



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Físico-Química

TESE DE DOUTORADO

**Preparação, Caracterização e Avaliação de
Nanoesferas de PLGA (50:50) contendo In(III)-
Meso-tetrafenilporfirina para Aplicação em Terapia
Fotodinâmica**

Aluno: André Romero da Silva

Orientador: Prof. Dr. Renato Atilio Jorge

**Campinas
Março de 2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

Si38p

Silva, André Romero da.

Preparação, caracterização e avaliação de nanoesferas de PLGA (50:50) contendo In(III)-meso-tetrafenilporfirina para aplicação em terapia fotodinâmica / André Romero da Silva. - Campinas, SP: [s.n], 2007.

Orientador: Renato Atilio Jorge.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Nanopartícula. 3. Câncer.
4. Fotoxidação. I. Jorge, Renato Atilio.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Título em inglês: Preparation, characterization and evaluation of PLGA 50:50 nanospheres loaded with In(III)-meso-tetraphenylporphyrin for use in photodynamic therapy.

Palavras-chaves em inglês: Photodynamic therapy, Nanoparticle, Cancer, Photooxidation.

Área de concentração: Físico-Química.

Titulação: Doutor em Ciências.

Banca examinadora: Prof. Dr. Renato Atilio Jorge (orientador), Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco (FFCLRP-USP), Profa. Dra. Eneida de Paula (IB-Unicamp), Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine (IQ-Unicamp), Prof. Dr. Fernando Antônio Santos Coelho (IQ-Unicamp).

Data de defesa: 02/03/2007

À minha família, em especial aos meus pais Miguel e Roseli pelo esforço ao longo dos anos para conceder aos seus filhos (Adriano, Alessandra e André) uma vida digna.

"A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana." (Louis Pasteur)

"Temos de fazer o melhor que podemos. Esta é a nossa sagrada responsabilidade humana." (Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Renato Atilio Jorge pela orientação a mim concedida no desenvolvimento deste trabalho, bem como na elaboração das minhas aulas à graduação.
- Ao Prof. Dr. Anibal Eugenio Vercesi da Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp pela colaboração nos experimentos de avaliação da eficiência do InTPP encapsulado em células LNCaP, e em especial a Dra. Natália Mayumi Inada pelos inúmeros experimentos que fizemos juntos.
- Ao Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco da Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras – USP Ribeirão pela colaboração nas medidas de propriedades fotofísicas do InTPP.
- Ao Prof. Dr. Fábio Augusto do Instituto de Química - Unicamp pelo trabalho de quantificação de clorofórmio residual sobre as nanopartículas de PLGA contendo InTPP, e em especial à Dra. Ana Maria de Oliveira pelas inúmeras análises realizadas no cromatógrafo.
- Ao Prof. Dr. Marcelo Menossi do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - Unicamp pela utilização de equipamentos nas etapas de lavagem e liofilização das formulações nanoparticuladas.
- À Profa. Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli da Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras – USP Ribeirão pela colaboração nas medidas de distribuição de tamanho e potencial zeta das partículas poliméricas, bem como, nas análises morfológicas usando o microscópio de fluorescência.
- À Profa. Dra. Ohara Augusto do Instituto de Química - USP pela utilização do espectrômetro de ressonância paramagnética eletrônica, e em especial ao Dr. Daniel Rettori pelos vários espectros de EPR obtidos para identificar a participação do oxigênio singlete nos experimentos de fotoxidação das células LNCaP.
- Ao Prof. Dr. Pedro Kunihiro Kiyohara do Instituto de Física - USP pelas microscopias eletrônicas e de varredura, e em especial a Mestre Paula Filloy pelas micrografias obtidas, às viagens ao IF-USP e por ter me ensinado as técnicas para a obtenção de micrografias.

- À Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad da Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp pela utilização do microscópio confocal, em especial à bióloga Mariana Ozello Baratti pelas micrografias e experimentos realizados.
- À Profa. Dra. Teresa Dib Zambon Atvars do Instituto de Química - Unicamp pela utilização do fluorímetro nos estudos de fotodegradação do InTPP.
- Às técnicas Cláudia, Débora, Elisabeth e Egle, pela amizade e o carinho com que me trataram durante todo este tempo que estou na Unicamp.
- À Izabel e ao Rodrigo da secretaria da comissão de pós-graduação pela forma profissional e respeitosa com que me trataram durante o curso.
- Aos funcionários Marcos e Fontana da vidraria pelo capricho e dedicação com que confeccionaram os nebulizadores e recipientes usados, respectivamente, nas análises de microscopia e no preparo das nanopartículas.
- Aos amigos do laboratório, Alessandra, Aline, Araceli, César, Eduardo, Geraldo, Gerusa, Gyda, Janaína, Joselito, Juliana, Marcel, Marcelo, Neife e Paula, pelo carinho e respeito com que me trataram durante o desenvolvimento deste trabalho.
- À Fapesp, ao CNPq e à Unicamp pelo apoio financeiro.

CURRICULUM VITAE

Dados Pessoais

- **André Romero da Silva**
Nascido em 13 de agosto de 1973
Natural de Campinas
e-mail: andreromerosilva@gmail.com

Formação Acadêmica

- **Mestre em Físico-Química**
Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química
(Fevereiro/2003)
- **Bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas**
Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química
(Março/2001)
- **Técnico em Administração**
E.E.I.P.S.G.E.S. Fundação Bradesco
(Dezembro/1991)

Experiência Científica

- Mestrado desenvolvido no Instituto de Química-Unicamp, na área de físico-química, sob orientação do Prof. Dr. Renato Atilio Jorge, sendo a dissertação intitulada: **Análise das propriedades fotossensibilizantes do In(III)-mesotetrafenilporfirina para uso em terapia fotodinâmica.** (Agosto/2001 a Fevereiro/2003)

Experiência Profissional

- **Programa de Bolsas para Instrutores Graduados**, trabalho exercido como Prof. Instrutor Graduado ministrando disciplinas aos cursos de graduação da Unicamp como QG100 – Química, QG102 – Química Experimental I e QG109 – Química Geral Experimental. (Fevereiro/2004 a Dezembro/2006)
- **Programa de Estágio Docente (PED)**, trabalho realizado como monitor da disciplina QF431 – Físico-Química I, no Instituto de Química da Unicamp.(Agosto/2003 a Novembro/2003)

Artigos Publicados

- N.M. Inada, A.R. Silva, R.A. Jorge, J. Borecky, A.E. Vercesi (2007) Irradiated cationic mesoporphyrin induces larger damage to isolated rat liver mitochondria than the anionic form. Archives of Biochemistry and Biophysics 457, 217-224.

- J.N. Ribeiro, A.R. Silva, A.C. Pelegrino, A.C. Tedesco, R.A. Jorge (2005) Evaluation of photodynamic activity of octaethylporphyrin and vanadyl octaethylporphyrin. *Applied Cancer Research* 25, 142-150.
- J.N. Ribeiro, A.R. Silva, R.A. Jorge (2004) Involvement of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by photodynamic therapy. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 40, 385-392.

Trabalhos Apresentados em Congressos

- A.R. Silva, R.A. Jorge (2006) Optimization of the PLGA particle size loaded with In(III)-mesotetraphenylporphyrin for application in photodynamic therapy using fractional factorial design. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia-SP.
- A.R. Silva, A.M. Oliveira, F. Augusto, R.A. Jorge (2005) Minimization of the content on residual organic solvent on PLGA nanospheres. 5th International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto-SP. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 41, 423-423.
- R.A. Silva, R.A. Jorge (2005) Characterization of micro and nanospheres of poly(lactide-co-glycolide) entrapment with In(III)-meso-tetraphenylporphyrin for use in photodynamic therapy. 3rd Meeting of the Network of Nanobiotechnology, São Pedro-SP.
- A.M. Oliveira, A.R. Silva, R.A. Jorge, F. Augusto (2005) HS-SPME-GC/MS for the screening volatile compounds from PLGA nanospheres-encapsulated pharmaceutical formulations. 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, Campinas-SP.
- A.R. Silva, R.A. Jorge (2005) Colorimetric determination of the residual PVA adsorbed on the surface of PLGA nanoparticles encapsulated with In(III)-meso-tetraphenylporphyrin for use in photodynamic therapy. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Águas de Lindóia-SP.
- D.A. Brasil, R.A. Jorge (2004) pH and ionic strength in the protoporphyrins aggregation. XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambú-MG.
- J.M.S. Alves, R.A. Jorge, A.R. Silva (2004) Influence of pH in the tryptophan photooxidation by toluidine blue. XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambú-MG.
- A.R. Silva, R.A. Jorge (2003) Interactions studies of In(III)-meso-tetra phenylporphyrin with unilamellar lipidic vesicles and photooxidation mechanism of human erythrocytes. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambú-MG.

RESUMO

O cloreto de In(III)-meso-tetrafenilporfirina (InTPP) foi encapsulado em nanopartículas de poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) 50:50, preparadas através do método de emulsão e evaporação. Foram obtidas nanopartículas com tamanho inferior a 200 nm e com uma distribuição homogênea. A velocidade de agitação e a porcentagem de etanol na fase aquosa foram os fatores que mais influenciaram nas diferentes propriedades estudadas (tamanho, potencial zeta, eficiência de encapsulação e recuperação da partícula, e porcentagem residual de emulsificante e de solvente orgânico utilizados). Foi desenvolvido um novo método de monitoramento da liberação do fármaco encapsulado sem separar as partículas do meio, usando um espectrofotômetro associado ao acessório de refletância difusa. O InTPP foi liberado das nanopartículas por um processo bifásico, caracterizado por uma rápida liberação inicial seguido por uma mais lenta. Utilizando modelos matemáticos concluiu-se que a liberação do InTPP ocorre por difusão. A viabilidade de células cancerígenas de próstata (LNCaP) foi reduzida para 40,8 e 1,7% na presença de 1,8 $\mu\text{mol/L}$ de InTPP livre ou encapsulado, respectivamente, após 120 minutos de irradiação. Análises de microscopia confocal mostraram que uma maior quantidade de InTPP encapsulado foi internalizado na célula se comparado ao fármaco livre o que justifica a melhor eficiência do fotossensibilizador encapsulado em reduzir a viabilidade das células LNCaP. Em ambas as situações o InTPP livre ou encapsulado foi localizado na região perinuclear da célula. Experimentos de ressonância paramagnética eletrônica confirmaram a participação do oxigênio singlete no processo fotocitotóxico, quando as células foram incubadas com as nanopartículas contendo o InTPP. O mesmo não foi observado com o composto livre devido ao seu estado agregado e a fotodegradação do InTPP, sugerindo que ambos podem estar influenciando na eficiência do InTPP livre em reduzir a viabilidade das células LNCaP. Conclui-se, pelos resultados deste trabalho, que o InTPP encapsulado em nanopartículas de PLGA com tamanho inferior a 200 nm pode ser utilizado em estudos pré-clínicos da terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

In(III)-meso-tetraphenylporphyrin (InTPP) chloride was encapsulated in 50:50 poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles prepared by the emulsion/evaporation technique. Nanoparticles with sizes smaller than 200 nm and with a homogeneous distribution were obtained. The stirring rate and the ethanol percentage in the aqueous phase were the factors that mainly influenced the different properties studied (size, zeta potential, entrapment and recovery efficiency, residual percentage of emulsifier and organic solvent). A new method was developed to monitor the delivery of the encapsulated drug without prior separation of the particles from the release medium, using a diffuse reflectance accessory coupled to a spectrophotometer. The InTPP was released from nanoparticles in a biphasic process characterized by an initial fast release followed by a slower release phase. Mathematical models applied to the release profiles allowed us to conclude that the release of InTPP from nanoparticles is controlled by diffusion. The viability of prostate cancer cells (LNCaP) was reduced to 40.8 and 1.7% in the presence of free or encapsulated InTPP (1.8 $\mu\text{mol/L}$), respectively, after 120 minutes of irradiation. Confocal microscopic analysis showed that a great amount of encapsulated InTPP was internalized in the cell, in respect to the free drug, explaining the better efficiency of the encapsulated photosensitizer to reduce the viability of the LNCaP cells. In both situations, free and encapsulated InTPP were localized in the perinuclear region of the cell. Electron paramagnetic resonance experiments confirmed the participation of singlet oxygen in the photocytotoxic process when the cells were incubated with nanoparticles loaded with InTPP. The same was not observed with the free compound due to its aggregate state and to the photodegradation of InTPP, suggesting that these factors have influenced the efficiency of free InTPP to reduce the viability of LNCaP cells. The results obtained in this work allow us to conclude that InTPP encapsulated in PLGA nanoparticles with a size smaller than 200 nm has a potential therapeutic effect and can be applied in pre-clinical studies of photodynamic therapy.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACÕES.....	xxi
LISTA DE TABELAS.....	xxiii
LISTA DE FIGURAS.....	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Histórico da terapia fotodinâmica.....	2
1.2 Princípios da terapia fotodinâmica.....	3
1.3 Localização intracelular dos fotossensibilizadores e mecanismo biológico de destruição dos tumores.....	6
1.4 Fotossensibilizadores.....	9
1.4.1 Derivados meso-tetrafenilporfirínicos.....	13
1.5 Sistemas carreadores de fármacos e terapia fotodinâmica.....	16
1.6 Copolímeros dos ácidos lático e glicólico.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Reagentes e Equipamentos.....	23
3.2 Determinação da massa molar do PLGA 50:50 e do PVA utilizados nos preparos das nanopartículas.....	25
3.3 Preparo das nanopartículas de poli(lactídio-co-glicolídio) (PLGA) 50:50.....	26
3.4 Análise morfológica das nanopartículas usando microscopia eletrônica e transmissão.....	27
3.5 Microscopia de fluorescência e análise elementar por EDX.....	27
3.6 Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} aplicado ao preparo de nanopartículas de PLGA 50:50.....	28
3.6.1 Medida do tamanho das partículas.....	30
3.6.2 Determinação das porcentagens de InTPP encapsulado e de recuperação das nanopartículas.....	31
3.6.3 Medida do potencial zeta.....	32
3.6.4 Determinação da porcentagem residual de PVA nas nanopartículas.....	32
3.6.5 Extração e quantificação do clorofórmio residual nas nanopartículas.....	32
3.7 Operações evolucionárias a partir dos resultados do planejamento fatorial 2^{4-1}	33
3.7.1 Estabilidade coloidal do ensaio OE5N.....	33

3.8 Estudo de liberação <i>in situ</i> do InTPP encapsulado em micro e nanopartículas (ensaio OE5N).....	34
3.9 Fotoxidação de células de câncer de próstata humana da linhagem LNCaP com partículas poliméricas contendo InTPP (ensaio OE5N)....	35
3.10 Análise da distribuição do InTPP nas micro e nanopartículas de PLGA (ensaio OE5N) usando-se microscopia de varredura a laser confocal.....	37
3.11 Análise da localização das partículas de PLGA contendo InTPP (ensaio OE5N) em células de tumor de próstata humana da linhagem LNCaP.....	38
3.11.1 Quantificação do InTPP livre ou encapsulado em nanopartículas de PLGA 50:50 (ensaio OE5N) internalizado nas células LNCaP.....	39
3.12 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....	40
3.13 Monitoramento da fotodegradação do InTPP livre em RPMI 1640 quando irradiado por uma lâmpada de mercúrio.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Determinação da massa molar do PLGA 50:50 e PVA utilizados no preparo das nanopartículas.....	41
4.2 Primeiras formulações realizadas na tentativa de obter nanopartículas poliméricas.....	44
4.3 Resultados do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}	45
4.3.1 Efeito dos fatores sobre o tamanho das partículas.....	46
4.3.2 Efeito dos fatores sobre a porcentagem de encapsulação e de recuperação das nanopartículas.....	51
4.3.3 Efeito dos fatores sobre o potencial zeta.....	60
4.3.4 Efeito dos fatores sobre a porcentagem de PVA residual.....	64
4.3.5 Efeito dos fatores sobre a quantidade residual de clorofórmio....	70
4.4 Otimização do tamanho de partículas a partir dos resultados do planejamento fatorial 2^{4-1}	76
4.4.1 Estabilidade coloidal do ensaio OE5N.....	86
4.5 Liberação <i>in situ</i> do InTPP encapsulado em partículas de PLGA.....	93
4.6 Fotoxidação de células de câncer de próstata humana da linhagem LNCaP com partículas poliméricas contendo InTPP.....	108
4.7 Avaliação da participação do oxigênio singlete na fotoxidação das células LNCaP.....	122
5. CONCLUSÕES.....	130

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	133
7. ANEXO.....	149
7.1 Estruturas de alguns compostos citados na tese.....	149

LISTA DE ABREVIACOES

- CFP – Ponto de floclulao crítico
- CPHA – Canadian Public Healthy Agency
- DAPI – 4',6 diamidino-2-fenilindol
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- ECD – Detector de captura de elétrons
- EDTA – cido etilenodiamino tetra-acético
- EDX – Energia dispersiva de raio-X
- EMEA – European Medical Agency
- EPR – Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica
- ERD – Espectroscopia de refletância difusa
- FDA – Food and drug administration
- GC – Cromatografia gasosa
- GPC – Cromatografia de permeação em gel
- HDL – Lipoproteína de alta densidade
- HpD – Derivado de hematoporfirina
- InTPP – In(III)-Meso-tetrafenilporfirina
- LDL – Lipoproteína de baixa densidade
- LED – Diodos emissores de luz
- LNCaP – Linhagem de célula de câncer de próstata humana
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MM – Massa molar
- OE – Operação evolucionária
- PBS – Tampão fosfato salino
- PDT – Terapia fotodinâmica
- PEG – Polietileno glicol
- PLA – Polímero do ácido lático
- PLG – Polímero do ácido glicólico
- PLGA – Copolímero do ácido lático e ácido glicólico
- PS – Fotossensibilizador
- PVA – lcool Polivinílico

PVDF – Difluoreto de polivinilideno
R² – Coeficiente de correlação
RE – Retículo endoplasmático
S₀ – Estado eletrônico fundamental
S₁ – Estado eletrônico singlete excitado
SPME – Microextração em fase sólida
SUS – Sistema único de saúde
T₁ – Estado eletrônico triplete excitado
TBS – Tampão trisma base
TEM – Microscopia eletrônica de transmissão
TEMP – 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona
TEMPO – 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona-N-oxil
THF – Tetrahidrofurano
THPP – Meso-tetrahidroxifenilporfirina
TPGS – Succinato de D-α tocoferol polietileno glicol 1000
TPP – Meso-tetrafenilporfirina
[η] – Viscosidade intrínseca
η_{red} – Viscosidade reduzida

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores e níveis estudados, e matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} aplicado ao preparo das nanopartículas de PLGA encapsuladas com InTPP.....	29
Tabela 2 – Massa molar do PLGA 50:50 obtida após análise de GPC.....	42
Tabela 3 – Áreas integradas dos espectros de absorvância dos ensaios do planejamento fatorial 2^{4-1}	47
Tabela 4 – Porcentagem de encapsulação do InTPP em nanopartículas de PLGA pertencentes aos ensaios do planejamento fatorial 2^{4-1}	52
Tabela 5 – Valores de potencial zeta das nanopartículas de PLGA pertencentes aos ensaios do planejamento fatorial 2^{4-1}	62
Tabela 6 – Valores da porcentagem de PVA residual sobre as nanopartículas de PLGA pertencentes aos ensaios do planejamento fatorial 2^{4-1}	67
Tabela 7 – Resultados obtidos do planejamento fatorial 2^{4-1} para avaliar a influência dos parâmetros de preparação de nanopartículas de PLGA sobre a quantidade de clorofórmio residual.....	74
Tabela 8 – Concentração de InTPP livre ou encapsulado (ensaio OE5N) que foi internalizado nas células LNCaP.....	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos possíveis que ocorrem na PDT, sendo: S_0 o estado fundamental do fotossensibilizador (P), S_1 o estado singlete excitado, T_1 o estado triplete excitado, B representa uma biomolécula, (1) excitação do fotossensibilizador, (2) decaimento não radioativo devido a relaxações vibracionais, (3) fluorescência, (4) cruzamento intersistemas, (5) fosforescência, (6) transferência de energia, (7) transferência de elétron, (8) transferência de próton ou elétron.....	5
Figura 2 – Estrutura de fotossensibilizadores aprovados para aplicação clínica. (A) Visudyne [®] , (B) Foscan [®] , (C) Levulan [®] e (D) Metvix [®]	12
Figura 3 – Estrutura da In(III)-meso-tetrafenilporfirina (InTPP).....	15
Figura 4 – Estrutura do PLGA, sendo X e Y o número de unidades referente ao polímero dos ácidos láctico e glicólico, respectivamente.....	21
Figura 5 – Representação da equação de hidrólise de um grupo éster do PLGA.....	22
Figura 6 – Sistemas de agitação utilizados nos preparos das (A) micropartículas e (B) nanopartículas.....	26
Figura 7 – (A) Espectros de emissão da lâmpada de mercúrio 80W HPLN da Philips e (B) perfil espectral do filtro BG 38 da Oriel.....	36
Figura 8 – Viscosidade reduzida versus concentração de PVA para a determinação da viscosidade intrínseca.....	43
Figura 9 – MEV de micropartículas poliméricas de PLGA carregadas com InTPP, preparadas via agitação mecânica de (A) 300 rpm ou (B) 1200 rpm, e suas respectivas distribuição de tamanho (A' e B') obtidas através da análise das micrografias pelo software UTHSCSA ImageTool 3.0.....	45
Figura 10 – Espectros de absorvância de algumas formulações do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}	47
Figura 11 – Valores dos contrastes principais e combinatórios dos fatores estudados (A = % de PVA, B = Velocidade de agitação, C = % de etanol na fase aquosa, D = % de etanol na orgânica) sobre o diâmetro das partículas poliméricas do planejamento fatorial 2^{4-1} . Os contrastes foram calculados através do software Statistica 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 90% de confiança).....	48

Figura 12 – Alteração da viscosidade absoluta da fase aquosa utilizada no preparo das nanopartículas de PLGA na presença e na ausência de etanol à 30°C.....	49
Figura 13 – Estrutura molecular do álcool polivinílico.....	50
Figura 14 – Valores dos contrastes principais e combinatórios dos fatores estudados (A = % de PVA, B = Velocidade de agitação, C = % de etanol na fase aquosa, D = % de etanol na orgânica) sobre a porcentagem de encapsulação do InTPP em nanopartículas de PLGA pertencentes ao planejamento fatorial 2^{4-1} . Os contrastes foram calculados através do software Statística 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 90% de confiança).....	53
Figura 15 – Variação da absorvância de uma solução aquosa de InTPP (0,2 μ mol/L) na presença de 0,1% de DMF e várias concentrações de (A) PVA ou (B) etanol.....	54
Figura 16 – Micrografia de fluorescência de micropartículas de PLGA contendo InTPP. Foi realizado aumento de 400x.....	56
Figura 17 – Valores dos contrastes principais e combinatórios dos fatores estudados (A = % de PVA, B = Velocidade de agitação, C = % de etanol na fase aquosa, D = % de etanol na orgânica) sobre a porcentagem de recuperação das nanopartículas de PLGA pertencentes ao planejamento fatorial 2^{4-1} . Os contrastes foram calculados através do software Statística 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 90% de confiança).....	58
Figura 18 – Valores dos contrastes principais e combinatórios dos fatores estudados (A = % de PVA, B = Velocidade de agitação, C = % de etanol na fase aquosa, D = % de etanol na orgânica) sobre o potencial zeta das nanopartículas de PLGA pertencentes ao planejamento fatorial 2^{4-1} . Os contrastes foram calculados através do software Statística 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 90% de confiança).....	63
Figura 19 - Modelo de interação das moléculas PVA durante o processo de preparo das nanopartículas. Adaptado a partir de Garlindo-Rodrigues et al. [137].....	66
Figura 20 – Valores dos contrastes principais e combinatórios dos fatores estudados (A = % de PVA, B = Velocidade de agitação, C = % de etanol na fase aquosa, D = % de etanol na orgânica) sobre a porcentagem de PVA residual sobre as nanopartículas de PLGA pertencentes ao planejamento fatorial 2^{4-1} . Os contrastes foram calculados através do software Statística 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 90% de confiança).....	69

Figura 21 – Cromatogramas CG-ECD de compostos voláteis presentes nas formulações nanoparticuladas do ensaio 8, na fibra com revestimento PDMS usada na etapa de extração, e do clorofórmio.....	73
Figura 22 – Valores dos contrastes principais e combinatórios dos fatores estudados (A = % de PVA, B = Velocidade de agitação, C = % de etanol na fase aquosa, D = % de etanol na orgânica) sobre a concentração residual de CH ₃ Cl nas nanopartículas de PLGA pertencentes ao planejamento fatorial 2 ⁴⁻¹ . Os contrastes foram calculados através do software Statistica 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 90% de confiança).....	75
Figura 23 – Resultados obtidos das operações evolucionárias a partir de alguns ensaios (◆) realizados no planejamento fatorial 2 ⁴⁻¹ . (Os pontos não preenchidos correspondem a ensaios não realizados. Os valores aos lados dos retângulos correspondem às áreas integradas dos espectros de absorvância dos ensaios realizados, sendo o menor valor destacado por um círculo).....	77
Figura 24 – Distribuição de tamanho das partículas, obtido por espalhamento de luz dinâmico, referente ao ensaio evolucionário com espectro de absorção de menor área integrada, (A) antes da etapa de lavagem, (B) após uma etapa de lavagem e posterior liofilização sem trealose e (C) após 6 etapas de lavagem e posterior liofilização com trealose.....	79
Figura 25 – Micrografia eletrônica de varredura de partículas liofilizadas do ensaio OE5N após uma etapa de lavagem. Foram realizados aumentos de (A e C) 10.000x e de (B) 30.000x.....	81
Figura 26 – Micrografia eletrônica de varredura de partículas liofilizadas do ensaio OE5N após seis etapas de lavagem. Foram realizados aumentos de (A) 10.000X, (C) 20.000X e de (B) 30.000X.....	82
Figura 27 – (A) Micrografia eletrônica de transmissão e (B) distribuição de tamanho das partículas do ensaio OE5N presentes na micrografia.....	84
Figura 28 – Determinação do ponto de floculação crítico de nanopartículas de PLGA através da monitoração do raio hidrodinâmico das partículas com a variação da concentração de eletrólito.....	87
Figura 29 – (A) Monitoramento da fluorescência do InTPP em tampão fosfato salino pH 7,4, após período de incubação de 24 horas a 37 °C na presença de diferentes concentrações de Triton X100 [®] e Tween 20 [®] . (B) Determinação da solubilidade do InTPP em tampão fosfato salina na presença de Triton X100 [®]	94

Figura 30 – Micrografia eletrônica de varredura de micropartículas de PLGA contendo InTPP (A) antes e (B) depois de 1384 h redispersas em isobutanol.....	96
Figura 31 – (A) Monitoramento da absorbância do InTPP liberado de nanopartículas do ensaio OE5N em função do tempo sem previa separação entre partículas e meio de liberação. (B) Comparação do perfil espectral do InTPP em isobutanol antes e depois da separação das nanopartículas do ensaio OE5N do meio de liberação para curtos, médios e longos períodos de liberação.....	97
Figura 32 – Resultados da liberação <i>in situ</i> do InTPP encapsulado em (A) nano (ensaio OE5N) e (B) micro partículas de PLGA a 27 °C.....	99
Figura 33 – Ajuste do modelo de difusão para os (■) dados da cinética de liberação do InTPP encapsulado em (A) nano e (B) micropartículas em isobutanol a 27 °C.....	102
Figura 34 – Micrografia confocal de agregados de nanopartículas do ensaio OE5N (A) e de micropartículas (B) encapsulados com InTPP. Em ambas as figuras A e B há 3 micrografias sendo uma delas (a) referente a visualização da partícula sem excitação do InTPP, (b) a outra refere-se a emissão de fluorescência do InTPP excitado pelo laser de argônio e (c) a última que constitui uma soma das duas primeiras micrografias.....	106
Figura 35 – Cortes ópticos transversais com aumento gradual de 0,6 µm de profundidade para uma micropartícula de PLGA contendo InTPP encapsulado obtidos por microscopia confocal.....	107
Figura 36 – Fototoxicidade de células LNCaP com InTPP (3,8 µmol/L) (A) encapsulado em nanopartículas de PLGA 50:50 (ensaio OE5N) e (B) não encapsulado por 40 minutos após vários períodos de incubação. Dados representativos de três experimentos independentes. (*) Redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle (células) com 90% de confiança.....	109
Figura 37 – Fototoxicidade de células LNCaP incubadas por 2 horas com (A) partículas de PLGA contendo diferentes concentrações de InTPP (ensaio OE5N) e (B) soluções do mesmo composto não encapsulado e irradiadas por 40 minutos após incubação. Dados representativos de três experimentos independentes. (*) Redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle (células) com 90% de confiança.....	112

Figura 38 – Fotoxidação de células LNCaP na presença de InTPP 1,8 $\mu\text{mol/L}$ (A) encapsulado (ensaio OE5N) e (B) não encapsulado em nanopartículas de PLGA, após 2 h de incubação e tempo variados de irradiação. Dados representativos de três experimentos independentes. (*) Redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle (células) com 90% de confiança.....	114
Figura 39 – Fotoxidação de células LNCaP na presença de 1,8 $\mu\text{mol/L}$ de InTPP encapsulado (ensaio OE5N) e não encapsulado em partículas de PLGA após 2 horas de incubação e tempos variados de irradiação. Experimentos realizados (A) sem e (B) com lavagem das placas após período de incubação. Dados representativos de três experimentos independentes. (*) Redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle (células) com 90% de confiança.....	116
Figura 40 – Micrografia confocal de células LNCaP incubadas por 2 horas com (A) nanopartículas (Ensaio OE5N) contendo InTPP ou com (B) soluções de InTPP na concentração de 1,8 $\mu\text{mol/L}$. (a) Micrografias relacionadas a fluorescência da faloidina ligada a F-actina para marcação do citoesqueleto, (b) micrografia relacionada a fluorescência do DAPI que se liga ao DNA para marcação do núcleo, (c) micrografia associada a fluorescência do InTPP e (d) combinação das micrografias relacionadas a fluorescência dos três compostos fluorescentes (faloidina, DAPI e InTPP)....	117
Figura 41 – Micrografia confocal de células LNCaP incubadas por 2 horas com (A) e (B) sem nanopartículas (Ensaio OE5N) contendo InTPP 1,8 $\mu\text{mol/L}$. (a) Micrografia associada a fluorescência do InTPP, (b) micrografia relacionada a fluorescência do DAPI que se liga ao DNA para marcação do núcleo, (c) micrografia relacionada a fluorescência da faloidina ligada a F-actina para marcação do citoesqueleto e (d) combinação das micrografias relacionadas a fluorescência dos três compostos fluorescentes (faloidina, DAPI e InTPP).....	121
Figura 42 – Cortes ópticos transversais com aumento gradual de 0,48 μm de profundidade para uma célula LNCaP incubada por 2 horas com nanopartículas de PLGA contendo InTPP. Os cortes ópticos foram realizados do topo para baixo.....	122
Figura 43 – Reação do oxigênio singlete com o TEMP gerando o radical nitróxido TEMPO.....	123
Figura 44 – Espectro de EPR do TEMPO gerado pela fotoxidação do 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (23 mmol/L) à temperatura ambiente (24 °C) usando uma lâmpada de mercúrio na presença de InTPP (1,8 $\mu\text{mol/L}$) (A) encapsulado e (B) não encapsulado em nanopartículas de PLGA. Os tempos de irradiação das soluções são indicados na figura.....	124

Figura 45 – Espectro de absorvância e de fluorescência do InTPP 7,7 $\mu\text{mol/L}$ não encapsulado no (A) meio de cultura RPMI 1640 e (B) em DMSO. O InTPP foi excitado no comprimento de onda 426 nm em ambas as soluções.....	125
Figura 46 – Monitoramento dos espectros de absorvância e fluorescência do InTPP não encapsulado (7,7 $\mu\text{mol/L}$) em meio de cultura RPMI 1640 e 0,18% de DMSO durante irradiação com lâmpada de mercúrio.....	127
Figura 47 – Monitoramento dos espectros de absorvância do InTPP não encapsulado (7,7 $\mu\text{mol/L}$) em água e 0,18% de DMSO durante irradiação com lâmpada de mercúrio.....	129

1. INTRODUÇÃO

Estimativas do Instituto Nacional do Câncer apontavam que 472 mil novos casos de câncer (ou 355 mil se excluídos os casos de tumores de pele não-melanoma) deveriam ser diagnosticados no Brasil em 2006, sendo 234 mil entre os homens e 238 mil entre as mulheres [1]. Entre os tumores mais diagnosticados, à exceção do de pele não-melanoma, estão os de próstata, pulmão e estômago no sexo masculino; mama, colo do útero e intestino no sexo feminino [2].

Registros mundiais mostraram que 10 milhões de novos casos foram diagnosticados em 2002 com 6 milhões de mortes registradas devido ao câncer. Previsões estimam que em 2020 cerca de 15 milhões de novos casos sejam diagnosticados no mundo e 12 milhões de pessoas venham a falecer [2]. Cerca de 140 mil pessoas morrem todos os anos no Brasil, vítimas do câncer [2].

O aumento crescente nos diagnósticos de câncer fez aumentar de forma expressiva o número de pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS) nos últimos 5 anos, fato que fez o governo federal aumentar os gastos com a assistência oncológica de 571 milhões em 2000 para 1,1 bilhões em 2005. Para que se tenha uma idéia, o SUS registrou 423 mil internações por neoplasias malignas em 2005 e 1,6 milhões de consultas em oncologia [2].

O aumento contínuo dos casos de câncer no país e no mundo acompanha o envelhecimento da população, mas hábitos como consumo regular de bebidas alcoólicas, tabagismo, sedentarismo, má alimentação e obesidade também favorecem este aumento.

As últimas décadas foram caracterizadas pela evolução no tratamento do câncer devido à descoberta de novos quimioterápicos [3], a associação de terapias padrões (cirurgia, radioterapia e quimioterapia) [4] e o surgimento de novas terapias como a hormonioterapia [5] e a imunoterapia [6]. Os avanços da oncologia têm aumentado o tempo de vida dos pacientes e reduzido os efeitos colaterais do tratamento medicamentoso como alopecia (queda de cabelo), alterações gastrintestinais (náuseas, vômitos e diarreia) e adinamia (prostração física).

Embora avanços tenham ocorrido, não são raros os casos onde a medicina não tem estratégia definida para tratamento de alguns tipos de câncer. Um exemplo é o carcinoma de células pequenas da bexiga, um tumor agressivo descoberto desde 1981 que não apresenta estratégia definida para tratamento e que leva os pacientes a terem sobrevida média de 5 a 6,5 meses [7]. Quanto se pensa em neoplasias em estágio avançado, os prognósticos são ainda piores. Um exemplo é a disseminação peritoneal oriunda de tumores gastrointestinais a qual não apresenta tratamento padrão e para a qual a quimioterapia sistêmica não apresenta efeito significativo, devido ao baixo fluxo sanguíneo no peritônio, fato que leva os pacientes a resistirem por apenas 3 meses [8]. Melhoras nos prognósticos têm sido obtidas com a administração combinada dos quimioterápicos: etoposídeo, doxorrubicina e cisplatina (vide anexo), mas poucos pacientes suportam o tratamento devido à severa toxicidade (mielosupressão, náuseas e vômitos) [9,10]. Diante destes fatos, novas técnicas de tratamento vêm sendo estudadas e entre elas se destaca a terapia fotodinâmica.

1.1 Histórico da terapia fotodinâmica

A terapia que usa a luz visível ou visível próximo (infravermelho) como agente terapêutico, também definida como fototerapia, foi aplicada no Egito, Índia e China a mais de 4000 anos para o tratamento de psoríase, vitiligo, raquitismo, câncer e psicose [11]. Há 2500 anos atrás, um médico grego chamado Herodotus recomendou a fototerapia, através da luz solar, para restauração da saúde [12].

Embora se considere o marco inicial da fototerapia o trabalho desenvolvido por Finsen, em 1890, para tratamento da tuberculose cutânea (lupus vulgaris) utilizando uma lâmpada de arco-carbono e um filtro para radiação infravermelha (trabalho este que concedeu a Finsen o prêmio Nobel de 1903), os pesquisadores franceses já utilizavam radiação solar para o tratamento da tuberculose, escorbuto, reumatismo, edemas e fraqueza nos músculos, mesmo antes desta data [13].

Muitos consideram o grupo de pesquisa de von Tappeiner como o fundador da terapia fotodinâmica (PDT). Dentre os trabalhos desenvolvidos neste grupo,

destaca-se o realizado por Raab, em 1900 [14], que estudou o efeito do alaranjado de acridina (vide anexo) e luz sobre o paramécio, bem como, o trabalho de Jesionek em 1903 [15] que fez a primeira aplicação clínica da terapia fotodinâmica com o uso tópico de eosina (vide anexo) e luz no tratamento de carcinoma basocelular antes de período de irradiação. Em 1907, von Tappeiner e Jodlbauer definiram a PDT como a interação dinâmica entre luz, um agente fotossensibilizador, e moléculas de oxigênio resultando na destruição de tecidos [16].

Muitos trabalhos foram realizados até a terapia fotodinâmica moderna, como a demonstração do efeito fotossensibilizante da hematoporfirina (vide anexo) em ratos por Hausmann (1911) [17] e em humanos por Meyer-Betz (1913) [18], a observação da fluorescência da porfirina em sarcomas de ratos por Policard (1924) [19] e em carcinomas de mama humana por Körbler (1931) [20], a primeira aplicação da PDT usando porfirinas no tratamento de tumores de animais por Auler e Banzer (1942) [21], a aplicação de derivados de hematoporfirina no tratamento de câncer de mama e metástase na região torácica por Richard Lipson (1966) [22] e por Kelly e Snell para tratamento de câncer de bexiga (1976) [23] usando luz branca. Em 1975, Dougherty et al [24] registraram que o derivado de hematoporfirina (HpD) em combinação com luz vermelha poderia completamente erradicar o crescimento de tumores de mama em ratos. A purificação do HpD realizada por Dougherty levou a produção do Photofrin II[®] (vide anexo) o qual foi aplicado em testes de cânceres de bexiga e pele, conduzindo às pesquisas modernas de PDT.

1.2 Princípios da terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica é uma técnica que vem sendo utilizada no tratamento do câncer, bem como em outras doenças não oncológicas [25,26]. Além disso, a PDT tem sido utilizada no tratamento de efluentes [27], em sínteses químicas [28,29], na esterilização de sangue [30] e na exterminação de pragas agrícolas [31].

Na oncologia, a PDT está baseada na administração sistêmica de um fotossensibilizador (PS) que se acumula preferencialmente nos tecidos doentes [32] em razão da formação de complexos intravasculares entre as substâncias fotossensíveis e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) [33]. Como a maioria das células tumorais possui alta concentração de receptores deste tipo de lipoproteína (em comparação às células normais), há o acúmulo preferencial dos fotossensibilizadores sobre o tecido tumoral, de maneira que tem sido aceito que a seletividade tumoral aumenta com o caráter lipofílico do agente fotossensibilizante [34,35]. Entretanto, nem todos os tumores apresentam elevada concentração de receptores LDL e, neste caso, o fotossensibilizador pode se ligar a lipoproteínas de alta densidade (HDL) e albumina, fato que permite a retenção do PS no estroma tumoral ('arquitetura' de suporte de tecido conectivo e aporte vascular) sem o intermédio de receptores [36,37].

O tumor é então irradiado utilizando-se uma fonte de luz na região do vermelho ou infravermelho próximo [38] a fim de que a radiação penetre efetivamente nos tecidos tumorais, uma vez que radiações de alta energia são absorvidas por cromóforos bioendogênicos e/ou espalhadas pelos tecidos, o que torna a fotoxidação apenas superficial [39]. Lâmpadas convencionais, diodos emissores de luz (LED) e lasers tem sido usados como fontes de irradiação na PDT. Devido à elevada potência do feixe de radiação, o laser possibilita que os períodos de irradiação sejam curtos. Também são facilmente acoplados às fibras óticas permitindo que as irradiações possam ser realizadas em órgãos internos [12,26]. No entanto, no tratamento de grandes lesões da pele, fontes como os LED's são superiores aos lasers devido ao seu largo campo de irradiação [12,26].

A irradiação do tumor provoca a excitação do fotossensibilizador a um estado eletrônico de maior energia, o qual pode retornar ao estado fundamental via processos radioativos (como fluorescência ou fosforescência) ou não radioativos (como conversão interna, cruzamento intersistema ou relaxações vibracionais) [12]. Dentre estes processos de decaimento energético, o cruzamento intersistema é fundamental para a terapia fotodinâmica, consistindo numa transição proibida por spin, onde o fotossensibilizador no estado eletrônico

singlete excitado (S_1) sofre uma transição para o estado triplete excitado (T_1). A substância fotossensível localizada no estado triplete excitado apresenta um tempo de vida maior do que no estado singlete excitado, em razão da transição $T_1 \rightarrow S_0$ ser proibida por spin [40]. Dessa forma, o fotossensibilizador no estado T_1 pode interagir fotoquimicamente com moléculas de oxigênio, ou biomoléculas localizadas próximas à região irradiada, gerando espécies reativas que danificam o tecido irradiado [41,42,43] (Figura 1).

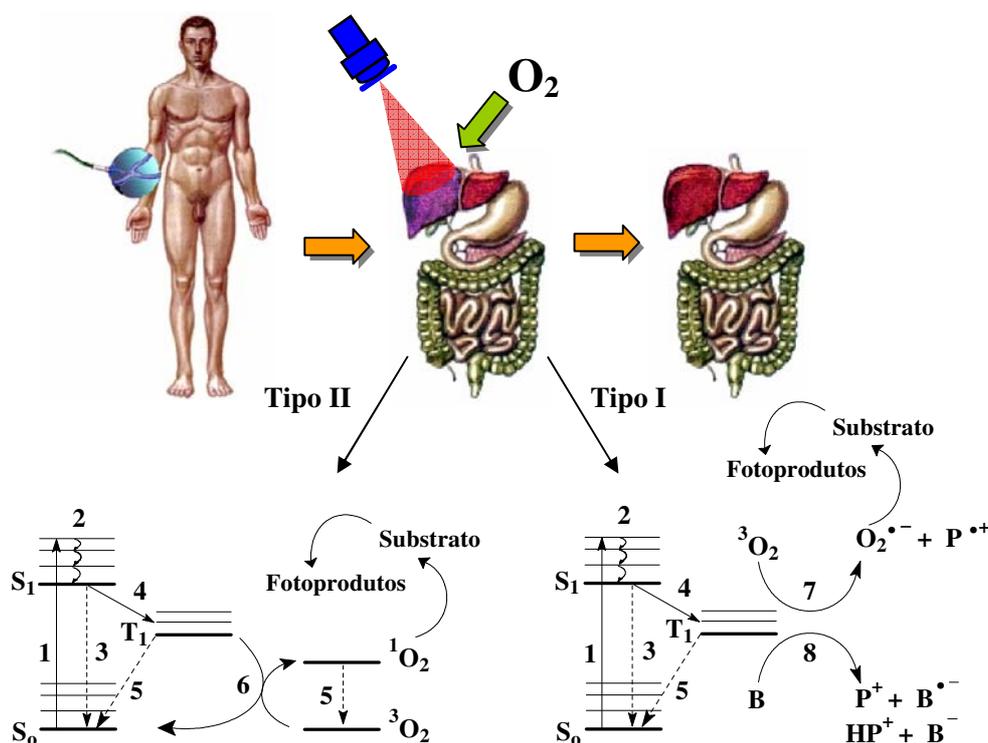


Figura 1 – Mecanismos possíveis que ocorrem na PDT, sendo: S_0 o estado fundamental do fotossensibilizador (P), S_1 o estado singlete excitado, T_1 o estado triplete excitado, B representa uma biomolécula, (1) excitação do fotossensibilizador, (2) decaimento não radioativo devido a relaxações vibracionais, (3) fluorescência, (4) cruzamento intersistemas, (5) fosforescência, (6) transferência de energia, (7) transferência de elétron, (8) transferência de próton ou elétron.

A fotodestruição dos tecidos pode ocorrer através da geração de radicais livres extremamente reativos (mecanismo tipo I) ou de oxigênio singlete (mecanismo tipo II) [44,45,46]. O mecanismo tipo I envolve reações de transferência de elétrons e/ou extração de átomos de hidrogênio entre o

fotossensibilizador e um substrato (biológico, solvente ou outro fotossensibilizador) produzindo radicais e/ou íons radicais. Estas espécies radicalares por serem altamente reativas podem causar destruições aos tecidos irradiados, mas também, podem interagir facilmente com o oxigênio molecular gerando espécies reativas de oxigênio tais como ânion superóxido ou hidroxila os quais também são citotóxicos [40]. Já o mecanismo tipo II resulta de um processo de transferência de energia entre o estado triplete excitado do fotossensibilizador para o estado triplete fundamental do oxigênio molecular, levando a geração do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$).

Existem dois estados singletes do oxigênio. O estado $^1\Delta_g$ tem energia de 94 kJ/mol acima do estado fundamental e o estado $^1\Sigma_g^+$ tem 156,7 kJ/mol. Como o singlete de maior energia ($^1\Sigma_g^+$) tem curto tempo de vida (20 ps em metanol [47]) acaba sendo suprimido ao estado $^1\Delta_g$. Então, o oxigênio singlete no estado $^1\Delta_g$ é assumido ser a espécie envolvida no mecanismo tipo II. Neste mecanismo, a energia transferida do fotossensibilizador ao oxigênio molecular no estado fundamental ($^3\Sigma_g^-$ ou $^3\text{O}_2$) leva um dos dois elétrons do $^3\text{O}_2$, localizados separadamente em orbitais moleculares degenerados antiligantes π^* , a ocupar o mesmo orbital degenerado do outro elétron havendo inversão do spin. O fato de um dos orbitais degenerados estar vazio é que confere ao oxigênio singlete um caráter eletrofílico, favorecendo sua participação em reações onde há presença de substratos ricos em elétrons [38].

1.3 Localização intracelular dos fotossensibilizadores e mecanismo biológico de destruição dos tumores

O transporte e a entrada dos fotossensibilizadores dentro das células são afetados pelo ambiente celular, formação de complexos extracelulares entre fotossensibilizador e proteínas, bem como, por propriedades físico-químicas como a polaridade do fotossensibilizador e a natureza química dos substituintes laterais presentes em sua estrutura, a presença de metais ligados ao núcleo central porfirínico e a tendência dos fotossensibilizadores em sofrerem agregação.

Estudos têm mostrado que os fotossensibilizadores podem ser localizados na membrana plasmática [48], lisossomos [49], mitocôndria [50] e citoplasma [48].

Devido à supressão em sistemas biológicos, o tempo de vida do oxigênio singlete é curto (10-40 ns). Assumindo a mesma constante de difusão para o $^1\text{O}_2$ como para o oxigênio molecular em células, o raio de ação do oxigênio singlete é de apenas 10-20 nm [51]. Portanto, a destruição causada pelo efeito fotodinâmico ocorre próximo ao local de geração primária do $^1\text{O}_2$ na célula. Sendo assim, somente as estruturas celulares próximas as regiões com alta concentração do fotossensibilizador serão destruídas pela PDT [12]. Resultados experimentais têm mostrado que a inativação das células aumenta com a lipofilicidade dos fotossensibilizadores devido maior acúmulo intracelular [52].

Ressalta-se que frações muito pequenas do DNA das células podem ser destruídas pela PDT desde que a maioria das porfirinas e demais fotossensibilizadores (com exceção de alguns compostos aniônicos e catiônicos [53]) não se localizam no núcleo, o que é interessante por evitar que produzam mutações e conseqüentemente efeitos carcinogênicos [12]. Entretanto, ressalta-se que fotossensibilizadores solúveis em água (clorinas, meso-tetrafenilporfirinas sulfonadas e ftalocianinas de alumínio di e tetrasulfonadas) (vide anexo) causaram destruição do DNA após períodos de irradiações de baixa fluência ou períodos fracionados de irradiação devido a redistribuição dos fotossensibilizadores liberados de lisossomos para o núcleo da célula [12].

Resultados experimentais têm mostrado que fotossensibilizadores localizados em mitocôndrias induzem a apoptose celular enquanto que necroses celulares são observadas para fotossensibilizadores localizados em lisossomos e na membrana plasmática. Necrose e apoptose são dois caminhos pelos quais as células eucarióticas podem morrer. A necrose é caracterizada pelo fato de a morte celular ocorrer geralmente devido a lesões físicas, como os danos vasculares nos tecidos tumorais ocasionados pela PDT, enquanto que a apoptose é uma morte geneticamente programada devido aos danos genéticos subletais que sinalizam à uma série de proteases, como as caspases, para catalisar reações hidrolíticas responsáveis pela clivagem e inativação de proteínas que protegem as células da morte [45,54,55]. O grande interesse pela apoptose está baseado no fato de que, em geral, ela é induzida por baixas concentrações de medicamento que não são

suficientes para alterar a homeostase celular. Diferentemente, os processos necróticos causam alterações no equilíbrio fisiológico celular, o que resulta no influxo de água para a célula e conseqüente destruição da integridade da membrana, levando a um processo inflamatório. Portanto, a morte celular ocasionada por apoptose não causa processos inflamatórios na região irradiada, o que é vantajoso para os pacientes com câncer, quando comparada a uma massiva necrose e uma subseqüente inflamação da região necrosada [56]. Trabalho recente desenvolvido por Ding e colaboradores [57] mostrou que o processo apoptótico iniciado pela PDT pode ser ocasionado pela degradação de proteínas transmembrânicas (Ca^{2+} -ATPase) responsáveis pelo bombeamento de Ca^{2+} do citosol ao interior do retículo endoplasmático (RE). Estas proteínas, localizadas nas membranas do RE, mantêm a concentração de íons Ca^{2+} no retículo endoplasmático de 3 a 4 vezes maior do que no citosol. Como o íon Ca^{2+} é um mensageiro secundário que pode sinalizar às células para iniciarem o processo apoptótico ou necrótico, a degradação destas proteínas sarcoendoplasmáticas pode causar um aumento da concentração de íons Ca^{2+} no citosol, provocando a liberação de citocromo C pelas mitocôndrias. O citocromo C presente no citosol liga-se a procaspase-9 (pro-enzima apoptótica), ocasionando a auto clivagem e ativação desta caspase a qual ativa a caspase-3, desencadeando uma cascata de caspases que leva a apoptose celular [42].

Fotossensibilizadores localizados em lisossomos podem não produzir fototoxicidade celular após a irradiação mas a produção de oxigênio singlete pode provocar a ruptura dos lisossomos, e conseqüentemente, a liberação de enzimas lisossomais que podem degradar outros componentes celulares [58]. Além disso, moléculas do fotossensibilizador liberadas na ruptura dos lisossomos podem se relocalizar em outras organelas como nas membranas mitocondriais, permitindo que fotodestruições possam ocorrer em outros sítios celulares [59].

Pesquisas [60,61] têm mostrado que a PDT também pode destruir o tumor via modulação da resposta do sistema imunológico, ativando ou suprimindo a produção de moduladores como as citocinas. A expressão da interleucina-6 (proteína segregada pelos macrófagos) (IL-6) em modelos de tumores de ratos

aumentou depois da aplicação da PDT, enquanto que a da interleucina-10 (citoquina antiinflamatória) diminuiu, sugerindo que o processo inflamatório seja devido, parcialmente, ao aumento da expressão da IL-6. Bellnier [62] mostrou que proteínas receptoras da superfície celular, ricas em cisteína, (TNF- α , do inglês tumor necrosis factor), quando administradas como adjuvantes do Photofrin[®] em PDT, aumentaram a fototoxicidade e seletividade do fotossensibilizador em decorrência do TNF estimular o crescimento de macrófagos e conseqüentemente da resposta inflamatória. Trabalhos [63] também mostraram que a PDT pode prolongar a expressão da ciclooxygenase 2 (COX 2), a qual é responsável por produzir mediadores inflamatórios chamados de eicosanóides (como prostaglandina E2 (PGE2) e leucotrienos), regulando a expressão da interleucina-12 (pró-inflamatória) e sua atividade anti-tumoral em carcinomas de mama de ratos.

1.4 Fotossensibilizadores

A eficiência do tratamento da terapia fotodinâmica depende de diversas propriedades fisiológicas e físico-químicas [12,44,45,64], em particular, da retenção seletiva dos fotossensibilizadores nos tecidos doentes, bem como, do número de fótons absorvidos pelo fotossensibilizador por unidade de volume do tecido [65]. A escolha de um fotossensibilizador deve dar preferência a uma substância que apresente pequena ou nenhuma toxicidade na ausência de irradiação, sendo cinética e termicamente estável para conferir à substância um adequado tempo de vida, necessário às reações de transferência de elétrons (mecanismo tipo I) e as reações de transferência de energia (mecanismo tipo II) [44].

Desde que moléculas bioendogênicas absorvem em comprimentos de onda abaixo de 620 nm (como hemoglobinas e melanina) e acima de 900 nm (H₂O), a máxima penetração da luz nos tecidos ocorre nesta faixa de comprimentos de onda [66,67]. Como fotossensibilizadores que absorvem em comprimentos de onda superiores a 800 nm tendem a ter baixa produção de oxigênio singlete em razão dos estados tripletes excitados apresentarem energia inferior a necessária

para a transição $^3\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{O}_2$ (94 kJ/mol), a faixa de comprimento de onda entre 620-800 nm passa a ser mais adequada à PDT. Dessa forma, buscam-se fotossensibilizadores que absorvam nesta janela terapêutica pois serão mais eficientemente excitados *in vivo*, devido ao menor espalhamento e absorção de luz por parte dos tecidos e de moléculas bioendogênicas.

Busca-se também fotossensibilizadores que apresentem baixa tendência à agregação, já que a formação de agregados provoca a diminuição do tempo de vida da fluorescência e fosforescência da substância fotossensível em razão do aumento dos decaimentos não radiativos por conversão interna, tornando mais difícil a transferência de energia do fotossensibilizador do estado triplete excitado para o $^3\text{O}_2$, o que diminui a eficiência do fotossensibilizador [68,69]. Os valores de pH, variações de temperatura, estruturas moleculares, a natureza do íon metálico central e os grupos funcionais periféricos substituídos nos fotossensibilizadores, podem influenciar grandemente a agregação [69,70].

Sabe-se que o tempo de vida do estado triplete (τ_T), definido como o tempo médio que uma molécula gasta em seu estado triplete excitado, limita o tempo disponível para a colisão entre o $^3\text{O}_2$ e o estado triplete do fotossensibilizador. Portanto, quanto maior o tempo de vida do estado triplete, e desde que a energia do estado triplete seja > 94 kJ/mol (energia necessária a transição $^3\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{O}_2$), maior será a eficiência da transferência de energia do fotossensibilizador para o $^3\text{O}_2$, e maior será o rendimento quântico de oxigênio singlete, aumentando-se a eficiência fotodinâmica do fotossensibilizador. Deve-se ressaltar que fotossensibilizadores com baixo rendimento quântico de fluorescência apresentam maior probabilidade de decaimentos não radioativos, possibilitando um aumento do rendimento quântico do estado triplete via cruzamento intersistemas [39,44,71].

É de interesse que os “fotossensibilizadores ideais” sejam quimicamente puros e de composição específica conhecida, possam ser excretados rapidamente do organismo (para evitar fotossensibilidade a luz solar) e sejam preparados a partir de precursores facilmente disponíveis, a fim de diminuir os custos de produção [67,72]. Além disso, os fotossensibilizadores devem ser estáveis o suficiente para evitar os processos de fotodegradação. No entanto, tal propriedade

pode ser vantajosa desde que não reduza significativamente a eficiência da fotodestruição do tecido doente, e possa diminuir o tempo de duração da fotossensibilidade pós-PDT, o que aumentaria a seletividade do tratamento [12,67].

O primeiro fotossensibilizador aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para ser utilizado clinicamente foi o Photofrin[®] (vide anexo), um derivado de hematoporfirina o qual apresenta outros variantes comerciais (Photosan[®], Photogem[®], Photocarcinorin[®] e Haematodrex[®]) [67,73]. A habilidade fotodinâmica deste composto se deve principalmente aos seus componentes oligoméricos, sendo caracterizado por uma proporção de monômeros, dímeros e oligômeros estimada em 14:19:67, respectivamente [67]. Em razão dos bons resultados obtidos em estudos clínicos o Photofrin[®] já foi aprovado pelos órgãos de saúde de mais de 40 países para tratamento de diversos tipos de câncer [67].

Atualmente, mais três compostos aprovados pela FDA estão sendo utilizados na PDT: o Visudyne[®] (verteporfina ou monoácido derivado de benzoporfirina) no tratamento da degeneração macular, o Levulan[®] (ácido aminolevulínico) no tratamento da queratose actínica, e o Metvix[®] (aminolevulinato de metila) no tratamento de queratose actínica e carcinoma basocelular [34,42,65,67] (Figura 2). Ressalta-se que o Visudyne[®] também foi recentemente aprovado pela EMEA (European Medical Agency) e a CPHA (Canadian Public Healthy Agency) para o tratamento da degeneração macular [67]. Mais recentemente, um novo fotossensibilizador (Foscan[®], m-tetrahidroxifenilclorina) (Figura 2) foi aprovado pela EMEA para uso no tratamento de carcinomas celulares da cabeça e do pescoço [74]. Além disso, outros compostos estão sendo estudados em testes clínicos de fase I, II e III, para aplicações em diversos tipos de câncer, como ftalocianinas de alumínio sulfonadas, ftalocianinas de zinco, etiopurpurinato de estanho (IV), texafirinato de lutécio (III), e hexoxifitoclorina (vide anexo) [67].

No intuito de aumentar a seletividade tumoral e a absorção na região do vermelho, reduzir a fotossensibilidade da pele depois do período de irradiação e facilitar a solubilidade em meios fisiológicos vários compostos vêm sendo

sintetizados para aplicação em PDT [67,75]. Pandey et al. [76] sintetizaram derivados de pirofeoforbide a (vide anexo) com diferentes tamanhos de grupos alcóxi (RO-, onde R refere-se a grupos alquil) e mostraram que o aumento da anfifilicidade pela adição do grupo alcóxi elevou a eficiência fotodinâmica do pirofeoforbide, sendo os heptoxi derivados os mais eficientes. Grupos alcóxi maiores reduziram a eficiência em razão do aumento do caráter hidrofóbico.

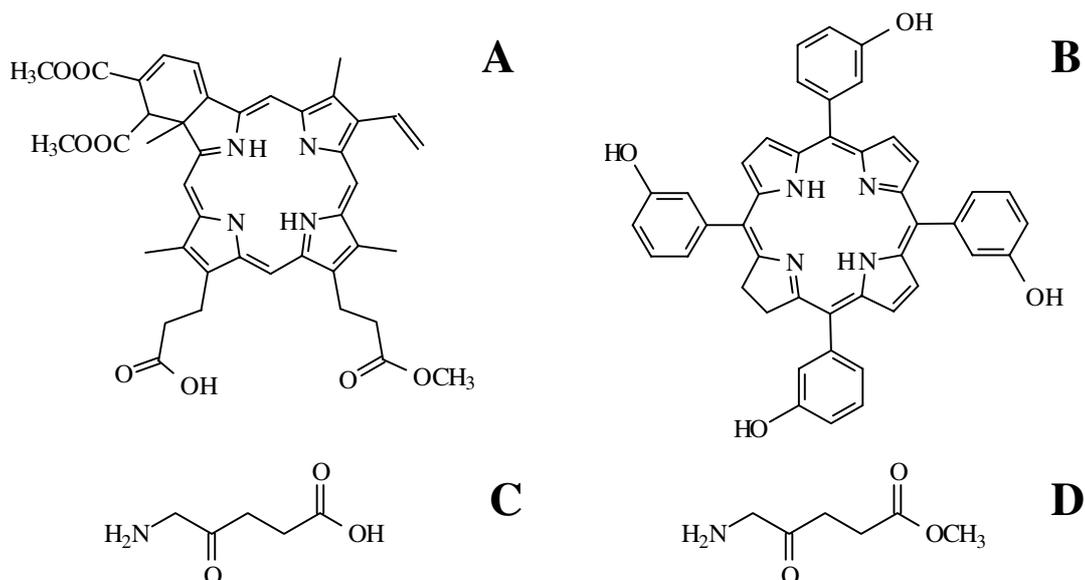


Figura 2 – Estrutura de fotossensibilizadores aprovados para aplicação clínica. (A) Visudyne[®], (B) Foscan[®], (C) Levulan[®] e (D) Metvix[®].

Wiehe et al. [77] ao sintetizaram uma série de derivados tetrapirrólicos com estruturas similares ao Foscan[®] mostraram que a substituição de um grupo hidroxifenil por grupos alquílicos (hexil ou heptil) levou a localização preferencial destes derivados na interface hidrofóbica/hidrofílica de lipossomas, sugerindo que o aumento da anfifilicidade pode favorecer o acúmulo específico dos fotossensibilizadores *in vivo*. Resultados semelhantes foram obtidos por Rancan et al. [78] os quais mostraram que as dihidroxi-tetrafenilclorinas (vide anexo) sintetizadas a partir do Foscan[®] foram retidas diferentemente pelas células linfoblásticas humanas da linhagem Jukart devido a variação da anfifilicidade.

Clorinas e₆ quando ligadas a LDL aumentaram de 4-5 vezes a retenção do fotossensibilizador em células tumorais, comparado ao fotossensibilizador livre (contendo ou não LDL em solução), fato que levou ao aumento da fototoxicidade

em 8 vezes [79]. Resultados similares também foram obtidos com a ligação de transferrina (principal proteína do sistema circulatório envolvida no transporte de ferro) a clorina e_6 (vide anexo) levando à redução de 30% no rendimento quântico de oxigênio singlete, em comparação com a clorina livre, mas a um aumento de 10 vezes na eficiência fotodinâmica [80]. Isto devido a superexpressão de receptores de transferrina por células cancerígenas em proliferação, o que aumentou a internalização do fotossensibilizador nas células [80].

Schneider et al. [81] mostraram que a 4-carboxi-tetrafenilporfirina (vide anexo) ligada ao ácido fólico (vitamina essencial para a síntese de nucleotídeos) aumentou a retenção em células de carcinoma nasofaríngeo em 7 vezes, bem como, a eficiência do fotossensibilizador em causar a morte celular. Estes resultados mostram que o ácido fólico pode ser usado para aumentar a seletividade do fotossensibilizador já que receptores de ácido fólico são superexpressados em tumores epiteliais como o de mama, ovário, pulmão e cérebro [66].

1.4.1 Derivados meso-tetrafenilporfirínicos

A meso-tetrafenilporfirina (TPP) é um fotossensibilizador hidrofóbico que apresenta baixo rendimento quântico de fluorescência (0,11 em benzeno [45]), mas elevado rendimento quântico de estado triplete (0,82 em benzeno [82]) e de oxigênio singlete (0,63 em benzeno [82]). Isto faz com que o TPP seja utilizado como padrão em comparações das propriedades fotofísicas de outros fotossensibilizadores.

Derivados hidrofílicos de TPP também são caracterizados pelo elevado rendimento quântico de oxigênio singlete e retenção tumoral. Um exemplo é a meso-tetrahidroxifenilporfirina (THPP) que apresenta elevada retenção tumoral, sendo 25-30 vezes mais eficiente que os derivados de hematoporfirina em causar morte celular [83]. Embora as meso-tetrafenilporfirinas tetrasulfonadas também apresentem elevado rendimento quântico de oxigênio singlete [84] e retenção tumoral [85,86], estudos *in vitro* [87] e *in vivo* [88] mostraram que estes fotossensibilizadores são neurotóxicos, pois provocam a morte de neurônios,

inibem o crescimento de dendritos (prolongação dos neurônios) e diminuem a velocidade de condução dos impulsos nervosos. Além disso, é um fotossensibilizador encontrado no núcleo de células cancerígenas [85], o que pode representar um risco à indução de mutações carcinogênicas.

Alguns derivados de TPP com átomos metálicos localizados no centro do núcleo porfirínico também apresentam elevado rendimento quântico de oxigênio singlete. Um exemplo é a meso-tetrafenilporfirina de gálio, caracterizada pela elevada solubilidade em solventes orgânicos e eficiência em gerar oxigênio singlete (0,85 em tolueno)[89].

Trabalho realizado em nosso laboratório mostrou que a meso-tetrafenilporfirina de índio (InTPP) (Figura 3) foi 1,4 vezes mais eficiente que o Photofrin® em causar hemólise de eritrócitos [90], devido maior associação com as células vermelhas do sangue, bem como apresentou elevado rendimento quântico de oxigênio singlete (0,72 em dimetil sulfóxido). Pesquisas [91,92] realizadas com o $^{111}\text{InTPP}$ mostraram que este composto pode ser utilizado como um radiomarcador. Radiomarcadores são compostos que têm várias aplicações clínicas, como a identificação de plaquetas, eritrócitos e leucócitos presentes em órgãos normais ou doentes [91]. Isto permite a detecção de lesões inflamatórias bem como de coágulos sanguíneos intravasculares por imagem [91,92]. Os estudos realizados *in vitro* por Cloutour et al. [91] e McAfee et al [92] demonstraram que o $^{111}\text{InTPP}$ foi eficiente em identificar as plaquetas e leucócitos sem causar alterações na fisiologia celular. Na presença de eritrócitos o $^{111}\text{InTPP}$ tende a se deslocar das plaquetas para as hemácias, não sendo um bom radiomarcador de plaquetas nestas condições. Estudos *in vivo* [92] demonstraram que o $^{111}\text{InTPP}$ promoveu excelente visualização da medula óssea em pacientes com anemia hemolítica. Merrick et al. [93] mostraram que o $^{111}\text{InTPP}$, após administração intravenosa em ratos Wistar, localizou-se em altas concentrações no fígado, e em menores concentrações no baço, rim, medula, pulmão, músculos e pele, após 72 horas da administração.

Sabe-se que a introdução de um átomo pesado na estrutura de uma molécula aumenta a velocidade das transições proibidas por spin (cruzamentos

intersistemas) devido ao aumento do acoplamento spin-órbita [94]. Este acoplamento surge a partir das interações entre o momento magnético spin do elétron e o campo magnético resultante da movimentação do núcleo [94]. Uma vez que a magnitude do campo magnético do núcleo é diretamente proporcional a carga nuclear, e conseqüentemente do número atômico [94], a presença de átomos pesados (como o Ga ou In) na estrutura porfirínica favorece a geração de oxigênio singlete [41]. Chen et al. [95] e Rosenfeld et al. [96] mostraram que a presença de In(III) no núcleo de uma série de pirofeoforbide causou um impacto significativo sobre a eficiência fotodinâmica de experimentos *in vitro* e *in vivo*.

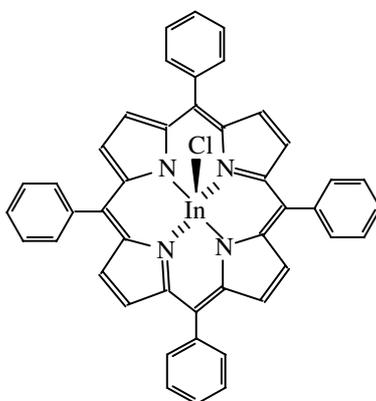


Figura 3 – Estrutura da In(III)-meso-tetraferriporfirina (InTPP)

Embora o InTPP tenha apresentado resultados interessantes como fotossensibilizador [90], ele é um composto hidrofóbico. Resultados recentes mostraram que a capacidade de associação da meso-tetraferriporfirina a modelos de membrana foi reduzida devido a formação de agregados ou microcristais, que diminuem a cinética de associação do fotossensibilizador. Além disso, o aumento da lipofilicidade dos compostos fotossensíveis dificulta a administração destas substâncias por via intravenosa, bem como, diminui a geração de oxigênio singlete em meio aquoso devido a formação de agregados.

Por este motivo, vários trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de se desenvolver sistemas de liberação que permitam a administração de fotossensibilizadores hidrofóbicos no tratamento do câncer, sendo os lipossomas,

micelas poliméricas e nanopartículas, os modelos de sistemas coloidais mais estudados [97,98].

1.5 Sistemas carreadores de fármacos e terapia fotodinâmica

Os sistemas carreadores para fotossensibilizadores têm recebido especial atenção devido aos resultados que mostram melhorias na seletividade e eficiência da PDT, bem como redução de efeitos colaterais como hipersensibilidade da pele e da agregação de fotossensibilizadores em meio aquoso [32,99].

Vários estudos [100,101,102] têm mostrado que o acúmulo seletivo dos veículos de liberação em sítios alvos, como nos tumores, se deve ao aumento da permeabilidade dos vasos tumorais que parece ser regulado por vários mediadores tais como fatores de crescimento endotelial vascular, a bradiquinina (proteína sintetizada pelo fígado e que tem efeito vasodilatador), óxido nítrico, prostaglandinas e metaloproteinases [103]. A presença de canais transendoteliais, junções interendoteliais e poros na faixa de 380 a 780 nm caracterizam a barreira endotelial ineficiente do tumor [104]. Portanto, o aumento da permeabilidade em razão de vasos “mal vedados”, a extensiva angiogênese (formação de novos vasos) e a pobre drenagem linfática tumoral resultante de um sistema linfático subdesenvolvido, conferem aos sistemas carreadores nanométricos a oportunidade de atingirem seus sítios de ação por simples difusão [32].

Após administração intravenosa, os colóides com superfícies não modificadas (carreadores com dimensões entre 1 a 1000 nm) são opsonizados e rapidamente eliminados da corrente sanguínea pelo sistema fagocítico mononuclear, independente do sistema de liberação considerado [105]. Portanto, o fígado age como um reservatório de micelas, lipossomas, nanopartículas, etc., sendo responsável pela biotransformação dos compostos (conversão de substâncias lipofílicas em hidrofílicas) para facilitar o processo de excreção. Esta biodistribuição pode ser interessante se os tumores estão localizados no sistema fagocítico mononuclear, caso contrário, passa a ser um fator limitante à eficiência dos carreadores de fármacos [106].

É por este motivo que pesquisadores desenvolveram os carreadores 'Stealth[®]' (marca registrada pela Liposome Technology Inc.) os quais são lipossomas caracterizados por apresentarem maior tempo de permanência na corrente sanguínea devido às modificações realizadas na sua superfície [106]. Esta revolução iniciou-se com os lipossomas quando pesquisadores utilizaram fosfolipídios modificados, contendo polietileno glicol (PEG) (vide anexo) de massa molar entre 1000 a 5000 Da como sistemas de liberação [107]. Isto permitiu que a superfície dos lipossomas fosse revestida por cadeias hidrofílicas que repeliam as proteínas plasmáticas, conferindo uma estabilização estérica, fato que elevou o tempo de circulação médio dos lipossomas de minutos para dezenas de horas.

Diferentes estratégias lipossomais têm sido desenvolvidas para direcionar o fotossensibilizador aos tecidos doentes, como revisado por Derycke e de Witte [108], possibilitando a melhora substancial da eficiência da PDT e mais segurança na utilização dos fotossensibilizadores.

Resultados mostraram que a encapsulação da meso-tetrafenilporfirina em lipossoma permitiu a monomerização do fotossensibilizador o qual foi capaz de gerar oxigênio singlete e de provocar a fotoxidação de células de carcinoma humano da linhagem HeLa [109]. Sadzuka et al. [110] mostraram que houve um aumento na retenção tumoral do Photofrin[®] (vide anexo) encapsulado em lipossomas Stealth[®], bem como, um aumento no rendimento quântico de oxigênio singlete. Entretanto, algumas formulações lipossomais Stealth[®] têm apresentado efeitos colaterais como o da síndrome da mão e do pé (caracterizada pelo vazamento do fármaco encapsulado pelas mãos e pés, causando eritemas e hipersensibilidade) havendo a necessidade da administração de anti-histamínicos e anti-inflamatórios [111]. Ressalta-se também que formulações PEG-lipossomais apresentam dificuldade em encapsular fármacos que facilmente formam agregados, pois estes perturbam a integridade da bicamada lipídica [99]. No caso dos lipossomas convencionais (não Stealth[®]), as limitações são maiores devido o curto tempo de estocagem e a instabilidade química e física em ambientes biológicos, o que torna a sua utilização menos apreciável ao encapsulação dos fotossensibilizadores [112].

Fotossensibilizadores também têm sido encapsulados em micelas poliméricas as quais se diferenciam das micelas convencionais devido sua baixa concentração micelar crítica (em torno de 10^{-7} mol/L) comparado as micelas convencionais (em torno de 10^{-3} a 10^{-4} mol/L) [98,99]. Sibata et al. [98] mostraram que as propriedades fotofísicas da ftalocianina de zinco (vide anexo) não foram modificadas quando o fármaco foi encapsulado em micelas conjugadas de PEG e estearol fosfatidil-etanolamina sugerindo que o fotossensibilizador possa ser administrado por este sistema carreador. Nishiyama et al. [99] encapsularam dendrímeros aniônicos de meso-tetrafenilporfirina de zinco (sendo as unidades dendríticas constituídas por polibenzil éter e grupos carboxílicos periféricos) em micelas poliméricas catiônicas de PEG-Poli(L-lisina) e mostraram que a eficiência fotodinâmica do fotossensibilizador sobre células de carcinoma de pulmão aumentaram em 280 vezes, fato explicado pelos pesquisadores em razão da geração do oxigênio singlete dentro das micelas poliméricas e ausência de agregados dendríticos. Embora os resultados acima sejam interessantes, estudos *in vivo* mostraram que micelas poliméricas causaram uma pequena regressão tumoral, e aumentaram o acúmulo de fármacos em tecidos saudáveis [113].

O ácido 5-aminolevulínico (ALA) é um aminoácido naturalmente convertido em nosso organismo à protoporfirina IX (PpIX) (vide anexo), precursora do heme (componente de proteínas que se ligam ao oxigênio e de coenzimas de diferentes óxido-redutases) e excelente fotossensibilizador. Pesquisas têm mostrado que a administração do ALA favorece o acúmulo transiente de PpIX dentro das células. No entanto, a biodisponibilidade intracelular do ácido aminolevulínico é baixa devido ao mecanismo lento de retenção celular, fato que levaram pesquisadores a sintetizarem derivados lipofílicos do ALA [114]. Vários dendrímeros (macromoléculas globulares com muitas ramificações emanando de um núcleo central [115]) foram sintetizados por Battah et al. [116] para aumentar a retenção celular do ALA. Os resultados mostraram que o ALA-dendrítico atravessou facilmente a membrana celular aumentando a concentração intracelular do ALA, e conseqüentemente, sua eficiência em causar a morte de células de queratinócitos da linhagem PAM 212. Deve-se ressaltar que dendrímeros com ramificações

altamente regulares, de massa molar única e com números de grupos periféricos bem definidos, são obtidos por síntese gradativa [115] que envolve um trabalho excessivo e encarece o produto.

Outros carreadores menos convencionais também foram utilizados na PDT. Nanopartículas de ouro contendo em sua superfície moléculas de ftalocianina de zinco ligadas ao mercaptoalquil éter apresentaram elevado rendimento quântico de oxigênio singlete em razão da sua associação com o agente de transferência de fase (brometo de tetraoctilamônio, usado junto a fase orgânica para induzir a transferência do AuCl_4^- presente na fase aquosa) que apresenta em sua estrutura um átomo de bromo (efeito do átomo pesado) [117]. Partículas de sílica dopadas com pirofeoforbide (vide anexo) obtidas por Roy et al. [118] foram internalizadas por células de carcinoma de cólon humano e geraram oxigênio singlete, causando redução da viabilidade celular. Embora os resultados acima sejam interessantes tais partículas, embora biocompatíveis, não são biodegradáveis havendo possibilidade de acúmulo das mesmas no organismo.

Nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1000 nm [119]. O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais se diferenciam entre si pela presença ou não de óleo em suas composições. Guterres et al. [120] definem as nanocápsulas como vesículas constituídas por um invólucro polimérico disposto em torno de um núcleo oleoso. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica.

Fotossensibilizadores encapsulados em nanoesferas poliméricas vem mostrando excelentes resultados na PDT. A meso-tetrahidroxifenilporfirina encapsulada em nanopartículas do polímero do ácido láctico-co-glicólico (PLGA) foi mais eficiente em reduzir a viabilidade de células cancerígenas da linhagem EMT-6, sendo a eficiência dependente do tempo de incubação, da dose de irradiação e da concentração do fotossensibilizador utilizado [121]. Pesquisas in vivo realizadas por Vargas et al. [112] em modelos de membranas corioalantóides de embriões de aves mostraram que a meso-tetrahidroxifenilporfirina, quando encapsulada em nanopartículas de PLGA, foi mais eficiente em causar um efeito

fototrombico vascular, se comparado ao fotossensibilizador livre, devido a permanência prolongada das partículas no sistema vascular, bem como à maior retenção do THPP nas paredes dos vasos. Estes resultados sugerem que o THPP encapsulado possa ser utilizado no tratamento da neovascularização coroidal que está relacionada à degeneração macular. Resultados semelhantes foram obtidos por Pegaz et al. [122] quando encapsularam a meso-tetrafenilporfirina em nanopartículas do polímero do ácido lático (PLA). Pegaz et al. [122] mostraram que o TPP encapsulado apresentou a mesma eficiência que o Visudyne[®] (único fotossensibilizador autorizado pela FDA para tratamento da degeneração macular) em causar a destruição vascular. Tedesco [123] também relatou, recentemente, sua experiência com carreadores nanoparticulados (usados para encapsular ftalocianinas e clorinas) os quais se mostraram viáveis e eficientes para uso em neoplasias cutâneas. Embora os resultados obtidos pelos pesquisadores acima demonstrem que as partículas poliméricas sejam sistemas carreadores eficientes para a PDT, o custo dos polímeros aprovados pela FDA (polímeros do ácido lático, glicólico (PLG) e copolímeros) e utilizados no preparo das partículas é elevado. Para que se tenha uma idéia, o preço de 5 g de PLGA 50:50 (40-75 kDa) ou PLA (75-120 kDa) está em torno, respectivamente, de U\$ 245,00 e U\$ 124,50.

Em razão das nanopartículas poliméricas oferecerem numerosas vantagens sobre os sistemas convencionais de liberação de drogas, como a elevada capacidade de encapsulação de droga, possibilidade de curtos e longos períodos de liberação do fármaco, larga variedade de matérias a serem utilizados, os inúmeros processos pelos quais as partículas podem ser produzidas e os bons resultados experimentais mostrados pelas formulações nanoparticuladas para os fotossensibilizadores hidrofóbicos, optou-se por encapsular o InTPP em nanoesferas de PLGA com o intuito de permitir a administração intravenosa deste fotossensibilizador.

1.6 Copolímero dos ácidos lático e glicólico

Além das propriedades físico-químicas inerentes aos fármacos e aos carreadores coloidais necessárias para um tratamento clínico eficiente, restrições

biológicas são impostas quanto aos polímeros usados na preparação dos carreadores particulados, como a de que sejam biocompatíveis e biodegradáveis [124].

Entende-se como biocompatível todo o polímero que, após implantado, torna-se isolado dos tecidos do corpo por uma encapsulação natural de colágeno. Considera-se biodegradável todo o polímero em que a degradação, total ou parcial, é resultante do contato com elementos biológicos, como tecidos, células, líquidos corporais ou enzimas presentes num sistema biológico [124]. A maioria dos polímeros biodegradáveis contém grupos hidrolisáveis como amida, éster, uréia e uretano ao longo da cadeia carbônica [125], no entanto, os poliésteres do ácido lático e glicólico (Figura 4) são os polímeros mais estudados na literatura devido sua biocompatibilidade, o fácil processo de fabricação, a cinética de degradação conhecida e por serem aprovados pelo FDA para aplicações clínicas.

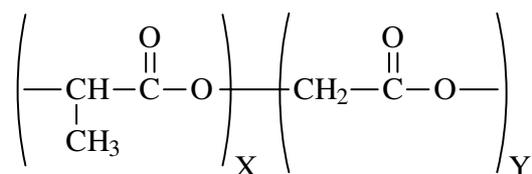


Figura 4 – Estrutura do PLGA, sendo X e Y o número de unidades referente ao polímero dos ácidos lático e glicólico, respectivamente.

O PLGA com altas proporções de unidades de ácido lático em relação ao ácido glicólico, ou até a proporção de 50:50, é um polímero solúvel em solventes orgânicos comuns como os hidrocarbonetos halogenados, dioxano, xilol, acetato de etila, tetrahidrofurano, acetona, dimetilsulfóxido e dimetiformamida. Já o polímero de ácido glicólico e copolímeros ricos em unidades de PLG são menos solúveis nestes solventes [126].

A biodegradação do PLGA ocorre pela clivagem das cadeias do poliéster, via hidrólise (Figura 5), ou ação de enzimas levando a geração de ácidos monoméricos que são eliminados através do ciclo de Krebs na forma de CO₂ e também pela urina, sendo a velocidade de hidrólise dependente do pH, temperatura e presença de catalisadores [126]. Pitt et al. [127] determinaram que a primeira fase de degradação do PLGA e seus monômeros envolve a perda de

massa molecular causada pela clivagem hidrolítica das ligações ésteres, sendo a segundo etapa caracterizada pela perda de massa e uma variação na taxa de cisão da cadeia polimérica.

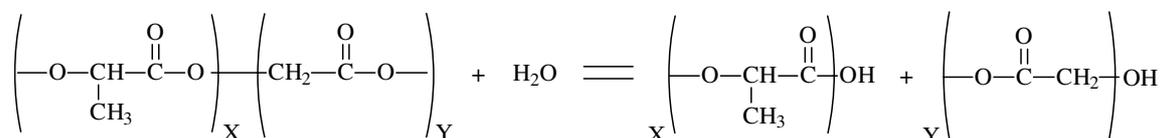


Figura 5 – Representação da equação de hidrólise de um grupo éster do PLGA.

A velocidade de hidratação do polímero parece ter um importante papel na liberação do fármaco já que favorece mais a erosão. Gilding and Reed [128] demonstraram que a retenção da água pelo PLGA aumentou quando maiores proporções do polímero de ácido glicólico foram conjugadas ao polímero do ácido lático, fato justificável em razão do polímero de ácido glicólico ser menos hidrofóbico que o do ácido lático, pela ausência do grupo metila em sua estrutura. Em razão disto o tempo necessário para a biodegradação do PLGA 50:50 (2 meses) foi menor se comparado ao PLGA 85:15 (5 meses) o qual é mais rico em unidades poliméricas de PLA [126].

Devido às propriedades biodegradáveis e biocompatíveis do PLGA que permitem sua aplicação em implantes [126], suturas cirúrgicas [129], reparos dentários [130] e fraturas [131], bem como na reconstrução de implantes [126], e dado ao fato deste polímero ser amplamente utilizado como carreador de fármacos por ser aprovado pela FDA para uso em clínica humana [132], optou-se por utilizá-lo na encapsulação do InTPP através do preparo de nanoesferas.

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser de forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados [119]. Métodos como de coacervação [133], nanoprecipitação [134], salting-out [135], emulsão-evaporação [136], emulsão-difusão [137], spray-drying [138] e fusão polímero-fármaco [139] são utilizados para o preparo dos carreadores poliméricos. Entretanto, entre os métodos acima, os mais utilizados no preparo das nanopartícula poliméricas são os de emulsão-evaporação, emulsão-difusão e nanoprecipitação. Dada a

facilidade do método de emulsão-evaporação [119], que consiste na dispersão de uma fase orgânica (na qual se dissolve o polímero) sobre uma fase aquosa e posterior etapa de evaporação do solvente orgânico, optou-se por utilizá-lo no preparo das partículas de PLGA contendo InTPP.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consistiu em determinar a atividade fotodinâmica *in vitro* do cloreto de In(III)-meso-tetrafenilporfirina encapsulado em nanoesferas de PLGA (50:50) com diâmetros médios inferiores a 200 nm.

Este trabalho compreendeu ainda os seguintes objetivos específicos:

1) Determinar a influência da velocidade de agitação, porcentagem de etanol nas fases orgânica e aquosa e do PVA nas propriedades das nanopartículas de PLGA (50:50) contendo InTPP.

2) Caracterizar as nanoesferas quanto a morfologia, distribuição de tamanho das nanopartículas, potencial zeta, eficiência de encapsulação e recuperação, concentração residual de PVA e clorofórmio, perfil de liberação do fármaco e análise da distribuição do fármaco no interior da partícula, através de microscopia confocal.

3) Comparar a eficiência entre InTPP encapsulado e livre na redução da viabilidade de células de câncer de próstata da linhagem LNCaP.

4) Avaliar a participação do oxigênio singlete nos processos fotocitotóxicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e equipamentos

O cloreto de meso-tetrafenilporfirina de índio com grau de pureza maior que 95% foi adquirido da Porphyrin Products, Inc. O poli-lactídeo-co-glicolídeo (PLGA 50:50, 50-75 kDa), o álcool polivinílico (PVA 13-23 kDa, 87-89% hidrolisado), o NaOH, o HCl, o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), o Triton X100[®], a albumina bovina, o 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (TEMP), a tripsina e o azul de tripan foram adquiridos da Sigma[®]. O sulfato de sódio, o tetrahidrofurano

(THF), o cloreto de sódio, o cloreto de potássio, o fosfato monobásico de potássio, o fosfato dibásico de sódio e o paraformaldeído foram obtidos da Merck[®]. O iodeto de potássio e o iodo foram adquiridos da Nuclear[®], e o ácido bórico e a trisma base foram obtidos da BioAgency. O clorofórmio, o isobutanol, o etanol e o dimetilsulfóxido (DMSO) foram obtidos da Synth[®] e a D-trealose da VETEC[®]. O meio de cultura RPMI 1640, a penicilina, a gentamicina e a anfotericina foram adquiridas da Cultilab. A faloidina 635 (Alexa Fluor[®] 635) e o reagente ProLong[®] Gold contendo 4',6 diamidino-2-fenilindol (DAPI) foram obtidos da Molecular Probes.

Foi utilizado o espectrofluorímetro ISS[®] PC1[™] – Photon Counting; os espectrofotômetros Hewlett Packard 8453A – Diode Array e o Varian Cary-5 UV-Vis-Nir, o último com acessório de refletância difusa; o espectrômetro EPR EMX-CW da Bruker; uma lâmpada de mercúrio HPLN 80W (Phillips); um filtro BG 38 da Oriel para bloquear radiações emitidas pela lâmpada abaixo de 400 nm e acima de 600 nm; a centrífuga J2-21 (Beckman); a balança analítica Mettler AE200; a microbalança Perkin Elmer AD-6 Autobalance; o agitador mecânico 752A (Fisatom); o dispersor UltraTurrax[®] T18 (IKA); o liofilizador Freezone[®] 4.5 da Labconco; o microscópio eletrônico de varredura JSM 6360LV (JEOL) com um sistema PGT-IMIX para análise de energia dispersiva de raio-X (EDX); o microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 200; o microscópio confocal Zeiss LMS 510; o microscópio de fluorescência Olympus[®] BX-FLA; o metalizador MED 20 Coating System (Bal-Tec) e o cromatógrafo a gás Autosystem XL (Perkin-Elmer Corp). O diâmetro das partículas e a carga superficial foram estudados utilizando-se o equipamento Zetasizer 3000 HAS da Malvern Instruments.

3.2 Determinação da massa molar do PLGA 50:50 e do PVA utilizados nos preparos das nanopartículas

A massa molar e a polidispersividade do copolímero PLGA foram obtidas utilizando-se cromatografia de permeação em gel em um cromatógrafo Waters 510, com três colunas Tosoh-Has para separar moléculas de massa molar de 10^4 , 10^5 e 10^6 daltons. Foi utilizado THF como fase móvel a 30°C , o qual foi injetado à vazão de 1,0 mL/min., e um detector de índice de refração diferencial (Waters modelo 410) para obtenção dos dados. Padrões de poliestireno (vide anexo) monodispersos foram utilizados para a curva analítica. As amostras foram dissolvidas em THF e filtradas com filtros Millipore PVDF (difluoreto de polivinilideno) de 0,45 μm antes de serem analisadas no cromatógrafo.

A massa molar do PVA foi obtida através da determinação da viscosidade intrínseca ($[\eta]$) da solução aquosa do álcool polivinílico e posterior utilização da equação de Mark-Kuhn-Houwink-Sakurada (equação 1) [140,141].

$$[\eta] = K.M^a \quad (1)$$

onde K e a são constantes para um determinado par polímero-solvente e para uma determinada temperatura.

A viscosidade intrínseca ($[\eta]$), definida como a viscosidade à concentração infinitamente diluída tendendo a zero, foi obtida através de um gráfico da viscosidade reduzida (η_{red}) em função da concentração (C) da solução polimérica estudada [140]:

$$\eta_{red} = [(t - t_0)/t_0] / C \quad (2)$$

onde (t - t_0) diferença dos tempos de escoamento da solução e do solvente puro. A extrapolação do gráfico quando a concentração tende a zero permite determinar o valor de $[\eta]$. Para este fim, o tempo de escoamento das soluções de PVA (0,2-4,0% m:v) através de um capilar de diâmetro 0,75 mm foi obtido utilizando-se um viscosímetro de Ostwald (Classe A) à 30°C .

3.3 Preparo das nanopartículas de poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) 50:50

As nanopartículas foram preparadas pelo método de emulsão/evaporação [142]. Tipicamente 50 mg de PLGA e 0,30 mg de InTPP foram dissolvidos em uma mistura de clorofórmio/etanol (19:1 v:v). 10 mL de fase orgânica foram adicionadas lentamente (7,5 minutos) a 45 mL de uma solução aquosa de PVA (1 ou 2 % m:v) através de uma seringa de vidro acoplada a uma agulha número 24 G^{3/4} ($\varnothing = 0,055$ cm e comprimento = 2,0 cm). A mistura foi mantida sob agitação mecânica de 300 ou 1200 rpm por 15 minutos (incluindo o tempo de adição), usando-se uma haste com hélices modelo naval ($\varnothing = 6,0$ cm) em um béquer com diâmetro interno de 7,2 cm (Figura 6A).

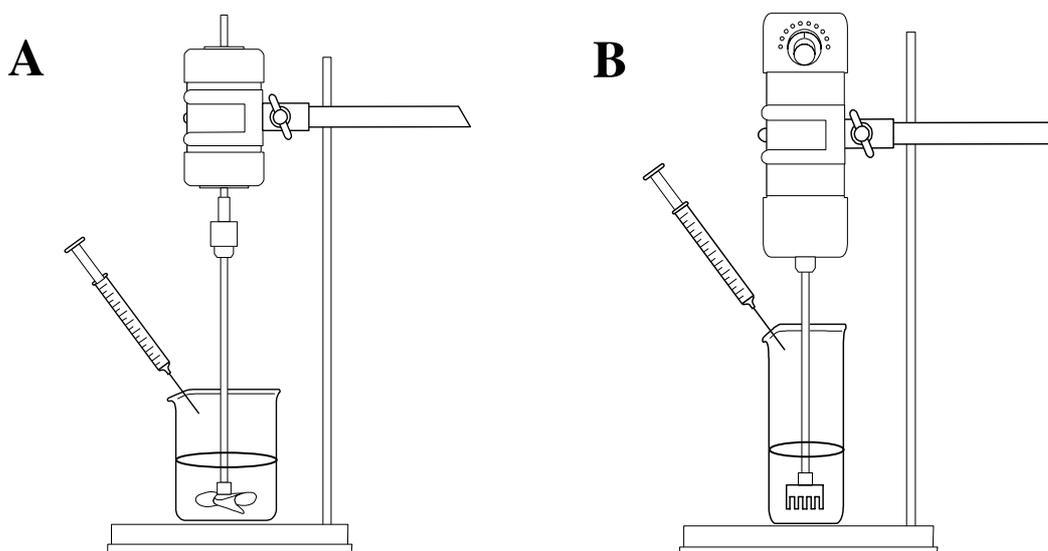


Figura 6 – Sistemas de agitação utilizados nos preparos das (A) micropartículas e (B) nanopartículas.

A distância das hélices em relação ao fundo do béquer, bem como, em relação à superfície (menisco) da fase aquosa foi mantida em 1,0 cm. Nas demais formulações, preparadas conforme tabela 1, a mistura orgânica/aquosa foi homogeneizada através de um dispersor com haste modelo S18N-19G ($\varnothing = 1,9$ cm) por 15 minutos em um béquer com diâmetro interno 5,6 cm (Figura 6B). A distância entre a parte final do dispersor em relação ao fundo do béquer foi mantida em 0,6 cm, enquanto que, em relação ao menisco da fase aquosa, foi

mantida em 1,4 cm. A emulsão resultante foi mantida sob agitação magnética durante 24 horas para evaporação do solvente orgânico. As partículas obtidas foram lavadas com água desionizada e centrifugadas por seis vezes a 20.400 x g por 20 minutos a 10°C, sendo o sobrenadante descartado a fim de eliminar o excesso de PVA presente em solução, bem como o InTPP não encapsulado. As partículas foram posteriormente liofilizadas por 48 horas, usando-se trealose como crioprotetor na proporção 1:2 (massa de trealose:massa de PLGA).

3.4 Análise morfológica das nanopartículas usando microscopia eletrônica de varredura e transmissão

Uma massa de 1,1 mg do liofilizado foi dispersa em 1,0 mL de água desionizada, sendo sonicada por 1 minuto. Posteriormente, uma gota da dispersão foi aplicada sobre o stub do microscópio eletrônico de varredura (MEV). O excesso de líquido foi removido com um papel de filtro. Após secagem da gota, o stub foi revestido com ouro, usando-se um metalizador MED 20 Coating System (Bal-Tec) operado nas seguintes condições: 30 mA de corrente e 50 mTorr de pressão por 160 minutos, e o material foi observado no MEV. Para análise morfológica via microscopia eletrônica de transmissão (realizada no laboratório do Prof. Dr. Pedro Kunihiro Kiyohara-IF USP), a amostra dispersa em água desionizada e sonicada foi nebulizada sobre telas de cobre de 300 mesh, previamente recobertas por película de parafina [143]. A nebulização da suspensão nanoparticulada permite que as nanoesferas, com diâmetros inferiores a 200 nm, sejam aspergidas, preferencialmente, sobre a tela de cobre. Após secagem o material foi observado no microscópio eletrônico de transmissão operando a 160kV.

3.5 Microscopia de fluorescência e análise elementar por EDX

Partículas de PLGA com tamanhos superiores a 1000 nm e carregadas com InTPP foram analisadas qualitativamente por microscopia de fluorescência (no laboratório da Profa. Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli-FFCLRP USP), usando uma lâmpada de arco-mercúrio para a excitação do InTPP na região do

visível. Os comprimentos de onda foram selecionados através de um sistema de filtros U-MWBV da Olympus. Comprimentos de onda entre 400-440 nm foram selecionados para excitar a amostra usando o filtro BP400-440. O filtro DM455 foi usado como espelho dicróico, posicionado a 45 °C em relação ao feixe de luz incidente, a fim de separar a luz fluorescente daquela proveniente da radiação incidente. Neste caso, todos os comprimentos de onda superiores a 475 nm foram transmitidos pelo filtro. Uma pequena quantidade de partículas liofilizadas foi depositada sobre a lâmina e as micrografias foram então obtidas usando objetivas com capacidade de aumento de 400x, sendo as imagens capturadas através de uma câmera de alta sensibilidade C-24 SIT da Hamamatsu.

Análises elementares foram também realizadas utilizando-se o microscópio eletrônico de varredura com um sistema PGT-IMIX para análise de energia dispersiva de raio-X (EDX) para avaliar a presença de elementos químicos pertencentes à molécula do InTPP nas partículas de PLGA.

3.6 Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} aplicado ao preparo de nanopartículas de PLGA 50:50

A preparação de uma formulação carreadora de fármaco envolve uma série de variáveis. Por décadas, a tarefa de otimização das formulações farmacêuticas ficou associada ao trabalho univariado de tentativa e erro. Usando esta metodologia, a solução de problemas específicos com as formulações pode ser obtida, mas a composição ótima nem sempre é atingida. Em geral, métodos univariados podem melhorar uma característica em detrimento de outra, fato que pode tornar dispendioso e caro a otimização das formulações [144]

No entanto, o emprego de planejamento sistemático dos experimentos tem sido utilizado para otimizar as formulações de sistemas carreadores a fim de resolver os problemas acima expostos. Esta sistemática torna-se mais vantajosa devido ao menor número de experimentos necessários para se atingir a formulação ótima, permitem solucionar problemas de preparo das formulações mais facilmente, revelam interações (efeitos sinérgicos) entre variáveis do processo e permitem controlar o processo de obtenção dos sistemas carreadores

em razão da ampla compreensão da influência das variáveis de processo sobre as propriedades destes carreadores [144].

Diante dos fatos acima, quatro diferentes fatores e suas influências no tamanho e eficiência de recuperação das nanopartículas, na eficiência de encapsulação do InTPP, no valor do potencial zeta, na porcentagem de PVA residual, e na quantidade de clorofórmio residual foram avaliados usando um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} constituído de dois níveis. Os fatores e níveis estudados, bem como a matriz do planejamento fatorial fracionário, são mostrados na tabela 1. Optou-se por utilizar o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} ao invés do completo 2^4 em razão deste último exigir um maior número de ensaios (16 experimentos, 32 replicatas), se comparado ao fracionário (8 experimentos, 16 replicatas).

Tabela 1 – Fatores e níveis estudados, e matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} aplicado ao preparo das nanopartículas de PLGA encapsuladas com InTPP

Fatores Estudados		Níveis	
		-	+
A	Concentração de PVA / % (m:v)	1	2
B	Velocidade de Agitação /rpm	10.000	14.000
C	Porcentagem de etanol na fase aquosa / % (v:v)	0	11
D	Porcentagem de etanol na fase orgânica / % (v:v)	0	5

Ensaio	Fatores			
	A	B	C	D*
1	-	-	-	-
2	+	-	-	+
3	-	+	-	+
4	+	+	-	-
5	-	-	+	+
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	+

* Os sinais atribuídos ao fator D foram obtidos através do produto das colunas A, B e C.

As formulações referentes a cada ensaio foram preparadas em duplicata, conforme tópico 3.3, sendo as propriedades acima investigadas conforme subtópicos descritos abaixo. O cálculo dos efeitos de cada fator sobre as propriedades da partícula foi realizado com o software Statistica 6.0. Os sinais (+)

e (-) foram usados para identificar os níveis superiores e inferiores, respectivamente, de cada fator estudado. Estes sinais não foram escolhidos ao acaso, mas correspondem a uma codificação relacionada ao algoritmo usado no software Statistica 6.0. Na realidade, os sinais correspondem à subtração do valor médio das variáveis a serem estudadas em relação a cada valor individual, dividido pela metade da amplitude de variação (diferença média entre o menor e o maior valor). Ou seja, para as velocidades de agitação de 10.000 e 14.000 rpm os sinais – e + correspondem aos seguintes cálculos:

$$\frac{10.000 - 12.000}{(14.000 - 10.000)/2} = -1$$

$$\frac{14.000 - 12.000}{(14.000 - 10.000)/2} = +1$$

3.6.1 Medida de tamanho das partículas

Uma estimativa do tamanho das partículas foi realizada através da medida da absorvância das suspensões após a etapa de evaporação do solvente, no intervalo de 200-800 nm. Nesta faixa espectral, somente o InTPP absorve. Como a concentração do composto encapsulado foi sempre mantida constante, optou-se por fazer as medidas de absorvância utilizando-se água como branco. A integral nesta faixa espectral foi calculada usando o software Origin 6.1, e o valor obtido foi considerado como proporcional à turbidez da suspensão coloidal. O tamanho das partículas que constituíam a suspensão com menor área integrada (ensaio 8 do planejamento fatorial e ensaio OE5N das operações evolucionárias) foi avaliado através de espalhamento de luz dinâmica usando o equipamento Zetasizer 3000 HAS da Malvern Instruments no laboratório da Profa. Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli (FFCLRP-USP). Em algumas situações as imagens obtidas por microscopia foram analisadas através do software UTHSCSA ImageTool 3.0, combinado ao Origin 6.1, com o objetivo de se obter a distribuição de tamanho das partículas presentes nas formulações liofilizadas, sendo os valores dos diâmetros

correspondentes a análise de aproximadamente 700 partículas referente a cada formulação preparada.

3.6.2 Determinação das porcentagens de InTPP encapsulado e de recuperação das partículas

Uma massa conhecida do material liofilizado (1,1-1,3 mg) foi dissolvida em 1,0 mL de CHCl_3 , sendo uma alíquota desta solução diluída 20 vezes para análise no espectrofotômetro no comprimento de onda 425 nm. Posteriormente, uma curva de calibração foi obtida utilizando-se o método de adição de padrão. Para este fim, medidas de absorvância das soluções diluídas foram obtidas na presença de diferentes concentrações de InTPP (0-1 $\mu\text{mol/L}$). Através deste experimento e do conhecimento da massa de nanopartícula liofilizada, bem como das massas de PLGA e InTPP utilizadas no preparo das nanopartículas, foi possível determinar a porcentagem de partículas recuperadas após a liofilização, a porcentagem de massa do fotossensibilizador presente na massa de nanopartícula recuperada e a porcentagem de encapsulação do InTPP nas partículas de PLGA, conforme equações abaixo [97,145].

$$\% \text{ Partícula recuperada} = \frac{\text{massa de partícula recuperada}}{\text{massa utilizada de PLGA} + \text{massa utilizada de InTPP}} \times 100 \quad (3)$$

$$\% \text{ InTPP presente nas partículas liofilizadas} = \frac{\text{massa de InTPP contida na partícula liofilizada}}{\text{massa de partícula liofilizada}} \times 100 \quad (4)$$

$$\% \text{ InTPP (teórica) presente nas partículas} = \frac{\text{massa de InTPP utilizada no preparo das partículas}}{\text{massa de InTPP utilizada} + \text{massa de PLGA utilizada}} \times 100 \quad (5)$$

$$\% \text{ de InTPP encapsulado} = \frac{\% \text{ InTPP presente nas partículas liofilizadas}}{\% \text{ InTPP (teórica) presente nas partículas}} \times 100 \quad (6)$$

3.6.3 Medida de potencial zeta

As medidas de potencial zeta foram realizadas no laboratório da Profa. Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli (FFCLRP-USP), via determinação da mobilidade eletroforética das partículas a 25°C, utilizando-se o equipamento Zetasizer 3000 com uma célula capilar de quartzo contendo um par de eletrodos de paládio. Tipicamente, 3,0 mg de nanopartículas liofilizadas foram dispersas em 10 mL de água desionizada, sendo a suspensão, posteriormente, sonicada por 1,0 minuto. Os resultados obtidos correspondem a uma média de 10 medidas para cada suspensão analisada (duas replicatas).

3.6.4 Determinação da porcentagem residual de PVA nas nanopartículas

Uma quantidade conhecida de partículas liofilizadas (tipicamente 2,0 mg) foi misturada com 2,0 mL de uma solução de NaOH 0,5 mol/L por 15 minutos à 60°C, sendo a mistura, subseqüentemente, neutralizada com uma solução de HCl 1,0 mol/L. O volume foi ajustado a 5,0 mL com água desionizada, sendo posteriormente adicionado 3,0 mL de uma solução de H₃BO₃ 0,65 mol/L e 0,5 mL de uma solução de I₂/KI (0,05 mol/L / 0,15 mol/L). O balão de 10,0 mL foi então completado com água desionizada. A absorbância do complexo colorimétrico formado entre o PVA e o iodo foi medida em 665 nm e a concentração foi obtida com uma curva de calibração [146].

3.6.5 Extração e quantificação do clorofórmio residual nas nanopartículas

As extrações do clorofórmio residual foram realizadas através da ressuspensão de 2,0 mg de partículas liofilizadas em 1,0 mL de uma solução saturada de NaCl à temperatura ambiente de (25 ± 3) °C. Depois de 5 minutos de pré-equilíbrio e sobre agitação magnética, a amostragem do espaço confinado (headspace) foi realizada através de uma fibra de polidimetilsiloxano – 100 µm por 10 minutos. Após extração, a fibra foi retirada do recipiente contendo a suspensão

e inserida no injetor do cromatógrafo a gás, onde o analito foi termicamente dessorvido sob fluxo do gás de arraste e carregado para a coluna cromatográfica [147]. As análises foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Fábio Augusto – IQ Unicamp em um cromatógrafo a gás Autosystem XL (Perkin-Elmer Corp.) com detector de captura de elétrons (ECD), operado no modo splitless nas análises por microextração em fase sólida (SPME, do inglês Solid Phase Microextraction). Uma coluna HP-5 (5% de fenilmetilsiloxano, 30 m de comprimento x 250 µm de diâmetro da coluna e 0,25 µm de diâmetro da fase estacionária) foi utilizada nas seguintes condições durante a análise cromatográfica: temperatura do injetor = 250 °C, temperatura do detector = 320 °C, programação de temperatura do forno = 50 °C (2 min) a 7 °C/min até 110 °C (2 min) e vazão de gás de arraste (He) = 1,24 mL/min.

3.7 Operações evolucionárias a partir dos resultados do planejamento fatorial 2⁴⁻¹

Devido à necessidade da redução do tamanho das partículas poliméricas para diâmetros inferiores a 200 nm, a fim de aumentar a permanência das nanoesferas na circulação sanguínea, operações evolucionárias foram realizadas a partir dos resultados das áreas integradas referentes a alguns ensaios da tabela 1. Estas operações consistem em introduzir variações das condições usadas na produção das partículas para que possa haver evolução e adaptação do tamanho das esferas [148]. Para isto foram variadas a porcentagem de etanol na fase aquosa (11-30%) e a velocidade de agitação (14000-18000 rpm). A porcentagem de PVA foi mantida em 1% (v:v) e a porcentagem de etanol na fase orgânica em 5% (v:v).

3.7.1 Estabilidade coloidal do ensaio OE5N

O ensaio caracterizado com a menor área integrada do espectro de absorvância (ensaio OE5N) da operação evolucionária foi avaliado em termos de estabilidade coloidal [145]. Cerca de 0,6 mL de uma suspensão de nanopartículas (não lavadas e liofilizadas, ou lavadas uma ou seis vezes, e posteriormente,

liofilizadas) foi adicionada a 2,5 mL de uma solução de Na₂SO₄ (concentração final entre 0,0-0,5 mol/L) e o diâmetro hidrodinâmico foi medido à 25°C. Para as formulações liofilizadas, as suspensões foram preparadas através da dispersão de 3,5 mg de nanopartículas em água desionizada. O ponto de floculação crítico (CFP) foi obtido quando a concentração de eletrólito adicionado provocou um aumento excessivo no diâmetro das nanopartículas.

3.8 Estudo de liberação *in situ* do InTPP encapsulado em micro e nanopartículas (ensaio OE5N)

1,2 mg de micro e nanopartículas liofilizadas (ensaio OE5N) foram ressuspendidas em 2,0 mL de isobutanol a 27 °C dentro de uma cubeta de quartzo. Este solvente foi escolhido por dissolver o InTPP mas não o PLGA. A solubilidade do InTPP neste solvente à 27 °C foi (97 ± 7) µmol/L. A soma da concentração do InTPP liberado e não liberado das partículas foi 27 vezes menor do que a solubilidade do InTPP em isobutanol. A cubeta foi mantida ao abrigo da luz para evitar a fotodegradação do composto. Espectros de absorvância das suspensões em intervalos pré-determinados foram obtidos a 421 nm usando a técnica de espectroscopia de refletância difusa (ERD) que permite a eliminação da influência da luz espalhada pelas partículas no espectro de absorvância do InTPP. Neste procedimento as partículas não foram separadas do meio de liberação. A cubeta foi posicionada na frente da fenda de entrada da esfera de integração e um padrão sólido de politetrafluoretileno foi posicionado na fenda de saída. O espectro obtido a partir do padrão sólido e da cubeta com apenas isobutanol foi usado como branco. Para identificar se a absorvância monitorada ao longo do tempo pertencia ao InTPP liberado em isobutanol, ou ligado às partículas, o mesmo experimento foi realizado em tempos curtos, médios e longos. A suspensão foi centrifugada (30 minutos, 23.708 x g) para separar o sobrenadante das partículas poliméricas. O espectro de absorvância do sobrenadante foi medido em 421 nm usando ERD sendo o perfil e a intensidade do espectro comparado com o espectro da suspensão. As partículas foram dissolvidas em clorofórmio e a absorvância do InTPP foi medida a 425 nm. Curvas analíticas de InTPP em

isobutanol e clorofórmio foram usadas para quantificar a quantidade de InTPP no meio de liberação e ligado às partículas. Este experimento foi realizado em duplicata. Modelos matemáticos foram utilizados com o objetivo de se explicar o perfil de liberação das micropartículas e nanopartículas.

3.9 Fotoxidação de células de câncer de próstata humana da linhagem LNCaP com partículas poliméricas contendo InTPP (ensaio OE5N)

A linhagem de células imortalizadas LNCaP (células humanas de tumor de próstata) foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC). Células do 2º repique, estocadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas a 37°C e lavadas duas vezes em meio de cultura padrão (meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10 mmol/L de HEPES, 4,5 mmol/L de glicose, 1,0 mmol/L de piruvato, 2,0 mM de L-glutamina, antibióticos (penicilina e gentamicina), antifúngico (anfotericina) e 10% de soro fetal bovino), sendo as células separadas do meio por 5 minutos de centrifugação a 25 °C e 500 x g. Em seguida, as células foram ressuspensas em 10 mL do meio de cultura padrão, em garrafa estéril de 75 cm² para cultura de células aderidas. As células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C durante 48 horas [149]. Após este período, foi atingida a confluência celular e as células aderidas ao frasco foram soltas através de uma solução 0,25% m/v de tripsina e 0,02% m/v de EDTA [150]. A suspensão foi colocada em um tubo falcon de 15 mL e, posteriormente, foi centrifugada por 5 minutos a 25 °C e 500 x g. O pellet foi então ressuspensado em RPMI 1640 e as células (viáveis e com membranas danificadas) foram contadas em Câmara de Neubauer pelo teste de exclusão do azul de tripan. Alíquotas desta suspensão (5×10^5 células/mL) foram cultivadas em placas de cultura 40x10 mm por dois dias na estufa de CO₂, sendo 20 o número máximo de repiques das células investigadas nesse trabalho. No início do experimento o meio de cultura foi trocado pelo meio contendo as partículas ressuspensas em RPMI ou por soluções de InTPP em RPMI contendo 0,18% (v:v) de DMSO. O DMSO foi necessário para solubilizar o InTPP uma vez que o fotossensibilizador é pouco solúvel em meio aquoso. Para isto, 2,4 mg de

nanopartículas foram dispersas no meio de cultura de forma que a concentração final de InTPP fosse de 1,8-7,7 $\mu\text{mol/L}$. Soluções de InTPP livre, nas mesmas concentrações acima, foram também utilizadas nos experimentos de fotoxidação. As culturas foram incubadas em tempos variados (1, 2 e 3 horas) com as suspensões de nanopartículas ou soluções de InTPP livre. Após este período, as placas foram irradiadas por 40-120 minutos usando uma lâmpada de mercúrio 80W HPLN da Philips (6,3 mW/cm^2) e um filtro Oriel BG 38 para permitir a passagem de radiação na faixa de 400-600 nm. O espectro de emissão da lâmpada e de absorção do filtro são mostrados na figura 7.

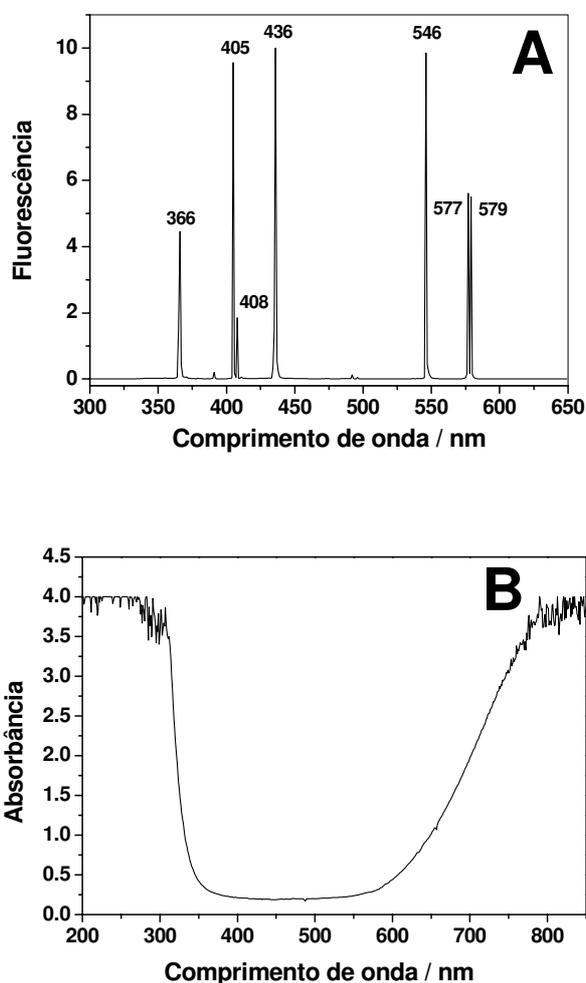


Figura 7 – (A) Espectros de emissão da lâmpada de mercúrio 80W HPLN da Philips e (B) perfil espectral do filtro BG 38 da Oriel.

Posteriormente, o meio foi retirado, sendo adicionado 300 μ L de RPMI (sem soro fetal bovino) para lavar a placa e eliminar o resíduo de soro fetal bovino. Foi adicionado em seguida 300 μ L de uma solução 0,25% m/v de tripsina e 0,02% m/v de EDTA para descolar as células da placa, sendo deixado o meio em repouso por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 600 μ L de meio suplementar com soro fetal bovino para inativar a tripsina. A mistura foi adicionada em um tubo falcon de 15 mL, e posteriormente, centrifugada por 3 minutos a 500 g. O sobrenadante foi descartado, sendo as células ressuspensas em 1,0 mL de meio de cultura. 100 μ L da suspensão de células foram misturadas a 100 μ L de azul de tripan, sendo uma alíquota da solução resultante posta na câmara de Neubauer para posterior contagem de células via microscópio. Experimentos foram realizados conforme procedimento acima para avaliar se a fotoxidação observada foi causada pelo InTPP (encapsulado ou livre) quando internalizado ou não internalizado nas células, com a diferença que as placas incubadas com as soluções ou partículas contendo InTPP foram lavadas 3 vezes com 500 μ L de meio de cultura antes do período de irradiação. Ressalta-se que todos os experimentos referentes a este item foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Anibal Eugenio Vercesi (FCM-Unicamp).

3.10 Análise da distribuição do InTPP nas micro e nanopartículas de PLGA (ensaio OE5N) usando-se microscopia de varredura a laser confocal

1,1 mg de nano (formulação OE5N) e micro partículas liofilizadas foram ressuspensas em 1,0 mL de água e sonicadas por 1 minuto. Posteriormente, cerca de 50 μ L de suspensão foi espalhada sobre uma lâmina de vidro pela técnica de esfregação. Em seguida, a lâmina foi deixada em repouso à temperatura ambiente para secagem da amostra. Posteriormente, lamínulas foram fixadas em cima das lâminas e o material foi analisado no microscópio confocal laser LSM usando lentes objetivas de imersão em água 63 x 1.2 e um laser de argônio (emissão 488 nm) para excitação do InTPP. A fluorescência emitida pelo InTPP foi

selecionada usando-se um filtro BP505-550 que permite a transmissão de radiações com comprimentos de onda entre 505 e 550 nm. Este experimento foi realizado no laboratório da Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad (FCM-Unicamp).

3.11 Análise da localização das partículas de PLGA contendo InTPP (ensaio OE5N) em células de tumor de próstata da linhagem LNCaP

Células LNCaP (5×10^5 células/mL) foram cultivadas em placas ($\varnothing = 1,6$ cm) contendo uma lamínula ($\varnothing = 1,3$ cm) para adesão das células por 48 h usando RPMI 1640, segundo o procedimento já descrito no item 3.9. Após este período, o meio de cultura foi substituído por uma suspensão de partículas poliméricas contendo InTPP ($1,8 \mu\text{mol/L}$) em RPMI 1640 ou uma solução com mesma concentração de InTPP não encapsulado em meio de cultura contendo 0,18% (v:v) de DMSO. As células foram incubadas com as partículas ou soluções por 2 horas sendo os poços, posteriormente, lavados por 2 vezes com tampão fosfato salino (PBS) (137 mmol/L NaCl , $2,7 \text{ mmol/L KCl}$, $12,7 \text{ mmol/L Na}_2\text{HPO}_4$, $2,2 \text{ mmol/L KH}_2\text{PO}_4$). Em seguida, $400 \mu\text{L}$ de uma solução 4% (m/v) de paraformaldeído em PBS foram adicionados aos poços para fixação das células, sendo aguardado o tempo de 20 minutos. Após este tempo, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS, sendo a lamínula retirada da placa. Sob a lamínula foi adicionada uma solução de permeabilização 0,2% (m:v) de Triton X100[®] em TBS (150 mmol/L NaCl e $50 \text{ mmol/L Trisma Base}$) a qual foi deixada em contato com as células por 5 minutos. Posteriormente, o efeito de permeabilização foi bloqueado usando uma solução 3% (m:v) de albumina bovina em tampão PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida $100 \mu\text{L}$ de uma solução de faloidina 635 ($0,4$ unidade de polipeptídeo/mL em 1:500 metanol/tampão PBS) foi adicionada sobre a lamínula, a qual foi mantida em contato com as células por 30 minutos ao abrigo da luz para marcação do citoesqueleto - F-actina. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS para eliminar a faloidina 635

residual e 100 μ L de uma solução de montagem ProLong[®] Gold contendo 4',6 diamidino-2-fenilindol (DAPI) para marcação nuclear foi posta em contato com a lamínula à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o procedimento acima as amostras foram visualizadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510 usando lentes objetivas de imersão em água 63 x 1.2. As imagens apresentam definição de 1024 x 1024 pixels e foram adquiridas utilizando lasers de argônio (emissão 488 nm) ou hélio/neônio (emissão 633 nm). A faloidina foi excitada em 633 nm sendo sua fluorescência vermelha selecionada através de um filtro LP650 que transmite toda a radiação com comprimentos de onda acima de 650 nm. Já o InTPP foi excitado em 488 sendo sua fluorescência selecionada usando o filtro BP505-550, conforme especificado no item 3.10. O DAPI foi excitado utilizando uma lâmpada de mercúrio de 100W associada aos filtros BP365-372 e LP397. O primeiro filtro permitiu que apenas comprimentos de onda entre 365 a 372 nm fossem utilizados para excitar o DAPI, enquanto o último permitiu que as radiações emitidas em comprimentos de onda superiores a 397 nm fossem detectadas. Ressalta-se que este experimento foi realizado no laboratório da Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad (FCM-Unicamp).

3.11.1 Quantificação do InTPP livre ou encapsulado em nanopartículas de PLGA 50:50 (ensaio OE5N) internalizado nas células LNCaP

A concentração de InTPP livre ou encapsulado internalizado nas células LNCaP foi determinada através do método descrito por Win et al. [151], com algumas modificações. Células LNCaP (5×10^5 células/mL) foram cultivadas por 48 horas, conforme descrito no item 3.9, em uma placa de cultura 40x10 mm usando o meio RPMI 1640. Após este período, o meio de cultura foi substituído por uma suspensão de nanopartículas de PLGA contendo InTPP (1,8 μ mol/L) em RPMI 1640, ou por uma solução 1,8 μ mol/L de InTPP livre em RPMI 1640, contendo 0,18% v:v de DMSO. As células foram incubadas com o InTPP livre ou com o InTPP encapsulado por 2 horas. Após este período, as placas foram lavadas por 3 vezes usando o meio de cultura a fim de eliminar o fotossensibilizador livre ou

encapsulado que não havia sido internalizado nas células. Em seguida as células foram tripsinizadas, conforme descrito no item 3.9, e o pellet obtido por centrifugação (500 x g) foi ressuspenso em uma solução de Triton X100[®] contendo 0,2 mol/L de NaOH. Esta solução permite a lise das células, bem como a monomerização do PLGA. Este experimento foi realizado em triplicata, sendo o InTPP quantificado através de uma curva de calibração.

3.12 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

A detecção indireta do oxigênio singlete por espectroscopia EPR foi baseada na formação de radicais nitróxidos estáveis 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona-N-oxil (TEMPO) pela reação do $^1\text{O}_2$ com o 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (TEMP), como proposto por Lion [152]. Soluções de TEMP (23 mmol/L) em meio de cultura RPMI 1640 foram irradiadas por 48 minutos, usando o mesmo sistema de irradiação do item 3.9, à temperatura ambiente (24 °C) na presença de InTPP (1,8 $\mu\text{mol/L}$) livre ou encapsulado em nanopartículas de PLGA (ensaio OE5N). Em razão da hidrofobicidade do fotossensibilizador, a solução estoque do InTPP livre foi preparada em dimetilsulfóxido. Portanto, os experimentos com o InTPP livre foram realizados contendo 0,18% (v:v) de DMSO. Os espectros de EPR foram obtidos no laboratório da Profa. Dra. Ohara Augusto (IQ-USP) através de um espectrômetro EMX-CW da Bruker usando uma cavidade retangular. Soluções contidas em uma cubeta de quartzo para EPR (flat cell) foram irradiadas por períodos de 8 minutos. Após este tempo, medidas de EPR foram realizadas à temperatura ambiente nos seguintes ajustes instrumentais: potência do microondas, 2 mW; frequência do microondas 9,709 GHz; frequência de modulação do campo, 100 kHz; amplitude de modulação do campo, 1,0 G; tempo para recepção dos sinais, 20,5 ms; tempo total da varredura, 21 s; números de varreduras, 1; centro do campo, 3455G; largura do campo, 80 G.

3.13 Monitoramento da fotodegradação do InTPP livre em RPMI 1640 quando irradiado por uma lâmpada de mercúrio

Os espectros de absorbância e de fluorescência do InTPP livre (7,7 $\mu\text{mol/L}$) foram monitorados em intervalos de 8 minutos após irradiação do meio de cultura RPMI 1640 contendo o fotossensibilizador livre e 0,18% (v:v) de DMSO. Experimentos também foram realizados sob as mesmas condições mas substituindo o RPMI 1640 por água. Os espectros de fluorescência foram obtidos através da excitação do InTPP no comprimento de onda 426 nm e a emissão monitorada entre 550 e 700 nm. Este ensaio foi realizado utilizando uma cubeta de quartzo de base quadrada com dimensões 1,0x1,0x4,5 cm e fendas de excitação e emissão de 2,0 mm. Estes experimentos foram realizados no laboratório da Profa. Dra. Teresa Dib Zambon Atvars.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da massa molar do PLGA 50:50 e PVA utilizados no preparo das nanopartículas

O material polimérico se diferencia dos demais materiais por possuir uma cadeia longa, apresentando portanto uma alta massa molar. Esta característica dos polímeros influencia as suas propriedades físico-químicas, tais como viscosidade, solubilidade e termoestabilidade, de tal modo a impedir ou facilitar a utilização de um polímero para uma determinada aplicação. Normalmente, as propriedades poliméricas sofrem alterações de forma assintótica com relação as mudanças na massa molar (MM), ou seja, polímeros de baixa MM devem sofrer maiores alterações nas suas propriedades quando comparados a polímeros de alta MM [140,153]. Portanto, torna-se importante o conhecimento da MM dos polímeros que serão utilizados no preparo das nanopartículas.

Com o objetivo de se determinar a massa molar do PLGA, a cromatografia de permeação em gel (GPC) foi utilizada. Esta é uma técnica de fracionamento das cadeias poliméricas em relação ao volume hidrodinâmico que cada uma ocupa em solução. A solução polimérica é bombeada através de uma coluna

recheada com um gel poroso (normalmente esferas de poliestireno copolimerizado com divinil-benzeno e com ligações cruzadas) [153]. Moléculas cujo tamanho é maior do que o tamanho dos poros do recheio não conseguem penetrar ou se difundir pelos poros, são totalmente excluídas dos poros, ou seja, elas não são retidas, sendo eluídas mais facilmente pela coluna cromatográfica [140]. Os resultados obtidos na GPC são mostrados na tabela 2.

Tabela 2 – Massa molar do PLGA 50:50 obtida após análise cromatográfica

M_n / Da	M_w / Da	Polidispersividade
43.136	46.334	1,07

onde M_n é a massa molar numérica média e M_w é a massa molar ponderal média.

O valor de M_n mostrado na tabela 2 representa a massa molar de todas as cadeias dividido pelo número total de cadeias, sendo portanto uma média que leva em conta mais fortemente o número de cadeias poliméricas. Matematicamente, M_n é representado por:

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} = \frac{\text{massa total do sistema polimérico}}{\text{número total de moléculas do sistema}} \quad (7)$$

A M_w é outra forma de se calcular a massa molar média, onde a massa molar de cada fração contribui de maneira ponderada no cálculo da média total. Matematicamente, M_w é representado por:

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i} = \frac{\sum w_i M_i}{\sum w_i} = \frac{\sum w_i M_i}{w} \quad (8)$$

onde w_i é a massa da fração i. O valor obtido experimentalmente da M_w (46.334 Da) está relativamente próximo a faixa de massa molar informada pelo fabricante (entre 50.000-70.000 Da). A diferença entre o valor informado pelo fabricante e o experimental também foi observado por Konan [97] mostrando a necessidade da determinação experimental da massa molar média do polímero para melhor caracterização da substância polimérica que será utilizada no preparo das nanopartículas.

Através das massas molares M_w e M_n é possível determinar o valor da polidispersividade, parâmetro importante para se avaliar o quão larga ou estreita é

a curva de distribuição de massas molares. Quando M_w é igual a M_n , tem-se um polímero monodisperso, ou seja, todas as cadeias têm o mesmo comprimento. Portanto, o resultado experimental obtido para polidispersividade mostra que o PLGA utilizado no preparo das nanopartículas tem uma distribuição de tamanho relativamente pequeno uma vez que o valor da polidispersividade obtida por GPC foi de 1,07.

A massa molar do álcool polivinílico foi obtida, conforme mostrado no item 3.2, através da determinação da viscosidade intrínseca e da utilização da equação de Mark-Kuhn-Houwink-Sakurada [140]. Os valores das viscosidades específicas foram obtidos pela medida do tempo de escoamento da solução polimérica através do capilar do viscosímetro de Ostwald à 30°C, permitindo a determinação da viscosidade reduzida. Posteriormente, um gráfico da viscosidade reduzida versus a concentração de cada solução polimérica foi obtido (Figura 8).

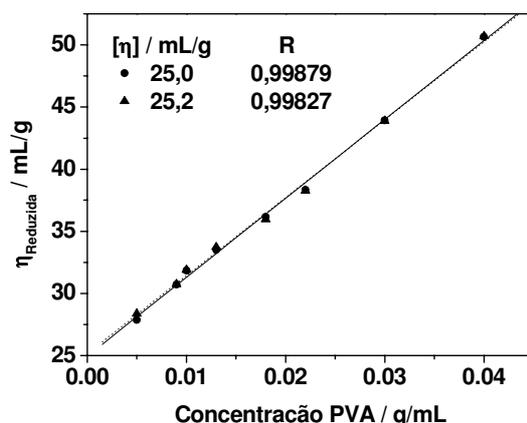


Figura 8 – Viscosidade reduzida versus concentração de PVA para a determinação da viscosidade intrínseca.

Através do coeficiente linear do gráfico da Figura 8 foi possível determinar a viscosidade intrínseca do PVA. Os valores da viscosidade intrínseca obtida experimentalmente foram 25,0 e 25,2 mL/g. Para o PVA as constantes K e a da equação de Mark-Kuhn-Houwink-Sakurada [154] (Eq. 1) à temperatura de 30°C são $45,3 \times 10^{-3}$ mL/g e 0,64, respectivamente. O valor calculado da massa molar

média do PVA foi 19358 ± 170 Da, portanto, dentro da faixa de massa molar média informado pelo fabricante (13.000 a 23.000 Da).

4.2 Primeiras formulações realizadas na tentativa de obter nanopartículas poliméricas

As primeiras formulações preparadas através do método de emulsão-evaporação, a partir dos polímeros PLGA usando PVA como estabilizante, foram feitas via agitação mecânica de 300 rpm. As micrografias e a distribuição do diâmetro das partículas pertencentes a esta formulação são mostradas nas figuras 9A e 9A'. Verifica-se através desta figura que as partículas de PLGA carregadas com InTPP não apresentaram uma distribuição homogênea de tamanho e que suas dimensões estão muito acima dos tamanhos desejados (abaixo de 200 nm) para serem utilizadas em aplicações intravenosas. Novas formulações foram preparadas usando velocidade de agitação de 1200 rpm com o objetivo de se obter partículas de menor diâmetro, sendo os resultados mostrados nas figuras 9B e 9B'.

Os resultados da figura 9B e 9B' mostram que o aumento da velocidade de agitação de 300 para 1200 rpm causou uma diminuição de 39 % no diâmetro médio das partículas poliméricas, gerando esferas discretas, com diâmetros médios relativamente homogêneos de 1,9 μm . A diminuição no diâmetro das partículas já era esperada já que quanto maior a velocidade de agitação maior será a dispersão da fase orgânica na fase aquosa e menor o tamanho das gotículas da fase orgânica dispersa em solução, fato que determina a geração de partículas com diâmetros menores após a evaporação do solvente [135,155,156]. No entanto, o diâmetro das partículas permaneceu muito acima das dimensões nanométricas necessárias para a aplicação intravenosa de suspensões coloidais. Como a velocidade de agitação parece ser um fator importante no tamanho das partículas, optou-se por otimizar o tamanho das esferas avaliando-se a importância deste fator, assim como de outros já relacionados na tabela 1, sobre o diâmetro das partículas usando-se um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

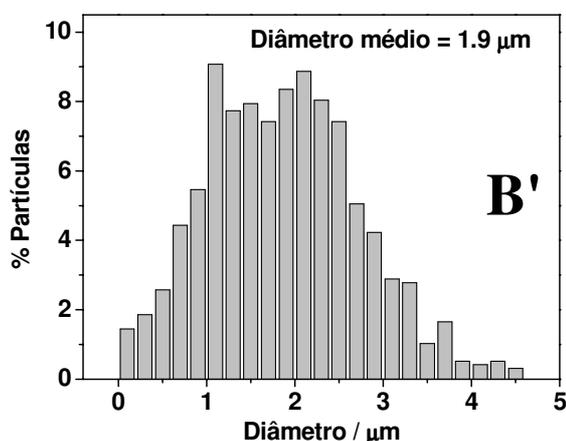
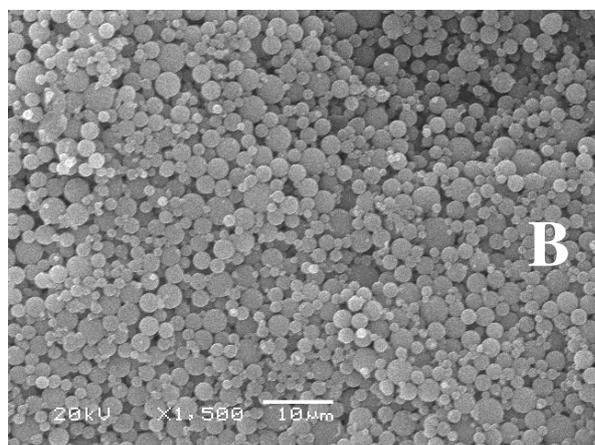
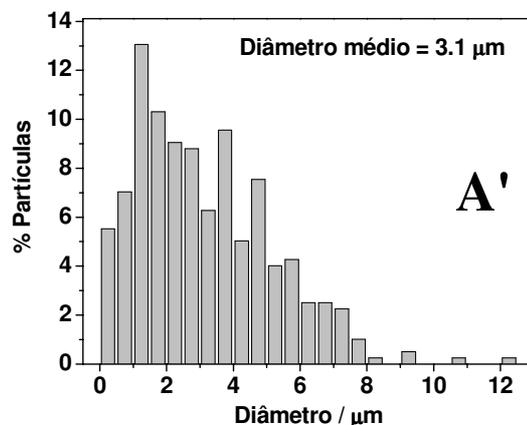
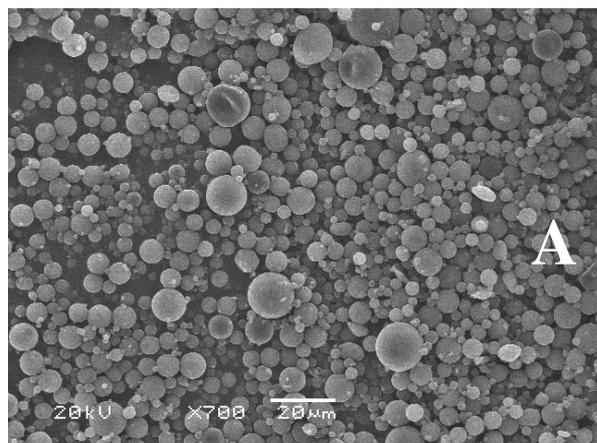


Figura 9 – MEV de micropartículas poliméricas de PLGA carregadas com InTPP, preparadas via agitação mecânica de (A) 300 rpm ou (B) 1200 rpm, e suas respectivas distribuição de tamanho (A' e B') obtidas através da análise das micrografias pelo software UTHSCSA ImageTool 3.0.

4.3 Resultados do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

A fração 2^{4-1} é caracterizada por fornecer valores de contrastes (C) que são estimativas da soma de dois efeitos (E) (efeitos principais e de interação, ou somente de interação) dos parâmetros envolvidos no preparo das partículas sobre uma determinada propriedade [148]. Por exemplo, o contraste referente ao fator 1 (C_1) seria equivalente a soma entre o efeito principal do fator 1 (E_1) com o efeito ternário dos fatores 2, 3 e 4 (E_{234}), ou o contraste C_{12} seria igual a soma dos efeitos E_{12} e E_{34} . Como os contrastes deste fatorial misturam os efeitos principais

com apenas as interações de três fatores, e sabendo que, em geral, estas interações ternárias são desprezíveis, os contrastes devem fornecer ótimas aproximações dos efeitos principais, que seriam calculados num fatorial completo. E embora os contrastes binários possam superestimar os efeitos de interação entre dois fatores estudados, devido a redução no número de ensaios, a situação pode ser remediada se ensaios realizados em duplicata mostrarem que certos contrastes binários são insignificantes sobre uma propriedade. Dessa forma, o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} foi escolhido com a finalidade de minimizar o número de ensaios necessários para um fatorial completo envolvendo 4 fatores (16 formulações, 32 replicatas), permitindo, desta forma, diminuir o trabalho envolvido no preparo, lavagem e liofilização das suspensões nanoparticuladas.

Neste planejamento foram estudadas as influências de fatores como a velocidade de agitação, a concentração do PVA e a presença de etanol na fase orgânica e aquosa, sobre o diâmetro das partículas encapsuladas com InTPP. O interesse em estudar estes fatores se deve aos resultados obtidos por outros pesquisadores [32,155,156] onde o aumento da velocidade de agitação, da concentração do estabilizante coloidal e a presença de um solvente que não solubiliza o polímero na fase orgânica, provocaram a diminuição do tamanho da partícula polimérica. Como alguns trabalhos têm mostrado que a viscosidade pode interferir no tamanho das partículas coloidais [156], optou-se por também estudar a influência do etanol presente na fase aquosa. Deve-se ressaltar que nenhum trabalho da literatura destaca a influência destes fatores sobre o tamanho das partículas através de um fatorial fracionário. Além disso, as estimativas do desvio padrão dos contrastes são iguais para todos os ensaios em virtude deste valor se referir a uma estimativa conjunta, calculada a partir dos desvios de cada um dos ensaios realizados, desde que seja considerado que a variância das repetições seja a mesma em toda a região investigada [148].

4.3.1 Efeito dos fatores sobre o tamanho das partículas

O tamanho das esferas foi monitorado através dos espectros de absorvância das suspensões coloidais, sendo posteriormente, calculadas as

respectivas áreas integradas (tabela 3), as quais foram consideradas como proporcionais a turbidez das suspensões. Como a radiação eletromagnética espalhada por uma partícula ou agregados é diretamente proporcional ao quadrado do volume das partículas ($I_{\text{esp}} \propto V^2$) [157], as suspensões caracterizadas pela presença de partículas de menor diâmetro devem apresentar espectros de absorvância com menor área integrada em razão das mesmas causarem menor espalhamento de luz. Portanto a redução no espalhamento de luz causa a diminuição das intensidades dos espectros de absorvância observadas neste trabalho (Figura 10).

Observa-se também que o espalhamento é mais intenso em regiões de menor comprimento de onda em razão da intensidade de espalhamento ser inversamente proporcional ao comprimento de onda elevado a quarta potência ($I_{\text{esp}} \propto 1/\lambda^4$) [157], fato que justifica o perfil espectral obtido em todas as formulações.

Os resultados obtidos na tabela 3 mostram que a área integrada dos espectros de absorvância das suspensões coloidais tende a diminuir à medida que os experimentos são realizados do ensaio 1 ao ensaio 8, indicando que o tamanho das partículas de PLGA diminui nesta seqüência de ensaios, uma vez que a área integrada é proporcional a turbidez da suspensão.

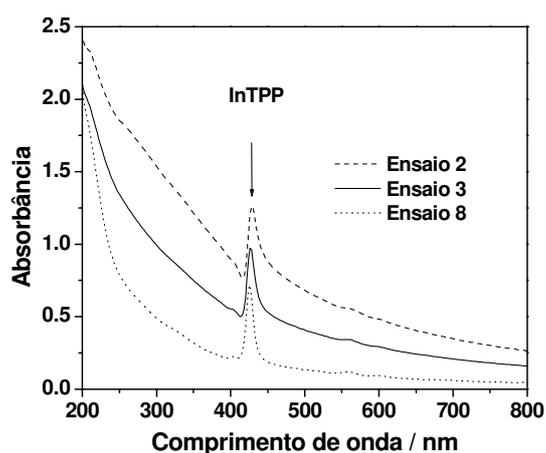


Figura 10 – Espectros de absorvância de algumas formulações do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

Tabela 3 – Áreas integradas dos espectros de absorvância dos ensaios do planejamento fatorial 2^{4-1}

Ensaio	Área integrada do espectro de ABS
1	562 ± 3
2	497 ± 6
3	385 ± 11
4	421 ± 4
5	393 ± 3
6	369 ± 24
7	259 ± 27
8	213 ± 15

Se a turbidez de uma suspensão diminui, têm-se partículas coloidais com tamanhos menores e que espalham menos luz, o que acarreta um espectro de absorvância cuja área integrada é menor. Dessa forma, o tamanho das partículas presentes no ensaio 8 (caracterizado pela menor área integrada do espectro de absorção) foi determinado via espalhamento de luz dinâmico e o resultado indicou partículas com diâmetro médio de 262 ± 13 nm.

Considerando-se os valores dos contrastes relativos a um único fator, e de acordo com as afirmações citadas no item 4.3, foi possível estimar os efeitos dos parâmetros de preparação sobre o tamanho das nanopartículas de PLGA.

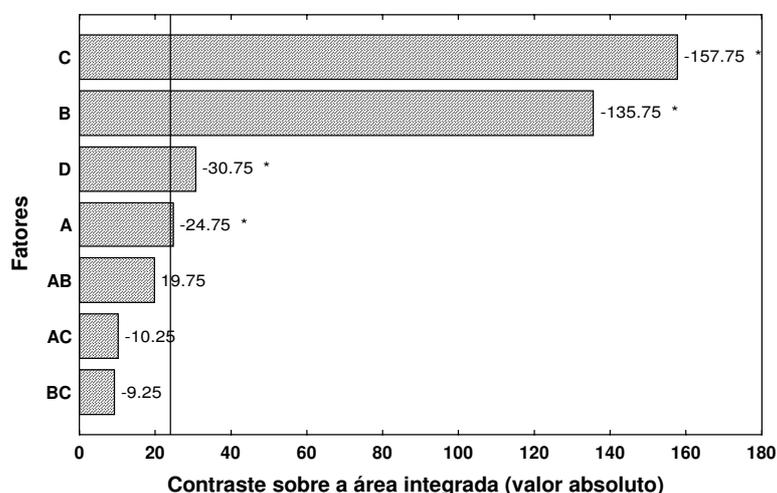


Figura 11 – Valores dos contrastes principais e combinatórios dos fatores estudados (A = % de PVA, B = Velocidade de agitação, C = % de etanol na fase aquosa, D = % de etanol na orgânica) sobre o diâmetro das partículas poliméricas do planejamento fatorial 2^{4-1} . Os contrastes foram calculados através do software Statistica 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 90% de confiança)

Os resultados estatisticamente significativos, com 90% de confiança, indicaram que o aumento de todos os parâmetros estudados (% de PVA, velocidade de agitação, % de etanol na fase aquosa e % de etanol na fase orgânica) causou uma diminuição da área integrada dos espectros de absorvância das suspensões coloidais, que esta associada com a diminuição do tamanho das partículas poliméricas. Quanto menor o diâmetro das partículas, menor será também o espalhamento de luz o que ocasionará uma diminuição na absorvância da suspensão coloidal e, conseqüentemente, na área integrada do espectro

obtido. Dentre os fatores estudados, a velocidade de agitação e a porcentagem de etanol na fase aquosa foram responsáveis pelos maiores efeitos de redução no tamanho da partícula, respectivamente -136 e -158. Isto pode ser confirmado pela comparação dos valores das áreas integradas do ensaio 1 (área = 562 ± 3) com o ensaio 7 (área = 259 ± 27), e do ensaio 2 (área = 497 ± 6) com o ensaio 8 (área = 213 ± 15) já que nestas situações os demais fatores envolvidos (porcentagem de etanol na fase orgânica e a porcentagem de PVA) foram mantidos constantes. O maior efeito causado pelo etanol presente na fase aquosa sobre o diâmetro das partículas (Figura 11-fator C) pode estar associado ao fato de que o álcool etílico provoca um aumento na viscosidade da fase aquosa, dificultando a coalescência das gotículas de fase orgânica obtidas durante a dispersão produzida pelo agitador, evitando portanto a agregação das partículas e conseqüente aumento do diâmetro das mesmas [155,158]. Para se verificar a influência do etanol na viscosidade da fase aquosa, foi determinado o valor da viscosidade absoluta através de medidas do tempo de escoamento em capilar 0,75 mm de um viscosímetro de Ostwald à 30°C, comparado a viscosidade de soluções aquosa de PVA na mesma temperatura, conforme mostrado na figura 12.

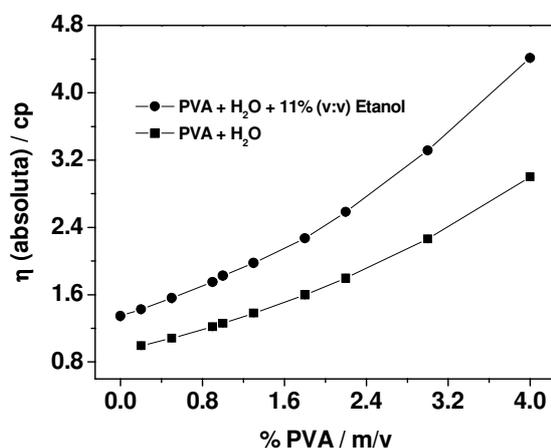


Figura 12 – Alteração da viscosidade absoluta da fase aquosa utilizada no preparo das nanopartículas de PLGA na presença e na ausência de etanol à 30°C.

Como se pode observar pela figura 12, a viscosidade da fase aquosa na presença de etanol é 43-45% maior do que na ausência de etanol. Portanto, muito

provavelmente, este aumento na viscosidade da solução aquosa diminuiu a coalescência das partículas produzidas durante o preparo da emulsão, favorecendo a obtenção de partículas poliméricas de menor diâmetro.

Da mesma forma como foi verificado no item 4.2, o aumento da velocidade de agitação também induz a diminuição no tamanho das partículas poliméricas (Figura 11-fator B). Quanto maior a velocidade de agitação, maior será a dispersão da fase orgânica na fase aquosa e menor o tamanho das gotículas da fase orgânica dispersa em solução, fato que acarreta a geração de partículas com diâmetros menores após a evaporação do solvente [135,155,156].

O aumento na concentração de PVA na fase aquosa também provocou uma diminuição no tamanho das partículas poliméricas (Figura 11-fator A). O álcool polivinílico é um copolímero de poli(acetato de vinila) e poli(álcool vinílico) conforme mostrado na figura 13. A parte hidrofóbica do PVA (acetato de vinila) é responsável pela penetração deste segmento do polímero dentro da fase orgânica, levando o PVA a ficar ancorado à matriz polimérica do PLGA, após a evaporação do solvente orgânico. A interação das cadeias poliméricas do PVA na interface aquosa-orgânica induz a redução na tensão interfacial, aumentando a estabilização das áreas interfaciais associadas às emulsões, bem como a estabilização mecânica e a estabilização estérica. Por outro lado, as cadeias poliméricas do PVA não localizadas na interface aquosa-orgânica podem influenciar a viscosidade da fase contínua, e conseqüentemente, o tamanho das partículas [137,146]. Dessa forma, o aumento da concentração de PVA leva ao aumento da viscosidade da fase aquosa, bem como a diminuição da tensão interfacial entre a fase aquosa/orgânica, favorecendo a diminuição do tamanho das nanopartículas de PLGA.

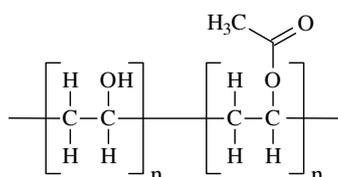


Figura 13 – Estrutura molecular do álcool polivinílico.

Um resultado interessante foi a influência do etanol (fase orgânica) sobre a diminuição do tamanho das partículas (Figura 11-fator D). Experimentos têm mostrado que a adição de um solvente, que não dissolve o polímero, à fase orgânica causa a diminuição da solubilidade do polímero, acelerando a separação de fase do PLGA durante o processo de dispersão [159]. O clorofórmio é um solvente que tem maior afinidade pelo PLGA do que pelo PVA, enquanto que o etanol tem maior afinidade pelo PVA do que pelo PLGA. Portanto, quando a fase orgânica é adicionada à fase aquosa, o etanol preferencialmente se difunde para fora das gotículas de solução orgânica obtidas pelo processo de dispersão, induzindo a diminuição das gotículas [160]. Isto provoca o aumento da concentração do clorofórmio no interior das gotículas o que induz a coacervação (separação de fase) do PVA localizado na interface água-clorofórmio, acelerando a formação de uma parede polimérica de PLGA de curta distância em relação ao centro da gotícula uma vez que o clorofórmio tem baixa afinidade pelo PVA [137,159,159]. Isto minimiza a coalescência das gotículas antes que todo o clorofórmio possa se difundir para a fase aquosa, permitindo a diminuição do tamanho das partículas poliméricas. Vale ressaltar que o clorofórmio presente nas gotículas se difunde continuamente para fase aquosa, até que ocorra a coacervação das partículas de PLGA e posterior solidificação [160].

4.3.2 Efeito dos fatores sobre a porcentagem de encapsulação e de recuperação das nanopartículas

A porcentagem de InTPP encapsulado em nanopartículas de PLGA foi determinada conforme item 3.6.2 e os resultados são mostrados na tabela 4. Pode-se observar que a porcentagem média de encapsulação do InTPP nas partículas de PLGA variou entre 82 a 100%. Posteriormente, os cálculos do contraste de cada um dos fatores estudados sobre a % de encapsulação foi obtido através do programa Statistica 6.0 (Figura 14).

Os resultados dos contrastes do planejamento 2^{4-1} indicaram que os aumentos nas porcentagens de PVA (Figura 14-fator A) e de etanol na fase aquosa (Figura 14-fator C) causaram uma elevação na porcentagem média de

encapsulação do InTPP. Isto pode ser verificado se comparado o valor da porcentagem de encapsulação nos ensaios 1 e 6, uma vez que nestes ensaios a concentração dos outros fatores (velocidade de agitação e porcentagem de etanol na fase orgânica) foi mantida constante.

Tabela 4 – Porcentagem de encapsulação do InTPP em nanopartículas de PLGA pertencentes aos ensaios do planejamento fatorial 2^{4-1}

Ensaio	Fatores				% Encapsulação	% de partículas recuperadas
	A	B	C	D		
1	-	-	-	-	82 ± 4	$78,4 \pm 0,7$
2	+	-	-	+	$100,0 \pm 0,4$	$83,6 \pm 1,4$
3	-	+	-	+	87 ± 3	$65,3 \pm 3,3$
4	+	+	-	-	94 ± 3	$74,3 \pm 0,6$
5	-	-	+	+	94 ± 2	$69,2 \pm 1,9$
6	+	-	+	-	95 ± 4	$69,3 \pm 2,1$
7	-	+	+	-	97 ± 3	$55,5 \pm 2,5$
8	+	+	+	+	99 ± 2	$44,5 \pm 1,6$

O aumento da porcentagem de PVA e etanol causaram uma alteração na porcentagem média de encapsulação de $82 \pm 4\%$ para $95 \pm 4\%$. O mesmo pode ser verificado se forem comparadas as porcentagens de encapsulação dos ensaios 3 e 8, onde houve um aumento no encapsulação do InTPP de $87 \pm 3\%$ para $99 \pm 2\%$.

Conforme citado no item 4.3.1, a viscosidade da fase aquosa aumenta com as concentrações de PVA e de etanol na fase aquosa, o que favorece a obtenção de partículas pequenas. Partículas pequenas apresentam elevada área superficial específica permitindo que um maior número de moléculas do estabilizante se localize na interface entre as fases orgânica e aquosa. Isto pode dificultar a difusão da droga encapsulada da fase orgânica para a fase aquosa, levando ao aumento da porcentagem de encapsulação. Este efeito interfacial do PVA também foi sugerido por Sahoo et al. [146] para explicar o aumento do encapsulação da albumina bovina em nanopartículas de PLGA. Outros autores como Mu et al. [161]

e Yoncheva et al. [162] também citam que os agentes emulsificantes podem influenciar na porcentagem de droga encapsulada em partículas poliméricas devido sua influência na interface entre a fase orgânica e a fase aquosa.

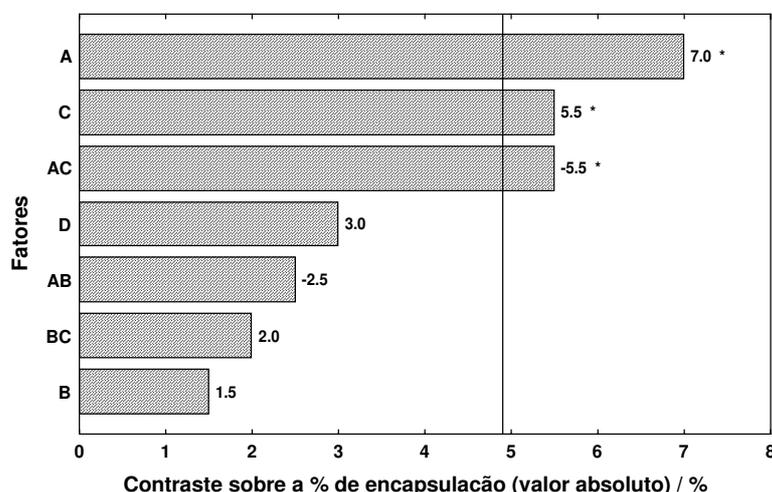


Figura 14 – Valores dos contrastes principais e combinatórios dos fatores estudados (A = % de PVA, B = Velocidade de agitação, C = % de etanol na fase aquosa, D = % de etanol na orgânica) sobre a porcentagem de encapsulação do InTPP em nanopartículas de PLGA pertencentes ao planejamento fatorial 2^{4-1} . Os contrastes foram calculados através do software Statistica 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 90% de confiança)

Um resultado interessante obtido pelo planejamento fatorial está relacionado ao contraste de interação AC (Figura 14). Como os fatores B e D não foram significativos sobre a porcentagem de encapsulação, foi também assumido que o efeito de interação BD não é significativo, permitindo-se estimar que o contraste AC possa ser utilizado como efeito de interação entre a porcentagem de PVA e de etanol na fase aquosa sobre a porcentagem de encapsulação. O aumento da porcentagem de ambos os parâmetros durante o preparo das formulações provocou uma diminuição da porcentagem de InTPP encapsulado.

Estudos espectroscópicos (Figuras 15A e 15B) revelaram que tanto o PVA quanto o etanol favorecem a monomerização do InTPP em meio aquoso, evidenciado pelo aumento da absorvância do InTPP e redução do alargamento do perfil espectral. Isto pode diminuir a porcentagem de encapsulação do InTPP nas partículas de PLGA devido o aumento de ambos os parâmetros (etanol e do PVA)

tornar o meio aquoso mais favorável a solubilização do InTPP. Muito provavelmente, o efeito individual de cada fator sobre o tamanho das partículas deve sobrepujar o efeito que cada um deles exerce sobre a solubilização do InTPP em meio aquoso, tornando o efeito individual favorável ao aumento da porcentagem de encapsulação. No entanto, o aumento simultâneo de ambos os fatores torna mais suscetível a solubilização do composto no meio aquoso, fato que torna o aumento combinado responsável pela diminuição da porcentagem de encapsulação.

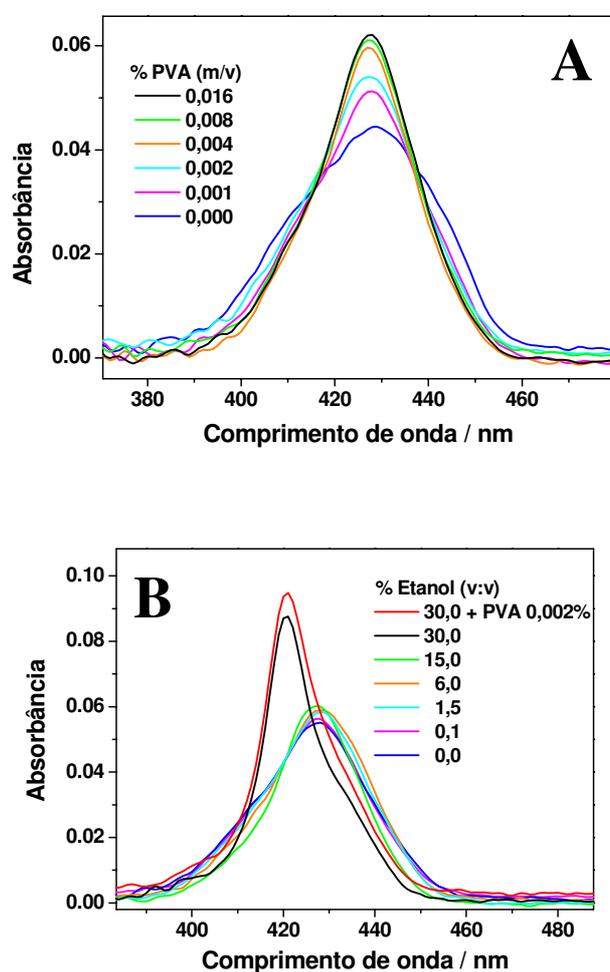


Figura 15 – Variação da absorbância de uma solução aquosa de InTPP (0,2 $\mu\text{mol/L}$) na presença de 0,1% de DMF e várias concentrações de (A) PVA ou (B) etanol.

Um planejamento fatorial 2^2 realizado por Dillen et al. [163] mostrou que o aumento do número de ciclos de homogeneização da suspensão coloidal seria significativo para aumentar a porcentagem de encapsulação da ciprofloxacina (vide anexo) em nanopartículas de PLGA via emulsão água/óleo/água, devido à diminuição do tamanho das gotículas de solvente orgânico, o que permitiria uma evaporação mais rápida do solvente em razão da maior área superficial da gotícula. Isto minimizaria a difusão da droga da fase aquosa interna para a externa, aumentando a porcentagem de encapsulação da ciprofloxacina nas partículas de PLGA. O resultado obtido por Dillen indica que fatores que influenciam no tamanho da partícula podem afetar a porcentagem de encapsulação de um composto sobre nanopartículas poliméricas. Portanto, como os fatores A e C influenciam o tamanho das partículas, há possibilidade de que ambos afetem a porcentagem de encapsulação do InTPP de forma similar ao sugerido por Dillen.

Alguns artigos [164,165] relatam o problema da baixa eficiência de encapsulação de drogas hidrofóbicas devido à interação do fármaco com o surfactante utilizado para estabilizar a emulsão, provocando a saída da droga para a fase aquosa e conseqüente diminuição na eficiência do encapsulação. Em função dos resultados obtidos nos ensaios do planejamento fatorial, tal fato torna-se importante para a eficiência do InTPP quando ambas as concentrações de PVA e etanol forem aumentadas simultaneamente.

Pesquisadores relataram porcentagens de encapsulação da meso-tetra(4-hidroxifenil)porfirina (uma porfirina com estrutura semelhante ao InTPP) em nanopartículas de PLGA com diâmetros médios em torno de 109 a 136 nm na faixa de 63 a 77% [97,121]. A maior porcentagem de encapsulação obtida na formulação preparada em nosso laboratório pode estar associada ao fato de que a relação entre a massa de PLGA e InTPP utilizada no preparo das partículas foi 17 vezes maior do que a relação utilizada no encapsulação do tetra(4-hidroxifenil)porfirina (p-THPP) ou devido ao fato do InTPP ser mais hidrofóbico do que o p-THPP o que levaria uma maior concentração de moléculas do InTPP a ficar incorporadas nas partículas de PLGA ou adsorvidas nas superfícies das

partículas. O caráter mais hidrofílico do p-THPP comparado ao InTPP faz com que a meso-tetra(4-hidroxifenil)porfirina tenha maior capacidade de solubilizar-se na fase aquosa, diminuindo a eficiência de encapsulação da molécula junto as partículas de PLGA.

Micrografias do InTPP encapsulado em micropartículas (Figura 16) foram obtidas pela excitação do fotossensibilizador com uma fonte de mercúrio, selecionando comprimentos de onda entre 400-440 nm para avaliação qualitativa do encapsulação do InTPP. As micrografias confirmaram o encapsulação do InTPP nas partículas poliméricas já que a fluorescência observada na micrografia advém da partícula e não de regiões próximas ou externas a partícula. Os experimentos de liberação em conjunto com a microscopia confocal (a serem mostrados no item 4.6) permitiram sugerir que a fluorescência detectada foi emitida por moléculas de InTPP localizadas na zona superficial das partículas, bem como no interior. Experimentos realizados com partículas sem InTPP encapsulado não apresentaram emissão de fluorescência. Os resultados das microscopias de fluorescência realizados com nanopartículas não permitiram observar emissão de fluorescência em razão da limitação de aumento do microscópio óptico.

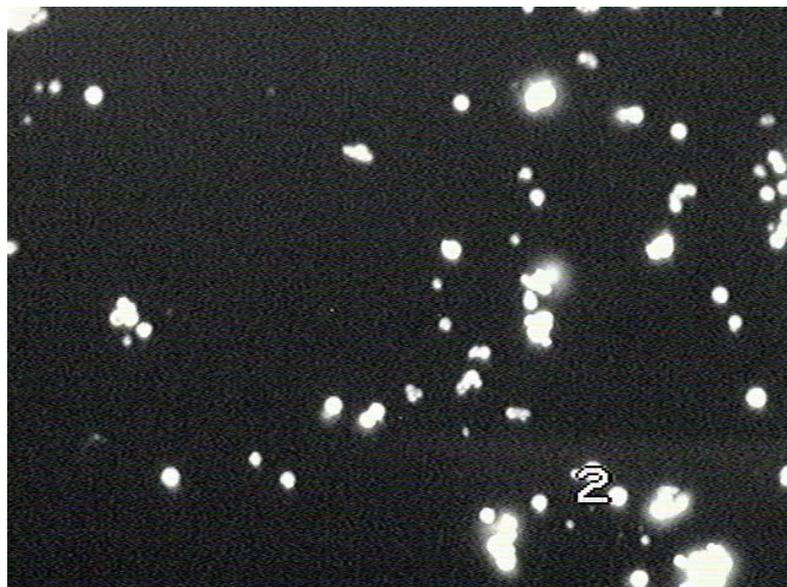


Figura 16 – Micrografia de fluorescência de micropartículas de PLGA contendo InTPP. Foi realizado aumento de 400x.

Análises elementares realizadas utilizando-se o microscópio eletrônico de varredura com analisador EDX também confirmaram a presença de elementos químicos pertencentes à molécula do InTPP nas micropartículas de PLGA (resultados não mostrados). Entretanto a intensidade da energia dispersiva de raio-X emitida pelo InTPP presente nas micropartículas foi muito pequena, provavelmente, devido a pequena proporção de massa de InTPP por massa de partícula ($0,57 \pm 0,03$ %). Não foram detectadas energias dispersivas de raio-X para o InTPP encapsulado em nanopartículas. Estas apresentam um volume menor que as micropartículas o que favorece a encapsulação de uma massa menor de InTPP por nanopartícula, fato que leva a emissão de raio-X de menor intensidade, não detectada pelo aparelho.

Uma vez que a indústria visa a produção de formulações com custo reduzido, foi determinada a porcentagem de recuperação de partículas em todos os ensaios do planejamento fatorial (Tabela 4). Os resultados mostram que a porcentagem média de partículas recuperadas variou entre 83,6 a 44,5%, sugerindo que as formulações caracterizadas pela presença de partículas de menor diâmetro apresentaram as menores porcentagens de recuperação.

Os valores dos contrastes do planejamento fatorial fracionário mostraram que os aumentos da velocidade de agitação (Figura 17-fator B), da porcentagem de etanol na fase aquosa (Figura 17-fator C) e da porcentagem de etanol na fase orgânica (Figura 17-fator D) causaram uma diminuição da porcentagem de partículas recuperadas. Isto pode ser observado, por exemplo, se forem comparados os ensaios 1, 2, 5 e 6 (onde foi usada velocidade de agitação baixa) que apresentaram porcentagens de recuperação entre 83,6 a 69,2%, com os ensaios 3, 4, 7 e 8 (onde foi usado velocidades altas de agitação) que apresentaram uma recuperação entre 74,3 a 44,5%. Raciocínio idêntico pode ser feito com os demais fatores. Estes 3 fatores foram responsáveis por causar um redução no diâmetro das partículas poliméricas, conforme já citado no item 4.3.1. Como o processo de lavagem foi executado sempre mantendo a mesma velocidade e tempo de centrifugação, respectivamente, $20.400 \times g$ e 20 minutos, a medida que as partículas diminuíram de tamanho, houve uma perda maior das

partículas durante as etapas de lavagens. Problemas na recuperação das partículas também foram relatados por Gorner et al. [166] quando preparou nanopartículas de PLA contendo lidocaína (vide anexo). Altas velocidades de centrifugação foram utilizadas para separar as nanopartículas com diâmetro entre 247 e 366 nm mantendo uma porcentagem média de recuperação de 51,5%. No entanto, ao manter a mesma velocidade para separar as partículas com diâmetros maiores (817 nm) houve colapso das partículas e o rendimento foi pequeno (31%).

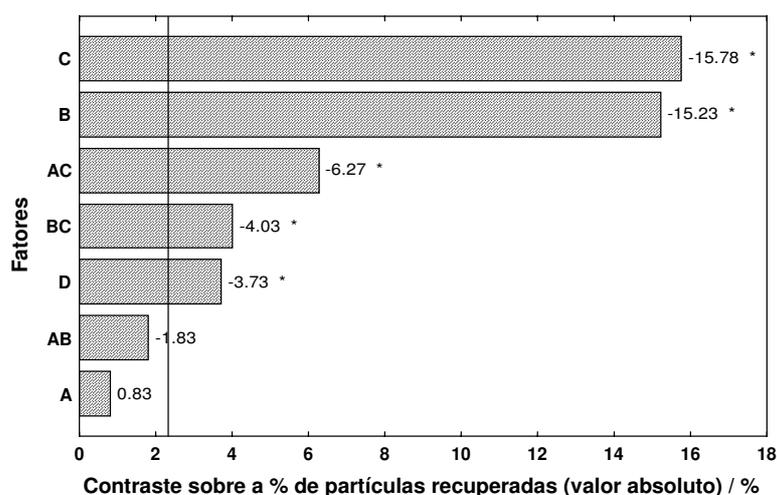


Figura 17 – Valores dos contrastes principais e combinatórios dos fatores estudados (A = % de PVA, B = Velocidade de agitação, C = % de etanol na fase aquosa, D = % de etanol na orgânica) sobre a porcentagem de recuperação das nanopartículas de PLGA pertencentes ao planejamento fatorial 2^{4-1} . Os contrastes foram calculados através do software Statistica 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 90% de confiança)

Feng et al. [164] ao encapsular o paclitaxel (vide anexo) em nanopartículas de PLGA relataram que a recuperação das partículas preparadas usando PVA como emulsificante variou entre 82,4 a 41,9%, sendo que a menor porcentagem refere-se a situação onde o paclitaxel não foi encapsulado, e a maior para a situação onde a relação de massa de paclitaxel por massa de partícula foi de 12%. Os resultados de Feng sugerem que a massa de fármaco contida na partícula pode também afetar a % de recuperação.

Riley et al. [145] prepararam nanopartículas de PLA-PEG, contendo cloreto de procaína, com diâmetros muito menores (entre 71,5 a 64,7 nm) que aqueles

obtidos neste trabalho e obtiveram porcentagens de recuperação entre 71,8 e 66,1%, enquanto no ensaio 8 a recuperação foi de 44,5%. Ressalta-se que aqueles autores separaram suas partículas usando velocidade e tempo de centrifugação alta, respectivamente, 311.000 x g e 3 horas, fato que deve ter favorecido seus melhores resultados.

O Planejamento fatorial também mostrou que os contrastes de interação BC e AC foram significativos, com 90 de confiança, em causar uma diminuição da recuperação das partículas poliméricas. Embora o fator A não seja significativo em causar alteração na porcentagem de recuperação das partículas, o fator D é significativo. Portanto, como o contraste BC é uma somatória dos efeitos $E_{BC} + E_{AD}$ não se pode assumir que o efeito de interação AD seja desprezível em relação ao efeito BC. O mesmo raciocínio deve ser feito ao contraste AC, pois embora o fator A não seja significativo, o fator C influenciou a recuperação das partículas. Como o contraste AC é uma soma dos efeitos de combinação $E_{AC} + E_{BC}$ não se pode afirmar qual efeito de interação, se AC ou BC ou ambos são realmente significativos. Dessa forma, o planejamento fatorial fracionário neste caso impossibilita uma conclusão satisfatória sobre os efeitos interação entre os fatores estudados.

De qualquer forma, os resultados acima mostraram que a otimização de um tempo e de uma velocidade de centrifugação adequada é necessária para se obter melhor porcentagem de recuperação. Tentou-se aumentar a velocidade da centrífuga para 48.400 x g, a fim de aumentar a porcentagem de nanopartículas recuperadas, mas não houve alteração significativa dos resultados, à exceção da tendência das partículas em formarem agregados que não se dispersaram. A utilização de ultracentrífuga e a diminuição no número de lavagens poderiam minimizar as perdas das nanopartículas obtidas. No entanto, a diminuição no número de lavagens, acarreta o aumento da concentração de PVA residual (conforme será mostrado à frente) sobre as nanopartículas o que não é desejado nas formulações farmacêuticas, bem como a utilização de ultra-centrífuga pode causar deformações nas partículas e agregações que provocariam alterações nas propriedades das nanopartículas como a velocidade de liberação do fármaco e a

eficiência na encapsulação da droga. Otimizações poderiam ser feitas usando um planejamento fatorial, mas optou-se por aumentar a velocidade e o tempo de centrifugação para 27.200 x g e 40 minutos respectivamente para as formulações posteriores.

4.3.3 Efeito dos fatores sobre o potencial zeta

A estabilidade de uma suspensão depende das propriedades físicas das partículas coloidais que as constituem, sendo necessário determiná-las para a compreensão das interações individuais de cada partícula que podem levar a desestabilização de uma suspensão. Em geral, busca-se maximizar as forças repulsivas entre as partículas a fim de minimizar as interações que levam a formação de agregados, o quais desestabilizam as suspensões coloidais. Dessa forma, as forças de interação nas superfícies dos colóides são as responsáveis pelo comportamento das suspensões, sendo as forças eletrostáticas repulsivas uma das vias pelas quais as partículas podem resistir à agregação.

A maior parte dos materiais macroscópicos ou particulados em contato com um líquido adquire uma carga elétrica superficial, a qual pode ser gerada devido a dissociação de grupos ionogênicos presentes na superfície das partículas ou devido a adsorção diferencial de íons da solução na superfície do colóide. Esta carga superficial influencia a distribuição dos íons próximo a superfície [158]. Considerando-se uma partícula carregada negativamente, íons de carga positiva (contra-íons) são atraídos pela superfície e formam uma rígida camada adjacente ao redor da mesma, conhecida como camada de Stern. Outros contra-íons são também atraídos pela partícula negativa, no entanto, são repelidos pela camada de Stern, o que resulta em uma camada difusa de contra-íons caracterizada pela alta concentração de íons positivos próximos à partícula negativa e pela diminuição gradual desta concentração com o afastamento em relação à partícula carregada, até que seja atingido o equilíbrio com a concentração dos contra-íons em solução. De forma oposta, os íons negativos (co-íons) são repelidos pela superfície da partícula carregada negativamente, de maneira que na camada difusa há uma pequena concentração de co-íons próxima a partícula carregada.

No entanto, a concentração de íons negativos tende a aumentar com o afastamento em relação à partícula carregada, em função da diminuição do efeito repulsivo, até que o equilíbrio com a concentração dos co-íons em solução seja atingido [167].

Assim se constitui uma dupla camada elétrica a qual está dividida em duas regiões: uma interna que inclui íons fortemente ligados à superfície e uma região externa onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico [167]. Quando um campo elétrico é aplicado a uma suspensão, cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade eletrocinética, e o potencial determinado na superfície de cisalhamento (superfície imaginária constituída pelos contra-íons ligados à superfície da partícula, bem como por algumas moléculas do solvente também ligadas à superfície) é chamado de potencial zeta [167], o qual pode ser utilizado para prever a tendência das partículas coloidais a agregação.

Um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} também foi utilizado para avaliar a influência dos parâmetros de preparação das nanopartículas sobre o valor do potencial zeta. Os contrastes dos parâmetros de preparação das partículas poliméricas, bem como os valores dos potenciais zeta são mostrados respectivamente na figura 18 e na tabela 5.

Pode-se observar que os potenciais são negativos para todos os ensaios, concordando com os resultados experimentais relatados por outros pesquisadores [97,146,168]. Geralmente, valores altamente negativos de potencial zeta são esperados para partículas de PLGA devido a presença dos grupos carboxílicos localizados nas cadeias poliméricas do poliéster [168]. Através da tabela 5 pode-se verificar uma redução do potencial negativo quando se comparam os ensaios com maior área integrada do espectro de absorvância das suspensões de partículas de PLGA (ensaios 1 e 2) com o ensaio de menor área integrada (ensaio 8), sugerindo que partículas de menor tamanho apresentam potenciais menores. Um exemplo é o ensaio 8 que tem um valor de área integrada (213 ± 15) inferior ao ensaio 1 (562 ± 3), bem como um menor potencial zeta ($-20,0 \pm 0,2$ mV) quando comparado ao mesmo ensaio ($-26,3 \pm 0,9$ mV). No entanto, esta tendência

de redução do potencial não foi significativa para os demais ensaios em razão da proximidade dos valores dos potenciais, considerando-se os desvios.

Tabela 5 – Valores de potencial zeta das nanopartículas de PLGA e das áreas integradas dos espectros de absorvância pertencentes aos ensaios do planejamento fatorial 2^{4-1}

Ensaio	Fatores				Potencial Zeta / mV	Área integrada espectro de ABS
	A	B	C	D		
1	-	-	-	-	-26,3 ± 0,9	562 ± 3
2	+	-	-	+	-26,5 ± 0,5	497 ± 6
3	-	+	-	+	-21,2 ± 4,4	385 ± 11
4	+	+	-	-	-24,5 ± 3,9	421 ± 4
5	-	-	+	+	-25,2 ± 0,7	393 ± 3
6	+	-	+	-	-23,3 ± 1,5	369 ± 24
7	-	+	+	-	-22,8 ± 1,1	259 ± 27
8	+	+	+	+	-20,0 ± 0,2	213 ± 15

Pesquisadores têm relatado uma clara diferença nos valores do potencial zeta de partículas cujas superfícies não são ou são revestidas por polímeros anfifílicos [145,146]. Normalmente, partículas revestidas com alguns polímeros anfifílicos apresentam menores potenciais zeta em razão do aumento da superfície de cisalhamento, e conseqüentemente, da blindagem da carga superficial das partículas [169,170]. Portanto, como partículas pequenas apresentam maior área superficial, maior será a porcentagem de PVA residual sobre a superfície das nanopartículas, e conseqüentemente, menor deverá ser o valor do potencial zeta. Isto justificaria a redução do potencial negativo observado para o ensaio 8 quando comparado ao ensaio 1. Resultados experimentais semelhantes foram também obtidos por Sahoo et al. [146] e por Panyam et al. [171], que utilizando nanopartículas de PLGA de menor tamanho verificaram uma concentração maior de PVA residual adsorvido sobre a superfície da partícula, ocasionando a diminuição do valor negativo do potencial zeta. Resultados obtidos por Bourdon et al. [172] durante a encapsulação da meta-tetra(hidroxifenil)clorina em nanocápsulas de PLA, na presença e ausência do emulsificante Poloxamer,

também mostraram uma diminuição nos valores do potencial zeta quando o emulsificante foi utilizado.

Os resultados obtidos através do planejamento fatorial mostram que entre os parâmetros de preparação das nanopartículas que foram avaliados, apenas a velocidade de agitação causou um efeito estatisticamente significativo ($+4,3 \pm 1,6$ mV), com 90% de confiança, sobre os valores do potencial zeta (Figura 18-fator B), causando a diminuição do potencial negativo.

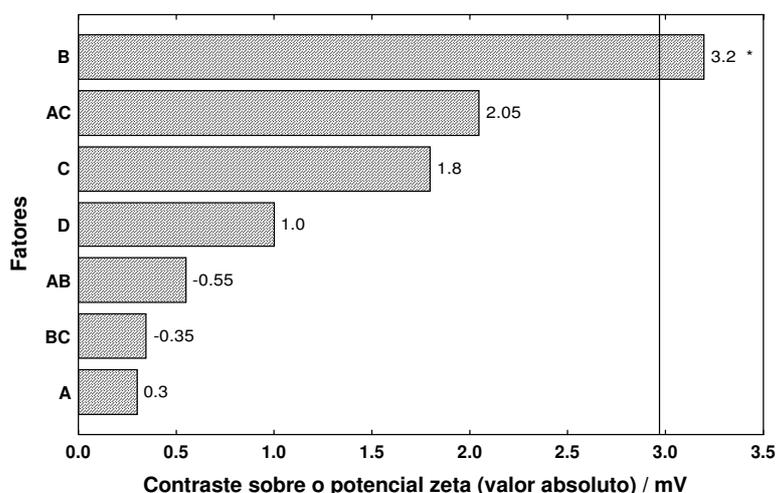


Figura 18 – Valores dos contrastes principais e combinatórios dos fatores estudados (A = % de PVA, B = Velocidade de agitação, C = % de etanol na fase aquosa, D = % de etanol na orgânica) sobre o potencial zeta das nanopartículas de PLGA pertencentes ao planejamento fatorial 2^{4-1} . Os contrastes foram calculados através do software Statistica 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 90% de confiança)

O aumento da velocidade de agitação causa maior dispersão da fase orgânica sobre a fase aquosa levando a obtenção de gotículas de menor tamanho, as quais apresentam elevada área superficial específica. Como citado no item 4.3.2, isto favorece maior acúmulo das moléculas de PVA na interface entre as fases orgânica/aquosa formada durante a emulsão, levando a um aumento da porcentagem de PVA residual adsorvida sobre a superfície das partículas [137]. Este aumento do PVA residual causa um aumento na superfície de cisalhamento, e provavelmente, na blindagem da carga superficial das nanopartículas de PLGA, ocasionando uma diminuição do potencial negativo.

Os fatores estudados como a porcentagem de PVA na fase aquosa, e a porcentagem de etanol na fase orgânica, embora sejam parâmetros de preparação que causaram uma diminuição no tamanho das partículas, são fatores cujos efeitos sobre o diâmetro foram menores, comparados aos outros dois fatores estudados. Portanto, pode ser que em razão disto, a porcentagem de PVA na fase aquosa e o etanol na fase orgânica não tenham provocado alteração significativa no potencial zeta. No entanto, o etanol na fase aquosa foi o fator que mais induziu a diminuição no tamanho da partícula. Um planejamento fatorial foi realizado (item 4.3.4) para avaliar se os parâmetros de preparação exercem alguma influência sobre a porcentagem residual de PVA na superfície das nanopartículas de PLGA. Dessa forma, era esperado que este fator pudesse influenciar a porcentagem de PVA residual sobre a superfície das nanopartículas de PLGA, o que provocaria a diminuição do potencial zeta.

Dillen et al. [163] também realizaram estudos através de um planejamento fatorial 2^4 para avaliar a influência de parâmetros de preparação de nanopartículas contendo ciprofloxacina (vide anexo), como o número de ciclos de homogeneização, a presença de ácido bórico em meio aquoso, a concentração da droga a ser encapsulada, e a proporção entre as fases orgânica/aquosa, sobre o potencial zeta. Os resultados mostraram que nenhum destes parâmetros foi estatisticamente significativo sobre os valores de potencial zeta. Como os ciclos de homogeneização afetam o tamanho da partícula, esperava-se que este fator fosse significativo sobre os valores do potencial zeta. No entanto, os ciclos de homogeneização não causaram variações significativas nos tamanhos das partículas, as quais variaram de 308 a 240 nm. É possível que o número de ciclos de homogeneização não tenha sido suficiente para causar variações mais significativas sobre o tamanho das partículas a ponto de afetar o potencial zeta, como foi observado no fatorial fracionário (Figura 18) quando houve o aumento da velocidade agitação de 10.000 para 14.000 rpm. Deve-se ressaltar que neste trabalho [163], não houve etapas de lavagem das suspensões coloidais como houve nas preparações realizadas em nosso laboratório. Além disso, a massa molar do PVA utilizada por Dillen foi bem maior (30.000-70.000 Da) quando

comparada com o PVA utilizado em nosso laboratório (13.000-23.000 Da). Estes detalhes experimentais podem causar diferenças nos resultados observados para os efeitos do número de ciclos de homogeneização sobre o potencial zeta comparado ao efeito da velocidade de agitação.

4.3.4 Efeito dos fatores sobre a porcentagem de PVA residual

O álcool polivinílico, produzido pela hidrólise controlada de acetato polivinílico, é o agente emulsificante mais utilizado como estabilizante de emulsões, uma vez que permite a obtenção de partículas com diâmetro relativamente pequeno e com distribuição de tamanho uniforme [146]. O PVA apresenta autorização da FDA (Food and Drug Administration) desde 1996 para ser utilizado em cosméticos [173]. É também utilizado no revestimento de superfícies, na manufatura de esponjas artificiais, como lubrificante em soluções oftalmológicas, em aplicações clínicas como material causador de embolia, como condutor de espermicidas, e em formulações farmacêuticas orais e dérmicas [173].

O caráter anfifílico do PVA, devido a presença de grupos acetato (parte hidrofóbica) e grupos hidroxila (parte hidrofílica) nas cadeias, permite que o álcool polivinílico interaja na interface orgânica/aquosa dos sistemas nanoparticulados (Figura 19), reduzindo eficientemente a tensão interfacial e promovendo a formação de um sistema dispersivo [137], conforme citado no item 4.3.1.

Portanto, o solvente orgânico ao se difundir para a fase aquosa, causa a coalescência e posterior solidificação do PLGA contendo uma camada de álcool polivinílico que reveste a superfície da partícula [137,146,174]. O empacotamento compacto das cadeias de PVA ancoradas na interface orgânica/aquosa forma um filme rígido de álcool polivinílico que, por ser resistente a forças de cisalhamento, confere estabilidade mecânica às gotículas de solvente orgânico durante a emulsificação [137]. Além disso, a presença do PVA na superfície das partículas permite a estabilização da emulsão por efeitos estéricos, os quais dependem da conformação adotada pelas cadeias do polímero.

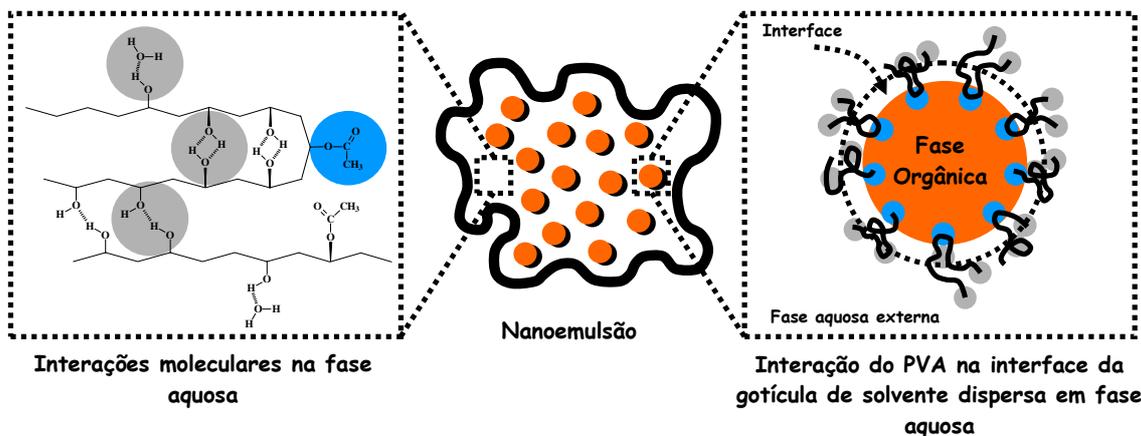


Figura 19 – Modelo de interação das moléculas de PVA durante o processo de preparo das nanopartículas. Adaptado de Garlindo-Rodrigues et al. [137].

Deve-se ressaltar que o PVA residual sobre as nanoesferas favorece a adsorção irregular de outras moléculas de álcool polivinílico na superfície das partículas [137], potencializando a estabilização por efeito estérico. Trabalhos têm mostrado que a porcentagem residual de álcool polivinílico sobre a superfície das partículas pode influenciar propriedades físico-químicas e biológicas das nanoesferas como o tamanho e a distribuição de tamanho [97,137,146,174], a carga superficial [97,146,175], hidrofobicidade da superfície [146], velocidade de degradação do PLGA [176], perfis de liberação de drogas encapsuladas [146] e retenção celular das nanoesferas [146,171]. Embora alguns trabalhos [161,175] relatem que o PVA seja não-biodegradável e potencialmente cancerígeno, pesquisas têm mostrado que o PVA é um excelente material para uso em aplicações médicas, tais como em sistema de liberação de drogas, devido sua biocompatibilidade [177]. Estudos realizados por Nair et al. [173] mostraram que a toxicidade do PVA não está associada a sua estrutura, mas a sua massa molar. O álcool polivinílico com massa molar em torno de 14.800 Da apresenta meia vida plasmática de 90 minutos após administração intravenosa, de forma que o acúmulo de polímero nos órgãos é muito pequeno. No entanto, moléculas de PVA com massas molares maiores, como 170.000 Da, apresentam meia vida plasmática de 23 horas, sendo portanto mais tóxico devido ao maior acúmulo no organismo humano [74,173].

Portanto, em razão das informações citadas acima, foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} a fim de avaliar a influência de alguns parâmetros de preparação das nanopartículas de PLGA, como a porcentagem de etanol nas fases aquosa e orgânica, a porcentagem de PVA e a velocidade de agitação, sobre a porcentagem residual de álcool polivinílico, conforme item 3.6. Os efeitos dos parâmetros de preparação sobre a % residual de PVA, bem como os valores residuais de álcool polivinílico são mostrados, respectivamente, na Figura 20 e na tabela 6.

Tabela 6 – Valores da porcentagem de PVA residual sobre as nanopartículas de PLGA e das áreas integradas dos espectros de absorvância pertencentes aos ensaios do planejamento fatorial 2^{4-1}

Ensaio	Fatores				% PVA residual ($m_{PVA}:m_{Partícula}$)	Área integrada espectro de ABS
	A	B	C	D		
1	-	-	-	-	$0,3 \pm 0,1$	562 ± 3
2	+	-	-	+	$0,4 \pm 0,1$	497 ± 6
3	-	+	-	+	$1,0 \pm 0,3$	385 ± 11
4	+	+	-	-	$0,6 \pm 0,1$	421 ± 4
5	-	-	+	+	$1,1 \pm 0,1$	393 ± 3
6	+	-	+	-	$1,1 \pm 0,1$	369 ± 24
7	-	+	+	-	$1,2 \pm 0,4$	259 ± 27
8	+	+	+	+	$1,7 \pm 0,4$	213 ± 15

A tabela 6 mostra que as porcentagens médias residuais de PVA presentes nos ensaios do planejamento fatorial variaram entre 0,3 e 1,7%. Konan e colaboradores [97] mostraram que a porcentagem de PVA (M_w 26.000 Da) presente nas superfícies das nanopartículas de PLGA 50:50, com tamanhos em torno de 100 nm, pode variar entre 15,9 a 38,3% (m:m). Sahoo e colaboradores [146] têm mostrado que a porcentagem residual de PVA associado às nanopartículas preparadas com uma porcentagem de 2% (m:m) de álcool polivinílico (M_w 30.000 a 70.000 Da) está em torno de $3,5 \pm 0,3\%$ (m:m). Comparando-se os valores obtidos neste trabalho com os dados citados acima,

observa-se uma porcentagem menor de PVA sobre as formulações preparadas em nosso laboratório. Muito provavelmente, esta menor porcentagem de álcool polivinílico pode estar associada ao número de lavagens das suspensões coloidais para eliminação do excesso do polímero [175] ou devido ao método utilizado para lavagem da suspensão. Konan [32], em seu trabalho, cita que o excesso de PVA foi eliminado através de ultrafiltração das partículas, no entanto, este processo mostrou-se pouco eficiente na eliminação do PVA, resultando numa porcentagem maior de álcool polivinílico sobre as superfícies das nanopartículas. Já o processo de lavagem utilizado por Sahoo [146] envolve um procedimento similar ao realizado neste trabalho, porém, o número de lavagens (duas no total) realizadas pelo pesquisador foi menor do que o realizado em nosso laboratório (seis lavagens no total). Portanto, o aumento no número de lavagens das suspensões para eliminação do excesso de PVA favorece a diminuição do álcool polivinílico residual sobre as partículas [175], o que é interessante para fins de aplicação intravenosa em razão do PVA não ser biodegradável.

Pode-se verificar pela tabela 6 que à medida que as áreas integradas dos espectros de absorção, pertencentes às suspensões do planejamento fatorial, diminuíram (o que indica uma redução do tamanho das partículas) houve um aumento na porcentagem residual do PVA. Isto pode ser confirmado comparando-se os valores da % residual e da área integrada dos ensaios 1 a 8. Resultados semelhantes foram observados por Lee et al. [174] e por Panyam et al. [176]. Partículas de maior diâmetro apresentam menor curvatura superficial se comparadas às curvaturas das partículas de menor diâmetro. Este fato permite que uma única molécula de PVA possa ancorar na interface orgânica/aquosa através de um grande número de grupos acetato. Isto faz com que poucas moléculas possam ancorar na interface orgânica/aquosa levando a um menor empacotamento das moléculas de PVA na superfície da partícula.

Entretanto, nas partículas menores, o ancoramento de uma molécula de PVA ocorre através de um pequeno número de grupos acetato em razão da maior curvatura superficial da partícula. Isto possibilita que um maior número de moléculas possam ancorar na superfície da partícula, levando a um

empacotamento maior de moléculas de PVA. Portanto, a diminuição no tamanho das partículas aumenta a área superficial específica das nanoesferas permitindo que um maior número de moléculas de PVA interaja na interface entre as fases orgânica e aquosa (item 4.3.1), resultando no aumento da porcentagem de PVA residual.

Os resultados estatisticamente significativos, obtidos com 90% de confiança, referente aos efeitos dos parâmetros de preparação das nanopartículas sobre a porcentagem de PVA residual (Figura 20), indicaram que a porcentagem de etanol na fase aquosa e a velocidade de agitação foram os fatores que influenciaram na % residual do estabilizante.

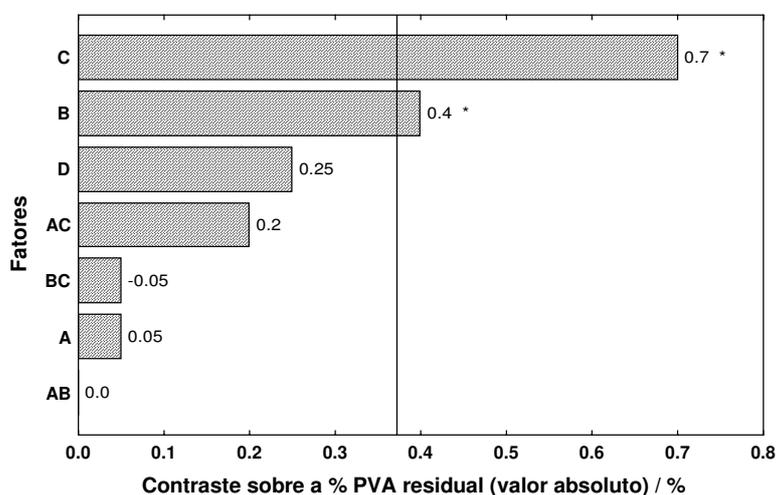


Figura 20 – Valores dos contrastes principais e combinatórios dos fatores estudados (A = % de PVA, B = Velocidade de agitação, C = % de etanol na fase aquosa, D = % de etanol na orgânica) sobre a porcentagem de PVA residual sobre as nanopartículas de PLGA pertencentes ao planejamento fatorial 2^{4-1} . Os contrastes foram calculados através do software Statística 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 90% de confiança)

A presença de etanol na fase aquosa causou um aumento discreto na porcentagem média de PVA residual pertencente aos ensaios do planejamento fatorial. Isto pode ser observado se comparados os resultados dos ensaios 1 a 4, caracterizados pela ausência de etanol na fase aquosa, onde a porcentagem média de PVA residual variou de 0,3 a 1,0%, enquanto que nos ensaios de 5 a 8, onde há etanol na fase aquosa, a porcentagem média de PVA residual variou de

1,1 a 1,7%. O aumento da velocidade de agitação também causou variações similares na porcentagem de PVA residual, desde que os ensaios preparados com menor velocidade de agitação (ensaios 1, 2, 5 e 6) apresentaram valores residuais de PVA entre 0,3 a 1,1%, enquanto que os ensaios preparados com maior velocidade de agitação (ensaios 3, 4, 7 e 8) apresentaram valores residuais de PVA entre 1,0 a 1,7%. Foi mostrado (item 4.3.1) que a porcentagem de etanol na fase aquosa e a velocidade de agitação causaram os maiores efeitos sobre o tamanho das partículas, se comparados aos demais fatores estatisticamente significativos. O álcool etílico aumenta a viscosidade da fase aquosa, dificultando a coalescência das partículas, enquanto que o aumento da velocidade de agitação produz gotículas menores da fase orgânica dispersa na fase aquosa. Portanto, ambos os fatores favorecem a obtenção de nanopartículas com diâmetros menores, porém as partículas de menor tamanho tendem a apresentar maior porcentagem de PVA residual.

Experimentos realizados para identificar a porcentagem de PVA residual sobre nanoesferas de PLGA 50:50 e 75:25 contendo ou não meso-tetra(4-hidroxifenil)porfirina (THPP) (um fotossensibilizador com estrutura semelhante ao InTPP) mostraram que o resíduo de PVA foi muito maior nas partículas contendo o THPP encapsulado [97]. Os pesquisadores justificaram o fato como decorrente da presença do fotossensibilizador na interface óleo/água, que por apresentar uma certa afinidade pelo emulsificante, induz a adsorção do PVA sobre a superfície da partícula. Tal fato não deve estar ocorrendo no preparo das nanoesferas de PLGA carregadas com o InTPP já que a porcentagem média residual de PVA nas partículas do ensaio 8 ($1,7 \pm 0,4$ %) é semelhante ao valor residual presente nas partículas preparadas sob as mesmas condições do ensaio 8, mas na ausência do InTPP ($1,8 \pm 0,1$ %).

4.3.5 Efeito dos fatores sobre a quantidade residual de clorofórmio

Poucos métodos de produção de partículas não necessitam o uso de solventes orgânicos como os de fusão [139] ou extrusão [178]. Contudo estes

métodos requerem temperaturas muitas vezes superiores a 100°C, o que os tornam apenas aplicáveis para drogas resistentes ao calor. Dentre os métodos que requerem solventes orgânicos para solubilização de polímeros, e muitas vezes das drogas a serem encapsuladas, destaca-se o método de emulsão-evaporação por ser o mais aplicado no preparo de suspensões micro e nanoparticuladas. Este método é caracterizado pela dissolução de um polímero num solvente imiscível em água, sendo a droga, se lipofílica, dissolvida junto com o polímero, e se hidrofílica, dissolvida em meio aquoso. Após o preparo de uma emulsão óleo/água (no caso de drogas lipofílicas) ou água/óleo/água (no caso de drogas hidrofílicas), procedimentos devem ser realizados para a evaporação do solvente, de forma que nanopartículas sólidas possam ser obtidas no fim do procedimento experimental. O sucesso da encapsulação de uma substância [179,180], assim como de outras propriedades das esferas poliméricas como porosidade [179], morfologia das superfícies das partículas [179] e velocidade de liberação do fármaco [159,181], depende grandemente da seleção do solvente orgânico usado para dissolver o polímero. Como no método de emulsão-evaporação os solventes utilizados devem ter elevada pressão de vapor, os mesmos são, em geral, potencialmente tóxicos [179]. Dessa forma, como estes solventes não são removidos completamente durante o processo de obtenção das partículas poliméricas, eles devem ser quantificados após a preparação das nanoesferas para eliminar os riscos toxicológicos aos pacientes.

Neste trabalho foi utilizado clorofórmio, um solvente classificado pela farmacopéia americana (USP 28) como de classe 2: de uso limitado, causador de toxicidades irreversíveis como teratogenicidade, sendo não genotóxico [182]. Outra organização americana (International Agency for Research on Cancer) classifica o clorofórmio como sendo um solvente pertencente ao grupo 2B [183], caracterizado por englobar agentes, possivelmente, carcinogênicos aos seres humanos. O clorofórmio é metabolizado por processos oxidativos ou redutivos. Sob condições normais, o metabolismo oxidativo é o principal caminho, sendo o fosgênio o produto desta oxidação [183]. O fosgênio reage com a água produzindo dióxido de carbono e ácido clorídrico, ou pode se ligar covalentemente a

macromoléculas [183]. O clorofórmio é metabolizado no fígado e rim, mais lentamente nos seres humanos do que em camundongos, sendo a enzima CYP2E1 a principal envolvida no metabolismo do clorofórmio nos tecidos tanto de roedores como nos dos humanos [183]. A USP 28 impõe como concentração limite residual de clorofórmio a quantia de 60 ppm ou uma exposição diária permitida de 0,6 mg/dia [182]. Dessa forma, foi decidido avaliar a influência de quatro parâmetros de preparação das nanoesferas de PLGA (concentração de PVA, velocidade de agitação, porcentagem de etanol na fase aquosa e porcentagem de etanol na fase orgânica) sobre o clorofórmio residual presente nas partículas poliméricas.

O método mais apropriado para se analisar solventes residuais é a cromatografia gasosa (GC) devido a sua excelente habilidade de separação, de acordo com as condições cromatográficas e colunas utilizadas, bem como em razão do seu baixo limite de detecção e possibilidade de analisar amostras líquidas ou sólidas de natureza complexa [184]. Quando análises diretas por GC são passíveis de serem utilizadas em amostras, então, esta deve ser a metodologia escolhida devido sua simplicidade e confiabilidade [184]. Porém, freqüentemente as amostras contêm substâncias não voláteis ou corrosivas, que podem danificar a coluna, reduzindo seu tempo de uso. Em outros casos as amostras apresentam pequenas quantidades residuais de solvente, necessitando amostragens excessivas das matrizes sólidas para que a técnica de extração e injeção direta tenha sensibilidade adequada [185]. Dessa forma, optou-se por utilizar a técnica de microextração em fase sólida (SPME – Solid Phase Microextraction) no headspace do frasco de amostragem. A técnica de SPME, introduzida por Pawliszyn et al. em 1990 [186], combina a extração, pré-concentração e introdução da amostra em uma única etapa, além de oferecer uma série de vantagens para o preparo de amostras como a redução do tempo total de análise por amostra, menor manipulação/tratamento, eliminação de solventes orgânicos na extração, perda reduzida de analito, simplicidade e baixo custo por amostra [147].

O pico cromatográfico no tempo de retenção de 2,1 minutos (Figura 21) foi usado na quantificação do clorofórmio residual para o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} . Os resultados (tabela 7) mostram que a quantidade residual de clorofórmio em todos os ensaios do planejamento fatorial está abaixo do limite permitido pela USP 28 (60 ppm), já que o ensaio caracterizado pelas maiores concentrações do solvente clorado (ensaio 1) apresentou quantidades de clorofórmio que são milhares de vezes menores (3,66 ppb). Muito provavelmente, as etapas de evaporação por um período de 24 horas, e de liofilização por 48 horas a baixas pressões, causaram uma diminuição significativa do solvente clorado nas formulações nanoparticuladas.

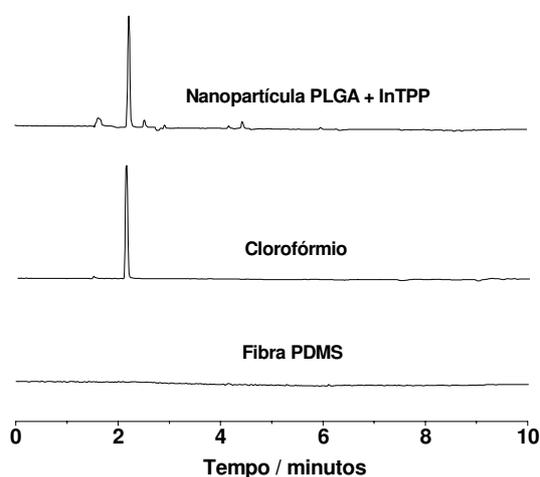


Figura 21 – Cromatogramas CG-ECD de compostos voláteis presentes nas formulações nanoparticuladas do ensaio 8, na fibra com revestimento PDMS usada na etapa de extração, e do clorofórmio.

Bitz et al. [180] relataram a obtenção de micropartículas de PLA, com diâmetros médios variando entre 4,2 a 4,6 μm , as quais apresentaram quantidades médias de clorofórmio residual de 1234 ppm após etapa de secagem por spray drying, e posteriormente, em dessecador (sob vácuo) por 3 dias. Hansen [187] e Ellis [188] mostraram que a evaporação de um solvente a partir de filmes poliméricos envolve um processo de dois estágios: o primeiro depende da volatilidade do solvente e pressão de vapor, o qual é limitado pela espessura da

camada polimérica, e o segundo depende da resistência interna à difusão [184]. Dessa forma, é de se esperar que a porcentagem residual de clorofórmio nas micropartículas obtidas por Bitz (4,2-4,6 μm) seja maior do que nas obtidas, por exemplo, nas nanopartículas do ensaio 8 (262 nm), já que o diâmetro das micropartículas preparadas pelo pesquisador são maiores, o que aumenta o caminho de difusão a ser percorrido pelo solvente. Tal fato pode inclusive ser observado nos ensaios do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (tabela 7). De forma geral, os ensaios caracterizados com as maiores áreas integradas, referentes aos espectros de absorvância das suspensões nanoparticuladas, são constituídos de partículas com os maiores diâmetros médios. Conseqüentemente, as partículas com os maiores diâmetros apresentaram as maiores concentrações de clorofórmio residual.

Tabela 7 – Resultados obtidos do planejamento fatorial 2^{4-1} para avaliar a influência dos parâmetros de preparação de nanopartículas de PLGA sobre a quantidade de clorofórmio residual.

Ensaio	Fatores				$\mu\text{g CHCl}_3/\text{kg}$ partícula	Área integrada espectro de ABS
	A	B	C	D		
1	-	-	-	-	$3,66 \pm 0,81$	562 ± 3
2	+	-	-	+	$2,49 \pm 0,21$	497 ± 6
3	-	+	-	+	$0,38 \pm 0,04$	385 ± 11
4	+	+	-	-	$0,67 \pm 0,02$	421 ± 4
5	-	-	+	+	$0,22 \pm 0,01$	393 ± 3
6	+	-	+	-	$1,00 \pm 0,07$	369 ± 24
7	-	+	+	-	$0,22 \pm 0,01$	259 ± 27
8	+	+	+	+	$0,12 \pm 0,01$	213 ± 15

Os resultados (Figura 22) estatisticamente significativos do planejamento fatorial fracionário, considerando-se as aproximações de que, em geral, as interações ternárias são desprezíveis e que os contrastes devem fornecer ótimas aproximações dos efeitos principais, mostraram que os fatores envolvidos no preparo das partículas de PLGA que influenciaram no conteúdo de clorofórmio residual foram a velocidade de agitação (fator B) e a presença de etanol na fase

aquosa (fator C). Os resultados revelaram que o aumento do fator B, bem como de C, causou uma diminuição da concentração residual de clorofórmio. Ambos os fatores B e C foram os parâmetros que apresentaram os maiores efeitos sobre o tamanho das partículas (Figura 11). O aumento na velocidade de agitação favorece a dispersão da fase orgânica sobre a aquosa, gerando gotículas pequeníssimas de solvente orgânico dispersas na fase aquosa, as quais após evaporação do solvente levam a obtenção das partículas poliméricas. Já a presença de etanol na fase aquosa eleva a viscosidade do meio, dificultando a coalescência das gotículas e favorecendo a obtenção de partículas com diâmetros menores.

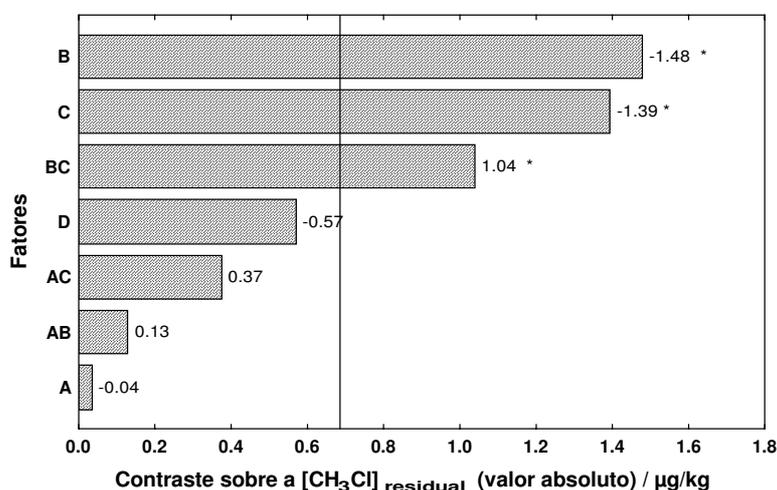


Figura 22 – Valores dos contrastes principais e combinatórios dos fatores estudados (A = % de PVA, B = Velocidade de agitação, C = % de etanol na fase aquosa, D = % de etanol na orgânica) sobre a concentração residual de CH_3Cl nas nanopartículas de PLGA pertencentes ao planejamento fatorial 2^{4-1} . Os contrastes foram calculados através do software Statistica 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 90% de confiança)

Portanto, o aumento de ambos os fatores causa uma diminuição no tamanho das partículas. Como partículas de menor diâmetro apresentam menor camada polimérica para difusão do solvente, espera-se que a evaporação do solvente seja mais rápida, e conseqüentemente, menor a concentração residual do clorofórmio nas formulações nanoparticuladas.

Entretanto, o planejamento fatorial fracionário mostrou que o contraste BC causou um aumento no conteúdo de clorofórmio residual, quando ambos os fatores foram aumentados durante o procedimento de preparo das nanopartículas. Como os fatores A e D não foram significativos sobre a concentração de clorofórmio residual, foi assumido que o efeito de interação AD não é significativo, permitindo-se estimar o contraste BC como o efeito de interação entre a velocidade de agitação e a porcentagem de etanol sobre a porcentagem de clorofórmio residual. O efeito dos fatores combinados na concentração de solvente residual pode estar associado ao PVA ancorado na superfície das nanopartículas. Sabe-se (item 4.3.4) que a diminuição do tamanho das partículas poliméricas causa o aumento da porcentagem de PVA residual. Dessa forma, como ambos os fatores (velocidade de agitação e presença de etanol na fase aquosa) favorecerem a diminuição do diâmetro médio das partículas, maior será o número de moléculas de PVA interagindo na interface orgânica/aquosa e, conseqüentemente, maior o acúmulo de PVA na superfície das partículas. Este fato pode dificultar a difusão do solvente na interface orgânica/aquosa, e posteriormente após solidificação do polímero, na interface matriz polimérica/fase aquosa, favorecendo o aumento do clorofórmio residual.

4.4 Otimização do tamanho de partículas a partir dos resultados do planejamento fatorial 2^{4-1}

Embora, o tamanho necessário para as partículas circularem pelos menores vasos capilares seja abaixo de 5 μm , diâmetros bem menores são requeridos a fim de que as partículas possam atingir os vasos tumorais, bem como, permanecer durante mais tempo na corrente sanguínea [189]. Resultados experimentais têm mostrado que partículas com tamanhos menores que 200 nm apresentam um tempo de circulação maior na corrente sanguínea, devido à redução do reconhecimento destas partículas por proteínas plasmáticas (opsoninas) responsáveis por facilitar a ação do sistema retículo endotelial [121,172,189]. Em função destas características, decidiu-se obter nanopartículas com diâmetros médios inferiores a 200 nm. Para este fim, uma otimização do tamanho das

partículas foi realizada, variando-se a porcentagem de etanol na fase aquosa, bem como a velocidade de agitação, uma vez que estes fatores afetaram significativamente o tamanho das partículas coloidais. As porcentagens de etanol na fase orgânica e as de PVA na fase aquosa não foram variadas porque ambos influenciaram muito pouco no tamanho das partículas. Operações evolucionárias (OE) foram realizadas a partir das áreas integradas dos ensaios 3 e 5 que constituíram o planejamento 2^{4-1} (Figura 23). Estes ensaios apresentaram as mesmas porcentagens de etanol na fase orgânica e de PVA na fase aquosa estabelecidas para a realização dos experimentos de otimização. A porcentagem de PVA foi mantida em 1%, a fim de reduzir a quantidade do estabilizante coloidal no preparo das nanopartículas. Optou-se por manter a porcentagem de etanol na fase orgânica em 5%, já que sua presença nas formulações favorece a diminuição do tamanho das partículas.

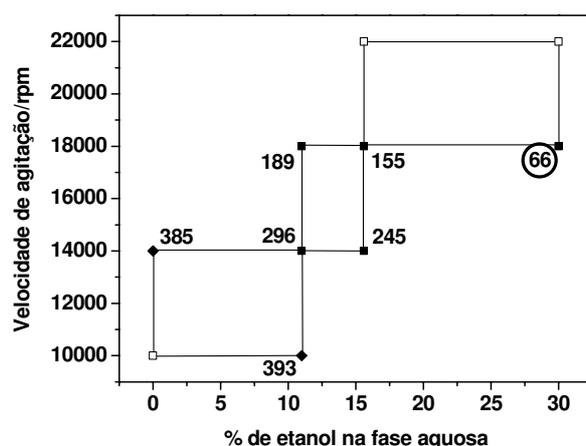


Figura 23 – Resultados obtidos das operações evolucionárias a partir de alguns ensaios (◆) realizados no planejamento fatorial 2^{4-1} . (Os pontos não preenchidos correspondem a ensaios não realizados. Os valores aos lados dos retângulos correspondem às áreas integradas dos espectros de absorção dos ensaios realizados, sendo o menor valor destacado por um círculo)

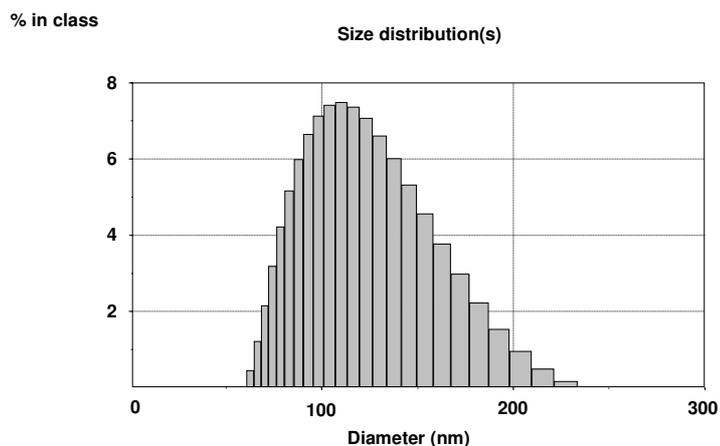
Pode-se verificar pela figura 23 que, à medida que a porcentagem de etanol na fase aquosa ou a velocidade de agitação foram aumentadas, houve uma diminuição das áreas integradas dos espectros de absorção referente às suspensões de cada ensaio realizado, indicando uma diminuição no tamanho das

nanopartículas. Estes resultados corroboram a influência de ambos os parâmetros sobre o tamanho das partículas, conforme foi relatado no planejamento fatorial fracionário.

Medidas do diâmetro hidrodinâmico mostraram que as partículas que constituíam o ensaio da operação evolucionária com menor área integrada (valor de 66, e nomeado como OE5N) apresentavam tamanhos médios de 118 nm, antes de a suspensão sofrer o processo de lavagem.

A curva de distribuição do raio hidrodinâmico (Figura 24A) mostra que o ensaio OE5N compreende partículas com tamanhos que variam em torno de 50 a 240 nm, podendo ser classificado como um sistema coloidal de relativa homogeneidade, em razão da sua baixa polidispersividade (0,138).

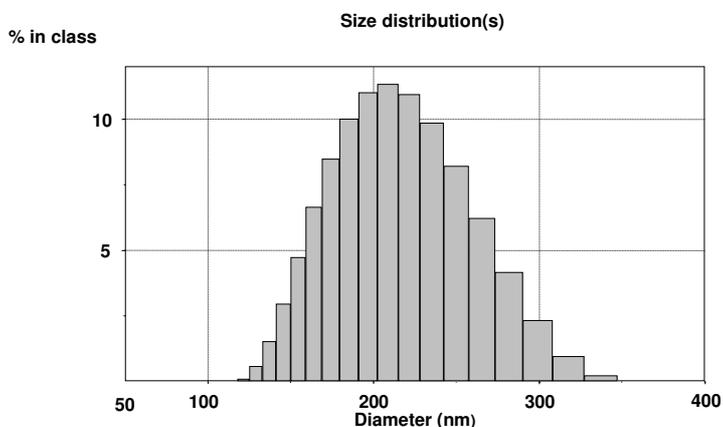
A suspensão após uma etapa de lavagem, e posterior liofilização sem crioprotetor (trealose), apresentou uma distribuição de tamanho que compreendia partículas com diâmetro entre 125 a 350 nm (Figura 24B), portanto, uma faixa de tamanho superior àquela apresentada pela mesma suspensão antes da primeira etapa de lavagem, fato que causou uma alteração no diâmetro médio de 118 para 210 nm. Sabe-se que o PVA utilizado como estabilizador em suspensões nanoparticuladas tende a adsorver na superfície das partículas através da parte hidrofóbica do acetato de vinila, o qual serve de ancoradouro deste polímero na interface orgânica/aquosa formada durante a emulsificação. Quando o solvente orgânico se difunde para a fase aquosa, há a coalescência e posterior solidificação do PLGA contendo uma camada de álcool polivinílico que reveste a superfície da partícula [146,174], a qual é classificada por alguns pesquisadores [137,176] de irremovível por etapas de lavagem.



A

Diâmetro médio = 118 nm

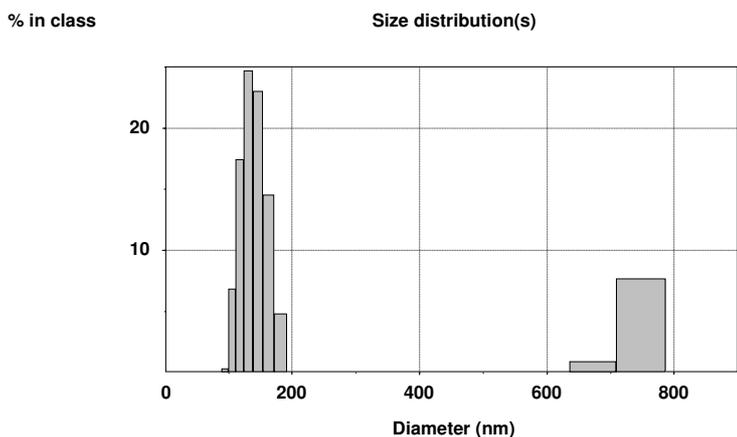
Polidispersividade = 0,138



B

Diâmetro médio = 210 nm

Polidispersividade = 0,158



C

Diâmetro médio = 138 nm

Diâmetro médio = 740 nm

Polidispersividade = 0,522

Figura 24 – Distribuição de tamanho das partículas, obtido por espalhamento de luz dinâmico, referente ao ensaio evolucionário (OE5N) com espectro de absorção de menor área integrada, (A) antes da etapa de lavagem, (B) após uma etapa de lavagem e posterior liofilização sem trealose e (C) após 6 etapas de lavagem e posterior liofilização com trealose.

Portanto, mesmo realizando várias etapas de lavagem para eliminar o excesso do PVA, sempre haverá uma porcentagem residual sobre as partículas. Após uma etapa de lavagem, a camada de PVA sobre as nanoesferas liofilizadas permitiu uma redispersão instantânea das partículas poliméricas em água, no entanto, devido a solvatação das cadeias de PVA por moléculas de água através de ligações de hidrogênio, há uma alteração da conformação das cadeias do polímero, as quais se desenrolam, levando a um aumento efetivo no volume das partículas, e portanto, em seu raio hidrodinâmico.

Ressalta-se, entretanto, que Konan et al. [135] relataram para partículas pequenas, que esta camada hidrofílica de PVA não é suficiente para preservar o tamanho da partícula durante o processo de liofilização, uma vez que agregações foram observadas por esses pesquisadores. Se tal fato ocorreu nas formulações OE5N, então esta suspensão seria caracterizada por agregados de tamanhos relativamente homogêneos, já que a polidispersividade da suspensão é 0,158. Dessa forma, micrografias das partículas constituintes desta suspensão foram obtidas, utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura, a fim de se avaliar a morfologia das nanoesferas e a presença de agregados na formulação (Figura 24).

Pode-se verificar pela figura 25A e 25B que as partículas do ensaio OE5N, após uma etapa de lavagem, aparentemente são discretas, esféricas e com tamanhos relativamente homogêneos. O material liofilizado também foi caracterizado pela presença de placas com formatos indefinidos sob as quais foram encontradas partículas de PLGA (Figura 25C). Tais placas foram consideradas como sendo resíduos de PVA que estavam na fase aquosa e que não foram totalmente eliminados através de uma única etapa de lavagem. Aparentemente, não houve formação de agregados de partículas, devido a liofilização realizada na ausência de um crioprotetor, como foi observado por Konan et al. [135]. Provavelmente, as nanopartículas de PLGA foram revestidas por múltiplas camadas de PVA.

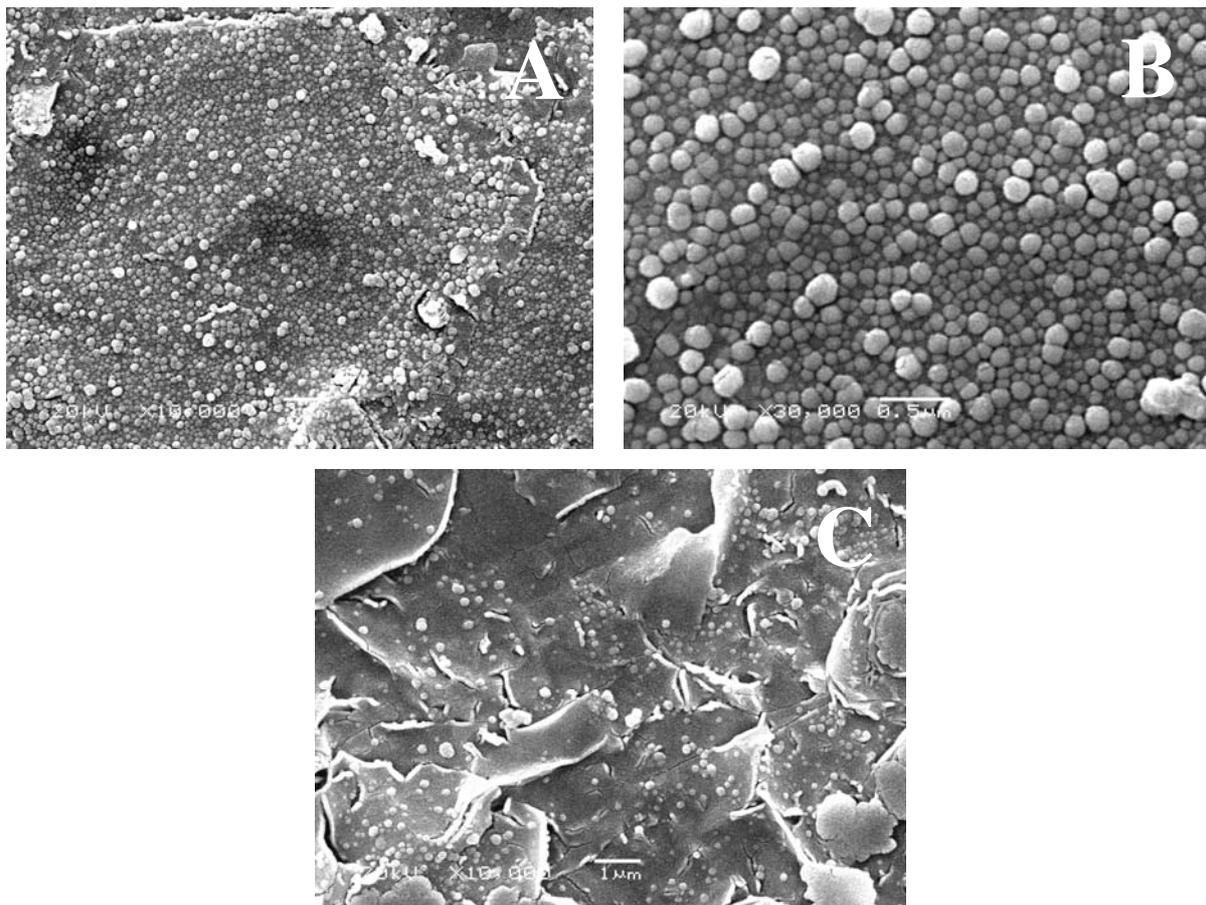


Figura 25 – Micrografia eletrônica de varredura de partículas liofilizadas do ensaio OE5N após uma etapa de lavagem. Foram realizados aumentos de (A e C) 10.000x e de (B) 30.000x.

Uma nova suspensão foi preparada, sendo posteriormente lavada com água desionizada em seis etapas, e liofilizada usando-se um crioprotetor (trealose), a fim de evitar a agregação de partículas, durante a etapa de liofilização, devido a eliminação do PVA adsorvido nas partículas poliméricas com o aumento no número de etapas de lavagem. Vários estudos têm mostrado que a utilização de crioprotetores, como açúcares, evita a agregação das partículas durante o processo de liofilização devido a habilidade dos açúcares em formar uma matriz amorfa e vítrea em torno das partículas [190,191]. Optou-se por trabalhar com a proporção 1:2 (massa de trealose:massa de nanopartículas) em razão de Konan et al. mostrarem que esta proporção foi suficiente para evitar a agregação de nanopartículas de PLGA 75:25 com diâmetro médio de 130 nm. A

distribuição de tamanho mostra duas populações de esferas (Figura 24C): uma com diâmetros variando em torno de 100 a 200 nm e compreendendo 91,5% das partículas com diâmetro médio de 138 nm, e uma outra população com diâmetro entre 625 e 800 nm correspondente a 8,5% do total das partículas com diâmetro médio de 740 nm. A presença de populações heterogêneas na suspensão fez com que a polidispersividade aumentasse para 0,522.

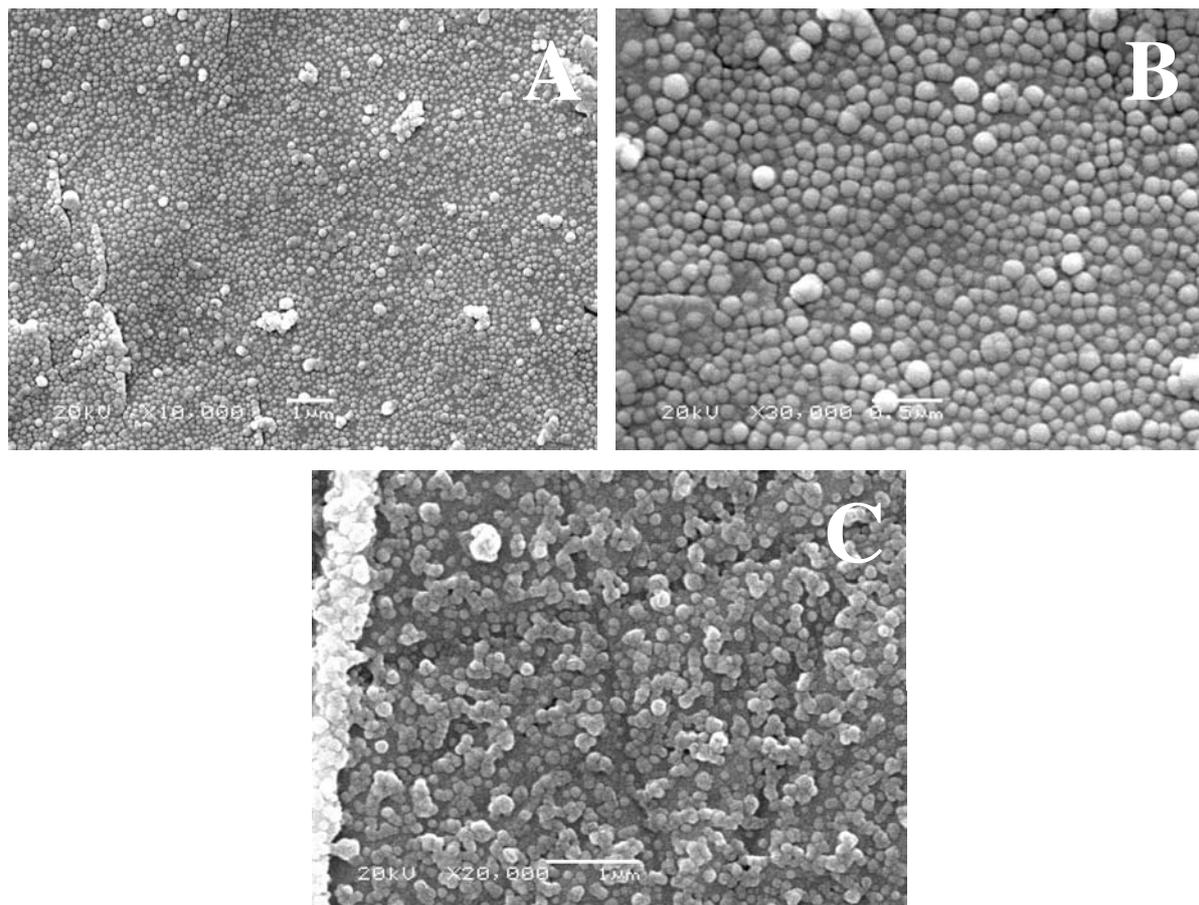


Figura 26 – Micrografia eletrônica de varredura de partículas liofilizadas do ensaio OE5N após seis etapas de lavagem. Foram realizados aumentos de (A) 10.000X, (C) 20.000X e de (B) 30.000X.

Portanto, o aumento no número de lavagens provocou a formação de agregados devido a diminuição da porcentagem de PVA adsorvido sobre a superfície das partículas, favorecendo a adesão das nanoesferas (Figura 26C). Ressalta-se que estes agregados são facilmente eliminados usando uma unidade filtrante da Millipore®, modelo Millex® GP 0,22 µm. Análises morfológicas das

partículas liofilizadas, revelaram também que as partículas do ensaio OE5N são caracterizadas pela forma esférica e pela relativa homogeneidade no tamanho (Fig. 26A e 26B).

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) confirmou a presença de partículas com diâmetros menores do que o diâmetro médio hidrodinâmico (138 nm) obtidos para as formulações OE5N lavadas por seis vezes e posteriormente liofilizadas (Figura 27A). Partículas com diâmetros pequenos já haviam sido detectados por espalhamento de luz dinâmica nas formulações não lavadas (Figura 24A).

Muito provavelmente, as etapas de lavagem e posterior liofilização devem ter favorecido a agregação destas partículas, fato que levou a detecção de agregados nanoparticulados com diâmetros hidrodinâmicos de 740 nm, conforme relatado acima. As manchas escuras presentes na micrografia referem-se a regiões de alto espalhamento de elétrons, sendo portanto, regiões com alta concentração de partículas. Deve-se ressaltar que aumentos maiores, para melhor visualização das partículas, não foram possíveis em razão da rápida destruição das esferas pelo feixe de elétrons. Análise do diâmetro das partículas da micrografia (Figura 27A), através do software ImageTool 3.0, revelaram nanoesferas com diâmetros médios de 59 ± 14 nm (Figura 27B), sendo que 99% das partículas apresentaram diâmetros inferiores a 100 nm. A presença de apenas 1% de partículas com diâmetro próximo ao diâmetro médio hidrodinâmico (138 nm) se deve a forma de preparo das amostras para visualização, as quais foram nebulizadas sobre a tela de cobre. A nebulização favorece a aspensão de partículas de menor diâmetro sobre a tela de cobre do que as de maior diâmetro levando ao resultado observado.

Os resultados da TEM mostram que a formulação OE5N é interessante para fins de aplicação intravenosa, pois contém partículas com diâmetros muito pequenos, portanto, favoráveis a redução do reconhecimento das partículas pelo sistema fagocítico mononuclear devido a adsorção de proteínas plasmáticas (opsoninas) por interações de van der Waals ou de origem eletrostática [172]. Ressalta-se que partículas com tamanhos inferiores a 100 nm e com superfícies

hidrofílicas têm reduzido as reações de opsonização e subsequente eliminação das partículas pelos macrófagos [192].

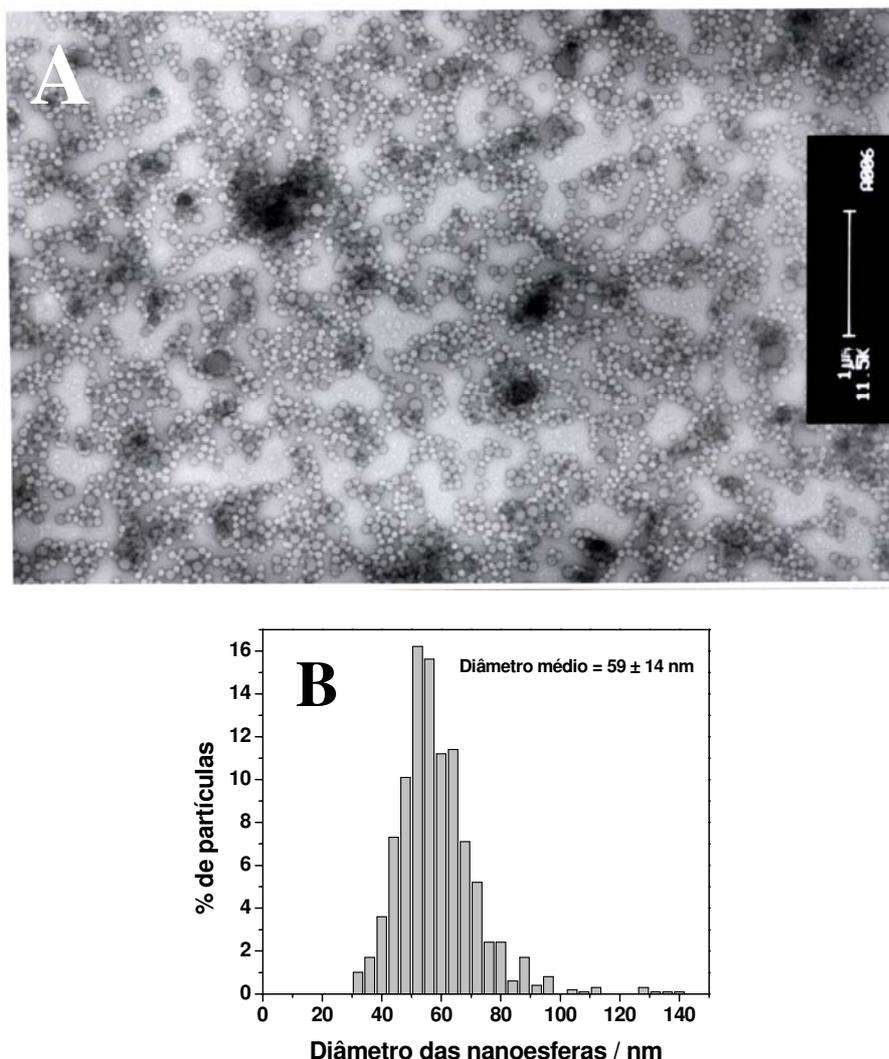


Figura 27 – (A) Micrografia eletrônica de transmissão e (B) distribuição de tamanho das partículas do ensaio OE5N presentes na micrografia.

Os resultados anteriores (Figura 24) revelaram um aumento de 17% no diâmetro médio das partículas após as seis etapas de lavagem quando comparado ao tamanho das partículas que não passaram pelas etapas de lavagem. No entanto, este aumento (17%) é menor se comparado ao aumento no tamanho das partículas causado após uma única etapa de lavagem (78%). A justificativa relatada para a diferença foi associada a maior quantidade de PVA residual adsorvido na superfície das nanoesferas quando lavadas apenas em uma

etapa. A quantificação do PVA residual realizada por reação colorimétrica corrobora a afirmação acima, já que a porcentagem de PVA residual foi de $4,5 \pm 0,7\%$ nas partículas pertencentes ao ensaio OE5N lavado seis vezes enquanto que a porcentagem residual na suspensão lavada uma vez foi de $12,1 \pm 0,5\%$. Portanto, seis etapas de lavagem levaram a uma diminuição da porcentagem residual de álcool polivinílico de 2,7 vezes nas formulações nanoparticuladas se comparado ao resultado obtido com uma etapa de lavagem. Estes resultados sugerem que as superfícies das partículas são caracterizadas por apresentarem moléculas de PVA ancoradas e que são de difícil remoção, mas também, por apresentarem múltiplas camadas de álcool polivinílico adsorvidas sobre as nanoesferas, sendo resíduos mais fáceis de serem eliminados pelas etapas de lavagem. Zambaux et al. [175] através de cálculos aproximados do número de moléculas de PVA adsorvidas por nanopartícula, e assumindo que o PVA está exclusivamente localizado sobre a superfície da esfera, concluiu que a partícula teria uma superfície com múltiplas camadas de PVA adsorvidas. Estes resultados são concordantes com os observados por Lankveld et al. [193] que relataram uma possível adsorção múltipla de PVA sobre uma superfície hidrofóbica.

Zambaux et al. [175] e Sahoo et al. [146] relataram que o aumento da porcentagem de PVA na fase aquosa durante o processo de emulsificação acarreta o aumento do PVA residual nas formulações nanoparticuladas. De acordo com os resultados obtidos pelos pesquisadores, era esperado que, ao se reduzir a porcentagem de 2% (m/v) de PVA na fase aquosa, utilizada no ensaio 8 do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , para 1% (m/v) nos experimentos da operação evolucionária, houvesse uma diminuição da porcentagem de PVA residual nas partículas do ensaio OE5N. Entretanto, as partículas do ensaio OE5N (diâmetro médio de 138 nm) apresentaram porcentagem residual de PVA de $4,5 \pm 0,7\%$, enquanto que as partículas do ensaio 8 do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (diâmetro médio de 262 nm) uma porcentagem residual de $1,7 \pm 0,4\%$.

Embora pareça que os resultados obtidos neste trabalho discordem dos resultados de Zambaux e Sahoo, deve-se ressaltar que o planejamento fatorial (Figura 20-fator A) revelou que o aumento da porcentagem de PVA na fase

aquosa não tem efeito sobre a porcentagem de PVA residual. Lee et al. [174], conforme já citado acima, mostraram uma dependência desta porcentagem residual com a área superficial específica das partículas poliméricas. Portanto, como as partículas do ensaio OE5N apresentaram menor diâmetro do que as do ensaio 8, conseqüentemente, também detém maior área superficial específica o que conduz a um aumento na porcentagem de PVA residual na superfície das nanopartículas de PLGA. Dessa forma, todo e qualquer fator que influencie no tamanho das partículas pode, indiretamente, causar alteração na porcentagem de PVA residual nas formulações nano e microparticuladas. Muito provavelmente, o efeito observado por Zambaux e Sahoo sobre a porcentagem de PVA residual devido ao aumento do PVA na fase aquosa esta associado ao pequeno número de etapas de lavagem das suspensões utilizadas pelos pesquisadores, respectivamente, 2 e 3 etapas.

Em razão da porcentagem residual de PVA determinada nas partículas do ensaio OE5N estarem abaixo dos valores encontrados por outros pesquisadores como Konan et al. [32,97] os quais encontraram valores em torno de 15,3% para partículas com diâmetros em torno de 145 nm, o aumento no número de lavagens das suspensões para eliminação do excesso de PVA favorece a diminuição do álcool polivinílico residual sobre as partículas, o que é interessante para fins de aplicação intravenosa, em razão do PVA não ser biodegradável [97]. Além disso, estudos [146] têm mostrado que quanto menor a porcentagem de PVA residual sobre as partículas, maior é a retenção intracelular das nanoesferas. Deve-se ressaltar também que quanto maior a porcentagem de PVA residual maior será a barreira que o fármaco encapsulado terá que percorrer para atingir o meio de liberação, assim como maior a dificuldade para que o solvente do meio de liberação possa atingir o polímero usado na encapsulação, retardando a degradação do mesmo, e conseqüentemente, a liberação do fármaco.

4.4.1 Estabilidade coloidal do ensaio OE5N

Embora trabalhos da literatura mostrem vantagens em se diminuir a porcentagem de PVA residual sobre a superfície das partículas, a redução na

porcentagem residual do emulsificante pode alterar a estabilidade coloidal de uma suspensão de partículas favorecendo a formação de agregados, o que tornar inviável a sua administração por via intravenosa. Dessa forma, a estabilidade coloidal das formulações OE5N foi avaliada antes e após uma ou seis etapas de lavagem, através da adição de uma solução de Na_2SO_4 .

Os resultados (Figura 28) revelaram que a suspensão OE5N apresentou uma diminuição da estabilidade coloidal com o aumento no número de lavagens. As nanopartículas recém preparadas e que não passaram por etapas de lavagem apresentaram o ponto de floculação crítico (CFP) em 0,3 mol/L de Na_2SO_4 . Já as partículas que sofreram uma etapa de lavagem apresentaram o CFP em 0,25 mol/L de Na_2SO_4 enquanto que aquelas lavadas por seis vezes apresentaram o CFP em 0,2 mol/L.

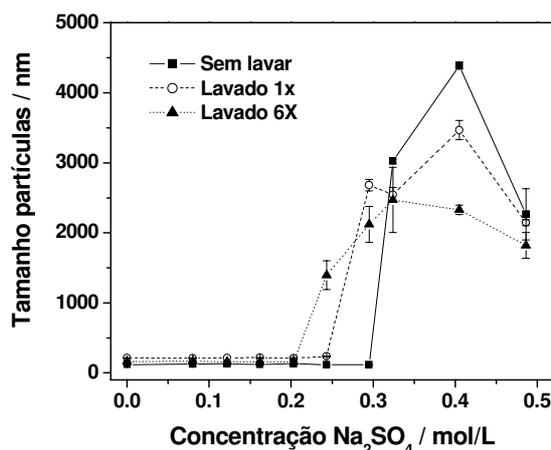


Figura 28 – Determinação do ponto de floculação crítico de nanopartículas de PLGA através da monitoração do raio hidrodinâmico das partículas com a variação da concentração de eletrólito.

Resultados obtidos por Riley et al. [145] mostraram que nanopartículas de PLA-PEG (75:5), com diâmetro médio de 118,7 nm, apresentaram CFP com concentração de Na_2SO_4 igual a 0,13 mol/L, sendo portanto, menos estáveis que as partículas do ensaio OE5N as quais apresentaram CFP em concentrações maiores de Na_2SO_4 (0,2 mol/L). No entanto, partículas de PLA-PEG (3:5), com diâmetros de 28,2 nm, apresentaram-se mais estáveis a adição de eletrólitos do que a suspensão OE5N em razão do CFP ocorrer em maiores concentrações

Na_2SO_4 (0,54 mol/L). Riley et al. justificaram a diferença na estabilidade das partículas de PLA-PEG (3:5 e 75:5) pela diminuição do revestimento superficial das partículas de PLA pelo polioxietileno, o que favorece a atração das partículas por forças de van der Waals levando, conseqüentemente, a um processo mais rápido de floculação.

Resultados similares foram relatados por Avgoustakis et al. [194] para partículas de PLGA-PEG obtidas a partir de copolímeros com diferentes proporções molares de PLGA e PEG. Nanoesferas com diâmetros médios de 57,7 nm e proporção molar igual a 34 foram caracterizadas por apresentar o CFP em 0,6 mol/L de Na_2SO_4 , enquanto que partículas com diâmetros médios de 114,8 nm e proporção molar de 495, apresentaram CFP em 0,1 mol/L de Na_2SO_4 . Portanto, os resultados de Avgoustakis mostram que partículas obtidas a partir de copolímeros com alta proporção molar de PLGA/PEG apresentam menor estabilidade coloidal devido o incompleto revestimento da superfície das nanopartículas pelas cadeias de PEG. Sobre o stress gerado pelas colisões Brownianas, as cadeias de PEG são incapazes de evitar a aproximação das partículas. Dessa forma, quando a carga superficial das partículas for neutralizada pelo eletrólito, a atração de van der Waals entre as esferas de PLGA prevalecerá, ocorrendo a floculação das nanopartículas. Avgoustakis et al. [194] sugeriram que para partículas caracterizadas por um alto revestimento superficial de PEG, as floculações ocorrem em elevadas concentrações de eletrólitos devido a diminuição do poder de solvência da água sobre as cadeias de PEG.

Embora os exemplos acima citados mostrem a dependência da estabilidade coloidal com o grau de cobertura da superfície das nanopartículas por cadeias de PEG ligadas covalentemente à matriz polimérica de PLA ou PLGA, outros trabalhos também mostram a dependência em relação a cobertura superficial das partículas por polímeros fisicamente adsorvidos sobre suas superfícies [195,196]. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho associado aos da literatura sugerem fortemente que a diminuição da estabilidade das formulações OE5N esteja associada à redução no número de camadas de PVA adsorvidas na superfície das partículas de PLGA com o aumento das etapas de lavagem. Como o PVA não é

um homopolímero verdadeiro, mas um copolímero de álcool e acetato polivinílico, as moléculas do copolímero adsorvidas na superfície das partículas tendem a adquirir uma conformação tal que os grupos hidroxila do álcool polivinílico sejam expostos à fase aquosa para que possam realizar ligações de hidrogênio com as moléculas da água. Dessa forma, a adição de eletrólitos provoca a diminuição da solvência do PVA adsorvido na superfície das partículas de PLGA, o que favorece a interação intra e intercadeias de PVA, e conseqüentemente, a floculação das partículas.

Portanto, os resultados sugerem que as moléculas de PVA ancoradas na superfície das partículas agem como uma barreira estérica que dificulta a agregação das esferas poliméricas. Ressalta-se que, embora pareça que as partículas lavadas por seis etapas sejam inviáveis para serem administradas na corrente sanguínea devido sua menor estabilidade coloidal, a força iônica da solução de Na_2SO_4 que causou a agregação das partículas é 3,7 vezes maior que a força iônica do plasma sanguíneo (0,163 mol/L) [197]. Logo, as partículas do ensaio OE5N lavadas por 6 etapas não devem sofrer agregação na corrente sanguínea por falta de estabilidade coloidal.

Partículas liofilizadas, após passarem por 6 etapas de lavagem, foram ressuspendidas em água desionizada e o potencial zeta foi medido à 25°C, sendo o valor médio obtido igual a $-9,5 \pm 2,2$ mV. Evidentemente, a adição de eletrólitos nas suspensões nanoparticuladas causa uma neutralização das cargas superficiais negativas oriundas da presença de grupos carboxílicos do PLGA, o que favorece também a agregação coloidal. Entretanto, dado ao pequeno valor da carga superficial presente nas partículas do ensaio OE5N, comparado às partículas de PLGA ou PLA preparadas na ausência de estabilizantes (respectivamente, $-45,5$ [198] e -92 mV [199]), pode-se concluir que a estabilização eletrostática não é o principal mecanismo pelo qual se dá a estabilização coloidal das suspensões OE5N.

O potencial negativo para nanopartículas de PLGA está de acordo com resultados experimentais relatados por outros pesquisadores [97,159,165], onde valores negativos são esperados devido a presença dos grupos carboxílicos

localizados nas cadeias poliméricas do poliéster [200]. O valor do potencial zeta para o ensaio OE5N foi menor se comparado ao valor do ensaio 8 ($-20,0 \pm 0,2$ mV) que apresentou o menor potencial entre os demais ensaios do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} . A diminuição do potencial zeta já era esperada, uma vez que os resultados do planejamento fatorial, mostrados no item 4.3.3, revelaram que o aumento da velocidade de agitação causa uma diminuição do potencial negativo.

O aumento da velocidade de agitação causa maior dispersão da fase orgânica sobre a fase aquosa levando a obtenção de gotículas de menor tamanho, as quais apresentam elevada área superficial específica. Isto favorece que um número maior de moléculas de PVA interaja na interface entre as fases orgânica/aquosa formada durante a emulsão, levando a um aumento da porcentagem de PVA residual adsorvida sobre a superfície das partículas. O PVA residual aumenta a superfície de cisalhamento (superfície imaginária constituída pelos contra-íons ligados à superfície da partícula, bem como por algumas moléculas do solvente também ligadas à superfície) onde é medido o potencial, e conseqüentemente, a blindagem da carga superficial das partículas [169,170], diminuindo o potencial zeta. A diminuição do potencial zeta devido ao aumento da porcentagem de PVA residual também já foi relatado por outros pesquisadores como Sahoo et al. [146] e Panyam et al. [171]. Portanto, como a área integrada do espectro de absorção do ensaio OE5N foi determinada como sendo igual a 66 ± 1 , inferior, portanto, à do ensaio 8 (213 ± 15), é de se esperar que as partículas do ensaio OE5N tenham uma porcentagem residual de PVA maior sobre suas superfícies, causando uma blindagem maior da carga superficial e, conseqüente, diminuição do potencial zeta.

Experimentos foram realizados para ser avaliar a porcentagem de InTPP encapsulado nas partículas poliméricas obtidas no ensaio OE5N. Os resultados mostraram que a porcentagem de encapsulação do InTPP foi de 70 ± 1 %, sendo menor se comparado aos ensaios 3 e 5 do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (respectivamente, 87 ± 3 % e 94 ± 2 %) que são caracterizados por apresentarem a mesma porcentagem de PVA na fase aquosa e de etanol na fase orgânica

usados na OE. A diferença entre os ensaios está na velocidade de agitação e na porcentagem de etanol presente na fase aquosa. No ensaio OE5N a velocidade de agitação foi de 18.000 rpm enquanto que nos ensaios 3 e 5 foram, respectivamente de 14.000 e 10.000 rpm, e a porcentagem de etanol na fase aquosa foi de 30% (v:v) para o ensaio realizado na operação evolucionária, e de 0 e 11% para os ensaios 3 e 5, respectivamente. Resultados do planejamento fatorial (Figura 14) revelaram que os únicos parâmetros de preparação que provocaram alterações na eficiência de encapsulação foram as porcentagens de PVA e de etanol na fase aquosa, onde o aumento da % de PVA ou do etanol causou a elevação da porcentagem de encapsulação do InTPP nas nanopartículas de PLGA. Portanto, como não houve alteração na porcentagem de PVA, era esperado que o aumento na porcentagem de etanol ocasionasse um pequeno aumento na porcentagem de InTPP encapsulado nas partículas obtidas no ensaio OE5N. Entretanto, houve uma diminuição da % do fotossensibilizador encapsulado nas nanopartículas poliméricas. Ressalta-se que o fatorial fracionário (Figura 14) mostrou a existência de um efeito de interação entre a porcentagem de PVA e de etanol na fase aquosa sobre a porcentagem de encapsulação do InTPP, de forma que o aumento da porcentagem de ambos os parâmetros durante o preparo das formulações provocou uma diminuição da porcentagem de InTPP encapsulado. Embora no ensaio OE5N a porcentagem usada de PVA tenha sido menor, é provável que o efeito de interação combinatória entre os fatores tenha sobrepujado o efeito individual do etanol em aumentar a porcentagem de encapsulação do InTPP.

Como foi relatado no item 4.3.2, estudo espectroscópico mostrou que o PVA e o etanol permitem uma maior solubilidade do InTPP em meio aquoso. Também foi mostrado que o aumento da porcentagem de etanol na fase aquosa eleva a viscosidade do meio. Este aumento na viscosidade da fase aquosa demonstra que as moléculas de etanol interagem com os segmentos do PVA, provavelmente por ligação de hidrogênio, tornando-as menos desembaraçadas e, conseqüentemente, com maior volume. É de conhecimento científico que “bons solventes” interagem fortemente com as cadeias emaranhadas de polímeros

causando uma expansão do “novelo polimérico” e, conseqüentemente, aumentando a viscosidade [201]. Todos os fatos citados acima devem estar favorecendo a interação do InTPP com as regiões hidrofóbicas do PVA na interface orgânica/aquosa, possibilitando que uma maior concentração do composto esteja entre as camadas de PVA adsorvidas na superfície da partícula, bem como solubilizado no meio aquoso. Para avaliar esta interação entre o fotossensibilizador e as cadeias do álcool polivinílico na mistura água/etanol, foi preparada uma nova formulação a qual sofreu apenas um único processo de lavagem, sendo posteriormente liofilizada. A eficiência de encapsulação desta formulação foi de $89 \pm 5 \%$, indicando que algumas moléculas de InTPP devem interagir com as regiões hidrofóbicas do PVA, já que as formulações que sofreram seis etapas de lavagem apresentaram uma porcentagem de encapsulação de $70 \pm 1 \%$.

Mu et al. [161] relataram que nanopartículas de PLGA 50:50, contendo o paclitaxel (vide anexo) encapsulado (quimioterápico oncológico hidrofóbico), apresentaram uma eficiência máxima de encapsulação de 60,1% usando o PVA como emulsificante, enquanto que usando o succinato de D- α tocoferol polietileno glicol 1000 (TPGS) (vide anexo) a eficiência de encapsulação foi de 88,3%. Esta diferença foi justificada pelos autores como sendo decorrente da maior interação das moléculas do paclitaxel com o álcool polivinílico ao invés do TPGS, o que favoreceu a partição ou difusão do fármaco da fase orgânica para a aquosa, diminuindo a porcentagem de encapsulação. Outros trabalhos [164,165] também relataram o problema da baixa eficiência de encapsulação de drogas hidrofóbicas em função da interação do fármaco com o surfactante utilizado para estabilizar a emulsão, provocando a saída da droga para fase aquosa e posterior diminuição na eficiência do encapsulação. Ressalta-se que embora a eficiência de encapsulação do InTPP em nanoesferas de PLGA tenha diminuído para 70%, tal porcentagem está próxima a eficiência de encapsulação da meso-tetra(4-hidroxifenil)porfirina (uma porfirina com estrutura semelhante ao InTPP) em nanopartículas de PLGA com diâmetros médios em torno de 109 a 136 nm, onde os valores da porcentagem variaram entre 63 a 77% [97,121]. Pegaz et al. [122] conseguiram,

recentemente, encapsular a meso-tetrafenilporfirina (TPP), fotossensibilizador com mesma estrutura do InTPP mas sem o In ligado ao núcleo porfirínico, em nanopartículas de PLA com tamanho médio de 210 nm. A eficiência de encapsulação obtida para o TPP nas partículas de PLA foi de $87,2 \pm 1,0\%$, sendo bem maior se comparada à eficiência de encapsulação do InTPP nas nanoesferas de PLGA. Esta diferença está associada a maior lipofilicidade do PLA em relação ao PLGA, o que favorece a interação de drogas hidrofóbicas (como TPP) com as moléculas do polímero, aumentando a porcentagem de encapsulação. O polímero do ácido lático, em função do grupo metila presente em sua estrutura, é mais hidrofóbico que o polímero do ácido glicólico (PLG) [126]. Dessa forma, o copolímero PLGA (50:50) por ser menos hidrofóbico que o PLA, tenderá a interagir menos eficientemente com as drogas apolares, causando uma diminuição na eficiência de encapsulação.

4.5 Liberação *in situ* do InTPP encapsulado em partículas de PLGA

Investigações do mecanismo de liberação de fármacos permitem, comumente, obter informações importantes sobre a estrutura interna dos veículos de liberação e de relações físico-químicas entre fármaco-veículo. Contudo, o desenvolvimento apropriado de estudos de liberação *in vitro* é, freqüentemente, dificultado por uma série de problemas técnicos [202]. Condições Sink (situação na qual o volume do meio de dissolução deve ser de 5 a 10 vezes maior que o volume necessário para ocorrer a saturação do fármaco) não são sempre possíveis de serem atingidas por compostos lipofílicos durante a liberação, uma vez que a sensibilidade do ensaio analítico, usualmente, não permite a diluição do fármaco nos meios aquosos utilizados nos estudos de liberação.

Neste trabalho tentativas foram realizadas para que o estudo de liberação mimetizasse condições fisiológicas como o pH (7.4), a força iônica (0,163 mol/L) [197] e a temperatura (37 °C) do sistema circulatório. Para isto, experimentos foram realizados utilizando-se surfatantes como Triton X100[®] e Tween 20[®] em

soluções tamponadas (PBS) para solubilização do InTPP, conforme mostrado na figura 29A.

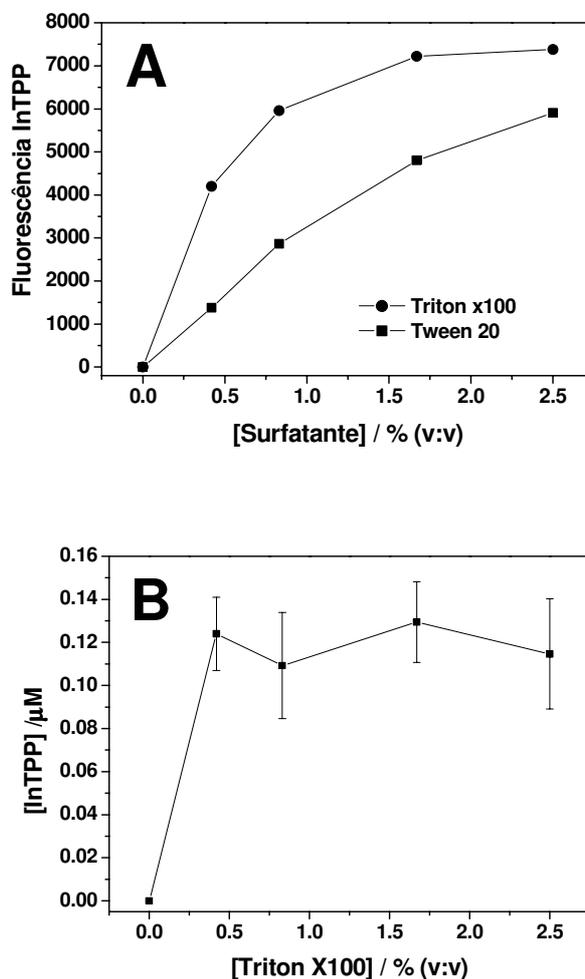


Figura 29 – (A) Monitoramento da fluorescência do InTPP em tampão fosfato salino pH 7,4, após período de incubação de 24 horas a 37 °C na presença de diferentes concentrações de Triton X100[®] e Tween 20[®]. (B) Determinação da solubilidade do InTPP em tampão fosfato salina na presença de Triton X100[®].

Pode-se observar pela figura 29A que o Triton X100[®] foi o surfatante que melhor auxiliou na solubilização do InTPP em meio aquoso já que intensidades maiores de fluorescência foram detectadas usando Triton X100[®] do que Tween 20[®]. A determinação da concentração máxima de InTPP solubilizado em PBS (Figura 29B) revelou que a solubilidade da porfirina de índio nas condições propostas para realização do experimento de liberação foi de $0,12 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$.

Em razão da baixa solubilidade do InTPP no meio de liberação e do seu baixo rendimento quântico de fluorescência (0,008) optou-se por estudar a liberação do InTPP das partículas poliméricas usando isobutanol como meio de liberação. Ressalta-se que outros pesquisadores como Chorny et al. [159] e Duclairoir et al. [203] também já relataram estudos de liberação usando solventes orgânicos, respectivamente heptano e decano, como meio de liberação em decorrência da baixa solubilidade dos compostos encapsulados em partículas poliméricas.

O InTPP apresenta uma solubilidade oitocentas vezes maior em isobutanol ($97 \pm 7 \mu\text{mol/L}$) quando comparada à solução tampão de fosfato salino com Triton X100[®]. Evidentemente, o estudo de liberação em solvente orgânico não mimetiza o sistema circulatório, mas permite fazer previsões sobre a distribuição do InTPP dentro das partículas se analisado em conjunto com modelos matemáticos de difusão, bem como, avaliar a presença de moléculas de InTPP na superfície das esferas através da análise do perfil de liberação.

A boa solubilidade do InTPP em isobutanol permitiu que a condição Sink fosse obtida durante o experimento de liberação através da ressuspensão de micro e nanopartículas poliméricas, carregadas com InTPP, em álcool isobutílico (1:1666 w:v) o qual não dissolve o PLGA, mas é um bom solvente para o InTPP. Este solvente também não tem efeito sobre a morfologia das partículas desde que comparações entre as micrografias das micropartículas antes (Figura 30A) e depois (Figura 30B) de redispersas por quase 1400 h mostraram ausência de fusão de partículas ou presença de erosão nas superfícies das mesmas.

Outro problema está relacionado à suscetibilidade da maioria dos métodos de liberação em mascarar o perfil de liberação real do fármaco devido à separação física do veículo e do fármaco liberado não determinado *in situ* [204,205]. Estas interferências causam distorções nos períodos iniciais de liberação do fármaco, levando, freqüentemente, a uma estimativa inexata do perfil de liberação.

Recentemente, Chorny et al. [159] relataram um método de liberação *in situ* onde o fármaco liberado foi monitorado e quantificado usando um espectrofluorímetro. Neste trabalho foram realizados experimentos *in situ* onde o fármaco liberado de nanopartículas do ensaio OE5N e de micropartículas foi

monitorado usando um espectrofotômetro sem separação das partículas do meio de liberação. Um acessório de refletância difusa foi também usado para eliminar a interferência da luz espalhada pelas partículas no espectro do InTPP.

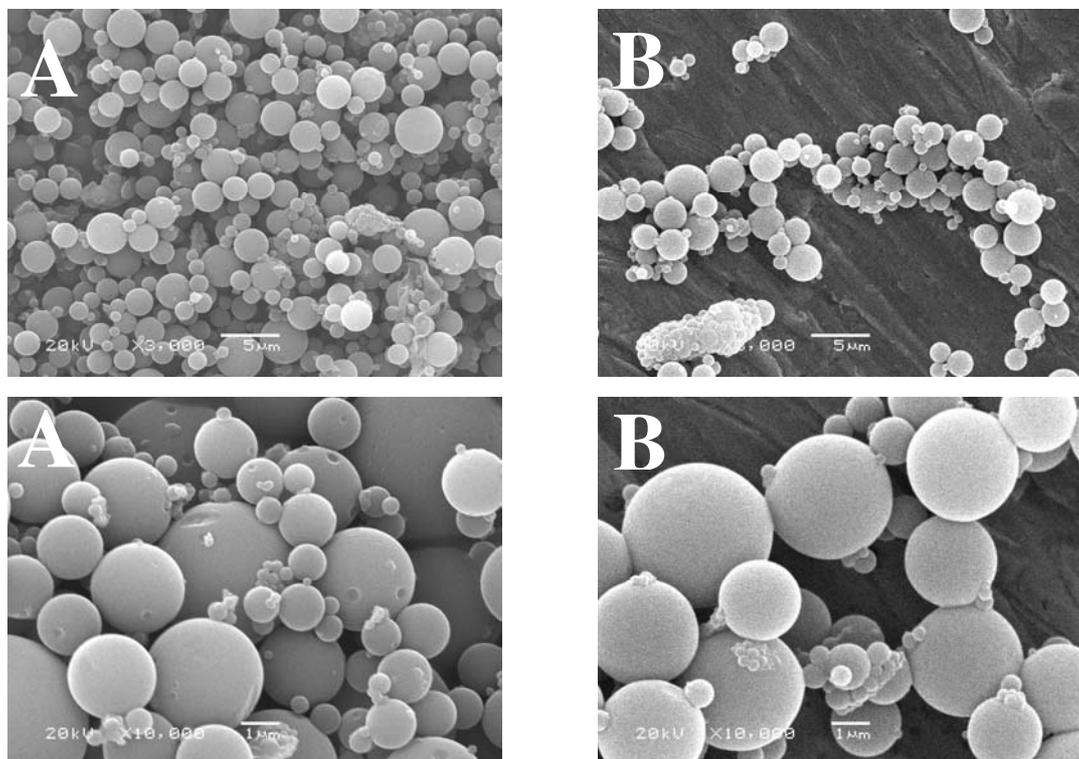


Figura 30 – Micrografia eletrônica de varredura de micropartículas de PLGA contendo InTPP (A) antes e (B) depois de 1384 h redispersas em isobutanol.

Os espectros de absorvância do InTPP monitorados sem separação das nanopartículas do meio de liberação (Figura 31A) revelaram que a absorvância do InTPP aumentou durante o experimento de liberação, sugerindo que o fármaco foi liberado das nanopartículas de PLGA. O mesmo experimento de liberação foi conduzido em tempos curtos, médios e longos de liberação, sendo as suspensões centrifugadas e a absorvância do sobrenadante medida, para identificar se a absorvância monitorada do InTPP pertencia ao fármaco liberado no isobutanol ou as moléculas ligadas às nanopartículas. Os resultados (Figura 31B) revelaram que não houve diferença entre os espectros de absorvância do InTPP nas amostras centrifugadas ou nas suspensões não centrifugadas, sugerindo que o espectro monitorado no experimento de liberação pertence ao fármaco liberado em

isobutanol e não ao fármaco ligado à nanopartícula. Resultados semelhantes foram obtidos na liberação do InTPP das micropartículas de PLGA.

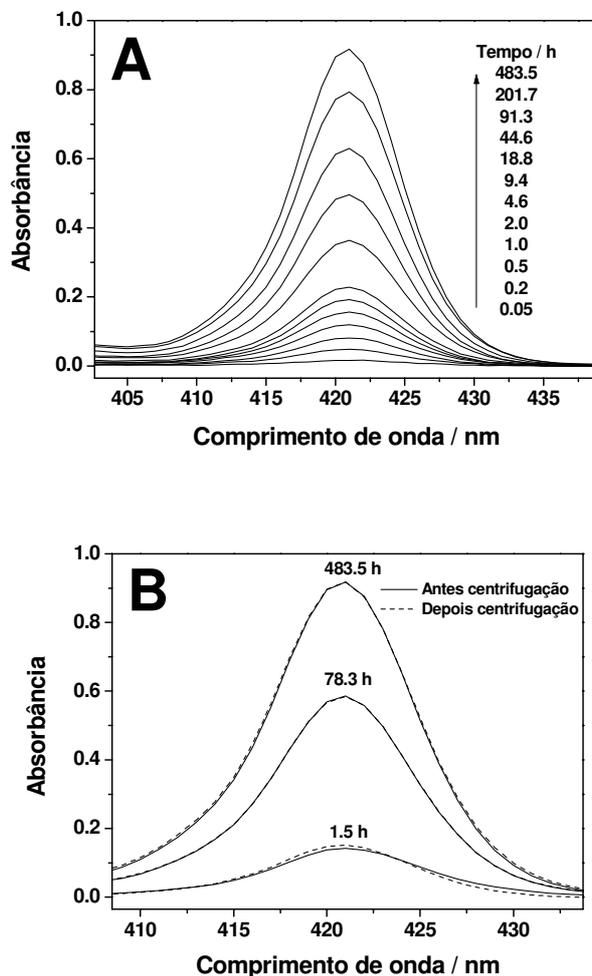


Figura 31 – (A) Monitoramento da absorbância do InTPP liberado de nanopartículas do ensaio OE5N em função do tempo sem previa separação entre partículas e meio de liberação. (B) Comparação do perfil espectral do InTPP em isobutanol antes e depois da separação das nanopartículas do ensaio OE5N do meio de liberação para curtos, médios e longos períodos de liberação.

A figura 32 apresenta o perfil de liberação do InTPP de micro e nanopartículas na forma de uma dependência temporal da porcentagem de InTPP liberado. O fármaco liberado foi monitorado por cerca de 1400 h para micropartículas (Fig. 32B) e 700 h para nanopartículas (Fig. 32A), e os resultados indicam que a liberação de InTPP é tipicamente bifásica, com uma liberação

rápida inicial seguida por uma fase de liberação mais lenta. Na fase inicial conhecida como 'burst', cerca de 31,5 % do InTPP foi liberado das nanopartículas nas primeiras 9 h enquanto que cerca de 28,4 % foi liberado das micropartículas dentro das primeiras 2,2 h. Esta liberação rápida inicial poderia ser atribuída ao fármaco localizado na zona superficial das partículas, ou seja, adsorvido ou fracamente ligado à área superficial da partícula. Assumindo que as partículas sejam esféricas, como já mostrado nas micrografias, e sabendo-se que a área superficial (AS) de uma esfera é proporcional ao seu diâmetro ($AS = \pi d^2$, onde d é o diâmetro da esfera), pode-se justificar a maior velocidade de liberação do InTPP das micropartículas do que das nanopartículas na fase inicial da liberação. Contudo, deve-se também considerar que a porcentagem de PVA residual sobre a superfície das micropartículas ($0,28 \pm 0,04$ %) é muito menor do que nas nanopartículas ($4,5 \pm 0,7\%$). Portanto, é possível que grandes quantidades de PVA presentes na superfície das partículas possam atuar como barreira à liberação do InTPP localizado na zona superficial da esfera, levando a uma diminuição da velocidade de liberação do fármaco. Além disso, Messaritaki et al. [206] relataram recentemente que a liberação inicial ('burst') do 5-fluorouracil (vide anexo) encapsulado em micropartículas de PLGA foi dependente da velocidade de inchamento da matriz polimérica no meio de liberação. Dessa forma, partículas pequenas que apresentem maior concentração de PVA residual oferecerão maior resistência à permeação do meio de liberação através da matriz polimérica, retardando a liberação do fármaco encapsulado. Os resultados também sugerem que a quantidade de InTPP na zona superficial da micropartícula é ligeiramente menor do que nas nanopartículas, já que a porcentagem média de InTPP liberada pela microesfera na fase inicial é menor do que na nanoesfera.

A diferença entre o meio usado neste trabalho (um solvente orgânico) e o meio aquoso usado pela maioria dos pesquisadores em experimentos de liberação torna difícil a comparação da liberação do InTPP com outros fármacos. Por exemplo, Faisant et al. [207] estudou o mecanismo de liberação de 5-fluorouracil (lipofílico) encapsulado em microesferas de PLGA (diâmetro médio de 52 μm e relação $m_{\text{fármaco}}/m_{\text{partícula}}$ de 20 %) usando um tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C como

meio de liberação, e os resultados mostraram que 25-35% do total de fármaco foi liberado dentro de 24 h, um tempo bem superior, se comparado ao tempo de liberação (1ª fase) das micropartículas deste trabalho.

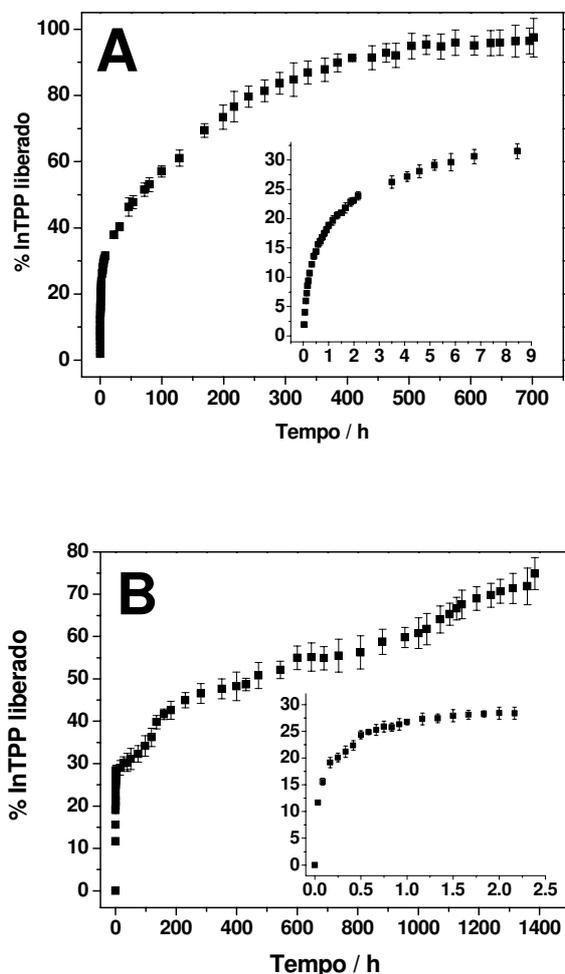


Figura 32 – Resultados da liberação *in situ* do InTPP encapsulado em (A) nano (ensaio OE5N) e (B) micro partículas de PLGA a 27 °C.

A segunda fase de liberação do InTPP poderia ser atribuída a difusão da droga dissolvida dentro da partícula de PLGA para o meio de liberação, desde que erosões na superfície de micropartículas não foram observadas por MEV depois de longos períodos de liberação. Análises da superfície de nanopartículas por MEV não foram possíveis devido à limitação do microscópio e a degradação das partículas pequenas pelo feixe de elétrons. Os resultados mostram que 97% do

InTPP foi liberado das nanopartículas depois de 702 h (Fig. 32A) enquanto que 75% do fármaco foi liberado da micropartícula depois de 1385 h (Fig. 32B). Esta diferença é esperada já que com o aumento do tamanho da partícula o comprimento do caminho difusional aumenta, conduzindo, dessa forma, a uma redução na velocidade de transporte de massa e do gradiente de concentração do fármaco.

Com o objetivo de explicar o perfil de liberação das micropartículas e nanopartículas carregadas com InTPP, modelos matemáticos foram utilizados a fim de avaliar se a liberação seria governada por processo de difusão ou de dissolução do fármaco contido nas partículas. O primeiro modelo matemático utilizado assume que a liberação do fármaco das partículas é governada por difusão, sendo um processo de transferência de massa que pode ser quantificado usando a 2ª Lei de Fick [208] a qual, para partículas esféricas, tem a seguinte forma:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) \quad (9)$$

onde c é a concentração local da droga no tempo t e na distância r a partir do centro da partícula, e D é o coeficiente de difusão do fármaco na matriz polimérica. Assumindo que o fármaco esteja uniformemente distribuído dentro do sistema de liberação, tenha perfeita condição sink e uma condição padrão de simetria partindo-se do centro da partícula até sua superfície, a seguinte solução analítica da 2ª Lei de Difusão de Fick pode ser usada para descrever os resultados cinéticos de liberação do fármaco:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6\alpha(\alpha+1) \exp(-Dq_n^2 t / r^2)}{9 + 3\alpha + q_n^2 \alpha^2} \quad (10)$$

onde M_t e M_∞ são as quantidades totais de soluto na esfera depois de um tempo t e um tempo infinito, respectivamente; $\alpha = V/(V_i K_p)$ representa uma proporção de equilíbrio entre o fármaco liberado e o fármaco retido na particular, sendo V o volume de líquido usado como meio de liberação, V_T o volume total das partículas e $K_P = c_{i\infty}/c_{b\infty}$ é o coeficiente de partição caracterizado pela proporção do fármaco

localizado dentro da partícula e a concentração do fármaco no meio de liberação em equilíbrio termodinâmico; e q_n é a raiz da equação abaixo:

$$\tan q_n = \frac{3q_n}{3 + \alpha q_n^2} \quad (11)$$

Como não é possível desconsiderar a existência de ‘nanoporos’ nas partículas, D representa uma constante de difusibilidade aparente, considerando-se o transporte do fármaco através do polímero, bem como, possível transferência de fármaco através de ‘nanoporos’ em contato com o isobutanol. A equação 10 é uma expressão matemática exata para o modelo de difusão de Crank desde que a equação relatada por Crank [208] contem um coeficiente incorreto que pode induzir a erros aos cálculos associadas as cinéticas de liberação do fármaco [209].

O ajuste da equação 10 à cinética de liberação do InTPP encapsulado em nanopartículas de PLGA levou a uma boa concordância entre o modelo de difusão e os dados experimentais (Figura 33A, linha contínua) desde que o coeficiente de correlação (R^2) foi 0,9886. Entretanto, o mesmo resultado não foi observado para o InTPP liberado das micropartículas (Figura 33B, linha contínua) desde que o valor de R^2 foi 0,5503. Estes resultados sugerem que a liberação do InTPP das nanopartículas é controlada pela difusão enquanto que para as micropartículas provavelmente outro fenômeno possa estar contribuindo para o mecanismo de liberação. Os valores de D obtidos a partir do ajuste não linear da equação 10 aos dados experimentais foram $2,4 \times 10^{-21} \text{ m}^2/\text{s}$ e $5,3 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ para o InTPP liberado das nano e micropartículas, respectivamente. Embora o modelo matemático usado não seja eficaz em descrever a liberação do InTPP das micropartículas, era esperado que o coeficiente de difusão do InTPP das micropartículas fosse maior do que os das nanopartículas em razão da maior área superficial das micropartículas comparado a das nano. Além disso, a porcentagem de PVA residual sobre a superfície das micropartículas é menor, comparada a das nanopartículas. Ressalta-se que os coeficientes de difusão de compostos em solventes orgânicos estão em torno de $10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ [203] mas neste trabalho os coeficientes estão bem abaixo do valor usual. Portanto, esta diferença entre os

valores usuais e os experimentais dos coeficientes de difusão sugere que o fármaco está retido na matriz polimérica.

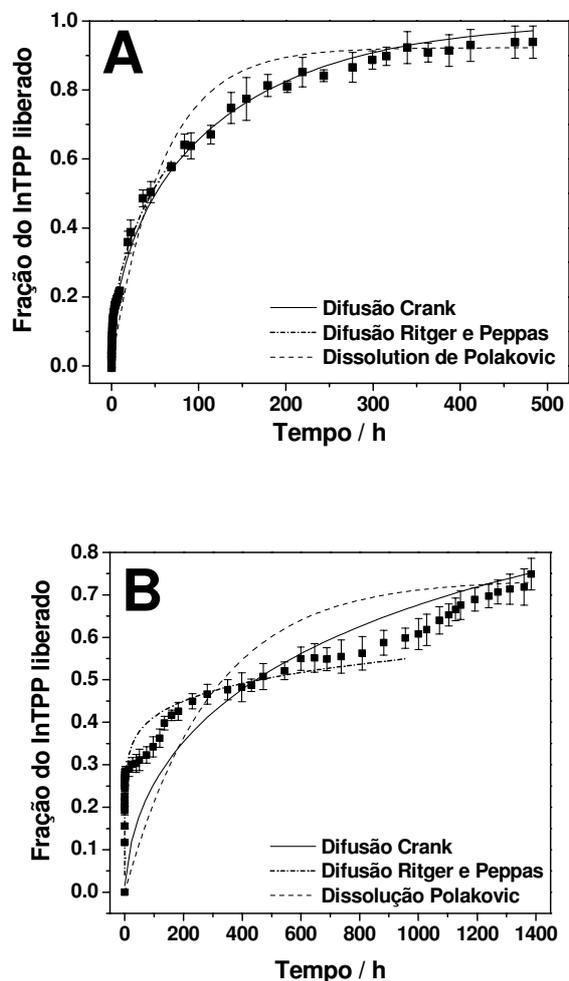


Figura 33 – Ajuste do modelo de difusão para os (■) dados da cinética de liberação do InTPP encapsulado em (A) nano e (B) micropartículas em isobutanol a 27 °C.

Os dados experimentais foram também analisados através do modelo empírico de liberação difusional de Ritger e Peppas [210,211]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (12)$$

onde M_t e M_∞ são as quantidades totais de soluto na esfera depois de um tempo t e um tempo infinito, respectivamente, k é uma constante que congrega as

propriedades da matriz polimérica e do fármaco, e n é o expoente difusional que é o indicativo do mecanismo de transporte. O modelo de Ritger e Peppas só pode ser aplicado para caracterizar os primeiros 60% de liberação do fármaco pelas esferas poliméricas. Um coeficiente difusional igual a 0,50 corresponderia a uma liberação segundo o modelo de Fick ($M_t/M_\infty = kt^{1/2}$) a partir de uma matriz unidimensional [211]. Quando corrigido para a geometria das micro e nanopartículas, o expoente difusional modifica-se para o valor 0,43 quando a difusão de Fick ocorre na matriz esférica. A melhor concordância entre o modelo empírico e os dados experimentais foi obtida para a liberação do InTPP das nanopartículas (Figura 33A, curva tracejada com ponto) do que das micropartículas (Figura 33B, curva tracejada com ponto), após ajuste da curva usando a equação 12, uma vez que o valor de R^2 foi 0,9876 para a droga liberada das nanopartículas e 0,9405 para as micropartículas. Um valor de n igual a $0,44 \pm 0,01$ foi obtido para a liberação do InTPP das nanoesferas sugerindo que a liberação é governada pela difusão de Fick. O resultado obtido pelo modelo empírico de Ritger e Peppas é similar ao obtido pelo modelo de difusão de Crank modificado por Jo et al. [209]. O valor de n de $0,23 \pm 0,01$ para o fármaco liberado das microesferas mostra que a liberação do InTPP não foi governada pela difusão de Fick. Esta conclusão também está de acordo com as obtidas pelo modelo de Crank.

O modelo de dissolução de Polakovic et al [212] foi também aplicado aos dados de liberação do InTPP através da equação abaixo:

$$\frac{M_b}{M_0} = \frac{I}{K_p} \left[1 - \exp\left(-\frac{\alpha + I}{\alpha} kt \right) \right] \quad (13)$$

onde M_b and M_0 são as quantidades de fármaco no meio de liberação e localizado no interior da partícula, respectivamente; k é uma constante de velocidade de dissolução aparente e os outros símbolos (α and K_p) tem o mesmo significado como no modelo de difusão de Crank (Equação 10). O modelo de dissolução pode ser esperado quando cristais do composto encapsulado estiverem presentes nas partículas poliméricas. Ressalta-se que a dissolução do fármaco não é um mecanismo pelo qual um composto é transportado para fora da matriz polimérica,

uma vez que isto se dá por difusão. Contudo a dissolução pode afetar a velocidade do fluxo difusional oriunda das partículas poliméricas, o que poderia levar a velocidade de dissolução a ser uma etapa determinante quando a velocidade de absorção de um fármaco for maior que a velocidade de dissolução. Este fato poderia afetar o efeito curativo de um fármaco devido ao limitado tempo de residência dos fármacos nos sítios de absorção.

A aplicação do modelo de dissolução de Polakovic et al. [212] à cinética de liberação do InTPP mostraram que os dados experimentais foram melhor ajustados à liberação do composto oriundo das nanoesferas do que das microesferas, já que os valores de R^2 foram 0,8488 e 0,1448, respectivamente, para as nano e micropartículas. No entanto, ambos os resultados sugerem que a liberação do InTPP não é controlada pela dissolução do composto porfirínico, desde que o ajuste do modelo de difusão aos dados experimentais foi melhor do que o ajuste com o modelo de dissolução. Polakovic et al. [212] mostraram que a difusão através da matriz polimérica é o melhor modelo matemático ajustado a cinética de liberação de lidocaína (vide anexo) encapsulada em nanopartículas de PLA com baixa relação $m_{\text{fármaco encapsulado}}/m_{\text{partícula}}$ ($< 10\%$), enquanto que o modelo de dissolução foi mais suscetível para descrever a liberação de drogas com alta relação $m_{\text{fármaco encapsulado}}/m_{\text{partícula}}$ ($> 10\%$). Observações similares foram obtidas por Gorner et al. [166] o qual assumiu que formulações com baixas relações de droga encapsulada por massa de partícula teriam uma matriz polimérica homogênea com a droga distribuída aleatoriamente através da partícula, enquanto que para sistemas caracterizados por altas relações uma matriz polimérica heterogênea seria formada. Estas informações associadas aos resultados experimentais permitem sugerir que o InTPP poderia estar distribuído homogeneamente na matriz polimérica, uma vez que a porcentagem de InTPP carregado nas partículas de PLGA foi menor que 1%.

Tentativas foram feitas para avaliar a distribuição do InTPP dentro das partículas poliméricas usando-se microscopia confocal. Em razão da limitação do microscópio com relação à visualização das nanopartículas, onde somente agregados fluorescentes foram observados (Figura 34A), optou-se por avaliar a

distribuição do InTPP nas micropartículas uma vez que a fluorescência emitida por cada partícula foi facilmente observada (Figura 34B). Dessa forma, as partículas foram observadas através de cortes ópticos transversais de diferentes profundidades (Figura 35).

Os cortes ópticos transversais obtidos por microscopia confocal (Figura 35) confirmaram a presença do InTPP dentro da matriz polimérica de PLGA. As micrografias demonstram que o InTPP está distribuído de forma relativamente homogênea dentro das micropartículas uma vez que as fluorescências observadas nos cortes ópticos apresentam intensidades aproximadamente semelhantes e não se observa distribuição preferencial do InTPP em regiões mais superficiais ou interiores da partícula. Além disso, as micrografias dos cortes ópticos sugerem que não há presença de cristais de InTPP no interior da micropartícula, uma vez que não foram observadas regiões fluorescentes de formatos indefinidos e com intensidades fluorescentes que as diferenciassem das demais regiões da partícula como um todo.

Berkland et al. [213] relataram que o tamanho da microesfera afeta diretamente a distribuição do fármaco dentro da matriz polimérica. A análise de micropartículas de PLGA encapsuladas com rodamina B e piroxicam (vide anexo) mostrou que partículas pequenas ($< 10 \mu\text{m}$ de diâmetro) apresentaram uma distribuição uniforme do fármaco dentro das partículas. Entretanto, o aumento no tamanho das esferas levou a uma distribuição preferencial da rodamina para a região superficial da micropartícula enquanto que o piroxicam distribuiu-se preferencialmente na parte mais interna da partícula. Segundo Berkland, métodos que diminuam o tempo de separação de fase do polímero na fase aquosa após período de emulsão ou reduzam a mobilidade do fármaco na solução que contem o polímero (fase orgânica) devem possibilitar uma distribuição mais uniforme do fármaco dentro da partícula. As micropartículas que foram avaliadas apresentavam diâmetros relativamente pequenos ($1,9 \mu\text{m}$) se comparado aos obtidos por Berkland.

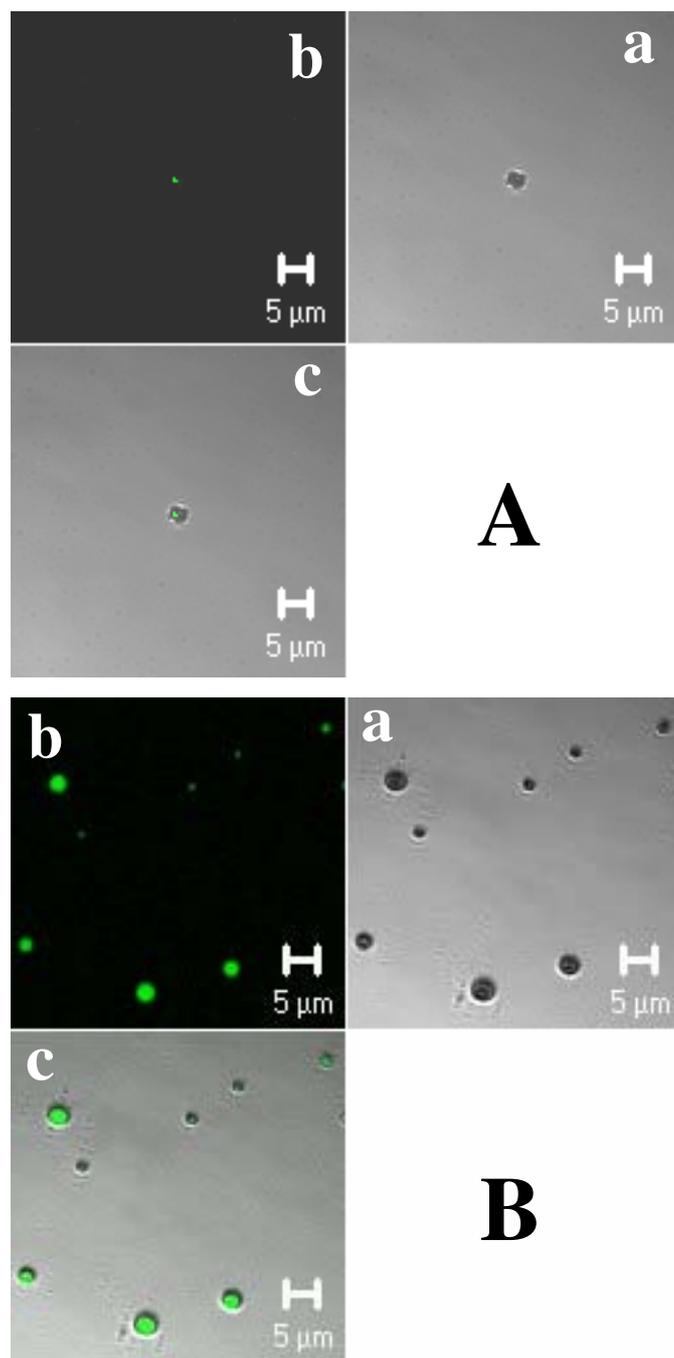


Figura 34 – Micrografia confocal de agregados de nanopartículas do ensaio OE5N (A) e de micropartículas (B) encapsulados com InTPP. Em ambas as figuras A e B há 3 micrografias sendo uma delas (a) referente à visualização da partícula sem excitação do InTPP, (b) a outra refere-se a emissão de fluorescência do InTPP excitado pelo laser de argônio e (c) a última que constitui uma soma das duas primeiras micrografias.

Possivelmente, as pequenas gotículas de fase orgânica obtidas durante a etapa de emulsificação favoreceram uma evaporação rápida do clorofórmio impossibilitando a mobilidade do InTPP na solução orgânica antes da separação de fase do PLGA em fase aquosa. Isto permitiu que o InTPP se distribuisse de forma relativamente homogênea dentro da micropartícula e não apresentasse uma distribuição preferencial na região superficial ou mais interior à partícula. Após os resultados da análise confocal pode-se concluir que a falta de ajuste dos modelos de difusão e de dissolução aos dados experimentais de liberação do InTPP oriundo de micropartículas, não está associada à distribuição não uniforme ou à presença de cristais do InTPP dentro das micropartículas de PLGA.

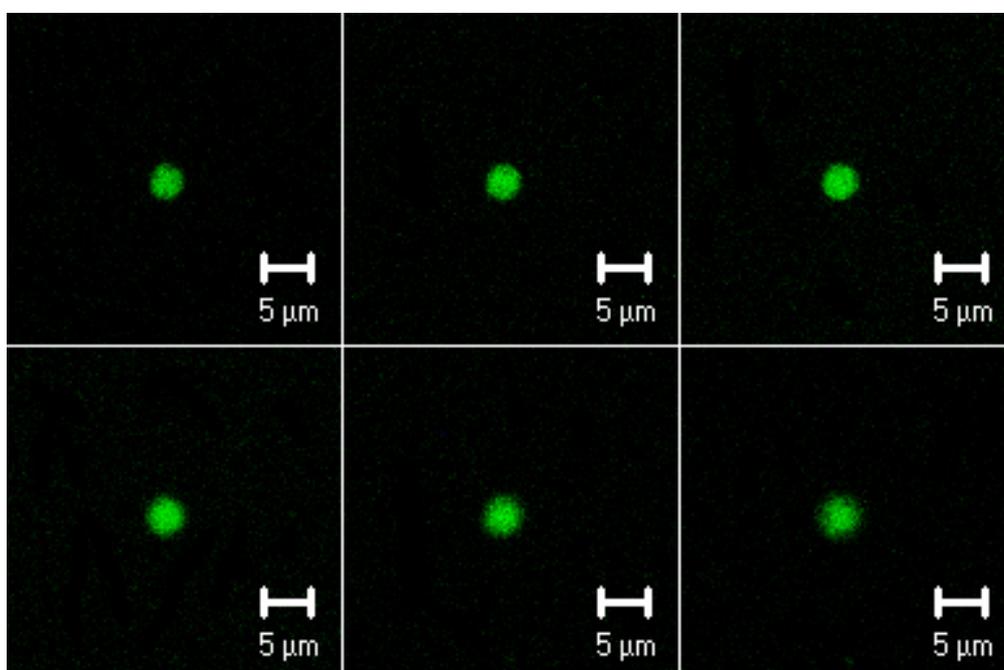


Figura 35 – Cortes ópticos transversais com aumento gradual de 0,6 μm de profundidade para uma micropartícula de PLGA contendo InTPP encapsulado obtidos por microscopia confocal.

Trabalho realizado por Berkland et al. [213] também mostraram que as formulações de micropartículas contendo piroxicam e rodamina, caracterizadas pela larga distribuição de tamanho, apresentaram perfis de liberação irregulares caracterizados por múltiplas fases de aumento e diminuição da velocidade de liberação dos fármacos. Os pesquisadores justificaram o fato devido a combinação

de vários perfis de liberação oriundos de microesferas de tamanho variado. Como as micropartículas analisadas apresentaram uma distribuição de diâmetro médio entre 0,15 a 4,5 μm , provavelmente, o perfil de liberação do InTPP das micropartículas de PLGA, caracterizado por pequenos aumentos e diminuições da velocidade de liberação do fármaco, seja uma combinação de vários perfis de liberação do InTPP encapsulado em micropartículas de tamanhos variados.

Embora, análises semelhantes não tenham sido feitas com as nanopartículas, é possível através do raciocínio descrito acima e dos resultados dos perfis de liberação das nanopartículas do ensaio OE5N sugerir que o InTPP deve estar distribuído de forma homogênea nas nanopartículas de PLGA.

4.6 Fotoxidação de células de câncer de próstata humana da linhagem LNCaP com partículas poliméricas contendo InTPP

Após extensa caracterização das nanoesferas poliméricas, optou-se por avaliar a eficiência fotodinâmica das partículas obtidas no ensaio OE5N sobre células tumorais de próstata humana da linhagem LNCaP. Esta linhagem foi isolada em 1977 por Horoszewicz et al. [214] através de biópsia, por aspiração de linfonodo supraventricular esquerdo, de um homem caucasiano de 50 anos, com diagnóstico de carcinoma metastático de próstata. Ressalta-se que vários pesquisadores têm mostrado o potencial da terapia fotodinâmica para tratamento do câncer de próstata [215,216] e, somado ao fato de que o câncer de próstata está entre os tumores mais diagnosticados entre os homens, escolheu-se esta linhagem celular para avaliar a eficiência do InTPP encapsulado, comparada à eficiência do InTPP livre, em causar a redução da viabilidade celular.

Inicialmente, estudos foram realizados para averiguar se o tempo de incubação do InTPP em placas contendo células LNCaP poderia afetar a eficiência fotodinâmica. Para este fim, suspensões de nanopartículas contendo InTPP, bem como, soluções de InTPP não encapsulado, foram incubadas em tempos variados.

Após período de irradiação de 40 minutos foi observada uma redução significativa, com 90% de confiança, da viabilidade celular quando o tempo de

incubação aumentou de 1 h para 3 h para as culturas de LNCaP incubadas com o InTPP encapsulado, e de 2 h para 3 h para as células incubadas como o InTPP não encapsulado (Figura 36A e 36B).

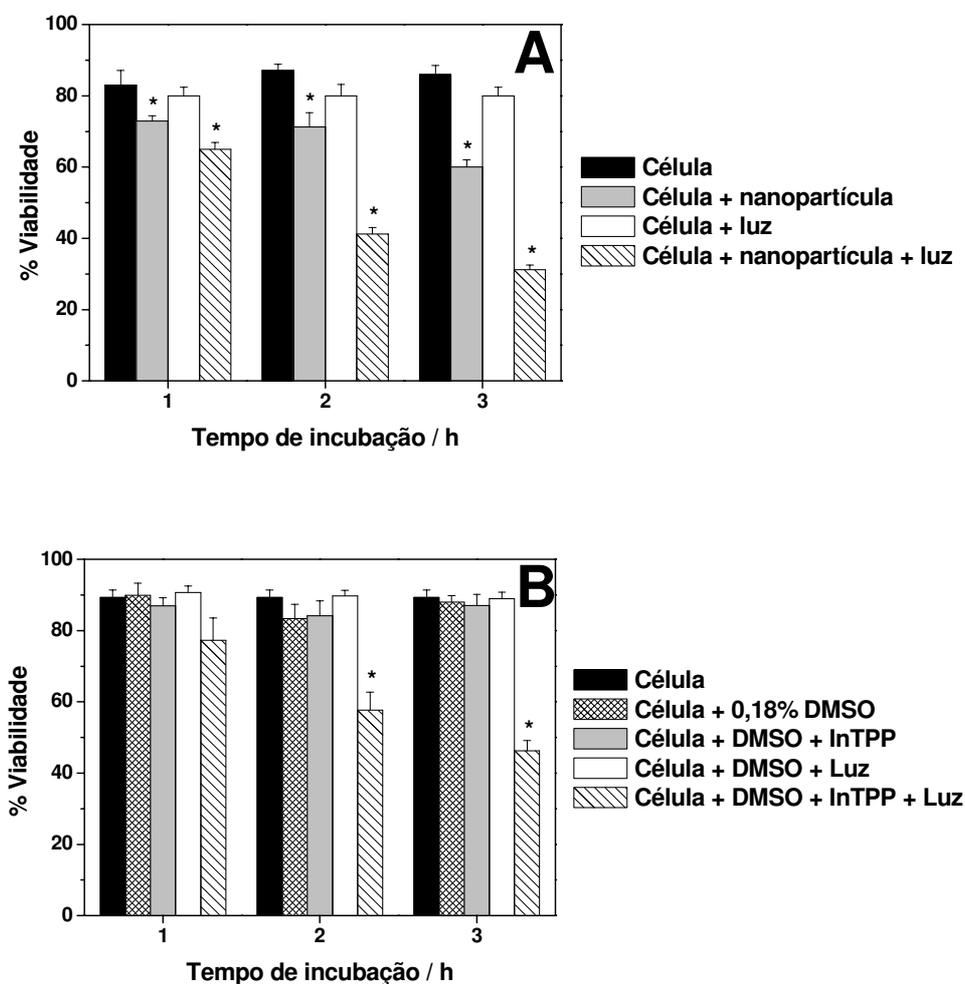


Figura 36 – Fotoxidação de células LNCaP com InTPP (3,8 $\mu\text{mol/L}$) (A) encapsulado em nanopartículas de PLGA 50:50 (ensaio OE5N) e (B) não encapsulado por 40 minutos após vários períodos de incubação. Dados representativos de três experimentos independentes. (*) Redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle (células) com 90% de confiança.

Os resultados sugerem que o InTPP encapsulado foi relativamente mais eficiente em causar morte às células de LNCaP comparado ao InTPP não encapsulado já que a viabilidade celular média foi reduzida de 65% para 41,2% quando o tempo de incubação com as partículas de PLGA contendo InTPP

aumentou de 1 h para 2 h e, posteriormente, para 31,2% quando o tempo de incubação aumentou para 3 h, enquanto que a viabilidade média das células incubadas com o InTPP em solução não sofre redução significativa no tempo de incubação de 1 h, mas foi reduzida de 77,3% para 46,3% quando o tempo de incubação aumentou de 2 h para 3 h.

Resultados similares também foram obtidos por Konan et al. [121] quando aumentaram o tempo de incubação de 5 para 15 minutos da meso-tetra(4-hidroxifenil)porfirina (THPP) (vide anexo), uma porfirina com estrutura semelhante ao InTPP, encapsulada em nanopartículas de PLGA sobre culturas de células de tumor mamário de camundongos EMT-6, já que a viabilidade celular foi reduzida de 65,6 para 6,3%, enquanto que nas mesmas condições o THPP não encapsulado causou uma redução de 100 para 70%. McCarthy et al. [217] ao irradiar as células de glioblastoma 9L (tumor cerebral) imediatamente após contato com partículas de PLGA contendo meso-tetrafenilporfolactol (vide anexo) ou após 16h de incubação, observou que a viabilidade foi reduzida de 91 para 5%. Zeisser-Labouebe et al. [218] também observaram, em experimentos de fotocitotoxicidade, uma redução da viabilidade celular quando se aumentou o tempo de incubação das células de câncer de ovário humano da linhagem NuTu-19 com hipericina (vide anexo) encapsulada e não encapsulada em nanopartículas de PLA. Esta dependência temporal reflete a cinética de retenção dos sistemas de liberação pelas células tumorais onde curtos períodos de incubação, necessários a uma significativa morte celular, sugerem uma rápida retenção das nanopartículas pelas células.

Comparando-se a viabilidade celular na presença e ausência de partículas poliméricas contendo InTPP (sem etapa de irradiação), pode-se verificar que a concentração de 3,8 $\mu\text{mol/L}$ de InTPP causou citotoxicidade no escuro uma vez que a viabilidade média diminuiu, aproximadamente, de 85 para 72% após 1 e 2 horas de incubação, e de 85 para 60% após 3 horas de incubação (Figura 36A). Diferentemente, o InTPP em solução não apresentou efeito citotóxico após o período de incubação (Figura 36B).

Os resultados sugerem que o aumento do tempo de incubação favorece o aumento da citotoxicidade do InTPP encapsulado em nanopartículas de PLGA. Konan et al. [121] relatou que o THPP encapsulado em nanopartículas de PLGA não causou citotoxicidade no escuro, entretanto, o tempo de incubação (5-60 min) foi menor comparado ao tempo deste trabalho (1-3h), o que poderia mascarar os resultados uma vez que Bachor et al. [219] mostraram que existe uma correlação entre a velocidade de endocitose e a eficiência na morte celular. Zeisser-Labouebe et al. [218] também não observaram citotoxicidade na ausência de irradiação quando a hipericina (Hy), encapsulada ou não em nanopartículas de PLA, foi encubada com células NuTu-19. Embora o tempo de incubação utilizado por Zeisser-Labouebe tenha variado entre 15 min e 2 h, as concentrações utilizadas de Hy foram menores (0,02-0,4 $\mu\text{mol/L}$) quando comparadas à concentração utilizada neste experimento (3,8 $\mu\text{mol/L}$), fato que poderia favorecer a ausência dos efeitos citotóxicos como os observados para o InTPP encapsulado.

Ressalta-se que a citotoxicidade no escuro não foi causada pelas partículas de PLGA, pois experimentos realizados com nanopartículas vazias (sem InTPP) não causaram morte celular. Este resultado está de acordo com o obtido por outros grupos [121,217] e é consistente com a biocompatibilidade conhecida do PLGA. Verifica-se também que as células irradiadas na ausência de partículas (controle irradiado) não sofreram redução significativa da viabilidade celular.

Experimentos similares foram realizados usando diferentes concentrações de InTPP após 2 h de incubação (Fig. 37A e 37B). Os resultados mostraram, com 90% de confiança, que o aumento da concentração do fotossensibilizador causou um aumento na eficiência fotodinâmica da formulação nanoparticulada (Figura 37A) uma vez que houve uma redução da viabilidade celular média de 56 para 15% quando a concentração de InTPP aumentou de 1,8 para 7,7 $\mu\text{mol/L}$.

Experimentos realizados com o InTPP não encapsulado (Figura 37B) também mostraram que o mesmo aumento na concentração do fotossensibilizador causou uma redução média na viabilidade celular de 62,8 para 53,7%. Estes resultados indicam que o InTPP encapsulado foi mais eficiente em causar a morte das células LNCaP comparado ao InTPP não encapsulado quando a

concentração do fotossensibilizador foi aumentada. Observa-se também que a viabilidade celular foi reduzida, significativamente, quando as culturas foram mantidas no escuro incubadas com concentrações de InTPP ($\geq 3,8 \mu\text{mol/L}$) encapsulado em partículas de PLGA. Esta citotoxicidade no escuro não foi observada para as culturas celulares incubadas com o InTPP não encapsulado.

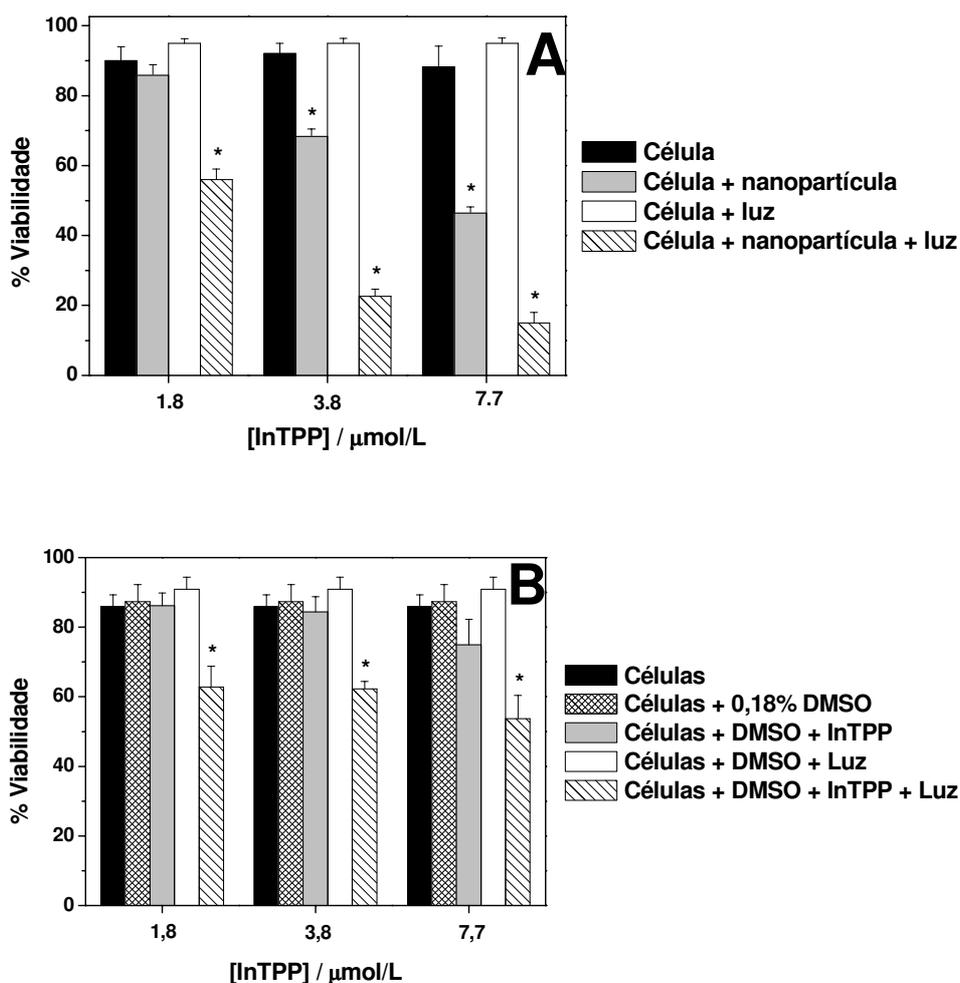


Figura 37 – Fotoxidação de células LNCaP incubadas por 2 horas com (A) partículas de PLGA contendo diferentes concentrações de InTPP (ensaio OE5N) e (B) soluções do mesmo composto não encapsulado e irradiadas por 40 minutos após incubação. Dados representativos de três experimentos independentes. (*) Redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle (células) com 90% de confiança.

Portanto, tanto a eficiência fotodinâmica quanto a citotoxicidade no escuro se mostra dose dependente para o InTPP encapsulado. Konan et al. [121] mostraram que a viabilidade das células EMT-6 também foi reduzida de 18 para 11% quando as concentrações de THPP encapsulado em nanoesferas de PLGA foram aumentadas de 4,2 para 13,9 $\mu\text{mol/L}$ em experimento de fotocitotoxicidade. Uma redução da viabilidade celular de 82 para 11% foi observada sob as mesmas concentrações citadas acima usando soluções de THPP não encapsulado. Zeisser-Labouebe [218] também observaram reduções na viabilidade de células NuTu-19 quando a concentração de hipericina (vide anexo) encapsulada ou não em nanopartículas de PLA foi aumentada durante os experimentos de fotocitotoxicidade, mostrando-se dose dependente. Optou-se por utilizar a concentração de 1,8 $\mu\text{mol/L}$ de InTPP encapsulado em nanopartículas para os estudos subseqüentes em razão da ausência de efeito citotóxico significativo no escuro causado pelo fotossensibilizador nesta concentração.

A influência do tempo de exposição das células à radiação foi também avaliada. Os resultados (Fig. 38A) mostram que a eficiência fotodinâmica do InTPP encapsulado depende do tempo de irradiação das células, desde que a viabilidade celular média foi reduzida de 58,7 para 1,7% quando o tempo de irradiação foi aumentado de 40 para 120 minutos. A mesma dependência foi observada para o InTPP não encapsulado (Fig. 38B) uma vez que a viabilidade média foi reduzida de 62,8 para 40,8% quando o tempo de irradiação foi aumentado de 40 para 120 minutos.

Pegaz et al. [122] relataram a dependência da dose de irradiação com a eficiência fotodinâmica da meso-tetrafenilporfirina e da meso-tetra-(4-carboxifenil) porfirina (vide anexo), encapsuladas em nanopartículas de PLA, em causar danos vasculares na membrana corioalantóide de galinhas.

Resultados similares foram obtidos por Konan et al. [121] e Zeisser-Labouebe et al. [218] quando doses de luz variadas foram incididas sobre culturas celulares, respectivamente, das linhagens EMT-6 e NuTu-19, incubadas com a meso-tetra(4-hidroxifenil)porfirina e a hipericina, encapsuladas ou não, em nanopartículas de PLGA e PLA, respectivamente. Os pesquisadores também

mostraram que a eficiência dos fotossensibilizadores não encapsulados foi menor comparado aos encapsulados quando doses maiores de irradiação foram utilizadas, fato também observado neste trabalho.

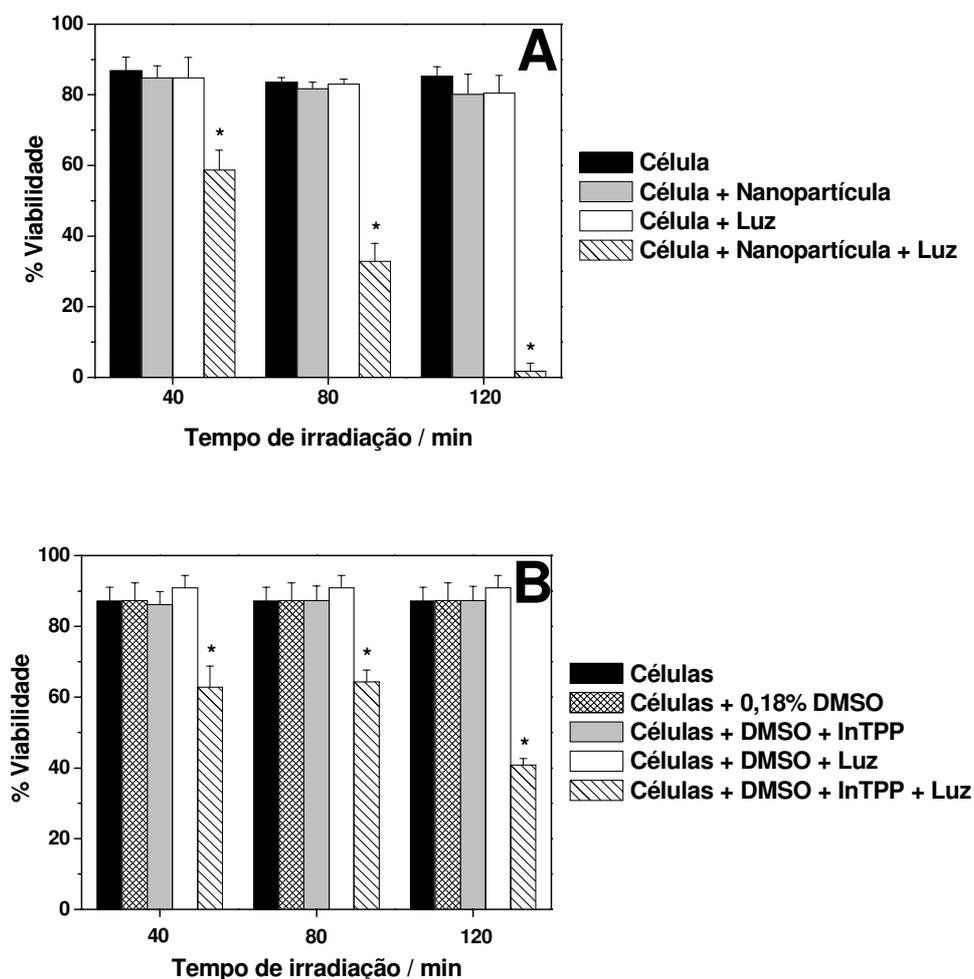


Figura 38 – Fotoxidação de células LNCaP na presença de InTPP 1,8 $\mu\text{mol/L}$ (A) encapsulado (ensaio OE5N) e (B) não encapsulado em nanopartículas de PLGA, após 2 h de incubação e tempo variados de irradiação. Dados representativos de três experimentos independentes. (*) Redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle (células) com 90% de confiança.

Konan et al [121] e Zeisser-Labouebe et al. [218] explicaram a diferença na eficiência dos fotossensibilizadores encapsulados comparados aos livres devido ao diferente mecanismo e velocidade da retenção dos fotossensibilizadores pelas células. Dessa forma, diferentes mecanismos de retenção celular podem estar

acontecendo com o InTPP livre e encapsulado nas células LNCaP, conduzindo aos resultados distintos da eficiência do fotossensibilizador, livre e encapsulado, em reduzir a viabilidade das células cancerígenas.

Todos os resultados observados acima foram obtidos através da irradiação das placas contendo as células LNCaP logo após o período de incubação com as suspensões de partículas ou soluções de InTPP não encapsulado. Como não se tinha certeza se as fotoxidações observadas eram decorrentes dos fotossensibilizadores internalizados nas células ou livres em solução (ou mesmo uma mistura de ambos), experimentos foram realizados lavando as placas antes do período de irradiação (Figura 39).

A figura 39B mostra que o procedimento de lavagem antes do período de irradiação das placas contendo células LNCaP e incubadas com InTPP (encapsulado ou não em partículas de PLGA) não causou diferença significativa na viabilidade celular comparada aos resultados obtidos quando as fotoxidações foram realizadas sem a etapa de lavagem (Figura 39A). Estes resultados confirmam que as fotoxidações observadas em experimentos anteriores foram ocasionadas pelo InTPP (encapsulado ou não) internalizado nas células e não devido as moléculas do fotossensibilizador (encapsuladas ou não) em solução. McCarthy et al. [217] observaram resultados semelhantes ao irradiarem células de glioblastoma 9L logo após incubação com partículas de PLGA encapsulada com meso-tetrafenilporfolactol (10 $\mu\text{mol/L}$) ou após período de incubação de 16 h uma vez que a fototoxicidade causada pelas partículas não internalizadas (9% de morte celular) foi mínima comparada às partículas internalizadas (95% de morte celular).

A fim de avaliar qualitativamente a retenção do InTPP encapsulado e não encapsulado dentro das células LNCaP análises das células foram feitas após período de incubação de 2 horas utilizando-se microscopia confocal. As figuras 40A e 40B mostram um conjunto de quatro micrografias sendo uma delas relacionada à fluorescência da faloidina ligada a F-actina para marcação do citoesqueleto, uma relacionada a fluorescência do DAPI que se liga ao DNA para marcação do núcleo, uma micrografia associada a fluorescência do InTPP e uma última que combina as micrografias relacionadas a fluorescência dos três

compostos avaliados (faloidina, DAPI e InTPP). As micrografias mostraram que tanto o InTPP encapsulado em nanopartículas de PLGA quanto o InTPP não encapsulado foram localizados dentro das células, em geral, sempre na região perinuclear.

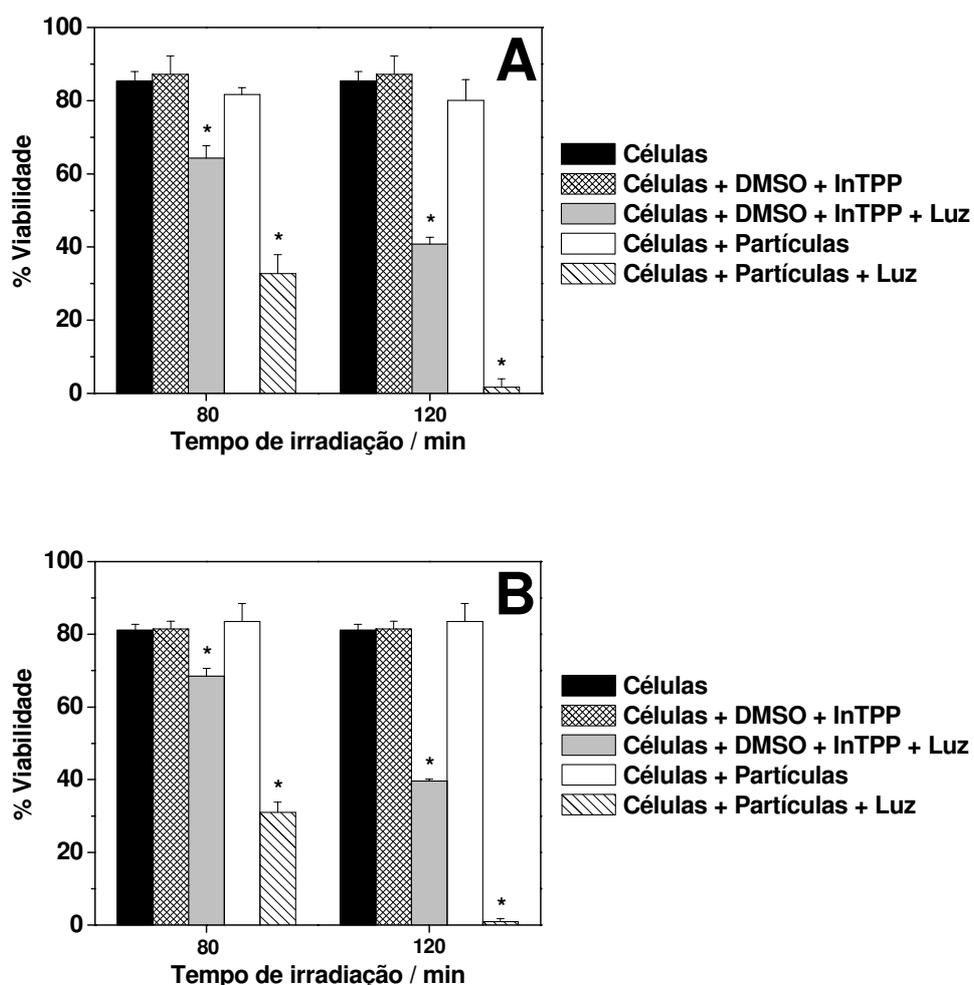


Figura 39 – Fotoxidação de células LNCaP na presença de 1,8 $\mu\text{mol/L}$ de InTPP encapsulado (ensaio OE5N) e não encapsulado em partículas de PLGA após 2 horas de incubação e tempos variados de irradiação. Experimentos realizados (A) sem e (B) com lavagem das placas após período de incubação. Dados representativos de três experimentos independentes. (*) Redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle (células) com 90% de confiança.

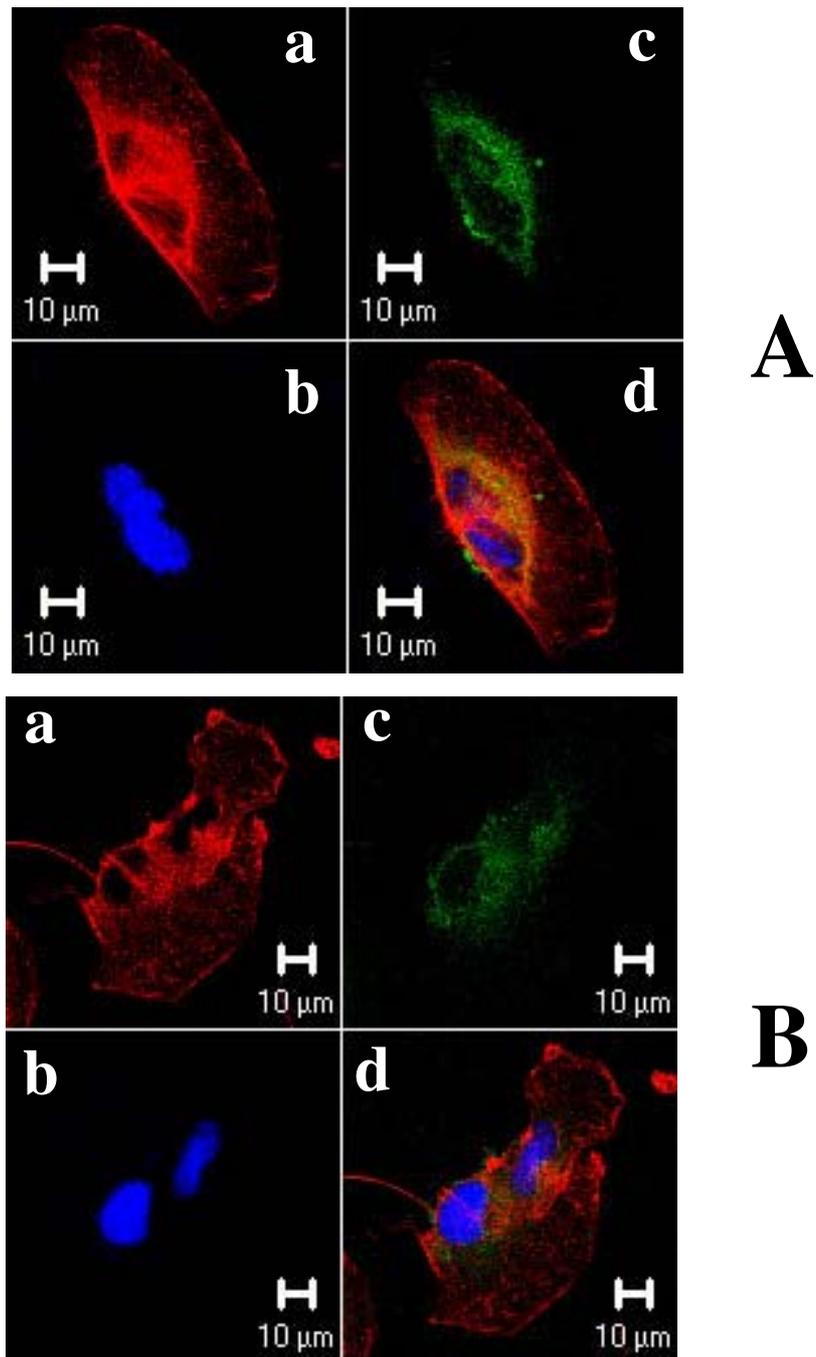


Figura 40 – Micrografia confocal de células LNCaP incubadas por 2 horas com (A) nanopartículas (Ensaio OE5N) contendo InTPP ou com (B) soluções de InTPP na concentração de 1,8 μmol/L. (a) Micrografias relacionadas a fluorescência da faloidina ligada a F-actina para marcação do citoesqueleto, (b) micrografia relacionada a fluorescência do DAPI que se liga ao DNA para marcação do núcleo, (c) micrografia associada a fluorescência do InTPP e (d) combinação das micrografias relacionadas a fluorescência dos três compostos fluorescentes (faloidina, DAPI e InTPP).

Observa-se também uma menor intensidade de fluorescência do InTPP não encapsulado dentro das células comparado ao InTPP encapsulado, sugerindo que uma maior quantidade de InTPP encapsulado tenha sido internalizado nas células comparado ao composto não encapsulado, fato que poderia justificar a melhor eficiência do InTPP encapsulado em reduzir a viabilidade das células LNCaP comparado ao composto não encapsulado. Experimentos foram realizados para quantificar o InTPP livre ou encapsulado que foi internalizado nas células, conforme descrito no item 3.11.1. Os resultados mostrados na tabela 8, confirmam os resultados obtidos pela microscopia confocal, já que o InTPP encapsulado foi 3,0 vezes mais internalizado nas células do que o InTPP livre.

Tabela 8 – Concentração de InTPP livre ou encapsulado (ensaio OE5N) que foi internalizado nas células LNCaP

Fotossensibilizador	[InTPP] Internalizado / $\mu\text{mol/L}$
Encapsulado em nanopartículas de PLGA	0,12 \pm 0,02
Livre	0,04 \pm 0,01

Como fotossensibilizadores em solução tendem a serem conduzidos ao interior da célula por difusão, e devido a natureza hidrofóbica do InTPP, esperava-se encontrar o InTPP localizado na membrana citoplasmática já que estudos [45,220] têm mostrado que fotossensibilizadores hidrofóbicos, preferencialmente, localizam-se na membrana citoplasmática. Neste trabalho, a localização do InTPP foi diferente da esperada já que o composto foi encontrado no interior da célula. Possivelmente, o InTPP tenha se associado com proteínas do soro fetal bovino presente no meio de cultura, resultando em complexos que podem ser transferidos para dentro do citoplasma por endocitose via receptores Apo B/E. Justificativas semelhantes foram feitas por Konan et al. [221] para justificar a localização intracelular do THPP não encapsulado.

Berg et al. [85] mostraram que a meso-tetrafenilporfirina tetrasulfonada (hidrofílica) (vide anexo) foi localizada no interior de células de carcinoma de cólon em organelas lisossomais ou endossomos, mas foi observada em quantidades

pequenas no núcleo e no citoplasma. É possível que a meso-tetrafenilporfirina tetrasulfonada possa desagregar no interior dos lisossomos ou endossomos de forma que pequenas frações sejam liberadas no citoplasma, e conseqüentemente, redistribuindo-se no núcleo. Ressalta-se que as meso-tetrafenilporfirinas monosulfonadas (mais hidrofóbicas) foram sempre localizadas na região perinuclear, não havendo fotossensibilizador localizado no núcleo, fato que está de acordo com o observado para o InTPP encapsulado e não encapsulado.

Resultados experimentais [151,217,222] têm mostrado que nanopartículas são conduzidas ao interior das células por endocitose o que possibilita um acúmulo muito maior de droga. Como o mecanismo de retenção do fotossensibilizador pelas células determina sua localização celular, e conseqüentemente sua eficiência fotodinâmica, a encapsulação dos fotossensibilizadores pode modificar a distribuição intracelular destes compostos permitindo que o fotossensibilizador se localize em compartimentos subcelulares específicos.

Vale ressaltar que estudos recentes realizados por Win e colaboradores [151] demonstraram que a retenção celular de partículas de PLGA com superfície revestidas pelo álcool polivinílico foi aumentada em 2,9 vezes enquanto que para as partículas cujas superfícies foram revestidas por succinato de D- α -tocoferol polietileno glicol 1000 (TPGS) (vide anexo) a retenção foi aumentada em 3,9 vezes. Pesquisadores [151,223] também têm mostrado que o tamanho das partículas podem influenciar a retenção intracelular, sendo que de maneira geral, partículas menores que 200 nm parecem ter interações interfaciais mais eficientes com as membranas celulares. Estas informações permitem sugerir que as superfícies das nanopartículas, bem como seus tamanhos, podem ser alterados de forma a favorecer a interação das partículas com as células cancerígenas.

Konan et al [221] também demonstraram que o THPP encapsulado ou não em nanopartículas de PLGA foi internalizado na célula EMT-6, sendo que a intensidade de fluorescência medida nas células tratadas com o THPP encapsulado foi duas vezes maior comparado ao THPP não encapsulado. Entretanto, McCarthy et al. [217] relataram que a meso-tetrafenilporfirina (TPP)

(vide anexo) (mesma estrutura do InTPP mas sem o átomo de In no centro da estrutura) encapsulada em nanopartículas de PLGA não foram internalizadas em células de glioblastoma 9L, bem como, não causaram redução significativa da viabilidade celular. Eles justificaram o fato observado como decorrente da agregação do fotossensibilizador no interior da partícula já que a agregação reduz a formação de oxigênio singlete.

Ressalta-se que não há dúvidas que as fluorescências verdes observadas nas células LNCaP são oriundas do InTPP localizado nas células, uma vez que fluorescências similares não foram observadas quando o InTPP não foi incubado na cultura de células (Figura 41A e 41B). Entretanto, a fim de avaliar se o InTPP estava distribuído no interior da célula e não somente próximo a superfície, as células foram observadas através de cortes ópticos transversais de diferentes profundidades (Figura 42).

As micrografias das seções ópticas de uma célula LNCaP mostraram que as nanopartículas estão distribuídas no interior da célula, uma vez que a fluorescência persiste à medida que os cortes ópticos foram realizados em diferentes profundidades da célula. Pode-se observar também que esta distribuição não é homogênea já que a intensidade de fluorescência não é uniforme ao longo das seções ópticas. Além disso, observa-se uma diminuição da intensidade de fluorescência para regiões celulares mais profundas.

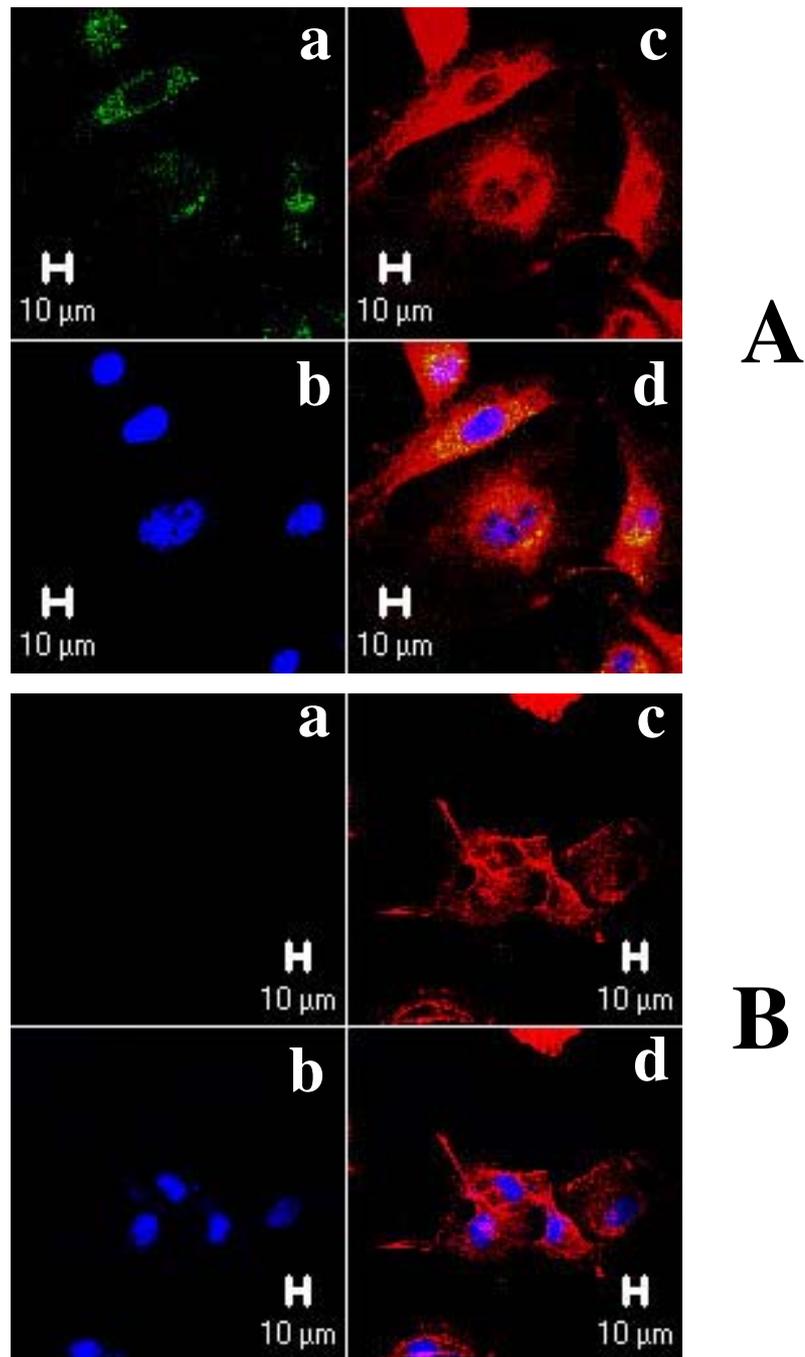


Figura 41 – Micrografia confocal de células LNCaP incubadas por 2 horas com (A) e (B) sem nanopartículas (Ensaio OE5N) contendo InTPP 1,8 $\mu\text{mol/L}$. (a) Micrografia associada a fluorescência do InTPP, (b) micrografia relacionada a fluorescência do DAPI que se liga ao DNA para marcação do núcleo, (c) micrografia relacionada a fluorescência da faloidina ligada a F-actina para marcação do citoesqueleto e (d) combinação das micrografias relacionadas a fluorescência dos três compostos fluorescentes (faloidina, DAPI e InTPP).

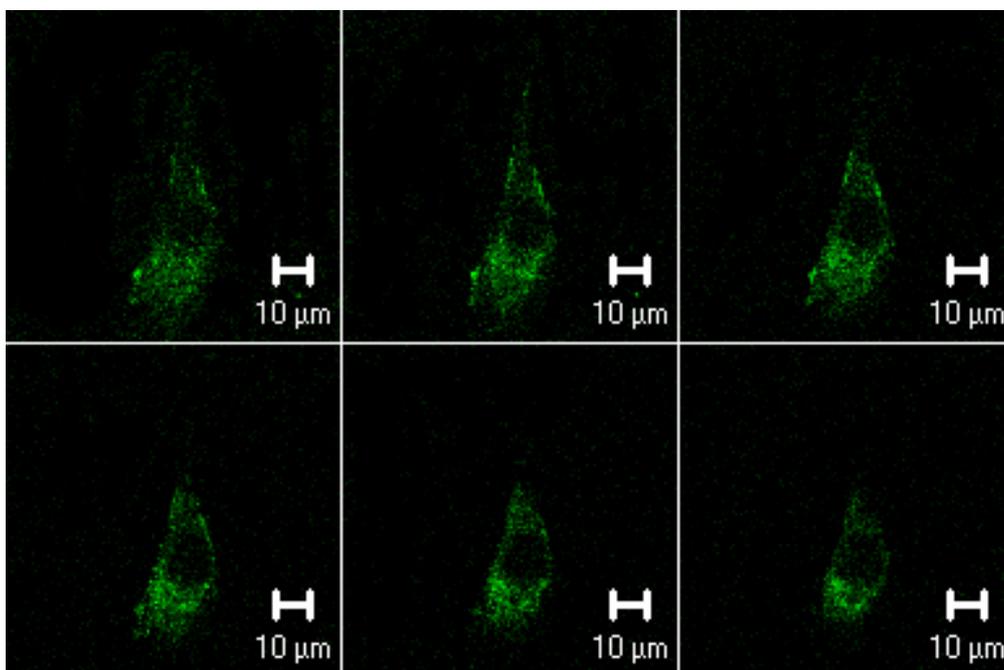


Figura 42 – Cortes ópticos transversais com aumento gradual de 0,48 μm de profundidade para uma célula LNCaP incubada por 2 horas com nanopartículas de PLGA contendo InTPP. Os cortes ópticos foram realizados do topo para baixo.

4.7 Avaliação da participação do oxigênio singlete na fotoxidação das células LNCaP

Embora os resultados acima mostrem que o InTPP encapsulado em nanopartículas de PLGA foi mais eficiente que o InTPP não encapsulado em reduzir a viabilidade de células de câncer de próstata, nada se pode afirmar sobre qual mecanismo (Tipo I ou II) está envolvido na morte celular observada. Para responder a questão, a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) foi utilizada para avaliar a participação do oxigênio singlete nas fotoxidações observadas das células LNCaP. Para este fim a 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (TEMP) foi utilizada para identificar a presença do oxigênio singlete já que o TEMP reage com o $^1\text{O}_2$ formando um radical nitróxido estável (2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona-N-oxil (TEMPO)) o qual é facilmente detectável por EPR (Figura 43) [152].

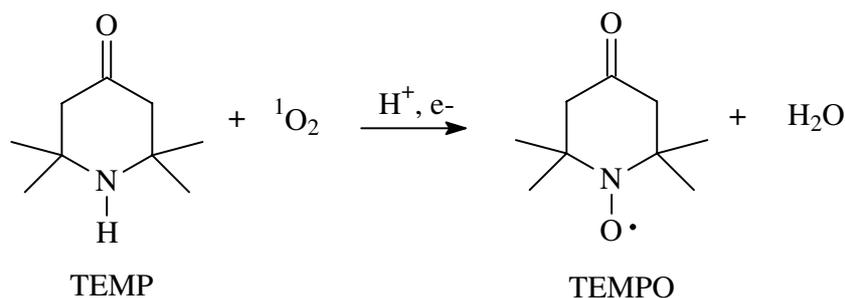


Figura 43 – Reação do oxigênio singlete com o TEMP gerando o radical nitróxido TEMPO.

A irradiação do meio de cultura RPMI 1640 à temperatura ambiente (24 °C), através da mesma lâmpada de mercúrio usada na irradiação das células LNCaP, como descrito no item 3.9, e na presença de InTPP (1,8 μmol/L) encapsulado em nanopartículas de PLGA e 23 mmol/L TEMP, levou a geração de um sinal de EPR na forma de um triplete o qual é característico do radical nitróxido (TEMPO) (Figura 44A). A intensidade do sinal de EPR aumentou gradativamente com o tempo de irradiação, sugerindo que à medida que a solução foi irradiada moléculas de oxigênio singlete foram geradas levando ao aumento progressivo do sinal do radical nitróxido. Um pequeno sinal foi obtido antes da irradiação do TEMP devido a presença do TEMPO como impureza. Dessa forma, pode-se sugerir que as fotoxidações das células LNCaP envolveu a participação do oxigênio singlete quando o InTPP encapsulado em nanopartículas de PLGA foi utilizado.

Bachor et al. [219] também mostraram a participação do oxigênio singlete na fotoxidação de células de câncer de bexiga (MGH-U1) usando-se clorina e₆ (vide anexo) encapsulada em microesferas de poliestireno (vide anexo). Estes resultados são interessantes, pois mostram que o polímero não age como uma barreira à interação do oxigênio molecular com o fotossensibilizador encapsulado.

Entretanto, resultados similares não foram observados quando o meio de cultura foi irradiado na presença de InTPP não encapsulado uma vez que a intensidade do sinal de EPR não foi alterada durante todo o período de irradiação (Figura 44B). Também não foram observadas mudanças na intensidade do sinal de EPR quando o meio de cultura foi irradiado na ausência do InTPP não

encapsulado (não mostrado). Ressalta-se que o sinal de EPR foi suprimido (não mostrado) quando maiores concentrações de InTPP (20 $\mu\text{mol/L}$) não encapsulado foram utilizadas.

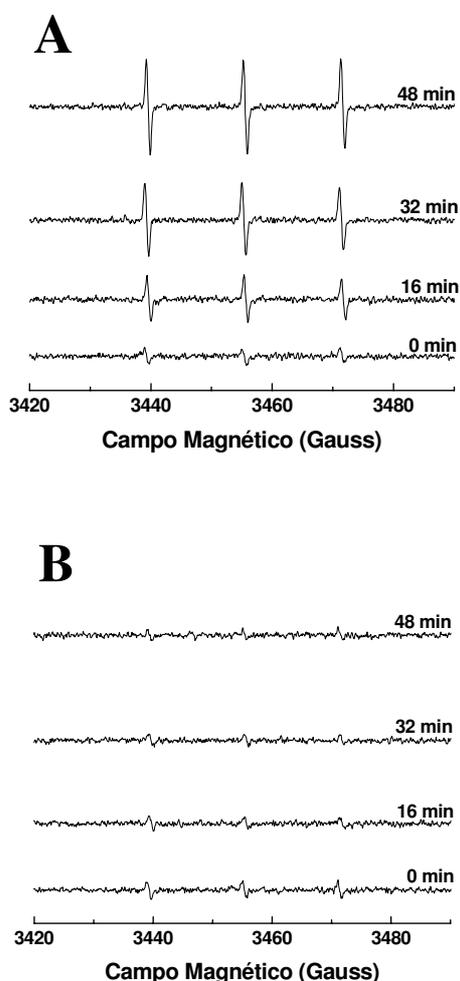


Figura 44 – Espectro de EPR do TEMPO gerado pela fotoxidação do 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (23 mmol/L) à temperatura ambiente (24 °C) usando uma lâmpada de mercúrio na presença de InTPP (1,8 $\mu\text{mol/L}$) (A) encapsulado e (B) não encapsulado em nanopartículas de PLGA. Os tempos de irradiação das soluções são indicados na figura.

Estes resultados poderiam sugerir que o oxigênio singlete não está participando do processo fototóxico observado para as células LNCaP quando incubadas com o InTPP não encapsulado. Espectros de absorvância e de fluorescência (Figura 45) do InTPP não encapsulado em RPMI 1640 foram então

obtidos para se avaliar a possibilidade da presença de agregados estarem influenciando a geração do oxigênio singlete.

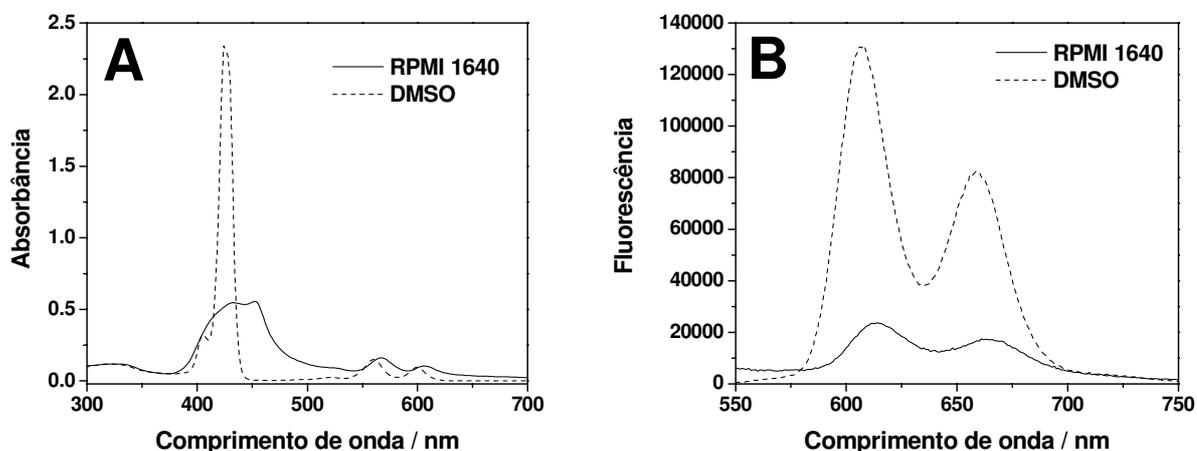


Figura 45 – Espectro de absorvância e de fluorescência do InTPP 7,7 $\mu\text{mol/L}$ não encapsulado no (A) meio de cultura RPMI 1640 e (B) em DMSO. O InTPP foi excitado no comprimento de onda 426 nm em ambas as soluções.

O espectro de absorvância do InTPP livre no RPMI 1640 comparado com o espectro obtido em DMSO indica que o fotossensibilizador encontra-se agregado no meio de cultura. Em RPMI a banda de Soret sofre um alargamento (400-500 nm), bem como uma redução na intensidade de absorvância comparado ao perfil espectral do InTPP em DMSO (Figura 45A). Redução significativa também foi observado na intensidade de fluorescência do InTPP no meio de cultura (Figura 45B). Estes resultados sugerem que a menor eficiência do InTPP não encapsulado em reduzir a viabilidade das células LNCaP pode estar associado ao caráter lipofílico do composto de índio, o qual tende a agregar em meio aquoso reduzindo a eficiência fotodinâmica sobre as células. A formação de agregados provoca a diminuição do tempo de vida da fluorescência e fosforescência da substância fotossensível em razão do aumento dos decaimentos não radiativos por conversão interna, tornando mais difícil a transferência de energia do fotossensibilizador do estado triplete excitado para o $^3\text{O}_2$, o que diminui a eficiência do fotossensibilizador [68,69].

Udal'tsov et al. [224] estudaram a agregação da meso-tetrafenilporfirina (TPP), através de técnicas fluorimétricas e microscopia eletrônica de varredura. Os pesquisadores mostraram que dímeros de TPP não se formam em condições usuais pelas interações π - π entre os anéis pirrólicos, responsáveis pela formação de agregados tipo H (também conhecida como face-a-face), devido à rotação dos anéis fenílicos que dificulta a aproximação das moléculas. Estes pesquisadores observaram a formação de agregados de TPP, em soluções aquosas (pH ácido) contendo 7% (v:v) de solvente orgânico (tetrahidrofurano), devido ao balanço entre as interações hidrofóbicas entre os anéis fenílicos do TPP e as interações entre moléculas de água com os anéis pirrólicos do mesmo composto (via ligação de hidrogênio) [224]. Embora nos experimentos com células LNCaP o pH tenha sido mantido em 7,2, é possível que a presença de inúmeras substâncias (aminoácidos, vitaminas e antibióticos) no meio RPMI 1640 favoreça as interações entre os anéis fenílicos devido a redução na rotação destes grupos levando a formação de agregados de InTPP similares as observadas por Udal'tsov. A maior eficiência do InTPP encapsulado comparado ao composto livre sugere que a encapsulação em nanopartículas de PLGA pode favorecer a solubilização do composto na matriz polimérica em estado não agregado. Resultados semelhantes foram obtidos por Pegaz et al. [122] na avaliação da eficiência fototrombica da meso-tetrafenilporfirina (derivado porfirínico com mesma estrutura que o InTPP mas sem o metal central) (vide anexo) livre ou encapsulada sobre membranas corioalantóides. Ressalta-se que McCarthy et al. [217] sugeriram que a presença de TPP em estado agregado no interior de nanopartículas de PLGA seria a causa da ausência de atividade fotodinâmica sobre culturas de células de melanoma e glioblastoma, fato que sugere que o InTPP encapsulado em partículas de PLGA não se encontra agregado. Este resultado é consistente com a eficiência fotodinâmica apresentada pelo InTPP encapsulado em nanopartículas durante a fotoxidação de células LNCaP, bem como, com as análises da distribuição do InTPP nas partículas poliméricas obtidas por microscopia confocal.

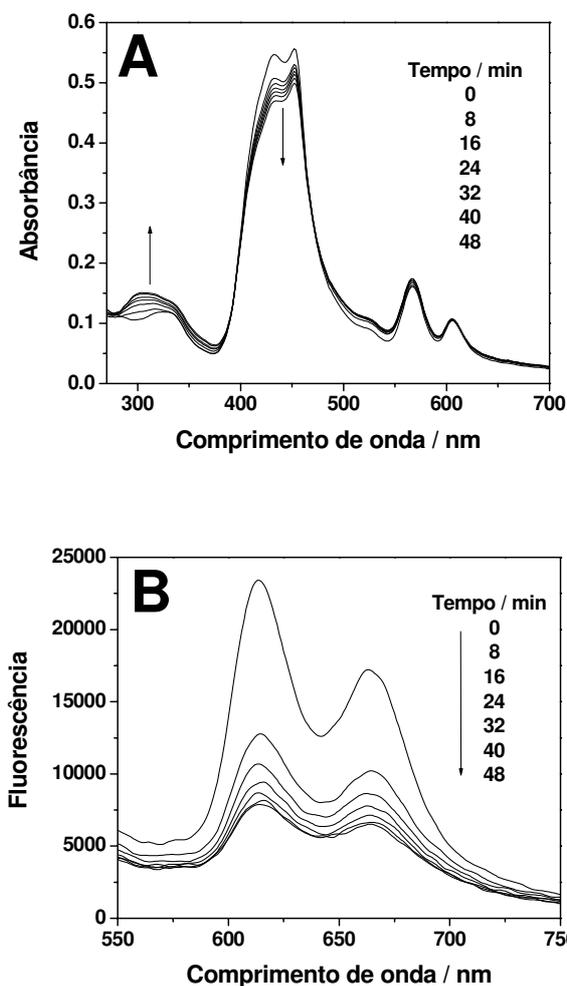


Figura 46 – Monitoramento dos espectros de absorvância e fluorescência do InTPP não encapsulado (7,7 $\mu\text{mol/L}$) em meio de cultura RPMI 1640 e 0,18% de DMSO durante irradiação com lâmpada de mercúrio.

Embora os resultados de EPR (Figura 44B) indiquem que o estado agregado do InTPP livre no RPMI 1640 não seja eficiente em gerar oxigênio singlete, ainda assim, reduções da viabilidade celular foram observadas e as mesmas parecem aumentar com o tempo de irradiação (Figura 38), sugerindo que um outro mecanismo (via radicalar) poderia estar associado aos resultados observados na fotoxidação das células LNCaP. Para avaliar se uma possível fotodegradação do InTPP estaria associada ao resultado negativo do experimento de EPR na presença de InTPP livre, soluções de RPMI 1640 contendo InTPP não

encapsulado foram irradiadas (Figura 46) e os espectros de absorvância e de fluorescência do InTPP monitorados.

Os resultados (Figura 46) mostraram que a intensidade da banda de Soret (400-500 nm) do InTPP livre diminuiu, assim como, a intensidade de fluorescência durante o período em que a solução foi irradiada. Estes resultados sugerem que o InTPP em solução deve estar sofrendo fotodegradação já que as intensidades de absorvância e de fluorescência do InTPP foram reduzidas durante o período de irradiação. Pode-se observar também um aumento da intensidade de absorvância na região de 300 nm com o tempo de irradiação, fato que pode ser associado a geração de subprodutos da fotodegradação.

Estudos sobre o fotobranqueamento da meso-tetrafenilporfirina, realizados por Cavaleiro et al [225], utilizando-se as técnicas de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa, determinaram que o fotobranqueamento da meso-tetrafenilporfirina (substância com mesma estrutura do InTPP, apenas sem o átomo de índio no centro da estrutura) ocorre essencialmente com o mesmo mecanismo da octaetilporfirina, complexos de clorinas e derivados de bacterioclorofilas (vide anexo), envolvendo a adição do oxigênio singlete ao anel porfirínico, provocando a sua quebra. Sabe-se que o RPMI 1640 é uma mistura de sais enriquecidos com os 20 aminoácidos padrões, vitaminas, glicose e glutatona. Também é de conhecimento que o oxigênio singlete reage com aminoácidos, lipídios, ácidos graxos, bem como, com vitaminas [44,226]. Dessa forma, como o RPMI 1640 apresenta em sua composição substâncias que são passíveis de reagirem com o oxigênio singlete, é possível que haja redução da eficiência do InTPP livre em causar a morte das células LNCaP.

Como o InTPP encontra-se agregado no meio de cultura, a geração de oxigênio singlete é reduzida. Associado ao fato de alguns componentes do RPMI 1640 poderem atuar como substratos em reações com o oxigênio singlete, não foi possível visualizar o sinal do radical nitróxido no experimento de EPR usando InTPP livre. A supressão do sinal do radical nitróxido após irradiação do meio de cultura na presença de concentrações maiores de InTPP livre pode ter sido causada pelos subprodutos oriundos da fotoxidação dos componentes do RPMI

ou da fotodegradação do InTPP. Portanto, o aumento do sinal de EPR pertencente ao radical nitróxido, quando soluções do TEMP foram fotooxidadas na presença de InTPP encapsulado, sugere que a porfirina encapsulada não sofreu fotodegradação significativa a ponto de influenciar no sinal do radical nitróxido.

Diante do fato de que os componentes do RPMI podem atuar como supressores do oxigênio singlete gerado pelo InTPP, também é esperado que a fotodegradação do InTPP seja menos intensa no meio de cultura. Para confirmar esta hipótese, experimentos de fotodegradação foram realizadas nas mesmas condições da figura 46, mas com a exceção do solvente utilizado onde o RPMI 1640 foi substituído por água (figura 47).

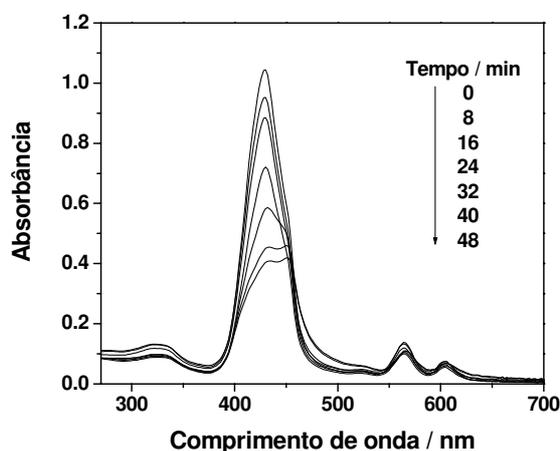


Figura 47 – Monitoramento dos espectros de absorvância do InTPP não encapsulado ($7,7 \mu\text{mol/L}$) em água e 0,18% de DMSO durante irradiação com lâmpada de mercúrio.

Comparando-se os espectros do InTPP livre em RPMI 1640 (Figura 46A) e em água (Figura 47) no tempo zero minutos de irradiação, pode-se verificar que a banda de Soret (400-500 nm) apresentou maior intensidade e um alargamento menos pronunciado em água sugerindo que o InTPP encontra-se menos agregado em água do que no meio de cultura. Isto é confirmado observando-se a queda mais acentuada da intensidade da absorvância do InTPP em água do que em RPMI uma vez que é de conhecimento que a fotodegradação tende a ser maior quanto menor o estado de agregação do fotossensibilizador [227].

Pode-se também observar que a fotodegradação do InTPP em água não gerou um pico em 300 nm como foi observado na fotoxidação usando o RPMI 1640 como solvente. Estes resultados sugerem que o pico em 300 nm observados na fotodegradação do InTPP em RPMI está associado a subprodutos de degradação de componentes do meio de cultura oriundos da reação com o oxigênio singlete ou com subprodutos do InTPP fotodegradado. Ressalta-se que caso estes subprodutos sejam citotóxicos, eles poderiam estar competindo com oxigênio singlete na redução da viabilidade das células LNCaP.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu uma série de conclusões referentes ao preparo, caracterização e avaliação de nanopartículas de PLGA contendo InTPP para serem aplicadas a PDT, conforme abaixo:

- formulações iniciais de partículas poliméricas preparadas com baixa agitação mecânica levaram à obtenção de micropartículas caracterizadas com diâmetros médios muito superiores aos indicados para aplicação intravenosa.

- o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} se mostrou satisfatório em estimar os efeitos da velocidade de agitação, da porcentagem de PVA, porcentagem de etanol na fase orgânica e aquosa sobre 6 propriedades importantes que caracterizam as partículas poliméricas através de um número reduzido de ensaios:

- o aumento de todos os fatores estudados causou a diminuição do tamanho das partículas, sendo a porcentagem de etanol na fase aquosa e a velocidade de agitação os responsáveis pelas maiores reduções. Ressalta-se que o monitoramento do tamanho das partículas pode ser realizado de forma bastante simples através da área integrada do espectro de absorbância da suspensão coloidal.

- dentre os fatores estudados, o aumento da porcentagem de PVA e de etanol na fase aquosa causou a elevação da porcentagem média de InTPP encapsulado em partículas de PLGA. Entretanto, aproximações permitiram estimar que um efeito combinado de ambos os fatores acima causa a diminuição na

eficiência de encapsulamento devido favorecerem a solubilização do InTPP em fase aquosa.

➤ o planejamento fatorial revelou que o aumento da velocidade e das porcentagens de etanol nas fases orgânica e aquosa causou a redução da porcentagem de partículas recuperadas após as etapas de lavagem e liofilização. Aproximações não puderam ser feitas para se concluir sobre o significado dos contrastes de interação que causaram uma redução significativa da porcentagem de recuperação das partículas em razão da maioria dos fatores estudados influenciarem na recuperação. Os resultados mostraram que quanto menor o diâmetro das partículas menor também se torna a porcentagem de recuperação, fato que está associado à rotação e ao tempo de centrifugação usados nas etapas de lavagens.

➤ somente o aumento da velocidade de agitação causou uma diminuição do valor negativo do potencial zeta. O potencial negativo tende a diminuir com a redução do tamanho das partículas devido maior acúmulo de PVA residual sobre a superfície das nanoesferas. O valor negativo é devido a presença dos grupos carboxílicos localizados nas cadeias do PLGA.

➤ o aumento da porcentagem de etanol na fase aquosa e da velocidade de agitação elevou a porcentagem de PVA residual presente na superfície das nanoesferas, sendo que os valores obtidos estão bem abaixo dos relatados por outros pesquisadores.

➤ o aumento da velocidade de agitação e da porcentagem de etanol na fase aquosa causou uma diminuição da concentração de clorofórmio residual, a qual está milhares de vezes abaixo do limite estabelecido pela USP 28 (60 ppm). Entretanto, o planejamento mostrou que o efeito combinado de ambos os fatores é responsável por aumentar a concentração residual do solvente orgânico nas partículas de PLGA.

- operações evolucionárias realizadas através da variação da porcentagem de etanol na fase orgânica ou da velocidade de agitação permitiram otimizar o tamanho das partículas com diâmetros médios inferiores a 200 nm e de relativa homogeneidade. As etapas de lavagem mostraram-se importantes para

diminuir o PVA residual, entretanto, tal diminuição leva a redução da estabilidade coloidal a qual parece ser dependente da barreira estérica criado pelo PVA ancorado ou adsorvido na superfície da partícula.

- este trabalho permitiu o desenvolvimento de uma nova técnica de monitoramento *in situ* da liberação do fármaco encapsulado em partículas poliméricas, usando técnicas espectrofotométricas. O processo de liberação do InTPP se caracterizou como bifásico, onde os modelos matemáticos sugerem que a liberação do InTPP oriundo das nanoesferas se dá por difusão, enquanto que o oriundo das microesferas parece ser caracterizado pela combinação de vários perfis de liberação oriundos de microesferas de tamanho variado. Análises de microscopia confocal mostraram que a distribuição do InTPP é relativamente homogênea dentro da micropartícula, permitindo concluir que a falta de ajuste dos modelos de difusão e de dissolução referente à liberação do InTPP de micropartículas não está associada à distribuição irregular ou à presença de cristais do InTPP dentro das micropartículas de PLGA.

- os experimentos de fotoxidação de células de LNCaP revelaram que o InTPP encapsulado em nanopartículas de PLGA foi mais eficiente em reduzir a viabilidade celular comparado ao fotossensibilizador não encapsulado. A citotoxicidade no escuro e a eficiência fotodinâmica do InTPP encapsulado mostraram-se dependentes do tempo de incubação e da dose do composto. Além disso, a eficiência fotodinâmica também foi dependente do tempo de irradiação das culturas celulares. Já o InTPP livre não apresentou citotoxicidade no escuro, mas a redução da viabilidade celular mostrou-se dependente da concentração utilizada de InTPP livre e do tempo de irradiação.

- análises realizadas por microscopia confocal revelaram que o InTPP encapsulado foi mais internalizado nas células LNCaP do que o InTPP livre, sendo que ambos se localizaram na região perinuclear. Este fato pode ter levado a maior eficiência fotodinâmica do InTPP encapsulado em reduzir a viabilidade das células cancerígenas. Além disso, o InTPP livre se apresenta em estado agregado no meio RPMI 1640 o que também influencia a capacidade do InTPP em gerar o oxigênio singlete.

- experimentos de EPR mostraram que o InTPP produz oxigênio singlete quando encapsulado em nanopartículas de PLGA, indicando que o fotossensibilizador deva estar dentro da matriz polimérica num estado não agregado. Resultados similares não foram observados para o InTPP livre devido os constituintes do meio RPMI 1640 serem alvos de ataque do oxigênio singlete, além do InTPP livre sofrer fotodegradação durante o tempo irradiação. Os fotoprodutos gerados no processo de fotodegradação podem estar causando a redução da viabilidade celular em conjunto com as moléculas de oxigênio singlete.

Os resultados deste trabalho indicam que o InTPP encapsulado em nanopartículas de PLGA 50:50, com diâmetros médios inferiores a 200 nm, pode ser um fotossensibilizador a ser aplicado em estudos pré-clínicos da terapia fotodinâmica.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- [1] http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=1793 (acessado em 30/12/06)
- [2] http://www.inca.gov.br/situacao/arquivos/ocorrencia_magnitude_cancer_brasil.pdf (acessado em 30/12/06)
- [3] M.R. Miglarese, R.O. Carlson (2006) Development of new câncer therapeutic agents targeting mitosis. *Expert Opin. Investig. Drugs* **15**, 1411-1425.
- [4] J.G. Franklin, M.D. Paus, A. Pluetschow (2005) Chemotherapy, radiotherapy and combined modality for Hodgkin's disease, with emphasis on second cancer risk. *Cochrane database of systematic reviews* **4**, CD003187.
- [5] P. Dubsy, M. Gnant (2006) The endocrine origin and different characters of breast cancers – Recent research on hormone and endocrine treatment. *Breast Care* **1**, 124-128.
- [6] Y. Becker (2006) Molecular immunological approaches to biotherapy of human cancers – A review, hypothesis and implications. *Anticancer Res.* **26**, 1113-1134.
- [7] D.N. Church, A. Bahl (2006) Clinical review-small cell carcinoma of the bladder. *Cancer Treat. Rev.* **32**, 588-593.
- [8] B. Sadeghi, C. Arvieux, O. Glehen, A.C. Beaujard, M. Rivoire, J. Baulieux, E. Fontaumard, A. Brachet, J.L. Caillot, J.L. Faure, J. Porcheron, J.L. Peix, Y. François, J. Vignal, F.N. Gilly (2000) Peritoneal carcinomatosis from nongynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer* **88**, 358-363.
- [9] H. Wilke, P. Preusser, U. Fink, U. Gunzer, H.J. Meyer, J. Meyer, J.R. Siewert, W. Achterrath, L. Lenaz, H. Knipp (1989) Preoperative

- chemotherapy in locally advanced and nonresectable gastric cancer: a phase II study with etoposide, doxorubicin, and cisplatin. *J. Clin. Oncol.* **7**, 1318-1326.
- [10] Y. Yonemura, Y. Endo, T. Obata, T. Sasaki (2007) Recent advances in the treatment of peritoneal dissemination of gastrointestinal cancers by nucleoside antimetabolites. *Cancer Sci.* **98**,11-18.
- [11] J.D. Spikes (1985) The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in health sciences, in: R. Bergasson, G. Jori, E.J. Land, T.G. Truscott (Ed.), Primary photoprocesses in biology and medicine, New York, Plenum Press, 209-227.
- [12] A. Juzeniene, K.P. Nielsen, J. Moan (2006) Biophysical Aspects of Photodynamic Therapy. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology* **25**, 7-28.
- [13] J.F. Cauvin (1815) Des bienfaits de l'insolation, these de doutorado, Universidade de Paris, França.
- [14] O. Raab (1900) Über die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusorien. *Z. Biol.* **39**, 524-546.
- [15] H. von Tappeiner, A. Jesionek (1903) Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden stoffen. *Muench Med. Wochenschr* **47**, 2042-2044.
- [16] H.A. von Tappeiner, A. Jodlbauer (1907) Die sensibilisierende wirkung fluoreszierender substanzen: Gesam melte untersuchugen über die photodynamische erscheinung. Leipzig, Germany, F.C.W. Vogel, p.1-210.
- [17] W. Hausmann (1911) Die senibilisierende wirkung des hematoporphyrins. *Biochem. Z.* **30**, 276-316.
- [18] F. Meyer-Betz (1913) Untersuchungen über die biologische (photodynamische) wirkung des hamatopotphyrins und anderer derivative des blut- und galenfarbstoffs. *Dtsch. Arch. Klin. Med.* **112**, 476-503.
- [19] A. Policard (1924) Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood, *C. R. Soc. Biol.* **91**,1423-1428.
- [20] J. Korbier (1931) Untersuchung von krebsgewebe im fluoreszenerregenden licht. *Strahlentherapie* **41**, 510-518.
- [21] H. Auler, G. Banzer (1942) Untersuchungen über die rolle der porphyrine bei geschwulstkranken menschen und tieren. *Z. Krebsforsch* **53**, 65-68.
- [22] R.L. Lipson, M.J. Gray, E.J. Baldes (1966) Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Ninth Internat. Cancer Congr.*, Tokyo, Japan, p. 393.
- [23] J.F. Kelly, M.E. Snell (1976) Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J. Urol.* **115**, 150-151.
- [24] T.J. Dougherty, G.B. Grindey, R. Fiel, K.R. Weishaupt, D.G. Boyle (1975) Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 115–121.
- [25] M. Triesscheijn, P. Baas, J.H.M. Schellens, F.A. Stewart (2006) Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist* **11**, 1034-1044.

- [26] Y.G. Qiang, X.P. Zhang, J. Li, Z. Huang (2006) Photodynamic therapy for malignant and non-malignant diseases: clinical investigation and application. *Chin. Med. J.* **119**, 845-857.
- [27] E.L. Clennan (2000) New mechanistic and synthetic aspects of singlet oxygen chemistry. *Tetrahedron* **56**, 9151-9179.
- [28] R. Gerdes, O. Bartels, G. Schneider, D. Wöhrle, G. Schulz-Ekloff (2001) Photooxidations of phenol, cyclopentadiene and citronellol with photosensitizers ionically bound at a polymeric ion exchanger. *Polym. Advan. Technol.* **12**, 152-160.
- [29] P. Esser, B. Pohlmann, H.D. Scharf (1994) The photochemical-synthesis of fine chemicals with sunlight. *Angew. Chem. Int. Edit.* **33**, 2009-2023.
- [30] W.M. Sharman, C.M. Allen, J.E. van Lier (1999) Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov. Today* **4**, 507-517
- [31] T. Ben Amor, G. Jori (2000) Sunlight-activated insecticides: historical background and mechanisms of phototoxic activity. *Insect Biochem. Molec.* **30**, 915-925.
- [32] Y.N. Konan, R. Gurny, E. Allemann (2002) State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **66**, 89-106.
- [33] S. Michels, S.; U. Schmidt-Erfurth (2003) Sequence of early vascular events after photodynamic therapy. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* **44**, 2147-2154.
- [34] F.I. Simplicio, F. Maionchi, N. Hioka (2002) Photodynamic therapy: pharmacological aspects, applications and news from medications development. *Quím. Nova* **25**, 801-807.
- [35] L.V. Via, S.M. Magno (2001) Photochemotherapy in the treatment of cancer. *Curr. Med. Chem.* **8**, 1405-1428.
- [36] G. Jori. (1989) Transporte and tissue delivery of photosensitizers. Em: CIBA Foundation Symposium 146 (Ed): Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use. Wiley and Sons, Chichester, p. 78-94.
- [37] S.S. Stylli, A.H. Kaye (2006) Photodynamic therapy of cerebral glioma – A review. Part I – A biological basis. *J. Clin. Neurosci.* **13**, 615-625.
- [38] A.E.H. Machado (2000) Photodynamic therapy: principles, potential of application and perspectives. *Quim. Nova* **23**, 237-243
- [39] R.B. Ostler, A.D. Scully, A.G. Taylor, I.R. Gould, T.A. Smith, A. Waite, D. Phillips (2000) The effect of pH on the photophysics and photochemistry of di-sulphonated aluminum phthalocyanine. *Photochem. Photobiol.* **71**, 397-404.
- [40] W.M. Sharman, C.M. Allen, J.E. van Lier (2000) Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol.* **319**, 376-400.
- [41] A. Gorman, J. Killoran, C. O'Shea, T. Kenna, W.M. Gallagher, D.F. O'Shea (2004) In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10619-10631.
- [42] N.L. Oleinick, R.L. Morris, I. Belichenko (2002) The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 1-21.

- [43] C.F. Van Nostrum (2004) Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **56**, 9-16.
- [44] R. Bonnett (1995) Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* **24**, 19-33.
- [45] M. Ochsner (1997) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **39**, 1-18.
- [46] C.H. Sibata, V.C. Colussi, N.L. Oleinick, T.J. Kinsella (2000) Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**, 869-880.
- [47] R. Schmidt, M. Dodeschein (1994) Time-resolved measurement of $O_2 (^1\Sigma_g^+)$ in solution – phosphorescence from an upper excited-state. *J. Phys. Chem.* **98**, 2874-2876.
- [48] I. Bronshtein, S. Aulova, A. Juzeniene, V. Iani, L.W. Ma, K.M. Smith, Z. Malik, J. Moan, B. Ehrenberg (2006) In vitro and in vivo photosensitization by protoporphyrins possessing different lipophilicities and vertical localization in the membrane. *Photochem. Photobiol.* **82**, 1319-1325.
- [49] R. Luguya, T.J. Jensen, K.M. Smith, M.G.H. Vicente (2006) Synthesis and cellular studies of a carboranylchlorin for the PDT and BNCT of tumors. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 5890-5897.
- [50] Z.Y. Ji, G.R. Yang, V. Vasovic, B. Cunderlikova, Z.H. Suo, J.M. Nesland, Q. Peng (2006) Subcellular localization pattern of protoporphyrin IX is an important determinant for human carcinoma its photodynamic efficiency of and normal cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **84**, 213-220.
- [51] J. Moan, K. Berg, J.C. Bommer, A. Western (1992) Action spectra of phthalocyanines with respect to photosensitization of cells. *Photochem. Photobiol.* **56**, 171-175.
- [52] J.S. Nelson, C.H. Sun, M.W. Berns (1986) Study of the in vivo and in vitro photosensitizing capabilities of uroporphyrin I compared to Photofrin II. *Lasers Surg. Med.* **6**, 131-136.
- [53] A. Ruck, T. Kollner, A. Dietrich, W. Strauss, H. Schneckenburger (1992) Fluorescence formation during photodynamic therapy in the nucleus of cells incubated with cationic and anionic water-soluble photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **12**, 403-412.
- [54] C.J.G. de Almeida, R. Linden (2005) Phagocytosis of apoptotic cells: a matter of balance. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1532-1546.
- [55] I.J. MacDonald, T.J. Dougherty (2001) Basic principles of photodynamic. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **5**, 105-129.
- [56] K. Plaetzer, T. Kiesslich, C.B. Oberdanner, B. Krammer (2005) Apoptosis following photodynamic tumor therapy: induction, mechanism and detection. *Curr. Pharm. Design* **11**, 1151-1165.
- [57] X. Ding, Q. Xu, F. Liu, P. Zhou, Y. Gu, J. Zeng, J. Na, W. Daí, X. Li (2004) Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation. *Cancer Lett.* **216**, 43-54.
- [58] M. Geze, P. Morliere, J.C. Maziere, K.M. Smith, R. Santus (1993) Lysosomes, a key target of hydrophobic photosensitizers proposed for

- photochemotherapeutic applications. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **20**, 23-35.
- [59] J. Moan, K. Berg, H. Anholt, K. Madslien (1994) Sulfonated aluminium phthalocyanines as sensitizers for photochemotherapy. Effects of small light doses on localization, dye fluorescence and photosensitivity in V79 cells. *Int. J. Cancer* **58**, 865-870.
- [60] A.P. Castano, P. Mroz, M.R. Hamblin (2006) Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 535-545.
- [61] S.O. Gollnick, X. Liu, B. Owczarczak, D.A. Musser, B.W. Henderson (1997) Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo. *Cancer Res.* **57**, 3904-3909.
- [62] D.A. Bellnier (1991) Potentiation of photodynamic therapy in mice with recombinant human tumor necrosis factor-alpha. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **8**, 203-210.
- [63] M. Mitsuhashi, J.G. Liu, S.J. Cao, X.Y. Shi, X.J. Mat (2004) Regulation of interleukin-12 gene expression and its anti-tumor activities by prostaglandin E2 derived from mammary carcinomas. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 322-332.
- [64] J.C.M. Bremner, S.R. Wood, J.K. Bradley, J. Griffiths, G.E. Adams, S.B. Brown (1999) P-31 magnetic resonance spectroscopy as a predictor of efficacy in photodynamic therapy using differently charged zinc phthalocyanines. *Brit. J. Cancer* **81**, 616-621.
- [65] E.F.G. Dickson, R.L. Goyan, R.H. Pottier (2003) New Directions in Photodynamic Therapy. *Cell. Mol. Biol.* **48**, 939-954.
- [66] B. Chen, B.W. Pogue, P.J. Hoopes, T. Hasan (2006) Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **16**, 279-305.
- [67] E.S. Nyman, P.H. Hynninen (2004) Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **73**, 1-28
- [68] A.M. Crouch, C.H. Langford (1990) Photophysical behavior of zinc tetraphenylporphyrins in solutions and polymer-films. *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* **52**, 55-64.
- [69] D.A. Fernández, J. Awruch, L.E. Dicalio (1996) Photophysical and aggregation studies of t-butyl-substituted Zn phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* **63**, 784-792.
- [70] D. Brault, C. Vever-Bizet, T. Le Doan (1986) Spectrofluorimetric study of porphyrin incorporation into membrane models – evidence for pH effects. *BBA-Biomembranes* **857**, 238-250.
- [71] A.M. Braun, M.T. Maurette, E. Oliveros (1991) Photochemical Technology, 1st Edition, John Wiley & Sons, p. 457-463.
- [72] M.W. Wiedmann, K. Caca (2004) General principles of photodynamic therapy (PDT) and gastrointestinal applications. *Curr. Pharm. Biotech.* **5**, 397-408.
- [73] S.B. Brown, E.A. Brown, I. Walker (2004) The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* **5**, 497-508.

- [74] S. Banfi, E. Caruso, S. Caprioli, L. Mazzagatti, G. Canti, R. Ravizza, M. Gariboldi, E. Monti (2004) Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 4853-4860.
- [75] Y.H. Chen, G.L. Li, R.K. Pandey (2004) Synthesis of bacteriochlorins and their potential utility in photodynamic therapy (PDT). *Curr. Org. Chem.* **8**, 1105-1134.
- [76] R.K. Pandey, A.B. Sumlin, S. Constantine, M. Aoudia, W.R. Potter, D.A. Bellnier, B.W. Henderson, M.A. Rodgers, K.M. Smith, T.J. Dougherty (1996) Alkyl ether analogs of chlorophyll-a derivatives: Part 1. Synthesis, photophysical properties and photodynamic efficacy. *Photochem. Photobiol.* **64**, 194-204.
- [77] A. Wiehe, Y.M. Shaker, J.C. Brandt, S. Mebs, M.O. Senge (2005) Lead structures for applications in photodynamic therapy. Part 1: Synthesis and variation of *m*-THPC (Temoporfin) related amphiphilic A₂BC-type porphyrins. *Tetrahedron* **61**, 5535-5564.
- [78] F. Rancan, A. Wiehe, M. Nobel, M.O. Senge, S. Al Omari, F. Bohm, M. John, B. Roder (2005) Influence of substitutions on asymmetric dihydroxychlorins with regard to intracellular uptake, subcellular localization and photosensitization of Jurkat cells. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **78**, 17-28
- [79] U. Schmidt-Erfurth, H. Diddens, R. Birngruber, T. Hasan (1997) Photodynamic targeting of human retinoblastoma cells using covalent low-density lipoprotein conjugates. *Br. J. Cancer* **75**, 54-61.
- [80] P.G. Cavanaugh (2002) Synthesis of chlorin e6-transferrin and demonstration of its light-dependent in vitro breast cancer cell killing ability. *Breast Cancer Res. Treat.* **72**, 117-130.
- [81] R. Schneider, F. Schmitt, C. Frochot, Y. Fort, N. Lourette, F. Guillemin, J.F. Muller, M. Barberi-Heyob (2005) Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 2799-808.
- [82] M.C. DeRosa, R.J. Crutchley (2002) Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.* **233-234**, 351-371.
- [83] M.C. Berenbaum, S.L. Akande, R. Bonnett, H. Kaur, S. Ioannou, R.D. White, U.J. Winfield (1986) Meso-tetra(hydroxyphenyl)-porphyrins, a new class of potent tumour photosensitizers with favourable selectivity. *Br. J. Cancer* **54**, 717-725.
- [84] F. Wilkison, W.P. Helman, A.B. Ross (1993) Quantum yields for the photosensitizing formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **22**, 113-265.
- [85] K. Berg, A. Western, J.C. Bommer, J. Moan (1990) Intracellular localization of sulfonated meso-tetraphenylporphyrin in a human carcinoma cell line. *Photochem. Photobiol.* **52**, 481-487.
- [86] I.A. Patito, C. Rothmann, Z. Malik (2001) Nuclear transport of photosensitizer during photosensitization and oxidative stress. *Biol. Cell* **93**, 285-291.
- [87] R.J. Riopelle, J.C. Kennedy (1982) Some aspects of porphyrin neurotoxicity in vitro. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **60**, 707-714.

- [88] A.F. Sima, J.C. Kennedy, D. Blakeslee, D.M. Robertson (1981) Experimental porphyric neuropathy: a preliminary report. *Can. J. Neurol. Science* **8**, 105-114.
- [89] E. Zenkevich, E. Sagun, V. Knyukshto, A. Shulga, A. Mironov, O. Efremova, R. Bonnett, S. P. Songca, M. Kassem (1996) Photophysical and photochemical properties of potential porphyrin and chlorin photosensitizers for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **33**, 171-180.
- [90] André Romero da Silva (2003) Dissertação de mestrado “Análise das Propriedades Fotossensibilizantes do In(III)-mesotetrafenilporfirina para uso em Terapia Fotodinâmica”, Instituto de Química, UNICAMP.
- [91] C. Cloutour, D. Ducassou, J.C. Pommier, L. Vuillemin (1982) Chloro ¹¹¹In Tetraphenylporphyrin and its possible clinical application. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **33**, 1311-1318.
- [92] J.G. McAfee, M.L. Thakur (1976) Survey of radioactive agents for in vitro labeling of phagocytic leukocytes.1. Soluble agents. *J. Nucl. Med.* **17**, 480-487.
- [93] M.V. Merrick, A.D. Nunn, M.L. Thakur, S.W. Gunasekera (1975) Influence of ligand on tissue distribution of carrier free ¹¹¹In in the rat. *Inter. J. Nucl. Med. Biol.* **2**, 45-48.
- [94] J.C. Koziar, D.O. Cowan (1978) Photochemical heavy-atom effects. *Accounts Chem. Res.* **11**, 334-341.
- [95] Y. Chen, X. Zheng, M.P. Dobhal, A. Gryshuk, J. Morgan, T.J. Dougherty, A. Oseroff, R.K. Pandey (2005) Methyl pyropheophorbide-a analogous: potential fluorescent probes for the peripheral-type benzodiazepine receptor. Effect of central metal in photosensitizing efficacy. *J. Med. Chem.* **48**, 3692-3695.
- [96] A. Rosenfeld, J. Morgan, L.N. Goswami, T. Ohulchanskyy, X. Zheng, P.N. Prasad, A. Oseroff, R.K. Pandey (2006) Photosensitizers derived from 13²-oxo-methyl pyropheophorbide-a: Enhanced effect of indium (III) as a central metal in vitro and in vivo photosensitizing efficacy. *Photochem. Photobiol.* **82**, 626-634.
- [97] Y.N. Konan, R. Cerny, J. Favet, M. Berton, R. Gurny, E. Allemann (2003) Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra (4-hydroxylphenyl)porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **55**, 115-124.
- [98] M.N. Sibata, A.C. Tedesco, J.M. Marchetti (2004) Photophysicals and photochemicals of zinc(II) phthalocyanine in long time circulating micelles for photodynamic therapy use. *Eur. J. Pharm. Sci.* **23**, 131-138.
- [99] N. Nishiyama, K. Kataoka (2006) Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacol. Ther.* **112**, 630-648.
- [100] D. Shenoy, S. Little, R. Langer, M. Amiji (2005) Poly(ethylene oxide)-modified poly(β -amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: Part 2. In vivo distribution and tumor localization studies. *Pharm. Res.* **22**, 2107-2114.

- [101] R.L. Juliano (1988) Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres and emulsions. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2**, 31-52.
- [102] R. Duncan (1997) Drug targeting: where are we now and where are we going? *J. Drug Targ.* **5**, 1-4.
- [103] H. Maeda (2001) The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **41**, 189-207.
- [104] S.K. Hobbs, W.L. Monsky, F. Yuan, W.G. Roberts, L. Griffiths, V.P. Torchilin, R.K. Jain (1998) Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4607-4612.
- [105] J. Kreuter, U. Tauber, V. Illi (1979) Distribution and elimination of poly(methyl-2-¹⁴C-methacrylate) nanoparticle radioactivity after injection in rats and mice. *J. Pharm. Sci.* **68**, 1443-1447.
- [106] P. Couvreur, C. Vauthier (2006) Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.* **23**, 1417-1450.
- [107] M.C. Woodle, D.D. Lasic (1992) Sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1113**, 171-199.
- [108] A.S.L. Derycke, P.A.M. de Witte (2004) Liposomes for photodynamic therapy. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **56**, 17-30.
- [109] M. Canete, A. Villanueva, V. Dominguez, S. Pólo, A. Juarranz, J.C. Stockert (1998) *Int. J. Oncol.* **13**, 497-504.
- [110] Y. Sadzuka, K. Tokutomi, F. Iwasaki, I. Sugiyama, T. Hirano, H. Konno, N. Oku, T. Sonobe (2006) The phototoxicity of photofrin was enhanced by PEGylated liposome in vitro. *Cancer Lett.* **241**, 1-7.
- [111] A.N. Gordon, J.T. Fleagle, D. Guthrie, D.E. Parkin, M.E. Gore, A.J. Lacave (2001) Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin vs. Topotecan. *J. Clin. Oncol.* **19**, 3312-3322.
- [112] A. Vargas, B. Pegaz, E. Debeve, Y. Konan-Kouakou, N. Lange, J.P. Ballini, H.V.D. Bergh, R. Gurny, F. Delie (2004) Improved photodynamic activity of porphyrin loaded into nanoparticles: an in vivo evaluation using chick embryos. *Int. J. Pharm.* **286**, 131-145
- [113] J. Taillefer, N. Brasseur, J.E. Van Lier, V. Lenearts, D. Le Garrec, J.C. Leroux (2001) In-vitro and in-vivo evaluation of pH-responsive polymeric micelles in a photodynamic cancer therapy model. *J. Pharm. Pharmacol.* **53**, 155-166.
- [114] R.F.V. Lopez, N. Lange, R. Guy, M.V.L.B. Bentley (2004) Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug of 5-ALA and its esters. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 77-94
- [115] E.R. Gillies, J.M.J. Frechet (2005) Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov. Today* **10**, 35-43.
- [116] S.H. Battah, C.E. Chee, H. Nakanishi, S. Gerscher, A.J. MacRobert, C. Edwards (2001) Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid-

- containing dendrimers for photodynamic therapy. *Bioconjugate Chem.* **12**, 980-988.
- [117] D.C. Hone, P.I. Walker, R. Evans-Gowing, S. FitzGerald, A. Beeby, I. Chambrier, M.J. Cook, D.A. Russell (2002) Generation of cytotoxic singlet oxygen via phthalocyanine-stabilized gold nanoparticles: a potential delivery vehicle for photodynamic therapy. *Langmuir* **18**, 2985-2987
- [118] I. Roy, T.Y. Ohulchanskyy, H.E. Pudavar, E.J. Bergey, A.R. Oseroff, J. Morgan, T.J. Dougherty, P.N. Prasad, (2003) Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7860-7865.
- [119] S.R. Schaffazick, S.S. Guterres, L.L. Freitas, A.R. Pohlmann (2003) Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova* **26**, 726-737.
- [120] S.S. Guterres, E.V. Benvenuti, A.R. Pohlmann (2006) Nanopartículas poliméricas para administração de fármacos, em: N. Duran, L.H.C. Mattoso, P.C. Morais (Ed.) Nanotecnologia. Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação, Artliber Editora S.A., São Carlos-SP, p. 161-166.
- [121] Y.N. Konan, M. Berton, R. Gurny, E. Allemann (2003) Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **18**, 241-249.
- [122] B. Pegaz, E. Debeve, F. Borle, J.P. Ballini, H. van den Bergh, Y.N.K. Konan (2005) Encapsulation of porphyrin and chlorins in biodegradable nanoparticles: The effect of dye lipophilicity on the extravasation and the photothrombic activity. A comparative study. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **80**, 19-27.
- [123] A.C. Tedesco (2006) Uso de dispositivos nano-estruturados no tratamento do câncer, em: N. Duran, L.H.C. Mattoso, P.C. Morais (Ed.) Nanotecnologia. Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação, Artliber Editora S.A., São Carlos-SP, p. 184-193.
- [124] M.I. Ré, M.F.A. Rodrigues (2006) Polímeros biodegradáveis, em: N. Duran, L.H.C. Mattoso, P.C. Morais (Ed.) Nanotecnologia. Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação, Artliber Editora S.A., São Carlos-SP, p. 149-159.
- [125] R. Chandra, R. Rustgi (1998) Biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.* **23**, 1273-1335.
- [126] D.H. Lewis (1990) Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers, in: M. Chasin, R. Langer (Ed.) Biodegradable polymers as drug delivery systems, Marcel Dekker Inc., New York, p. 1-41.
- [127] C.G. Pitt, M.M. Gratzel, G.L. Kimmel, J. Surlles, A. Schindler (1981) Aliphatic polyesters. 2. The degradation of poly(D,L-lactide), poly(ϵ -caprolactone) and their copolymers in vivo. *Biomaterials* **2**, 215-220.

- [128] D.K. Gilding, A.M. Reed (1979) Biodegradable polymers for use in surgery: poly(glycolic)/poly(lactic acid) homo- and copolymers: 1. *Polymer* **20**, 1459-1469.
- [129] H. Porte, G. Couarraze (1994) Microencapsulation processes for the manufacture of systems providing modified release of the active constituent, in: D. Chulia, M. Delail, Y. Pourcelot (Ed.) Powder technology and pharmaceutical processes, Elsevier Science, Amsterdam, p. 513-543.
- [130] J.D. Strobel, T.J. Laughin, F. Ostroy, M.D. Lilly, B.H. Perkins, R.L. Dunn (1987) Controlled-release systems for anticancer agents. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **14**, 261-262.
- [131] P. Rokkanen, O. Bostman, S. Vainionpaa, K. Vihtonen, P. Tormala, J. Laiho, J. Kilpikari, M. Tamminmaki (1985) Biodegradable implants in fractures of the ankle. *Lancet* **325**, 1422-1424.
- [132] S.J. Holland, B.J. Tighe, P.L. Gould (1986) Polymers for biodegradable medical devices, I. Potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. *J. Control. Release* **4**, 155-180.
- [133] W. Dong, R. Bodmeier (2006) Encapsulation of lipophilic drugs within enteric microparticles by a novel coacervation method. *Int. J. Pharm.* **326**, 128-138
- [134] U. Bilati, E. Allemann, E. Doelker (2005) Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **24**, 67-75
- [135] Y.N. Konan, R. Gurny, E. Allemann (2002) Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **233**, 239-252.
- [136] E. Ricci-Junior, J.M. Marchetti (2006) Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. *Int. J. Pharm.* **310**, 187-195.
- [137] S. Galindo-Rodriguez, E. Allemann, H. Fessi, E. Doelker (2004) Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm. Res.* **21**, 1428-1439.
- [138] K. Okuyama, I.W. Lenggono (2003) Preparation of nanoparticles via spray route. *Chem. Eng. Sci.* **58**, 537-547.
- [139] B. Wichert, P. Rohdewald (1990) A new method for the preparation of drug containing polylactic acid microparticles without using organic solvents. *J. Control. Release* **14**, 269-283.
- [140] E.F. Lucas, B.G. Soares, E. Monteiro (2001) Caracterização de Polímeros. Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica, 1^a Edição, E-papers Serviços Editoriais Ltda, Rio de Janeiro, p. 125-149.
- [141] J. Brandrup, E.H. Immergut, W. McDowell (1975) Polymer Handbook, 1st Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, p. IV-1 - IV-14.
- [142] H. Jeffery, S.S. Davis, D.T. O'Hagan (1991) The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles, I. Oil-in-water emulsion solvent evaporation. *Int. J. Pharm.* **77**, 169-175.
- [143] C.E. Hall (1953) Introduction to Electron Microscopy, McGraw-Hill Book Company, Inc., p. 312-318.

- [144] B. Singh, R. Kumar, N. Ahuja (2005) Optimizing drug delivery systems using systematic "design of experiments." Part I. Fundamnetal aspects. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **22**, 27-105.
- [145] T. Riley, T. Govender, S. Stolnik, C.D. Xiong, M.C. Garnett, L. Illum, S.S. Davis (1999) Colloidal stability and drug incorporation aspects of micellar-like PLA-PEG nanoparticles. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **16**, 147-159.
- [146] S.K. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha, V. Labhasetwar (2002) Residual alcohol associated with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J. Control. Release* **82**, 105-114.
- [147] Ana Maria de Oliveira (2005) Tese de Doutorado "Estudos preliminares e aplicações de microextração em fase sólida (SPME) combinada com cromatografia gasosa com detecção por emissão atômica", Instituto de Química, Unicamp, p. 40-43.
- [148] B.B. Neto, I.S. Scarminio, R.E. Bruns (2001) Como fazer experimentos, Editora da Unicamp, Campinas, p. 149-200.
- [149] G.D. Wasley, J.W. May (1970) Animal cell culture methods, Oxford, London.
- [150] Natália Mayumi Inada (2006) Tese de doutorado "Ação fotodinâmica de meso-porfirinas sobre função mitocondrial e viabilidade de células LNCaP", Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.
- [151] K.Y. Win, S.S. Feng (2005) effects of particle size and surface coating on celular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* **26**, 2713-2722.
- [152] Y. Lion, M. Delmelle, A. van de Vorst (1976) New method of detecting singlet oxygen production. *Nature* **263**, 442-443.
- [153] S.V. Canevarolo (2004) Cromatografia de exclusão por tamanho, em: S.V.Canevarolo (Ed.) Técnicas de Caracterização de Polímeros, 1ª Edição, ArtLiber Editora Ltda, São Carlos, p. 117-145.
- [154] J. Brandrup, E.H. Immergut, W. McDowell (1975) *Polymer Handbook*, 1st Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, p. IV-1 - IV-14.
- [155] H.Y. Kwon, J.Y. Lee, S.W. Choi, Y. Jang, J.H. Kim (2001) Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method. *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **182**, 123-130.
- [156] D. Quintanar-Guerreiro, H. Fessi, E. Allemann, E. Doelker (1996) Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticle by an emulsification-diffusion technique. *Int. J. Pharm.* **143**, 133-141.
- [157] L. Ke'na, M.A. Chunqi, L. Ying, Z. Fenglin, T. Shenyang (2000) Rayleigh light scattering and its applications to biochemical analysis. *Chin. Sci. Bull.* **45**, 386-394.
- [158] D.J. Shaw (1975) Introdução a Química dos Colóides e de Superfícies, 1ª Edição, Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 159-166.
- [159] M. Chorny, I. Fishbein, H.D. Danenberg, G. Golomb (2002) Lipophilic drug loaded nanosphere prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *J. Control. Release* **83**, 401-414.

- [160] H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi, Y. Kawashima (2000) Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles. *Powder Technol.* **107**, 137-143.
- [161] L. Mu, S.S. Feng, (2003) PLGA/TPGS nanoparticles for controlled release of paclitaxel: effects of the emulsifier and drug loading ratio. *Pharm. Res.* **20**, 1864-1872.
- [162] K. Yoncheva, J. Vandervoort, A. Ludwig (2003) Influence of process parameters of high-pressure emulsification method on the properties of pilocarpine-loaded nanoparticles. *J. Microencapsul.* **20**, 449-458
- [163] K. Dillen, J. Vandervoort, G. Van Den Mooter, L. Verheyden, A. Ludwig (2004) Factorial design, physicochemical characterization and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **275**, 171-187.
- [164] S.S. Feng, L. Mu, K.Y. Win, G. Huang (2004) Nanoparticles of biodegradable polymers for clinical administration of paclitaxel. *Curr. Med. Chem.* **11**, 413-424.
- [165] C. Rouzes, M. Leonard, A. Durand, E. Dellacherie (2003) Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **32**, 125-135.
- [166] T. Gerner, R. Gref, D. Michenot, F. Sommer, M.N. Tran, E. Dellacherie (1999) Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix. *J. Control. Release* **57**, 259-268.
- [167] R.J. Hunter (1988) Zeta potential in colloid science. Principles and applications, 3rd Edition, Academic Press Inc., San Diego, p. 5.
- [168] Y.P. Li, Y.Y. Pei, X.Y. Zhang, Z.H. Gu, Z.H. Zhou, W.F. Yuan, J.J. Zhou, J.H. Zhu, X.J. Gao (2001) PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J. Control. Release* **71**, 203-211.
- [169] A.E. Hawley, L. Illum, S.S. Davis (1997) Preparation of biodegradable, surface engineered PLGA nanospheres with enhanced lymphatic drainage and lymph node uptake. *Pharm. Res.* **14**, 657-661.
- [170] M. Tobio, R. Gref, A. Sanchez, R. Langer, M.J. Alonso (1998) Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharm. Res.* **15**, 270-275.
- [171] J. Panyam, S.K. Sahoo, S. Prabha, T. Bargar, V. Labhasetwar (2003) Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **262**, 1-11.
- [172] O. Bourdon, V. Mosqueira, P. Legrand, J. Blais (2000) A comparative study of the cellular uptake, localization and phototoxicity of meta-tetra(hydroxyphenyl) chlorin encapsulated in surface-modified submicronic oil/water carriers in HT29 tumor cells. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **55**, 164-171
- [173] Nair, B. (1998) Final report on the safety assessment of polyvinyl alcohol. *Int. J. Toxicol.* **17**, 67-92.
- [174] S.C. Lee, J.T. Oh, M.H. Jang, S.I. Chung (1999) Quantitative analysis of polyvinyl alcohol on the surface of poly(D,L-lactide-co-glycolide)

- microparticles prepared by solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration. *J. Control. Release* **59**, 123-132.
- [175] M.F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, P. Maincent, E. Dellacherie, M.J. Alonso, P. Labrude, C. Vigneron (1998) Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J. Control. Release* **50**, 31-40.
- [176] J. Panyam, M.M. Dali, S.K. Sahoo, W. Ma, S.S. Chakravarthi, G.L. Amidon, R.J. Levy, V. Labhasetwar (2003) Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *J. Control. Release* **92**, 173-187.
- [177] S. Mallapragada, S. McCarthy-Schroeder (2000) Poly(vinyl alcohol) as a drug delivery carrier, in: Handbook of pharmaceutical controlled release technology, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 31-46.
- [178] F. Carli, M. Bresciani, T. Canal, P. Gambini (2002) Pharmaceutical compositions in form of polymeric microparticles obtained by extrusion and spheronization. US Patent **6.355.273**.
- [179] P.B. O'Donnell, J.W. McGinity (1997) Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **28**, 25-42
- [180] C. Bitz, E. Doelker (1996) Influence of the preparation method on residual solvents in biodegradable microspheres. *Int. J. Pharm.* **131**, 171-181.
- [181] H.J. Jeon, Y.I. Jeong, M.K. Jang, Y.H. Park, J.W. Nah (2000) Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. *Int. J. Pharm.* **207**, 99-108.
- [182] The United States Pharmacopeia 28 (2005) United States Pharmacopeial Conventional Inc, Rockville, p. 2322-2332.
- [183] International Agency for Research on Câncer (1999) Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances, Vol 73, p.131.
- [184] C. Witschi, E. Doelker (1997) Residual solvents in pharmaceutical products: acceptable limits, influences on physicochemical properties, analytical methods and documented values. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **43**, 215-242.
- [185] F. Ruchatz, P. Kleinebudde, B.W. Muller (1996) Residual solvents in biodegradable microparticles: determination by a dynamic headspace gas chromatographic method. *Int. J. Pharm.* **142**, 67-73.
- [186] C.L. Arthur, J. Pawliszyn (1990) Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. *Anal. Chem.* **62**, 2145-2148.
- [187] C.M. Hansen (1965) The free volume interpretation of plasticizing effectiveness and diffusion of solvents and plasticizers in high polymers. *Off. Dig.* **37**, 57-77.
- [188] W.H. Ellis (1983) Comparative solvent evaporation mechanisms for conventional and high solids coatings. *J. Coat. Technol.* **55**, 63-72.
- [189] R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R.H. Muller, J.M. Verbavatz, R. Langer (1995) The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanosphere. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **16**, 215-233.

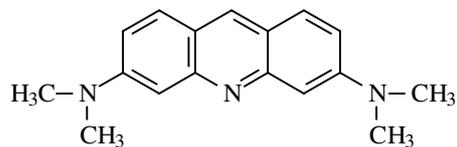
- [190] J.F. Carpenter, M.J. Pikal, B.S. Chang, T.W. Randolph (1997) Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice. *Pharm. Res.* **14**, 969-974.
- [191] T.W. Randolph (1997) Phase separation of excipients during lyophilization: Effects on protein stability. *J. Pharm. Sci.* **86**, 1198-1202.
- [192] G. Storm, S.O. Belliot, T. Daemen, D.D. Lasic (1995) Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **17**, 31-48.
- [193] J.M.G. Lankveld, J. Lyklema (1972) Adsorption of polyvinyl alcohol on the paraffin-water interface. *J. Colloid Interface Sci.* **41**, 454-482.
- [194] K. Avgoustakis, A. Beletsi, Z. Panagi, P. Klepetsanis, E. Livaniou, G. Evangelatos, D.S. Ithakissios (2003) Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **259**, 115-127.
- [195] R. Lambe, T.F. Tadros, B. Vincent (1978) Effect of temperature, particle-volume fraction, and polymer concentration on stability of aqueous polystyrene latex dispersions in presence of poly(vinyl-alcohol). *J. Colloid Interface Sci.* **66**, 77-84.
- [196] J.W. Dobble, R. Evans, D.V. Gibson, J.B. Smitham, D.H. Napper (1973) Enhanced Steric Stabilization. *J. Colloid Interface Sci.* **45**, 557-565.
- [197] G.G. Villela (1958) *Bioquímica do sangue*, 2^a Edição, Editora Guanabara, Rio de Janeiro, p. 140.
- [198] S. Stolnik, M.C. Garnett, M.C. Davies, L. Illum, M. Bousta, M. Vert, S.S. Davis (1995) The colloidal properties of surfactant-free biodegradable nanospheres from poly(β -malic acid-co-benzyl malates) and poly(lactic acid-co-glycolide). *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **97**, 235-245.
- [199] T. Trimaille, C. Pichot, A. Elaissari, H. Fessi, S. Briançon, T. Delair (2003) Poly(D,L-lactic acid) nanoparticle preparation and colloidal characterization. *Colloid Polym. Sci.* **281**, 1184-1190.
- [200] T. Govender, S. Stolnik, M.C. Garnett, I. Illum, S.S. Davis (1999) PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J. Control. Release* **57**, 171-185.
- [201] R.J. Young (1983) *Introduction to polymers*, 1st Edition, Chapman and Hall, London, p. 101-103, 123-128.
- [202] C. Washington (1996) Drug release from microparticulate systems, em: Benita S, editor. *Microencapsulation. Methods and industrial applications*. Vol 73. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 155-181.
- [203] C. Duclairoir, A.M. Orecchioni, P. Depraetere, F. Osterstock, E. Nakache (2003) Evaluation of gliadins nanoparticles as drug delivery systems: a study of three different drugs. *Int. J. Pharm.* **253**, 133-144.
- [204] C. Washington (1989) Evaluation of non-sink dialysis methods for the measurement of drug release from colloids: effects of drug partition. *Int. J. Pharm.* **56**, 71-74.
- [205] C. Washington (1990) Drug release from microdisperse systems: a critical review. *Int. J. Pharm.* **58**, 1-12.

- [206] A. Messaritaki, S.J. Black, C.F. van der Walle, S.P. Rigby (2005) NMR and confocal microscopy studies of the mechanisms of burst release from PLGA microspheres. *J. Control. Release* **108**, 271-281.
- [207] N. Faisant N, J. Siepmann, J.P. Benoit (2002) PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *Eur. J. Pharm. Sci.* **15**, 355-366.
- [208] J. Crank (1956) *The Mathematics of Diffusion*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, pp 89-103.
- [209] Y.S. Jo, M. Kim, D.K. Kim, C. Kim, Y. Jeong, K. Kim, M. Muhammed (2004) Mathematical modelling on the controlled-release of indomethacin-encapsulated poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanospheres. *Nanotechnology* **15**, 1186-1194.
- [210] P.L. Ritger, N.A. Peppas (1987) A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Control. Release* **5**, 37-42.
- [211] P.L. Ritger, N.A. Peppas (1987) A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the forms of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Control. Release* **5**, 23-36.
- [212] M. Polakovic, T. Gorner, R. Gref, E. Dellacherie (1999) Lidocaine loaded biodegradable nanospheres II. Modeling of drug release. *J. Control. Release* **60**, 169-177.
- [213] C. Berklund, K.Kim, D.W. Pack (2003) PLG microsphere size controls drug release rate through several competing factors. *Pharm. Res.* **20**, 1055-1062.
- [214] J.S. Horoszewicz, S.S. Leong, E. Kawinski, J.P. Karr, H. Rosenthal, T.M. Chu, E.A. Mirand, G.P. Murphy (1983) LNCaP model of human prostatic-carcinoma. *Cancer Res.* **43**, 1809-1818.
- [215] A. Zimmermann, H. Walt, U. Haller, P. Baas, S.D. Klein (2003) Effects of chlorin-mediated photodynamic therapy combined with fluoropyrimidines in vitro and in a patient. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **51**, 147-154.
- [216] B. Ortel, D. Sharlin, D. O'Donnell, A.K. Sinha, E.V. Maytin, T. Hasan (2002) Differentiation enhances aminolevulinic acid-dependent photodynamic treatment of LNCaP prostate cancer cells. *Br. J. Cancer* **87**, 1321-1327.
- [217] J.R. McCarthy, J.M. Perez, C.Bruckner, R. Weissleder (2005) Polymeric nanoparticle preparation that eradicates tumors. *Nano Lett.* **5**, 2552-2556.
- [218] M. Zeisser-Labouebe, N. Lange, R. Gurny, F. Delie (2006) Hypericin-loaded nanoparticles for the photodynamic treatment of ovarian cancer. *Int. J. Pharm.* **326**, 174-181
- [219] R. Bachor, M. Scholz, C.R. Shea, T. Hasan (1991) Mechanism of photosensitization by microsphere-bound chlorin e₆ in human bladder carcinoma cells. *Cancer Res.* **51**, 4410-4414.
- [220] A.C.E. Moor (2000) Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **57**, 1-13.
- [221] Y.N. Konan, J. Chevallier, R. Gurny, E. Allemann (2003) Encapsulation of p-THPP into nanoparticles: cellular uptake, subcellular localization and effect of serum on photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **77**, 638-644.

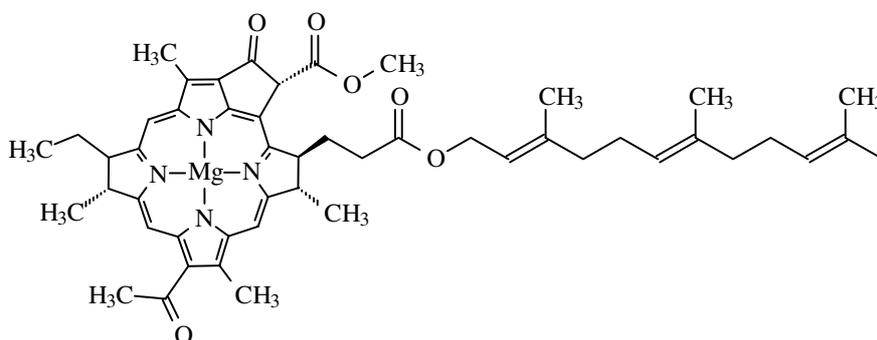
- [222] Z. Zhang, S.S. Feng (2006) Self-assembled nanoparticles of poly(lactide)-vitamin E TPGS copolymers for oral chemotherapy. *Int. J. Pharm.* **324**, 191-198.
- [223] M.P. Desai, V. Labhasetwar, E. Walter, R.J. Levy, G.L. Amidon (1997) The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm. Res.* **14**, 1568-1573.
- [224] A.V. Udaltsov, L.A. Kazarin, A.A. Sweshnikov, (2001) Self-assembly of large-scale aggregates of porphyrin from its dimers and their absorption and luminescence properties. *J. Mol. Struct.* **562**, 227-239.
- [225] J.A.S. Cavaleiro, M.G.P.S. Neves (1990) The photo-oxidation of meso-tetraphenylporphyrins. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**, 1937-1943.
- [226] Y.S. Oh, E.S. Jang, J.Y. Bock, S.H. Yoon, M.Y. Jung (2006) Singlet oxygen quenching activities of various fruit and vegetable juices and protective effects of apple and pear juices against hemolysis and protein oxidation induced by methylene blue photosensitization. *J. Food Sci.* **71**, c260-c268.
- [227] G. Streckyte, R. Rotomskis (1993) Phototransformations of porphyrins in aqueous and micellar media. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **18**, 259-263.

7. ANEXO

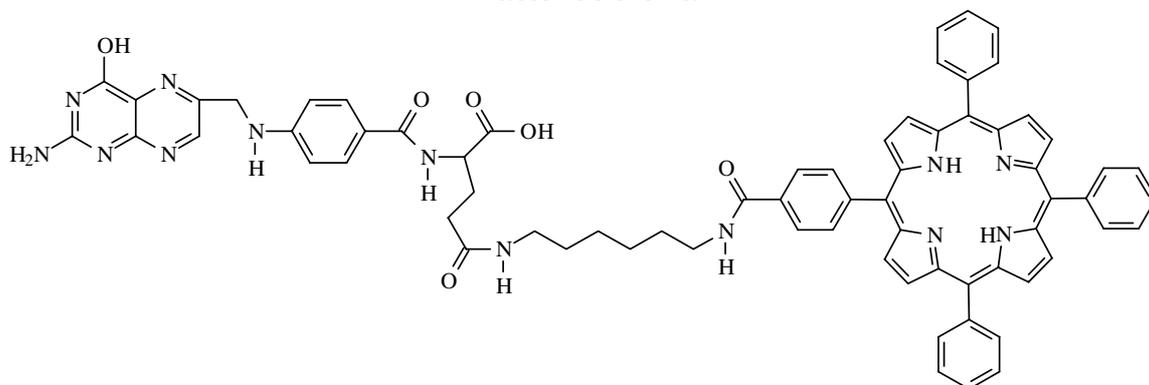
7.1 Estruturas de alguns compostos citados na tese



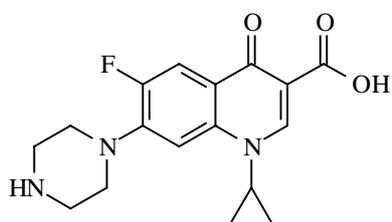
Alaranjado de acridina



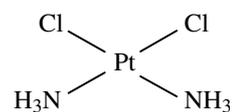
Bacterioclorofila



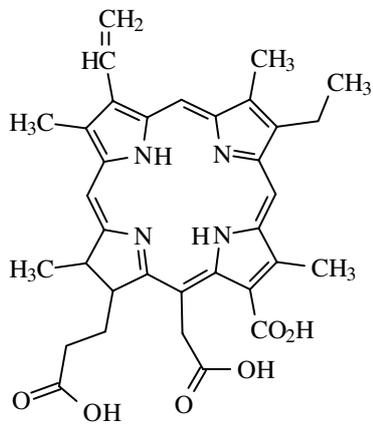
4-Carboxi-tetrafenilporfirina ligada ao ácido fólico



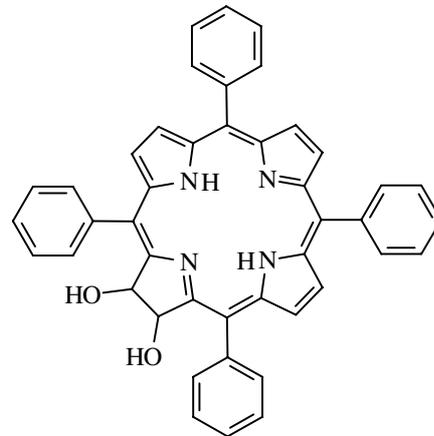
Ciprofloxacina



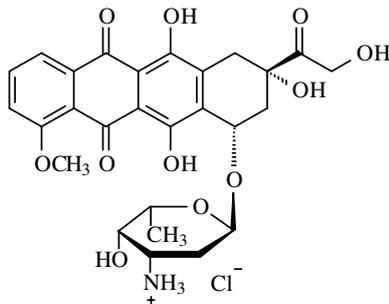
Cisplatina



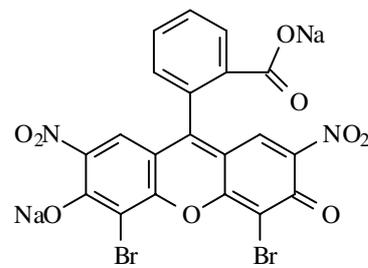
Clorina e6



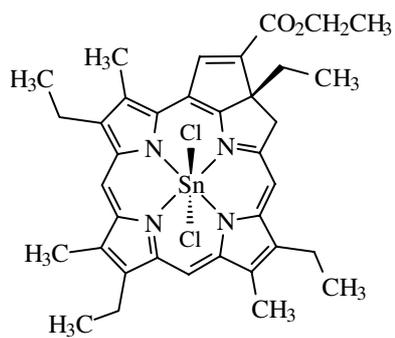
2,3-Dihidroxi-tetrafenilclorina



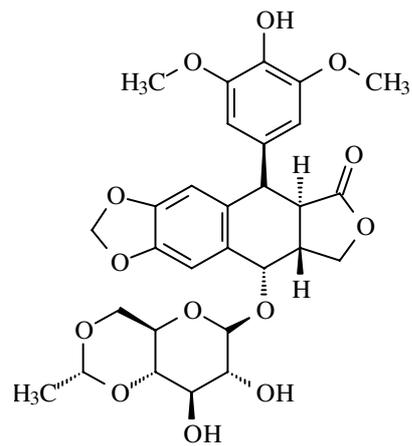
Doxorrubicina



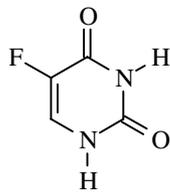
Eosina



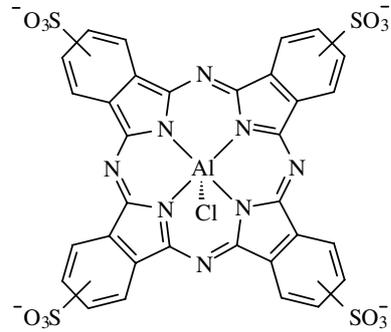
Etiopurpurinato de estanho (IV)



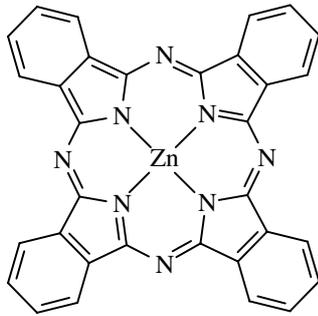
Etoposídeo



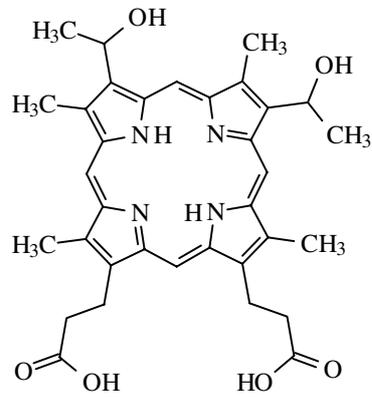
5-Fluorouracil



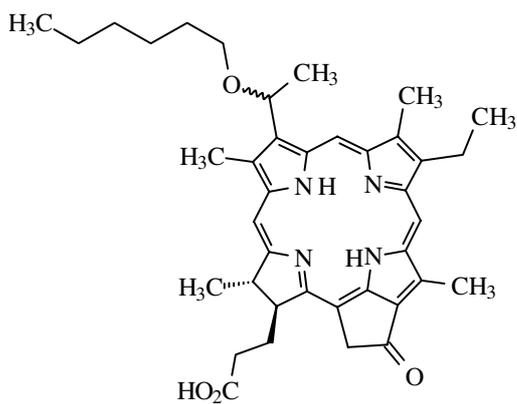
Ftalocianina de alumínio tetrasulfonada



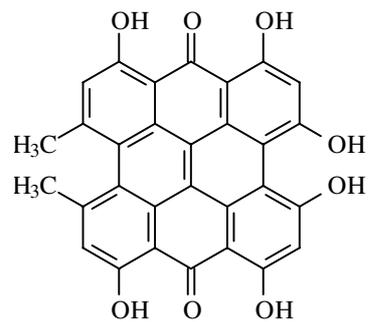
Ftalocianina de zinco



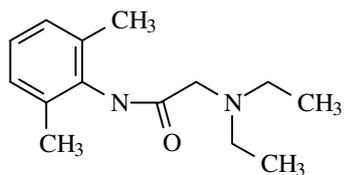
Hematoporfirina



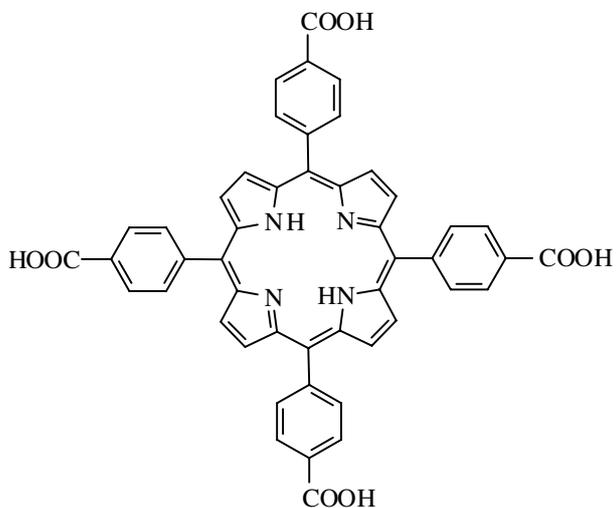
Hexoxifitoclorina



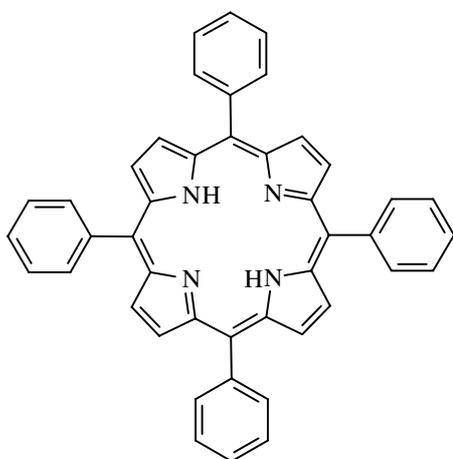
Hipericina



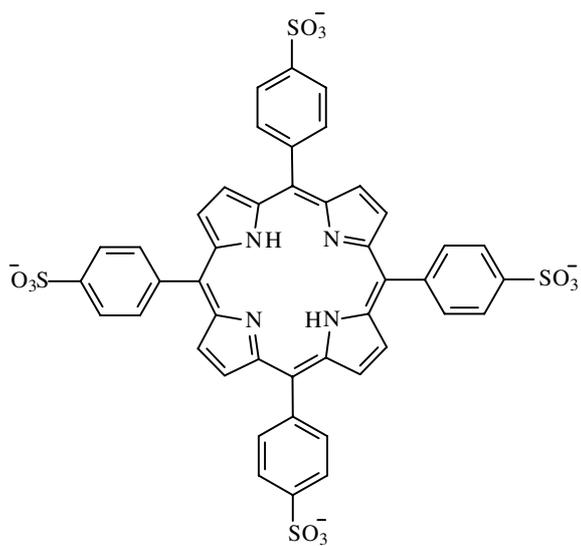
Lidocaína



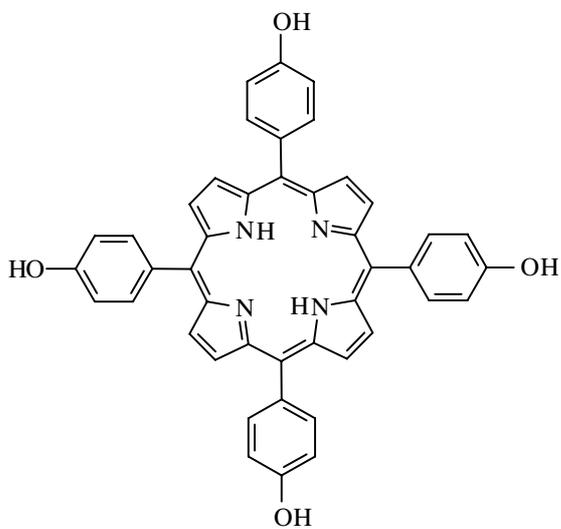
Meso-tetra-(4-carboxifenil)porfirina



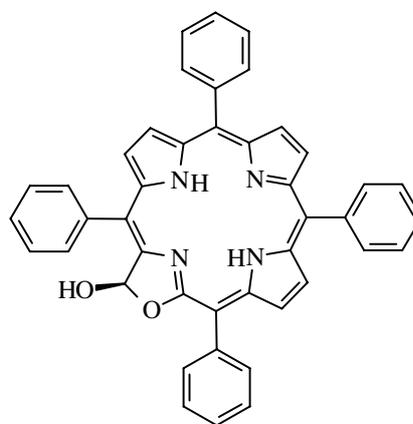
Meso-tetrafenilporfirina



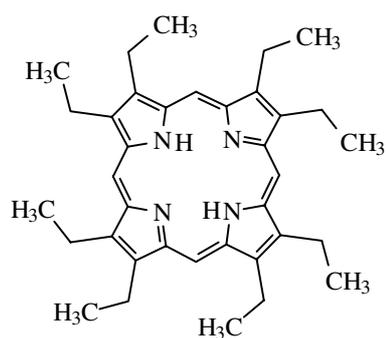
Meso-tetrafenilporfirina tetrasulfonada



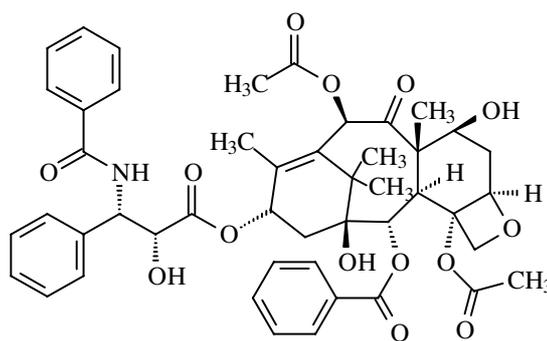
Meso-tetrahidroxifenilporfirina



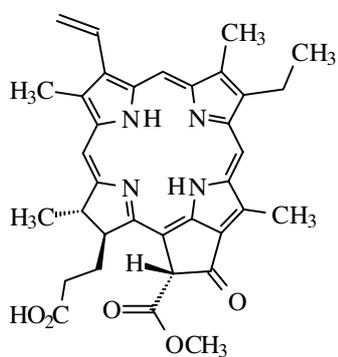
Meso-tetrafenilporfolactol



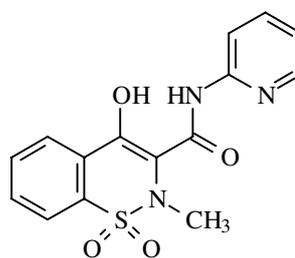
Octaetilporfirina



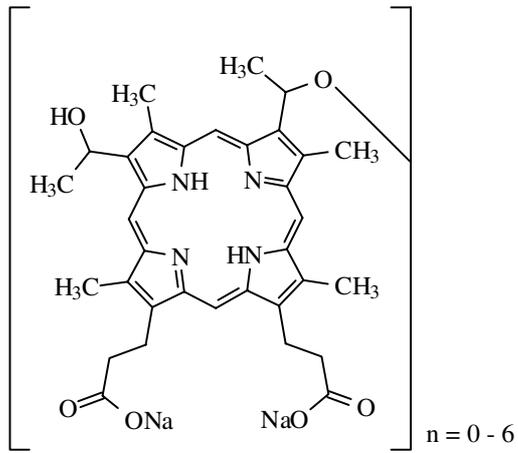
Paclitaxel



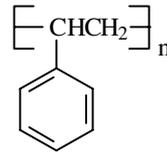
Pirofeoforbide a



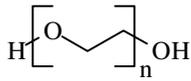
Piroxicam



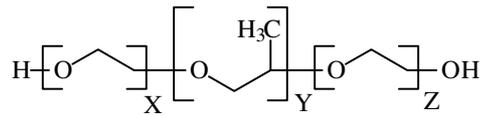
Photofrin®



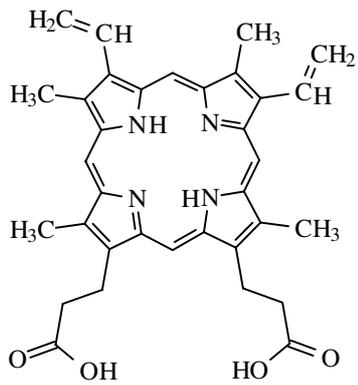
Poliestireno



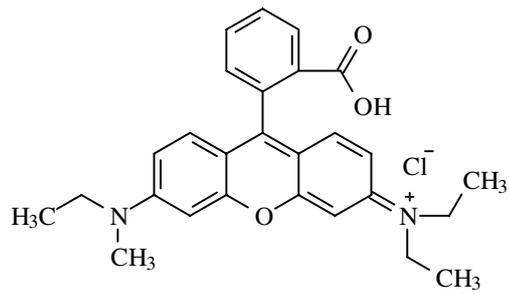
Polietileno glicol



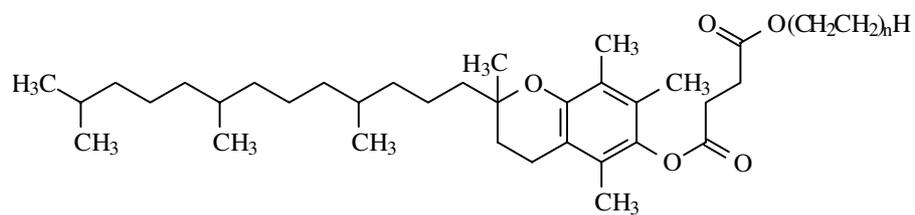
Poloxamer



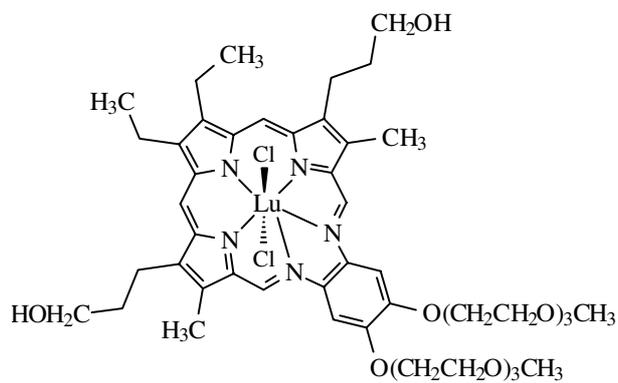
Protoporfirina IX



Rodamina B



Succinato de D- α tocoferol polietileno glicol 1000



Texafirinato de lutécio (III)