrotonina foi obtida de cascas do caule de *Croton cajucara* como previamente descrito por Souza Brito e colaboradores (1998). A pureza da DHC foi de 99% medida através das técnicas de NMR (ressonância magnética nuclear), UV (ultravioleta), IR (infravermelho) e MS (espectroscopia de massa) (Souza-Brito *et al.*, 1998). Ácido poli-D,L-láctico-co-glicólico (PLGA) (50:50 ácido láctico:ácido glicólico, 45.000-75.000 Da de massa molecular), polivinil álcool (PVA) (30.000-70.000 Da de massa molecular), Pluronic F68 (8.400 Da de massa molecular) foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Para a confecção das nanoesferas de PLGA, utilizou-se a técnica de evaporação do solvente associada ao método de difusão da emulsificação espontânea (Ferdous *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 1999), com algumas modificações.

Inicialmente, para confeccionar as nanoesferas vazias, 200 mg de PLGA foram dissolvidos em 25 mL de acetona; para a confecção das nanoesferas contendo DHC, 200 mg de PLGA foram dissolvidos em 25 mL de acetona seguido pela adição de 40 mg de DHC. Cinquenta miligramas dos tensoativos polivinil álcool e Pluronic F68 foram dissolvidos em 60 mL de água destilada estéril. As soluções poliméricas (fase apolar) – PLGA e PLGA com DHC – foram adicionadas por gotejamento à fase aquosa sob agitação em um agitador mecânico (1700 rpm) durante 4 h, em condições assépticas. Posteriormente, a emulsão foi simultaneamente agitada (500 rpm) em agitador magnético e sonicada em banho, utilizando um sonicador ultrassônico (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL, USA), a temperatura ambiente com

ciclos de 50% durante 1 h. O solvente orgânico foi evaporado através de agitação (± 50 rpm) utilizando um agitador magnético por 16 h em fluxo laminar. Finalmente, as nanopartículas foram lavadas com água destilada estéril, centrifugadas a 5000 rpm (3024 g) por 2 h (Beckman J2-21 Centrifuge, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA). Este processo foi repetido três vezes até não ser detectável (espectrofotometria UV-Vis) DHC nas lavagens. As nanoesferas concentradas foram ressuspensas em água destilada, rapidamente congeladas em nitrogênio N₂ (-196°C) e liofilizadas através do sistema FreeZone[®] 4.5 Liter Benchtop Freeze Dry System (Labconco Co., Kansas, MO, EUA) com condensador a temperatura de -49°C e pressão de $8,4 \times 10^{-2}$ mBar por 24 horas.

Durante a padronização do método descrito acima, outras combinações de tensoativos – PVA (127.000 Da) e PVA (127.000 Da) com Pluronic F68 – foram usados para confeccionar as nanoesferas.

III.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOESFERAS DE PLGA

III.2.1. TAMANHO DAS NANOESFERAS

O tamanho médio das nanoesferas e a distribuição do tamanho das mesmas foram medidos através da técnica de espalhamento de luz laser utilizando um analisador de tamanho de partículas (Autosizer 4700, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido) a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25°C. Antes das análises, as nanopartículas liofilizadas foram suspensas em água destilada. A distribuição

do tamanho foi dada pelo índice de polidispersidade. Cada valor representa a média de três medidas (Prior *et al.*, 2002).

III.2.2. MORFOLOGIA DA SUPERFÍCIE DAS NANOESFERAS

A morfologia da superfície das nanoesferas foi analisada obtendo imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Uma amostra liofilizada de nanopartículas foi colocada em fita dupla-face sobre “stubs” de alumínio formando uma camada uniforme de partículas. A amostra foi recoberta com ouro usando um evaporador de metais nobres SCD 050 Sputter Coater Balzers (Bal-Tec AG, Technotrade International, Inc., Manchester, NH, EUA) utilizando uma corrente de deposição de 40 mA, sob atmosfera rarefeita de argônio com pressão de 0,2 mBar por 100 s e espessura de 260 Å. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-5800 LV (JEOL USA, Inc., Peabody, MA, EUA) a 10 kV de voltagem de aceleração (Prior *et al.*, 2002).

III.2.3. POTENCIAL ZETA

A carga de superfície das nanoesferas foi avaliada através da técnica de determinação do potencial zeta (ζ) utilizando um analisador de potencial zeta (Zeta Master, Malvern Instruments Ltd.). As medidas foram realizadas em água milliQ, pH 7,4 a 25°C. Cada valor representa a média de quinze leituras obtidas (Miglietta *et al.*, 2000).

III.2.4. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A eficiência de encapsulação foi estimada segundo Kim e colaboradores (2000), com algumas modificações. Cinco miligramas de nanoesferas contendo DHC foram dissolvidas em 3 mL de metanol puro. A quantidade de DHC adsorvida na matriz polimérica foi determinada utilizando como controle uma solução metanólica de DHC (1mg/mL), medindo absorbâncias em uma faixa de 200 a 800nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (UV-visible DU[®] 640B Spectrophotometer, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, EUA). A eficiência de encapsulação foi calculada baseada na porcentagem de DHC adsorvida na formulação de nanoesferas comparada à quantidade inicial utilizada na preparação.

III.2.5. CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DA DHC *IN VITRO*

Para determinar o tempo de liberação da DHC, foram realizadas medidas nos tempos 0, 6, 12, 24, 36 e 48 horas. Foram preparadas soluções (250 μ M relativo à DHC) das partículas de PLGA contendo DHC e de uma mistura física de DHC e partículas de PLGA vazias em meio de cultura DMEM contendo 0,2 % de dimetil sulfóxido (DMSO). A quantidade de DHC liberada das nanoesferas no meio de cultura foi determinada medindo-se absorbâncias na faixa de 200 a 800 nm, tendo utilizado uma solução 250 μ M de DHC em DMEM e a mistura física de DHC com nanoesferas de PLGA vazias como controles (Kim *et al.*, 2000).

III.3. COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE DHC COM β -CDs

DHC e β -CDs (β -CD, Me- β -CD e HP- β -CD) foram misturadas na proporção molar de 1:2 (DHC: β -CD; DHC:Me- β -CD e DHC:HP- β -CD) em uma solução 1:1 orgânico-aquosa de etanol-água, sendo estas misturas agitadas por 5 horas. Após o tempo de agitação, para obter os complexos de inclusão sólidos, as soluções foram evaporadas sob vácuo e a temperatura de 45°C em um rota-evaporador. Após este período, os preparados foram deixados em estufa a 70°C por 3 horas ou até que o peso permanecesse constante, sendo posteriormente mantido em dessecador até serem utilizados. Misturas físicas na mesma proporção molar de 1:2 (DHC: β -CDs) foram preparadas misturando-se os compostos em um cadinho de cerâmica por 2 minutos (De Azevedo *et al.*, 2004; Corrêa *et al.*, 2005). Os complexos de inclusão e a caracterização dos mesmos foram feitos pela Dra. Mariângela B.M. de Azevedo (STQ-CIETEC, Cidade Universitária, USP, São Paulo – SP).

III.4. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM β -CDs

III.4.1. DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR PÓ

Os difratogramas provenientes da difração de raios-X por pó das amostras foram obtidos utilizando um difratômetro de raios-X Siemens D5000-XRD (Siemens Electronical Equipment, Toronto, ON, Canada), nas seguintes condições: tubo de Cu, radiação $\text{CuK}\alpha$ (1,54051 Å), filtro de Ni, voltagem de 40kV, corrente de 30mA, padrão interno de NaCl, em ângulos de 2θ variando de 4 a 60 graus, razão de contagem de 1000/s. O detector foi um

contador proporcional com detecção de voltagem de 1,7kV. A velocidade de varredura foi de 4°/min e as amostras foram preparadas em lâminas de plástico. (De Azevedo *et al.*, 2004). Os dados de XRD são representados em um gráfico de intensidade de espalhamento versus o ângulo de espalhamento (2θ) correspondente. As posições, intensidades, largura e o padrão geral dos picos fornecem informações importantes sobre os parâmetros da estrutura do material analisado, podendo ser usado para determinar a composição do mesmo.

III.4.2. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA E ANÁLISE

TERMOGRAVIMÉTRICA

As análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimétrica (TGA) da DHC, β -CDs e complexos de inclusão de DHC com β -CDs foram obtidas utilizando o sistema “DSC-STAR system” (Mettler Toledo Inc., Columbus, OH, EUA). As amostras (2-5 mg) foram aquecidas em uma panela de alumínio selada, sob um fluxo de nitrogênio de 40-50 mL/min e a uma taxa de aquecimento de 10°C/min (De Azevedo *et al.*, 2004). A calorimetria diferencial de varredura é uma técnica de análise térmica usada para detectar mudanças físicas ou químicas que são acompanhadas de ganho ou perda de calor. A análise termogravimétrica permite avaliar a mudança na massa de uma amostra em função do aumento da temperatura, permitindo ainda avaliar a estabilidade térmica e a temperatura de decomposição da amostra.

III.4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A morfologia dos componentes individuais, complexo de inclusão e mistura física foi determinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram previamente secas em placas de Petri, em estufa a 35°C por 36 horas e quando retiradas da estufa resfriadas em dissecador com vácuo. As amostras para a microscopia foram montadas em “stubs” de alumínio de ¼ de polegada com uma fita revestida de carbono e então recobertas com ouro usando o equipamento Sputter Coater K-550 (Emitech Ltd., Ashford, UK), com um potencial de recobrimento de 3000W, sob corrente de deposição de 20 mA em uma atmosfera rarefeita de argônio de 0,1-0,2 mBar por 60s. As amostras foram observadas ao microscópio eletrônico de varredura LEO 440i (Leo Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK), usando voltagem de aceleração de 20 kV e distância de trabalho de 18 mm (De Azevedo *et al.*, 2004).

III.5. CULTURA DE CÉLULAS V79

As células utilizadas nos experimentos foram do tipo fibroblástico, da linhagem estabelecida em cultura V79 clone M-8, oriunda de pulmão de Hamster Chinês (*Cricetulus griseus*). Os fibroblastos foram mantidos em cultura contínua em garrafas para cultura de 25cm² (TPP, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) através de repiques periódicos até atingirem a densidade de confluência. O cultivo foi realizado em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell), 100UI/mL de penicilina, e 100µg/mL de sulfato de estreptomicina (Nutricell). A incubação foi realizada em estufa a 37°C sob atmosfera úmida e contendo 5% de CO₂ (Melo *et al.*, 2000).

Nos diferentes ensaios de citotoxicidade que avaliam a viabilidade celular, o plaqueamento foi realizado utilizando-se placas de 96 cavidades (IWAKI, Asahi Techno Glass, Co., Funabasi, Japan), plaqueando-se 3×10^4 células/mL em cada cavidade (100µL/cavidade) seguido de incubação a 37°C por 48 horas. O meio foi retirado 48 horas após o plaqueamento das células e as culturas foram expostas durante 24 horas ao meio DMEM suplementado contendo diferentes concentrações de DHC livre, DHC veiculada nas nanoesferas de PLGA, DHC complexada com β -CDs e misturas físicas de DHC com β -CDs. Após 24 horas de tratamento, as culturas foram processadas de acordo com os protocolos específicos dos testes para determinação do conteúdo de ácidos nucléicos, incorporação do vermelho neutro e redução do MTT como descritos a seguir em III.8 (pág. 34).

III.6. ANIMAIS

Os animais, ratos Wistar machos, utilizados para a obtenção dos hepatócitos, foram fornecidos pelo CEMIB/UNICAMP, mantidos, antes dos experimentos, em condições livres de patógenos, com temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $55 \pm 5\%$, ciclo claro-escuro regulado em 12 horas de luz e 12 horas de escuridão e livre acesso à ração padronizada para roedores Nuvilab Cr-1-A (Nuvital, São Paulo, Brasil) e água de torneira.

III.7. CULTURA PRIMÁRIA DE HEPATÓCITOS

Os hepatócitos foram extraídos de fígado de ratos machos Wistar (200-250 g) usando a técnica de perfusão em duas etapas (Guguen-Guillouzo & Guillouzo, 1986) com algumas modificações. Os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral 15% (1,5mL por via intraperitoneal) e posteriormente o fígado foi perfundido com tampão Hanks por 20 minutos a 25mL/min e posteriormente com o mesmo tampão contendo collagenase 0,05% e cloreto de cálcio 1mM por 20 minutos a 15mL/min. Os hepatócitos descolados por ação da collagenase foram ressuspensos em meio de DMEM suplementado com 50UI/mL de sulfato de estreptomicina, 50µg/mL de penicilina, 0,2% de albumina bovina, 0,1UI/mL de insulina bovina, 10^{-6} M de dexametasona, 1% de DMSO (dimetilsulfóxido) e 10% de soro fetal bovino. Foram plaqueadas 6×10^5 células viáveis/mL (viabilidade avaliada pelo teste de exclusão do Azul Tripán) em placas de cultura com 96 cavidades.

As células foram incubadas à 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 4 horas para que se aderissem nas placas. Após 4 horas de incubação o meio foi trocado para remoção das células que não aderiram e posteriormente foi adicionado meio DMEM, semelhante ao inicial com exceção do soro fetal bovino, contendo diferentes concentrações de DHC livre, DHC veiculada nas nanoesferas de PLGA, DHC complexada com β-CDs e misturas físicas de DHC com β-CDs, sendo as células novamente incubadas a 37°C em 5% de CO₂ até completar 24 horas de cultivo, tempo equivalente a 20 horas de tratamento. Após este período de incubação o meio foi retirado e em seguida as culturas foram processadas de acordo com os protocolos específicos para os testes de determinação do conteúdo de ácidos nucléicos, incorporação do vermelho neutro e redução do MTT descritos a seguir em III.8.

Além dos testes de citotoxicidade citados acima, na cultura de hepatócitos também foram determinados os seguintes parâmetros: quantificação da peroxidação lipídica, glutathiona reduzida (GSH) e das atividades enzimáticas dos citocromos P450, sendo que para esses ensaios os hepatócitos foram processados em placas de 24 cavidades (IWAKI) como descrito a seguir em III.9 (pág. 36).

III.8. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

REDUÇÃO DO MTT

O teste de redução do MTT foi realizado de acordo com o método de Denizot & Lang (1986). Após o período de tratamento de 24 horas para as células V79 e 20 horas para os hepatócitos o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas uma vez com PBS- Ca^{++} para posterior adição de 100 μL de meio DMEM puro contendo 1 mg/mL de MTT em cada cavidade. As placas foram incubadas por 4 horas a 37°C e em seguida o sobrenadante foi removido e 100 μL de etanol foi adicionado a cada cavidade para solubilizar o formazan produzido. As placas foram agitadas por 20 minutos em um agitador de placas e as absorbâncias das soluções foram lidas a 570nm (VersaMaxTM, Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, Co., Sunnyvale, CA, USA).

INCORPORAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

O teste de incorporação do vermelho neutro foi realizado de acordo com o método de Borenfreund & Puerner (1984). Após os tempos de tratamento de cada célula o meio de cultura foi trocado por meio DMEM puro contendo 50 µg/mL de vermelho neutro, sendo as células incubadas novamente por 4 horas a 37°C. Após incubação o meio com vermelho neutro foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS- Ca^{++} para retirada do excesso de corante não incorporado pelos lisossomos. A cada cavidade foram adicionados 100 µL de solução aquosa contendo 1% de ácido acético glacial e 50% de etanol para fixar as células e extrair o vermelho neutro incorporado nos lisossomos. As placas foram agitadas por 20 minutos em um agitador de placas e as absorbâncias das soluções foram lidas a 540nm (VersaMaxTM, Tunable Microplate Reader).

CONTEÚDO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

O número de células nas cavidades controles e tratadas foi estimado através da quantificação dos ácidos nucleicos conforme Cingi *et al.* (1991). Após os tempos de tratamento de cada célula o meio foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS- Ca^{++} e duas vezes com etanol (todas as soluções geladas), secas ao ar e lisadas com NaOH 500 mM (100 µL/cavidade, 1 hora a 37°C). A absorbância da fração NaOH a 260 nm (UV-visible DU[®] 640B Spectrophotometer, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA) foi utilizada como índice do número de células e os resultados foram expressos com porcentagem da absorbância das células não tratadas.

III.9. NÍVEIS DE GSH, PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CITOCROMOS P450 EM HEPATÓCITOS

Os hepatócitos foram plaqueados em placas de 24 cavidades (IWAKI) nas mesmas condições descritas anteriormente. Após 4 horas de incubação o meio foi retirado e os hepatócitos foram tratados por 20 horas nas condições descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Concentrações de drogas e formulações utilizadas no tratamento de hepatócitos para a determinação de GSH, peroxidação lipídica e atividade enzimática de CPs450.

Tratamento	Concentrações de tratamento (μ M)			
DHC	50	150	300	500
DHC/PLGA	50	150	300	500
DHC/ β -CD	50	150	300	500
DHC/HP- β -CD	50	150	300	500
DHC/Me- β -CD	50	150	300	500
Nanoesferas de PLGA vazias	12,4			
β -CD	1.000			
HP- β -CD	1.000			
Me- β -CD	1.000			

Após o tempo de tratamento (20 horas) o meio foi retirado, os hepatócitos foram descolados das placas com PBS, sendo em seguida centrifugados a 50g por 5 min e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6 e em seguida estocado a -70°C para posterior determinação dos níveis de GSH, peroxidação lipídica e atividade enzimática dos citocromos P450 (1A1 e 2B1), como descrito a seguir.

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NOS HEPATÓCITOS

Após o tempo de tratamento de 20 horas, os hepatócitos foram descolados e removidos das placas com 1 mL de PBS gelado. A uma alíquota de 50 μ L da suspensão de hepatócitos em PBS foi adicionado 450 μ L de NaOH 1M. Essa nova solução foi aquecida em banho-maria à 50°C por 1 hora para promover a digestão dos hepatócitos. Após a digestão das células, realizou-se o ensaio de quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry e colaboradores (1951), modificado por Hartree (1972), sendo a albumina bovina usada como padrão.

As amostras foram diluídas em um volume final de 1 mL de água destilada e adicionadas a 900 μ L de uma solução A (tartarato de sódio e potássio 7 mM, carbonato de sódio 810 mM e NaOH 0,5M). Para a obtenção da curva padrão uma série de diluições de albumina bovina 300 μ g/mL, em NaOH 1M, foi preparada para fornecer concentrações de 30 a 150 μ g/mL. Também foi preparado um branco (NaOH 1M). Os tubos foram colocados em banho-maria à 50°C por 10 minutos e posteriormente resfriados à temperatura ambiente, sendo em seguida adicionado 100 μ L de uma solução B (tartarato de sódio e potássio 70 mM, sulfato de cobre 40 mM e NaOH 0,1M). Essa solução foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente foram adicionados 3 mL de uma solução C (reagente de Folin-Ciocalteu em água, 1:15 v/v). Essa nova solução foi aquecida em banho-maria à 50°C por 10 minutos e posteriormente resfriada à temperatura ambiente. O volume final das amostras era de 5 mL. A absorbância a 650 nm foi determinada no espectrofotômetro (UV-visible DU[®] 640B Spectrophotometer, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, EUA).

DETERMINAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

A concentração de GSH foi determinada como descrito por Torsoni e colaboradores (1998), com algumas modificações. Os hepatócitos foram lavados com solução fisiológica e lisados com água (1 mL). Ao lisado foi adicionado 1,5 mL de solução precipitante (1,67 g de ácido metafosfórico glacial, 0,2 g de EDTA e 30 g de NaCl em 100 mL de água MilliQ). Após 5 min da adição da solução precipitante, a mistura foi centrifugada a 350g por 5 min e 0,4 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,6 mL do meio de reação contendo DTNB para a formação de TNB (tampão Na_2HPO_4 0,2 M, pH 8,0, contendo 0,5 mM DTNB dissolvido em 1.0 % citrato de sódio). Após 5 min a absorbância do produto formado (TNB) foi medida a 412 nm. A concentração de GSH foi calculada utilizando seu coeficiente de extinção $\varepsilon = 13.6 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Torsoni *et al.*, 1998). A concentração de GSH é expressa em “ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas”. A viabilidade celular dos hepatócitos foi verificada pela contagem dos mesmos utilizando o teste de exclusão do corante azul de tripan. Células que captaram azul de tripan foram consideradas com perda de GSH (Xu and Thornalley, 2001).

DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A extensão de peroxidação lipídica induzida pela DHC livre e por sua forma veiculada em partículas de PLGA e β -CDs foi determinada pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com malonaldeído (MDA), um produto formado pela peroxidação lipídica (Wallin *et al.*, 1993). Este ensaio foi realizado conforme descrito por Salgo & Pryor (1996), com algumas modificações. Os hepatócitos tratados ou não foram lisados com 15

mM de Tris/HCl (5 mL) por 60 min. Ao lisado foram adicionados 2 mL de solução precipitante (10,4 g de ácido tricloro-acético (TCA)/mL) e incubado com ácido tiobarbitúrico (6,7 mg de TBA/mL) por 90 min a 100°C. Posteriormente, foi adicionado 5 mL de butanol à mistura, agitado vigorosamente e centrifugado a 750g por 10 min. A fluorescência relativa do sobrenadante foi medida em espectrofluorímetro (SPF-500C Spectrofluorometer, SLM-Aminco Instruments, Urbana, IL, USA) em comprimento de onda de excitação de 515 nm e de emissão de 553 nm. A concentração de TBARS (picomol/mg de proteínas) foi expressa como equivalentes de 1,1,3,3-tetraetoxipropano o qual foi utilizado como padrão.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO CITOCROMO P4501A1

A atividade enzimática do citocromo P4501A1 foi determinada de acordo com Burk e colaboradores (1985), modificada por e Reen (1993).

A uma solução com volume final de 500 µL, contendo Tris-HCl 50 mM, pH 7,6; MgCl₂ 5 mM; dicumarol 10 µM; NADPH 500 µM e 50 µg de proteínas hepáticas preparadas após 20 horas de tratamento, adicionou-se 25 µL do substrato 7-metoxiresorufina (MOR) 1 mM dissolvido em metanol para iniciar a reação. A solução foi incubada a 37°C por 1 hora. Após a incubação, adicionou-se 2 mL de metanol gelado para finalizar a reação, sendo em seguida o produto formado – resorufina – determinado e quantificado no espectrofluorímetro (SPF-500C Spectrofluorometer, SLM-Aminco Instruments, Urbana, IL, USA) a 550/585 nm de excitação/emissão, respectivamente.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO CITOCROMO P4502B1

A atividade enzimática do citocromo P4502B1 foi determinada de acordo com Reen e colaboradores (1991).

A uma solução com volume final de 500 μ L, contendo Tris-HCl 200 mM, pH 7,6; $MgCl_2$ 5 mM; NADPH 600 μ M e 125 μ g de proteínas hepáticas preparadas após 20 horas de tratamento, adicionou-se 25 μ L do substrato 7-metoxicoumarina (MOC) 400 μ M dissolvido em metanol para iniciar a reação. A solução foi incubada a 37°C por 15 minutos. Após a incubação, adicionou-se 75 μ L de ácido tricloroacético 15% (p/v) gelado, seguido pela adição de 1,5 mL de clorofórmio. A solução foi agitada e 1 mL da fase clorofórmica foi retirada e transferida para um tubo de ensaio contendo 3 mL de NaOH 10 mM e NaCl 1M. Após extração, a fase aquosa foi removida e o produto formado – 7-hidroxycoumarina – presente na fase clorofórmica foi determinado e quantificado no fluorímetro (SPF-500C Spectrofluorometer, SLM-Aminco Instruments, Urbana, IL, USA) a 368/456 nm de excitação/emissão, respectivamente.

III.10. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Cada ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo menos três vezes (sextuplicata cada). Para calcular o IC_{50} (concentração que inibi em 50% a viabilidade celular no parâmetro analisado) os resultados foram expressos em porcentagem por comparação aos controles e determinados graficamente através de curvas concentração-resposta utilizando o programa Origin[®] versão 6.0', sendo calculado a média $\pm$ desvio padrão. Comparações estatísticas foram feitas utilizando teste ANOVA ou teste-t de Student como calculado pelo programa e com índice de significância $p=0,05$. Com relação aos testes de determinação de GSH, peroxidação lipídica e atividade de P450, estes foram realizados duas vezes (triplicata cada).

IV-RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO DAS NANOESFERAS DE PLGA

Para uso em humanos, o material constituinte de uma partícula contendo a droga a ser administrada, deve ser quimicamente inerte e livre de impurezas. Além disso, é interessante que a partícula polimérica confira maior estabilidade e direcionamento à droga. Levando em consideração estes aspectos, preparou-se nanoesferas de PLGA (50:50), poli (D,L-láctico-co-glicólico) conforme a técnica de evaporação de solvente associada ao método de difusão da emulsificação espontânea (Ferdous *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 1999), com algumas modificações como descrito em III.1 (pág. 25).

O tamanho médio, índice de polidispersidade e potencial zeta obtidos para as nanoesferas de PLGA vazias e contendo DHC, bem como a eficiência de encapsulação e cinética de liberação *in vitro* da DHC são apresentados abaixo (**Tabela 4**).

Tabela 4. Caracterização físico-química de nanoesferas de PLGA contendo DHC.

Propriedades das nanoesferas	PLGA	PLGA/DHC
Tamanho $\pm$ SD (nm)	627,9 $\pm$ 85,7	821,3 $\pm$ 127,9
Polidispersidade	0,517	0,684
Potential Zeta $\pm$ SD (mV)	-32,6 $\pm$ 0,7	-25,2 $\pm$ 0,9
Proporção molar de PLGA: DHC	-	$\cong$ 4:161
Eficiência de encapsulação (%)	-	83,2 $\pm$ 2,6
Liberação <i>In vitro</i> (% de DHC liberada em horas)	-	2,0 $\pm$ 0,2%; 27,2 $\pm$ 0,9%; 48,3 $\pm$ 1,1%; 76,4 $\pm$ 1,4%; 91,6 $\pm$ 1,2% e 100,0 $\pm$ 0,2% em 0, 6, 12, 24, 36 e 48 h respectivamente

Durante a padronização do método de confecção das nanoesferas, foram observadas grandes mudanças nas propriedades físico-químicas das mesmas, como visto abaixo através da microscopia eletrônica de varredura (**Figura 6**).

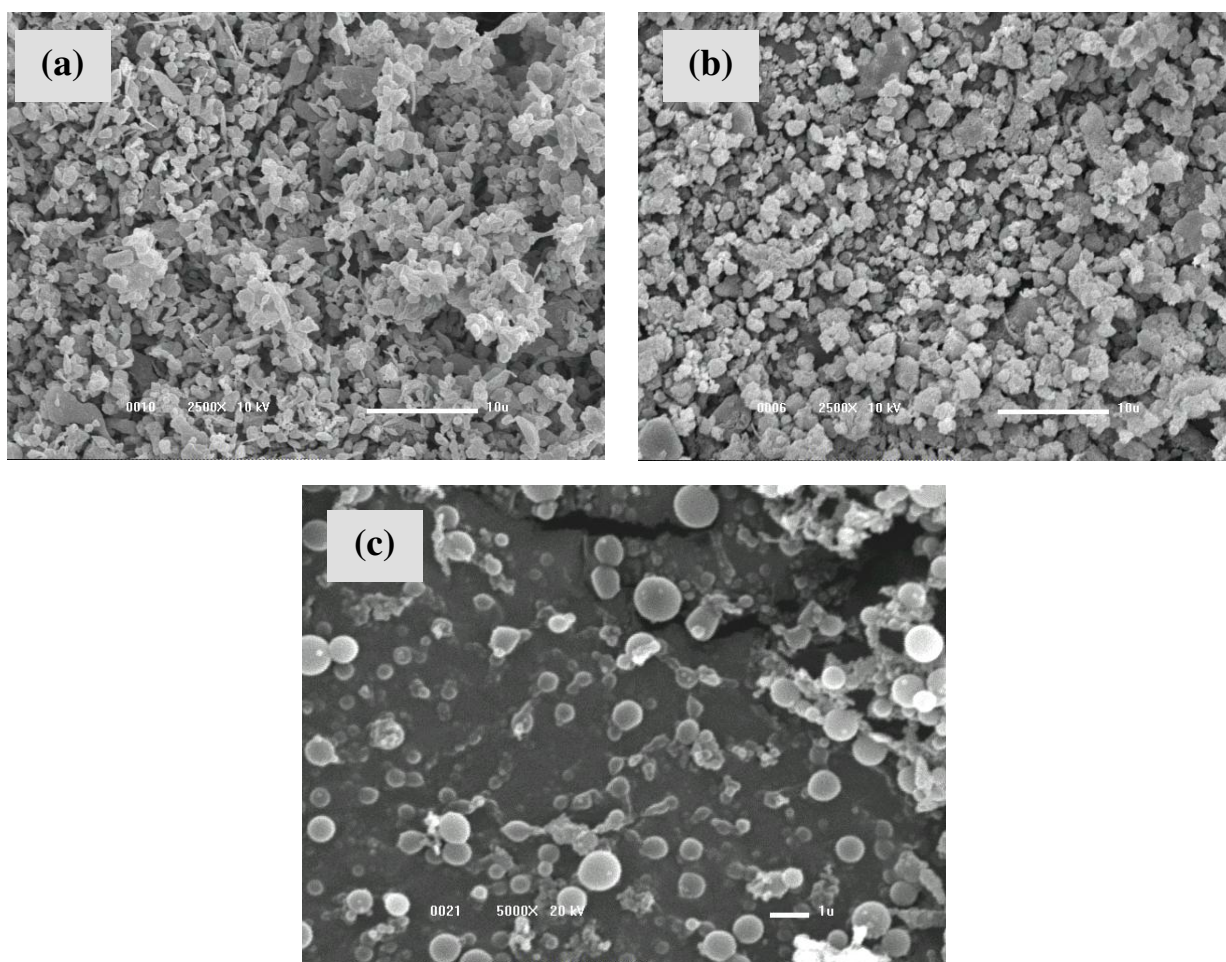


Figura 6. Imagem de Microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia de superfície de: (a) nanoesferas de PLGA vazias (2500 x); (b) nanoesferas de PLGA contendo DHC; ambas as preparações com PVA (127.000 Da) (2500 x). A barra horizontal indica 10 µm. Em (c) nanoesferas de PLGA contendo DHC, preparação com PVA (30.000-70.000 Da) e Pluronic (8.400 Da) (5000 x). A barra horizontal indica 1µm.

CITOTOXICIDADE DA DHC VEICULADA EM NANOESFERAS DE PLGA

A fim de verificar a citotoxicidade da DHC veiculada em nanoesferas de PLGA, foram realizadas culturas de células V79 e hepatócitos. As células V79 e hepatócitos, após processadas, foram tratadas com diferentes concentrações de DHC, DHC veiculada em nanoesferas de PLGA e mistura física dos componentes isolados, como descrito em Métodos/Experimental (itens III.5 e III.7, pág. 31 e 33 respectivamente). Após o tratamento as células foram processadas para os ensaios de determinação dos indicadores de toxicidade, como descrito em Métodos/Experimental (item III.8, pág. 34).

Os resultados referentes aos testes de citotoxicidade da DHC veiculada em nanoesferas de PLGA frente às células V79 e hepatócitos são apresentados a seguir.

Para avaliar a toxicidade direta das nanoesferas de PLGA em células V79 e em hepatócitos, estas foram tratadas com diversas concentrações (0 – 170 μM) de nanoesferas de PLGA vazias (**Figura 7**). Este ensaio foi realizado como uma etapa prévia para os testes de citotoxicidade, garantindo que os efeitos tóxicos observados não são devido ao “veículo” (nanoesferas vazias).

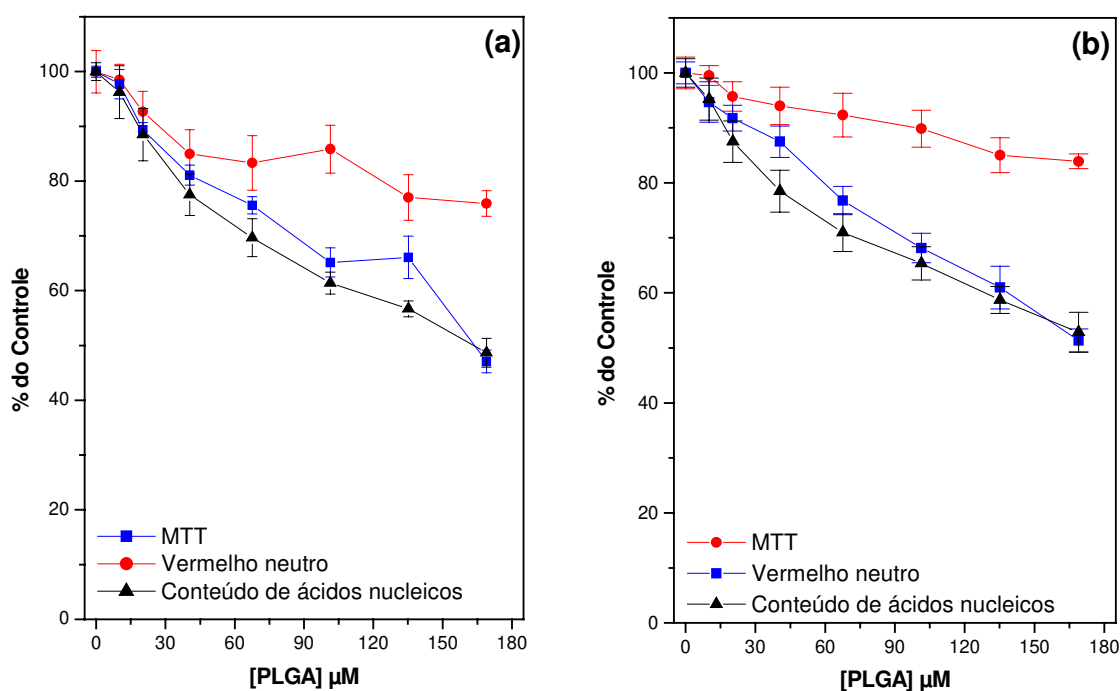


Figura 7. Viabilidade de células V79 (a) e hepatócitos (b) após tratamento com nanoesferas de PLGA vazias por 24 e 20 h respectivamente. Parâmetros analisados: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

Foi observado que até a concentração de 12,42 μM – concentração de nanoesferas relativa a maior concentração de DHC testada (500 μM) conforme a proporção molar de PLGA para DHC (**Tabela 4, pág. 42**), não houve, tanto em V79 como em hepatócitos (**Figura 7**), uma toxicidade significativa nos parâmetros analisados.

CÉLULAS V79

Os efeitos tóxicos da DHC livre analisados em células V79 provaram ser concentração-dependente, apresentando valores de IC_{50} nos testes de redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e quantificação de ácidos nucleicos de 400 μM , >500 μM (não visível no gráfico) e 225 μM , respectivamente (**Figura 8**).

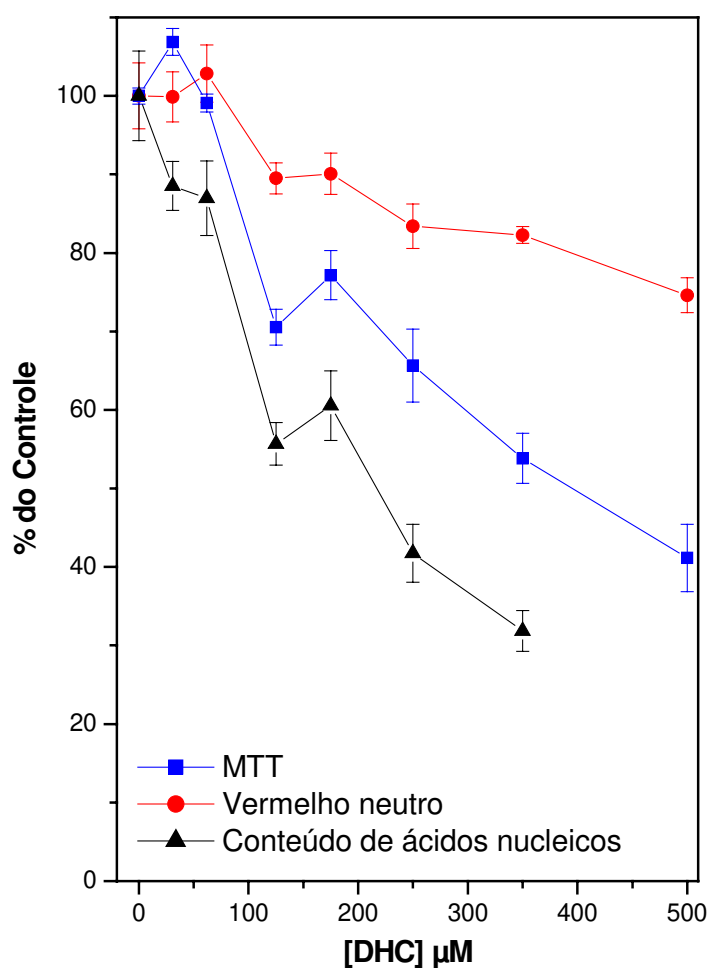


Figura 8. Viabilidade de células V79 após tratamento com DHC por 24 h. Parâmetros analisados: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

A DHC veiculada em nanoesferas de PLGA (**Figura 9**) não apresentou diferença significativa de toxicidade no teste de incorporação do vermelho neutro e de conteúdo de ácidos nucleicos quando comparada à DHC livre (**Figura 8, pág. anterior**). No teste de redução do MTT, na máxima concentração testada (500 μM) de DHC veiculada em nanoesferas de PLGA, não foi encontrado valor de IC_{50} ; em contrapartida, foi observado um estímulo de 13% na capacidade das células V79 para reduzir o MTT quando comparado ao controle (células V79 em meio DMEM).

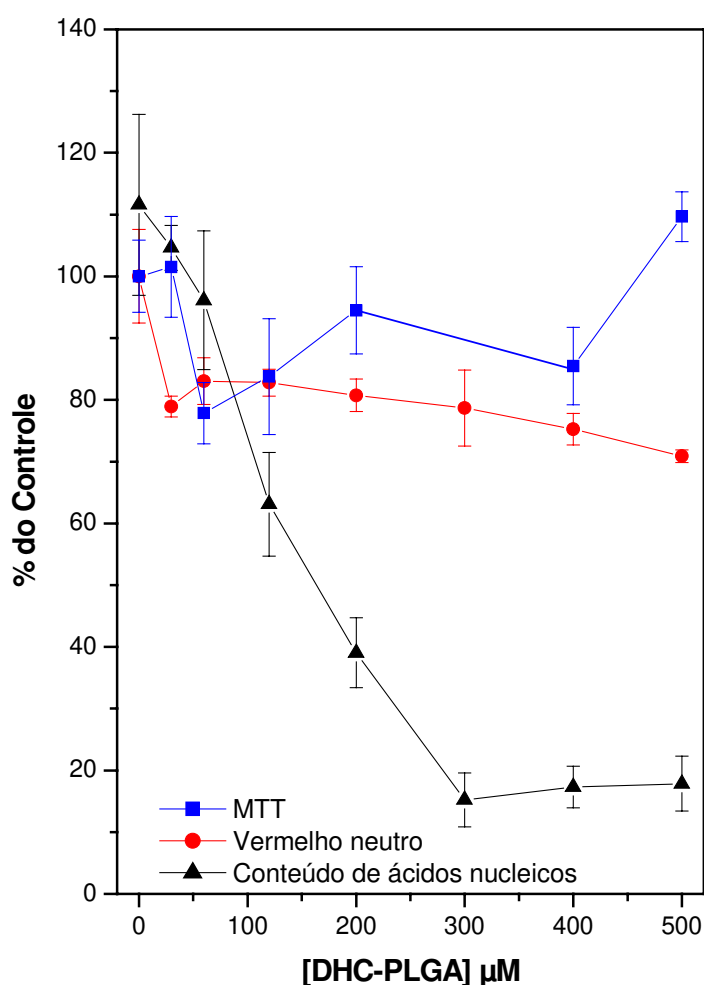


Figura 9. Viabilidade de células V79 após tratamento com DHC veiculada em nanoesferas de PLGA por 24 h. Parâmetros analisados: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

HEPATÓCITOS

A análise dos parâmetros de hepatotoxicidade mostrou que a DHC acarreta grandes efeitos tóxicos nessas células nos três parâmetros testados, apresentando valores de IC_{50} de 144 μ M, 31 μ M e 25 μ M nos testes de redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos, respectivamente (**Figura 10**).

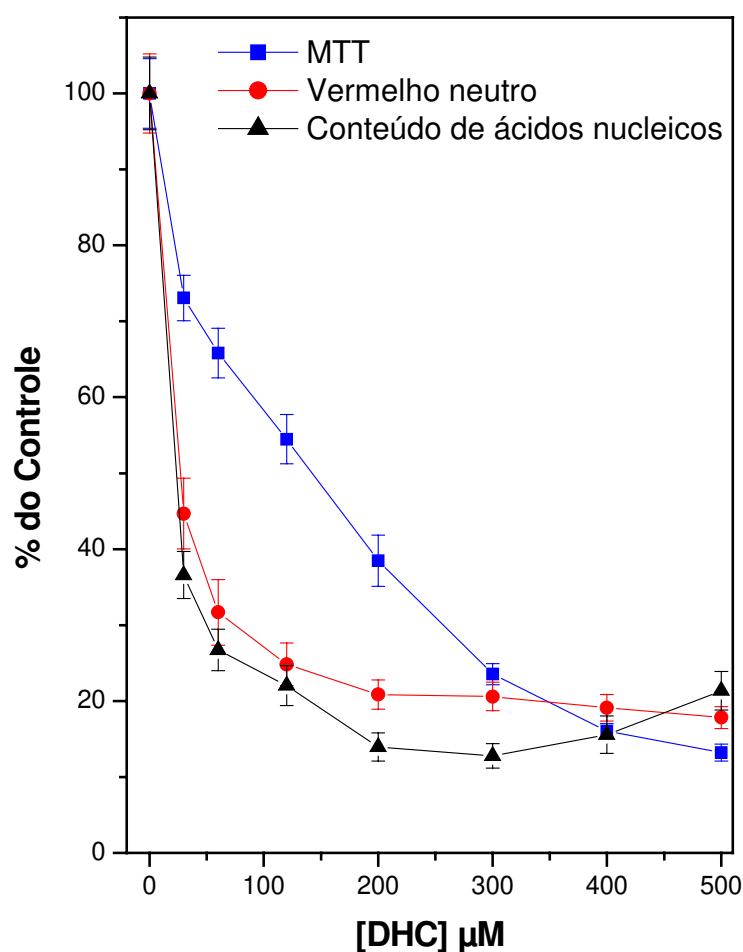


Figura 10. Viabilidade de hepatócitos após tratamento com DHC por 20 h. Parâmetros analisados: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

Os hepatócitos tratados com DHC veiculada em nanoesferas de PLGA (**Figura 11**) apresentaram valores maiores de IC_{50} (**Tabela 5**), comparados aos observados no tratamento com DHC livre (**Figura 10, pág. anterior**).

Tabela 5. Valores de IC_{50} da DHC livre e veiculada em nanoesferas de PLGA nos hepatócitos.

Valores de IC_{50} em μM (parâmetros de viabilidade)			
Tratamento	Redução do MTT	Vermelho neutro	Conteúdo de ácidos nucleicos
DHC livre	144	31	25
DHC-PLGA	462	266	116

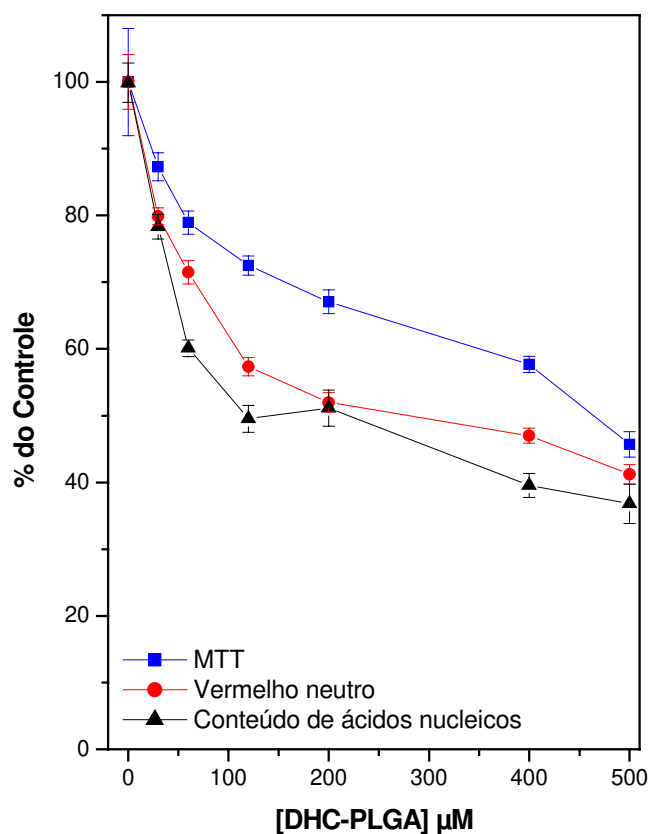


Figura 11. Viabilidade de hepatócitos após tratamento com DHC veiculada em nanoesferas de PLGA por 20 h. Parâmetros analisados: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE DHC COM β -CDs

Nos nossos estudos, preparamos complexos de inclusão de DHC com β -CD, Me- β -CD e HP- β -CD pelo método de coevaporação, como descrito em Métodos/Experimental (item III.3, pág. 29). A formação dos complexos de inclusão de DHC com β -CDs pelo método de coevaporação foi analisada por difração de raios-X por pó (XRD), calorimetria diferencial de varredura (DSC), análise termogravimétrica (TGA) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV), como descrito em Métodos/Experimental (item III.4, pág. 29).

Os resultados da caracterização dos complexos de inclusão de DHC com β -CDs são apresentados a seguir.

O difratograma do complexo de inclusão de DHC com β -CD (**Figura 12, linha vermelha**) apresenta novos picos a $2\theta = 12.0^\circ$ e 18.0° que são ausentes nos difratogramas dos componentes isolados. O difratograma da DHC (**Figura 12, linha azul**) apresenta picos a $2\theta = 8,0^\circ$, $13,5^\circ$, $16,5^\circ$ e 24° ; o difratograma da β -CD (**Figura 12, linhas preta**) apresenta picos a $2\theta = 8,5^\circ$, $19,0^\circ$ e 21° . Esses picos dos componentes isolados – DHC e β -CD, não estão presentes no difratograma do complexo de inclusão de DHC com β -CD. O difratograma da mistura física de DHC com β -CD foi uma sobreposição dos difratogramas dos componentes isolados (dado não mostrado).

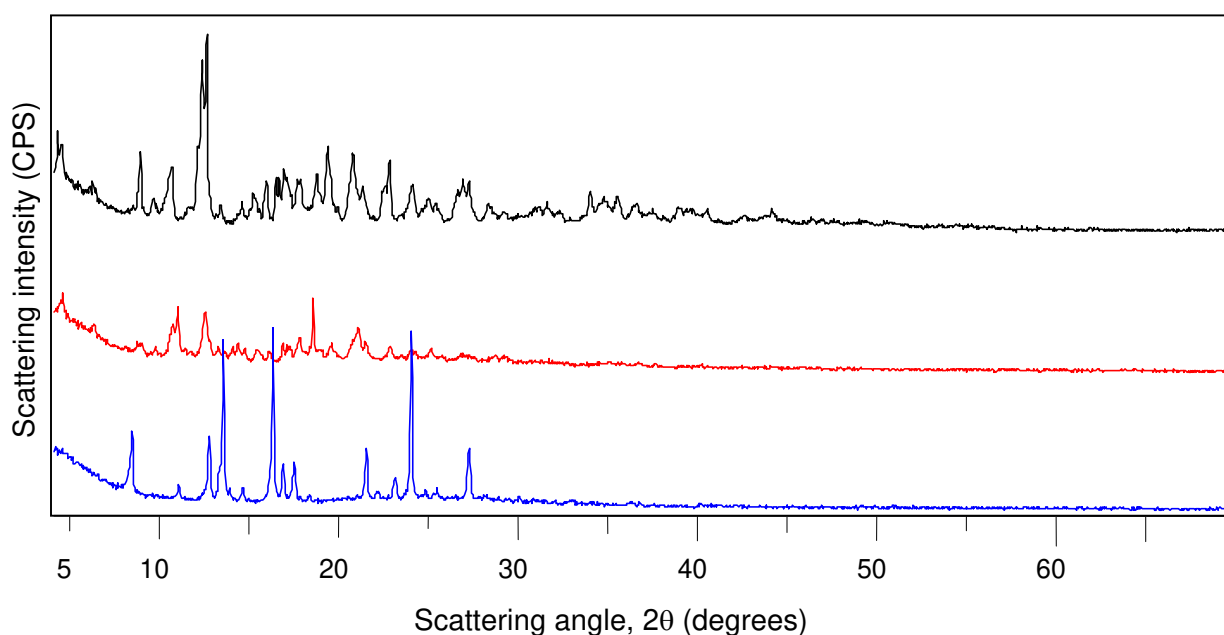


Figura 12. Difratogramas de DHC (azul), β -CD (preto) e complexo de inclusão de DHC com β -CD (vermelho).

O difratograma do complexo de inclusão de DHC com HP- β -CD (**Figura 13, linha vermelha**) apresenta um perfil amorfo. O difratograma da DHC (**Figura 13, linha azul**) apresenta picos a $2\theta = 8,0^\circ$, $13,5^\circ$, $16,5^\circ$ e 24° ; o difratograma da HP- β -CD (**Figura 13, linha preta**) apresenta picos a $2\theta = 12,5^\circ$ e 19° . Esses picos dos componentes isolados – DHC e HP- β -CD, não estão presentes no difratograma do complexo de inclusão de DHC com HP- β -CD. O difratograma da mistura física de DHC com HP- β -CD foi uma sobreposição dos difratogramas dos componentes isolados (dado não mostrado).

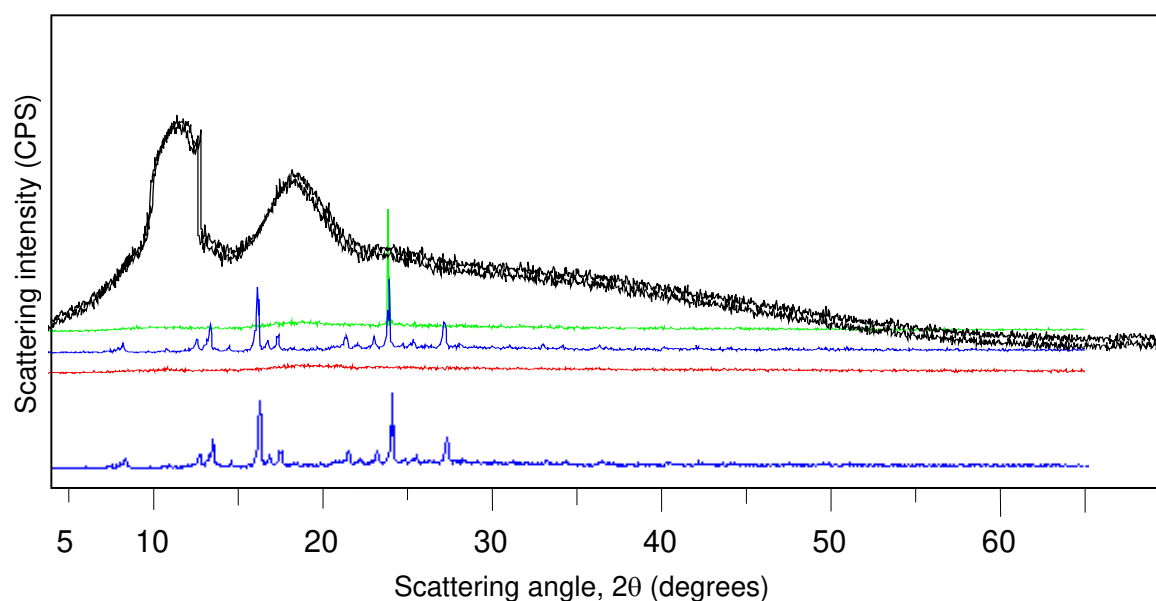


Figura 13. Difratogramas de DHC (azul), HP- β -CD (preto) e complexo de inclusão de DHC com HP- β -CD (vermelho).

O difratograma do complexo de inclusão de DHC com Me- β -CD (**Figura 14, linha vermelha**) mostra um perfil amorfo, sem picos indicativos de cristalinidade; perfil semelhante ao difratograma da Me- β -CD (**Figura 14, linha preta**). O difratograma da DHC (**Figura 14, linha azul**) apresenta picos a $2\theta = 8,0^\circ$, $13,5^\circ$, $16,5^\circ$ e 24° . Os picos de cristalinidade presentes no difratograma da DHC não estão presentes tanto no difratograma do complexo de inclusão de DHC com Me- β -CD, quanto no da Me- β -CD. O difratograma da mistura física de DHC com Me- β -CD foi uma sobreposição dos difratogramas dos componentes isolados (dato não mostrado).

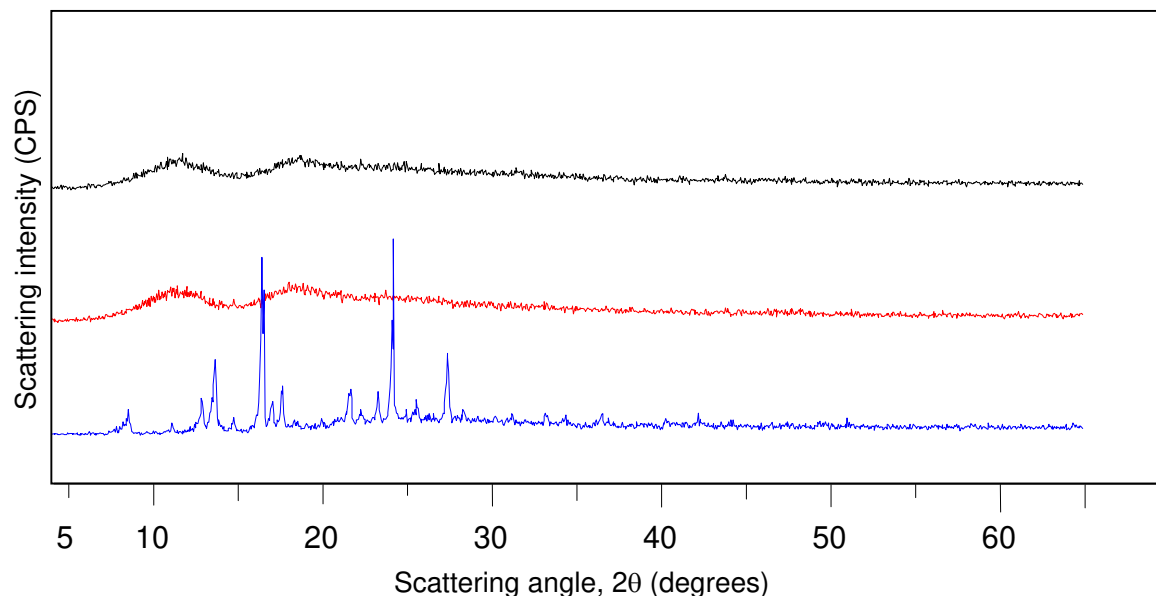


Figura 14. Difratogramas de DHC (azul), Me- β -CD (preto) e complexo de inclusão de DHC com Me- β -CD (vermelho).

O termograma da DSC do complexo de inclusão de DHC com β -CD (**Figura 15, linha vermelha**) mostra um pico endotérmico a 117,49°C que não está presente nos termogramas dos componentes isolados – DHC e β -CD. No termograma da DHC (**Figura 15, linha azul**) observa-se um pico endotérmico a 135,47°C e outro a 416,17°C, sendo esses picos não observados no termograma do complexo de inclusão. Observa-se no termograma do complexo de inclusão de DHC com β -CD (**Figura 15, linha vermelha**) que o pico endotérmico entre 143,38°C e 167,31°C, presente no termograma da β -CD (**Figura 15, linha preta**), também está presente, entretanto com uma redução em sua área.

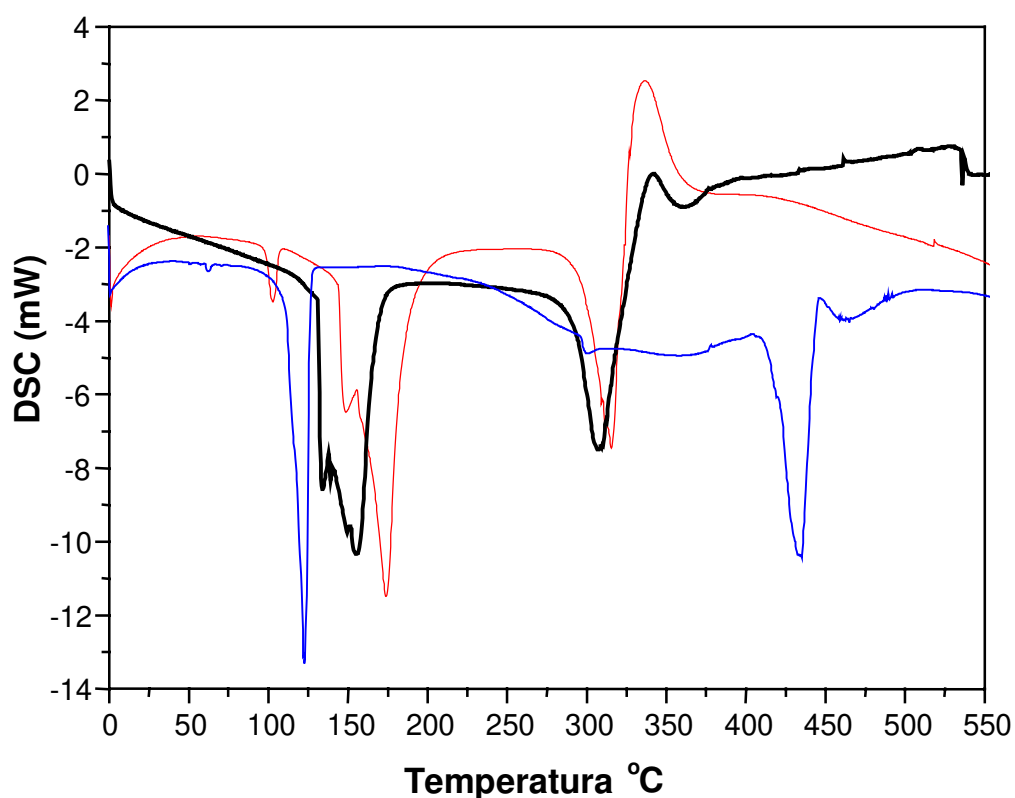


Figura 15. Termogramas da DSC de DHC (azul), β -CD (preto) e complexo de inclusão de DHC com β -CD (vermelho).

O termograma da DSC do complexo de inclusão de DHC com HP- β -CD (**Figura 16, linha vermelha**) mostra dois picos endotérmicos, um a 148,71°C e outro a 326,58°C que não estão presentes nos termogramas dos componentes isolados – DHC e HP- β -CD (**Figura 16, linhas azul e preta, respectivamente**). No termograma da HP- β -CD (**Figura 16, linha preta**) observa-se dois picos (160,04°C e 327,46°C). Os picos endotérmicos a 135,47°C e 416,17°C presentes no termograma da DHC (**Figura 16, linha azul**), não estão presentes no termograma do complexo de inclusão de DHC com HP- β -CD (**Figura 16, linha vermelha**).

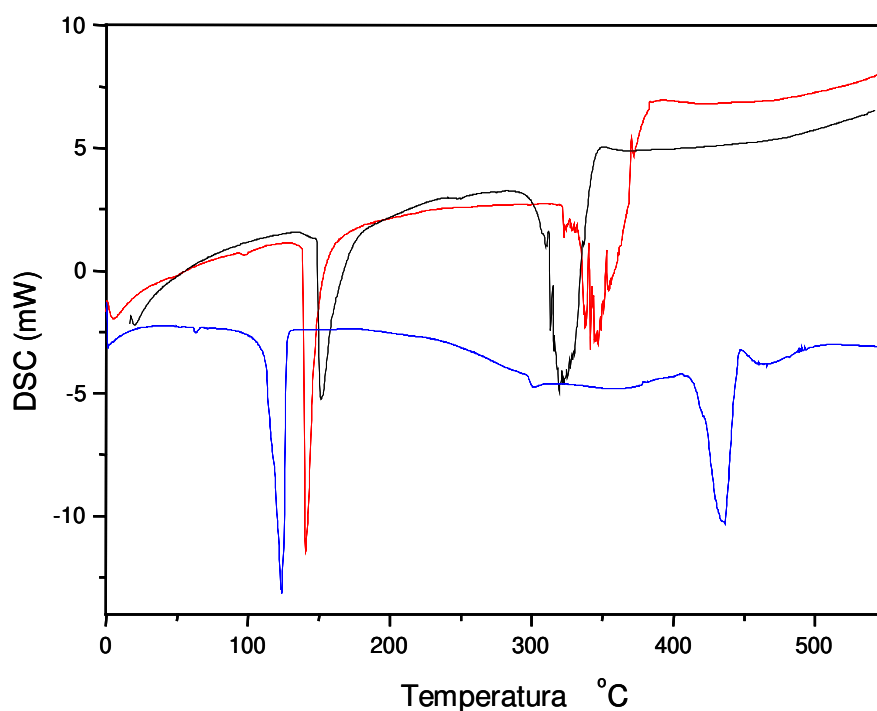


Figura 16. Termogramas da DSC de DHC (azul), HP- β -CD (preto) e complexo de inclusão DHC com HP- β -CD (vermelho).

O termograma da DSC do complexo de inclusão de DHC com Me- β -CD (**Figura 17, linha vermelha**) mostra dois picos endotérmicos (154,86°C e 366,13°C) semelhantes ao do termograma da Me- β -CD (158,04°C e 367,56°C) (**Figura 17, linha preta**), entretanto no termograma do complexo de inclusão estes picos se apresentam com amplitude e áreas reduzidas. Observa-se que os picos endotérmicos da DHC (135,47°C e 416,17°C) (**Figura 17, linha azul**) estão ausentes no termograma do complexo de inclusão.

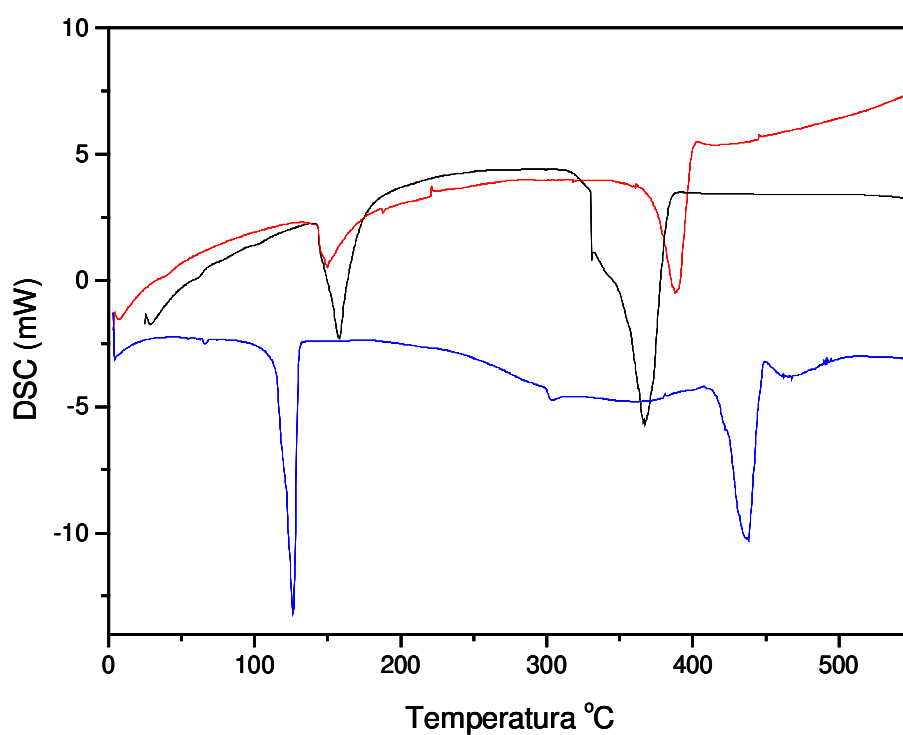


Figura 17. Termogramas da DSC de DHC (azul), Me- β -CD (preto) e complexo de inclusão DHC com Me- β -CD (vermelho).

O termograma da TGA da DHC (**Figura 18, linha azul**) mostra que esta molécula sofreu um processo de decomposição térmica contínua a partir de 250°C chegando a uma decomposição completa a 350°C sem deixar resíduos sólidos. Em contraste, o termograma do complexo de inclusão de DHC com β -CD (**Figura 18, linha vermelha**) mostra que esse novo composto foi mais estável termicamente que a DHC, com formação de resíduo sólido a 600°C correspondente a 17% do material analisado.

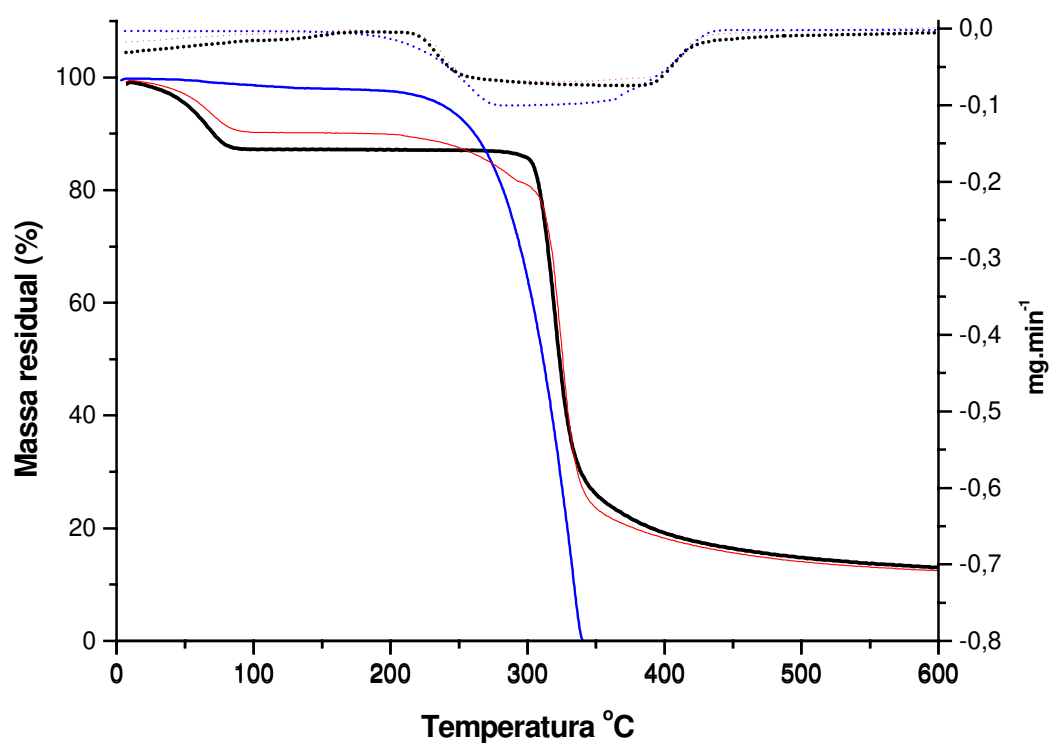


Figura 18. Termogramas da TGA de DHC (azul), β -CD (preto) e complexo de inclusão de DHC com β -CD (vermelho).

O termograma da TGA da DHC (**Figura 19, linha azul**) mostra que essa molécula sofreu um processo de decomposição térmica contínua a partir de 250°C chegando a uma decomposição completa a 350°C sem deixar resíduos sólidos. Em contraste, o termograma do complexo de inclusão de DHC com HP- β -CD (**Figura 19, linha vermelha**) mostra que este foi mais estável termicamente que a DHC, com formação de resíduo sólido a 550°C correspondente a 6,3% do material analisado.

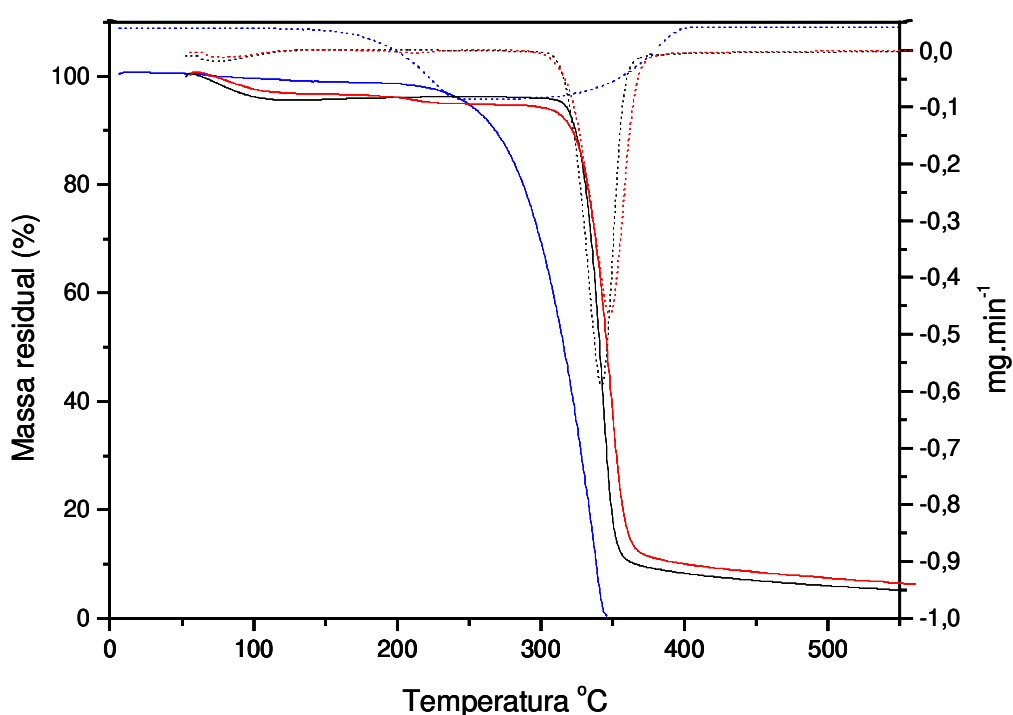


Figura 19. Termogramas da TGA de DHC (azul), HP- β -CD (preto) e complexo de inclusão de DHC com HP- β -CD (vermelho).

O termograma da TGA da DHC (**Figura 20, linha azul**) mostra que essa molécula sofreu um processo de decomposição térmica contínua a partir de 250°C chegando a uma decomposição completa a 350°C sem deixar resíduos sólidos. Em contraste, o termograma do complexo de inclusão de DHC com Me- β -CD (**Figura 20, linha vermelha**) mostra que este foi mais estável termicamente que a DHC, com formação de resíduo sólido a 550°C correspondente a 8% do material analisado.

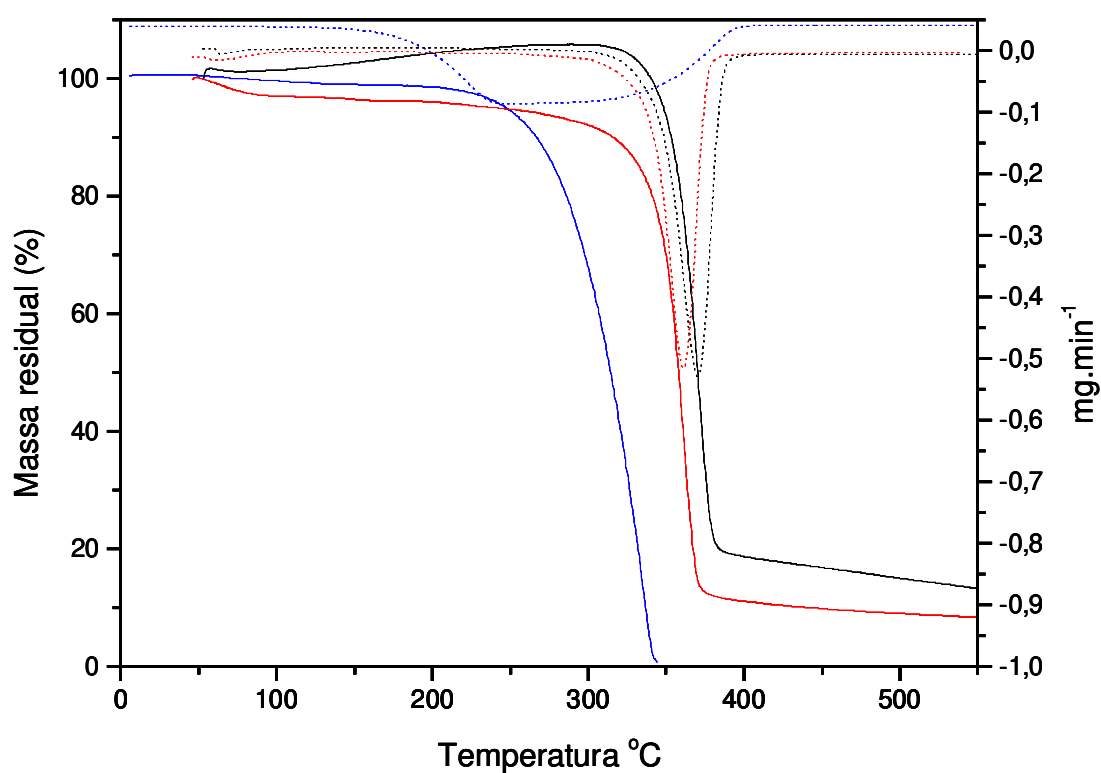


Figura 20. Termogramas da TGA de DHC (azul), Me- β -CD (preto) e complexo de inclusão de DHC com Me- β -CD (vermelho).

Além das técnicas de XRD, DSC e TGA, as amostras (DHC e complexos de inclusão de DHC com β -CDs) também foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Na microscopia foi observado que o aspecto cristalino da DHC (**Figura 21a**) desapareceu nos complexos de inclusão com β -CD, HP- β -CD e Me- β -CD (**Figuras 21 b-d, respectivamente**).

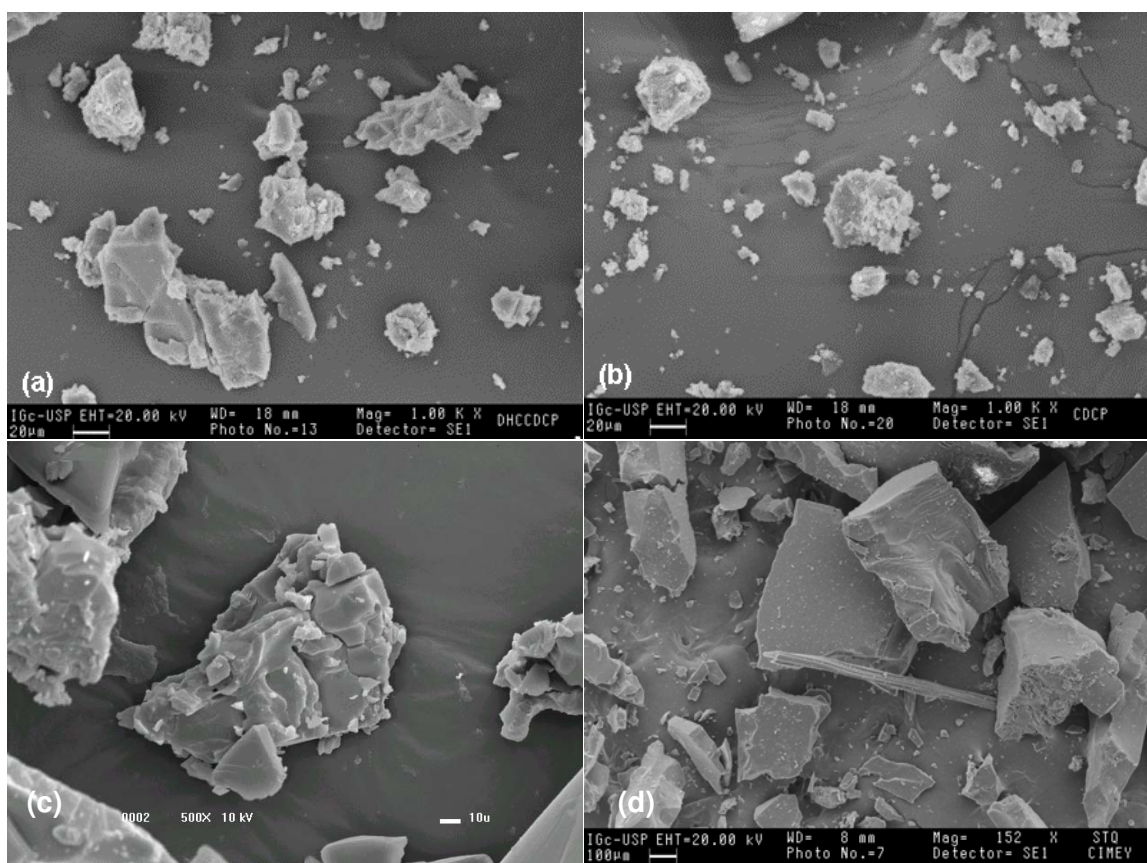


Figura 21. Micrografias de cristais de DHC (a) (1.000x), complexo de inclusão de DHC com β -CD (b) (1.000x), complexo de inclusão de DHC com HP- β -CD (c) (500x) e Me- β -CD (d) (152x).

CITOTOXICIDADE DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE DHC COM β -CDs

A fim de verificar a citotoxicidade da DHC complexada com β -CDs, foram realizadas culturas de células V79 e hepatócitos. As células V79 e hepatócitos, após processadas, foram tratadas com diferentes concentrações de DHC, DHC complexada com β -CDs e mistura física dos componentes isolados de cada um dos três complexos de inclusão (DHC com β -CD, HP- β -CD e Me- β -CD) como descrito em Métodos/Experimental (itens III.5 e III.7, pág. 31 e 33 respectivamente). Após o tratamento as células foram processadas para os ensaios de determinação dos indicadores de toxicidade, como descrito em Métodos/Experimental (item III.8, pág. 34).

Os resultados referentes aos testes de citotoxicidade da DHC complexada em β -CDs frente às células V79 e hepatócitos são apresentados a seguir.

CÉLULAS V79

O complexo de inclusão DHC- β -CD (**Figura 22**) acarretou uma baixa citotoxicidade nas células V79 frente ao teste de incorporação do vermelho neutro ($IC_{20} = 400 \mu M$). No teste de redução do MTT, observou-se uma baixa toxicidade (IC_{50} de $676 \mu M$, estimado a partir da extrapolação linear dos dados plotados).

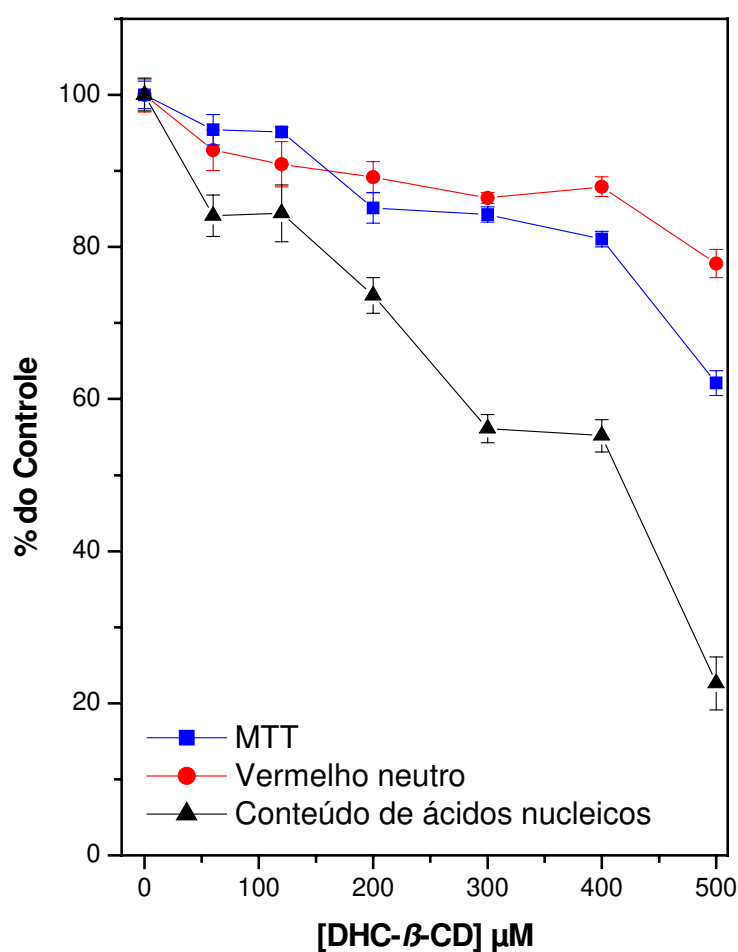


Figura 22. Viabilidade de células V79 após tratamento com complexo de inclusão de DHC com β -CD por 24 h. Parâmetros analisados: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

No teste de conteúdo de ácidos nucleicos em células V79, o complexo de inclusão DHC- β -CD acarretou uma baixa citotoxicidade (IC_{50} de 420 μ M) (**Pág. anterior**) comparada ao visto no tratamento com DHC livre (IC_{50} de 225 μ M) (**Pág. 46**).

O complexo de inclusão DHC-HP- β -CD (**Figura 23**) mostrou ser pouco citotóxico no teste de incorporação do vermelho neutro ($IC_{20} \cong 500$ μ M) em células V79.

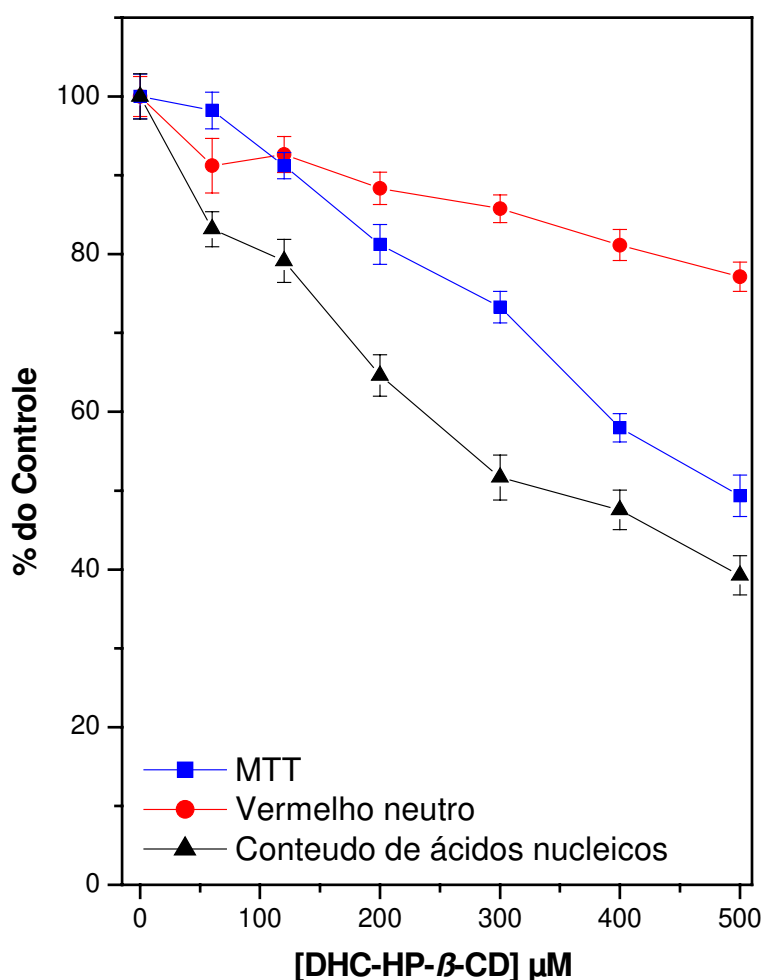


Figura 23. Viabilidade de células V79 após tratamento com complexo de inclusão de DHC com HP- β -CD por 24 h. Parâmetros analisados: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

No teste de redução do MTT, o complexo de inclusão DHC-HP- β -CD foi menos citotóxico (IC_{50} de 500 μ M; pág. anterior) que a DHC livre (IC_{50} de 400 μ M; pág. 46). No teste de conteúdo de ácidos nucleicos, o complexo de inclusão de DHC com HP- β -CD apresentou uma baixa citotoxicidade (IC_{50} de 340 μ M; pág. anterior) comparada a DHC livre (IC_{50} de 225 μ M; pág. 46).

O complexo de inclusão de DHC-Me- β -CD (**Figura 24**) foi pouco citotóxico frente ao teste de incorporação do vermelho neutro (IC_{25} de 500 μ M) nas células V79.

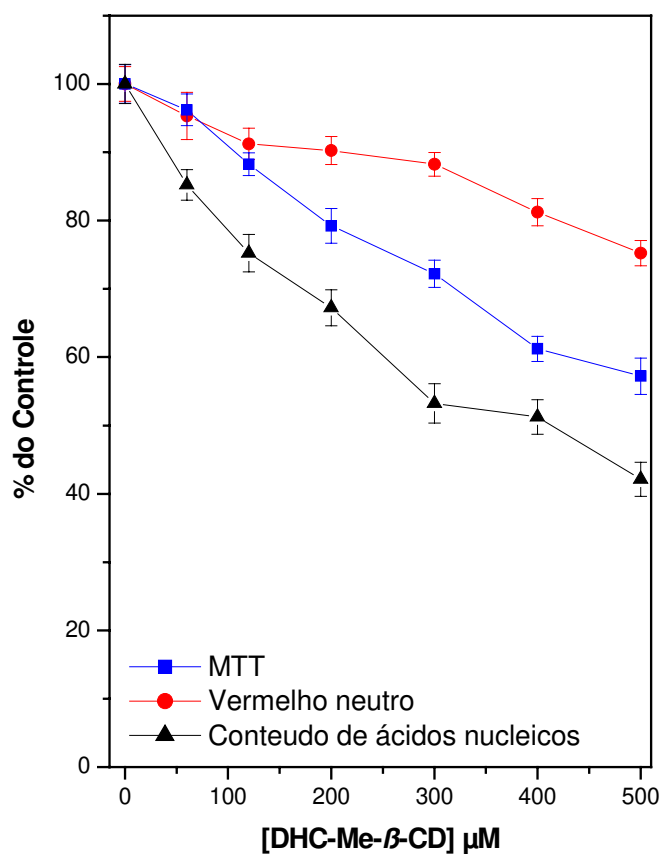


Figura 24. Viabilidade de células V79 após tratamento com complexo de inclusão de DHC com Me- β -CD por 24 h. Parâmetros analisados: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

No teste de redução do MTT, o complexo de inclusão DHC-Me- β -CD foi menos citotóxico ($IC_{50} > 500 \mu M$; pág. anterior) que a DHC livre (IC_{50} de $400 \mu M$; pág. 46) em células V79. No teste de conteúdo de ácidos nucléicos, o complexo DHC-Me- β -CD apresentou uma baixa citotoxicidade (IC_{50} de $415 \mu M$; pág. anterior) comparada a DHC livre (IC_{50} de $225 \mu M$; pág. 46).

Para investigar um possível impedimento estérico entre a DHC e as β -CDs, as células V79 foram tratadas com uma mistura física dos componentes isolados – DHC e β -CDs na razão molar de 1:2 (DHC: β -CDs) em concentrações de 0 a $500 \mu M$ (relativas de DHC). Os resultados são apresentados a seguir.

Nas células V79, a mistura física de DHC com β -CD (**Figura 25**), comparada a DHC livre (**Pág. 46**), não acarretou mudanças significativas no teste de incorporação do vermelho neutro. Quanto à redução do MTT e ao conteúdo de ácidos nucleicos, foi observada uma baixa citotoxicidade ($IC_{20} \cong 500 \mu M$ e IC_{50} de $340 \mu M$, respectivamente).

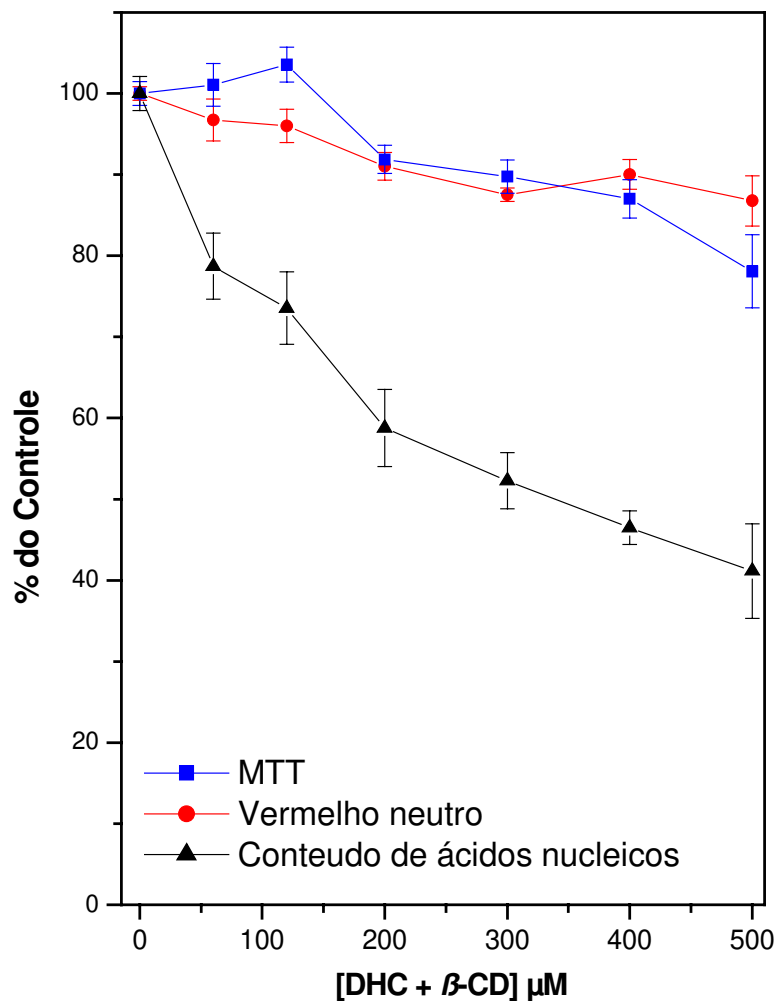


Figura 25. Viabilidade de células V79 após tratamento com mistura física de DHC com β -CD por 24 h. Parâmetros analisados: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

A mistura física de DHC com HP- β -CD (**Figura 26**) apresentou baixa toxicidade nas células V79 frente a todos os testes de viabilidade analisados ($IC_{20} = 464 \mu M$, $IC_{15} = 500 \mu M$ e $IC_{50} = 315 \mu M$ nos testes de redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos, respectivamente).

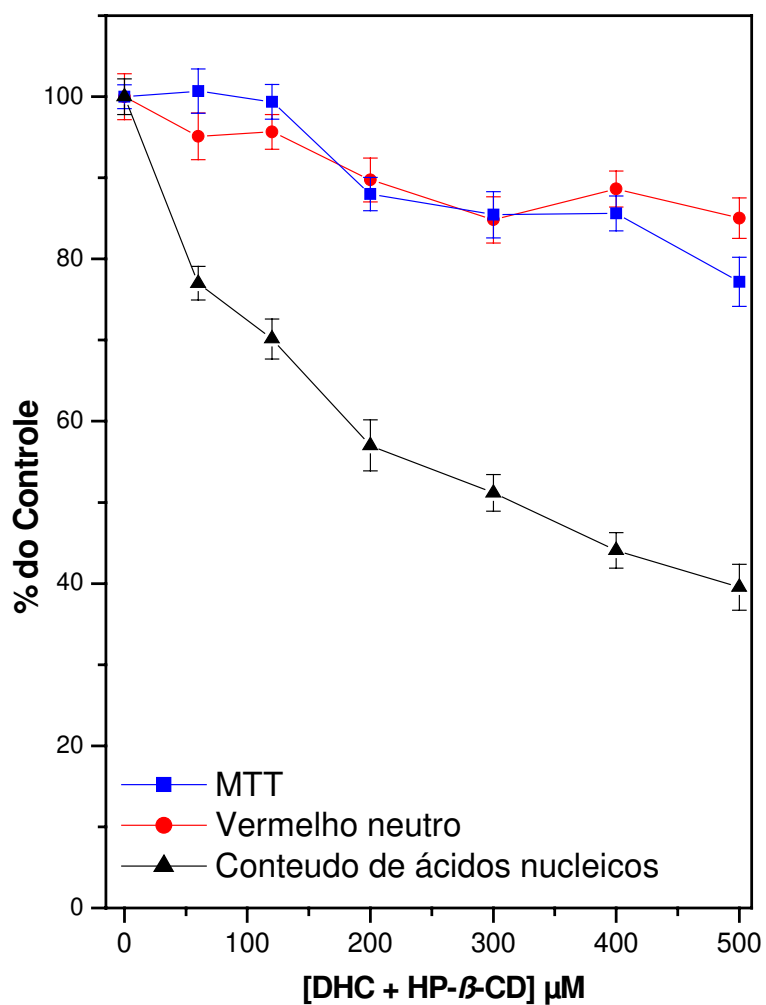


Figura 26. Viabilidade de células V79 após tratamento com mistura física de DHC com HP- β -CD por 24 h. Parâmetros analisados: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

A mistura física de DHC com Me- β -CD (**Figura 27**) apresentou baixa toxicidade nas células V79 frente a todos os testes de viabilidade analisados ($IC_{25} = 500 \mu M$, $IC_{20} = 500 \mu M$ e $IC_{50} = 300 \mu M$ nos testes de redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos, respectivamente).

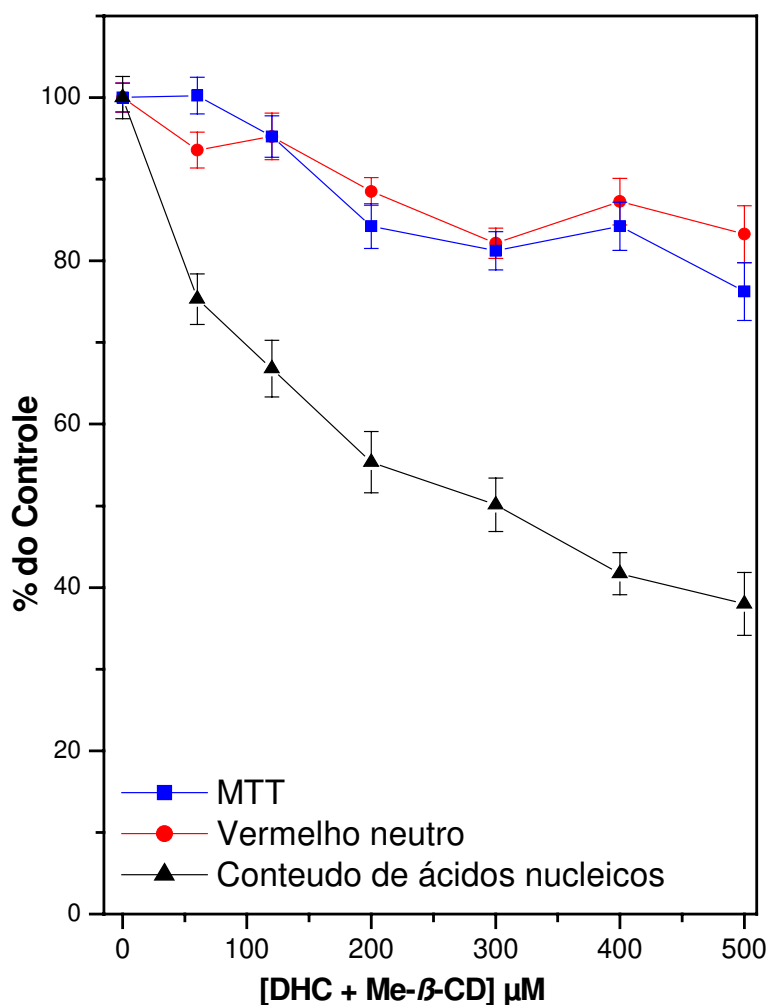


Figura 27. Viabilidade de células V79 após tratamento com mistura física de DHC com Me- β -CD por 24 h. Parâmetros analisados: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

HEPATÓCITOS

Nos hepatócitos tratados com o complexo de inclusão de DHC com β -CD (**Figura 28**), valores de IC_{50} de 254 μ M e 500 μ M foram obtidos nos testes de conteúdo de ácidos nucléicos e redução do MTT, respectivamente. Também foi verificado que esse complexo de inclusão apresentou um baixo efeito tóxico (IC_{50} maior que 500 μ M) frente ao teste de incorporação do vermelho neutro.

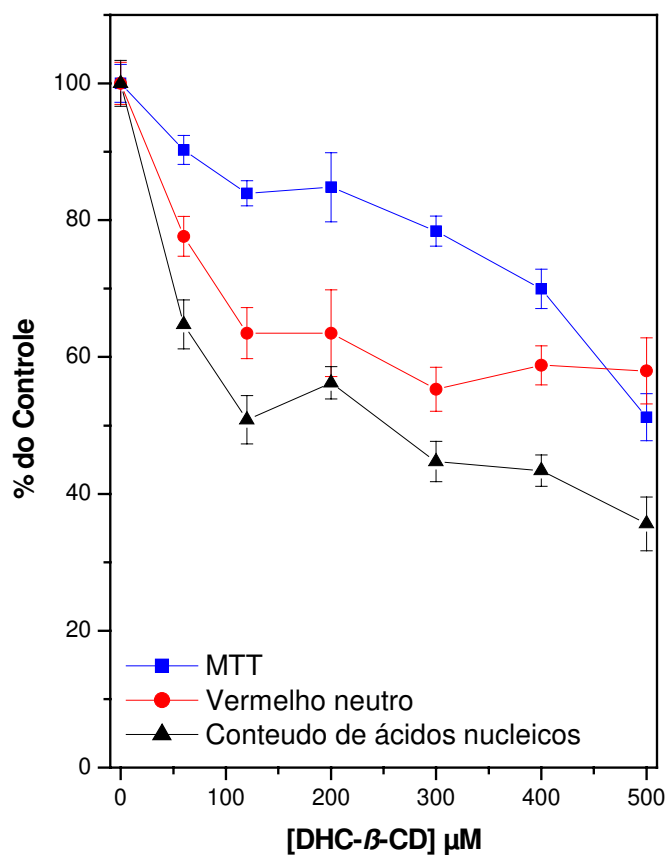


Figura 28. Viabilidade de hepatócitos após tratamento com complexo de inclusão de DHC com β -CD por 20 h. Parâmetros analisados: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucléicos. Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

Nos hepatócitos tratados com o complexo de inclusão de DHC com HP- β -CD (Figura 29), os valores de IC₅₀ obtidos para os testes de redução do MTT, conteúdo de ácidos nucleicos e incorporação do vermelho neutro, foram de 390 μ M, 176 μ M e 430 μ M, respectivamente.

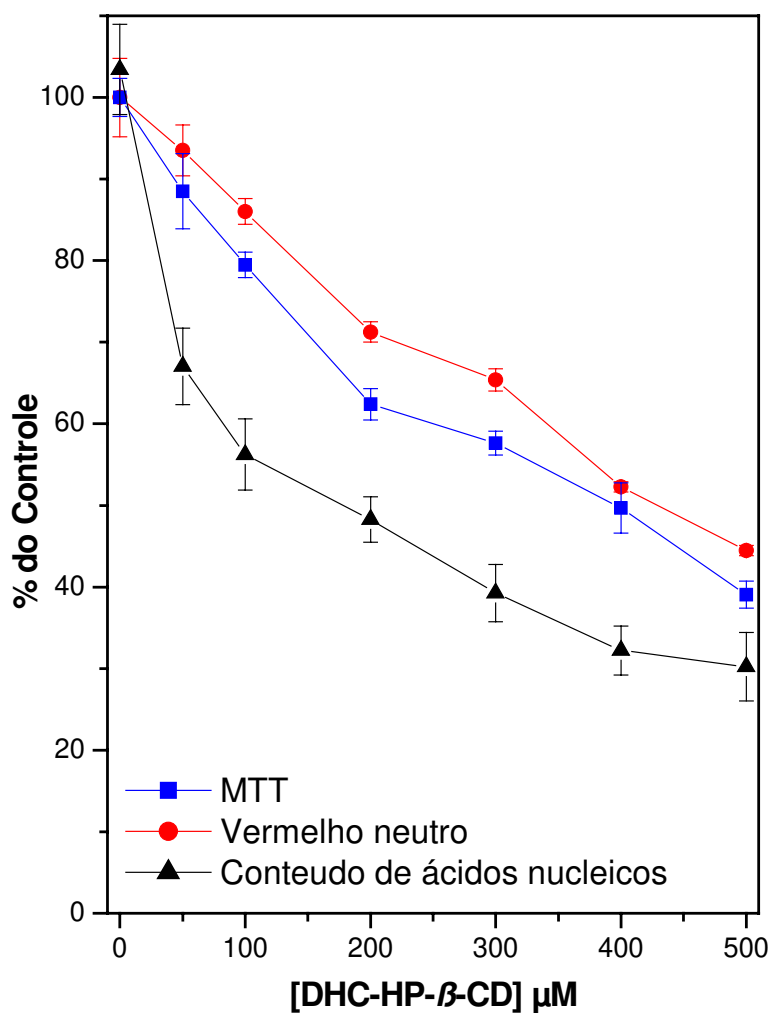


Figura 29. Viabilidade de hepatócitos após tratamento com complexo de inclusão de DHC com HP- β -CD por 20 h. Parâmetros analisados: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

Nos hepatócitos tratados com o complexo de inclusão de DHC com Me- β -CD (Figura 30), os valores de IC₅₀ obtidos para os testes de redução do MTT, conteúdo de ácidos nucleicos e incorporação do vermelho neutro, foram de 352 μ M, 162 μ M e 495 μ M, respectivamente.

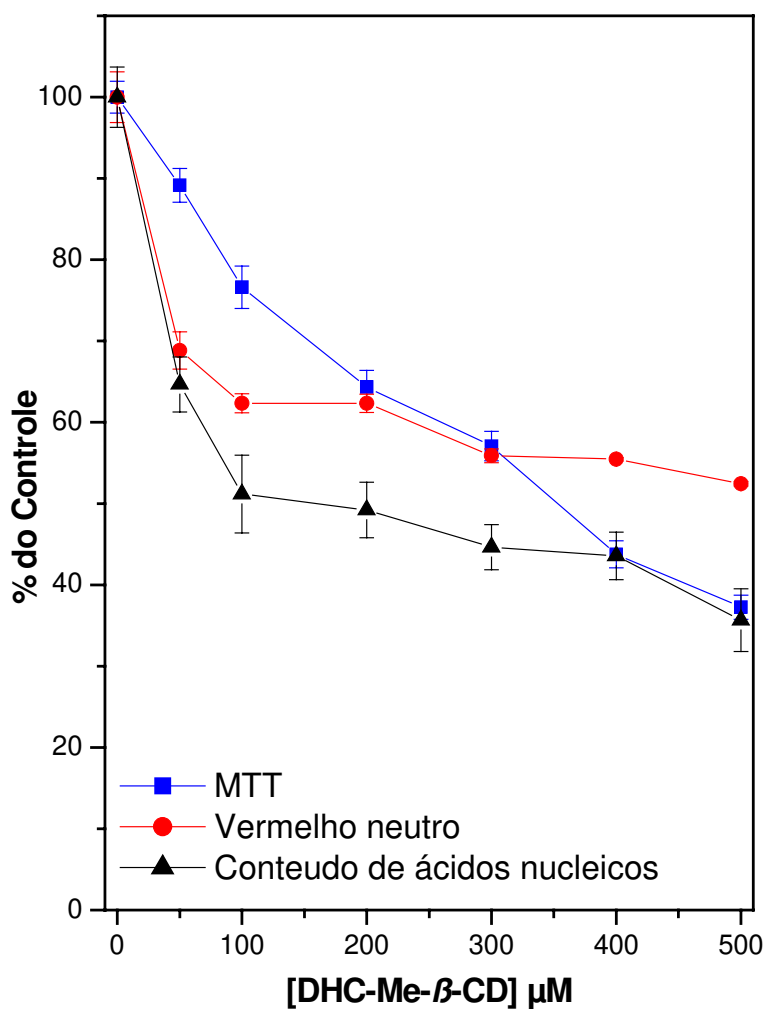


Figura 30. Viabilidade de hepatócitos após tratamento com complexo de inclusão de DHC com Me- β -CD por 20 h. Parâmetros analisados: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada

Para investigar uma possível interferência das β -CDs frente aos efeitos da DHC, os hepatócitos foram tratados com misturas físicas dos componentes isolados – DHC e β -CDs na razão molar de 1:2 (DHC: β -CDs), em concentrações relativas de DHC de 0 a 500 μ M.

A hepatotoxicidade das misturas físicas (**Figura 31, pág. seguinte**) foi similar nos três testes de viabilidade realizados (**Tabela 6**) comparada à observada no tratamento com DHC livre (**Figura 10, pág. 48**).

Tabela 6. Valores de IC₅₀ obtidos nos tratamentos dos hepatócitos com as misturas físicas de DHC e β -CDs.

Tratamento	Valores de IC ₅₀ em μ M (parâmetros de viabilidade)		
	MTT	Vermelho neutro	Conteúdo de ácidos nucléicos
DHC	144	31	25
DHC + β -CD	213	38	40
DHC + HP- β -CD	175	46	42
DHC + Me- β -CD	171	42	42

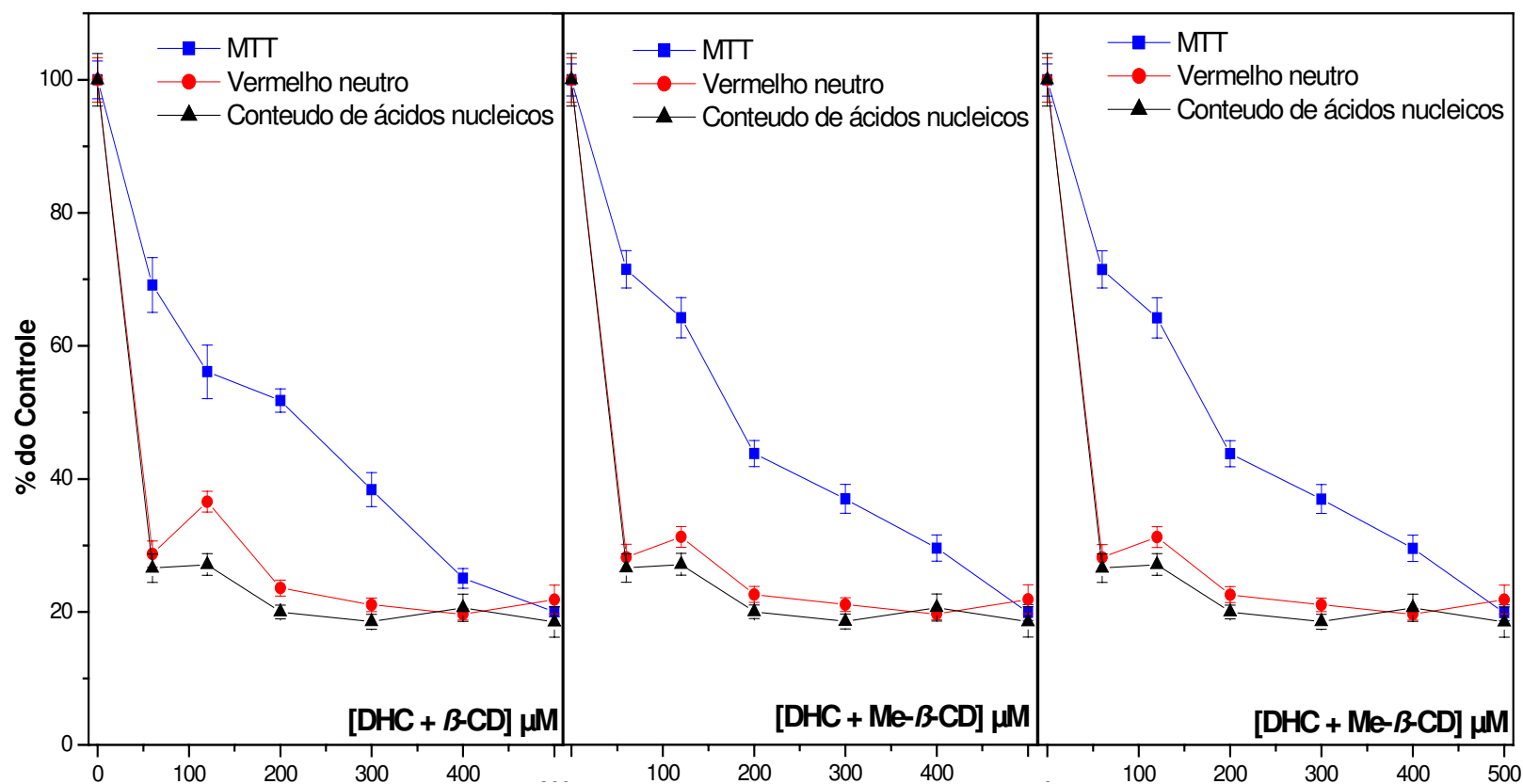


Figura 31. Viabilidade dos hepatócitos após tratamento com misturas físicas de DHC com β-CDs por 20 h. Parâmetros analisados: redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucléicos. Cada ponto representa média ± desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GSH E EXTENSÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM HEPATÓCITOS

A determinação da concentração de GSH e extensão de peroxidação lipídica através da formação de TBARS foram realizadas como descrito em Métodos/Experimental (item III.9, pág. 38). Os resultados são expressos em microgramas e nanomol por miligrama de proteínas totais dos hepatócitos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ – nmol/mg de proteínas), respectivamente, para a concentração de GSH e TBARS, sendo que o valor de proteínas totais calculado para os hepatócitos foi de $1,41 \pm 0,08 \text{ mg}/10^6$ células. Os resultados são apresentados a seguir.

A concentração de GSH nos hepatócitos (**Figura 32**) tratados com DHC livre, comparada ao controle, diminuiu de $21,94 \pm 1,73\%$ a $68,36 \pm 1,15\%$. Nos hepatócitos tratados com DHC nas suas formas veiculadas, a concentração de GSH comparada ao controle diminuiu de $9,70 \pm 1,12\%$ a $64,21 \pm 1,47\%$, de $7,62 \pm 1,91\%$ a $62,82 \pm 1,43\%$, de $6,24 \pm 1,98\%$ a $61,66 \pm 1,30\%$ e de $4,85 \pm 1,89\%$ a $60,73 \pm 1,39\%$ nas veiculações com nanoesferas de PLGA, HP- β -CD, Me- β -CD e β -CD, respectivamente (**Figura 32**).

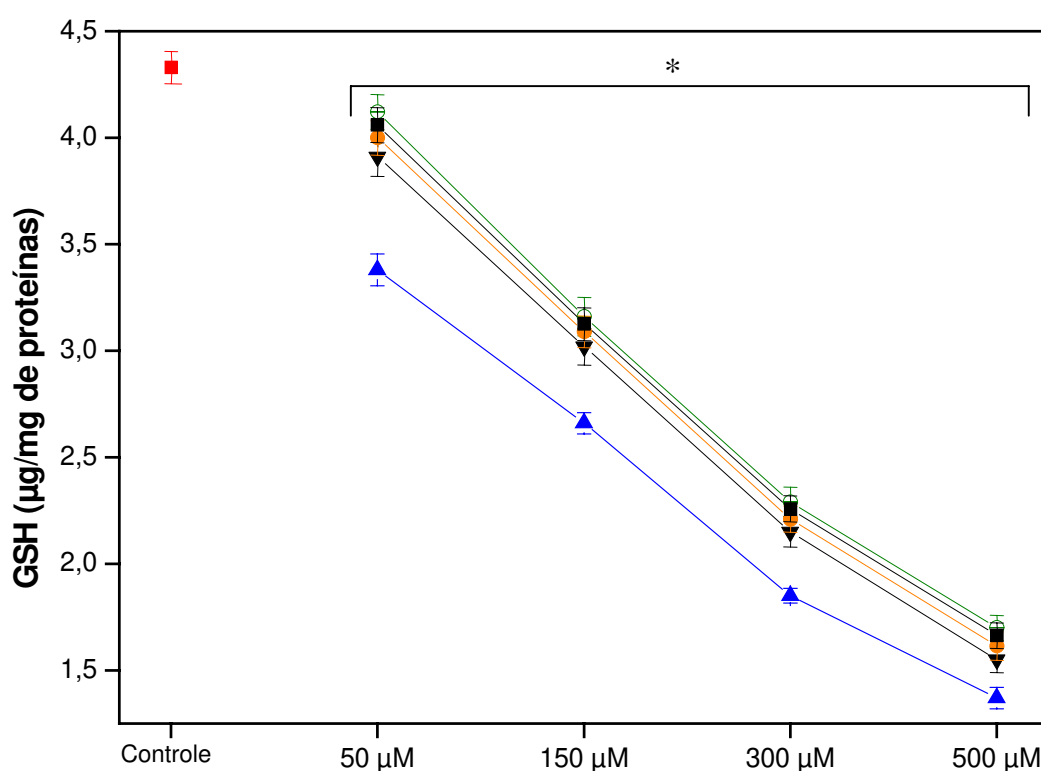


Figura 32. Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) em $\mu\text{g/mg}$ de proteínas nos hepatócitos tratados com DHC e suas formas veiculadas. ■ (controle), ▲ (DHC), ▼ (DHC-PLGA), ● (DHC- β -CD), ● (DHC-HP- β -CD) e ■ (DHC-Me- β -CD). * Estatisticamente diferentes do controle pelo test-t de Student ($p < 0,05$) ($n=3$).

A concentração de TBARS nos hepatócitos (**Figura 33**) tratados com DHC livre, comparada ao controle, aumentou de $48,38 \pm 5,10$ a $255,20 \pm 7,32\%$. Nos hepatócitos tratados com DHC nas suas formas veiculadas, a concentração de TBARS comparada ao controle aumentou de $19,55 \pm 4,88\%$ a $196,09 \pm 5,37\%$, de $16,76 \pm 4,57\%$ a $173,52 \pm 5,21\%$, de $6,37 \pm 5,32\%$ a $163,45 \pm 4,97\%$ e de $2,90 \pm 4,27\%$ a $162,34 \pm 5,54\%$ nas veiculações com nanoesferas de PLGA, HP- β -CD, Me- β -CD e β -CD, respectivamente (**Figura 33**).

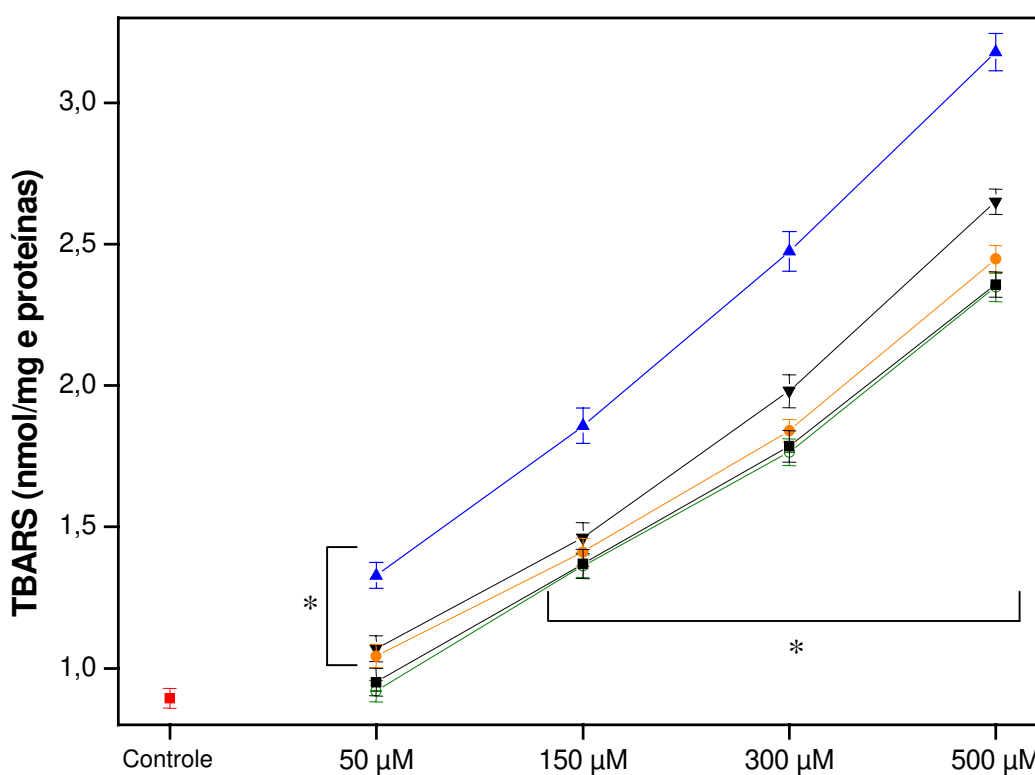


Figura 33. Extensão da peroxidação lipídica determinada por meio da concentração de TBARS em nmol/mg de proteínas nos hepatócitos tratados com DHC e suas formas veiculadas. ■ (controle), ▲ (DHC), ▼ (DHC-PLGA), ● (DHC- β -CD), ● (DHC-HP- β -CD) e ■ (DHC-Me- β -CD). * Estatisticamente diferentes do controle pelo test-t de Student ($p < 0,05$) ($n = 3$).

DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DAS ENZIMAS CP4501A1 E CP4502B1 EM HEPATÓCITOS

A atividade enzimática das enzimas CP4501A1 e CP4502B1 foi medida utilizando os substratos 7-metoxiresorufina e 7-metoxicoumarina, respectivamente; sendo os produtos formados, resorufina e 7-hidroxycoumarina, pela atividade das enzimas 1A1 e 2B1, respectivamente, determinados e quantificados por fluorescência como descrito em Métodos/Experimental (item III.9, pág. 39 e 40 respectivamente). Os resultados são expressos em picomoles do produto formado por minuto por miligrama de proteínas totais dos hepatócitos (pmol/min/mg de proteínas), sendo que o valor de proteínas totais calculado para os hepatócitos foi de $1,41 \pm 0,08$ mg/ 10^6 células. Os resultados são apresentados a seguir.

A atividade enzimática do CP1A1 dos hepatócitos (**Figura 34**) tratados com DHC livre, comparada ao controle, foi inibida de $11,98 \pm 2,37\%$ a $59,32 \pm 3,58\%$. Nos hepatócitos tratados com DHC nas suas formas veiculadas, a atividade enzimática do CP1A1 comparada ao controle foi inibida de $6,97 \pm 2,25\%$ a $56,85 \pm 4,11\%$, de $4,87 \pm 3,64\%$ a $56,18 \pm 3,41\%$, de $3,14 \pm 2,83\%$ a $55,05 \pm 4,63\%$ e de $2,32 \pm 2,19\%$ a $55,2 \pm 4,39\%$ nas veiculações com nanoesferas de PLGA, HP- β -CD, Me- β -CD e β -CD, respectivamente (**Figura 34**).

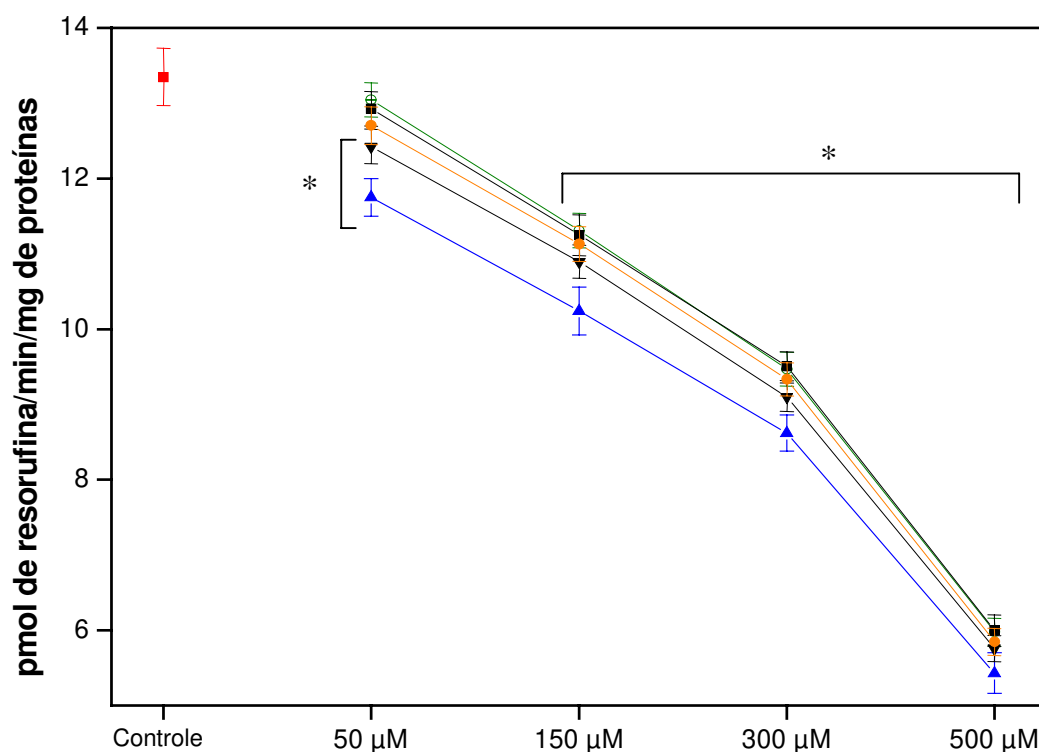


Figura 34. Determinação da atividade enzimática do CP1A1 de hepatócitos tratados com DHC e suas formas veiculadas. Os resultados são expressos como pmol de resorufina/min/mg de proteína hepática. ■ (controle), ▲ (DHC), ▼ (DHC-PLGA), ● (DHC- β -CD), ● (DHC-HP- β -CD) e ■ (DHC-Me- β -CD). * Estatisticamente diferentes do controle pelo test-t de Student ($p < 0,05$) ($n=3$).

A atividade enzimática do CP2B1 dos hepatócitos (**Figura 35**) tratados com DHC livre, comparada ao controle, foi inibida de $9,17 \pm 3,19\%$ a $52,03 \pm 4,13\%$. Nos hepatócitos tratados com DHC nas suas formas veiculadas, a atividade enzimática do CP2B1 comparada ao controle foi inibida de $4,68 \pm 3,66\%$ a $49,08 \pm 3,78\%$, de $2,47 \pm 2,21\%$ a $48,65 \pm 4,07\%$, de $1,97 \pm 1,95\%$ a $48,02 \pm 3,88\%$ e de $1,58 \pm 1,61\%$ a $47,87 \pm 4,73\%$ nas veiculações com nanoesferas de PLGA, HP- β -CD, Me- β -CD e β -CD, respectivamente (**Figura 35**).

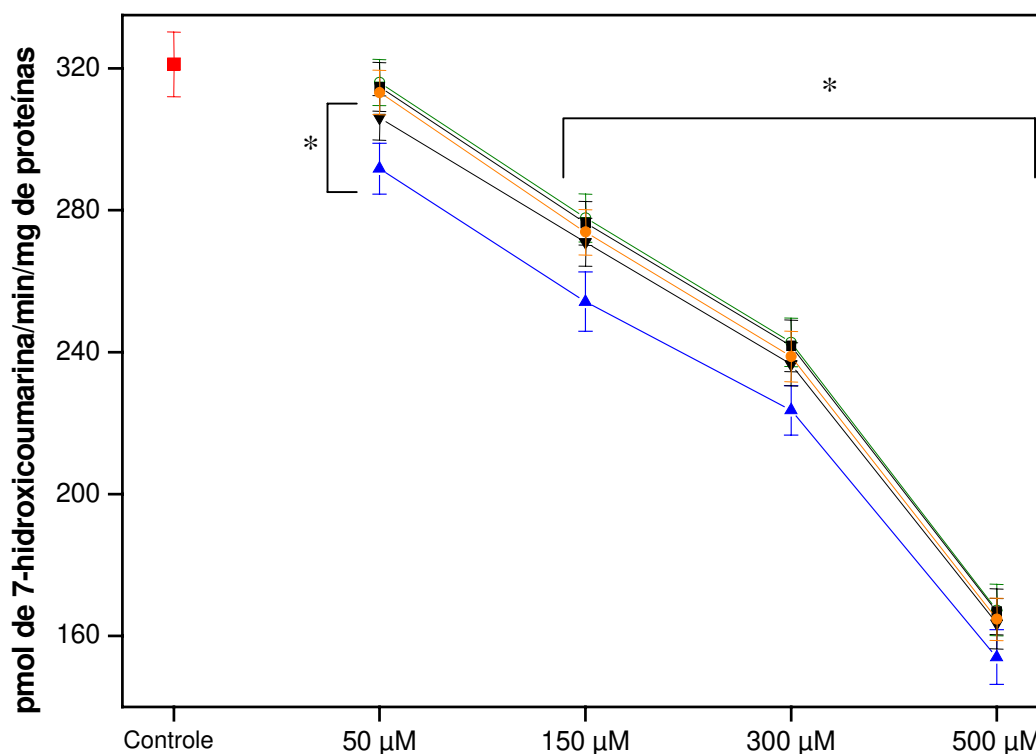


Figura 35. Determinação da atividade enzimática do CP2B1 de hepatócitos tratados com DHC e suas formas veiculadas. Os resultados são expressos como picomol de 7-hidroxycoumarina/min/mg de proteína hepática. ■ (controle), ▲ (DHC), ▼ (DHC-PLGA), ● (DHC- β -CD), ● (DHC-HP- β -CD) e ■ (DHC-Me- β -CD). * Estatisticamente diferentes do controle pelo test-t de Student ($p < 0,05$) ($n=3$).

V-DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO DAS FORMAS DE VEICULAÇÃO DA DHC

Os sistemas de liberação controlada oferecem várias vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos. Nas formas de administração convencionais (nebulização "spray", injeção, pílulas) a concentração da droga na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina. Considerando-se que cada droga possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato se torna problemático se a dose efetiva do fármaco estiver próxima à sua dose tóxica. O objetivo dos sistemas de liberação controlada é permitir a vetorização dos fármacos a fim de manter a concentração do mesmo entre os níveis terapêutico e tóxico por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem.

Dentre os vetores empregados como sistemas de liberação controlada, temos os coloidais constituídos por lipossomas e micro/nanopartículas poliméricas, e as ciclodextrinas, que vem se mostrando como promissoras formas de liberação controlada de fármacos (Hirayama & Uekama, 1999; Schaffazick *et al.*, 2003). Grande atenção vem sendo direcionada para o desenvolvimento de sistemas terapêuticos parenterais como formulações destinadas para a liberação de fármacos sítios-específicos, que é no que consiste o principal objetivo em se tratando de vetorização de antitumorais, como a DHC, por exemplo. (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996).

Em nossos estudos tivemos por enfoque a comparação da citotoxicidade da DHC veiculada em nanoesferas poliméricas preparadas a partir do copolímero do ácido láctico e glicólico (PLGA) e complexada em β -CD e derivados (Me- β -CD e HP- β -CD) com a DHC na sua forma livre. A análise comparativa da citotoxicidade foi realizada frente a duas linhagens celulares: células sem capacidade de metabolização através do sistema P450 (células V79) e em células com capacidade de biotransformação (cultura primária de hepatócitos).

As nanoesferas de PLGA contendo DHC foram preparadas pelo método de evaporação do solvente associado ao método de difusão da emulsificação espontânea (Ferdous *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 1999), com algumas modificações. O tamanho médio obtido para as nanopartículas de PLGA vazias e de PLGA contendo DHC foi de 628 nm e 821 nm, respectivamente, com índice de polidispersão de 0,517 e 0,684, respectivamente (**Tabela 4, pág. 42**). De forma geral as nanoesferas apresentaram uma distribuição unimodal, com índice médio de polidispersão. Muitos estudos têm sido desenvolvidos na avaliação dos principais fatores que afetam o diâmetro das partículas de sistemas nanoestruturados. A composição quali-quantitativa e o método de preparação são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersão das partículas (Schaffazick *et al.*, 2003). Uma outra observação importante é que a presença do polímero pré-formado (método de deposição do polímero pré-formado, utilizado em nossos estudos) pode conduzir à diminuição do tamanho das partículas em relação à emulsão devido a um efeito estabilizador do polímero ao redor das gotículas (Losa *et al.*, 1993; Schaffazick *et al.*, 2003).

A presença do fármaco, assim como o tensoativo utilizado no meio reacional pode provocar alteração no tamanho das partículas (Vandervoort & Ludwig, 2001). Inicialmente, obtivemos partículas de tamanho da ordem de micrômetros – entre 1,4 e 2,1 μm (dados não mostrados). Ao longo da padronização da técnica de preparação, com alterações nos métodos e tempos de agitação, assim como utilização de diferentes tensoativos, o tamanho das partículas diminuiu, assim como o índice de polidispersão. Segundo Ferdous e colaboradores (1998), os métodos de agitação, sonicação e homogeneização, em combinação ou não, apresentam diferentes efeitos no tamanho final das partículas, assim como na superfície das mesmas. A combinação dos três métodos provoca significativa diminuição no tamanho das partículas.

Inicialmente utilizou-se como tensoativo, apenas o PVA de alta massa molecular (127.000 Da). Esta preparação apresentou muitos problemas de agregação de partículas (**Figura 6 a-b, pág. 43**). Em seguida, passou-se a utilizar como tensoativos o PVA de alta massa molecular e pluronic F68 (massa molecular de 8.400 Da). Neste caso, a preparação melhorou em relação à dispersão, fato que está associado à diminuição de formação de agregados. Em uma etapa posterior, utilizou-se como tensoativos PVA de menor massa molecular (massa molecular de 30.000 – 70.000 Da) e pluronic F68 (**Figura 6 c, pág. 43**). Esta última preparação apresentou a melhor dispersão em relação às anteriores e baixa agregação

De acordo com os resultados, podemos sugerir que durante o processo de homogeneização há uma difusão rápida do solvente (acetona) através da interface, produzindo uma fina emulsão. O PVA de alta massa molecular utilizado inicialmente atuou como tensoativo durante a emulsificação e a DHC foi adsorvida ao polímero durante esse processo. A sonicação e utilização do PVA de baixa massa molecular juntamente com o

Pluronic F68 causaram redução no tamanho das partículas e, simultaneamente com agitação magnética conduziu à evaporação do solvente e endurecimento do polímero na superfície das nanoesferas.

A eficiência de encapsulação da DHC nas nanoesferas de PLGA variou ao longo da padronização do método utilizado na confecção das mesmas, sendo que na primeira preparação a eficiência foi de $50,75 \pm 1,2\%$ (dado não mostrado), chegando a $83,2 \pm 2,6$ na última preparação (**Tabela 4, pág. 42**). Em relação à liberação *in vitro* da DHC, a primeira preparação utilizando PVA de alta massa molecular como tensoativo promoveu uma rápida liberação da DHC: $2,17 \pm 0,23\%$ na primeira hora e $100,0 \pm 0,11\%$ em 24 horas (dados não mostrados). A preparação seguinte utilizando PVA de baixa massa molecular e Pluronic F68 como tensoativos promoveu a liberação *in vitro* de $2,0 \pm 0,2\%$, $27,2 \pm 0,9\%$, $48,3 \pm 1,1\%$, $76,4 \pm 1,4\%$, $91,6 \pm 1,2$ e $100,0 \pm 0,2\%$ em 0, 6, 12, 24, 36 e 48 horas, respectivamente, da DHC a partir das nanoesferas (**Tabela 4, pág. 42**). Provavelmente a liberação relativamente rápida da DHC ocorreu devido à droga estar adsorvida principalmente na superfície das nanoesferas (Li *et al.*, 2001). Em relação à associação do fármaco ao sistema nanoestruturado, vários estudos mostram que diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada ao sistema. Entre eles se destacam as características físico-químicas do fármaco (Calvo *et al.*, 1996), as características da superfície das partículas ou a natureza do polímero (Yoo *et al.*, 2005; Vila *et al.*, 2002), a quantidade de fármaco adicionada à formulação (Brasseur *et al.*, 1991), a ordem de adição do fármaco na formulação, ou seja, antes (incorporação) ou após (incubação) à formação das nanoestruturas (Fresta *et al.*, 1995) e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica (Fontana *et al.*, 1998).

Segundo Soppimath e colaboradores (2001), a liberação dos fármacos a partir de sistemas nanoparticulados poliméricos depende de diferentes fatores: a) da deserção do fármaco da superfície das partículas; b) da difusão do fármaco através da matriz polimérica; c) da erosão da matriz polimérica ou d) da combinação dos processos de difusão e erosão.

De acordo com Panyam & Labhasetwar (2003), o comportamento dos sistemas de liberação é dependente da taxa de degradação do polímero. Estes autores relatam que durante a fase inicial, a liberação do agente terapêutico adsorvido ocorre principalmente através de sua difusão na matriz polimérica, enquanto, durante a fase final, a liberação é mediada por ambos, difusão do agente terapêutico pela matriz polimérica e degradação da mesma. Desta forma, Paynam & Labhasetwar (2003) sugerem que a degradação do PLGA ocorra através de um processo autocatalítico de suas ligações éster. Os grupos carboxílicos terminais presentes nas cadeias de PLGA aumentam em número durante o processo de biodegradação conforme as cadeias são clivadas (Crow *et al.*, 2005; Jain, 2000). Vários fatores como morfologia, composição, tacticidade, hidrofobicidade/hidrofilicidade e massa molecular do polímero, assim como a presença de outros aditivos ao mesmo, afetam a taxa de degradação da matriz polimérica (Panyam & Labhasetwar, 2003). Polímeros de PLGA na proporção 50:50 de ácido lático e glicólico são hidrolisados mais rapidamente que aqueles contendo maior proporção de um ou de outro monômero. O ácido lático é mais hidrofóbico que o ácido glicólico e, portanto, polímeros de PLGA com maior quantidade de ácido lático são pouco hidrofílicos, absorvem menos água e subsequentemente degradam-se mais lentamente (Jain, 2000).

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes

no meio aquoso de dispersão (Mosqueira *et al.*, 2000). Nossas preparações de nanoesferas de PLGA vazias e de PLGA-DHC apresentaram potencial zeta em torno de -32 e -25 mV, respectivamente (**Tabela 4, pág. 42**). Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanoesferas adjacentes (Schaffazick *et al.*, 2003).

Os polaxamers (copolímeros de óxidos de etileno e propileno), como por exemplo, o Pluronic e polímeros constituintes das nanoesferas, são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta. Especialmente os poliésteres, como o PLA e lecitinas, fornecem um potencial zeta negativo à interface, enquanto os polaxamers (tensoativos não-iônicos) tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro (Legrand *et al.*, 1999). Desta forma, as nossas preparações realizadas após padronização apresentaram boa estabilidade físico-química tendendo à minimização da agregação entre as partículas, fato este refletido nas determinações do potencial zeta.

A ciclodextrina (CD) pode ser uma molécula “hospedeira” e a “força diretora” da formação do complexo se deve à substituição da alta entalpia das moléculas de água (presentes na cavidade da CD) por uma molécula “hóspede” apropriada. Uma, duas, ou três moléculas de ciclodextrina contêm uma ou mais moléculas “hóspedes” associadas. Na maioria dos casos, a proporção de hóspede-hospedeiro é 1:1, entretanto 2:1, 1:2, 2:2, ou associações mais complexas e estados de equilíbrio maiores podem ocorrer, quase sempre, simultaneamente (Szejtli, 1998). Nos nossos estudos preparamos complexos de inclusão de DHC com β -CDs através do método de coevaporação como descrito por De Azevedo e

colaboradores (2004), sendo esses complexos caracterizados pelas técnicas de difração de raio-X (XRD), calorimetria diferencial de varredura (DSC), análise termogravimétrica (TGA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As técnicas de XRD, DSC e TGA são bem conhecidas por fornecerem uma caracterização qualitativa do estado sólido dos sistemas por comparação dos seus picos de difração e térmicos, respectivamente (Mura, *et al.*, 1999). Os dados da XRD dos complexos de inclusão (**Figuras 12-14, págs. 51-53**) por nós obtidos indicam a formação de um novo composto supramolecular, demonstrando que houve uma interação físico-química entre a DHC e as β -CDs para a formação dos complexos de inclusão. Essa indicação é fundamentada pelo aparecimento de novos picos e pelo perfil amorfo dos difratogramas dos complexos de inclusão comparados aos dos componentes isolados e concomitantemente a ausência dos picos característicos do difratograma da DHC (**Tabela 7**).

Tabela 7. Perfil dos difratogramas obtidos pela técnica de XRD.

Difratograma	Características relevantes
DHC (linha azul, figuras 12, 13 e 14)	picos a $2\theta = 8,0^\circ, 13,5^\circ, 16,5^\circ$ e 24°
β -CD (linha preta, figura 12)	picos a $2\theta = 8,5^\circ, 19,0^\circ$ e 21°
HP- β -CD (linha preta, figura 13)	picos a $2\theta = 12,5^\circ$ e 19°
Me- β -CD (linha preta, figura 14)	sem picos, perfil amorfo
DHC complexada com β -CD (linha vermelha, figura 12)	picos a $2\theta = 12,0^\circ$ e $18,0^\circ$
DHC complexada com HP- β -CD (linha vermelha, figura 13)	sem picos, perfil amorfo
DHC complexada com Me- β -CD (linha vermelha, figura 14)	sem picos, perfil amorfo

A calorimetria diferencial de varredura forneceu dados quantitativos precisos devido ao tratamento das amostras conforme o princípio do pó compensado. Um pico positivo representa uma transição endotérmica e um pico negativo representa uma transição exotérmica (Hausberger & De Luca, 1995). Um processo endotérmico é resultante da fusão ou de uma transição de fase sólido-sólido de primeira ordem que aparece como um pico pontiagudo. Por outro lado, processos químicos tais como decomposição, ocorrem em uma faixa de temperatura mais ampla do que transições de fase de primeira ordem e apresenta-se como um desvio a partir da linha de base.

Os termogramas da DSC dos complexos de inclusão comparados ao da DHC, não apresentaram os picos endotérmicos a 135,47°C e 416,17°C atribuídos ao ponto de fusão e ao colapso térmico da DHC, respectivamente (**Figuras 15-17, págs. 54-56**). Esse resultado, corroborado com as diferenças de amplitude e área dos picos dos termogramas dos compostos de inclusão, bem como o aparecimento de novos picos nesses termogramas (**Tabela 8**), sugere que novas espécies supramoleculares foram formadas.

Tabela 8. Perfil dos termogramas obtidos pela técnica de DSC.

Termograma	Características relevantes
DHC (linha azul, figuras 15, 16 e 17)	picos a 135,47°C e 416,17°C
β -CD (linha preta, figura 15)	pico entre 143,38°C-167,31°C com 7mW de amplitude
HP- β -CD (linha preta, figura 16)	picos a 160,04°C e 327,46°C com amplitudes de 6,5mW e 8mW, respectivamente
Me- β -CD (linha preta, figura 17)	picos a 158,04°C e 367,56°C com amplitudes de 5mW e 10mW, respectivamente
DHC complexada com β -CD (linha vermelha, figura 15)	pico a 117,49°C e pico entre 143,38°C-167,31°C com área reduzida
DHC complexada com HP- β -CD (linha vermelha, figura 16)	picos a 148,71°C e 326,58°C com amplitudes de 12,3mW e 5mW, respectivamente
DHC complexada com Me- β -CD (linha vermelha, figura 17)	picos a 154,86°C e 366,13°C com amplitudes de 1,5mW e 4,5mW, respectivamente

Analisando-se a região entre 143,38°C e 167,31°C no termograma da β -CD (**Figura 15, linha preta, pág. 54**), observa-se que no termograma do complexo de inclusão (**Figura 15, linha vermelha, pág. 54**) houve uma diminuição dessa área. Essa redução sugere uma interação apolar-apolar com a cavidade da β -CD, via substituição de algumas moléculas de água pela molécula hóspede, no caso a DHC. A cavidade da β -CD tem um diâmetro interno grande o suficiente para a acomodação de um anel aromático ($\sim 7 \text{ \AA}$) (Kalinkova, 1999). Em uma solução aquosa, a cavidade da β -CD, levemente apolar, está ocupada por moléculas de água que estão energeticamente desfavorecidas (interação polar-apolar), podendo ser facilmente substituídas por “moléculas hóspedes” apropriadas que sejam menos polares do que aquelas (Szejtli, 1998).

Os resultados obtidos nas DSCs são reforçados pelas análises termogravimétricas (TGAs). Nas TGAs (**Figuras 18-20, págs. 57-59**) a DHC mostrou baixa estabilidade térmica quando comparada aos complexos de inclusão, iniciando sua decomposição a 250°C chegando a uma decomposição completa a 350°C sem deixar resíduos sólidos. Em contraste, nos complexos de inclusão da DHC com β -CD, HP- β -CD e Me- β -CD, houve a formação de resíduos sólidos a 600°C e 550°C correspondentes a 17%, 6,3% e 8% do material analisado, respectivamente. Na microscopia eletrônica de varredura (MEV) (**Figura 21 pág. 60**) observou-se que o aspecto cristalino da DHC desapareceu nos complexos de inclusão com β -CDs. Estes achados comprovam que de fato houve a formação dos complexos de inclusão da DHC com as β -CDs com conseguinte estabilização da DHC.

CITOTOXICIDADE DAS FORMAS VEICULADAS DE DHC FRENTE ÀS CÉLULAS V79 E HEPATÓCITOS

Os efeitos tóxicos da DHC veiculada nas nanoesferas de PLGA frente às células V79 foram significativamente menores que os encontrados no tratamento com DHC livre (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de IC₅₀ de DHC livre, veiculada em nanoesferas de determinadas em cultura de células V79 e hepatócitos.

Valores de IC ₅₀ em μM (parâmetros de viabilidade)			
Tratamento e linhagem celular	Redução do MTT	Vermelho neutro	Conteúdo de ácidos nucléicos
DHC livre (V79)	400	>500	225
DHC-PLGA (V79)	-	>500	175
DHC livre (Hepatócitos)	144	31	25
DHC-PLGA (Hepatócitos)	462	266	116

Os resultados de citotoxicidade mostram que houve alterações nos três parâmetros de viabilidade analisados (redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucléicos) nas células V79 e hepatócitos quando tratadas com DHC veiculada em nanoesferas de PLGA.

Na maior concentração testada (500 μM de DHC-PLGA) no tratamento de V79 com DHC veiculada em nanoesferas de PLGA (pág. 47) observou-se um aumento de 13% na capacidade dessas células em reduzir o MTT comparado ao controle (células V79 em meio DMEM; pág. 46). Esse aumento da capacidade das células V79 em reduzir o MTT pode ser reflexo de alguma mudança nos níveis citosólicos de NAD(P)H ou estar relacionado com

alguma interação entre as partículas de PLGA e a membrana celular ou ainda a possíveis efeitos de resíduos do polímero.

Bernhard e colaboradores (2003) sugerem que em mitocôndrias intactas o MTT é reduzido a formazan pela enzima succinato-desidrogenase da cadeia respiratória. Embora a redução do MTT seja atribuída à atividade da cadeia respiratória mitocondrial, estudos detalhados com homogenatos de fígado e hepatócitos intactos mostram que a redução do MTT pelos hepatócitos avalia predominantemente o balanço $[NAD(P)^+]/[NAD(P)H]$ (Melo *et al.*, 2002). Em outro estudo com linhagens de células derivadas de tumores cerebrais de rato, foi observado que o MTT não é reduzido exclusivamente na mitocôndria, mas também em vesículas intracelulares, algumas dessas vesículas identificadas como sendo endosomas e lisosomas; além disso, foi observado que o MTT não se difunde pela membrana, mas sim internalizado através da endocitose, enquanto que sua forma reduzida (formazan) primeiramente se acumula no compartimento endosomal/lisosomal e em seguida é transportado até a superfície da célula através da exocitose (Bernhard *et al.*, 2003). O teste de redução do MTT é considerado válido como medida da viabilidade celular porque mede a endocitose, um processo fundamental da maioria das células vivas. Contudo, fatores afetando a endocitose do MTT, a exocitose do formazan e a atividade da “MTT-redutase” celular, irão todos afetar a redução do MTT (Melo *et al.*, 2002).

Considerando-se a razão entre os valores de IC_{50} encontrados nos tratamentos com a DHC veiculada em nanoesferas de PLGA e DHC livre, notamos que a hepatotoxicidade da DHC quando veiculada em nanoesferas de PLGA (**Figura 11, pág. 49**) foi aproximadamente 3,21, 4,64 e 8,58 vezes menor quando comparado ao tratamento com DHC livre (**Figura 10, pág. 48**) frente aos testes de redução do MTT, conteúdo de ácidos nucleicos e incorporação do vermelho neutro, respectivamente (**Tabela 9, pág. 89**).

A comparação dos valores de IC_{50} observados nas duas linhagens celulares (células V79 e hepatócitos) submetidas aos tratamentos com DHC livre e DHC veiculada em nanoesferas de PLGA, mostra que a veiculação da DHC nas nanoesferas de PLGA diminuiu de maneira significativa os efeitos tóxicos da DHC, principalmente nos hepatócitos. A acentuada diminuição da hepatotoxicidade da DHC quando veiculada nas nanoesferas de PLGA pode estar relacionada à menor exposição dos hepatócitos à DHC, permitindo uma menor produção de metabólitos da DHC através da biotransformação dependente do sistema P450. É sabido que a biotransformação da DHC nos hepatócitos gera metabólitos potencialmente mais tóxicos as essas células comparativamente a DHC livre (Melo *et al.*, 2002). Com a menor exposição dos hepatócitos a DHC, menor é a produção destes metabólitos e consequentemente menor os efeitos tóxicos causados.

A avaliação comparativa da citotoxicidade dos complexos de inclusão de DHC com β -CDs (β -CD, HP- β -CD e Me- β -CD) e DHC livre mostra que esses complexos proporcionaram uma diminuição significativa da citotoxicidade da DHC frente às células V79 e hepatócitos nos três parâmetros de viabilidade estudados (**Tabela 10, pág. seguinte**). Nas células V79, os complexos de inclusão não acarretaram mudanças significativas de citotoxicidade frente ao teste de incorporação do vermelho neutro ($IC_{50} > 500$) quando comparado ao tratamento com DHC livre. Entretanto nos demais testes – redução do MTT e conteúdo de ácidos nucléicos, a citotoxicidade foi menor. Com relação ao tratamento das células V79 com as misturas físicas de DHC e β -CDs, também foi observado uma diminuição significativa da citotoxicidade (**Tabela 10, pág. seguinte**).

Tabela 10. Resultados dos testes de viabilidade celular realizados nas células V79 submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamento	Valores de IC ₅₀ em μ M (parâmetros de viabilidade)		
	MTT	Vermelho neutro	Conteúdo de ácidos nucléicos
DHC	400	>500	225
DHC- β -CD	676	IC ₂₀ = 400	420
DHC-HP- β -CD	500	IC ₂₀ = 500	342
DHC-Me- β -CD	>500	IC ₂₅ = 500	416
DHC + β -CD	IC ₂₀ = 500	>500	420
DHC + HP- β -CD	IC ₂₀ = 464	>>500	315
DHC + Me- β -CD	IC ₂₅ = 500	IC ₂₀ = 500	300

Nos hepatócitos, o tratamento com os complexos de inclusão de DHC com β -CDs, de maneira geral, acarretou uma menor hepatotoxicidade frente a todos os testes de viabilidade analisados (redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucléicos) comparado aos obtidos no tratamento com DHC livre. Dos complexos de inclusão, a DHC- β -CD foi a que acarretou uma diminuição mais acentuada na hepatotoxicidade da DHC (**Tabela 11, pág. seguinte**) tratamento com as misturas físicas de DHC e β -CDs, essas acarretaram uma diminuição da hepatotoxicidade da DHC pouco acentuada comparada aos complexos de inclusão (**Tabela 11, pág. seguinte**).

Tabela 11. Resultados dos testes de viabilidade celular realizados nos hepatócitos submetidos a diferentes tratamentos.

Tratamento	Valores de IC ₅₀ em μ M (parâmetros de viabilidade)		
	MTT	Vermelho neutro	Conteúdo de ácidos nucleicos
DHC	144	31	25
DHC- β -CD	500	>500	254
DHC-HP- β -CD	390	430	176
DHC-Me- β -CD	352	495	162
DHC + β -CD	213	38	40
DHC + HP- β -CD	175	46	42
DHC + Me- β -CD	171	42	42

Nas condições utilizadas nos tratamentos, as β -CDs livres (1 mM) não foram tóxicas para as células V79 e hepatócitos (dados não mostrados). Uma vez que as β -CDs não apresentaram toxicidade na faixa de concentração (100 μ M a 1.000 μ M) usada nos experimentos, a baixa citotoxicidade dos complexos de inclusão quando comparada a DHC livre pode ser atribuída a formação de um complexo “hóspede-hospedeiro” entre a DHC e as β -CDs, evitando desse modo os efeitos secundários da DHC.

Com base nos resultados obtidos da avaliação comparativa da citotoxicidade frente aos testes de viabilidade celular – redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos – sugerimos que os sistemas de liberação controlada estudados neste trabalho proporcionam uma diminuição significativa dos efeitos tóxicos da DHC nas células V79 e em hepatócitos, sendo que nestas últimas, a diminuição foi mais acentuada se comparada à observada nas células V79; achado este em perfeito acordo com

a literatura que demonstra que o uso de sistemas de liberação controlada diminui os efeitos colaterais potencialmente causados pelos mais diversos fármacos (Hirayama & Uekama, 1999; Langer, 1998; Soppimath *et al.*, 2001).

CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH), EXTENSÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS CP450 EM HEPATÓCITOS TRATADOS COM AS FORMAS VEICULADAS DE DHC

Nos hepatócitos, além dos testes de redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucléicos, estes também foram analisados quanto à determinação e quantificação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), peroxidação de lipídica e atividade enzimática de duas enzimas (1A1 e 2B1) da família do citocromo P450 do sistema de metabolização de drogas.

Os hepatócitos tratados com DHC livre apresentaram considerável diminuição concentração-dependente dos níveis de GSH e aumento da produção de TBARS comparados ao controle (hepatócitos em meio DMEM suplementado) (**Figuras 32 e 33; págs. 75 e 76, respectivamente**). O aumento significativo da peroxidação lipídica observada no tratamento com DHC livre, provavelmente, é resultado do aumento de algumas das espécies oxidantes como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila ($\bullet OH$), produzidas durante as reações de biotransformação da DHC pelo sistema CP450. Essas espécies oxidantes são consideradas iniciadores de processos de lipoperoxidação (Gutteridge *et al.*, 1979). Por outro lado sabemos que um aumento de peroxidação lipídica também pode ser devido à depleção de GSH (efeito

detectado em nossos experimentos), já que essa substância é considerada um potente inibidor do processo de peroxidação lipídica (Haenen & Bast, 1983). Quando há um desequilíbrio entre espécies oxidantes e do sistema de defesa antioxidante (depleção de GSH), pode ocorrer um estresse oxidativo. Entre os danos oxidativos causados nas células, a peroxidação de lipídeos é a mais bem conhecida.

Sugerimos que a depleção de GSH nos hepatócitos induzida por DHC traz associado um aumento concentração-dependente na produção de TBARS. Análises de espectros UV/Vis de DHC na presença de GSH revelaram que a DHC forma conjugados com a GSH o que leva a uma diminuição da concentração de GSH disponível no sistema (Anazetti *et al.*, 2004). Além dos fatores discutidos anteriormente, a depleção de GSH detectada nos hepatócitos tratados com DHC livre, pode ser resultante da ligação do grupo $O=C-C=CH_2$ presente na DHC a grupamentos tiol da GSH. Esta conjugação, além de contribuir para a depleção dos níveis de GSH, induz um aumento na produção de TBARS.

Nos hepatócitos tratados com DHC veiculada em nanoesferas de PLGA e β -CDs foi observada uma diminuição concentração-dependente menos acentuada na concentração de GSH comparada à vista no tratamento com DHC (**Figura 32, pág. 75**). Com relação aos respectivos tratamentos com diferentes concentrações de DHC livre, esses valores foram estatisticamente diferentes dos observados nos tratamentos com DHC veiculada em nanoesferas de PLGA ($p<0,05$; $n=3$), DHC complexada com β -CD ($p<0,005$; $n=3$), DHC complexada com HP- β -CD ($p<0,01$; $n=3$) e DHC complexada com Me- β -CD ($p<0,005$; $n=3$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores observados nos tratamentos com DHC nas suas formas veiculadas.

Com relação à extensão de peroxidação lipídica nos hepatócitos, foi observado um aumento concentração-dependente da produção de TBARS menos acentuado comparado ao observado no tratamento com DHC (**Figura 33, pág. 76**). Com relação aos respectivos tratamentos com diferentes concentrações de DHC livre, esses valores foram estatisticamente diferentes dos observados nos tratamentos com DHC veiculada em nanoesferas de PLGA ($p < 0,005$; $n=3$), DHC complexada com β -CD ($p < 0,0005$; $n=3$), DHC complexada com HP- β -CD ($p < 0,01$; $n=3$) e DHC complexada com Me- β -CD ($p < 0,001$; $n=3$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores observados nos tratamentos com DHC nas suas formas veiculadas. Esses resultados sugerem que nos tratamentos com a DHC nas suas formas veiculadas ocorreria uma menor exposição dos hepatócitos à DHC, além de, como discutido anteriormente, produzir uma estabilização da DHC diminuindo assim os efeitos secundários da mesma quando veiculada.

Foi constatada uma inibição concentração-dependente das atividades enzimáticas das enzimas CP1A1 e CP2B1 (**Figuras 34 e 35; págs. 78 e 79, respectivamente**) nos hepatócitos tratados com DHC livre quando comparadas ao controle (hepatócitos em meio DMEM suplementado). Nos hepatócitos tratados com as quatro formas de veiculação da DHC constatou-se uma inibição menos acentuada na atividade das enzimas CP1A1 e CP2B1 (**Figuras 34 e 35; págs. 78 e 79, respectivamente**) quando comparadas aos hepatócitos tratados com DHC livre. Com relação aos respectivos tratamentos com as quatro diferentes concentrações de DHC livre como descrito em Métodos/Experimental (item III.9), nem todos os valores observados nos tratamentos com DHC nas suas quatro formas veiculadas foram estatisticamente diferentes.

Drogas contendo terminações olefínicas ou substituintes acetilênicos (ligações duplas ou triplas entre carbono-carbono no fim de um grupamento funcional) são conhecidas como substratos suicidas para as proteínas do sistema P450. A DHC possui um substituinte acetilênico na posição 13, podendo, portanto, agir como substrato inibidor de citocromos P450 (Melo, *et al.*, 2002), justificando os resultados observados acima. A inibição menos acentuada das enzimas CP1A1 e CP2B1 observada nos hepatócitos tratados com a DHC nas suas formas veiculadas, comparada ao observado no tratamento com DHC livre, pode ser justificado, como discutido anteriormente, pela estabilização da DHC quando veiculada nos sistemas de liberação controlada estudados neste trabalho, provocando assim possíveis alterações nas vias reacionais da DHC.

Com base nos resultados por nós obtidos, verificou-se que a inclusão da DHC nas ciclodextrinas comparada à incorporação da DHC nas nanoesferas de PLGA acarretou uma diminuição mais acentuada dos efeitos tóxicos da DHC, tanto nas células V79 quanto nos hepatócitos, frente aos testes de viabilidade celular (redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucléicos). As ciclodextrinas podem acelerar ou desacelerar vários tipos de reações com características cinéticas semelhantes aquelas das reações enzimáticas, i.e., formação de complexo enzima-substrato, inibição competitiva, saturação, e catálise estereoespecífica (Szejtli, 1988); e que a mais importante consequência da interação entre uma molécula hóspede, de baixa solubilidade e uma ciclodextrina em meio aquoso é a redução da citotoxicidade, sugerimos que a diminuição dos efeitos tóxicos da DHC deve-se à modificação da reatividade da molécula incluída na ciclodextrina. Na maioria dos casos, a reatividade decresce em razão da estabilização da molécula hóspede, mas, em outros casos a ciclodextrina comporta-se como uma enzima artificial que pode acelerar e modificar as vias de reação (Szejtli, 1988). A taxa de reação é modificada pela

inclusão porque a molécula hóspede é transferida do meio aquoso polar para um menos polar (cavidade da ciclodextrina), este processo é denominado de efeito microsolvente. O inverso, um aumento da taxa de reatividade acontece quando moléculas hóspedes, flexíveis, são forçadas a ajustar-se a uma conformação mais reativa (Griffiths & Bender, 1973).

VI. CONCLUSÕES

- Nanoesferas de PLGA incorporando DHC e complexos de inclusão de DHC com β -CDs foram preparados;
- Os resultados de caracterização físico-química das nanoesferas de PLGA incorporando DHC e dos complexos de inclusão de DHC com β -CD, HP- β -CD e Me- β -CD comprovam a formação dessas formulações;
- A eficiência de encapsulação da DHC em nanoesferas de PLGA foi satisfatória, entretanto;
- Considerando-se um potencial uso da DHC como antitumoral, o que exigiria um longo período de aplicação (mais de uma semana), a cinética de liberação da DHC a partir das nanoesferas de PLGA foi insatisfatória, não nos permitindo classificar esse sistema de liberação sustentada como de longa duração;
- O estudo da citotoxicidade basal através dos biomarcadores escolhidos neste trabalho (redução do MTT, incorporação do vermelho neutro e conteúdo de ácidos nucleicos) demonstra que a DHC na sua forma veiculada, tanto em nanoesferas de PLGA quanto em β -CDs, apresenta menores efeitos tóxicos em células V79 e em hepatócitos quando comparados à DHC livre, sendo essa diminuição muito mais acentuada nos hepatócitos;
- Comparando as diferentes formulações de veiculação de DHC estudadas neste trabalho, observou-se que nos ensaios de citotoxicidade basal a DHC complexada com β -CDs acarretou uma diminuição dos efeitos citotóxicos da

DHC mais acentuada quando comparada aos resultados obtidos com a DHC veiculada em nanoesferas de PLGA;

- Foi constatada uma diminuição menos acentuada nos níveis de GSH nos hepatócitos tratados com DHC veiculada em nanoesferas de PLGA e em β -CDs quando comparada aos resultados obtidos no tratamento com DHC livre, não havendo, entretanto, diferenças significativas entre as diferentes formulações de veiculação;
- Foi constatado um aumento menos acentuado na extensão da peroxidação lipídica nos hepatócitos tratados com DHC veiculada em nanoesferas de PLGA e em β -CDs quando comparada aos resultados obtidos no tratamento com DHC livre, não havendo, entretanto, diferenças significativas entre as diferentes formulações de veiculação;
- Foi constatada uma inibição menos acentuada das atividades enzimáticas de CP4501A1 e CP4502B1 nos hepatócitos tratados com DHC veiculada em nanoesferas de PLGA e em β -CDs quando comparada aos resultados obtidos no tratamento com DHC livre, não havendo, entretanto, diferenças significativas entre as diferentes formulações de veiculação;
- Em geral, dos complexos de inclusão estudados neste trabalho, o complexo de inclusão de DHC com β -CD se mostrou mais eficiente para diminuir os efeitos adversos da DHC.

VII. PERSPECTIVAS

- Novos estudos são necessários para avaliar o impacto da veiculação da DHC frente às funções biológicas desse composto, como: efeitos antiinflamatório, anti-tumoral, antiulcerogênico, entre outros;
- Testes de toxicidade *in vivo* são necessários para uma avaliação mais precisa e direta das vantagens e ou desvantagens das formulações de DHC estudadas neste trabalho;
- Novas formulações de veiculação de DHC utilizando diferentes PLGAs, como PLGA 65:35, 75:25 e 85:15, podem ser estudados com o objetivo de encontrar um sistema que apresente uma taxa mais lenta de liberação da DHC, podendo assim, minimizar os efeitos secundários e maximizar os efeitos terapêuticos da DHC.

VIII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anazetti, M.C.; Melo, P.M.; Durán, N.; Haun, M. (2004). Dehydrocrotonin and its derivative, dimethylamide-crotonin induce apoptosis with lipid peroxidation and activation of caspases -2, -6 and -9 in human leukemic cells HL60. *Toxicology*, 203: 123-137.
- Anazetti, M.C.; Melo, P.M.; Durán, N.; Haun, M. (2003). Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology*, 188: 261-274.
- Anazetti, M.C.; Melo, P.S.; Durán, N.; Haun, M. (2002). Cytotoxicity of ϵ -polycaprolactone nanospheres incorporating dehydrocrotonin on leukemic cells. Proceeding in Brazil, First Brazilian Winter School on Nanobiotechnology, pp. 175-178.
- Anazetti, M.C.; Melo, P.S.; Durán, N.; Haun, M. (2001). Dimethylamide-Crotonin inhibits HL60 cells growth with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Prata, A. (Editor). 34: supl. II pp. 252-253.
- Aoyama, H.; Melo, P.S.; Granjeiro, P.A.; Haun, M.; Ferreira, C.V. (2000). Cytotoxicity of okadaic acid and kinetic characterization of protein tyrosine phosphatase activity in V79 fibroblasts. *Pharm. Pharmacol. Commun.*, 6: 331-334.
- Athanasiou, K.A., Niederauer, G.G., Agrawal, C.M. (1996). Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, 17: 93-102.
- Babich, H.; Borefreund, E. (1990). Applications of the neutral red cytotoxicity assay to *in vitro* toxicology. *ATLA*, 18: 129-144.
- Barile, F. A.; Cardona, M. (1998). Acute cytotoxicity testing with cultured human lung and dermal cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 34: 631-635.
- Bernhard, D.; Schwaiger, W.; Crazzolara, R.; Tinhofer, I.; Kofler, R.; Csordas, A. (2003). Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer Lett.*, 195: 193-199.

- Blaauboer, B.J.; Boobis, A.R.; Castell, J.V.; Coecke, S.; Groothuis, G.M.M.; Guillouzo, A.; Hall, T.J.; Hawksworth, G.M.; Lorenzon, G.; Miltenburger, H.G.; Rogiers, V.; Skett, P.; Villa, P.; Wiebel, F.J. (1994). The practical applicability of hepatocyte cultures in routine testing - the report and recommendations of ecvam workshop .1. *ATLA*, 22: 231-241.
- Blanco-Prieto, M.J., Fattal, E., Puisieux, F., Couvreur, P. (1998). The multiple emulsion as a common step for the design of polymeric microparticles. In: Grossiord, J.L., Seiller, M. Multiple emulsions: structure, properties and applications. França: Éditions de Santé; p.397-435
- Bondy, S.C.; Naderi, S. (1994). Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive species. *Biochem. Pharmacol.*, 48: 155-179.
- Borenfreund, E.; Puerner, J.A. (1984). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. Tiss. Cult. Meth.*, 9: 7-9.
- Brasseur, N.; Brault, D.; Couvreur, P. (1991). Adsorption of hematoporphyrin onto polyalkylcyanoacrylate nanoparticles - carrier capacity and drug release. *Int. J. Pharm.*, 70: 129-135.
- Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54: 631-651.
- Brigger, I.; Chaminade, P.; Marsaud, V.; Appel, M.; Besnard, M.; Gurny, R.; Renoir, M.; Couvreur, P. (2001). Tamoxifen encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. A new antiestrogen formulation. *Int J Pharm.*, 214: 37-42.
- Brito, H.F.; Carvalho, C.A.A.; Malta, O.L.; Passos, J.J.; Menezes, J.F.S.; Sinisterra, R.D. (1999). Spectroscopic study of the inclusion compound of beta-cyclodextrin and Tris(dibenzoylmethane)europium(III) dihydrate. *Spectrochimica Acta.*, 55: 2403-2410.
- Burke, M.D.; Thompson, S.; Elcombe, C.R.; Halpert, J.; Haaparanta, T.; Mayer, R.T. (1985). Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol.*, 34: 3337-3345.
- Calvo, P.; Vila-Jato, J.L.; Alonso, M.J. (1996). Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug

- Chandy, T.; Das, G.S.; Rao, G.H. (2000). 5-Fluorouracil-loaded chitosan coated polylactic acid microspheres as biodegradable drug carriers for cerebral tumours. *J. Microencapsul.*, 17: 625-638.
- Chellat, F.; Merhi, Y.; Moreau, A.; Yahia, L. (2005). Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. *Biomaterials*, 26: 7260-7275.
- Cingi, M.R.; De Angelis, I.; Fortunati, E.; reggiani, D.; Bianchi, V.; Tiozzo, R.; Zucco, F. (1991). Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: A multicentre approach. *Toxicol. In Vitro*, 5: 119-125.
- Clemedson, C.; Nordin-Andersson, M.; Bjerregaard, H.F.; Clausen, J.; Forsby, A.; Gustafsson, H.; Hansson, U.; Isomaa, B.; Jorgensen, C.; Kolman, A.; Kotova, N.; Krause, G.; Kristen, U.; Kurppa, K.; Romert, L.; Scheers, E. (2002). Development of an in vitro test battery for the estimation of acute human systemic toxicity: An outline of the EDIT project. *ATLA.*, 30: 313-321.
- Clemedson, C.; McFarlane-Abdulla, E.; Andersson, M.; Barile, F.A.; Calleja, M.C.; Chesné, C.; Clothier, R.; Cottin, M.; Curren, R.; Daniel-Szolgay, E.; Dierickx, P.; Ferro, M.; Fiskesjö, G.; Garza-Ocañas, L.; Gómez-Lechón, M.J.; Göllden, M.; Isomaa, B.; Janus, J.; Judge, P.; Kahru, A.; Kemp, R.B.; Kerszman, G.; Kristen, U.; Kunimoto, M.; Kärenlampi, S.; Lavrijsen, K.; Lewan, L.; Lilius, H.; Ohno, T.; Persoone, G.; Roguet, R.; Romert, L.; Sawyer, T.W.; Seibert, H.; Shrivastava, R.; Stamatii, A.; Tanaka, N.; Torres-Alanis, O.; Voss, J.U.; Wakuri, S.; Walum, E.; Wang, X.; Zucco, F.; Ekwall, B. (1996). MEIC evaluation of acute systematic toxicity. Part I: methodology of 68 In Vitro toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals. *ATLA.*, 24: 251-272.
- Corrêa, D.H.A.; Melo, P.S.; De Carvalho, C.A.A.; De Azevedo, M.B.M.; Durán, N.; Haun, M. (2005). Dehydrocrotonin and its β -cyclodextrin complex: cytotoxicity on V79 cells and rat cultured hepatocytes. *Eur. J. Pharm.*, 510: 17-24.
- Costa, A.M.L.; Silva, J.C.R.; Campos, A.R.; Rao, V.S.N.; Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C. Antioestrogenic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* Benth. in rats (1999). *Phytother. Res.*, 13: 689-691.
- Cramer, F. (1954). *Einschlussverbindungen (Inclusion compounds)*. Springer-Verlag, Berlin.

- Crow, B.B.; Borneman, A.F.; Hawkins, D.L.; Smith, G.M.; Nelson, K.D. (2005). Evaluation of in vitro drug release, pH change and molecular weight degradation of poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) fibers. *Tiss. Engineer.*, 11: 1077-1084.
- De Azevedo, M.B.M.; De Carvalho, C.A.A.; Durán, N.; Melo, P.S.; Haun, M. (2004). Characterization and properties of the inclusion complex of dehydrocrotonin (DHC) with β -cyclodextrin. Proceeding 12th Symposium International Cyclodextrins, p. 36, Montpellier, France.
- Del Valle, E.M.M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Prog. Biochem. Biophys.*, 39: 1033-1046.
- Denizot, F.; Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*, 89: 271-277.
- Di Stasi, L.C.; Hiruma, C.A.; Guimarães, E.M.; Santos, C.M. (1994). Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. *Fitoter.*, LXV 6: 529-540.
- Di Stasi, L.C.; Santos, E.M.G.; Santos, C.M.; Hiruma, C.A. (1989). Plantas Medicinais da Amazônia. Editora UNESP, São Paulo, Brazil. pp, 127-128.
- Durán, N.; Justo, G.Z.; Melo, P.S.; De Azevedo, M.B.M.; Brito, A.R.; Almeida, A.B.; Haun, M. (2003). Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with beta-cyclodextrin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 81: 387-396.
- Eisebrand, G.; Pool-Zobel, B.; Baker, V.; Balls, M.; Blaauboer, B.J.; Boobis, A.; Carere, A.; Kevekordes, S.; Lhuguenot, J.-C.; Pieters, R and Kleiner, J. (2002). Methods of in vitro toxicology. *Food Chem. Toxicol.*, 40: 193-236.
- Elkind, M.M., Sutton, H. (1959). X-ray damage and recovery in mammalian cells in culture. *Nature*, 184: 1293-1295.
- Farber, J.L.; Kyle, M.E.; Coleman, J.B. (1990). Disease mechanisms of the cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.*, 62: 670-679.

- Farias, R.A.F.; Rao, V.S.N.; Viana, G.S.B.; Silaveira, E.R.; Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C. (1997). Hypoglycemic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. *Planta Med.*, 66: 558-560.
- Fatin-Rouge, N.; Bünzli, J.C.G. (1999). Thermodynamic and structural study of inclusion complexes between trivalent lanthanide ions and native cyclodextrins. *Inorg. Chim. Acta*, 293: 53-60.
- Feng, S.; Huang, G. (2001). Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. *J. Control Release*, 71: 53-69.
- Ferdous, A.J.; Stenbridge, N.Y.; Singh, M. (1998). Role of monensin PLGA polymer nanoparticles and liposomes as potentiator of ricin A immunotoxins in vitro. *J. Control. Release*, 50: 71-78.
- Ferreira, L.F.V.; Lemos, M.J.; Wintgens, V.; Netto-Ferreira, J.C. (1999). Diffuse reflectance technique applied to a fluorescence study of N-alkyl substituted 2,3-naphthalimides included in beta-ciclodextrin and adsorbed in microcrystalline cellulose. *Química Nova*, 22: 522-528.
- Fialho, S.L.; Rego, M.G.B.; Cardillo, J.A.; Siqueira, R.C.; Jorge, R.; Júnior, A.S.C. (2003). Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. *Arq. Bras. Oftalmol.*, 66: 891-896.
- Fontana, G.; Pitarresi, G.; Tomarchio, V.; Carlisi, B.; San Biagio, P.L. (1998). Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of ampicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials*, 19: 1009-1017.
- Freire, A.C.G.; Melo, P.S.; Aoyama, H.; Haun, M.; Durán, N.; Ferreira, C.V. (2003). Cytotoxicity effect of lactone from *Croton cajucara* on human promyelocytic leukemia cells. *Planta Med.*, 69: 67-69.
- Freshney, R.I. (1994). Culture of animal cells: A Manual of Basic Technique. 3rd. ed. (Eds. John Wiley & Sons) Wiley Liss, pp. 287-303.
- Fresta, M.; Puglisi, G.; Giammona, G.; Cavallaro, G.; Micali, N.; Furneri, P.M. (1995). Pefloxacin mesilate-loaded and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles - characterization of the colloidal drug carrier formulation. *J. Pharm. Sci.*, 84: 895-902.

- Giordano, O.S.; Pestchanker, M.J.; Guerreiro, E.; Saad, J.R.; Enriz, R.D.; Rodriguez, A.M.; Jáuregui, E.A.; Guzmán, J.; Maria, A.O.M.; Wendel, H. (1992). Structure-activity relationship in the gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *J. Med. Chem.*, 35: 2452-2458.
- Gomes, M.E.; Reis, R.L. (2004). Biodegradable polymers and composites in biomedical applications: from catgut to tissue engineering. Part 1 Available systems and their properties. *Int. Mat. Rev.*, 49: 261-273.
- Griffiths, D.W.; Bender, M.L. (1973). Orientational catalysis by cyclohexaamylose. *J. Am. Chem. Soc.*, 95: 1679-1680.
- Grynberg, N.F.; Echevarria, A.; Lima, J.E.; Pamplona, S.S.R.; Pinto, A.C.; Maciel, M.A.M. (1999). Anti-tumor activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. *Planta Med.*, 65: 687-689.
- Guengerich, F.P. (1992). Cytochrome P450: advances and prospects. *FASEB J.*, 6: 667-668.
- Guguen-Guillouzo, C.; Guillouzo, A. (1986). Methods for preparation of adult and fetal hepatocytes. In: *Isolated and Cultured Hepatocytes*. A. Guillouzo and C. Guguen-Guillouzo (Eds.), Les Editions INSERM, Paris and John Libbey Eurotext, London, 1-12.
- Guillouzo, A. (1998). Liver cells models in *in vitro* toxicology. *Env. Health Perspect.* 106: 511-531.
- Gutteridge, J.M.C.; Richmond, R.; Halliwell, B. (1979). Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroperoxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem. J.*, 184: 469-472.
- Haenen, G.R.M.M.; Bast, A. (1983). Protection against lipid peroxidation by microsomal glutathione-dependent labile factor. *FEBS Letters*, 159: 24-28.
- Hagiwara, H.; Ione, K.; Uda, H. (1995) A total synthesis of na antibacterial clerodane, 16-hydroxycleroda-3, 13(14)Z-dien-15,16-olide. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1: 757-764.
- Hartree, E.F. (1972). Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48: 422-427.
- Hartwell, J.L.; Abott, B.J. (1969). Antineoplastic principles in plants: recent developments in the field. *Advan. Pharmacol. Chemother.*, 7: 117-123.

- Hausberger, A.G.; De Luca, P.P. (1995). Characterization of biodegradable poly (D,L-lactide-co-glycolide) polymers and microspheres. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13: 747-60.
- Hirayama, F.; Uekama, K. (1999). Cyclodextrin-based controlled drug release system. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 36: 125-141.
- Hiruma-Lima, C.A.; Toma, W.; Souza-Gracioso, J.; Almeida, A.B.A.; Batista, L.M.; Magri, L.; Paula, A.C.B.; Soares, F.R.; Nunes, D.S.; Souza-Brito, A.R.M. (2002). Natural trans-crotonin: the anti-ulcerogenic effect of another diterpene isolated from the bark of *Croton cajucara* Benth. *Biol. Pharm. Bull.*, 25: 452-456.
- Hiruma-Lima, C.A.; Spadari-Bratfisch, R.C.; Kassisse, D.M.; Souza-Brito, A.R.M. (1999). Anti-ulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. *Planta Med.*, 65: 325-330.
- Honma, Y.; Tobe, H.; Makishima, M.; Yokoyama, A.; Okabe-Kado, J. (1998). Induction of differentiation of myelogenous leukemia cells by humulone, a bitter in the hop. *Leuk. Res.*, 22: 605-610.
- Jain, R.; Shah, N.H.; Malick, A.W.; Rhodes, T.C. (1998). Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: Different preparative approaches. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 24: 703-727.
- Jain, R.A. (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 21: 2475-2490.
- Junior, S.V.C. (2004). Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. (Ed. Sebastião V.C. Junior) Artliber. In: MICRONAL/Boletim de aplicação - Transição Vítrea: Uma importante propriedade para caracterização de materiais. Disponível em < www.micronal.com.br/artigostecnicos/transicaovitrea.htm > Acesso em novembro de 2005.
- Kalinkova, G.N. (1999). Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations. *Int. J. Pharm.*, 187: 1-15.
- Kim, S.Y.; Ha, J.C.; Lee, Y.M. (2000). Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)/poly(ϵ -caprolactone) (PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres. II. Thermo-responsive drug release behaviors. *J. Control. Release*, 65: 345-358.

- Kosower, N.; Kosower, E.M. (1978). The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.*, 54: 109-160.
- LaBella, F.S. (1991). Cytochrome P450 enzymes: ubiquitous “receptors” for drugs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 69: 1129-1132.
- Lambert, G.; Fattal, E.; Pinto-Alphandary, H. Guilk, A.; Couvreur, P. (2000). Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotides. *Pharm. Res.*, 17: 707-714.
- Langer, R. (1998). Drug delivery and targeting. *Nature*, 392 (Supp): 5-10.
- Legrand, P.; Barratt, G.; Mosqueira, V.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph. (1999). Polymeric nanocapsules as drug delivery systems - A review. *STP Pharma. Sci.*, 9: 411-418.
- Lewis, D.H. (1990). Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin, M., Langer, R. Biodegradable polymers as drug delivery systems. New York: Marcel Dekker; p.01-41.
- Li, Y-P.; Pei, Y-Y.; Zhang, X-Y.; Gu, Z-H.; Zhou, Z-H.; Yuan, W-F.; Zhou, J-J.; Zhu, J-H.; Gao, X-J. (2001). PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J. Control. Release*, 71: 203-211.
- Lindner, K.; Saenger, W. (1982). Topography of cyclodextrin inclusion complexes .18. Crystal and molecular-structures of cyclomaltoheptaose inclusion complexes with hi and with methanol. *Carbohydrate Res.*, 107: 7-16.
- Loftsson, T.; Masson, M.; Brewster, M.E. (2004). Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.*, 93: 1091-1099.
- Losa, C.; Marchal-Heussler, L.; Orallo, F.; Vila Jato, J.L and Alonso, M.J. (1993). Design of new formulations for topical ocular administration - polymeric nanocapsules containing metipranolol. *Pharm. Res.*, 10: 80-87.
- Loveland, B.E.; Johns, T.C.; Mackay, I.R.; Vaillant, F.; Wang, Z.X.; Hertzog, P. (1992). Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative. *Assays Biochem. Int.*, 27: 501-510.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randal, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Arruda, A.C.; Pamplona, S.G.S.R.; Vanderlinde, F.A.; Lapa, A.J.; Echevarria, A.; Grynberg, N.F.; Côlus, I.M.S.; Farias, R.A.F.; Luna Costa, A.M.; Rao, V.S.N. (2000). Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. *J. Ethnopharm.*, 70: 41-55.
- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Brabo, S.N.; Arruda, A.C. (1998a). Estudo da variação dos teores de terpenóides bioativos isolados de *C. cajucara*, nativos e cultivados no estado do Pará. *Rev. Univer. Rural Série Ciências Exatas Terra* 18/20: 17-34.
- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Brabo, S.N. and Silva, M.N. (1998b). Terpenoids from *C. cajucara*. *Phytochem.*, 49: 823-828.
- Martins, J.E.C. (1989). Plantas medicinais de uso na Amazônia. In: Centros de Estudos Jurídicos do Pará. Belém, Brazil. pp. 92.
- McChesney, J.D.; Clarck, A.M.; Silveira, E.R. (1991). Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*, 1. Hardwickic and 3,4-secotrachylobanoic acids. *J. Nat. Prod.*, 54: 1625-1633.
- Melo, P.S., Durán, N.; Haun, M. (2002). Derivatives of dehydrocrotonin, a diterpene lactone isolated from *Croton cajucara*: cytotoxicity in rat cultured hepatocytes and in V79 cells. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21: 281-288.
- Melo, P.S.; Durán, N.; Haun, M. (2001). Cytotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and *Escherichia coli*. *Toxicology*, 159: 135-141.
- Melo, P.S.; Maria, S.S.; Vidal, B.C.; Haun, M.; Durán, N. (2000). Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Animal*, 36: 539-543.
- Merkli, A., Tabatabay, C., Gurny, R., Heller, J. (1998). Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. *Prog. Polym. Sci.*, 23: 563-80.
- Miglietta, A.; Cavalli, R.; Bocca, C.; Gabriel, L.; Gasco, M.R. (2000). Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. *Int. J. Pharmaceutics*, 210: 61-67.
- Morel, F.; Beaune, P.H.; Ratanasavanh, D. (1990). Expression of cytochrome p-450 enzymes in cultured human hepatocytes. *Eur. J. Biochem.*, 191: 437-444.
- Morton, S.; Mitchell, M.C. (1985). Effects of chronic ethanol feeding on glutathione turnover in the rat. *Biochem. Pharm.*, 34: 1559-1563.

- Mosqueira, V.C.F.; Legrand, P.; Pinto-Alphandary, H.; Puisieux, F.; Barratt, G. (2000). Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J. Pharm. Sci.*, 89: 614-626.
- Mura, P.; Faucci, M.T.; Parrini, P.L.; Furlanetto, S.; Pinzauti, S. (1999). Influence of the preparation method on the physico-chemical properties of ketoprofen-cyclodextrin binary systems. *Int. J. Pharm.*, 179: 117-128.
- Murakami, H.; Kobayashi, M.; Takeuchi, H.; Kawashima, Y. (1999). Preparation of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent method. *Int. J. Pharm.*, 187: 143-152.
- Narasimhan, T.R.; Harindranath, N.; Premalata, S., Kesava Murthy, B.S.; Subba RAO, P.V. (1985). Toxicity of the sesquiterpene lactone parthenin to cultured bovine kidney-cells. *Planta Med.*, 3: 194-197.
- Omura, T.; Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I – evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, 239: 2370-2378.
- Paillard, F.; Finot, F.; Mouche, I.; Prenez, A.; Vericat, J.A. (1999). Use of primary cultures of rat hepatocytes to predict toxicity in the early development of new chemical entities. *Toxicol. In Vitro*, 13: 693-700.
- Panyam, J.; Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev.*, 55: 329-347.
- Parkinson, A. In: Klaasen, C.D. Toxicology: The basic science of poison. 5ed. Kansas: Mac Graw Hill, 1998. Cap.6: 113-184.
- Pistner, H.; Gutwald, R.; Ordnung, R.; Mühling, J.R.J. (1993). Poly(L-lactide): a long-term degradation study *in vivo* : I. Biological results. *Biomaterials*, 14: 671-677.
- Plaa, G.L.; Witschi, H. (1976). Chemical, drugs, and lipid peroxidation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 16: 125-141.
- Prior, S.; Gander, B.; Blarer, N.; Merkle, H.P.; Subirá, M.L.; Irache, J.M.; Gamazo, C. (2002). In vitro phagocytosis and monocyte-macrophage activation with Poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 15: 197-207.

- Puisieux, F.; Barrat, G.; Couarraze, G.; Couvreur, P.; Devissaguet, J-P.; Dubernet, C.; Fattal, E.; Fessi, H.; Vauthier, C.; Benita, S. (1994). Em Polymeric Biomaterials; Dumitriu, S., ed.; Marcel Dekker: New York. Cap 16.
- Quintanar-Guerrero, D.; Fessi E.H.; Allémann, E.; Doelker, E. (1996). Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly (D,L lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int. J. Pharm.* 143: 133-141.
- Reen, R.K. Biochemical studies on the interaction of piperine, a major alkaloidal component of black pepper, with drug metabolizing enzymes in experimental animals and in isolated mammalian cells. Doctoral thesis. Biochemistry Section, Regional Research Laboratory (CSIR), Jammu Tawi, India, 1993.
- Ren, X.; Xue, Y.; Liu, J.; Zhang, K.; Zheng, J.; Luo, G.; Guo, C.; Mu, Y.; Shen, J. (2002). A novel cyclodextrin-derived tellurium compound with glutathione peroxidase activity. *Chembiochem.*, 3: 356-363.
- Renzi, D.; Valtolina, M.; Forster, R. (1993). The evaluation of a multi- endpoint cytotoxicity assay system. *ATLA.*, 21: 89-96.
- Repetto, G.; Sanz, P. (1993). Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function: *In vitro* effects of 24 metals. *ATLA.*, 21: 501-507.
- Rodriguez, E., Towers, G.H.N.; Mitchell, J.C. (1976). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry.*, 15: 1573-1580.
- Rodriguez, J.A.; Haun, M. (1999). Cytotoxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on V79 cells and rat hepatocytes. *Planta Med.*, 65: 1-5.
- Rogiers, V.; Blaauboer, B.; Maurel, P.; Phillips, I.; Shephard, E. (1995). Hepatocyte-based in vitro models and their application in pharmacotoxicology. *Toxicol in Vitro*, 9: 685-694.
- Rosser, B.G.; Gores, G.J. (1995). Special reports and reviews. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterol.*, 108: 252-275.
- Salgo, M.G.; Pryor, W.A. (1996). Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 15: 482-488.

- Santos-Magalhães, N. S.; Pontes, A.; Pereira, V.M.W.; Caetano, M.N.P. (2000). Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *Int. J. Pharm.*, 208: 71-80.
- Schaffazick, S.R., Guterres, S.S.U., Freitas, L.D.; Pohlmann, A.R. (2003). Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. *Química Nova.*, 26: 726-737.
- Schardinger, F. (1904). *Bacillus macerans*. *Centralblatt Für Bakteriologie*, 14: 772.
- Schulzschalge, T.; Koch, E.; Schwind, K.H.; Hutzinger, O.; Neubert, D. (1991). Inductive potency of TCDD, TBDD and three 2, 3, 7, 8 – mixed halogenated dioxins in liver microsomes of male rats. *Chemosphere*, 23: 1925-1931.
- Sharma, D.; Chelvi, T.P.; Kaur, J.; Chakravorty, K.; De T.K.; Maitra, A.; Ralhan, R. (1996). Novel Taxol(R) formulation: Polyvinylpyrrolidone nanoparticle-encapsulated Taxol(R) for drug delivery in cancer therapy. *Oncol. Res.*, 8: 281-286.
- Singla, A.K.; Garg, A.; Aggarwal, D. (2002). Paclitaxel and its formulations. *Int. J. Pharm.*, 235: 179-192.
- Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R.; Rudzinski, W.E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control Release*, 70: 1-20.
- Souza-Brito, A.R.; Rodriguez, J.A; Hiruma-Lima, C.A.; Haun, M.; Nunes, D.S. (1998). Antiulcerogenic activity of trans-dehydrocrotonin from *C. cajucara*. *Planta Med.*, 64: 126-129.
- Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.*, 98: 1743-1754.
- Szente, L.; Szejtli, J. (1999). Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 36: 17-28.
- Thompson, D.O. (1997). Cyclodextrins--enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 14: 1-104.
- Torsoni, M.A., Viana, R.I.; Ogo, S.H. (1998). Sulphydryl groups and their relation to the antioxidant enzymes of chelonian red blood cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 46: 147-156.

- Uekama, K. (2004). Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chem. Pharm. Bull.*, 52: 900-915.
- Van den Bergh, M.E. (1982). In: Plantas medicinais da Amazônia – contribuição ao seu Conhecimento Sistemático, 2nd ed. Museu Paraense Emílio Goeldi, CNPq-MCT (Coleção Adolpho Ducke), Belém, Brazil. pp.124-125.
- Vandervoort, J.; Ludwig, A. (2001). Preparation factors affecting the properties of polylactide nanoparticles: a factorial design study. *Pharmazie*, 56: 484-488.
- Vila, A.; Sánchez, A.; Tobío, M.; Calvo, P.; Alonso, M.J. (2002). Design of biodegradable particles for protein delivery. *J. Control. Release*, 78: 15-24.
- Villiers, A. (1891). Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Compt. Rend. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 112, 536-538.
- Wallin, B., Rosengren, B., Shertzer, H.G.; Camejo, G. (1993). Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Anal. Biochem.*, 208: 10-15.
- Whittlesey, K.J.; Shea, L.D. (2004). Delivery systems for small molecule drugs, proteins, and DNA: the neuroscience/biometrial interface. *Experiment. Neur.*, 190:1-16.
- Witerbourn, C.C.; Metodiewa, D. (1994). The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.*, 314: 284-290.
- Wong, W.H., Mooney, D.J. (1997) Fundamentals of Biodegradable Polymer Scaffolds: Synthesis and properties of biodegradable polymers used as synthetic matrices for tissue engineering. In: Atala, A., Mooney, D.J., Vacanti, J.P., Langer, R. (eds). *Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*. Boston, USA: Birkhäuser; p.51.
- Xu, K.; Thornalley, P.J. (2001). Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.*, 61: 165-177.
- Yoo, H.S.; Lee, K.H.; Oh, J.E.; Park, T.G. (2000). In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. *J. Control Release.*, 68: 419-431.

- Yoo, J.Y.; Kim, J.M.; Seo, K.S.; Jeong, Y.K.; Lee, H.B.; Khang, G. (2005). Characterization of degradation behavior for PLGA in various pH condition by simple liquid chromatography method. *Bio-Med. Mater. Engineer.*, 15:279-288.
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, 74: 139-162.
- Zhang, Z.P.; Feng, S.S. (2005). Nanoparticles of poly(lactide)/vitamin E TPGS copolymer for cancer chemotherapy: Synthesis, formulation, characterization and in vitro drug release. *Biomaterials*, 27:262-270.
- Zhao, L.; Orton, E.; Vemuri, N.M. (2002). Predicting solubility in multiple nonpolar drugs-cyclodextrin system. *J. Pharm. Sci.*, 91: 2301-2306.