

Universidade Estadual de Campinas Instituto de Química Departamento de Físico-Química

Tese de Doutorado

"Preparação e caracterização de nano-esferas de PLGA contendo 5-fluorouracil e estudo do acoplamento de quitosana e ácido fólico em sua superfície."

Aluna: Adriana Calderini Orientador: Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine

> Campinas – SP 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

 Calderini, Adriana.
Preparação e caracterização de nano-esferas de PLGA contendo 5-fluorouracil e estudo do acoplamento de quitosana e ácido fólico em sua superfície / Adriana Calderini. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.
Orientador: Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine.
Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
1. 5-fluorouracil. 2. PLGA. 3. Quitosana. 4. Ácido fólico. I. Pessine, Francisco Benedito Teixeira.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Preparation and characterization of PLGA nanospheres containing 5fluorouracil and study of chitosan and folic acid attachment on their surface

Palavras-chaves em inglês: 5-fluorouracil, PLGA, Chitosan, Folic acid

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine (orientador), Prof. Dr. André Romero da Silva (CQ-IFES), Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto (DEA-UNESP), Prof. Dr. Renato Atílio Jorge (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Pedro Luiz Onófrio Volpe (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 20/07/2011

"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocamos nela corre por nossa conta."

Francisco Cândido Xavier

Agradecimentos

Agradeço sinceramente a todos que, mesmo longe, ajudaram de muitas formas a realizar este trabalho e me incentivaram a alcançar mais esta etapa de minha caminhada. A todos meus amigos pelo companheirismo e por me ajudarem a relaxar nos momentos de dificuldade. Em especial, agradeço meus pais, que sempre me apoiaram e me incentivaram em todas as escolhas feitas.

Ao Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine pela orientação, ajuda, amizade e por acreditar que eu poderia realizar este trabalho.

A todos do grupo de pesquisa durante esse período: Milene, Deborah, Simone, Ana Cláudia, Angélica, Andreza, Guilherme e Marcelo pela convivência, pelas discussões e pelo aprendizado conjunto.

A Prof^a. Dra. Maria Helena Bueno da Costa, que me presenteou com o polímero usado neste trabalho, sem o qual não teria tido oportunidade de realizálo. À empresa Eastman S.A. pelo fornecimento do surfatante utilizado e à empresa Valeant Farmacêutica Ltda. pelo 5-Fluorouracil fornecido.

Ao Prof. Dr. Nélson E. D. Caballero, que permitiu o uso do equipamento de Espalhamento Dinâmico de Luz durante todo o período do doutorado. Ao Prof. Dr. Renato Atílio Jorge, por ter me permitido utilizar o Ultraturrax® S18-T18 para iniciar meus experimentos deste projeto.

Aos demais professores, técnicos e funcionários do Instituto de Química, que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial, agradeço à Cláudia Martelli pelo auxílio nas análises de Espectroscopia; à Sônia Fanelli e Anderson Santos Pedrosa, por terem auxiliado nos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear e a Daniel Razzo pela ajuda na obtenção das imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura.

A Gilberto C. Franchi Jr. e Alexandre E. Nowill, pela realização dos testes *in vitro* em diferentes linhagens de células, que foram muito importantes para a conclusão do projeto.

vii

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa e auxílio concedidos. Ao CBAN-MCT pelo auxílio concedido nos Cursos de Nanotecnologia.

CURRICULUM VITAE

Data de Nascimento: 24/04/1982 Cidade: São Paulo Estado: SP País: Brasil Estado Civil: Solteira UF: SP RG: 32071917-0 CPF: 302733178-73 E-mail: adrianacalderini@yahoo.com.br Formação Acadêmica/Titulação Graduação Bacharelado em Química, Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas e Licenciatura em Química Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP - Campinas – SP (Março de 2000-Dezembro de 2004) Mestrado em Química - Físico-Química Pós-Graduação Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP - Campinas – SP (Março de 2005-Julho de 2006) Orientador: Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine Doutorado em Ciências - Físico-Química Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP - Campinas – SP (Março de 2005-Julho de 2006) Orientador: Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine Atividades Acadêmicas Iniciação Científica em Quimica Orgânica Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

"Estudo do potencial de redução de alfa-iodoacetofenona pelas bactérias de Saccharomyces Cerevisae". Orientador: Prof. Dr. Paulo S. Moran

Bolsista da: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Programa de Estágio Docente

Disciplina: QG-102 – carga horária: 8 h semanais -Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas (Agosto de 2004 - Dezembro de 2004)

Disciplina QF531 - turmas A e B – carga horária: 8 h semanais - Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas (Agosto de 2008 - Dezembro de 2008)

Produção bibliográfica

• Artigos completos publicados em periódicos

CALDERINI, A.; PESSINE, F. B. T.

Synthesis and characterization of inclusion complex of the vasodilator drug minoxidil with Beta-cyclodextrin. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. Volume 60, p.369 - 377, 2007.

Apresentação de trabalho em congresso (pôster)

CALDERINI, A.; MORAN, P. J. S.

"Estudo do Potencial de Inibição de Reações Radicalares em células de Saccharomyces Cerevisae utilizando α-iodoacetofenona". In: X Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, Campinas – SP, 2002.

CALDERINI, A.; PESSINE, F. B. T.

"Encapsulação e Caracterização Físico-Química do fármaco vasodilatador minoxidil em β-ciclodextrina". In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia, SP.

CALDERINI, A., BORGES, S. S. O., F, M., K, A., Q, C., G, R., BUENO, M. I. M. S.

"X-Ray Spectroscopy and multivariate calibration applied to soil samples." In: 10th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, Águas de Lindóia – SP, 2006.

CALDERINI, A.; MARTINS, M. H.; PESSINE, F. B. T.

"Encapsulação de Tenoxicam em PHB para aplicação oral." In: 60ª Reunião Anual da SBPC, Campinas – SP, 2008.

CALDERINI, A.; MARTINS, M. H.; PESSINE, F. B. T.

Otimização dos parâmetros para encapsulação de um antiinflamatório em microesferas de PHB. In: AutoOrg 2008 - I Encontro sobre Estruturas Auto Organizadas em Solucoes e Interfaces, São Pedro – SP, 2008.

CALDERINI, A.; PESSINE, F. B. T.

"Estudo da Influência do Solvente a obtenção de nano-esferas de PLGA com 5-Fluorouracil." In: 32° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza – CE, 2009.

CALDERINI, A.; SIMONI, D.; MARTINS, M. H. .; PESSINE, F. B. T.

"Estudo da Interação entre Tenoxicam e Albumina do Soro Bovino." In: 32 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza – CE, 2009.

CALDERINI, A.; PESSINE, F. B. T.

"Optimization of the encapsulaton of 5-fluorouracil in PLGA (50:50) and chitosan nanospheres."In: Cifarp - 7st International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto – SP, 2009.

CALDERINI, A.; PESSINE, F. B. T.

"Estudo da interação entre o fármaco Dapsona e Beta-Ciclodextrina por Espectroscopia de Fluorescência." In: 33° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóias – SP, 2010.

CALDERINI, A., PESSINE, F. B. T.

"Influência do pH, força iônica, osmolaridade e temperatura na encapsulação 5-Fluorouracil em nanoparticulas de PLGA." In: 33° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóias – SP, 2010.

CALDERINI, A.; MARTINS, M. H.; PESSINE, F. B. T.

"Estudo do complexo de inclusão de dapsona com hidroxipropil e beta-ciclodextrina por ressonância magnética nuclear." In: AutoOrg - Segundo encontro sobre estruturas auto-organizadas em soluções e interfaces, São Pedro – SP, 2010.

CALDERINI, A.; PESSINE, F. B. T.

"Modificação do perfil de liberação de nano-esferas de ácido poli(lático-co-glicólico (PLGA) contendo 5-Fluorouracil através do acoplamento de quitosana e ácido fólico." In: 34° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis – SC, 2011.

Apresentação Oral

CALDERINI A.; PESSINE F. B. T.

"Preparation and characterization of 5-Fluorouracil containing PLGA nanoparticles coated with Chitosan for drug delivery. In: International workshop cum conference on Nanoscience and Nanotechnology, 2009.

CALDERINI A.; PESSINE F. B. T.

"Preparation and characterization of PLGA nanospheres, containing 5-Fluorouracil, coated with Folic acid and Chitosan for targeted drug delivery." In: Primer Simposio Latinoamericano de Nanomedicinas, 2010.

MARTINS, M.H.; CALDERINI A.; PESSINE F. B. T.

"Preparation and characterization of dapsone inclusion complex in beta-cyclodextrin" In: 1er Simposio Latinoamericano de Nanomedicinas, 2010

<u>Prêmios</u>

3rd place in Oral young Scientist Presentation in the Indo-French Workshop cum Internacional Conference on Nanoscience and Nanotechnology, Ansal Institute of Technology - Gurgaon – India, 2009.

Prêmio Lavoisier de melhor aluna no curso de Licenciatura em Quimica, Universidade Estadual de Campinas, 2004

RESUMO

5-Fluorouracil (5-FU) é um dos fármacos mais úteis no tratamento de tumores sólidos em adultos, especificamente carcinomas do trato gastrointestinal (estômago, cólon e reto) e da mama. Em resumo, seu maior efeito bioquímico é a inibição da síntese do DNA, pois a concentração que inibe sua síntese pode ainda permitir a síntese do RNA. Causa severos efeitos adversos como mielo supressão, mucosite, dermatite, diarréia e toxicidade cardíaca. Em razão disto, têm sido realizadas várias tentativas para encapsular 5-FU a fim de reduzir os efeitos adversos que ele provoca. O objetivo deste projeto foi encapsular este antineoplásico utilizando nano-esferas de ácido poli(lático-co-glicólico), PLGA, como sistema carreador, acoplando à sua superfície quitosana e folato de quitosana para melhor endereçamento aos locais de ação, bioadesividade e menor toxicidade. A encapsulação de 5-FU em nano-esferas de PLGA foi aperfeiçoada através de planejamento experimental e por análise quimiométrica. Muitos fatores foram estudados: métodos de preparação, temperatura, quantidade inicial de 5-FU e pH. Na caracterização destes sistemas foram utilizadas diversas técnicas: espalhamento dinâmico de luz, determinação do potencial Zeta, calorimetria diferencial de varredura, análise termogravimétrica, difratometria de raios-X e microscopia eletrônica de varredura. Além disso, foram realizados ensaios de perfil de liberação, de estabilidade coloidal e estudo do comportamento desses sistemas em relação às células in vitro. O planejamento experimental permitiu obter nanoparticulas com capacidade de carregamento em torno de 11% e eficiência de encapsulação de 32%. O acoplamento de quitosana e folato de quitosana permitiu retardar a liberação do fármaco em solução. Para armazenagem destas partículas, observou-se que elas foram menos degradadas quando estão liofilizadas e mantidas a 4 °C. A melhor concentração de sacarose para liofilizá-las, sem que ocorra aumento de tamanho e polidispersão, foi 250 mmol/L. Os testes in vitro comprovaram a eficácia destas formulações.

Palavras Chave: 5-fluorouracil, PLGA, nanopartículas, quitosana, ácido fólico

xi

ABSTRACT

5-fluorouracil (5-fluoro-1H-pyrimidine-2,4-dione) is one of the most used drug to treat solid tumors in adults, specifically gastrointestinal (stomach and colorectal) and breast carcinomas. In summary, the major biochemical effect of 5-FU is inhibition of DNA synthesis, since concentrations which inhibit this synthesis may still permit RNA synthesis. It causes severe adverse effects as myelosuppression, mucositis, dermatitis, diarrhea and cardiac toxicity. Its encapsulation in nanoparticles can reduce these adverse effects, prolong its release and the drug can be placed directly on its site of action. The goal of this work was to encapsulate this anti-neoplasic drug using poly (lactic-co-glycolic acid) PLGA nanospheres as carrier system, attaching on their surface chitosan and folate-chitosan to attain an enhanced targeting, bioadesivity and less toxicity. The encapsulation of 5-FU in PLGA nanospheres was improved through an experimental design and chemometry. Many factors were studied: methods of preparation, temperature, initial amount of 5-FU and pH. In the characterization, many techniques were employed: dynamic light scattering, determination of Zeta potential, differential scanning calorimetry, thermo gravimetric analysis, X-ray difractometry and scanning electron microscopy. Besides, we also analyzed the release profile, colloidal stability and the behavior of these systems in relation to in vitro cancer cells. The experimental design allowed obtaining nanoparticles with drug loading around 11% and encapsulation efficiency of 32%. The attachment of chitosan and folate-chitosan also allowed prolonging the drug release in solution. To store these formulations, we observed that lyophilized particles kept at 4°C were less degraded. The best sucrose concentration to freeze-drying these particles with no size and polidispersity change was 250 mmol/L. The in vitro tests proved the efficacy of these formulations.

Keywords: 5-fluorouracil, PLGA, nanoparticles, chitosan, folic acid

Índice

Lista de Abreviaturas	xxi
Lista de Tabelas	xxiv
Lista de Figuras	xxviii
I. INTRODUÇÃO	1
1. Nanotecnologia e sistemas coloidais	2
2. Carreadores	6
a) Ciclodextrinas	7
b) Nanossuspensões e nanocristais	7
c) Nanopartículas lipídicas sólidas	7
d) Micro/Nanopartículas poliméricas	7
e) Hidrogéis	8
g) Lipossomas	8
h) Micelas poliméricas	8
i) Cristais líquidos	9
j) Dendrímeros	9
3. Caracterizações físico-químicas	9
a) Avaliação morfológica	9
b) Distribuição de tamanho e polidispersão	10
c) Potencial Zeta (ζ)	10
e) pH das suspensões	10
f) Difratometria de raios-X (DRX)	10
g) Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV)	11
h) Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	11
i) Análise termogravimétrica (TGA)	11
4. Vias de administração de carreadores	12
5. Micro/nanopartículas poliméricas	13
6. Preparação de nanopartículas poliméricas	19
6.1. Métodos de preparação	19
6.1.1. Dispersão de polímeros pré-formados	19

a) Análise elementar por CHN	47
b) Espectroscopia de absorção no UV-Vis	47
2 1 3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	47
2.2 Métodos de preparação de papopartículas	47
2.2.1 Método de evaporação do solvente e dupla emulsão água-óleo-	
água (A/O/A)	47
222 Emulsificação espontânea ou método de difusão do solvente	48
2.3 Formulações iniciais (Ultraturrax® T18 - dispersor S18)	۰. ۵۷
2.3.1 Preparação de NP utilizando PVA como surfatante	49 49
2.3.2. Preparação de NP utilizando TPGS como surfatante	50
2.3.2.1 Influência do solvente	50
2.3.2.1. Influência do solvente	50
	50
2.3.2.3. LIUIIIIZAÇAU	50
dispersor S25N-25F)	51
2.4.1. Influência do tempo de agitação, velocidade de rotação do dispersor	
e volume de TPGS	51
2.4.2. Planejamento Experimental	52
2.4.3. Otimização das NP através dos resultados do planejamento	
experimental	53
a) Influência da concentração da solução de 5-FU	53
b) Influência do pH e da temperatura	53
2.5. Quitosana e ácido fólico	53
2.5.1. Métodos de purificação	53
a) Forma neutra	53
b) Forma cloridrato	54
2.5.2. Síntese de folato de quitosana (QTSFOL)	54
2.5.3. Preparações de NP catiônicas de PLGA	55
2.5.3.1. Entrelaçamento de cadeias	55
2.5.3.2. Adsorção simples	56
2.6. Ensaios de estabilidade coloidal	56

2.7. Perfil de liberação	57
2.8. Liofilização das formulações finais	58
2.9. Degradação térmica	58
2.10. Preparação das misturas físicas (MF)	58
2.11. Análises instrumentais	58
a) Espectroscopia de absorção no infravermelho	58
b) Análise termogravimétrica	59
c) Calorimetria diferencial de varredura	59
d) Difratometria de raios-X	59
2.12. Ensaios <i>in vitro</i>	59
3. Tratamento quimiométrico dos dados obtidos a partir do planejamento	
experimental	63
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
1. Caracterização dos reagentes	63
1.1. 5-Fluorouracil	63
1.1.1. Análise elementar	63
1.1.2. Espectroscopia de absorção no UV-Vis	63
1.1.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho	64
1.1.4. Difratometria de raios-X	65
1.1.5. Análises térmicas	65
1.2 Ácido poli(lático- <i>co</i> -glicólico) (PLGA)	67
1.2.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho	67
1.2.2. Difratometria de raios-X	68
1.2.3. Análises térmicas	68
2. Formulações iniciais	70
2.1. Formulações preparadas com o dispersor Ultraturrax® T18-S18	70
2.1.1. Preparação de NP utilizando PVA como surfatante	70
2.1.2. Preparação de NP utilizando TPGS como surfatante	71
2.1.2.1. Influência do solvente	71
2.1.2.2. Influência do volume de TPGS, do tempo e da velocidade de	
centrifugação nas lavagens das NP	73

2.2. Formulações preparadas com o dispersor Ultraturrax® T25-S25N-	
25F	74
2.2.1. Estudo da influência do tempo e da velocidade de agitação no	
dispersor	74
2.2.2. Liofilização	75
3. Otimização do método de preparação de NP contendo 5-FU	75
3.1. Análise quimiométrica do planejamento experimental	75
3.1.1. Carregamento (%)	78
a) Modelo linear	78
b) Modelo quadrático	81
3.1.2. Potencial zeta (ζ)	84
3.1.3. Tamanho (φ, Z average)	87
3.1.4. Rendimento	90
3.1.5. Índice de polidispersão	90
3.2. Operações evolucionárias	90
4. Quitosana e ácido fólico	93
4.1. Quitosana	94
4.1.1. Ressonância Magnética Nuclear	94
4.1.2. Espectroscopia de absorção no infravermelho	96
4.2. Ácido fólico	96
4.2.1. Espectroscopia de absorção no UV-Vis	97
4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear - ¹ H	97
4.2.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho	99
4.2.4. Difratometria de raios-X	100
4.2.5. Análises térmicas	101
4.3. Síntese de folato de quitosana (QTSFOL)	102
4.4. Acoplamento de quitosana e folato de quitosana	105
4.4.1. Entrelaçamento de cadeias	105
4.4.2. Adsorção simples de quitosana e folato de quitosana	106
5. Estabilidade coloidal	112
6. Estudo do perfil de liberação das formulações	116

6.1. Perfil de liberação de carreadores	116
6.2. Difusão	118
a) Cinética de ordem zero	120
b) Cinética de primeira ordem	120
c) Modelo de Higuchi	120
d) Modelo de Peppas-Korsmeyer ou lei da potência	121
e) Modelo de Baker-Lonsdale	122
6.3. Estudo do perfil de liberação do fármaco 5-FU	122
7. Liofilização	126
7.1. Liofilização das Formulações	128
8. Estabilidade térmica	131
9. Análise das formulações liofilizadas	134
9.1. Microscopia eletrônica de varredura	135
9.2. Análises instrumentais	136
9.2.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho	136
9.2.2. Difratometria de raios-X	139
9.2.3. Calorimetria diferencial de varredura	141
9.2.4. Análise termogravimétrica	143
10. Ensaios <i>in vitro</i>	145
V. CONCLUSÕES	149
VI. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	153
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
VIII. ANEXOS	167
A. Formulações iniciais	167
A.1. Estudo de lavagem das nanopartículas	167
A.2. Liofilização	170
B. Curvas obtidas para cada linhagem de célula no primeiro teste	
realizado com 5-FU e NP	171
C. Curvas obtidas para cada linhagem de células no segundo teste	
realizado com 5-FU e as formulações de NP, NPQTSFOL, NPQTS e	
NP _{BRANCO}	175

LISTA DE ABREVIATURAS

φ	diâmetro médio (Z average)
ζ	potencial zeta
5-FU	5-fluorouracil
AF	ácido fólico
С	Carregamento
CPMAS	"cross polarization magic angle spinning"
DCC	n,n'-diciclohexilcarbodiimida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPD	dihidropirimidina desidrogenase
DRX	difratometria de raios-X
DSC	calorimetria diferencial de varredura
EDC	hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)
	carbodiimida
EDL	espalhamento dinâmico de luz
EE	eficiência de encapsulação
FBP	proteína ligante do folato
FDA	"food and drug administration"
FdUMP	5-fluoro-2'-deoxiuridina monofosfato
FdUTP	5-fluoro-2'-deoxiuridina trifosfato
FTIR	espectroscopia de absorção no infravermelho com
	transformada de Fourier
FUTP	5-fluoridina trifosfato
GL	graus de liberdade
HLB	balanço hidrofílico-lipofílico
i.v.	Intravenosa
IARC	agência internacional para pesquisa em câncer
IPD	índice de polidispersão
IV	Infravermelho

Μ	Manitol
MDR	"multi drug resistance"
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MF	mistura física
MM	massa molar
MQ	média quadrática
NP	Nanopartículas
NPQTS	nanopartículas recobertas com quitosana
NPQTSFOL	nanopartículas recobertas com folato de quitosana
NS	nano-esferas
OMS	organização mundial da saúde
PBLG	poli(γ-benzil-l-glutamato)
PCL	poli-ɛ-caprolactona
PEG	Polietilenoglicol
PHB	poli-hidroxibutirato
PLA	ácido poli-lático
PLGA	poli(ácido lático- <i>co</i> -glicólico)
PVA	álcool polivinílico
QTA	Quitina
QTS	Quitosana
QTSHCL	cloridrato de quitosana
QTSFOL	folato de quitosana
R	Rendimento
RES	sistema do retículo endotelial
RMN	ressonância magnética nuclear
RNA	ácido ribonucleico
S	erro padrão
S	Sacarose
SGI	sistema gastrointestinal
SQ	soma quadrática

t	valor t da distribuição de Student
Т	Trealose
Тд	temperatura de transição vítrea
TGA	análise termogravimétrica
TPGS	d- α -tocoferil polietileno glicol 1000 succinato
TS	enzima timidalase sintase
UV-Vis	região do ultravioleta-visível
V	velocidade de agitação

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis relacionados ao volume de TPGS e velocidade do	
dispersor para cada ensaio do planejamento experimental 2 ² com ponto	
central	52
Tabela 2. Níveis relacionados ao volume de TPGS e massa de 5-FU para	
cada ensaio do planejamento experimental 2 ² com ponto	
central	52
Tabela 3. Atribuições das bandas do espectro de absorção no	
infravermelho do 5-FU	64
Tabela 4. Atribuições das bandas do espectro de absorção no	
infravermelho do PLGA	67
Tabela5.ParâmetrosdasNPparaaprimeira	
formulação	70
Tabela 6. Parâmetros das NP para cada ensaio	71
Tabela 7. Parâmetros para o estudo de Velocidade (V) e Tempo de	
Centrifugação	73
Tabela 8. Resultados do planejamento experimental de carregamento	
(C), rendimento (R), diâmetro (ϕ), polidispersão (IPD) e potencial Zeta (ζ)	
para cada nível	76
Tabela 9. Cálculo dos coeficientes de regressão (CR), erro padrão (s),	
valor de t de Student e parâmetro p para o intervalo de confiança em	
95%	78
Tabela 10. Estimativa dos efeitos e intervalo de confiança de C para	
ajuste do modelo linear, erro padrão (s), valor de t de Student e	
parâmetro p	79
Tabela 11. Análise ANOVA para a variável C para ajuste do modelo	
linear. Valores de soma quadrática (SQ), graus de liberdade (GL) e média	
quadrática (MQ)	79

Tabela 12. Cálculo dos coeficientes de regressão (CR), erro padrão (s) e	
valor de t de <i>Student</i> e parâmetro p para o intervalo de confiança a 95%	
para o ajuste do modelo quadrático – variável C	83
Tabela 13. Estimativa dos efeitos e intervalo de confiança de C para	
ajuste do modelo quadrático, erro padrão (s), valor de t de Student e	
parâmetro p	83
Tabela 14. Análise ANOVA para a variável C para o ajuste do modelo	
quadrático. Valores de soma quadrática (SQ), graus de liberdade (GL) e	
média quadrática (MQ)	84
Tabela 15. Cálculo dos coeficientes de regressão (CR), erro padrão (s) e	
valor de t de Student e parâmetro p para o intervalo de confiança a 95%	
para o ajuste do modelo quadrático – variável ζ	84
Tabela 16. Estimativa dos efeitos e intervalo de confiança de ζ para	
ajuste do modelo quadrático, erro padrão (s), valor de t de Student e	
parâmetro p	85
Tabela 17. Análise ANOVA para a variável ζ para o ajuste do modelo	
quadrático. Valores de soma quadrática (SQ), graus de liberdade (GL) e	
média quadrática (MQ)	85
Tabela 18. Cálculo dos coeficientes de regressão (CR), erro padrão (s) e	
valor de t de Student e parâmetro p para o intervalo de confiança a 95%	
para o ajuste do modelo quadrático – variável φ	88
Tabela 19. Estimativa dos efeitos e intervalo de confiança de ϕ para	
ajuste do modelo quadrático, erro padrão (s), valor de t de Student e	
parâmetro p	88
Tabela 20. Análise ANOVA para a variável ϕ para ajuste do modelo	
quadrático. Valores de soma quadrática (SQ), graus de liberdade (GL) e	
média quadrática (MQ)	88
Tabela 21. Percentual de Carregamento (C) e rendimento (R), diâmetro	
(ϕ), índice de polidispersão (IPD) e potencial Zeta (ζ) para cada ensaio a	
25 °C	90

Tabela 22. Percentual de Carregamento (C) e rendimento (R), diâmetro	
(ϕ), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (ζ) para cada ensaio à	
25 °C. Cada ensaio foi feito com solução supersaturada de 5-FU (21,5	
mg/mL)	92
Tabela 23. Percentual de Carregamento (C), percentual de rendimento	
(R), diâmetro (ϕ), índice de polidispersão (IPD) e potencial Zeta (ζ) para	
cada ensaio a 25 °C. Cada ensaio foi feito com solução supersaturada de	
5-FU (21,5 mg/mL)	93
Tabela 24. Atribuições das bandas do espectro de absorção no	
infravermelho da quitosana	96
Tabela 25. Atribuição do δ (ppm) dos prótons do ácido fólico em DMSO-	
d ₆	99
Tabela 26. Atribuições das bandas do espectro de absorção no	
infravermelho do ácido fólico	100
Tabela 27. Níveis das variáveis 5-FU, velocidade do dispersor (VA) e	
parâmetros obtidos das NP (φ, ζ, IPD, C e R)	105
Tabela 28. Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (s) obtidos	
mediante análise ANOVA para o ensaio experimental	106
Tabela 29. Mecanismos de liberação por difusão considerando n para	
esferas	122
Tabela 30. Ajuste dos modelos matemáticos para liberação in vitro das	
formulações de NP, NPQTS e NPQTSFOL e para uma solução de 5-FU	124
Tabela 31. Massa molar, estruturas e fórmulas moleculares, e valores da	
temperatura de transição vítrea de alguns açúcares	127
Tabela 32. ϕ (nm), IPD e ζ (mV) das NP obtidos antes da	
liofilização	128
Tabela 33. ϕ (nm), IPD e ζ (mV) das NP obtidos após a liofilização e	
ressuspensão mediante agitação por 24 h	129
Tabela 34. ϕ (nm), IPD e ζ (mV) das NP obtidos antes da	
liofilização	130

Tabela 35. ϕ (nm), IPD e ζ (mV) das NP obtidos após a liofilização e	
ressuspensão mediante agitação por 5 min	130
Tabela 36. $\phi(nm)$ e IPD das amostras antes (ϕ_0 , IPD ₀) e após a liofilização	
(\phi_f, IPD_f)	135
Tabela 37. Resultados do ζ (mV) das amostras antes ($\zeta_0)$ e após a	
liofilização (ζ _f)	135
Tabela 38. IC_{50} para NP/5-FU e 5-FU em linhagens de células	
neoplásicas	146
Tabela 39. IC ₅₀ para 5-FU, NP _{Branco} e NP, NPQTS e NPQTSFOL com 5-	
FU em linhagens de células	
neoplásicas	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variação temporal da concentração do fármaco administrado via	
rota tradicional (B) e via carreador (A)	3
Figura 2. Representação esquemática das condições em uma superfície	
positiva com uma camada de íons negativos (Florence & Atwood, 2003)	5
Figura 3. Representação esquemática de alguns sistemas de entrega de	
fármacos	6
Figura 4. Representação esquemática de nanocápsulas (a e b) e nano-	
esferas poliméricas (c e d): a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso; b)	
fármaco adsorvido à parede polimérica; c) fármaco retido na matriz	
polimérica; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz	
polimérica (Schaffazick et al., 2003)	14
Figura 5. Fórmulas estruturais de alguns polímeros poliésteres	
biodegradáveis	16
Figura 6. Estrutura molecular do TPGS	18
Figura 7. Estrutura molecular do ácido fólico	24
Figura 8. Representação esquemática do mecanismo de endocitose	
mediada por receptor (Wang & Low, 1998)	26
Figura 9. Estrutura molecular da (a) quitina e (b) quitosana (Abreu &	
Campana-Filho, 2005)	27
Figura 10. Representação esquemática da divisão das células em tecidos	
e formação do câncer (retirado de http://www.inca.gov.br - acesso	
Março/2010)	30
Figura 11. Ilustração do efeito do aumento de retenção e permeação	
(EPR): carreadores (1) penetram através da vasculatura do tumor, (2) no	
interstício (3) e se degradam no local liberando o fármaco (4) e levando a	
um aumento da sua concentração (Torchilin, 2007)	33
Figura 12. Estrutura molecular da base uracil e do fármaco 5-	
Fluorouracil	35
Figura 13. Estruturas moleculares do eniluracil e capecitabina	37

Figura 14. Representação esquemática da preparação de	e
nanopartículas	. 48
Figura 15. Ultraturrax® T18 com elemento dispersor S18	. 49
Figura 16. Ultraturrax® T25 com elemento dispersor S25	. 51
Figura 17. Conjugação eletrostática de QTS e QTSFOL à superfície da	S
NP pelo método de entrelaçamento de cadeias	. 55
Figura 18. Conjugação eletrostática de QTS e QTSFOL à superfície da	S
NP por adsorção simples	56
Figura 19. Esquema utilizado para o experimento de perfil de	e
liberação	57
Figura 20. Curva de calibração de solução aquosa de 5-FU a 266 nm	63
Figura 21. Espectro de absorção no infravermelho do 5-FU	. 64
Figura 22. Difratograma de raios-X de 5-FU	65
Figura 23. Curva de DSC do 5-FU	66
Figura 24. Curva de TGA do 5-FU (a) % massa vs. Temperatura (°C) e (b)
δ (mg/°C) vs. temperatura (°C)	66
Figura 25. Espectro de absorção no infravermelho do PLGA	67
Figura 26. Difratograma de raios-X do PLGA	68
Figura 27. Curva de DSC do PLGA	. 69
Figura 28. Curva de TGA do PLGA (a) % massa vs. temperatura (°C); (b)
δ (mg/°C) vs. temperatura (°C)	69
Figura 29. Micrografia eletrônica de varredura das NP de PLGA	4
carregadas com 5-FU (x5000)	70
Figura 30. Micrografia das NP obtidas nos experimentos para estudo	С
sobre o solvente mais adequado (a) acetona (x1000); (b) diclorometano (x	x
30000); (c) acetato de etila (x3000)	72
Figura 31. Micrografias das NP de PLGA (x 60000; x30000)	74
Figura 32. (a) ϕ (nm) das NP de PLGA obtido em cada ensaio pelo tempo	;
(b) IPD das NP obtido em cada ensaio pelo tempo	75
Figura 33. Distribuição de tamanho obtida via espalhamento dinâmico de	e
luz para o ensaio no nível (+1;-1)	77

Figura 34. Distribuição de potencial Zeta obtida via espalhamento	
dinâmico de luz para o ensaio no nível (+1;-1)	77
Figura 35. Micrografia das NP obtidas por MEV do ensaio do nível (+1;-1	
– x15000)	78
Figura 36. Variável: Carregamento (C). (a) quadro de Pareto dos efeitos	
padronizados; (b) superfície ajustada (2 fatores, 1 bloco, 14 ensaios; MQ	
Erro Puro = 0,37); (c) quadro da distribuição dos resíduos vs. respostas	
previstas	80
Figura 37. Variável: Carregamento (C). (a) quadro de Pareto dos efeitos	
padronizados; (b) superfície ajustada (2 fatores, 1 bloco, 14 ensaios; MQ	
Erro Puro = 0,37); (c) quadro da distribuição dos resíduos vs. respostas	
previstas	82
Figura 38. Variável: ζ (mV) (a) quadro de Pareto dos efeitos	
padronizados; (b) superfície ajustada (2 fatores, 1 bloco, 14 ensaios; MQ	
Erro Puro = 9,4); (c) quadro da distribuição dos resíduos vs. respostas	
previstas	86
Figura 39. Variável: tamanho (ϕ). (a) quadro de Pareto dos efeitos	
padronizados; (b) superfície ajustada (2 fatores, 1 bloco, 14 ensaios; MQ	
Erro Puro = 48,6); (c) quadro da distribuição dos resíduos vs. respostas	
previstas	89
Figura 40. Espectro de RMN- ¹³ C obtido por CPMAS para a QTS neutra	
purificada (sonda 2R - 8 KHz)	95
Figura 41. Espectro de RMN- ¹ H da QTS em D_2O/H_3CCOOH (500 MHz;	
24,6°C; nt=32, lb=1,0 Hz; sonda bbsw)	95
Figura 42. Espectro de absorção no infravermelho da QTS	96
Figura 43. Curva de calibração da solução de ácido fólico em solução	
ácido acético 1% em 282 nm	97
Figura 44. Estrutura molecular do ácido fólico com as atribuições dos	
prótons (Bonechi et al., 2006)	98
Figura 45. Espectro de RMN- ¹ H de ácido fólico em DMSO-d ₆ . (500 MHz;	
24,6°C; nt=32, lb=1,0 Hz; sonda bbsw)	98

Figura 46. Espectro de absorção no infravermelho do ácido fólico	99
Figura 47. Difratograma de raios-X do ácido fólico	100
Figura 48. Curva de DSC do ácido fólico	101
Figura 49. Curva de TGA do AF (a) % massa vs. temperatura (°C) e (b) δ	
(mg/ºC) vs. temperatura (ºC)	102
Figura 50. Representação esquemática da reação entre ácido fólico e	
quitosana	103
Figura 51. Espectros de absorção no infravermelho do ácido fólico (AF),	
quitosana (QTS) e folato de quitosana (QTSFOL)	104
Figura 52. Espectro de RMN- ¹ H de QTSFOL em DMSO-d ₆ /CH ₃ COOH.	
(500 MHz; T= 24,6°C; nt=32, lb=1,0 Hz; sonda bbsw)	104
Figura 53. Variação temporal do (a) ϕ (nm); (b) IPD de NP recobertas com	
QTS	107
Figura 54. Variação temporal de (a) ϕ (nm); (b) IPD de NP recobertas com	
QTSFOL	108
Figura 55. Variação temporal de ζ de NP recobertas com QTS: (a) 0,50%;	
(b) 0,67%; (c) 0,76%	109
Figura 56. Variação temporal de NP recobertas com QTSFOL: (a) 0,67%;	
(b) 0,75%; (c) 0,88%	110
Figura 57. Estudo da estabilidade coloidal das partículas com adição de	
solução de Na ₂ SO ₄ em diferentes concentrações	113
Figura 58. Variação do (a) ϕ (nm) e (b) ζ (mV) das nanopartículas com a	
variação do pH	115
Figura 59. Capacidade tamponante das formulações NP, NPQTS e	
NPQTSFOL	116
Figura 60. Perfil de liberação de 5-FU a 37 ºC	123
Figura 61. Ajuste dos dados obtidos experimentalmente ao modelo de	
Peppas-Korsmeyer para NP, NPQTS e NPQTSFOL	125
Figura 62. Reação de hidrólise ácida do PLGA	131
Figura 63. Variação temporal do pH das amostras de NP de PLGA	132
Figura 64. Variação temporal do pH das amostras de NPQTSFOL	132

Figura 65. Variação temporal do pH das amostras de NPQTS	133
Figura 66. Micrografias da amostra liofilizada NPQTS-SAC	136
Figura 67. Espectros de absorção no infravermelho de 5-FU, PLGA,	
sacarose: (a) MF-SAC; (b) MF; (c) NP-SAC; (d) NP	137
Figura 68. Espectros de absorção no infravermelho de 5-FU, PLGA, QTS,	
sacarose para comparação com: (a) MFQTS-SAC; (b) MFQTS; (c)	
NPQTS-SAC; (d) NPQTS	138
Figura 69. Espectros de absorção no infravermelho de 5-FU, PLGA,	
QTSFOL, sacarose para comparação com: (a) MFQTSFOL-SAC; (b)	
MFQTSFOL; (c) NPQTSFOL-SAC; (d) NPQTSFOL	139
Figura 70. Difratogramas de 5-FU, PLGA e SAC para comparação com	
MF; MFSAC; NP; e NP-SAC	140
Figura 71. Difratogramas de 5-FU, PLGA, SAC e QTS para comparação	
com MFQTS; MFQTS-SAC; NPQTS; e NPQTS-SAC	140
Figura 72. Difratogramas de 5-FU; PLGA; SAC; ácido fólico; QTS;	
QTSFOL para comparação com MFQTSFOL; MFQTSFOL-SAC;	
NPQTSFOL; e NPQTSFOL-SAC	141
Figura 73. Curvas de DSC de 5-FU; PLGA; SAC; e das formulações de	
NP de contendo 5-FU	142
Figura 74. Curvas de DSC de 5-FU; PLGA; SAC; QTS; e formulações de	
NP recobertas QTS	142
Figura 75. Curvas de DSC de 5-FU; PLGA; SAC; QTSFOL; e formulações	
de NP recobertas QTSFOL	143
Figura 76. Curva de TGA das NP de PLGA e 5-FU (a) % massa vs.	
temperatura (°C) e (b) δ (mg/°C) vs. temperatura (°C)	144
Figura 77. Curva de TGA das amostras contendo QTS (a) % massa vs.	
temperatura (°C) e (b) δ (mg/°C) vs. temperatura (°C)	144
Figura 78. Curva de TGA das amostras contendo QTSFOL (a) % massa	
vs. temperatura (°C) e (b) δ (mg/°C) vs. temperatura (°C)	145
Figura 79. Fluxograma I – Etapas da preparação da formulação NP	151

Figura 80. Fluxograma II – Etapas da preparação das formulações	
NPQTS e NPQTSFOL	152
Figura 81. Fluxograma III – Etapas de caracterização das formulações	
NP, NPQTS e NPQTSFOL	152
Figura A1. Micrografias das NP – 20800 xg por 30 min	167
Figura A2. Micrografias das NP - 20800 xg por 60 min	167
Figura A3. Micrografias das NP – 83000 xg por 30 min	168
Figura A4. Micrografias das NP - 83000 xg por 60 min	168
Figura A5. Micrografias das NP – 186800 xg por 30 min	168
Figura A6. Micrografias das NP – 186800 xg por 60 min	170
Figura A7. a) 0% crioprotetor; b) 10% sacarose; c) 25% sacarose; d) 50%	
sacarose; e) 10% trealose; f) 25% trealose; g) 50% trealose	174
Figura A8. Curvas obtidas para cada linhagem de células no primeiro	
teste realizado com 5-FU e NP	169
Figura A9. Gráfico de IC ₅₀ para as diferentes linhagens de células obtidas	
no segundo teste realizado com 5-FU e as formulações de NP,	
NPQTSFOL, NPQTS e NP _{BRANCO}	176

I. INTRODUÇÃO

Muitas das propriedades farmacológicas de fármacos convencionais podem ser melhoradas através do uso de sistemas carreadores, como partículas lipídicas ou poliméricas, ciclodextrinas, micro/nano-emulsões, hidrogéis, dendrímeros, etc. Estes são projetados para alterar a farmacocinética e a biodistribuição do ativo associado e/ou funcionar como reservatório, isto é, sistema para liberação sustentada e contínua (Allen & Cullis, 2004). Sistemas carreadores coloidais como soluções micelares, vesículas, dispersões de cristais líquidos е micro/nanopartículas são uma grande promessa para entrega de fármacos. O objetivo dessas formulações é obter sistemas com características otimizadas, como as propriedades de liberação, longo tempo de vida na prateleira, baixa toxicidade e imunogenicidade (Mohanraj & Chen, 2006).

A caracterização de carreadores é de fundamental importância para o sucesso de seu funcionamento. Em cada um desses sistemas as interações interpartículas e com as moléculas do fármaco são específicas e dependem da superfície e da natureza química dos constituintes. As interações mais comuns são constituídas por forças de van der Waals e interações eletrostáticas, além daquelas associadas ao estado do sólido, devido à presença de regiões amorfas, impurezas e polaridades de sítios específicos. O estado físico de qualquer formulação está relacionado à estabilidade química e física e ao desempenho terapêutico do ativo (Hickey et al., 2007).

No caso de formulações sólidas, os métodos clássicos para caracterização são difratometria de raios-X e análises térmicas. A primeira fornece o grau de organização a longa distância, a extensão e natureza da cristalinidade, microestrutura e nanocristalinidade. As análises térmicas indicam polimorfismo, hidratos, tipo de interações e transições de fase. A morfologia pode ser caracterizada por microscopia de força atômica (MFA), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), entre outras. (Hickey et al., 2007).

1

A caracterização de suspensões envolve a avaliação morfológica, distribuição do tamanho das partículas, determinação do potencial zeta (ζ) e do pH, determinação da quantidade de fármaco associado às estruturas, cinética de liberação do fármaco e estabilidade em função do tempo de armazenamento (Schaffazik et al., 2003).

1. Nanotecnologia e Sistemas Coloidais

O termo "nanotecnologia" deriva da palavra grega nano e possui o significado de anão, sendo aplicada nas áreas de engenharia, eletrônica, física, ciência de materiais e na manufatura em níveis moleculares e submicrômetro (Wilkinson, 2003).

Em fins do século XIX, Paul Erlich propôs um modelo para transporte de fármacos em que estes deveriam ser idealmente colocados em um veículo que seria seletivo e especificamente dirigido ao local a ser tratado. Deste modo, os efeitos colaterais e adversos seriam minimizados ou evitados ocorrendo, ao mesmo tempo, aumento da eficácia terapêutica do fármaco. As primeiras tentativas para obtenção de um vetor eficaz para entrega seletiva de fármacos foram feitas com a encapsulação de biomoléculas em vesículas de Nylon e de outros polímeros sintéticos. Entretanto, este sistema de transporte se mostrou inadequado pelo fato destes polímeros não serem biodegradáveis.

A situação começou a mudar no início da década de 1960 quando Bangham et al. (1965), investigando a difusão de íons através de membranas lipídicas artificiais, verificaram que fosfolipídios quando colocados em solução aquosa formavam vesículas esféricas, mais tarde denominadas lipossomas. Apenas após 10 anos, Gregoriadis (1973) propôs que estas vesículas poderiam ser empregadas como sistemas carreadores de fármacos hidrofílicos em seu cerne aquoso, hidrofóbicos e anfifílicos em suas bicamadas. Tais veículos poderiam atuar como sistemas para liberação sustentada e contínua dos fármacos neles encapsulados e poderiam, assim, apresentar algumas vantagens em relação às administrações convencionais.

2

Para ilustrar, a Figura 1 mostra, de forma genérica, a janela terapêutica de um fármaco e perfil temporal de sua concentração, no plasma, quando administrado via oral e através de um vetor que provê liberação sustentada.



Figura 1. Variação temporal da concentração do fármaco administrado via rota tradicional (B) e via carreador (A).

Geralmente os sistemas mais apropriados a satisfazer às idéias de Erlich são os coloidais. Tais sistemas devem ser química e fisicamente estáveis quando estocados, mas uma vez administrados devem sofrer transformações de modo a promover liberação sustentada e contínua dos fármacos neles contidos.

As principais vantagens de utilizar sistemas coloidais são aumento da biodisponibilidade oral; diminuição da variabilidade e da interferência da alimentação; desenvolvimento de formulação para administração endovenosa; direcionamento do fármaco em local específico e, portanto, redução da toxicidade; aumento do tempo de vida, etc. (Mader & Mehnert, 2005).

A teoria DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) é usada para avaliar a estabilidade de suspensões hidrofóbicas. Essa teoria define um sistema coloidal como estável se o mínimo primário (agregação irreversível) é separado por uma barreira de potencial suficientemente alta, da ordem de 10kT. Como as forças de Van der Waals são sempre de atração entre as partículas de mesma espécie, a multiplicidade de interações entre pares de átomos ou moléculas em partículas adjacentes são levadas em consideração para o cálculo das forças de atração. Assim, as primeiras equações foram desenvolvidas por Hamaker com base na aditividade das energias de Van der Waals entre as moléculas (Florence & Atwood, 2003).

Nanopartículas coloidais tendem a precipitar ou flocular, pois há forças atrativas e repulsivas de longo alcance que agem entre elas. Para evitar esse fenômeno, pode-se estabilizá-las por meio de estabilização estérica ou eletrostática. No caso de estabilização estérica, o uso de macromoléculas nãoiônicas como estabilizantes de superfície surgiu desde o aparecimento da teoria DLVO. As forças estabilizadoras provêm da repulsão das camadas de interação do polímero com a aproximação de partículas com as macromoléculas hidratadas levando a uma variação entálpica positiva, ou seja, levando à interação estérica das cadeias (Florence & Atwood, 2003).

As forças e o tipo da interação do polímero com a superfície podem fazer grande diferença. A camada polimérica ligada a uma partícula deve repelir a camada ligada à outra partícula, gerando um estresse entre as cadeias. Um modo de aliviar este estresse é através da desorção da superfície dessa partícula. Portanto, moléculas ligadas fortemente são mais eficientes para estabilização. Além disso, a superfície deve estar completamente coberta com o polímero para impedir que o estresse seja aliviado por movimentos laterais de suas cadeias na superfície da partícula, o que pode resultar num afinamento da cobertura através de colisões pelo movimento browniano (Florence & Atwood, 2003).

Quanto à estabilização eletrostática, a carga das partículas provém da ionização dos grupos na superfície ou da adsorção de íons que fornecem as suas cargas superficiais. Uma superfície com carga positiva atrai uma camada de íons negativos na superfície na camada de Stern e a dupla camada difusa ou elétrica que se acumula, contendo íons positivos e negativos (Figura 2). As "forças eletrostáticas" provem da interação das duplas camadas elétricas que envolvem as partículas em suspensão (Florence & Atwood, 2003).

4




A medida mais próxima do potencial de superfície destas partículas é o potencial da camada de Stern (ψ_0), difícil de obter experimentalmente. Sua medida experimental aproximada é o potencial zeta (ζ), localizado na superfície de cisalhamento, um pouco mais distante da camada de Stern e dependente da rugosidade da superfície, das macromoléculas adsorvidas, etc.

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

Este potencial é um indicador útil dessa carga e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. O aumento da concentração de eletrólitos em uma suspensão diminui a espessura da dupla camada e reduz os efeitos de repulsão e de resistência a deformação da nuvem iônica levando à coagulação das partículas (Florence & Atwood, 2003).

Resumindo, a estabilidade química dos colóides é determinada por sua composição, devendo ser empregadas, por exemplo, substâncias que não se

oxidam, não sofrem hidrólise facilmente e que sejam estáveis durante a administração. Quanto à estabilidade física, esta depende de (Florence & Atwood, 2003):

- Efeitos de solvatação devidos às interações das moléculas do soluto e do solvente;
- Interações estéricas relacionadas ao tamanho, geometria e conformação das moléculas adsorvidas nas superfícies das partículas;
- Interações atrativas oriundas de forças de dispersão que estão relacionadas à polarizabilidade molecular;
- Interações eletrostáticas provenientes de grupos funcionais carregados existentes na superfície das partículas coloidais.

2. Carreadores

Vários sistemas de liberação de fármacos são encontrados na literatura e alguns fármacos encapsulados já estão comercialmente disponíveis. Alguns destes sistemas são ilustrados na Figura 3 e estão descritos a seguir.



Figura 3. Representação esquemática de alguns sistemas para entrega de fármacos.

a) Ciclodextrinas

São oligossacarídeos cíclicos que apresentam grande potencial como hospedeiros. As mais utilizadas contêm 6 (α , ciclohexa-amilose), 7 (β , ciclohepta-amilose) e 8 (γ , cicloocta-amilose) unidades glicopiranosídeas conectadas via ligações glicosídicas α -1,4. Apresentam uma cavidade central hidrofóbica, com superfície hidrofílica, em forma de cone oco, truncado. A preparação de complexos de inclusão é bastante simples. O procedimento mais comum é agitar ou misturar a ciclodextrina numa solução aquosa (fria ou quente, neutra, alcalina ou ácida) contendo moléculas do hóspede (Szejtli, 1988).

b) Nanosuspensões e nanocristais

Nanosuspensões consistem de fármacos pouco solúveis em água, dispersos em um meio líquido. A produção de nanocristais e nanosuspensões é chamada "nanonisação". O fármaco em pó é homogeneizado por alta pressão, moagem úmida em moinhos especiais ou técnicas como nanocristalização de suspensão supersaturada ou *spray-drying* (Kayser et al., 2005).

c) Nanopartículas lipídicas sólidas

Consistem de uma matriz (na qual o fármaco é incorporado) lipídica, sólida, cujas partículas têm diâmetro médio menor que 1 µm. Em sua preparação podem ser empregados homogeneização a alta pressão e dispersor de alta velocidade. Geralmente é usada grande quantidade de surfatantes para evitar agregação e estabilizar a dispersão (Kayser et al., 2005).

d) Micro/nanopartículas poliméricas

Inclui nanocápsulas, micro e nano-esferas. São formadas por polímeros biodegradáveis consistindo de poliésteres sintéticos ou polímeros naturais (Schaffazik, 2003; Kayser et al., 2005). Essas partículas serão mais bem detalhadas na seção 5.

e) Hidrogéis

São redes poliméricas, hidrofóbicas, tri-dimensionais, capazes de intumescer em água ou em fluidos biológicos, retendo grande quantidade de fluidos. A habilidade de absorver água é devido à presença de grupos hidrofílicos, e a possibilidade de moléculas difundirem e serem liberadas permite seu uso como carreadores. As técnicas de síntese envolvem copolimerização/reticulação de co-monômeros utilizando agente de reticulação. A polimerização é feita por um iniciador químico e pode ocorrer em solução ou em suspensão. Outro método envolve a reticulação de polímeros lineares por radiação ou por compostos químicos (Satish et al, 2006). A quantidade de água presente nos HG pode ser determinada empregando sondas moleculares, DSC ou RMN, sendo feitos experimentos de permeação, porosidade e caracterização reológica (Hoffman, 2002).

g) Lipossomas

São estruturas vesiculares consistindo de bicamadas lipídicas hidratadas que se formam espontaneamente quando fosfolipídios são dispersos em água (Sharma et al, 2009). Podem ser classificados de acordo com o número de lamelas (vesículas uni, oligo e multilamerares), pelo tamanho e pelo método de preparação. Vesículas unilamelares contem uma bicamada lipídica e apresentam diâmetro de 50-250 nm, possuem um grande núcleo aquoso e são utilizados para encapsular fármacos hidrofílicos. Vesículas multilamelares apresentam múltiplas bicamadas lipídicas onde é possível encapsular fármacos lipofílicos (Immordino et al., 2006).

h) Micelas poliméricas

São estruturas macromoleculares, formadas por copolímeros em bloco ou copolímeros enxertados em solução aquosa. As forças de coesão do núcleo, como forças eletrostáticas, interações π - π e pontes de hidrogênio, são a força motriz para formação das micelas. As moléculas do ativo são química ou

fisicamente retidas no núcleo das micelas, podendo conseguir uma concentração local maior que aquela ditada por sua solubilidade intrínseca (Yokoyama, 2005).

i) Cristais líquidos

Combinam as propriedades do estado líquido e do sólido. Podem ter diferentes geometrias, com camadas polares e não-polares alternadas (fase lamelar) onde soluções aquosas do fármaco podem ser incluídas (Kaparissides et al.,2006).

j) Dendrímeros

Apresentam tamanho nanométrico, altamente ramificado, com macromoléculas monodispersas e com arquitetura simétrica. Consistem de um núcleo central, com ramificações e grupos funcionais terminais. O núcleo e as unidades internas determinam o meio das nano-cavidades e as propriedades de solubilização, enquanto os grupos externos determinam a solubilidade e o comportamento químico destes polímeros (Kaparissides et al.,2006).

3. Caracterizações físico-químicas

a) Avaliação morfológica

As técnicas de MEV e MET têm sido bastante empregadas na obtenção de informações relativas à forma e tamanho das partículas. MET permite diferenciar nano-esferas e nanocápsulas e, ainda, possibilita determinar a espessura da parede. MFA fornece informações, com alta resolução tridimensional, em escala nanométrica, sendo capaz de resolver detalhes, em escala atômica, de superfícies (Schaffazik et al., 2003).

Uma das principais características do MEV é que qualquer radiação proveniente da amostra ou qualquer mudança da medida na amostra pode ser usada para fornecer o contraste da imagem. Cada sinal é resultado de alguma interação particular entre elétrons incidentes e a amostra, podendo fornecer diferentes informações sobre a amostra (Goodhew & Humphreys, 1988).

b) Distribuição de tamanho e polidispersão

Os métodos mais comuns para determinar a distribuição de tamanho são: espalhamento dinâmico de luz, espectroscopia de correlação de fótons, espectroscopia fotoacústica, MEV ou MET. Dependendo da formulação e do método, podem-se observar diferenças de tamanho de partículas, uma vez que as técnicas de microscopia fornecem imagens de cada partícula individual. A espectroscopia de correlação de fótons possibilita determinar o raio hidrodinâmico das partículas em suspensão, enquanto que o espalhamento dinâmico de luz possibilita determinar o diâmetro médio e a polidispersidade das partículas em suspensão (Schaffazik et al., 2003).

c) Potencial zeta (ζ)

Este parâmetro é determinado através de técnicas de eletroforese ou utilizando espalhamento dinâmico de luz. Ele reflete o potencial de superfície das partículas, que é influenciado por mudanças na interface com o meio dispersante, como dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Um valor, em módulo, relativamente alto (maior que 20 mV) é indicativo de boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal (Schaffazik et al., 2003).

e) pH das suspensões

Medidas de pH em função do tempo fornecem informações sobre a estabilidade das suspensões, pois a mudança de pH pode indicar degradação do carreador, ionização ou dissociação de grupos presentes em sua superfície (Schaffazik et al., 2003).

f) Difratometria de raios-X (DRX)

Esta técnica consiste na incidência da radiação em uma amostra e na detecção dos fótons difratados. Em um material cristalino, no qual os átomos guardam distribuição espacial periódica, a difração de raios-X ocorre nas direções de espalhamento que satisfazem a lei de Bragg (Skoog et al., 2002). Esta técnica

também possibilita observar a dispersão do fármaco na matriz de NP (Schaffazik et al., 2003).

g) Espectroscopia de absorção no infravermelho (IV)

Os espectros de moléculas, na região do IV, têm origem na absorção de energia que causa transições entre estados roto-vibracionais de um mesmo estado eletrônico (Skoog et al., 2002). Esta técnica permite confirmar a ausência de ligações químicas entre as moléculas hóspedes e hospedeiras e as interações e dispersão do fármaco na matriz de NP (Schaffazik et al., 2003).

h) Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Alterações estruturais de materiais são acompanhadas por trocas de calor, como absorção de calor durante fusão ou liberação durante cristalização. DSC é uma técnica apropriada para medir trocas de calor quando a amostra é submetida a um processo controlado de aquecimento, permitindo obter informações sobre propriedades estruturais da amostra. Entretanto, não fornece diretamente a causa do evento térmico. A natureza destas transições deve ser determinada por métodos complementares como TGA, DRX e técnicas espectroscópicas (Griffin & Laye, 1982). DSC tem sido utilizada para investigar interações entre polímeros e fármacos, em diversas formulações de micro-esferas e nanoparticulas, para investigar reações químicas (polimerização, despolimerização e degradação), para caracterizar o estado físico dos sistemas e para obter informações sobre a organização de outros componentes destas formulações (Schaffazik et al., 2003). É também bastante utilizada para detectar se o carreador aumenta a estabilidade do fármaco (Jorgensen et al., 2006).

i) Análise termogravimétrica (TGA)

Nesta análise, a massa de uma amostra, sob atmosfera de gás inerte ou oxidante, é monitorada continuamente em função de uma variação de temperatura ou do tempo à medida que a temperatura da amostra aumenta quando a amostra é submetida a um processo controlado de aquecimento. São obtidas duas curvas

(chamadas curvas de TGA) em função da temperatura: uma delas relacionada ao percentual da massa e outra à derivada, em relação à temperatura, desse percentual. Esta última permite a determinação precisa da temperatura em que ocorre perda de massa da amostra. A informação obtida através da TGA é mais limitada que a obtida por DSC, porque na TGA a variação de temperatura deve ser suficientemente elevada para provocar alteração na massa da amostra analisada (Skoog et al., 2002).

4. Vias de administração de carreadores

Esses sistemas podem ser administrados por diversas vias ao organismo. O transporte através das membranas biológicas deve-se a fatores como: ligação a proteínas, baixa solubilidade, ligações a outros sítios e ionização dos ativos,etc. Em relação à ionização, uma hipótese sugere que a permeabilidade de ativos seja maior quando este não está ionizado devido à natureza lipofílica da membrana. A ionização irá depender do pH do local de absorção. Além disso, dependendo do valor de pH, há também diferenças no pH da superfície da membrana devido a concentração hidrogeônica ser mais elevada do que a global, como no caso de células tumorais. Algumas vias de administração são descritas a seguir (Florence & Atwood, 2003):

Na administração via oral, a maioria dos fármacos é absorvida no intestino por difusão passiva através das membranas lipídicas que separam o conteúdo do intestino do resto do organismo. A absorção de partículas coloidais também pode ser feita no intestino através de células especializadas do tecido linfóide associado ao intestino. Quanto à absorção bucal e sublingual, não é conhecida a extensão de absorção dos fármacos e, provavelmente, a maioria deles é absorvida por simples difusão. No entanto, esse meio evita a exposição ao sistema gastrointestinal (SGI), a qual também é evitada pelas vias intravenosa, intramuscular, subcutânea e transdérmica.

Quanto à liberação transdérmica, o ativo deve penetrar o estrato córneo, que se comporta como uma barreira à difusão passiva. A penetração também

pode ser via folículos pilosos ou dutos sudoríparos, em menor proporção. O caminho de transporte de moléculas hidrofílicas é trans-celular e envolve a passagem através de células e paredes celulares. Quanto a moléculas lipofílicas, o caminho do ativo é do lipídeo endógeno dentro do estrato córneo. O veículo apresenta papel importante na terapia tópica, porque permanece no local aplicado, podendo diminuir a concentração de componentes voláteis e aumentar a de componentes não-voláteis da formulação. Essa via é uma alternativa à via oral, pois, além de evitar alterações no meio SGI, o ativo pode ser introduzido na circulação sistêmica sem passar pelo fígado (isto é, não há o chamado efeito da primeira passagem).

Na absorção retal, em supositórios, as substâncias entram em contato íntimo com a mucosa retal onde o pH está entre 7,2 e 7,4. A principal veia do reto é a retal superior (hemorroidal). Veias da parte inferior do plexo submucoso transformam-se nas veias retais que drenam para as veias pudendas internas. A via venosa específica do ativo depende da extensão de migração do supositório em sua forma original ou derretida ao longo do trato gastrointestinal. Assim, a via retal pode ou não evitar a passagem pelo fígado. A etapa limitante na absorção do ativo dissolvido e não sua velocidade de dissolução nos fluidos corpóreos (Florence & Atwood, 2003).

5. Micro/nanopartículas poliméricas

Micropartículas (partículas com diâmetro de 1 μ m a 1000 μ m) e nanoparticulas (partículas com diâmetro de 1 nm a 1000 nm) podem ser classificadas como esferas, no caso de serem sólidas, ou cápsulas, se forem ocas. São carreadores heterogêneos, formados por polímeros naturais (polissacarídeos como a quitosana, dextranas, alginatos, etc.) ou sintéticos (ácido poli lático, co-polímero entre ácido poli-lático e glicólico, (PLGA); poli- ϵ -caprolactona (PCL); poli-hidroxibutirato (PHB), poli-alquilcianoacrilatos, entre

outros. Constituem um dos sistemas importantes para encapsulação e liberação sustentada de fármacos *in vivo*.

Nas micro/nano-esferas o fármaco se encontra homogeneamente disperso no interior da matriz polimérica ao contrário do que ocorre com micro/nanocápsulas que atuam mais como reservatórios contendo o fármaco em seu interior. Micro/nano-esferas e micro/nano--cápsulas desejáveis para encapsulação de fármacos devem ser biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicas, não imunogênicas e passarem despercebidas ao patrulhamento exercido pelas células do sistema do retículo endotelial (RES). Devem ser também capazes de encapsular fármacos hidrofílicos, hidrofóbicos e anfifílicos e promover a liberação sustentada, contínua e, se possível, controlada do fármaco encapsulado, colocando-o especifica e seletivamente apenas no local em que ele é necessário (Moghimi et al., 2006; Schaffazick et al., 2003), durante o tempo necessário ao tratamento.

Esses veículos podem ser administrados em forma fluidizada com um líquido carreador, permitindo seu uso em preparações para infusão intravascular, emulsões injetáveis para administração parenteral e entérica, supositórios e para dose de vacinas com injeção subcutânea ou intramuscular (Song et al., 1997).



Figura 4. Representação esquemática de nano-cápsulas (a e b) e nano-esferas poliméricas (c e d): a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso; b) fármaco adsorvido à parede polimérica; c) fármaco retido na matriz polimérica; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica (Schaffazick et al., 2003). Estes sistemas também devem apresentar: estabilidade física, química e biológica, durante e após a encapsulação; maior eficiência de encapsulação; tamanho compatível com a via de administração; facilidade de preparação para administração; e serem esterilizáveis.

São pouco tóxicos, relativamente pouco imunogênicos, biodegradáveis e capazes de proteger os compostos terapêuticos encapsulados da diluição e degradação no sangue, de forma que quando alcançam os locais que necessitam de tratamento podem liberar gradativamente doses concentradas de fármaco aumentando sua eficácia. Essas partículas assim agem porque modificam as propriedades farmacocinéticas, o tempo de trânsito na circulação sanguínea e o metabolismo da substância encapsulada.

Micro/nano esferas podem ser estudadas em relação a fatores como estabilidade térmica, pH, força iônica, tipo de solvente, tempo de incubação, razão entre as concentrações do fármaco e das micro-esferas, eficiência do encapsulação, tamanho, etc. Na caracterização destes sistemas podem ser utilizadas as técnicas analíticas já mencionadas. Além disso, é necessário avaliar o comportamento desses sistemas em relação às células *in vitro* e *in vivo*.

Nanoparticulas poliméricas são mais estáveis no SGI que outros carreadores, como lipossomas, e podem proteger os ativos encapsulados nesse meio. Através do uso de diversos materiais poliméricos pode ser feita modelagem de suas características físico-químicas, do perfil de liberação e de seu comportamento biológico. A superfície destas partículas pode ser modificada por adsorção ou ligação química de, por exemplo, polietileno glicol, poloxâmeros e moléculas bio-ativas, como lecitinas e quitosana. Além do mais, o pequeno tamanho destas partículas e sua grande área superficial favorecem sua absorção, quando comparado a carreadores maiores (Rieux et al., 2006).

Polímeros sintéticos de interesse nessa área podem ser divididos em dois grupos: os poliésteres, como a poli-ε-caprolactona (PCL), e vários outros do ácido poli-lático (PLA) sozinho ou co-polimerizado com ácido glicólico (PLGA), os polialquilcianoacrilatos (PACA), cujos monômeros são tóxicos, e os polihidroxialcanoatos, como o poli-hidroxibutirato (PHB) que são produzidos a partir

do açúcar de cana por fermentação e tem custo competitivo com os polímeros sintéticos importados (Reis et al, 2006).

Atualmente, os polímeros sintéticos biodegradáveis mais utilizados e que a aplicação clínica já foi aprovada pelo FDA são os derivados do ácido poli-lático e seus co-polímeros com ácido glicólico (PLGA, ácido poli(lático-*co*-glicólico)). São carreadores empregados para reduzir toxicidades clínicas sistêmicas de fármacos e para aumentar sua eficácia terapêutica (Greim et al., 1993).

O polímero do ácido lático é disponível na forma oticamente ativa (L-PLA) e na forma racêmica (oticamente inativa (DL-PLA)) enquanto o ácido glicólico não forma esta mistura. A organização estrutural da cadeia de PLA determina seu estado físico. O isômero D-PLA é cristalino, com estrutura altamente regular enquanto DL-PLA é amorfo. O PLGA também é cristalino e sua cristalinidade depende das proporções relativas de ambos os monômeros. Quimicamente são possíveis polímeros PLGA com diferentes proporções entre o ácido lático e glicólico e com diferentes massas molares. Estes três fatores (massa molar, proporções entre os monômeros e natureza do grupo terminal) estão diretamente relacionados à velocidade de degradação do polímero, a qual pode variar de alguns meses até anos (Greim et al., 1993). As estruturas de alguns poliésteres são mostradas na Figura 5.



Figura 5. Fórmulas estruturais de alguns poliésteres biodegradáveis.

De modo geral, as partículas formadas por polímeros com grupos terminais ácidos sofrem degradação mais rápida (e, portanto, liberam mais rapidamente maior quantidade de fármaco encapsulado) que os com grupos ésteres. Os produtos de degradação (ácido lático e glicólico) são eliminados pelo organismo na forma de CO₂ e água. Caso o polímero seja mais rico em unidades glicólicas (acima de 70%) são mais amorfos e degradam mais rapidamente. Por outro lado, com a redução da massa molar a degradação é mais rápida devido ao aumento dos grupos terminais -COOH acelerando a catálise ácida (Göpferich, 1996). Portanto, a taxa de degradação depende dos fatores:

- Massa molar e proporção entre os co-polímeros;
- Proporção de domínios amorfos e cristalinos (os amorfos degradam mais rapidamente);
- Porosidade (número e tamanho dos poros);
- Terminação da cadeia polimérica.

Como mencionado, muitos fatores influenciam as características da micro/nano-esferas. Vários autores estudaram a preparação destes sistemas através de planejamento fatorial. Entre eles, podem ser citados Bozkir & Saka (2005), que investigaram fatores que influenciam a formulação de nano-esferas de PLGA com 5-FU, e Parikh et al. (2003) que otimizaram os parâmetros de encapsulação através de um planejamento fatorial 3².

Zambaux et al. (1998) também estudaram a influência de parâmetros experimentais na preparação de nanoparticulas de PLA preparadas pelo método de dupla emulsão, como o tipo de surfatante (álcool polivinílico ou albumina), a temperatura de transição, o método de evaporação de solvente, o volume da fase aquosa, a concentração do surfatante e a massa molar polimérica.

Diversos surfatantes são utilizados na preparação de micro/nanoparticulas. Um dos mais utilizados é o PVA (álcool polivinílico), porém ele é tóxico e não biodegradável, acumulando no organismo. Assim, partículas produzidas com PVA devem ser lavadas muitas vezes para reduzir o resíduo de PVA contido na superfície das nanoparticulas o que diminui o rendimento do processo (Silva, 2006). Em vista destes fatos, nesta Tese foi utilizado D-α-tocoferil polietileno glicol 1000 succinato (TPGS, Figura 6) como surfatante. TPGS é um derivado, solúvel em meio aquoso, da vitamina E natural, o qual tem estrutura anfifílica, consistindo de uma cauda alquil lipofílica e uma cabeça polar hidrofílica (tocoferol succinato). É uma forma segura e efetiva de usar essa vitamina para reverter ou prevenir sua deficiência e ainda pode também aumentar a sua biodisponibilidade oral (Mu & Feng, 2002).



Figura 6. Estrutura molecular do TPGS.

Devido à sua grande estrutura e área superficial, TPGS é excelente emulsificante, solubilizador e aumenta a biodisponibilidade de fármacos hidrofóbicos. O balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) de TPGS é 13, ele funde a 37-41 °C e é estável em temperatura menor que 200 °C. Sua massa molar média é 1513 g/mol. Diversas referências utilizam TPGS como surfatante, obtendo ótimos resultados, como a diminuição do tamanho das partículas, menor polidispersidade e maior eficiência de encapsulação em relação a outros surfatantes, como o álcool polivinílico. Além dessa propriedade, TPGS é utilizado para acoplar PEG à superfície de nanoparticulas para aumentar o tempo de residências destas (Mu & Feng, 2002; Zhang e Feng, 2006; Mu et al., 2004). Zhang e Feng (2006) demonstraram que a concentração de 0,03% de TPGS é excelente para preparar nanoparticulas de PLGA e PLA-TPGS.

TPGS é preparado pela esterificação do polietileno glicol 1000 ao grupo succinato do d- α -tocoferol; é estável em condições normais, mas reage em

soluções alcalinas. Sua absorção é feita sem necessidade da presença de sais biliares, pois tem habilidade de transferir vitamina E às células intestinais sem assistência alguma, enquanto que vitamina E requer uso de sais biliares para a absorção no lúmen intestinal através das células intestinais (Mu & Feng, 2002).

6. Preparação de nanoparticulas poliméricas

6.1. Métodos de preparação (Mohanraj & Chen, 2006; Murakami et al, 1999)

6.1.1. Dispersão de polímeros pré-formados: utilizada para preparar nanoparticulas de polímeros biodegradáveis e pode ser classificada em:

a) Método de evaporação do solvente: o polímero é dissolvido num solvente orgânico, que é o mesmo utilizado para dissolver os fármacos hidrofóbicos. A mistura é, então, emulsionada numa solução aquosa contendo surfatante para formar uma emulsão óleo/água. Após a formação da emulsão estável, o solvente orgânico é evaporado ou por pressão reduzida ou por agitação contínua. A evaporação do solvente orgânico faz que as nanoparticulas se solidifiquem, formando as nanoparticulas poliméricas. Nesse processo, as partículas tendem a agregar devido à alta quantidade de solvente residual durante o processo de evaporação do solvente. Birnbaum et al. (2000), num estudo sobre otimização de técnicas de preparação de NP de PLGA, mostrou que todas as formulações em que se usou diclorometano com diferentes surfatantes, houve agregação.

b) Emulsificação espontânea ou método de difusão do solvente: um solvente miscível com água (geralmente acetona) é utilizado para preparar as nanoparticulas. Nesse processo, a solução polimérica é gotejada na solução de tensoativo, sob agitação, e as NP são produzidas do seguinte modo: quando a solução polimérica é adicionada, gotas da emulsão são formadas na fase aquosa e o solvente se difunde rapidamente para fora da gota reduzindo o tamanho das

nanoparticulas. Como as nanoparticulas se formam instantaneamente, este método pode ser altamente benéfico em termos de encapsulação de fármacos.

Misturas binárias de solvente miscível e outro imiscível ou de dois solventes miscíveis também podem ser aplicadas (método de emulsificação espontânea e difusão do solvente) (Murakami et al, 1999). O aumento do rendimento utilizando dois solventes miscíveis está relacionado com o comportamento de separação de fase. Num sistema utilizando metanol/acetona ou etanol/acetona – álcool é o solvente pobre para PLGA e acetona é o solvente bom para o polímero. O ponto de névoa (*cloud point*) é obtido com a titulação do álcool na solução de PLGA em acetona e o valor dessa composição fornece o maior rendimento.

A quantidade de um solvente com maior miscibilidade com água facilita a indução da deposição e formação das partículas. Quando a solução de PLGA é dispersa na solução de surfatante, a perturbação do sistema produz instantaneamente grande área interfacial, que leva a formação de gotículas de tamanho nanométrico da solução de PLGA. Esta turbulência interfacial é governada pelo efeito de Gibbs-Marangoni.

6.1.2. Método de polimerização: Neste caso, monômeros são utilizados para formar as partículas numa solução aquosa. O fármaco é incorporado pela sua dissolução no meio de polimerização ou pela absorção nas partículas após a polimerização estar completa. Depois de formadas, estas devem ser purificadas para remover os estabilizadores e surfatantes empregados.

6.1.3. Coacervação ou gelação lônica: envolve a mistura de duas fases aquosas, na qual uma delas está o polímero catiônico ou aniônico (por exemplo, quitosana), e a outra um poliânion (por exemplo, trifosfato de sódio). Assim, os compostos interagem eletronicamente formando coacervados com tamanho na ordem nanométrica. A gelação iônica envolve transição do material de líquido para gel devido à interação iônica, em temperatura ambiente.

6.2. Purificação

A purificação das NP pode ser feita por métodos, como filtração e ultracentrifugação. A primeira técnica é realizada para remover grandes agregados e as técnicas de ultracentrifugação são geralmente empregadas para remoção de solvente orgânico, ativo e surfatante livre, e eletrólitos. Este é o método mais comum para remoção de grandes quantidades de impurezas do processo. Entretanto, a força da centrifugação pode causar *caking*, dificuldade de redispersar as NP e perda de NP no sobrenadante resultando em baixo rendimento do processo. Além destas técnicas, há purificação por diálise, filtração em gel, ultrafiltração, diafiltração e filtração por fluxo tangencial (Dalwadi et al., 2005).

6.3. Liofilização

A liofilização é geralmente feita utilizando crioprotetor, geralmente um açúcar, como manitol, sacarose e trealose. Crioprotetores funcionam abaixando a temperatura de transição vítrea de uma amostra, impedindo seu congelamento e mantendo alguma flexibilidade da mesma, na fase vítrea. Alguns crioprotetores exercem seu efeito via formação de ligações de hidrogênio com as moléculas biológicas quando as moléculas de água são deslocadas pelo vácuo do equipamento. Portanto, como o crioprotetor substitui as moléculas de água, o material retém sua estrutura, embora não esteja mais imerso em meio aquoso (Reis et al, 2006).

7. Modificação das propriedades de superfície

Apesar dos nanocarreadores terem adquirido importância como sistemas de entrega de fármacos, alguns estudos mostraram que NP apresentam a tendência de acumular no fígado e baço. Isto indica que um grande desafio para o emprego destas partículas é evitar o Sistema de Fagocitose Mononulear (MPS)/

Sistema do Reticulo Endotelial (RES). Células do RES são constituídas principalmente pelas células de Kupfer do fígado e macrófagos do baço e da medula óssea. O mecanismo de filtração do baço tem papel importante na depuração de partículas coloidais e sua influência aumenta com aumento do tamanho das partículas (Mohanraj & Chen, 2006).

Assim, os principais fatores que influenciam sua distribuição e destino são, além do tamanho da partícula, suas características relativas à carga e hidrofobicidade. Partículas menores que 200 nm não são facilmente reconhecidas pelo RES, enquanto partículas maiores podem ser filtradas e removidas pelo corpo (Nahar et al., 2006).

Porém, a tendência das NP serem captadas e sofrerem endocitose/fagocitose pelo MPS oferece oportunidade para entrega dos ativos a essas células e a esses órgãos. Assim, o tratamento de tumores localizados nestes órgãos, como hepatocarcinoma, metástase hepática originada do trato digestivo ou câncer ginecológico, tumor bronco pulmonar, tumores primitivos e metástases, pequenas células tumorais, mieloma e leucemia, leva vantagem em relação ao de outros locais (Mohanraj & Chen, 2006).

Para superar a limitação de rápida depuração e tratar outros tumores que não estão inclusos nos órgão ricos em células de MPS, NP furtivas foram desenvolvidas para serem invisíveis aos macrófagos e fagócitos e, assim, conseguir atingir o local de ação (Mohanraj & Chen, 2006). Essas NP foram desenvolvidas através da modificação ou funcionalização de sua superfície pela cobertura ou conjugação com polímeros hidrofílicos e polissacarídeos, por peguilação e por ancoramento de ligantes e anticorpos. O conceito de nanoparticulas funcionalizadas com ligantes e de longo tempo de circulação é uma realização do conceito da *magic bullet* de Paul Erlich (Nahar et al., 2006; Lemarchand et al., 2004).

A funcionalização da superfície aumenta a eficiência das NP devido à melhora de suas propriedades físico-químicas, como o aumento da solubilidade, prevenção da agregação, aumento da estabilidade em meios biológicos e aumento do carregamento. Essas NP, chamadas de "furtivas", apresentam maior

tempo de residência porque impedem a opsonisação ou a interação com macrófagos devido ao impedimento estérico criado na superfície das NP pelas cadeias dos polímeros. Além disso, a superfície também pode ser funcionalizada com certas moléculas para que ocorra entrega ativa dos fármacos no local de ação devido a um reconhecimento celular sítio-ligante (Nahar et al., 2006).

A opsonização é um processo pela qual um organismo estranho ou partículas são cobertas com opsoninas (imunoglobulinas, lamininas, fibronectinas, colágeno tipo I, etc.) na circulação sanguínea, as quais tornam esse material mais visível para as células fagocíticas. Esses dois processos formam o principal mecanismo de depuração do organismo. Para nanoparticulas poliméricas, geralmente ocorre retirada da circulação sanguínea pelo MPS. Se não forem biodegradáveis, a acumulação nestes órgãos, principalmente fígado e baço, pode levar à toxicidade e a outros efeitos negativos.

Após opsonização, ocorre ligação do fagócito à NP através da ligação das opsoninas em sua superfície. O ultimo passo é a ingestão do material pelos fagócitos que envolvem a endocitose da partícula, seguida da secreção de enzimas e outros fatores químicos óxido-reativos que fragmentam o material fagocitado. Para partículas não-biodegradáveis e moléculas de degradação de alta massa molar, os produtos de degradação serão removidos pelo sistema renal ou pelos órgãos do MPS (Owens III e Peppas, 2006).

Para evitar esse processo, são utilizados polímeros hidrofílicos, adsorvidos ou ligados covalentemente, como: copolímeros em bloco de óxido de etileno e óxido de propileno (polaxamer e polaxamina), homopolímeros de polietileno glicol, polisorbatos, hidroxipropilcelulose, lauril éter de polioxietileno, nonil fenólicos etoxilado e gliceróis etoxilados (Storm et al., 1995). O impedimento da ligação das opsoninas à superfície das NP é realizado pelo impedimento estérico, o que aumenta sua estabilidade no meio biológico. As forças envolvidas nessas interações são as de van der Waals, eletrostáticas, iônicas e hidrofóbicas.

Além disso, a superfície e o potencial da partícula podem ser modulados dependendo do objetivo desejado. Por exemplo, nanoparticulas muco-adesivas podem ser obtidas adsorvendo à sua superfície polímeros catiônicas, como a

quitosana que aderem às membranas biológicas, as quais apresentam carga negativa.

7.1. Ácido fólico

A entrega de fármacos no tratamento de neoplasias malignas apresenta geralmente duas limitações: a pequena seletividade dos agentes quimioterápicos para células cancerígenas, resultando em toxidade inaceitável para tecidos normais e a necessidade de alta solubilidade do agente quimioterápico para acessar a superfície das células do tumor pelo sistema circulatório. Entretanto, a solubilidade lipídica também deve ser alta para que suas moléculas consigam penetrar nas membranas celulares. Essas duas propriedades são difíceis de serem obtidas na mesma molécula. Porém, a conjugação da molécula de um dado fármaco com ácido fólico resolve ambas as limitações (Wang & Low, 1998; Zhang et al., 2007). Ácido fólico, ou ácido pteroil-L-glutâmico, é uma das vitaminas solúveis do complexo B, possui fórmula molecular C₁₉H₁₉N₇O₆ e massa molar 441,4 g/mol. Apresenta coloração amarelo-alaranjada, sob forma de pó cristalino inodoro. Sua estrutura molecular está ilustrada na Figura 7.



Figura 7. Estrutura molecular do ácido fólico.

O direcionamento de fármacos via folato foi descoberto após o grupo de Bart Kamen (University of Texas Southwestern Medical Center – 1986) ter publicado a descoberta do processo de absorção celular do folato por um receptor que media o processo endocitócito. Ácido fólico é requerido por células eucarióticas para reações de transferência de carbono usado na biossíntese de bases de nucleotídeos (purinas e pirimidinas). Portanto, a habilidade de atrair folato é importante para sobrevivência e proliferação de células (Hilgenbrink & Low, 2005).

O transporte celular do folato é mediado pelo carreador de folato reduzido (RFC - *Reduced Folate Carrier*), que apresenta baixa afinidade (K_m ~ 1 μ M) e está presente em praticamente todas as células do organismo, e/ou pela proteína ligante do folato (FBP – *Folate Binding Protein*, 38 kDa), conhecida como receptor de folato ou glicosil-fosfatidilinositol (GPI) - ancorada à membrana glicoproteica, que apresenta alta afinidade pelo ácido fólico (K_D ~100 pM) e está distribuída em apenas alguns locais. RFC é seletivo em facilitar o transporte de apenas formas reduzidas do AF, enquanto FBP transporta também diferentes moléculas ligadas ao folato. Uma vez que os conjugados do folato são ligados a um receptor FBP na superfície da célula, eles são transportados na célula através de um processo denominado de endocitose mediada por receptor. Através desta interação, o complexo folato-FBP é tomado pelas células e se move através de várias organelas envolvidas no tráfego endocitótico, como ilustrado na Figura 8 (Hilgenbrink & Low, 2005; Caliceti et al., 2003).

Duas proteínas isoformes de membranas associadas foram identificadas – tipo α e tipo β – que exibem diferente especificidade para folato e análogos do folato. Ambas as formas tem alta afinidade com ácido fólico (Kd = 100 e 170 pM, respectivamente). A concentração de receptores é altamente elevada em tecidos malignos, como câncer no ovário, endometrial, colo retal, mama, pulmão, renal, metástases do cérebro e carcinomas neuroendócrinos. Assim, o acoplamento de folato a sistemas de entrega de fármacos pode ser empregado no estudo sobre tratamento de diversos carcinomas (Caliceti et al., 2003; Zhang et al., 2007b).



Figura 8. Representação esquemática do mecanismo de endocitose mediada por receptor (Wang & Low, 1998).

Tal estratégia apresenta vantagens importantes quando comparada ao acoplamento de anticorpos ("tumor-specific moclonal antibodies"): baixa imunogeneicidade; rápido extravasamento, permeação do tumor e depuração sistêmica; resistência à desnaturação devido a reações e condições de estocagem; conjugação química simples e definida, que leva a baixo custo de produção e controle mais fácil da qualidade e alta especificidade a tumores (Lee & Low, 2000).

Essa mesma estratégia de terapia é aplicada em estudos de acoplamento de ácido hialurônico (HA) à superfície de nanoparticulas devido à alta quantidade de receptores de HA (CD44) expressos em células tumorais (Hyung et al., 2008).

7.2. Quitosana

Quitosana (QTS) é obtida da desacetilação da quitina (QTA), o segundo biopolímero mais abundante, encontrada em conchas e crustáceos. É composta de copolímeros de glucosamina e N-acetilglucosamina (Figura 9), apresentando em sua estrutura um grupo amino primário e duas hidroxilas livres para cada unidade C₆. Devido à fácil acessibilidade do grupo amino, apresenta carga positiva podendo interagir eletrostaticamente com superfícies de polímeros negativamente carregados, como o PLGA, por exemplo.



Figura 9. Estrutura molecular da (a) quitina e (b) quitosana (Abreu & Campana-Filho, 2005).

QTS é geralmente purificada na forma neutra obtida após dissolução do polímero em solução aquosa diluída de ácido acético, filtração e adição de álcali aquoso até provocar sua precipitação. Também se pode obter sais purificados de quitosana, como cloridrato, resultando num material hidrossolúvel. A quantidade de grupos N-acetil depende das condições de desacetilação e da origem da quitina. Geralmente, amostras com grau de N-acetilação abaixo de 0,3 são denominadas QTS, pois são solúveis em ácido acético diluído. A porcentagem de acetilação é um dos fatores mais importantes que influenciam as propriedades da QTA e da QTS. Inúmeros métodos são utilizados para a sua avaliação: titulação, espectroscopia de absorção no infravermelho, espectroscopia de RMN de ¹H ou de ¹³C em sólidos (Signini & Campana Filho, 2001).

Tan et al. (1998) compararam diversas técnicas para medir o grau de desacetilação (GD) da QTS como UV-Vis, RMN, titulação, teste de Ninidrina, entre outros. Técnicas como IV e NIR são inadequadas para análise devido à presença

de impurezas associadas às cadeias de QTS. Nesse trabalho, foi concluído que as medidas mais próximas do grau de desacetilação foram obtidas por UV-Vis e por RMN, devido à menor interferência de contaminantes. Zhang et al. (2005) estudaram também a determinação do GD por difratometria de Raios-X e compararam com outros métodos, obtendo boa correlação entre os resultados.

QTS é uma base fraca, insolúvel em água e em solventes orgânicos e solúvel em soluções ácidas com pH < 6,5, onde as unidades glucosaminas são convertidas em íons amônio R-NH₃⁺. Em soluções alcalinas ou com poliânions, QTS precipita, formando gel. Suas principais propriedades são: biodegradabilidade, baixa toxicidade, adsorção de íons metálicos, coagulação de suspensões ou solutos, boa biocompatibilidade, capacidade de formar filmes e muco-adesividade devido à interação eletrostática entre a QTS carregada positivamente e a superfície da mucosa carregada negativamente. Essas propriedades podem ser atribuídas a: forte ligação por hidrogênio de seus grupos; flexibilidade da cadeia e propriedades de energia superficial que favorecem seu espalhamento na mucosa.

Existem muitos artigos na literatura baseados na adsorção de QTS em superfícies de micro e nanoparticulas. As principais motivações são a possibilidade de obter NP biomiméticas que escapem do RES levando à maior tempo de circulação; fácil adesão à superfície das NP e bioadesividade, aumentando o transporte através da mucosa intestinal pelas interações específicas entre nanocarreadores e o epitélio intestinal pelo aumento do transporte paracelular (Rieux et al., 2006). Essas partículas são empregadas para diagnóstico, sistemas oftálmicos e intranasais, em quimioterapia, e como carreadores de genes e oligonucleotídeos.

Outra vantagem na utilização de QTS é que, além ser biocompatível e biodegradável, os grupos aminas pode ser ligado a outras moléculas, como ácido fólico, que levam o ativo diretamente ao local de ação (Nahar et al., 2006; Sinha et al.; 2004). Assim, neste trabalho foi sintetizado folato de quitosana (FOL-QTS) para acoplar folato à superfície das nanoparticulas de PLGA e conferir às formulações as propriedades tanto da quitosana quanto do ácido fólico.

Lemarchand et al. (2004) descreveram metodologias para modificar superfícies de nanoparticulas com quitosana: adsorção simples; incorporação da cadeia do polissacarídeo no momento da preparação das nanoparticulas; copolimerização das nanoparticulas com a cadeia do polissacarídeo por polimerização em emulsão ou radicalar e a partir de co-polímeros pré-formados. Kumar et al. (2004) prepararam NS catiônicas de PLGA, utilizando blendas de PVA-QTS pela técnica de emulsão-difusão-evaporação, como carreadores de DNA a partir de interação eletrostática.

Devido às suas características estruturais e fisiológicas, o acoplamento de QTS ou QTS modificada às NP foi considerado para este projeto. A incorporação de QTS nas NP foi estudada por adsorção simples e pela incorporação da cadeia do polissacarídeo no momento da preparação das NPs. A conjugação eletrostática de QTS-FOL foi feita somente por adsorção simples.

8. Sistema de entrega de fármacos para quimioterapia

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, que podem se espalhar (metástases) e se dividir rapidamente, como ilustrado na Figura 10. Importante causa de doença e morte no Brasil, desde 2003, neoplasias malignas constituem-se a segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade. Os cânceres de pulmão, próstata e estômago foram às principais causas de morte por câncer em homens; mama, pulmão e intestino, as principais causas da mortalidade feminina. Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (*World Cancer Report 2008*), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos (http://www.inca.gov.br – acesso Março2010).



Figura 10. Representação esquemática da divisão das células em tecidos e formação do câncer (retirado de http://www.inca.gov.br – acesso Março2010).

A quimioterapia de câncer é procedimento delicado nos quais inúmeros fatores são envolvidos, incluindo o fármaco utilizado, a condição do paciente, a farmacocinética, a dosagem e o período de aplicação (Feng & Chien, 2003).

Quanto à dosagem, um dos grandes problemas é a necessidade do uso de adjuvantes para administração clínica causando efeitos colaterais sérios e a disponibilidade destes antineoplásicos. Cremofor EL (óleo de mamona polioxietilado) e álcool desidratado são os dois adjuvantes mais utilizados. O primeiro causa hipersensibilidade, nefro, neuro e cardiotoxicidade, entre outros efeitos colaterais. A solução injetável de 5-fluorouracil (Adrucil®) contém este adjuvante em sua formulação.

Para tratamento do tumor, é necessário expor suas células à concentração de fármaco suficientemente alta por longo período. O recesso é necessário para que o paciente se recupere. Além disso, acredita-se que o tratamento seja mais efetivo se a concentração do fármaco permanecer por período de tempo maior numa concentração menor do que uma alta dosagem em apenas uma administração.

Quanto à toxicidade, antineoplásicos também podem afetar células sadias, e essa é uma das principais motivações para desenvolver sistemas de entrega seletiva destes ativos. Outro problema, relacionado à quimioterapia, é o desenvolvimento da resistência das células neoplásicas ao fármaco, devido à alta dosagem administrada no paciente, diminuindo a concentração do ativo no local de ação. A probabilidade do aparecimento dessa resistência aumenta com aumento da massa tumoral (Feng & Chien, 2003).

Para contornar este problema, geralmente é utilizada uma combinação de antineoplásicos. Porém, além dos efeitos sinérgicos ou antagônicos, também pode se desenvolver resistência a estes múltiplos fármacos. Outro problema está relacionado à barreira micro-circulatória a qual os agentes devem cruzar para alcançar as células do tumor. Moléculas de ativos devem alcançar os vasos sanguíneos do tumor, atravessar a parede dos vasos e migrar para alcançar as células (Feng & Chien, 2003).

A resistência ao fármaco pode ser dividida em três categorias, de acordo com seu mecanismo: resistência farmacocinética devido à baixa concentração do fármaco no tumor, resistência cinética devido à presença de pequena quantidade de células suscetíveis e a resistência genética devido à resistência bioquímica das células do tumor ao fármaco. A combinação de diferentes antineoplásicos é uma estratégia para diminuir esta resistência (Huber et al., 2010).

Esse fenômeno pode estar relacionado a uma série de fatores como: transporte do fármaco através da membrana plasmática (relacionado com as bombas de efluxo), alteração da enzima-alvo, alteração no metabolismo do fármaco, aumento na reparação do DNA e incapacidade de sofrer apoptose. Várias proteínas estão relacionadas a este fenômeno e as mais importantes são a MRP, localizada predominantemente na membrana plasmática, e a glicoproteína-P, que utiliza a energia proveniente da hidrólise do ATP, promovendo efluxo do quimioterápico (Huber et al., 2010).

"Multi Drug Resistance" (MDR) é desenvolvido contra fármacos com alguns tipos de estruturas moleculares e está relacionado à diminuição do acúmulo do fármaco nas células e alta concentração de glicoproteína-P (P-gp), glicoproteína

presente na membrana celular (Feng & Chien, 2003), que transporta fármacos e funciona como bomba de efluxo por um mecanismo que requer ATP, reduzindo a concentração intracelular do ativo e a atividade de antineoplásicos.

TPGS é eficiente em reduzir a influência de P-gp em diversos fármacos antineoplásicos transportados por essa proteína, como doxorrubicina e paclitaxel. 5-FU não é transportado por P-gp e, portanto, sua citotoxidade não é afetada pelo uso de TPGS. Dintaman & Silverman (1999) sugerem, também, que ele possa aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos via inibição da P-gp e via diminuição do transporte ao lúmen intestinal.

Sistemas nanoparticulados são veículos promissores na detecção e no tratamento do câncer devido à sua seletividade, entrega sustentada por longo período numa maior concentração que o fármaco livre e, portanto, maior potência no tratamento de tumores (Pathak & Katyiar, 2007).

Nanoparticulas podem chegar ao local de ação de forma passiva ou ativa. A entrega passiva de nanoparticulas explora as características de crescimento do tumor. A difusão no tumor se torna limitada num volume maior que 2 mm³. Esta limitação impacta na nutrição, excreção e entrega de oxigênio, resultando em aumento da vascularização (angiogênese) para ultrapassar esta limitação. A vascularização incompleta resulta em vasos que permitem extravasamento de partículas com diâmetro de 100 nm a 2 µm. Além disso, como a pressão intersticial é mais alta no centro da massa tumoral que em sua periferia, há fluxo de fluido intersticial para fora do tumor, reduzindo a difusão do fármaco para o centro do tumor. Entretanto, as partículas e moléculas que atingem o interstício têm maior tempo de retenção que nos tecidos normais. A combinação deste estravasamento e a pouca drenagem linfática resulta no Efeito de Aumento de Retenção e Permeação (EPR, Enhanced Permeation and Retention Effect, Figura 11). A entrega ativa tem a vantagem de aumentar o tempo de circulação, afinidade, extravasamento e absorção celular das nanoparticulas através do acoplamento de determinadas moléculas à sua superfície (Byrne et al., 2008).



Figura 11. Ilustração do efeito do aumento de retenção e permeação (EPR): carreadores (1) penetram através da vasculatura do tumor (2), no interstício (3), e se degradam no local liberando o fármaco (4), levando a um aumento da sua concentração (Torchilin, 2007).

Há um grande número de carreadores sendo usados em quimioterapia, os quais são desenvolvidos principalmente para aumentar a entrega do fármaco ao tumor através de superfícies hidrofílicas, como partículas furtivas e superfícies positivamente carregadas, podendo aumentar a endocitose devido à ligação eletrostática com as cabeças polares dos fosfolipídios negativamente carregados. Atualmente, os sistemas que estão comercialmente disponíveis são Myocet[™] (doxorrubicina lipossomada não peguilada), Doxil® e Caelix® (doxorrubicina lipossomada não peguilada), Doxil® e Caelix® (doxorrubicina lipossomada não peguilada), Doxil® e Caelix® (doxorrubicina lipossomada peguilada), e Abraxane® (paclitaxel ligado a nanoparticulas de albumina).

9. 5-Fluorouracil (5-FU)

Câncer é uma doença com metabolismo celular e mitose anormal. Antimetabótitos (AM) e agentes que interagem/interferem com DNA constituem, de longe, os maiores números de compostos já aprovados pelo FDA para tratamento de neoplasias (Montgomery & Ananthan, 1995).

A maioria dos AM (como 5-fluorouracil, metotrexato, etc.) tem estruturas análogas aos componentes do DNA e atuam inibindo a enzima envolvida na síntese do DNA ou são incorporados ao DNA ou ambos, agindo em fase específica do ciclo celular. A interferência específica somente com o *denovo* ciclo das células cancerígenas não é possível, pois o mesmo caminho biosintético é usado tanto para essas células neoplásicas como para as células dos tecidos normais. O mesmo é valido para a interferência na função do DNA. Portanto, tendem a ser mais úteis primariamente no tratamento de linfomas e leucemias, patologias em que o a proliferação celular é mais intensa que tumores sólidos que crescem mais lentamente (Montgomery & Ananthan, 1995).

Essencialmente, todos os AM conhecidos foram investigados para atividade antineoplásica, porém esta atividade estava acompanhada por alta toxicidade. O maior sucesso no desenvolvimento de AM ocorreu com análogos de metabólitos envolvidos na biossíntese dos ácidos nucléicos e co-fatores contendo purinas e pirimidinas (Montgomery & Ananthan, 1995).

Outra classe de antineoplásicos (como as antraciclinas) é constituída por fármacos que não atuam especificamente no ciclo celular e agem também sobre células sadias, que não estão proliferando, embora estas sejam menos sensíveis a eles. Como resultado, estes agentes são úteis no tratamento de neoplasias que crescem rápida e/ou lentamente (Montgomery & Ananthan, 1995).

A maioria das combinações de fármacos contém membros de ambas as classes. Tal combinação é feita tanto pela diferença dos mecanismos de ação, como pela toxicidade, entre as duas classes, embora ambas interfiram na síntese ou função do DNA. Outro fator é devido ao desenvolvimento de resistência ao fármaco (Montgomery & Ananthan, 1995).

AM inibem enzimas ou são ativados por elas e a população de células resistentes surge do crescimento rápido de células mutantes com mudanças na suas capacidades enzimáticas, pelo aumento da quantidade de enzima ou pela exclusão da atividade enzimática que ativa o fármaco (Montgomery & Ananthan, 1995).

O fármaco 5-Fluorouracil (2,4-dioxo-5-fluoropirimidina, 5-FU) é uma substância sólida, micronizada, estável à temperatura ambiente, branca, cristalina, solúvel em água (12,2 mg/mL). Sua fórmula molecular é C₄H₃FN₂O₂ e sua estrutura molecular está representada na Figura 12. Seu espectro de UV-Vis apresenta uma banda característica de uma transição π - π^* , com absorção em 266 nm e fluorescência em 391 nm quando excitada em 315 nm (Bayomi & Al-Badr, 1989).



Figura 12. Estrutura molecular da base uracil e do fármaco 5-fluorouracil.

O desenvolvimento de 5-FU foi um importante evento na história da quimioterapia contra o câncer, pois representou um dos primeiros exemplos em que o projeto e a síntese de um fármaco antineoplásico foram baseados em uma estratégia bioquímica. 5-FU tem sido usado há mais de 40 anos no tratamento de algumas neoplasias. É um antimetabólito, derivado fluorado da base Uracil, que reduz o crescimento tumoral incorporando-se ao RNA, inibindo a formação de timidina e a enzima timidalase sintase (TS) e, portanto, inibindo a síntese de proteínas (Montgomery & Ananthan, 1995).

Este fármaco é um dos mais úteis no tratamento de tumores sólidos em adultos, especificamente carcinomas do trato gastrointestinal (estômago, cólon e reto) e da mama, e também apresenta atividade contra carcinomas da cérvix, ovário, bexiga, próstata, pâncreas e fígado e no tratamento tópico de lesões prémalignas de ceratose actínica e carcinomas superficiais de células basais (carcinoma basocelular). Atualmente, este fármaco é comercializado com nomes *Efudex*®, *Carac*®, *Fluoroplex*® (administração tópica para câncer de pele) e Adrucil® (solução injetável).

Entretanto, a remissão completa usando apenas este fármaco não é usual e, por isso, ele é empregado em combinação com outros agentes terapêuticos como metrotrexato, hidroxiuréia, leucovorin, doxorubicina e ciclofosfamida (no tratamento de câncer avançado de mama). 5-FU não inibe sozinho o crescimento celular, mas é metabolicamente convertido em outras substâncias ativas das quais três são as maiores responsáveis pelo efeito terapêutico: FdUMP (5-fluoro-2'-deoxiuridina monofosfato); FdUTP (5-fluoro-2'-deoxiuridina trifosfato) e FUTP (5-fluoridina trifosfato) (Bayomi & Al-Badr, 1989; Rudy & Senkowski, 1973).

Após sua descoberta, 5-FU ainda permanece como um dos principais agentes quimioterápicos para o tratamento de câncer de cólon. A estratégia mais usada na administração de 5-FU é seu uso com Leucovorin, que também é um inibidor da enzima TS e aumenta a eficácia do 5-FU.

Inicialmente, 5-FU era administrado via oral. A administração por essa via foi estudada por diversos autores no tratamento de diversos carcinomas, dentre eles adenocarcinoma recorrente e de metástase. Douglass Jr. & Mittelman (1974) estudaram dois pacientes com metástase de carcinoma de cólon via administração oral, intravenosa e intra-hepática de 5-FU radioativo e observaram que após duas h de uma administração i.v. praticamente não havia 5-FU detectável no plasma periférico e portal e na secreção biliar; quanto a via intra-hepática, 5-FU não foi detectado, indicando que o fígado degrada rapidamente o fármaco; já pela via oral, houve aumento de concentração inicial após ingestão com uma infusão contínua de até 3 h após a ingestão.

Porém essa via não foi mais utilizada após a publicação de Hahn et al. (1975) mostrando que a intravenosa era mais efetiva devido à absorção do fármaco no intestino ser variável quando administrado oralmente. Em outro estudo realizado por Thomas (1978), a administração de 5-FU em cachorros da raça beagle demonstrou que a absorção de 5-FU no lúmen estomacal é baixa, o que

torna improvável a eficiência de administração desse fármaco pela via oral. Além disso, a mucosa gastrointestinal contém dihidropirimidina desidrogenase (DPD), uma das enzimas que catabolizam 5-FU e dependendo do individuo, a concentração dessa enzima é elevada, reduzindo os níveis deste fármaco no plasma.

Algumas estratégias têm sido desenvolvidas para diminuir esse problema, como a co-administração de fármacos que inibem a ação de DPD, como uracil e eniluracil, e a administração oral de pró-farmacos do 5-FU que são absorvidos intactos e são metabolicamente ativados após absorção intestinal, como a capecitabina mostrada na Figura 13 (Mayer, 2001).



Figura 13. Estruturas moleculares do eniluracil e capecitabina.

Eniluracil inibe completamente DPD aumentando a biodisponibilidade oral do fármaco e diminuindo a variabilidade de seu comportamento farmacocinético. Diversos estudos mostraram que a modulagem farmacocinética destes dois compostos pode ser boa alternativa no tratamento de câncer de cólon e gastrointestinal. Outro estudo mostra a eficiência da dosagem oral de 5-FU após a remoção cirúrgica de tumores gástricos (Sun et al., 2009).

Paek et al (2006) estudaram a administração do fármaco para o tratamento de câncer retal em camundongos pelas vias oral e retal. 5-FU administrado via supositório composto de polaxâmer 188 e propilenoglicol teve menor toxicidade

sistêmica, pois permitiu o contato tópico direto com a neoplasia retal e maior concentração nos tecidos do intestino, que a administração intravenosa.

Atualmente, 5-FU é administrado via intravenosa como um bólus ou como uma infusão contínua. Em pacientes com metástases no fígado é usada infusão intra-hepática contínua como alternativa à intravenosa, embora 50% do ativo sejam eliminados via primeira passagem pelo fígado. Como a meia vida deste fármaco no plasma é pequena (10-20 min), o protocolo envolve a administração endovenosa de doses elevadas (400-600 mg/m²), semanalmente, para que sejam alcançados níveis terapêuticos (Peters et al., 1993; Holland et al. 1997), fato que exacerba os efeitos adversos.

5-FU atua contra células que se dividem rapidamente afetando a medula óssea e as mucosas gastrointestinal e oral. Os efeitos adversos mais freqüentes incluem inicialmente anorexia e náuseas seguidas de estomatite e diarréia. Entretanto, os efeitos adversos mais sérios decorrem da mielo supressão a qual se manifesta clinicamente como leucopenia (redução da quantidade de glóbulos brancos), trombocitopenia e anemia. Ocorre, também, perda de cabelo, alterações nas unhas e dermatite. Entre as manifestações neurológicas, destaca-se a síndrome cerebelar aguda. Na administração intra-hepática podem advir complicações devidas ao atrito do catéter com a artéria gastroduodenal, resultando necrose, hemorragia e até perfuração do epitélio intestinal; causando, ainda, efeitos neurológicos, necrose do miocárdio, isquemia e reações inflamatórias como conjuntivite aguda e crônica. Além disso, as células tumorais podem criar resistência contra este fármaco dificultando seu acesso ao tumor, afetando a distribuição e aumentando a eliminação. Essa resistência está relacionada com o aumento dos níveis de enzima TS após certo período da administração (Peters et al., 2002).

Em razão disto, têm sido feitas várias tentativas para encapsular 5-FU a fim de reduzir os efeitos adversos que ele provoca. Em particular, isto foi feito anteriormente com lipossomas (Elorza et al., 1993; Fresta et al., 1993; Mazumbere, 1981; Ozer, 1992), onde foi observado que o 5-FU tem pouca interação com bicamadas lipídicas, em razão da eficiência de encapsulação ser

muito pequena, variando entre 2 e 6% dependendo da composição usada na preparação das vesículas. Outro problema encontrado diz respeito ao vazamento do 5-FU encapsulado quando é feita a separação do material não encapsulado (Elorza et al., 1993; Fresta et al., 1993; Ozer, 1992), o que limita o tempo de armazenamento de preparações lipossomais convencionais.

Mais recentemente, foram encontrados na literatura diversos sistemas relativos ao fármaco utilizado neste projeto, com objetivo de diminuir seus efeitos adversos e prolongar sua liberação. A incorporação de fármaco hidrofílico em sistemas carreadores sofre da rápida migração do fármaco e, portanto, perda do fármaco para fase aquosa (Govender et al., 1999). Assim, geralmente, partículas contendo 5-FU apresentam baixa eficiência de encapsulação e perfil de liberação mais rápido que fármacos hidrofóbicos. Alguns destes sistemas são descritos a seguir:

a) Hidrogel

Micro-esferas de hidrogel de quitosana e pluronic F-127 foram preparadas pelo método de reticulação em emulsão. Foram determinadas a eficiência de encapsulação (cujos valores variaram de 46 a 87%) e o tamanho médio das partículas em volume (136 a 382 µm³). Foram obtidas imagens por microscopia eletrônica de varredura; espectros de absorção no infravermelho com transformada de Fourier para confirmar a estabilidade química do 5-FU nas micro-esferas de hidrogel; curvas de DSC, que indicaram a dispersão do ativo na matriz do hidrogel, através do desaparecimento do pico de fusão do fármaco encapsulado; difratogramas de raios-X, sendo observado o desaparecimento de picos de 5-FU quando na matriz; a quantidade de água absorvida nos hidrogéis e experimentos de liberação *in vitro*, relacionando a liberação do fármaco com coeficientes de difusão (Rokhade et al., 2007).

b) Niossomas

Muzzalupo et al. (2007) estudaram a encapsulação de 5-FU em coroas de éteres, os quais pertencem à classe de macrociclos e possuem habilidade de

complexar íons e pequenas moléculas orgânicas. Também se comportam como ionóforos capazes de transportar íons através de barreiras lipofílicas. Nesse artigo, uma longa cadeia lipofílica de grupos alquila é adicionada à coroa, formando um surfatante, conhecido como "bolaforma", o qual se organiza em vesículas (monocamada de membranas lipídicas) em solução. 5-FU é encapsulado neste sistema com objetivo de aperfeiçoar a absorção oral e seu tempo de meia-vida. A eficiência de encapsulação variou entre 4 e 66 % e dependeu da quantidade de colesterol utilizada e do tipo de surfatante.

c) Lipossomas

Glavas-Dodov et al. (2005) prepararam lipossomas multi-lamelares (pelo método de hidratação do filme lipídico seco) contendo 5-FU. O efeito da liofilização foi estudado comparando os tamanhos das vesículas, a eficiência de encapsulação e a liberação do ativo antes e depois da liofilização/rehidratação, medindo parâmetros antes e após liofilização, com e sem sacarose (utilizada como crioprotetor). Apenas a liofilização sem crioprotetor aumentou os tamanhos das partículas e diminuiu a eficiência de encapsulação. Os lipossomas foram caracterizados por: cálculo da EE (5-30 %); diâmetro médio das partículas (3 a 8 µm) e perfil de liberação do fármaco, seguindo o modelo de Higuchi e cinética de ordem zero.

Um estudo sobre encapsulação de lipossomas como sistema para entrega de 5-FU via nasal no tratamento de câncer pulmonar foi feito por Hitzman et al. (2006) com objetivo de diminuir os efeitos colaterais do fármaco maximizando a sua concentração no pulmão e diminuindo em outras partes do organismo. As características dos lipossomas foram diâmetro entre 0,4 e 2,6 µm; conteúdo do fármaco 1,3 a 6,4 % e taxas de liberação de 0,44 a 2,32 % de 5-FU/h, obtidas via microdiálise.

O desenvolvimento de lipossomas catiônicos para tratamento de câncer pancreático foi feito por Kalra & Campbell (2006). Estes lipossomas geralmente se acumulam nos locais do tumor e no fígado (sítio favorável para desenvolvimento
de metastáses). Nesse trabalho foi possível obter percentual de encapsulação maior que 80 % e tamanho de partícula de 200 a 300 nm.

d) Micropartículas

Blanco et al. (2005) encapsularam 5-FU em micropartículas de PLGA e PLA utilizando o método de *spray-drying*, obtendo partículas com diâmetro médio entre 1,1 e 1,7 μ m, com superfície lisa e levemente porosa. Pelo mesmo método, foram preparadas micro-esferas de poli(ϵ -caprolactona) com diâmetro por volta de 3 μ m, eficiência de encapsulação de 49%. PLGA foi utilizado para encapsular 5-FU pelo método de evaporação do solvente, por Cifti et al. (1996). As Micro-partículas apresentaram geometria esférica, com diâmetro entre 2 e 5 μ m e EE maior 70 %. Foram feitos também estudos *in vivo* e *in vitro*, para determinar a eficiência terapêutica deste sistema.

e) Nanopartículas

Estão presentes na literatura inúmeros artigos sobre nanoparticulas como sistema para encapsulação de 5-FU, com objetivos similares. A caracterização é similar às de outros sistemas: morfologia, carregamento e eficiência de encapsulação, tamanho das partículas, potencial zeta, perfil de liberação e farmacocinética. Foi observado que nanopartículas geralmente apresentam carregamento menor e liberação mais rápida que micropartículas, devido a seu menor tamanho e maior área superficial. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Hitzman et al. (2006) que prepararam nanoparticulas lipídicas com diferentes composições, diâmetro entre 0,4 e 1,0 μm, com carregamento entre 4,7 e 18,4%. Li et al. (2008) estudaram a encapsulação de 5-FU em nanoparticulas de copolímeros em bloco, sendo o bloco hidrofóbico constituído por poli(γ-benzil-L-glutamato) e o bloco hidrofílico por poli(etilenoglicol), para o tratamento de câncer de cólon, com carregamento de 27,1%. As nanopartículas foram preparadas por diafiltração e apresentaram melhores características farmacocinéticas que o ativo isolado.

41

1. Geral

Preparar e caracterizar nano-esferas de PLGA contendo 5-FU como sistemas carreadores para tratamento de câncer, adsorvendo à sua superfície quitosana e folato de quitosana para que ocorra entrega mais seletiva, com maior direcionamento às células alvo e com menor toxicidade que a formulação convencional.

2. Específicos

• Determinar a influência da massa de 5-FU, pH das soluções, temperatura e volume da solução de surfatante nas propriedades das nanoparticulas de PLGA;

• Determinar a concentração das soluções de quitosana e folato de quitosana apropriada e o seu pH para adsorção a superfície das NP;

• Caracterizar as partículas quanto à morfologia, distribuição de tamanho das nanoparticulas, potencial Zeta, carregamento, rendimento, perfil de liberação e estabilidade;

Determinar as melhores condições para a armazenagem das formulações;

• Comparar a eficiência entre 5-FU encapsulado em nanopartículas de PLGA, com quitosana e folato de quitosana na sua superfície, em diferentes linhagens de células de câncer.

1. Reagentes e equipamentos

1.1. Reagentes e materiais

5-Fluoruracil micronizado (Suan Farma S.A.); PLGA R502, R502H, R503, R503H (Boehringer Ingelheim Pharma KG); acetona, ácido acético glacial e sacarose (todos da Synth®); PLGA (50:50, viscosidade inerente 0,15-0,25), trealose, hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-yl)-3,5-difeniltetrazólio (MTT) e dodecilsulfato de sódio (SDS) e borohidreto de sódio (NaBH₄), todos da Sigma; dihidrogenofosfato de potássio, sulfato de sódio, hidróxido de sódio (Vetec®); ácido clorídrico fumegante 38% (Merck); cloreto de potássio (KCI, Casa da Química Ltda.); dimetilsulfóxido (DMSO, Nuclear); cloreto de sódio (CHEMCO); ácido fólico (ChangZhou); membrana SpectraPor MWCO 1000; quitosana em pó (Polymar); succinato de D- α -tocoferol polietileno glicol 1000 (TPGS, Eastman); álcool polivinílico (PVA, Aldrich), massa molar 13000-23000 Da;

1.2. Equipamentos

Banho de ultrassom Ultrasonic Cleaner USC 1400A com aquecimento – Unique Ind. Com. Prod. Eletron. Ltda., freqüência 40 kHz, consumo 150 VA; microbalança analítica Mettler Toledo AB204S; dispersor IKA T25 com elemento dispersor S25 e dispersor IKA T18 com elemento dispersor S18; ultracentrífuga HIMAC CP80WX, Hitachi; microscópio eletrônico de varredura JEOL mod. JSM-T300 e JEOL 5800LV; equipamento ZetaSizer 3000HS Malvern Instruments; liofilizador FTS Systems; centrífuga Fanem 206II modelo 206 BL, espectrômetros de RMN Bruker Avance II 300 MHz e Varian 500 MHz; estufa de secagem Binder FED240 com controle digital de temperatura; espectrofotômetro HP8453; espectrofotômetro de Infravermelho Bomem–Hartmann modelo MB 102; difratômetro de Raios-X Shimadzu-XDR – modelo 6000.

2. Procedimentos

2.1. Técnicas de caracterização dos ensaios

2.1.1. Espalhamento dinâmico de luz (EDL)

a) Obtenção do diâmetro médio (φ, nm, Z *average*) e do índice de polidispersão (IPD)

O preparo das amostras foi feito diluindo 50 µL da suspensão de NP em 1 mL de água desionizada.

b) Obtenção do potencial zeta (ζ, mV)

Medidas de potencial ζ foram feitas determinando a mobilidade eletroforética das NP a 25 °C através da Lei de Henry, com uma cela contendo um par de eletrodos. O preparo das amostras foi feito diluindo 50 µL da suspensão de NP em 1 mL de solução filtrada (membrana 0,22 µm) de KCl 1 mmol/L ou em água desionizada.

2.1.2. Determinação do percentual de carregamento (C), eficiência de encapsulação (EE) e rendimento (R)

Os cálculos foram realizados utilizando a definição de Govender et al. (1999):

Carregamento (C) =
$$\frac{\text{massa de 5-FU final}}{\text{massa de NP recuperadas}} * 100\%$$
 EQUAÇÃO 1

Eficiência de Encapsulação (EE) = $\frac{\text{massa de 5-FU final}}{\text{massa de 5-FU inicial}} * 100\%$ EQUAÇÃO 2

Rendimento (R) =
$$\frac{\text{massa de NP recuperadas}}{\text{massa de PLGA+massa de 5-FU inicial}} * 100\%$$
 EQUAÇÃO 3

O conteúdo de 5-FU foi obtido de dois modos:

a) Análise elementar por CHN

Calculou-se a quantidade de 5-FU através da porcentagem de nitrogênio na amostra de NP. Como não há nitrogênio na estrutura química do PLGA e do surfatante, a % N é proporcional a % 5-FU presente nas NP.

b) Espectroscopia de absorção no UV-Vis

Uma determinada massa de NP foi dissolvida em clorofórmio. Como 5-FU não se dissolve em clorofórmio, adicionou-se água destilada para extraí-lo (Cifti et al.,1996; Bozkir & Saka, 2005), mantendo os tubos sob agitação por 24 h. A fase aquosa foi coletada e a quantidade de 5-FU foi determinada a 266 nm (Blanco et al., 2005). Com as partículas contendo QTS, após extração da fase aquosa, foi necessário centrifugá-las a 1890 xg por 15 min para retirar a QTS presente no meio, considerando que não há interações entre o fármaco e o polissacarídeo.

2.1.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Uma gota da suspensão coloidal obtida foi aplicada no porta-amostra. Após secagem, o porta-amostra foi revestido com ouro, usando metalizador MED 20 *Coating System* (Bal-Tec) operado nas condições 20 mA de corrente e 50 mTorr de pressão por 160 min. A amostra liofilizada foi pulverizada sobre uma fita de carbono e metalizada como descrito.

2.2. Métodos de preparação de nanoparticulas

2.2.1. Método de evaporação do solvente e dupla emulsão água-óleo-água (A/O/A)

Consiste em adicionar à solução de 100 mg de PLGA em 10 mL de solvente imiscível com água (10 mg/mL) uma alíquota de solução aquosa de 5-FU. Essa emulsão é colocada no ultrassom por 10 min e adicionada lentamente à solução de surfatante (PVA 1% ou TPGS 0,03% m/v) sob alta velocidade no dispersor. Após evaporação do solvente orgânico, as partículas são lavadas e centrifugadas para eliminar excesso de surfatante e 5-FU não-encapsulado (Reis

et al., 2006). Quando foi utilizado PVA, as partículas foram lavadas seis vezes e quando foi utilizado TPGS foram feitas apenas duas lavagens. A descrição detalhada da quantidade de 5-FU e de volume de surfatante será detalhada em cada item a seguir.

2.2.2. Emulsificação espontânea ou método de difusão do solvente

Um solvente miscível com água é utilizado para preparar as NP e consiste em adicionar uma alíquota de solução aquosa de 5-FU a uma solução de 100 mg de PLGA em 10 mL de acetona. Essa solução final é colocada sob ultrassom (potência 240W, frequência) por 10 minutos. Após esta etapa, a solução é adicionada lentamente a determinado volume de solução de TPGS 0,03% (m/v) sob agitação (6000-14000 rpm). Após evaporar o solvente orgânico, as partículas são lavadas e centrifugadas duas vezes para eliminar excesso de TPGS e 5-FU não-encapsulado (Reis et al., 2006). NP sem 5-FU foram preparadas sem adicionar solução aquosa de 5-FU. Um terceiro método de preparação foi estudado onde o fármaco foi dissolvido diretamente na solução de PLGA. A descrição da quantidade de 5-FU e de volume de surfatante será mais bem detalhada em cada item a seguir. A Figura 14 ilustra este método de preparação.



Figura 14. Representação esquemática da preparação de nanopartículas.

2.3. Formulações Iniciais (Ultraturrax® T18 - dispersor S18)

O equipamento de homogeneização e o elemento dispersor utilizados na parte inicial do projeto estão esquematizados na Figura 15:



Figura 15. Ultraturrax® T18 com elemento dispersor S18.

2.3.1. Preparação de NP utilizando PVA como surfatante

NP foram preparadas utilizando a técnica de evaporação do solvente A/O/A como descrito anteriormente. Foi feita a adição da primeira emulsão contendo 1,5 mL de solução aquosa de 5-FU 12,2 mg/mL e 10 mg/mL de PLGA em diclorometano a 60 mL de solução de PVA 1% lentamente sob agitação a 14000 rpm por 15 minutos. Em seguida, esta solução final foi mantida sob agitação magnética durante 24 horas para evaporar o solvente orgânico. Por último, as partículas foram lavadas com água destilada e centrifugadas a 18100 xg por 30 minutos a 4 °C. O procedimento foi repetido 6 vezes para eliminar o PVA. Essa amostra foi liofilizada para quantificação (Parikh et al. 2003; Silva, 2006).

2.3.2 Preparação de NP utilizando TPGS como surfatante

2.3.2.1. Influência do solvente

NP foram preparadas utilizando a técnica descrita na seção 2.2.2. Lentamente, foi adicionada a primeira emulsão contendo 1,5 mL de solução aquosa de 5-FU 12,2 mg/mL e 10 mg/mL de PLGA (100mg) em acetona, diclorometano e acetato de etila a 60 mL de solução de TPGS 0,03% sob agitação a 14000 rpm por 15 minutos. Esta suspensão foi mantida sob agitação magnética durante 24 h para evaporar o solvente. Em seguida, as partículas foram lavadas com água destilada e centrifugadas a 18100 xg por 30 minutos a 4 °C, 2 vezes, para eliminar o fármaco não-encapsulado e o excesso de TPGS. A amostra foi liofilizada para quantificação (Zhang et al., 2007). Os resultados foram analisados quanto ao rendimento, carregamento, ϕ , IPD e ζ . A morfologia das NP foi observada em imagens obtidas por MEV.

2.3.2.2. Influência do tempo e da velocidade de centrifugação

NP foram preparadas utilizando a técnica descrita na seção 2.2.1. Lentamente, a primeira solução contendo 1,5 mL de solução aquosa de 5-FU 12,2 mg/mL e 10 mg/mL de PLGA (100mg) em acetona foi adicionada a 60 mL de solução de TPGS 0,03% sob agitação a 14000 rpm por 15 minutos. Esta suspensão foi mantida sob agitação magnética durante 24 h para evaporar o solvente. Após preparar as NP, foram feitas duas lavagens utilizando 20800, 83000 e 186800 xg por 30 minutos ou 1 hora. Os resultados foram analisados quanto ao R, C, ϕ , IPD e ζ . A morfologia das NP foi observada por MEV.

2.3.2.3. Liofilização

Após determinar o tipo de solvente, a velocidade e o tempo de centrifugação, foi adicionada 10, 25 e 50% em massa de trealose ou sacarose referente à massa inicial do polímero. As amostras então foram congeladas com N_2 e liofilizadas. As amostras foram ressuspensas em água desionizada e a morfologia das NP foi observada por MEV.

50

2.4. Otimização da formulação de NP contendo 5-FU (Ultraturrax® T25 - dispersor S25N-25F)

Com as condições determinadas no experimento anterior e usando um novo dispersor, aplicou-se um planejamento experimental para aperfeiçoar os parâmetros usados na preparação das NP. O elemento dispersor e o equipamento estão ilustrados na Figura 16:



Figura 16. Ultraturrax® T25 com elemento dispersor S25N-25F.

2.4.1. Influência do tempo de agitação, da velocidade de rotação do dispersor e do volume de TPGS.

NP foram preparadas utilizando a técnica de difusão do solvente. A solução de PLGA 10 mg/mL em acetona (10mL) foi adicionada lentamente durante 7 minutos a solução de TPGS sob agitação 6000, 10000 e 14000 rpm. Após 10 minutos de agitação, foi retirada a primeira alíquota da suspensão. Outras cinco alíquotas foram retiradas após 11, 12, 13, 14 e 15 minutos. O ϕ e IPD foram obtidos para cada amostra em duplicata, após evaporação do solvente. As variáveis e os níveis do planejamento experimental estão detalhados na Tabela 1:

Níveis						
Ensaio	Velocidade	Volume de	Velocidade	Volume de		
	(rpm)	TPGS (mL)	(rpm)	TPGS (mL)		
1	+1	+1	14000	50		
2	+1	-1	14000	30		
3	-1	-1	6000	30		
4	-1	+1	6000	50		
5-7	0	0	10000	40		

Tabela 1. Níveis relacionados ao volume de TPGS e velocidade do dispersor para cada ensaio do planejamento experimental 2² com ponto central.

2.4.2. Planejamento experimental

NP foram preparadas como descrito anteriormente, com velocidade de agitação de 10000 rpm durante 10-12 minutos. As amostras foram feitas em duplicata, aleatoriamente, e depois caracterizadas. A análise estatística foi feita através do software Statistica 6.0 (Statsoft) (Barros Neto et al., 2007; Bozkir & Saka, 2005). As variáveis e os níveis do planejamento experimental estão detalhados na Tabela 2.

	Níveis					
Ensaios	5-FU	Volume de	5-FU	Volume de		
	(mg)	TPGS (mL)	(mg)	TPGS (mL)		
1	+1	+1	15	40		
2	+1	-1	15	30		
3	-1	-1	10	30		
4	-1	+1	10	40		
5-7	0	0	12,5	35		

Tabela 2. Níveis relacionados ao volume de TPGS e massa de 5-FU para cada ensaio do planejamento experimental 2² com ponto central.

2.4.3. Otimização das NP através dos resultados do planejamento experimental

a) Influência da concentração da solução de 5-FU

Foram preparadas NP adicionando 1,5 mL ou 1,75 mL de solução 5-FU 12 mg/mL. Outras duas amostras foram feitas adicionando 1,25 mL e 1,5 mL de uma solução supersaturada de 5-FU 21,5 mg/mL obtida a 40 °C.

b) Influência do pH e da temperatura

Foram feitos ensaios onde a temperatura de preparação das NP foi 0, 10, 25, 40 e 50 °C. Também foram feitos ensaios onde a solução de 5-FU 21,5 mg/mL foi preparada em solução de NaOH pH 9 e em solução de HCl pH 2. Todas as soluções foram aquecidas a 40 °C para completa dissolução do fármaco. Soluções de TPGS feitas em solução de NaOH pH 9 e em solução de HCl pH 2 foram utilizadas para preparar as partículas.

2.5. Quitosana e ácido fólico

2.5.1. Métodos de purificação

A purificação da QTS foi feita baseada no artigo de Signini & Campana Filho (2001), com algumas modificações. QTS purificada foi caracterizada por várias técnicas e obtido seu grau de desacetilação (Heux et al., 2000).

a) Forma neutra

Primeiramente, foram preparadas as soluções: NaOH 1 mol/L; NaOH 40% m/v; ácido acético 2% v/v. 10 g de QTS foram dissolvidos na solução de ácido acético 2%. Adicionou-se a solução de NaOH (40% m/v) à QTS, e, então, adicionou-se NaBH₄ (0,1264g), sob agitação e refluxo a 95 °C por 4 h. A suspensão foi resfriada e o resíduo retido por filtração lavado com água destilada até que o filtrado atingisse pH 7. O procedimento foi repetido mais uma vez. Após nova filtração, o resíduo foi dissolvido em 500 mL de solução de ácido acético 2%. A solução de quitosana foi centrifugada a 1890 xg por 15 minutos e o

sobrenadante retirado. QTS foi precipitada do sobrenadante mediante aumento do pH até 8-9, adicionando NaOH 1 mol/L. A suspensão de QTS foi filtrada e lavada abundantemente com água destilada até que o sobrenadante atingisse pH 7. Finalmente, a quitosana foi lavada com etanol 95% e liofilizada. A massa obtida foi 6,7 g e o rendimento 66,3%.

b) Forma cloridrato

1,02g de QTS foram dispersos em 150 mL de ácido acético 1% e a suspensão mantida sob agitação constante durante 24 h. A solução resultante foi filtrada à vácuo em funil de Büchner e, em seguida, a suspensão foi centrifugada por 15 minutos (1890 xg e 25 °C). Em seguida, foi dialisada empregando membrana SpectraPor MWCO 1000 por 3 dias contra solução aquosa de NaCl 0,2 mol/L e 2 dias contra água desionizada. Por fim, a amostra de cloridrato de quitosana (QTS-HCl) foi liofilizada e pesada, sendo obtidos 0,65 g, com rendimento de 64%.

2.5.2. Síntese de folato de quitosana (QTSFOL)

Foi preparada uma solução com 682 mg de EDC (3,60 mmol), 717 mg de ácido fólico (1,55 mmol) em 20 mL de DMSO anidro, em balão âmbar de fundo redondo de 500 mL, seco sob atmosfera de N₂. A solução foi mantida sob agitação durante 1 hora à 25 °C. 580 mg de QTS (2,12 mmol de grupos amina da QTS, considerando grau de desacetilação de 60%) foi dissolvida em 300 mL de tampão acetato pH 4,7.

Após toda QTS se dissolver a solução foi adicionada à de ácido fólico. A mistura ficou sob agitação, protegida da luz e sob atmosfera de N₂, por 16 h à 25 °C. O pH da solução resultante foi elevado a 9 com solução diluída de NaOH. Por último, a solução foi dialisada contra tampão fosfato salino pH 7,4 por 3 dias e contra água destilada por mais 3 dias, utilizando membrana de diálise SpectraPor 6 MWCO 1000. O produto foi liofilizado, com rendimento calculado de 66,6% (Dubé et al., 2002; Mansouri et al., 2006). O produto foi caracterizado por espectroscopia de absorção no UV-Vis, IV e RMN (Wan et al., 2008).

54

2.5.3. Preparações de NP catiônicas de PLGA

2.5.3.1. Entrelaçamento de cadeias

Após gotejamento da solução de PLGA/5-FU na solução de surfatante e QTS-HCl, essa suspensão é mantida sob agitação a 2000 rpm por três h para que houvesse o entrelaçamento das cadeias da QTS e de PLGA. Resumidamente, a primeira solução foi feita como no método da seção 2.2.1: a solução de PLGA e 5-FU foram adicionadas a uma solução aquosa de TPGSe e QTS-HCl; a suspensão foi mantida sob agitação a 25 °C por 3 h antes de ser homogeneizada a 10000 rpm por 12 minutos. Após remoção do solvente, as NP foram ultracentrífugadas a 20800 xg por 30 minutos e lavadas duas vezes. A preparação das amostras de NPQTS por este método foi otimizada através de planejamento experimental 2² com ponto central. Cada amostra foi preparada em duplicata, aleatoriamente, e caracterizada (Kumar et al., 2004). A Figura 17 ilustra este método.



Figura 17. Conjugação eletrostática de QTS e QTSFOL à superfície das NP pelo método de entrelaçamento de cadeias.

2.5.3.2. Adsorção simples

NP de PLGA contendo 5-FU foram preparadas, lavadas e ressuspensas em água. Soluções de QTS e QTSFOL 1% em ácido acético 1% foram adicionadas às suspensão de NP de modo a obter a concentração final de solução de polissacarídeo 0,5; 0,67 e 0,75% para QTS e 0,67; 0,75; 0,88% para QTSFOL e, então, colocadas sob agitação (Figura 18). O ϕ das partículas foi medido logo no início da adição e após 5; 10; 15; 20; 30; 40; 60; 90 minutos por 1; 7; 30 dias (Yang et al, 2009).



Figura 18. Conjugação eletrostática de QTS e QTSFOL à superfície das NP por adsorção simples.

2.6. Ensaios de estabilidade coloidal

Uma solução de Na₂SO₄ 1,0 mol/L foi diluída e adicionada a determinado volume da suspensão de NP de modo que a concentração final do sal fosse 0 a 0,8 mol/L. Após 1 hora, o ϕ e o IPD foram obtidos. O ponto de floculação crítica (CFP) foi observado quando a concentração de eletrólito fez que o tamanho das NP aumentasse excessivamente (Riley et al., 1999). A solução de tampão fosfato salina com a mesma força iônica do sangue foi preparada com 100 mL de tampão

PBS dissolvendo 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄ e 0,24 g KH₂PO₄ em água destilada e ajustando o pH com solução estoque de NaOH.

Quanto ao estudo da variação do pH, as soluções com pH 1 a 6 foram preparadas diluindo uma solução de HCl 0,1 mol/L, e soluções com pH 7 a 14 foram preparadas com solução de NaOH 0,1mol/L. As soluções com pH 1 a 14 foram adicionadas às NP, obtendo-se ϕ e ζ de cada suspensão.

2.7. Perfil de Liberação

Uma alíquota de 5,0 mL de suspensão de NP foi transferida para um tubo selado com membrana de diálise. Esse tubo foi colocado num frasco fechado contendo 40 mL de tampão fosfato pH 7,4. Esse sistema foi mantido sob agitação magnética a 37 °C e alíquotas de 1,0 mL foram retiradas periodicamente para análise. O volume de amostra retirada foi imediatamente reposto com o meio de liberação, mantendo as condições "sink". As amostras foram analisadas por espectroscopia de absorção no UV-Vis a 266 nm (Govender et al., 1999).

As análises foram realizadas em duplicata e a concentração de 5-FU foi determinada através de curva de calibração previamente obtida nas mesmas condições experimentais. Os resultados experimentais obtidos foram ajustados segundo cinco modelos matemáticos: modelo de ordem zero, modelo de primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Baker-Lonsdale. O esquema utilizado para realizar o experimento está ilustrado na Figura 19.



Figura 19. Esquema utilizado para o experimento de perfil de liberação.

2.8. Liofilização das formulações finais

A liofilização das formulações de NP, NPQTS e NPQTSFOL foram feitas adicionando três crioprotetores (trealose, sacarose e manitol) com proporções de 50 a 200% em massa referente à massa inicial total, seguido por congelamento sob N₂ líquido e secagem por liofilização durante 48 h. Também foram realizados outros experimentos com concentrações de trealose e sacarose previamente utilizada para a liofilização de lipossomas: 250 mmol/L para sacarose e 400 mmol/L para trealose (Quintilio et al., 2000; Esteves et al.,2000).

2.9. Degradação térmica

As formulações em suspensão e liofilizadas foram mantidas a 4, 25 e 37 °C. O pH destas amostras foi medido periodicamente. Neste experimento, a variação do pH é um indicativo da degradação do PLGA, pois libera monômeros de ácido lático e glicólico, que reduzem o pH da solução (Park, 1995).

2.10. Preparação das misturas físicas (MF)

As misturas físicas foram preparadas pela mistura dos constituintes de cada formulação. Cada constituinte foi pesado de acordo com o rendimento, o carregamento e com as quantidades de sacarose, QTS e QTSFOL utilizadas nas formulações de NP respectivas.

2.11. Análises instrumentais

Amostras de NP liofilizadas contendo apenas PLGA/5-FU ou também QTS/QTSFOL, com e sem sacarose, e suas respectivas misturas físicas foram preparadas e caracterizadas por diversas técnicas:

a) Espectroscopia de absorção no infravermelho: Os espectros foram registrados no espectrômetro FTIR Bomem MB Series, modelo MB102 utilizando pastilhas de KBr como suporte, prensadas a 5 toneladas.

58

- b) Análise termogravimétrica: As análises foram realizadas nos aparelhos TA Instruments, modelo TA 5000 Hi Res TGA 2950 e TA Instruments, modelo TA 2050, nas condições experimentais: (a) fluxo de argônio; (b) rampa de aquecimento 10 °C/minutos; (c) faixa de aquecimento 30-700 °C; e (d) massa de amostra ~ 5 mg.
- c) Calorimetria diferencial de varredura: As curvas calorimétricas foram registradas no aparelho DSC 910 DuPont *Instruments*, usando as condições:
 (a) fluxo de argônio; (b) rampa de aquecimento 10 °C/minutos; (c) faixa de aquecimento 30-300 °C; e (d) massa de amostra ~ 5 mg.
- d) Difratometria de raios-X: Os difratogramas foram obtidos no difratômetro de raios-X Shimadzu-XDR modelo 6000 (fonte de radiação CuKα, variando 2θ de 5 a 50°, λ=1,5406 Å operada a 40 kV e 30 mA, utilizando método do pó).

2.12. Ensaios in vitro

O efeito das NP sobre a viabilidade celular foi investigado pelo ensaio de MTT (Mosmann, 1983) com auxílio de Gilberto Carlos Franchi *Jr./*CIPOI/UNICAMP. Este ensaio depende da capacidade de células metabolizarem o sal amarelo de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5difeniltetrazólio (MTT)) formando um produto altamente colorido. Resumidamente, as células foram preparadas seguindo o protocolo e incubadas por 48 h. A seguir, foram centrifugadas, o meio de cultura RPMI-1640 foi retirado e as células foram ressuspensas em 100 µL de PBS. Então, 10 µL de solução de MTT 5 mg/mL em PBS foram adicionados e as células incubadas por 4 h. Em seguida, 100 µL de solução de SDS 10% em HCl 0,01 mol/L foram adicionados, medindo a absorbância num leitor de ELISA com filtro em 570-630 nm. A guantidade de 5-FU em cada amostra (2-3 mg) foi determinada por espectroscopia de absorção UV-Vis.

3. Tratamento quimiométrico dos dados obtidos a partir do planejamento experimental

O planejamento experimental envolve a determinação do modelo a ser aplicado, dos fatores envolvidos, dos níveis e das respostas obtidas. Após obter as respostas, é feita análise quimiométrica para ajustar o modelo aos dados experimentais e a análise da variância (ANOVA).

A partir do modelo e dos resultados fornecidos pela ANOVA, é feita análise dos fatores que são significativos e a qualidade do ajuste aplicando o teste t de Student e o teste F. O teste t é utilizado para planejamentos com número de graus de liberdade menor que 30 e a partir dele que se obtêm os intervalos de confiança dos parâmetros. O teste F é aplicado para avaliar o ajuste do modelo em relação aos dados obtidos. Os intervalos de confiança são obtidos com p < 0,05; isto é, com um nível de confiança maior que 95%.

A análise dos parâmetros envolve a obtenção da soma quadrática total (SQ_T) , que engloba a soma quadrática da regressão (SQ_R) e soma quadrática residual (SQ_r) .

$$SQ_T = SQ_r + SQ_R$$
 EQUAÇÃO 4

 SQ_R representa o desvio da previsão do modelo em relação à média global e é utilizado para determinar o coeficiente de determinação do modelo (R^2), ou seja, a porcentagem dos dados explicados por ele.

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T}$$

EQUAÇÃO 5

O erro padrão do modelo é obtido a partir dos valores de soma quadrática dos resíduos (SQ_r), isto é, da soma quadrática da diferença entre os valores obtidos e os valores previstos, e representa a parte da variação das respostas em torno da média que o modelo não consegue reproduzir. A média quadrática dos resíduos (MQ_r) é obtida dividindo SQ_r pelo número de graus de liberdade dos

resíduos e é uma estimativa da variância do modelo. Do mesmo modo, é determinada a média quadrática da regressão (MQ_R). A significância estatística da regressão é feita aplicando o teste F, onde ${}^{MQ_R}/{}_{MQ_r}$ deve ser maior que F nos

graus de liberdade respectivos para a equação ser significativa.

Através do ANOVA obtemos os dados de falta de ajuste e de erro puro. A falta de ajuste depende do modelo e será maior quanto maior for o desvio das estimativas da resposta para um dado nível em relação à média correspondente, e pode ser aperfeiçoado. O erro puro está relacionado com os erros aleatórios e não é possível aperfeiçoá-lo. Assim:

$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj}$$
 EQUAÇÃO 6

As médias quadráticas também são calculadas dividindo SQ pelos correspondentes números de graus de liberdade. A significância estatística da modelo também é feita aplicando o teste F, onde $\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}}$ deve e ser menor

que F nos graus de liberdade respectivos para que a falta de ajuste seja significativa. Se F for menor que esse valor, indicará que o modelo apresenta falta de ajuste. Se não houver falta de ajuste, SQ_r estará relacionado à variância e sua raiz quadrada fornecerá o erro padrão (s).

Foi empregado o planejamento experimental 2² com ponto central. Esse planejamento permite estudar três níveis realizando apenas 8 experimentos, onde o número de graus de liberdade e os erros são obtidos pela triplicata no ponto central.

61

1. Caracterização dos reagentes

1.1. 5-Fluorouracil

1.1.1. Análise elementar

As porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidas do 5-FU foram: $C(\%) = 36,72 \pm 0,31$; $H(\%) = 2,12 \pm 0,02$; e $N(\%) = 21,13 \pm 0,11$, estando de acordo com sua estrutura química, onde a porcentagem teórica é de 36,93% para C, 2,32% para H e 21,5% para N.

1.1.2. Espectroscopia de absorção no UV-Vis

A curva de calibração feita a partir de diluições de uma solução aquosa de 5-FU 10^{-4} mol/L a 266 nm, está mostrada na Figura 20. O coeficiente de extinção molar para essa solução foi de 7,9. 10^{-3} L/(cm mol).



Figura 20. Curva de calibração de solução aquosa de 5-FU a 266 nm (R = 0,99597, curvatura = 0,0079 e intercepto = 0,0467).

1.1.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho

O espectro de absorção no infravermelho do 5-FU está na Figura 21.



Figura 21. Espectro de absorção no infravermelho do 5-FU.

A atribuição das bandas está na Tabela 3 (Singh et al., 2009).

Número de onda (cm⁻¹)	Atribuições
3100–3000	vC–H
2938–2831	$v - CH_2$
1750	νCO
1600–1650	vCN e vCC do anel pirimidínico
1200 e 1250	vC–O e vC–N, respectivamente
820–550	δC–H
420 275	δ do plano das bandas do anel no halogênio
420-375	em compostos aromáticos fluorados

Tabela 3. Atribuições das principai	s bandas do espectro de absorção no
infraverme	elho do 5-FU.

1.1.4. Difratometria de raios-X

O padrão de diferação de raios-X do 5-FU obtido é mostrado na Figura 22. Um pico intenso característico é observado em 2θ a 29°, indicando natureza cristalina.



Figura 22. Difratograma de raios-X de 5-FU.

1.1.5. Análises térmicas

Singh et al. (2009) em trabalho realizado sobre a estabilidade térmica do 5-FU mostrou que este fármaco seria estável até 275 °C, sofrendo decomposição em 285 °C. Quanto à análise calorimétrica via DSC e TGA, observa-se que ocorre fusão seguida por decomposição que se inicia em 250 °C e seu máximo ocorre em 287 °C, corroborando os resultados obtidos no trabalho supracitado. As curvas calorimétricas de DSC e de TGA do 5-FU estão mostradas nas Figuras 23 e 24, respectivamente.



Figura 24. Curva de TGA do 5-FU (a) % massa vs. temperatura (°C) e (b) δ (mg/°C) vs. temperatura (°C).

1.2. Ácido poli(lático-co-glicólico) (PLGA)

1.2.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho

O espectro de infravermelho do PLGA está na Figura 25. A atribuição das principais bandas está na Tabela 4.



Figura 25. Espectro de absorção no infravermelho do PLGA.

Tabela 4. Atribuições da	s principais bar	ndas do espectro	no infravermelho do
--------------------------	------------------	------------------	---------------------

PLGA.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuições
3003-2952	vCH dos grupos CH_2 , CH_3
1762	vC=O
1380–1474	v–CH ₃
754	vC-H

1.2.2. Difratometria de raios-X

O padrão de raios-X do PLGA obtido é mostrado na Figura 26, onde se observa que sua estrutura é predominantemente amorfa.



Figura 26. Difratograma de raios-X do PLGA.

1.2.3. Análises térmicas

Na curva de DSC (Figura 27), observa-se que o PLGA apresenta Tg em 49 °C, devido a sua estrutura predominantemente amorfa (Motta & Duek, 2006). Nas curvas de TGA (Figura 28), observa-se que a perda de massa se inicia a 250 °C, o que está de acordo com os dados na literatura (Rezende & Duek, 2003).



Figura 28. Curva de TGA do PLGA (a) % massa vs. temperatura (°C) e (b) δ (mg/°C) vs. temperatura (°C).

2. Formulações iniciais

2.1. Formulações preparadas com o dispersor Ultraturrax® T18-S18

2.1.1. Preparação de NP utilizando PVA como surfatante

A primeira formulação foi preparada através do método A/O/A usando PVA como estabilizante (Tabela 5). A micrografia das partículas (Figura 29) mostra que elas têm formato esférico e que houve agregação das partículas após liofilização. Além disso, observou-se que houve grande perda de material durante a centrifugação, resultando numa recuperação de apenas 20%.



Figura 29. Micrografia eletrônica de varredura das NP de PLGA carregadas com 5-FU (x5000).

Tabela 5. Parâmetros das NP para a primeira formulação.

φ (nm)	IPD	ζ (mV)	C (%)	R (%)
302,5	0,190	-30,9 ± 13,7	0,7± 0,1	20

2.1.2. Preparação de NP utilizando TPGS como surfatante

2.1.2.1 Influência do solvente

Este experimento foi realizado para estudar a possibilidade de substituição de um solvente clorado na preparação das partículas para diminuir a sua toxicidade. Neste experimento, as partículas foram caracterizadas e os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 6.

Pode-se concluir que o pior solvente dentre os analisados para preparar NP de PLGA foi acetato de etila, pois este solvente apresenta menor volatilidade, o que leva à difusão mais lenta para fora das NP resultando em partículas maiores e mais agregadas. Além disso, observou-se que é possível usar acetona na preparação das NP, pois não interfere no carregamento do fármaco, o qual foi praticamente o mesmo nos três ensaios. A Figura 30 mostra a imagem destas partículas.

φ (nm)	IPD	ζ(mV)	C (%)	R (%)
144,9 ± 3,6	0,09 ± 0,01	-27,1 ± 7,3	2,2 ± 0,1	21 ± 2
2576+70	0 /1 + 0 03	-20.0 + 8.6	26+03	18 + 1
257,0 ± 7,5	0,41 ± 0,03	-23,3 ± 0,0	2,0 ± 0,0	10 ± 1
101 6 1 2 5	0 12 1 0 06	26 5 1 6 2		20 1 1
191,0 ± 2,5	U, IZ I U,UO	-30,3 ± 0,3	2,0 ± 0,4	20 I I
	φ (nm) 144,9 ± 3,6 257,6 ± 7,9 191,6 ± 2,5		ϕ (nm)IPD ζ (mV)144,9 ± 3,60,09 ± 0,01-27,1 ± 7,3257,6 ± 7,90,41 ± 0,03-29,9 ± 8,6191,6 ± 2,50,12 ± 0,06-36,5 ± 6,3	ϕ (nm)IPD ζ (mV)C (%)144,9 ± 3,60,09 ± 0,01-27,1 ± 7,32,2 ± 0,1257,6 ± 7,90,41 ± 0,03-29,9 ± 8,62,6 ± 0,3191,6 ± 2,50,12 ± 0,06-36,5 ± 6,32,6 ± 0,4

Tabela 6. Parâmetros das NP para cada ensaio para o estudo da influência do solvente.



Figura 30. Micrografia das NP obtidas nos experimentos para estudo sobre o solvente mais adequado (a) acetona (x1000); (b) diclorometano (x30000); (c) acetato de etila (x3000).

2.1.2.2. Influência do volume de TPGS, do tempo e da velocidade de centrifugação nas lavagens das NP

Os resultados obtidos do rendimento (R), carregamento do fármaco (C) nas NP, diâmetro (D), polidispersão (PDI) e potencial Zeta (ζ) estão na Tabela 7.

V (xg)	Tempo (min)	φ (nm)	IPD	C (%)	R (%)	ζ (mV)
20800	30	187,5	0,17	2,1 ± 0,1	17,6	-40,6 ± 12,8
	60	190,6	0,20	$0,74 \pm 0,05$	20,9	-42,4 ± 7,74
83000	30	240,1	0,30	1,62 ± 0,08	26,5	-44,1 ± 7,87
	60	247,5	0,23	1,3 ± 0,1	43,6	-47,5 ± 8,36
186800	30	329,5	0,23	$0,72 \pm 0,07$	38,2	-43,8 ± 5,77
	60	398,7	0,37	$0,33 \pm 0,05$	46,8	-36,5 ± 6,05

Tabela 7. Parâmetros obtidos no estudo de velocidade (V) e tempo de centrifugação.

Embora seja obtido maior rendimento com aumento da velocidade e do tempo utilizado em cada lavagem, observou-se diminuição do carregamento e aumento da IPD devido ao possível rompimento das NP, o que pode ser observado nas micrografias obtidas (anexo A.1). A 20800 xg/30 minutos observase que as partículas estão menos aglomeradas, menos agregadas e mais dispersas. Portanto, as lavagens das NP serão feitas a 20800 xg/30 minutos a 4 °C. A micrografia da formulação lavada nessas condições está mostrada na Figura 31.



Figura 31. Micrografias das NP de PLGA (x60000; x30000) com centrifugação a 20800 xg por 30 minutos.

2.2. Formulações preparadas com o dispersor Ultraturrax® T25-S25N-25F

2.2.1. Estudo da influência do tempo, da velocidade de agitação no dispersor e do volume da solução com TPGS

Foi obtido o diâmetro e a polidispersidade das nanoparticulas de PLGA de cada alíquota retirada de cada formulação. Os resultados estão na Figura 32. A análise foi feita através de um planejamento com dois fatores (velocidade e volume da solução de TPGS), dois níveis (6000 e 14000 rpm para velocidade; 30 e 50 mL para volume) e um ponto central (10000 rpm e 40 mL), cujo ensaio foi realizado em triplicata. Porém, como todas as medidas estavam muito próximas não houve influência significativa dos parâmetros nos resultados obtidos.

Assim, foi feita uma análise dos resultados, levando em consideração que maior a velocidade e maior tempo levam a aquecimento da solução, o que poderia prejudicar a formação das NP. Observa-se em relação ao diâmetro, que a diminuição do volume do surfatante reduz o diâmetro das NP, como pode ser observado comparando os resultados dos ensaios 1 com 2 e o ensaio 3 com 4. Porém, não foi possível o uso de um volume menor que 30 mL, pois poderia causar danos ao dispersor.

Quanto à velocidade, observou-se que o aumento de 6000 rpm para 14000 rpm leva também a menores partículas, porém 10000 rpm fornece partículas maiores que com 6000 rpm e maiores que quando empregada 10000 rpm. Quanto ao tempo de agitação, observa-se que até 12 minutos os resultados se estabilizam ou até ficam melhores que 15 minutos. Além disso, 14000 rpm e maior tempo aumenta a temperatura na emulsão durante a preparação. Assim, 10-12 minutos, 10000 rpm e 30 mL de surfatante foram empregados nas próximas formulações.



2.2.2. Liofilização

O objetivo foi analisar a influência do tipo e da quantidade de crioprotetor utilizado para liofilizar as NP, observando sua morfologia através de MEV (Anexo item A.2). Neste experimento inicial, as partículas agregaram após liofilização indicando que a quantidade de crioprotetor utilizada não estava adequada.

3. Otimização do método de preparação de NP contendo 5-FU

3.1. Análise quimiométrica do planejamento experimental

Foi empregado o planejamento 2² com ponto central, que permite estudar três níveis realizando apenas 8 experimentos, onde o número de graus de

liberdade e os erros são obtidos pela triplicata no ponto central. Porém, neste caso, foi necessário realizar maior número de experimentos para aumentar o número de graus de liberdade e melhorar o ajuste do modelo. Os fatores estudados foram: quantidade de 5-FU adicionada à solução de PLGA, e o volume da solução de TPGS onde a solução de PLGA e 5-FU foi adicionada. Os resultados estão sumarizados na Tabela 8.

nivei.						
5-FU	TPGS	CC (%)	R (%)	φ (nm)	IPD	ζ (mV)
1	1	1,35	33	105,0	0,091	-25,4
1	1	1,79	30,4	103,8	0,143	-28,9
1	-1	5,87	36,7	89,5	0,092	-43,2
1	-1	4,09	32,8	91,3	0,111	-40,6
-1	1	0,46	35	115,4	0,083	-28,8
-1	1	0,32	35,3	115,9	0,112	-30,1
-1	-1	3,35	31,5	94,4	0,103	-22,9
-1	-1	3,85	38,9	100,2	0,121	-24,6
0	0	1,54	35,7	123,8	0,118	-38,8
0	0	1,79	34,2	125,8	0,134	-40,7
0	0	1,45	33,6	108,5	0,103	-37,4
0	0	1,3	34,9	106,3	0,144	-35,8
0	0	2,69	31,8	107,2	0,100	-29,6
0	0	2,32	30,9	106,8	0,123	-37,4

Tabela 8. Resultados do planejamento experimental de carregamento(C), rendimento(R), diâmetro (ϕ), polidispersão (IPD) e potencial zeta (ζ) para cada

 ní	10	
111	ve	Ι.
	-	

A análise estatística foi feita aplicando o modelo linear e quadrático para todos os parâmetros obtidos aplicando os testes de significância t e F e feita análise ANOVA; porém, somente a análise das respostas que puderam ser ajustadas adequadamente está descrita a seguir. Esta análise foi feita utilizando o software Statistica 6.0 (Statsoft, Inc.).
Como ilustração dos resultados obtidos para cada ensaio, as Figuras 33, 34 e 35 mostram os resultados obtidos com a técnica de EDL e a micrografia das partículas no nível (+1;-1), respectivamente.



Figura 33. Distribuição de tamanho obtida via espalhamento dinâmico de luz para o ensaio no nível (+1;-1).



Figura 34. Distribuição de potencial Zeta obtido via espalhamento dinâmico de luz para o ensaio no nível (+1;-1).



Figura 35. Micrografia das NP obtidas por MEV do ensaio do nível (+1;-1 - x15000).

3.1.1. Carregamento (%)

a) Modelo linear

A Tabela 9 mostra os dados da regressão e do intervalo de confiança dos coeficientes do modelo, onde se pode observar que os coeficientes são estatisticamente válidos, pois o intervalo de confiança não compreende zero.

Tabela 9. Cálculo dos coeficientes de regressão (CR), erro padrão (s), valor de t de Student e parâmetro p para o intervalo de confiança em 95%.

	CR	S	t(9)	р	-95%	+95%
Intersecção	2,30	0,16	14,19	0,00	1,93	2,66
5-FU	1,28	0,43	2,99	0,015	0,31	2,25
TPGS	-3,31	0,43	-7,73	0,000029	-4,28	-2,34

Com estes dados é possível ajustar uma equação para esse modelo:

C (%) =	2,30	+ 1,28 * 5-FU	- 3,31 * TPGS	EQUAÇÃO 7
()	(± 0,16)	(±0,43)	(±0,43)	

Quanto à estimativa dos efeitos, observa-se na Tabela 10 que os dois fatores influenciam esta resposta (o intervalo de confiança não pode ser nulo). A porcentagem da variação explicada é alta (82,2%).

Tabela 10. Estimativa dos efeitos e intervalo de confiança de C para ajuste do modelo linear, erro padrão (s), valor de t de Student e parâmetro p.

	Efeito	S	t(9)	р	-95%	+95%
Média/Intersecção	2,30	0,16	14,19	0,000	1,93	2,66
5-FU	0,64	0,21	2,99	0,015	0,16	1,12
TPGS	-1,65	0,21	-7,73	0,000029	-2,14	-1,17

A Tabela 11 e Figura 36 mostram os resultados da análise ANOVA. A tabela do teste F (Barros Neto et al., 2007) fornece $F_{2,9}$ 4,26. Aplicando este teste para verificar a qualidade do ajuste chega-se a 2,92; menor que o valor de F, indicando que o modelo linear se ajusta aos dados experimentais.

MQ_{faj}	$-\frac{1,07}{-2,02}$	
MQ_{ep}	$-\frac{1}{0,37}$ - 2,92	EQUAÇÃO 8

Tabela 11. ANOVA para a variável C para ajuste do modelo linear. Valores de soma quadrática (SQ), graus de liberdade (GL) e média quadrática (MQ).

	SQ	GL	MQ
5-FU	3,28	1	3,28
TPGS	21,91	1	21,91
Falta de ajuste	2,14	2	1,07
Erro Puro	3,30	9	0,37
SQ⊤	30,64	13	



Figura 36. Variável: Carregamento (C). (a) quadro de Pareto dos efeitos padronizados; (b) superfície ajustada (2 fatores, 1 bloco, 14 ensaios; MQ Erro Puro = 0,37); (c) quadro da distribuição dos resíduos vs. respostas previstas.

A análise estatística mostra que ambos os fatores influenciam a resposta; porém o volume de TPGS apresenta maior peso e é inversamente proporcional ao C. Assim, quanto menor o volume, maior C. Em relação ao 5-FU, a influência foi quanto maior a quantidade de 5-FU maior C, pois quanto maior o volume maior a difusão do fármaco para a fase aquosa e quanto maior a quantidade de 5-FU, mais fármaco fica disponível para encapsulação e maior a viscosidade da solução. Além disso, partículas pequenas apresentam maior área superficial, o que acarreta maior retenção do surfatante e possivelmente, diminua a difusão do fármaco.

b) Modelo quadrático

A análise estatística da influência dos fatores pelo modelo quadrático aumenta em um termo quadrático da equação, o qual é relacionado a 5-FU. Não foi possível obter o termo quadrático em relação ao volume de TPGS e o termo de interação entre estes dois parâmetros, pois foram estudados apenas três níveis de cada fator no planejamento experimental. Portanto, não houve número suficiente de graus de liberdade. Não foram feitos outros experimentos em outros níveis, pois o experimento apresentou algumas restrições, como o volume mínimo de solução de TPGS utilizado para preparar as NP (30 mL) e o volume máximo de solução de 5-FU (1,5 mL) que poderia ser utilizado sem precipitar PLGA.

As mesmas conclusões obtidas com o modelo linear também foram obtidas com o modelo quadrático. Porém, nesse modelo a porcentagem da variação explicada é mais alta que a obtida com o modelo linear (89,15%). Com os dados contidos na Tabela 12, podemos ajustar a equação 9.

 $\begin{array}{rll} C(\%) = & 1,85 & + \ 0,64 \ ^* \ 5 \ -FU & + \ 0,79 \ ^* \ 5 \ -FU^2 & -1,66 \ ^* \ TPGS \\ (\pm \ 0,25) & (\pm \ 0,21) & (\pm \ 0,33) & (\pm \ 0,21) \end{array} \hspace{1.5cm} EQUA \ Callebra C(\%) = & 200 \ ^* \ C(\%) = & 2$

A Figura 37 mostra o quadro de Pareto dos efeitos padronizados, a superfície ajustada e o quadro da distribuição dos resíduos vs. respostas previstas para o modelo quadrático da resposta carregamento das NP.

81



Figura 37. Variável: Carregamento (C). (a) quadro de Pareto dos efeitos padronizados; (b) superfície ajustada (2 fatores, 1 bloco, 14 ensaios; MQ Erro puro 0,37); (c) quadro da distribuição dos resíduos vs. respostas previstas.

Tabela 12. Cálculo dos coeficientes de regressão (CR), erro padrão (s) e valor de t de Student e parâmetro p para o intervalo de confiança a 95% para o ajuste do modelo quadrático – variável C.

	CR	S	t(9)	р	-95%	+95%
Média/Intersecção	1,85	0,25	7,47	0,000038	1,29	2,41
5-FU (Linear)	0,64	0,21	2,99	0,015	0,16	1,12
5-FU(Quadrático)	0,79	0,33	2,40	0,040	0,046	1,53
TPGS (Linear)	-1,66	0,21	-7,73	0,000029	-2,14	-1,17

A Tabela 13 mostra a estimativa dos efeitos e intervalo de confiança de C para ajuste do modelo quadrático, erro padrão (s), valor de t de Student e parâmetro p e a Tabela 14 mostra os resultados da análise ANOVA. Aplicando o teste F para verificar a falta de ajuste chega-se ao valor 0,054; menor que o valor de F e menor que o valor obtido pelo modelo linear, indicando mais uma vez que o modelo quadrático se ajusta melhor aos dados experimentais.

Tabela 13. Estimativa dos efeitos e intervalo de confiança de C para ajuste do modelo quadrático, erro padrão (s), valor de t de Student e parâmetro p.

	Efeito	S	t(9)	р	-95%	+95%
Média/Intersecção	1,85	0,25	7,48	0,000038	1,29	2,41
5-FU (Linear)	1,28	0,43	2,99	0,015	0,31	2,25
5-FU (Quadrático)	1,57	0,65	2,40	0,040	0,093	3,05
TPGS (Linear)	-3,31	0,43	-7,73	0,000029	-4,28	-2,34

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	
5-FU (Linear)	3,28	1	3,28	
5-FU (Quadrático)	2,12	1	2,13	
TPGS (Linear)	21,91	1	21,91	
Falta de ajuste	0,02	1	0,02	
Erro Puro	3,30	9	0,37	
SQT	30,64	13		

Tabela 14. ANOVA para a variável C para o ajuste do modelo quadrático. Valores de soma quadrática (SQ), graus de liberdade (GL) e média quadrática (MQ).

3.1.2. Potencial zeta (ζ)

Para essa resposta, tanto o modelo linear quanto o quadrático apresentaram falta de ajuste. Porém, com o modelo linear, a porcentagem máxima de variação explicável foi 28,4%, enquanto que com o modelo quadrático essa porcentagem foi 49,9%. Assim, foi analisado apenas o modelo quadrático, o qual mostrou que ζ somente é influenciado pelo fator 5-FU. Quanto maior a quantidade de 5-FU utilizada na preparação das NP, menor ζ , devido ao abaixamento do pH da solução causada pelo fármaco. A equação 10 é ajustada aos dados da Tabela 15.

ζ (mV) =	-36,6	-4,0 * 5-FU -6,1 * 5-FU ²		
	(± 1,2)	(±1,1)	(±1,7)	LQUAÇAO 10

Tabela 15. Cálculo dos coeficientes de regressão (CR), erro padrão (s) e valor de t de Student e parâmetro p para o intervalo de confiança a 95% para o ajuste do modelo guadrático – variável ζ.

	CR	S	t(9)	р	-95%	95%	
Média/Intersecção	-36,6	1,2	-29,3	0	-39,4	-33,8	
5-FU (Linear)	-4,0	1,1	-3,7	0,005	-6,4	-1,5	
5-FU (Quadrático)	6,1	1,7	3,7	0,005	2,3	9,8	
TPGS (Linear)	2,3	1,1	2,1	0,07	-0,2	4,7	

A Tabela 16 mostra a estimativa dos efeitos e intervalo de confiança de ζ para ajuste do modelo quadrático, erro padrão (s), valor de t de Student e parâmetro p

	Efeito	S	t(9)	р	-95%	+95%
Média/Intersecção	-36,6	1,2	-29,3	0	-39,4	-33,9
5-FU (Linear)	-7,9	2,2	-3,7	0,005	-12,8	-3,0
5-FU (Quadrático)	12,1	3,3	3,7	0,005	4,6	19,6
TPGS (Linear)	4,5	2,2	2,1	0,07	-0,4	9,4

Tabela 16. Estimativa dos efeitos e intervalo de confiança de ζ para ajuste do modelo quadrático, erro padrão (s), valor de t de Student e parâmetro p.

A Tabela 17 mostra os resultados da análise ANOVA. Aplicando o teste F e utilizando o mesmo valor $F_{2,9}$ 4,26, chega-se ao valor 22,31; maior que o valor de F, indicando que o modelo não é ajustado adequadamente.

Tabela 17. ANOVA para a variável ζ para o ajuste do modelo quadrático. Valores de soma quadrática (SQ), graus de liberdade (GL) e média quadrática (MQ).

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	
5-FU (Linear)	125,6	1	125,6	
5-FU (Quadrático)	125,7	1	125,7	
TPGS (Linear)	41,0	1	41,0	
Falta de ajuste	209,1	1	209,1	
Erro puro	84,4	9	9,4	
SQT	585,7	13		

A Figura 38 mostra o quadro de Pareto dos efeitos padronizados, a superfície ajustada e o quadro da distribuição dos resíduos vs. respostas previstas para ζ:



Figura 38. Variável: ζ (mV) (a) Quadro de Pareto dos efeitos padronizados;
(b) Superfície ajustada (2 fatores, 1 bloco, 14 ensaios; MQ Erro puro 9,4); (c) Quadro da distribuição dos resíduos vs. respostas previstas.

3.1.3. Tamanho (ϕ , Z average)

Para ϕ , não foi possível ajustar o modelo linear aos dados experimentais, no qual R² obtido foi 44,1%. Usando o modelo quadrático, o volume de TPGS e o termo quadrático referente ao 5-FU influenciaram a resposta pois, quanto maior o volume, maior ϕ . Dois fatos podem estar ocorrendo: quanto menor o volume, melhor a homogeneização, a dispersão das gotículas e o cisalhamento das partículas e, portanto, menor ϕ e quanto menor o volume de TPGS, maior a viscosidade da solução e, portanto, menor a coalescência das gotículas. A equação 11 é ajustada para esse modelo.

 ϕ = 113,1 -4,5 * (5-FU) -11,1 * (5-FU)² + 8,1 * TPGS EQUAÇÃO (nm) (± 2,8) (±2,5) (±3,8) (±2,5) 11

A Tabela 18 mostra os coeficientes de regressão (CR), erro padrão (s) e valor de t de Student e parâmetro p para o intervalo de confiança a 95% para o ajuste do modelo quadrático – variável ϕ . A Tabela 19 mostra a estimativa dos efeitos e intervalo de confiança de ϕ para ajuste do modelo quadrático, erro padrão (s), valor de t de Student e parâmetro p e a Tabela 20 mostra os resultados da análise ANOVA. A porcentagem da variação explicada neste caso foi 71,2%. Aplicando o teste F para verificar a falta de ajuste chega-se ao valor 0,73, menor que o valor de F tabelado, indicando que o modelo quadrático se ajusta aos resultados experimentais.

modelo quadrático – variável ø.									
	CR	S	t(9)	р	-95%	+95%			
Média/Intersecção	113,1	2,8	39,7	0,0	106,6	119,5			
5-FU (Linear)	-4,5	2,5	-1,8	0,1	-10,1	1,0			
5-FU (Quadrático)	-11,1	3,8	-3,0	0,01	-19,6	-2,6			
TPGS (Linear)	8,1	2,5	3,3	0,009	2,5	13,7			

Tabela 18. Cálculo dos coeficientes de regressão (CR), erro padrão (s) e valor de t de Student e parâmetro p para o intervalo de confiança a 95% para o ajuste do

Tabela 19. Estimativa dos efeitos e intervalo de confiança de ∳ para ajuste do modelo quadrático, erro padrão (s), valor de t de Student e parâmetro p.

	Efeito	S	t(9)	р	-95%	+95%
Média/Intersecção	113,1	2,8	39,7	0	106,6	119,5
5-FU (Linear)	-9,1	4,9	-1,8	0,1	-20,2	2,1
5-FU (Quadrático)	-22,3	7,5	-3,0	0,02	-39,3	-5,2
TPGS (Linear)	16,2	4,9	3,3	0,009	5,0	27,3

Tabela 20. ANOVA para a variável ϕ para ajuste do modelo quadrático. Valores de soma quadrática (SQ), graus de liberdade (GL) e média quadrática (MQ).

Fonte de variação	SQ	GL	MQ
5-FU (Linear)	164,7	1	164,7
5-FU (Quadrático)	424,7	1	424,7
TPGS (Linear)	523,3	1	523,3
Falta de ajuste	9,5	1	9,5
Erro Puro	437	9	48,6
Total	1559	13	

A Figura 39 mostra o quadro de Pareto dos efeitos padronizados, a superfície ajustada e o quadro da distribuição dos resíduos vs. respostas previstas para o modelo referente ao ϕ .



Figura 39. Variável Tamanho (φ). (a) Quadro de Pareto dos efeitos padronizados; (b) Superfície ajustada (2 fatores, 1 bloco, 14 ensaios; MQ Erro puro 48,6); (c) Quadro da distribuição dos resíduos vs. respostas previstas.

3.1.4. Rendimento

Nenhum fator influenciou o rendimento do método, no intervalo de volume e de quantidade de 5-FU utilizado.

3.1.5. Índice de polidispersão

Ambos os fatores não influenciaram o índice de polidispersão das nanoparticulas, no intervalo de volume e na quantidade de 5-FU utilizados.

3.2. Operações evolucionárias

A partir dos resultados obtidos no planejamento experimental realizado, isto é, quanto maior a quantidade de 5-FU e quanto menor o volume de TPGS, maior o carregamento, outros ensaios foram realizados nos quais foi adicionada maior quantidade de 5-FU.

Inicialmente, o primeiro experimento foi feito adicionando 1,75 mL da solução de 5-FU 12 mg/mL; porém, observou-se que há precipitação do PLGA devido ao aumento da quantidade de água na solução de PLGA. Assim, aumentou-se a massa de 5-FU usando solução supersaturada de 5-FU a 40 °C. Os resultados estão sumarizados na Tabela 21.

Volume	Concentração	C (%)	D (0/)	+ (nm)	חמו	۲ (m\/)	
5-FU (mL)	(mg/mL)	C (//)	K (70)	φ (ΠΠ)	IFD	ς (Π ν)	
1,5	12	3,1 ±	43,2 ±	98,7 ±	0,112 ±	-33,8 ±	
	12	0,1	1,3	17,1	0,023	7,9	
15	21 5	7,2 ±	28,8 ±	128,8	0,137	-36,7 ±	
1,5	21,5	0,3	1,1	± 6,1	±0,022	7,5	
1 25	21.5	7,0 ±	41,7 ±	112,3	0,199 ±	-37,2 ±	
1,25	21,5	0,3	1,5	± 8,7	0,020	8,5	

Tabela 21. Percentual de carregamento (C), rendimento (R), diâmetro (ϕ), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (ζ) para cada ensaio a 25 °C.

Como a solubilidade do fármaco é maior em pH 9, também foram feitos experimentos em solução básica com esse pH. A preparação de NP em solução de TPGS e de 5-FU, pH 2, também foi testada, com intuito de observar qual a influência da acidez nas NP. Os resultados estão sumarizados na Tabela 22.

Nessa tabela observa-se que a diminuição do pH tanto da solução interna quanto da externa faz que os parâmetros piorem devido à contração do polímero e ao desfavorecimento de sua dissolução, fazendo que ele fique praticamente aderido à parede do recipiente e na haste do agitador. Foi impossível quantificar o 5-FU nesses ensaios, mas foi observado que R diminuiu e ϕ e IPD aumentaram. Os resultados com aumento do pH foram semelhantes aos obtidos com solução aquosa. Observa-se também influência do pH no potencial Zeta: em soluções ácidas ocorre neutralização dos grupos carboxilatos diminuindo ζ e em meio básico há aumento de ζ por causa da desprotonação dos grupos carboxila do PLGA.

Pelos resultados da Tabela 22, pode-se concluir que o pH das soluções interna e externa e a temperatura influenciam a quantidade de 5-FU encapsulado e a formação das partículas. Em meio ácido há contração da cadeia polimérica de PLGA, precipitação do polímero, diminuindo o rendimento. Em meio básico, além de o TPGS reagir em soluções alcalinas, os resultados foram muito semelhantes àqueles em água, provavelmente devido à solubilidade do 5-FU ser pouco maior em solução com pH 9 (os valores de pKa do 5-FU são 8 e 13).

Nessa tabela, observa-se que aumentando a concentração da solução num mesmo volume da solução interna de 5-FU o carregamento aumenta, mas o rendimento cai pela metade, possivelmente porque a menor quantidade de solvente para solubilizar o PLGA na fase orgânica favorece melhor interação intercadeias que sua separação na acetona, formando aglomerados. Quando a quantidade de água na solução de PLGA é menor, não há diminuição da quantidade disponível de polímero para formar nanoparticulas e, portanto, o rendimento aumenta. Assim, como previsto anteriormente pelo planejamento experimental, quanto maior a quantidade de 5-FU, maior o carregamento, mas

91

houve um limite para esse aumento, pois os ensaios com 1,5 mL e com 1,25 mL forneceram praticamente a mesma quantidade de 5-FU encapsulada.

Volume	рН	C (%)	R (%)	φ (nm)	IPD	ζ (mV)
5-FU (ML)						
1.5	15 5	7,2 ±	28,8 ±	128,8 ±	0,137	-36,7 ±
1,5	4,5 - 5	0,3	1,1	6,1	±0,022	7,5
1 5	C		20,6 ±	97,5	0,465 ±	-23,6 ±
1,5	Z		3,1	±15,1	0,212	5,7
1 5	0	7,1 ±	49,5 ±	55,3 ±	0,183 ±	-37,0 ±
1,5	9	0,1	2,8	23,7	0,021	8,5
1 25	1 5 5	7,0 ±	41,7 ±	112,3 ±	0,199 ±	-37,2 ±
1,25	4,5 - 5	0,3	1,5	8,7	0,020	8,5
1 05	0	7,5 ±	46,3 ±	56,0 ±	0,165 ±	-39,8 ±
1,25	9	0,1	1,1	31,9	0,010	9,2
TDCS	2		6,8 ±	931,4 ±	0,649	-13,6 ±
163	2		1,7	114,5	±0,315	3,2
TDCS	0	6,1 ±	39,5 ±	81,1 ±	0,166 ±	-48,9 ±
IPGS	9	0,1	1,2	32,1	0,120	4,9

Tabela 22. Percentual de carregamento (C) e rendimento (R), diâmetro (φ), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (ζ) para cada ensaio à 25 °C. Cada ensaio foi feito com solução supersaturada de 5-FU (21,5 mg/mL).

Quanto à influência exercida pela temperatura (Tabela 23), sua diminuição aumenta o carregamento do 5-FU devido à menor difusão para a solução aquosa. Porém, IPD aumenta o que poderia ser causado pela formação mais rápida das partículas, reduzindo a possibilidade de cisalhamento, ou a diminuição da temperatura acarrete diminuição da velocidade de difusão do solvente, levando a um maior tempo para que as partículas se coalescerem e aumentando a distribuição do tamanho das partículas. Contrariamente, quando se eleva a temperatura, o fármaco tende a difundir para a solução externa. Todos os parâmetros pioram a 50 °C, pois ocorre alteração da conformação das cadeias poliméricas na solução devido a proximidade com a temperatura de transição vítrea.

Tabela 23. Percentual de Carregamento (C), percentual de rendimento (R), diâmetro (ϕ), índice de polidispersão (IPD) e potencial Zeta (ζ) para cada ensaio a 25 °C. Cada ensaio foi feito com solução supersaturada de 5-FU (21,5 mg/mL).

Ensaio	C (%)	R (%)	φ (nm)	IPD	ζ (mV)
0°C	10,0 ± 0,6	46,5 ± 1,5	70,4 ± 9,4	0,186 ± 0,032	-38,5 ± 4,8
10 °C	$11,5 \pm 0,5$	41,1 ± 1,8	91,3 ± 10,2	0,129 ± 0,025	$-32,9 \pm 7,4$
20 °C	$7,2 \pm 0,3$	39,4 ± 2,1	120,1 ± 5,7	0,167 ± 0,031	-37,0 ± 8,5
25 °C	$7,0 \pm 0,3$	41,7 ± 1,5	112,3 ± 8,7	0,199 ± 0,020	-37,2 ± 8,5
40 °C	$5,8 \pm 0,05$	40,3 ± 1,2	51,6 ± 14,8	0,156 ± 0,044	-41,8 ± 8,4
50 °C		3,1 ± 1,2	402,6 ± 55,1	0,428 ± 0,017	- 27,6± 10,2

Para comparação, preparou-se NP dissolvendo a mesma quantidade de 5-FU (26,8 mg) diretamente na acetona a 10 °C, sendo obtidos C (5,3 ±0,2) %, R (43 ± 2,3) %, ϕ (128,8 ± 5,8) nm, IPD (0,209 ± 0,012) e ζ (-26,1 ± 9,5) mV. Nestas NP, C diminuiu pela metade, revelando a importância da difusão na preparação das NP: a quantidade de água utilizada facilita a deposição e formação das partículas devido à difusão preferencial da água para fora das gotículas, causada por sua baixa afinidade pelo PLGA. Em seguida a concentração de PLGA dentro da gotícula aumenta induzindo formação das NP e aumentando o percentual de carregamento.

4. Quitosana e ácido fólico

Primeiramente, foram feitas a purificação e caracterização da quitosana e a caracterização do ácido fólico. Em seguida, foi feita reação da QTS com ácido fólico visando acoplar folato à superfície das nanoparticulas de PLGA para aumentar a seletividade destas partículas na entrega de 5-FU utilizando quitosana

como ponte para esta interação. Vários trabalhos utilizam estratégia semelhante para aumentar o direcionamento de NP contendo agentes quimioterápicos. Outros métodos também são utilizados para este acoplamento, como ligação covalente do ácido fólico à superfície das NP via conjugação por EDC-NHS (Narayanan et al., 2010), acoplamento de ácido fólico a TPGS (Zhang et al., 2007b) e recobrimento de NP de PLGA com um conjugado de ácido fólico, polietilenoglicol e poli(L-lisina) (Kim et al., 2005).

4.1. Quitosana

Para caracterizar a quitosana purificada, foram obtidos espectros de absorção no infravermelho e de RMN de ¹³C e ¹H, sendo calculado o grau de desacetilação.

4.1.1. Ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de RMN foi utilizada para caracterizar a QTS após a purificação e calcular o grau de desacetilação (GD, Heux et al., 2000). O espectro de RMN-¹³C foi obtido por CPMAS da QTS neutra. Nesta técnica, GD é calculado a partir da integral do pico do carbono do grupo metila dividido pela soma das integrais dos picos dos átomos de carbono do anel D-glucopiranosil (átomos C1-C6), conforme equação 12.

$$GD = \frac{100 \, x \, I_{N-CH_3}}{\left[\frac{1}{6} \, x \left(I_{C1} + \, I_{C2} + \, I_{C3} + \, I_{C4} + \, I_{C5} + \, I_{C6}\right]}$$
EQUAÇÃO 12

A Figura 40 mostra o espectro de RMN-¹³C da QTS neutra, purificada, cujo GD calculado foi 95,7%.



Figura 40. Espectro de RMN-¹³C obtido por CPMAS para a QTS neutra purificada (sonda 2R - 8 kHz).

Como a QTS neutra não dissolve em D_2O , o espectro de RMN-¹H foi obtido para QTS-HCI. Pela técnica de RMN-¹H, o GD também é calculado a partir da integral do carbono do grupo metila divido pela soma das integrais dos átomos de carbono do anel D-glucopiranosil (átomos C1-C6). O espectro de RMN-¹H da QTS D_2O/H_3CCOOH em está na Figura 41. O cálculo do GD por este método não pode ser calculado, pois pico do solvente está sobreposto ao pico do grupo metila.



Figura 41. Espectro de RMN-¹H da QTS em D₂O/H₃CCOOH (500 MHz; 24,6 $^{\circ}$ C; nt=32, lb=1,0 Hz; sonda bbsw).

4.1.2. Espectroscopia de absorção no infravermelho

O espectro de absorção no infravermelho da QTS purificada neutra está na Figura 42. A atribuição das bandas está na Tabela 24 (Wan et al., 2008).



Figura 42. Espectro de absorção no infravermelho da QTS.

Tabela 24. Atribuições das bandas do espectro de absorção no infravermelho da quitosana.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3438	ν(OH) e ν(NH)
2926, 2876	ν(CH)
1655	v(C=O) grupos amida I e acetil
1375, 1325, 1261	v (CN) e δ (CN) grupo amida III
1098	v(C-O)

4.2. Ácido fólico

Para caracterizar o ácido fólico e comprovar sua pureza foram feitas análises térmicas e espectroscópicas, cujos resultados estão sumarizados a seguir:

4.2.1. Espectroscopia de absorção no UV-Vis

A curva de calibração feita a partir de diluições em solução de ácido acético 1% está mostrada na Figura 43. O coeficiente de extinção molar, em 282 nm, calculado para essa solução foi 2,6.10³ L/(cm.mol).



Figura 43. Curva de calibração da solução de ácido fólico em solução ácido acético a 1% com absorbância obtida em 282 nm.

4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear - ¹H

As atribuições do espectro de RMN-¹H foram feitas seguindo a denominação dada por Bonechi et al. (2006), cuja estrutura e a numeração dos prótons estão na Figura 44.



Figura 44. Estrutura molecular do ácido fólico com as atribuições de cada próton (Bonechi et al., 2006).

O espectro de RMN-¹H do ácido fólico obtido em DMSO-d₆ está ilustrado na Figura 45.



Figura 45. Espectro de RMN-¹H do ácido fólico em DMSO-d₆. (500 MHz; 24,6 $^{\circ}$ C; nt=32, lb=1,0 Hz; sonda bbsw).

As atribuições dos prótons característicos do ácido fólico estão na Tabela 25.

Proton	δ (ppm)
H7	8,64
H18	8,10
H13/15	7,64
H10	6,93
H12/16	6,63
H9	4,48
H19	4,32
H22	2,31
H21	2,03

Tabela 25. Atribuição do δ (ppm) dos prótons de ácido fólico em DMSO-d₆.

4.2.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho

O espectro de absorção, no infravermelho, do ácido fólico está na Figura 46. A atribuição das bandas está na Tabela 26 (Wan et al, 2008; Zhang et al., 2008).



Figura 46. Espectro de absorção no infravermelho do ácido fólico.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3100-3600	v(OH) do ácido glutâmico e v (NH) do grupo NH
	do anel pteridina
2980–2900	v _{simétrico} (CH) e v _{assimétrico} (CH)
1696	v(C=O) do grupo COOH
1638	v(C=O) do grupo CONH ₂
1604	δ(NH)
1517 1484	Bandas vibracionais características do grupo
1317-1404	fenil e da pteridina
1415	$\delta(OH)$ do esqueleto fenil

Tabela 26. Atribuições das bandas do espectro de absorção no infravermelho do ácido fólico.

4.2.4. Difratometria de raios-X

O padrão de difratometria de raios-X do AF obtido é mostrado na Figura 47, onde podemos observar um grande número de picos finos, caracterizando um composto cristalino.



Figura 47. Difratograma de raios-X do ácido fólico.

4.2.5. Análises térmicas

Quanto à análise calorimétrica por DSC, observa-se que a fusão do ácido fólico ocorre em \approx 197 ^{o}C (Figura 48).



Figura 48. Curva de DSC do ácido fólico.

Na análise da curva de TGA do ácido fólico (Figura 49), observou-se que a decomposição se inicia a 200 °C e segue uma gradual perda de massa até 700 °C. Essa primeira etapa de decomposição que ocorre em ≈100 °C é devido, principalmente, à perda da água adsorvida (Vora et al., 2004).



Figura 49. Curva de TGA do AF (a) % massa vs. temperatura (°C) e (b) δ (mg/°C) vs. temperatura (°C).

4.3. Síntese de folato de quitosana (QTSFOL)

A reação entre ácido fólico e a quitosana é feita através da conjugação de EDC. Esse reagente é um agente de acoplamento, similar ao DCC, porém é solúvel em água e reage com os grupos carboxila do ácido fólico em meio ácido, formando um intermediário derivado da uréia. A reação está representada na Figura 50.



Figura 50. Representação esquemática da reação entre ácido fólico e quitosana.

O cálculo da quantidade de folato acoplada à QTS foi feito por espectroscopia de absorção no UV-Vis. Primeiramente, obteve-se a curva de calibração do ácido fólico em solução de ácido acético 1%. Determinada quantidade de QTSFOL foi dissolvida na mesma solução. Usando o coeficiente de extinção molar (ϵ) é calculada a quantidade de folato acoplado à QTS, cuja porcentagem em massa foi 12,2%. Wan et al. (2008) obtiveram grau de substituição de 12,5%.

Os espectros de absorção no infravermelho (Figura 51) confirmam a conjugação entre QTS e AF. Há três bandas características da QTS: v(OH)em 3420 cm⁻¹, 1094 cm⁻¹ de $\delta(C-O-C)$ e 1653 cm⁻¹ de v(NH2). Comparado com QTS, QTSFOL mostra desaparecimento da banda em 1653 cm⁻¹, da deformação angular de N–H na amina primária e aparecimento da banda em 1565 cm⁻¹ associada à deformação N–H na amina secundária. Outra banda surge em 1208 cm⁻¹, atribuída ao v(C-N) desta amina (Wan et al., 2008).

103



Figura 51. Espectros de absorção no infravermelho do ácido fólico (AF), quitosana (QTS) e folato de quitosana (QTSFOL).

Nos espectros obtidos por RMN (Figura 52), observou-se que a conjugação química do AF à QTS resulta no aparecimento de picos a 7,2 ppm (H13/15, AF); 6,65 ppm (H12/16, AF) e em \approx 2 ppm (H21, AF). Outros picos do folato entre 2,5 e 4 ppm estão mascarados pelos picos referentes aos prótons da quitosana e do solvente.



Figura 52. Espectro de RMN-¹H de QTSFOL em DMSO-d₆/CH₃COOH. (500 MHz; 24,6 °C; nt=32, lb=1,0 Hz; sonda bbsw).

4.4. Acoplamento de quitosana e folato de quitosana

4.4.1. Entrelaçamento de cadeias

O ensaio inicial para acoplar QTS e QTSFOL à superfície das NP foi feito através do método de entrelaçamento de cadeias. Somente a quitosana (em forma de cloridrato) foi utilizada para teste devido à facilidade de sua purificação. Inicialmente, QTS-HCI foi dissolvida na solução de TPGS 0,03%; em seguida, a solução de PLGA/5-FU foi gotejada a esta solução, sob agitação a 2000 rpm por 3 h e, então, sob alta velocidade por 10 minutos. Para analisar a influência do fármaco e da velocidade de agitação do Ultraturrax®, foi aplicado planejamento experimental 2² com ponto central, cujos resultados estão sumarizados na Tabela 27.

5-FU	VA	5-FU	VA	φ (nm)	IPD	ζ (mV)	C (%)	R (%)
		(mg)	(rpm)					
+1	+1	15	14000	255,7	0,32	26,9	0,12	79,2%
+1	-1	15	10000	191,0	0,25	28,5	0,23	80,4%
-1	+1	10	14000	169,2	0,20	29,0	0,90	75,5%
-1	-1	10	10000	198,3	0,18	25,5	0,07	77,4%
0	0	12,5	12000	184,4	0,33	26,6	0,16	76,5%
0	0	12,5	12000	189,4	0,33	24,2	0,12	80,9%
0	0	12,5	12000	200,8	0,34	26,1	0,14	79,8%

Tabela 27. Níveis das variáveis 5-FU, velocidade do dispersor (VA) e parâmetros obtidos das NP (φ, ζ, IPD, C e R).

Analisando estes dados, pode-se observar que o carregamento das NPQTS neste experimento foi muito inferior aos da NP, provavelmente devido à difusão do 5-FU para a solução externa durante as 3 horas de agitação anterior à homogeneização com alta velocidade, o que também pode ter causado destruição das partículas já formadas. Este método seria, portanto, mais adequado para encapsular fármacos hidrofóbicos.

Como descrito anteriormente, a análise dos resultados por ANOVA (Tabela 28) considera como significativos parâmetros com valores de $p \le 0,05$. O erro padrão do método foi obtido pelas replicatas no ponto central.

Nesta tabela, conclui-se que a quantidade de 5-FU influenciou os resultados de ϕ , IPD e C, enquanto a variação da velocidade de agitação do Ultraturrax® foi significativa apenas para IPD. Os resultados experimentais de IPD e C não puderam ser ajustados e, em vista disso, não foram feitas mais replicatas no ponto central, o que aumentaria os graus de liberdade do planejamento e provavelmente ajustaria o modelo mais apropriadamente (Barros Neto et al., 2007).

Tabela 28. Coeficiente de regressão (CR) e erro padrão (s) obtidos mediante análise ANOVA para o ensaio experimental do método de entrelaçamento de

Parâmetros _	CR		-	S		-95%		95%
	5-FU	VA	5-FU	VA	5-FU	VA	5-FU	VA
φ (nm)	19,8	8,9	4,2	4,2	1,7	-9,2	3,9	26,9
IPD	0,048	0,023	0,003	0,003	0,04	0,01	0,06	0,03
ζ (mV)	0,23	0,48	0,6	0,6	-2,5	-2,2	2,9	3,2
C (%)	0,045	-0,02	0,1	0,1	0,002	-0,06	0,09	0,02
R (%)	1,68	-0,78	1,1	1,1	-3,3	-5,7	6,6	4,2

cadeias.

4.4.2. Adsorção simples de quitosana e folato de quitosana

O método de entrelaçamento de cadeias não foi eficiente em encapsular 5-FU em NP recobertas com QTS. Assim, o método de simples adsorção foi empregado, onde foi estudada a adsorção de QTS e QTSFOL, em três diferentes concentrações, com o tempo e monitoramento de ϕ , IPD e ζ .

Os valores iniciais de ϕ , IPD foram 71,8 nm e 0,193, respectivamente. A variação temporal do ϕ e IPD das nanoparticulas recobertas com QTS e QTSFOL estão ilustradas nas Figuras 53 e 54.



Figura 53. Variação temporal do (a) ϕ (nm); (b) IPD de NP recobertas com QTS.



Figura 54. Variação temporal de (a) ϕ (nm); (b) IPD de NP recobertas com QTSFOL.

Quanto à variação do ζ das NP recobertas com QTS e QTSFOL, os gráficos estão ilustrados nas Figuras 55 e 56:



0,67%; (c) 0,76%.



Figura 56. Variação temporal de ζ de NP recobertas com QTSFOL. (a) 0,67%; (b) 0,75%; (c) 0,88%.

Analisando estas figuras, observa-se que após a adição das soluções de QTS e QTSFOL a variação temporal de ϕ e de IPD não foi linear nos primeiros minutos. O ϕ das NPs aumentou com o aumento da concentração de QTS devido à maior quantidade de QTS adsorvida na superfície das NP. Para as amostras com menores concentrações de QTS e QTSFOL, tanto ϕ quanto IPD se mantiveram constantes após 45 minutos. Para as suspensões de NP com maiores concentrações de QTS e QTSFOL, as partículas aumentaram e ficaram mais polidispersas após 30 dias. Quanto maior o número de cadeias de QTS presentes no meio, maior a adsorção e mais desordenada, aumentando estes parâmetros. Com maior número de camadas, as cadeias de QTS tendem a se repelir devido à mesma carga, mas também são atraídas umas pelas outras e interagem através de interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e ligação de hidrogênio (Guo & Gemeinhart, 2008).

A alteração mais significativa ocorreu para ζ , cujo sinal foi invertido em todas as preparações. O ζ inicial das NP de PLGA foi (-29,3 ± 4,0) mV, devido aos grupos carboxila terminais do PLGA. Com adição das soluções de QTS e QTSFOL, o potencial se inverteu e seu valor aumentou com o tempo em todas as concentrações, porém permaneceu na mesma faixa para todas as suspensões. O aumento temporal de ζ indicou o aumento da adsorção de cadeias de QTS na superfície das NP, como observado nas Figuras 55 e 56. Quanto ao valor de ζ permanecer na mesma faixa nas três concentrações, podemos concluir que houve saturação da absorção já na primeira concentração estudada.

Guo & Gemeinhart (2009) estudaram a adsorção de QTS na superfície de NP de PLGA e analisaram que a adsorção de múltiplas camadas de QTS permite que apenas uma pequena quantidade de QTS influencie ζ, pois a carga superficial por unidade de área, devido aos grupos amina, é constante. Além disso, observaram que a atração eletrostática entre a carga positiva da QTS e a superfície negativa das NP de PLGA é a força motriz na formação da primeira camada de QTS adsorvida, ligação de hidrogênio (N-H) ou forças de van der Waals são responsáveis pela adsorção de mais cadeias de QTS mesmo após a carga positiva ter sido alcançada.

111

A inversão do sinal do ζ das NP é indicativa de forte interação entre a superfície das NP e QTS/QTSFOL. Portanto, este método foi eficiente em acoplar quitosana e ácido fólico à superfície das nanoparticulas de PLGA.

5. Estabilidade coloidal

A estabilidade coloidal de qualquer formulação é importante ser verificada frente à força iônica e a variação de pH no local de administração. Para formulações que serão administradas via aplicação parenteral, é importante verificar a estabilidade da emulsão a ser injetada no fluido sanguíneo que apresenta íons e sais, daí a necessidade de estudar a estabilidade da emulsão em soluções com diferentes concentrações de sal e em solução salina de tampão fosfato (força iônica 154 mmol/L).

Além desse fator, dependendo do local de administração destas partículas e seu caminho até chegar ao local de ação, as partículas podem ser desestabilizadas com a variação de pH do meio. Para formulações tópicas, um requisito importante é controlar o pH do sistema em que estas partículas serão veiculadas para evitar alergias e irritações ao paciente e não causar nenhuma mudança na característica destas partículas.

Já é conhecido o efeito da adição de sal na estabilidade de emulsões, isto é, o aumento da concentração de eletrólitos em uma suspensão diminui a espessura da dupla camada e reduz os efeitos de repulsão e de resistência à deformação da nuvem iônica levando a coagulação das partículas (Florence & Atwood, 2003). Portanto, diferentes concentrações de Na₂SO₄ foram adicionadas às suspensões de NP, NPQTS e NPQTSFOL, e a distribuição de tamanhos foi obtida por espalhamento dinâmico de luz. O gráfico de ϕ (Z *average*) das suspensões vs. concentração de Na₂SO₄ está ilustrado na Figura 57.

112


Figura 57. Estudo da estabilidade coloidal das partículas com adição de solução de Na₂SO₄ em diferentes concentrações.

Nessa figura observa-se que o acoplamento de QTS e QTSFOL diminui drasticamente a estabilidade destas partículas frente à força iônica, pois ϕ aumenta bruscamente na concentração inicial de 0,1 mol/L de Na₂SO₄. Para a formulação NP, o aumento de ϕ somente se inicia quando a concentração de Na₂SO₄ é acima de 0,5 mol/L. Além do efeito da adição de sal na desestabilização da emulsão, pode ocorrer reticulação das cadeias da QTS e QTSFOL ligadas à superfície das NP pelo anion SO₄²⁻ seguido da precipitação das partículas. A adição de ânions multivalentes é um dos métodos de reticulação iônica para formação e precipitação de micro-esferas de QTS (Yurdasiper & Sevgi, 2010).

Em solução salina de tampão fosfato, foi também observada a precipitação das formulações de NPQTS e NPQTSFOL. Yang et al. (2009) relataram aumento significativo do diâmetro de nanoparticulas de PLGA e Paclitaxel modificadas com QTS quando colocadas em plasma. Em outro trabalho, Nafee et al. (2009) estudaram a estabilidade coloidal de nanoparticulas de PLGA/QTS em diferentes meios de cultura em pH 4,7 e pH 7,4 e diferentes células, mostrando que a aglomeração destas NP diminui a citotoxidade destas

partículas devido à menor disponibilidade destas partículas no meio, proporcionalmente relacionada com a quantidade de QTS presente nas mesmas.

Quanto à estabilidade destas partículas frente à variação de pH do meio, o estudo foi realizado através da medida de ϕ e de ζ com variação do pH da solução. Os resultados estão na Figura 58.

A Figura 58 mostra o efeito do pH no diâmetro e na carga superficial das NP, NPQTS e NPQTSFOL. Observa-se que a partir do pH 10, começa a ocorrer variação de ϕ das nanoparticulas em todas as formulações, sendo que para as partículas recobertas com QTS e QTSFOL o aumento do diâmetro é muito maior. A variação destes parâmetros para as NP não recobertas é menor, sendo que ocorre somente ligeiro aumento do tamanho das partículas a partir de pH 11.

Quanto ao efeito da variação de pH na carga superficial da NP recobertas e não recobertas, observa-se na Figura 59 que ζ permanece praticamente constante entre pH 4 e 11. Há ligeiro aumento na carga das NP em pH menores e leve redução em pH maiores. Com as partículas recobertas, observa-se variação mais brusca de ζ , principalmente em pH maior, ocorrendo redução da carga superficial. O ponto isoelétrico para NP é entre pH 2 e 3 e da NPQTS e NPQTSFOL é entre 11 e 12.



Figura 58. Variação do (a) tamanho e (b) potencial Zeta das nanoparticulas, com variação de pH.

As variações de ϕ e ζ podem ser explicadas pela capacidade tamponante destas nanoparticulas (Figura 59).



Figura 59. Capacidade tamponante das formulações NP, NPQTS e NPQTSFOL.

Observa-se que as formulações conseguem manter o pH das soluções principalmente entre 4 e 9, podendo este comportamento ser relacionado à ζ e alteração nos grupos carregados na superfície das partículas.

Por fim, pode-se concluir que a formulação contendo NP não apresenta restrição quanto à administração por diferentes rotas. No entanto, as nanoparticulas recobertas com QTS e QTSFOL são provavelmente impróprias para administração intravenosa, mas podem ser administradas em diferentes formas farmacêuticas com força iônica controlada.

6. Estudo do perfil de liberação

6.1. Perfil de liberação em carreadores

Quando o fármaco está encapsulado sua liberação deve ocorrer por período prolongado de tempo; assim, essas formulações requerem estudos sobre perfil temporal de liberação e devem ser realizados *in vivo* ou *in vitro* usando tampão fisiológico a 37 ⁰C, em plasma e em soluções com diferentes forças iônicas (D'Souza & DeLucca, 2006).

Os métodos mais utilizados dividem-se em três categorias: amostragem e métodos de separação, fluxo contínuo e diálise, onde a liberação é determinada através do tempo. O meio de seleção é baseado na solubilidade e na estabilidade temporal do fármaco.

No primeiro método, as partículas são introduzidas num recipiente contendo o meio de liberação. O método de fluxo contínuo consiste num meio circulado por uma coluna contendo as partículas. Diversas configurações como tipo de bomba e fluxo são reportadas na literatura. Na diálise, a suspensão de NP é fisicamente separada do meio por uma membrana de diálise e a liberação é feita na solução externa pelo tempo. Nos três métodos, a seleção do meio é baseada na solubilidade do fármaco e em sua estabilidade ao longo do tempo.

Geralmente, a liberação de fármacos colocados em NP ocorre em duas etapas: a inicial rápida (efeito *burst*) e depois a mais lenta (sustentada). Na primeira etapa, ocorre rápida liberação do fármaco da superfície das NP ou a difusão através da matriz polimérica, permitindo que o fármaco atinja rapidamente uma concentração efetiva do fármaco na circulação. A segunda etapa é uma mais lenta e devido ao fármaco que está dentro das NP, ocorrendo durante sua erosão/biodegradação, possibilitando que sua concentração permaneça na circulação por um longo tempo. (Li et al., 2008; Mc Carron et al., 2000).

A liberação depende de fatores como solubilidade do ativo, dessorção da superfície, difusão através da matriz da NP, degradação e erosão da NP e da combinação dos processos de erosão e difusão. Além disso, a liberação irá depender de como o fármaco foi incorporado e se a partícula está recoberta por algum polímero, pois esta camada atuará como uma barreira à liberação e difusão do fármaco (Mohanraj & Chien, 2006).

A liberação do fármaco também pode ser afetada pelo tamanho da partícula: partículas menores têm maior área superficial e, portanto, a maior parte do fármaco associado estará mais próxima ou na superfície, levando à rápida liberação. Outros fatores que podem influenciar são: porosidade dos carreadores, o tipo da ligação polimérica e a velocidade de sua hidrólise, o efeito no pH na

cinética de degradação e o tipo de erosão que ocorre na matriz ou na superfície do carreador (Siepmann & Göpferich, 2001).

Em carreadores de PLGA, primeiramente ocorre entrada de água na matriz polimérica, seguida pela dissolução do fármaco e quebra das ligações éster. Simultaneamente, o fármaco difunde devido aos gradientes de concentração ou através da matriz polimérica e/ou pelos poros preenchidos com água (Faisant et al., 2002).

Quanto à hidrofilicidade do fármaco, podemos citar como exemplo trabalhos publicados: Ahlin et al. (2002) estudaram o perfil de liberação de enalaprilat encapsulado em PLGA o qual mostrou que 60-70% do fármaco foi liberado após 1 minutos em diferentes meios receptores (água, fluido gástrico pH 1,2 e fluido intestinal pH 7,5). Govender et al. (1999) incorporaram cloridrato de procaína, outro fármaco hidrofílico, em PLGA, utilizando o mesmo método deste projeto e estudaram sua liberação *in vitro*. O perfil foi muito similar ao obtido para 5-FU encapsulado, isto é, liberação mais rápida na primeira hora.

McCarron et al. (2000) estudaram o perfil de liberação de 4 tipos de NP poliméricas contendo 5-FU utilizando célula de Franz e solução receptora salina de tampão fosfato. Neste trabalho, observou-se que uma característica predominante foi o efeito *burst* inicial devido ao fármaco fracamente aderido à superfície das NP e que o percentual de carregamento não interfere no perfil de liberação. Li et al. (2008) estudaram o perfil de liberação em NP de poli(γ -benzil-L-glutamato) e poli(etileno glicol), no qual o efeito *burst* liberando ≈30% do fármaco encapsulado ocorreu entre 0 e 2 h.

6.2. Difusão

Difusão é um processo onde a diferença de concentração entre dois compartimentos é reduzida por um fluxo espontâneo da amostra. A força motriz para que a difusão aconteça é o gradiente de potencial químico, o qual também pode ser descrito pelo gradiente de concentração dc/dx.

A equação para este caso é a primeira lei de Fick.

$$J = -D\frac{dc}{dx}$$
 EQUAÇÃO 12

onde J é o fluxo da matéria; D, o coeficiente de difusão e dc/dx o gradiente de concentração através da membrana. Se a membrana tiver espessura $l e \Delta c$ representar a diferença de concentração da solução do fármaco entre as duas faces da membrana.

$$J = \frac{DK\Delta c}{l}$$
 EQUAÇÃO 13

onde *K* é o coeficiente de distribuição do permeante em direção ao polímero. As equações 12 e 13 são aplicadas quando a matriz contendo o fármaco for homogênea e ocorrer difusão através dela.

O coeficiente de difusão é dado pela equação de Stokes-Einstein.

$$D=\frac{RT}{6\pi\eta\alpha Na}$$

EQUAÇÃO 14

onde η é a viscosidade do meio, α é o raio da molécula e *Na* é o número de Avogrado. Na equação 14, observa-se que o coeficiente de difusão é inverso ao de viscosidade. Assim, a difusão em um polímero sólido não poroso é mais difícil e mais lenta que num fluido, pois há necessidade das cadeias do polímero permitirem a passagem das moléculas do fármaco (Florence & Atwood, 2003).

O fenômeno da difusão em matriz foi descrito por diferentes modelos matemáticos e diversas equações foram obtidas. A seguir será dada uma breve descrição de alguns destes modelos (Costa & Lobo, 2001; Costa, 2002; Siepmann & Siepmann, 2008).

a) Cinética de ordem zero

Esta cinética é utilizada considerando partículas que não desagregam e liberam o ativo lentamente, podendo ser expressa pela equação 15.

 $Q_t = Q_0 + \kappa_0 t$ EQUAÇÃO 15

sendo Q_t a quantidade de fármaco liberada no tempo t, Q_0 a quantidade inicial de fármaco na solução (geralmente igual a 0) e κ_0 o coeficiente de velocidade de liberação. As formas farmacêuticas que seguem este perfil liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, constituindo-se como uma das melhores formas de veicular fármaco para a liberação prolongada.

b) Cinética de primeira ordem

Este modelo foi proposto para descrever a absorção ou a eliminação de alguns fármacos, embora seja difícil conceituar este mecanismo em bases teóricas. Este modelo pode ser expresso pela equação 16.

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + \kappa_1 t \qquad \qquad \text{EQUAÇÃO 16}$$

onde Q_t é a quantidade de fármaco liberada no tempo t, Q_0 a quantidade inicial de fármaco na solução e κ_1 o coeficiente de velocidade de liberação de ordem 1. Assim, um gráfico de ln Q_t vs. t será linear.

Carreadores que seguem esse modelo são usados para encapsular fármacos hidrofílicos em matrizes porosas, que liberam o fármaco em quantidade proporcional à quantidade restante no seu interior, por unidade de tempo (Mulye & Turco, 1995).

c) Modelo de Higuchi

Higuchi (Higuchi, 1961; Higuchi, 1963) desenvolveu expressões matemáticas relativas à liberação de fármacos hidrossolúveis e pouco solúveis em

água, dispersos numa matriz uniforme semi-sólida e/ou sólida que constitui o meio de difusão. A equação 17 é mais importante neste modelo.

$$Q_t = \kappa_H t^{1/2}$$
 EQUAÇÃO 17

sendo κ_H a constante de liberação e Q_t a quantidade de fármaco no tempo t. Higuchi descreve a liberação do fármaco como difusão baseada na lei de Fick vs. $t^{1/2}$, e pode ser utilizada em sistemas para liberação transdérmica e matrizes complexas contendo fármacos hidrofílicos.

d) Modelo de Peppas-Korsmeyer ou Lei da Potência

Este modelo foi desenvolvido por Korsmeyer e Peppas (Korsmeyer & Peppas, 1981; Korsmeyer et al., 1983) e pode ser representado pela equação 18.

$$rac{M_t}{M_{\infty}} = \kappa_{
m PK} \, {
m t}^{
m n}$$
 EQUAÇÃO 18

onde κ_{PK} representa uma constante cinética que incorpora as características estruturais e geométricas da matriz de liberação, n é o expoente de liberação e M_t/M_{∞} é a fração de fármaco liberada no tempo t.

Peppas (1985) usou o valor de n para caracterizar diferentes mecanismos de liberação, verificando que n = 0, 5 para a difusão que segue o modelo de Fick e entre 0,5 e 1,0 para a transferência de massa segundo um modelo não-Fickiano. O ajuste neste modelo deve ser feito com apenas 60% da curva. Este modelo é geralmente usado para analisar a liberação de formas farmacêuticas poliméricas, quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando possa estar envolvido mais de um tipo de liberação. Para partículas esféricas, foi mostrado que n assume o valor 0,43 (Siepmann & Siepmann, 2008).

A Tabela 29 resume o que foi mencionado nesta secção:

N	Tipo de transporte do fármaco	Таха
		Concentração inicial do fármaco
0,43	Difusão Fickiana	abaixo do limite de solubilidade,
		sendo ausente efeito de borda
0.43	Transporte anômalo	Difusão do fármaco e intumescimento
0,43 < fr < 0,65 Transporte anomaio		da matriz
0,85	Liberação ordem zero	Intumescimento da matriz

Tabela 29. Tipos de liberação por difusão considerando n para esfera.

e) Modelo de Baker-Lonsdale

Foi desenvolvido por Baker e Lonsdale (1974) a partir do modelo de Higuchi e descreve a liberação do fármaco a partir da matriz esférica, sendo representado pela equação 19.

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_{\infty}} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_{\infty}} = \kappa_{BL} t \qquad \qquad \text{EQUAÇÃO 19}$$

onde M_t/M_{∞} é a quantidade de fármaco liberado no tempo t e κ_{BL} é a constante de difusão. Portanto, um gráfico relacionando a parte esquerda da equação com t será linear e a constante de liberação corresponderá à inclinação da reta.

6.3. Estudo do perfil de liberação do fármaco 5-FU

Os perfis de liberação do fármaco nas formulações NP, NPQTS e NPQTSFOL foram obtidos através do ensaio de liberação utilizando membrana de diálise em solução tampão fosfato pH 7,4 a 37 ⁰C. Os resultados estão apresentados na Figura 60.



Figura 60. Perfil de Liberação de 5-FU a 37 ⁰C.

Observa-se que liberação de 5-FU ocorre mais rapidamente na formulação que contém apenas NP, havendo um *burst* nos primeiros 50 minutos e uma liberação sustentada até 2 h. Nas formulações com NPQTS e NPQTSFOL, observa-se que até 105 minutos a liberação tem o mesmo perfil e depois é mais prolongada para NPQTSFOL. O *burst* foi maior durante a primeira hora devido à difusão do 5-FU próximo ou na superfície das NP. Este fenômeno ocorre devido à hidrofilicidade do fármaco e, possivelmente, ao caráter anfifílico de TPGS, o que causa rápida absorção de moléculas de água na matriz polimérica, levando à rápida difusão do fármaco através dessa matriz (Esmaeili et al., 2007). O acoplamento de QTS e QTSFOL dificulta esse fenômeno, levando à liberação mais lenta na etapa inicial, indicativo da forte interação entre QTS e QTSFOL e a superfície destas NP.

O perfil de liberação do 5-FU nas formulações foi modelado para cinéticas de ordem zero, primeira ordem, modelo de Higuchi, Peppas–Korsmeyer e Baker-Lonsdale. Os testes estatísticos aplicados para comparação das formulações e da modelagem foram feitos analisando χ^2 (soma quadrática dos erros) e R (coeficiente de correlação). Observa-se que os menores valores de χ^2 e os maiores valores de R foram obtidos para o modelo de Peppas–Korsmeyer

destacados na Tabela 30. A liberação do 5-FU foi bem ajustada pelo modelo de ordem zero, indicando que a difusão é o principal mecanismo de transporte desse fármaco. Para as formulações de NP, NPQTS, NPQTSFOL, tanto o modelo de ordem zero como o modelo de Higuchi foram bem ajustados aos dados experimentais, com R próximo de 1, mostrando que a difusão também é provavelmente o principal mecanismo de transferência de massa. Já para o modelo de primeira ordem, observa-se que os valores de χ^2 obtidos foram próximos de zero, porém o coeficiente de correlação foi pequeno.

Modelo		5-FU	NP	NPQTS	NPQTSFOL
	χ^2	0,013	84,2	2,7	41,7
Ordem zero	R	0,986	0,825	0,968	0,986
	14	(3,4±0,4)*	(2 1+0 0)*10 ⁻²	(5 0+0 2)*10 ⁻³	(9,2 ±
	K0	10 ⁻²	(3,1±0,0) 10	(5,9±0,3) 10	0,3)*10 ⁻³
Primeira	χ^2		0,3	1,1	5,4
ordem	R	n/a	0,763	0,779	0,638
	К ₁		0,11±0,03	0,016±0,003	0,025±0,006
Liquobi	χ^2		60,4	0,9	61,2
підистії	R	n/a	0,874	0,988	0,978
	κ _H		0,24±0,05	0,071±0,002	0,101±0,004
Poppas	χ^2		0,02	0,006	0,1
Feppas- Korsmovor	R	n/a	0,929	0,994	0,988
Kusineyei	Крқ	II/a	0,201± 0,003	0,148±0,004	0,17±0,01
	n**		1,1±0,2	0,90±0,02	0,87±0,03
Baker	χ^2		165,8	0,033	0,039
l onsdale	R	n/a	0,905	0,317	0,290
LUIISUAIC	κ _{BL}		$4,4 \pm 0,8$	(11±4)*10 ⁻⁴	(7±3)*10 ⁻⁴

Tabela 30. Ajuste dos modelos matemáticos para liberação *in vitro* das formulações de NP, NPQTS e NPQTSFOL e para uma solução de 5-FU.

*n/a = não aplicável.

Ajustando os dados experimentais com o modelo de Peppas-Korsmeyer observamos que os valores de n são maiores que 0,43, indicando que além da difusão, outros fenômenos de transporte estão envolvidos na liberação do fármaco. Porém, os valores de n para NPQTS e NPQTSFOL foram menores que para a formulação NP, o que pode indicar um mecanismo de liberação diferente da formulação NP, devido à camada de QTS ou QTSFOL presente na superfície destas partículas. Os dados ajustados para o modelo de Peppas-Korsmeyer estão ilustrados na Figura 61.



Figura 61. Ajuste dos dados experimentais ao modelo de Peppas-Korsmeyer para NP, NPQTS e NPQTSFOL.

O modelo de Baker-Lonsdale foi mais bem ajustado somente para a formulação NP. Como esse modelo descreve a liberação do fármaco a partir de matriz esférica, possivelmente os dados experimentais das formulações NPQTS e NPQTSFOL não foram bem ajustados devido à superfície ser modificada levando a outros mecanismos de liberação.

Cada modelo fornece uma interpretação adicional dos resultados obtidos, porém em todos podemos ver que a constante de liberação é aproximadamente uma ordem de grandeza maior para a formulação NP que para NPQTS e NPQTSFOL, indicando que a adsorção de QTS e QTSFOL é eficiente em reduzir a liberação do 5-FU das partículas. Além disso, a ligação de ácido fólico à quitosana propicia maior liberação e mais prolongada que aquela com apenas QTS.

7. Liofilização

Liofilização é um processo de múltiplos estágios que envolvem a preparação do material: congelamento (onde ocorre a solidificação da amostra); sublimação (primeira secagem, no qual o material é colocado sob vácuo e a pressão é abaixada progressivamente para o gelo sublimar); e dessorção (secagem secundária), que se inicia após o gelo ser sublimado e alto vácuo que permite remover moléculas de água ligadas e que ocorre a temperaturas acima da temperatura de congelamento (Rey, 2010).

Essas etapas causam grande estresse nas partículas e resultam num aumento significativo de seu tamanho devido à aglomeração. Para evitá-la, são usados crioprotetores e, quanto maior a concentração destes, maior o efeito protetor que exercem (Date et al., 2010). No congelamento de uma amostra, há separação de fases em gelo e solução crioconcentrada. Em suspensão de nanoparticulas, a fase crioconcentrada é composta de NP e os outros componentes da formulação (surfatante, tampão, ativos não encapsulados). Esta maior concentração pode induzir agregação e fusão irreversível das NP. Além disso, a cristalização do gelo pode exercer estresse mecânico causando desestabilização das NP. Por estas razões, excipientes, como açúcares, que protegem o produto do estresse do congelamento (crioprotetores) ou da secagem (lioprotetores) são adicionados às suspensões. Estes açúcares vitrificam numa temperatura específica (temperatura de transição vítrea, T_g) e imobilizam as NP na matriz vítrea, protegendo-as contra o estresse mecânico dos cristais de gelo (Abdelwahed, 2006).

As estruturas de alguns açúcares mais comumente utilizados e as respectivas T_g estão sumarizadas na Tabela 31 (Simperler et al., 2006; Yu et al. 1998).

Açúcar	Estrutura Molecular	Τ _g
Glicose	сн₂он сн₂он	23°C
$C_{6}H_{12}O_{6}$	᠆ᡆ᠋᠆᠆ᡆᢩᠬ	
Massa Molar 180,2 g/mol		
Manitol		12,6°C
$C_6H_{14}O_6$,
Massa Molar 182,2 g/mol	HO OH OH	
Sacarose	OH	60°C
$C_{12}H_{22}O_{11}$	0- < -0-1	
Massa Molar 342,3 g/mol	HO OH O OH	
Trealose	он но оч	107°C
$C_{12}H_{22}O_{11}$		
Massa Molar 342,3 g/mol	HO OH HO	

Tabela 31. Massa molar, estruturas, fórmulas moleculares e T_g de alguns açúcares.

7.1. Liofilização das formulações

Para encontrar o melhor modo das formulações preparadas NP, NPQTS e NPQTSFOL sofrerem o menor estresse possível durante a liofilização, foram feitos diversos experimentos onde foi variada a quantidade e o tipo de açúcar crioprotetor. A liofilização das suspensões foi feita adicionando, separadamente, três tipos de crioprotetores (trealose, sacarose e manitol), congelamento sob N₂ líquido, tempo de secagem por 48 h e posterior agitação até ressuspensão das partículas. Os primeiros resultados dos testes com adição de 10, 25 e 50% da massa de cada açúcar em relação à massa inicial do material foram insatisfatórios, pois não foi possível ressuspender as nanoparticulas, mesmo sob agitação em ultrassom e sob agitação magnética por 24 h.

Aumentando a massa dos crioprotetores em 100, 150 e 200% em relação à massa inicial total foram obtidos resultados melhores. No entanto, para que as partículas fossem ressuspensas, foi necessário deixá-las agitando por longo período (24 h). Os resultados estão nas Tabelas 32 e 33.

Amostra	φ (nm)	IPD	ζ (mV)
NP	107,0 ± 0,5	0,150 ± 0,029	-30,3 ± 7,0
NPQTS	136,4 ± 4,1	0,218 ± 0,017	22,0 ± 8,0
NPQTSFOL	136,6 ± 5,7	0,210 ± 0,023	$22,3 \pm 7,4$

Tabela 32. ϕ (nm), IPD e ζ (mV) das NP antes da liofilização.

		24 horas.		
Amostra	Crioprotetor	% em massa	φ (nm)	IPD
NP-T100		100	648,3 ± 9,5	0,573 ± 0,001
NP-T150	Trealose	150	536,6 ± 6,8	$0,558 \pm 0,057$
NP-T200		200	375,5 ± 16,3	$0,504 \pm 0,025$
NP-S100		100	208,0 ± 1,3	$0,223 \pm 0,007$
NP-S150	Sacarose	150	203,3 ± 6,3	0,334 ± 0,011
NP-S200		200	184,5 ± 1,3	$0,226 \pm 0,004$
NP-M100		100	235,7 ± 0,4	0,271 ± 0,016
NP-M150	Manitol	150	174,5 ± 2,1	0,178 ± 0,004
NP-M200		200	169,6 ± 2,8	0,217 ± 0,019
NPQTS-T100		100	311,9 ± 10,1	$0,282 \pm 0,041$
NPQTS-T150	Trealose	150	307,6 ± 3,3	$0,384 \pm 0,034$
NPQTS-T200		200	294,7 ± 4,1	$0,328 \pm 0,008$
NPQTS-S100		100	470,1 ± 0,4	$0,447 \pm 0,027$
NPQTS-S150	Sacarose	150	257,8 ± 1,4	0,192 ± 0,013
NPQTS-S200		200	246,4 ± 2,8	0,194 ± 0,013
NPQTS-M100		100	470,6 ± 0,4	$0,447 \pm 0,003$
NPQTS-M150	Manitol	150	276,9 ± 3,2	$0,238 \pm 0,024$
NPQTS-M200		200	269,1 ± 2,3	0,233 ± 0,018
NPQTSFOL-T100		100	2296 ± 295	1,000 ± 0,001
NPQTSFOL-T150	Trealose	150	2877 ± 809	1,000 ± 0,001
NPQTSFOL-T200		200	1343 ± 378	$0,934 \pm 0,093$
NPQTSFOL-S100		100	1356 ± 47	0,845 ± 0,021
NPQTSFOL-S150	Sacarose	150	1062 ± 164	0,818 ± 0,015
NPQTSFOL-S200		200	329,9 ± 1,7	$0,350 \pm 0,009$
NPQTSFOL-M100	Manitol	100	2182 ± 3	1,000 ± 0,001
NPQTSFOL-M150	IVIALIILUI	150	1074 ± 47,4	0,904 ± 0,057

Tabela 33. ϕ (nm) e IPD das NP após liofilização e ressuspensão sob agitação por

Melhores resultados foram obtidos quando a concentração de crioprotetor foi variada. A ressuspensão das partículas foi feita com água desionizada e agitação por 5 minutos. Os resultados estão nas Tabelas 34 e 35.

Os valores de ϕ e IPD após ressuspensão das NP quando aumentou a concentração do crioprotetor na suspensão antes da liofilização mostram que houve menor agregação das partículas. Os melhores resultados foram conseguidos com sacarose a 250 mmol/L, pois foram mantidas as dimensões das NP após liofilização.

Amostra	φ (nm)	PDI	ζ (mV)
NP	130,6 ± 0,6	0,158 ± 0,009	-25,5 ± 4,8
NPQTS	$153,9 \pm 0,4$	$0,302 \pm 0,054$	$23,8 \pm 6,8$
NPQTSFOL	163,2 ± 3,6	0,341 ± 0,011	$28,9 \pm 3,7$

Tabela 34. ϕ (nm), IPD e ζ (mV) das NP antes da liofilização.

Tabela 35. ϕ (nm) e IPD das NP após liofilização e ressuspensão sob agitação por

5 minutos.

Amostra	Crioprotetor	Concentração	φ (nm)	PDI
NP-T200			437,5 ± 40,2	0,734 ±0,043
NPQTS-T200		200 mmol/L	551,2 ± 97,9	0,861 ± 0,010
NPQTSFOL-T200			645,8 ± 20,7	$0,927 \pm 0,074$
NP-T400	Trealose		204,7 ± 2,2	$0,285 \pm 0,004$
NPQTS-T400		400 mmol/L	466,8 ± 19,3	0,433 ± 0,071
NPQTSFOL-T400			518,7 ± 4,8	0,497 ± 0,015
NP-T700		700 mmol/L	253,6 ± 14,5	0,463 ± 0,019
NP-S125			519,2 ± 1,2	0,782 ± 0,157
NPQTS-S125		125 mmol/L	816,9 ± 10,4	0,983 ± 0,201
NPQTSFOL-S125	Sacaroco		849,9 ± 89,7	$0,927 \pm 0,074$
NP-S250	Sacarose		231,7 ± 16,1	0,278 ± 0,025
NPQTS-S250		250 mmol/L	387,9 ± 12,5	0,302 ± 0,054
NPQTSFOL-S250			349,9 ± 13,9	0,327 ± 0,074

8. Estabilidade térmica

A estabilidade química das suspensões podem ser avaliadas pelo monitoramento do pH pois seu abaixamento pode indicar degradação do polímero ou de outro ingrediente (Guterres et al, 2002). Em relação ao PLGA, sua degradação produz ácidos lático e glicólico, que reduzem o pH, indicando alteração na estabilidade das NP.

A redução do pH é importante desvantagem no uso do PLGA, pois o aumento da acidez pode levar a reações inflamatórias em áreas com baixa velocidade de transporte de fluidos. Para o caso de implantes, por exemplo, a liberação constante de produtos de degradação é necessária para que o corpo tenha tempo suficiente para limpar o material implantado (Thomas & Burg, 2004).

A degradação do PLGA ocorre por hidrólise ácida e é uma reação autocatalisada, isto é, quanto mais monômeros são liberados, maior será a taxa de degradação (Figura 62). Além disso, depende de fatores como o número de cadeias glicolíticas, pois quanto maior este número, maior o aumento de ligações reativas com a água e a terminação da cadeia. Por exemplo, PLGA com terminação ácida é degradado mais rapidamente que com outro com terminação éster (Göpferich, 1996). Em NP, a taxa de degradação polimérica aumenta significantemente com aumento do tamanho da partícula (Klose et al., 2008).



Figura 62. Reação de hidrólise ácida do PLGA.

Para analisar a estabilidade térmica das NP em suspensão e em pó (liofilizadas), foi feita degradação destas mantendo-as a 4, 25 e 37 °C e obtendo, periodicamente, o pH de cada formulação. Os resultados dos experimentos estão sumarizados nas Figuras 63, 64 e 65.



Figura 63. Variação temporal do pH das amostras de NP de PLGA (LIO – amostras liofilizadas; SAC – amostras em solução com sacarose).



Figura 64. Variação temporal do pH das amostras de NPQTSFOL (LIO – amostras liofilizadas; SAC – amostras em solução com sacarose).



Figura 65. Variação temporal do pH das amostras de NPQTS (LIO – amostras liofilizadas; SAC – amostras em solução com sacarose).

Analisando as Figuras 63, 64 e 65, observa-se que as medidas do pH das suspensão indicam que o aumento da temperatura leva à degradação mais rápida que a 4 °C e que as formulações em suspensão na qual foi adicionada sacarose degrada mais rapidamente que aquelas sem sacarose.

Uma explicação possível para esse fato é que o aumento da temperatura aumenta a velocidade de hidrólise ácida da cadeia de PLGA e que a sacarose sofra desidratação, sob aquecimento em meio ácido, formando 5 hidroximetil-2-furaldeído. Este produto se decompõe, formando ácido levulínico, ácido fórmico, diacetil, ácido lático e/ou ácido acético reduzindo ainda mais o pH (Solomons & Fryhle, 2008). As formulações liofilizadas mantiveram pH constante quando mantidas a 4°C, ou variaram pouco quando mantidas a 25 ou 37 °C. Portanto, a melhor maneira de armazenar as formulações é liofilizando-as e mantendo-as a 4°C.

Esses resultados estão condizentes com alguns trabalhos encontrados na literatura. Por exemplo, num estudo realizado por De & Robinson (2004), foi observado que NP mantidas a 4 °C conservam sua estrutura após 6 dias, enquanto que com o aumento da temperatura a 25 °C e a 37 °C, o número de agregados também aumenta, formando estruturas em forma de agulha. No artigo de Zweers et al. (2004), foi determinado o tempo e como NP constituídas de PLA, PLGA e PEO-PLGA (óxido de polietileno-PLGA) sofrem degradação. NP de PLGA e PLA mantém seu tamanho até serem totalmente degradadas; porém, enquanto que NP de PLA se degradaram gradualmente por até dois anos, NP de PLGA degradaram totalmente em 10 semanas e NP de PEO-PLGA degradaram ainda mais rapidamente.

9. Análise das formulações liofilizadas

Para caracterizar e observar a morfologia das NPs foram preparadas novas formulações e as suas respectivas misturas físicas. As amostras foram preparadas pelo método de evaporação do solvente, lavadas e a liofilização de cada formulação foi novamente repetida utilizando 250 mmol/L de sacarose, sendo obtidos ϕ , ζ e IPD antes e após liofilização. Os resultados estão nas Tabelas 36 e 37, onde se observa pequeno aumento do diâmetro, do índice de polidispersão e diminuição (em módulo) de ζ causada, provavelmente, pela adsorção de sacarose à superfície das NP, blindando a carga superficial.

Amostra	φ₀ (nm)	IPD ₀	φ _f (nm)	IPD _f
NP _{branco}	111,8±0,1	0,107±0,001		
NP _{branco} -SAC	136,4±0,9	0,136±0,016	243,6±3,1	0,332±0,071
NP _{branco} QTS- SAC	135,7±3,9	0,208±0,016	306,1± 5,3	0,418±0,043
NP _{branco} QTSFOL- SAC	129,5±1,1	0,205±0,017	347,6±21,9	0,502±0,084
NP	101,6±1,0	0,118±0,028		
NP-SAC	140,8±0,1	0,121±0,011	237,6±4,7	0,302±0,036
NPQTS-SAC	174,2±6,2	0,278±0,047	265,9±2,9	0,313±0,078
NPQTSFOL-SAC	135,3±0,4	0,233±0,004	285,3±0,5	0,326±0,004

Tabela 36. $\phi(nm)$ e IPD das amostras antes (ϕ_0 , IPD₀) e após liofilização (ϕ_f , IPD_f).

Tabela 37. ζ (mV) das amostras antes (ζ_0) e após liofilização (ζ_f).

Amostra	<u>ζ</u> ₀ (mV)	ζ _f (mV)
NP _{branco}	-33,1±6,0	
NP _{branco} -SAC	-10,0±5,4	-8,9±5,3
NP _{branco} QTS-SAC	32,3±5,52	25,9±6,5
NP _{branco} QTSFOL-SAC	31,3±7,41	29,5±3,9
NP	-32,2±6,11	
NP-SAC	-20,5±4,82	-10,3±6,1
NPQTS-SAC	32,8±4,46	24,7±4,3
NPQTSFOL-SAC	33,3±4,95	27,4±4,5

9.1. Microscopia eletrônica de varredura

Não foi possível obter imagens das NP liofilizadas devido à grande quantidade de sacarose presente. Mesmo redissolvendo cada amostra a imagem obtida não ficou nítida. Como ilustração, uma imagem de MEV obtida da amostra NPQTS-SAC está na Figura 66.



Figura 66. Micrografias da amostra liofilizada NPQTS-SAC.

9.2. Análises instrumentais

O objetivo destas análises foi verificar a possível ocorrência de interações do fármaco com o carreador, comparando os espectros com relação à degradação, cristalinidade, localização, surgimento e desaparecimento e alterações nas intensidades das bandas espectrais, pois a interação do fármaco com o carreador acarreta mudanças em sua farmacocinética, em seu perfil de liberação e em sua eficácia.

9.2.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho

Nas amostras contendo sacarose, tanto MF como NP, devido à grande quantidade de sacarose necessária para liofilizar estas amostras sem rompê-las, o espectro da sacarose sobrepõe aos de outros compostos, dificultando a observação de qualquer mudança. Quanto à MF e NP de PLGA e 5-FU, observase que algumas regiões no espectro (2900-3100 cm⁻¹, referentes à v(C-H) e v(O-H) e 1600-1750 cm⁻¹ associadas à v(C=O), δ (C-N)) contém bandas referentes à soma dos espectros dos compostos isolados, apesar de também diferirem nas intensidades (Figuras 67, 68 e 69).



Figura 67. Espectros de absorção no infravermelho de 5-FU, PLGA, sacarose: (a) MF-SAC; (b) MF; (c) NP-SAC; (d) NP.

Quando QTS e QTSFOL estão adsorvidas na superfície das NP, a mesma característica dos espectros foi observada, ou seja, bandas referentes à soma dos espectros dos dois compostos isolados, apesar da diferença nas intensidades.



Figura 68. Espectros de absorção no infravermelho do 5-FU, PLGA, QTS, sacarose para comparação com: (a) MFQTS-SAC; (b) MFQTS; (c) NPQTS-SAC; (d) NPQTS.



Figura 69. Espectros de absorção no infravermelho do 5-FU, PLGA, QTSFOL, sacarose para comparação com: (a) MFQTSFOL-SAC; (b) MFQTSFOL; (c) NPQTSFOL-SAC; (d) NPQTSFOL.

9.2.2. Difratometria de raios-X

Nos difratogramas de raios-X, observa-se que as amostras de PLGA, MF e NP são praticamente amorfas (Figuras 70, 71 e 72). 5-FU apresenta somente um pico em 28°, que não aparece nos difratogramas das NP, indicando que está

distribuído na matriz polimérica amorfa. Sacarose apresenta picos em 8, 17 e 25°, também observado nos difratogramas das NP e MF que contém este crioprotetor, corroborando os resultados espectrais obtidos no IV.



Figura 70. Difratogramas de raios-X de 5-FU, PLGA e SAC para comparação com MF; MFSAC; NP; NP-SAC.



Figura 71. Difratogramas de raios-X de 5-FU, PLGA, SAC e QTS para comparação com MFQTS; MFQTS-SAC; NPQTS; NPQTS-SAC.



Figura 72. Difratogramas de raios-X de 5-FU; PLGA; SAC; ácido fólico; QTS; QTSFOL para comparação com MFQTSFOL; MFQTSFOL-SAC; NPQTSFOL; NPQTSFOL-SAC.

9.2.3. Calorimetria diferencial de varredura

A técnica de DSC fornece informações sobre o estado físico do 5-FU nas formulações de NP e nas MFs (Figuras 73, 74 e 75).

5-FU possui um pico endotérmico em 281 °C, a sacarose possui dois picos (em 194 e 228 °C) e PLGA um pico referente à T_g em ≈49 °C. Todas as amostras contendo sacarose apresentaram curvas com perfis similares ao do açúcar, isto é, dois picos endotérmicos em ≈190 e 220 °C devido à grande quantidade de sacarose necessária para liofilizar as amostras. Na mistura física, foram observados os picos de PLGA e de 5-FU. Já a amostra de NP é praticamente amorfa, sem presença de cristais de 5-FU, o que poderia também ter ocorrido devido a baixa razão de massa de 5-FU na amostra.



Figura 73. Curvas de DSC de 5-FU; PLGA; SAC; e das formulações de NP de contendo 5-FU.

Com relação à presença de QTS nas nanoparticulas, observa-se que QTS apresenta duas transições endotérmicos, um menos intenso em 106°C e outro mais intenso em 145°C. Quanto a MF-QTS, observou-se somente os picos de PLGA e da QTS.



Figura 74. Curvas de DSC de 5-FU; PLGA; SAC; QTS e formulações de NP recobertas QTS.

O ácido fólico apresenta um pico endotérmico em 194 °C. Tanto a curva de DSC da MFQTSFOL-SAC quanto a de NPQTSFOL-SAC tiveram o mesmo perfil da curva da sacarose. MFQTSFOL apresentou um pico do PLGA e uma transição larga de 150 °C a 200 °C.



Figura 75. Curvas de DSC de 5-FU; PLGA; SAC; QTSFOL e formulações de NP recobertas QTSFOL.

9.2.4. Análise termogravimétrica

Nas amostras (NP e MFs) contendo crioprotetor, as curvas TGA tiveram o perfil da curva da sacarose, fato já observado com outras técnicas, mas as amostras NP apresentaram o mesmo perfil de perda de massa que o PLGA. Nas curvas TGA das formulações contendo QTS e QTSFOL, as amostras MFQTS, NPQTS, MFQTSFOL e NPQTSFOL tiveram degradação térmica similares às de QTS e QTSFOL respectivamente; porém, a perda da massa foi menor na parte inicial da curva (entre 25 °C e 300 °C). Em relação ao PLGA e 5-FU, a perda da massa também foi menor que do 5-FU isolado, indicando maior proteção na NP (Figuras 76, 77, 78).



Figura 76. Curvas de TGA das NP de PLGA e 5-FU (a) % massa vs. temperatura (°C) e (b) δ (mg/°C) vs. temperatura (°C).



Figura 77. Curvas de TGA das amostras contendo QTS (a) % massa vs. temperatura (°C) e (b) $\delta(mg/°C)$ vs. temperatura (°C).



Figura 78. Curvas de TGA das amostras contendo QTSFOL (a) % massa vs. temperatura (°C) e (b) δ (mg/°C) vs. temperatura (°C).

10. Ensaios In Vitro

Primeiramente, foram realizados testes de citotoxidade do 5-FU e das NP:5-FU em 12 diferentes linhagens de células de câncer. Os valores de IC_{50} para os primeiros testes *in vitro* estão sumarizados na Tabela 38. Para as linhagens OVACAR, U138MG, U87, NCI, T84 e Neuroblastoma as NP/5-FU foram mais eficientes ou apresentaram a mesma citotoxicidade que o fármaco sozinho.

Linhagem	Tumor	EEU (ug/ml)	NP/5-FU
celular	ular		(µg/mL)
OVACAR*	Ovário	0,5 ± 0,1	
PC3**	Próstata	6 ± 1	25 ± 3
Т84	Cólon	1,1 ± 0,1	$1,2 \pm 0,3$
B16F10**	Melanoma de camundongo	0,8 ± 0.1	3,6 ± 0,7
HOS**	Osteosarcoma	$0,8 \pm 0,4$	27 ± 4
MCF7**	Mama	$0,2 \pm 0,1$	5,6 ± 0,1
U138MG**	Glioma	$4,4 \pm 0,3$	0,08 ± 0,04
U20S	Osteosarcoma	$0,7 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,2$
U87**	Glioma	8 ± 2	0,13 ± 0,08
NCI**	Pulmão	$1,3 \pm 0,2$	1,1 ± 0,2
NCI-H1299	Pulmão	$0,8 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,2$
Neuroblastoma	Cérebro	5,2 ± 0,2	3,6 ± 0,7

Tabela 38. IC₅₀ para NP/5-FU e 5-FU em linhagem de células neoplásicas.

* IC50 não foi calculado para a amostra de NP, pois a menor diluição da amostra tem efeito maior que 50%.

** As curvas de Concentração de 5-FU vs. Porcentagem de Inibição não apresentaram comportamento sigmoidal. *** Desvio padrão calculado com três replicatas.

O segundo teste foi feito para linhagens de células de câncer de ovário, mama, pulmão e cérebro para NP_{Branco} e NP, NPQTS e NPQTSFOL com 5-FU. Os teste para as linhagens das células T84 e B16F10 que deveriam ser feitos para avaliar a eficiência das formulações com QTS e QTSFOL ainda serão realizados. Os resultados do segundo teste estão sumarizados na Tabela 39.

Linhagem	Tumor	5FU	NP	NPQTSFOL	NPQTS	NP BRANCO
celular	Tumor	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
OVACAR	Ovário	1,03±0,03	1,02±0,28	1,02±0,40	0,92±0,26	17,55±3,64
U87	Glioma	7,78±1,24	4,35±0,58	4,33±0,62	4,89±1,18	19,25±2,02
MCF7	Mama	8,89±0,88	8,24±1,49	9,47±0,75	9,12±1,54	34,6±1,8
NCI-H1299	Pulmão	1,23±0,41	0,97±0,20	1,28±0,08	0,94±0,06	5,88±2,66

Tabela 39. IC₅₀ para 5-FU, NP_{Branco} e NP, NPQTS e NPQTSFOL com 5-FU em linhagens de células neoplásicas (número de replicatas = 3).

Observa-se que a formulação NP_{BRANCO} apresentou menor citotoxicidade que as formulações contendo 5-FU, indicando que essa formulação não é tóxica para as células. Exceto para a linhagem de célula U87, as formulações apresentaram o mesmo IC₅₀ que o fármaco livro. Os resultados para a linhagem da células U87 mostram que para as formulações de NP, IC₅₀ quase caiu pela metade, indicando que estas formulações foram mais eficientes.

Diversos trabalhos utilizam acoplamento de QTS à NP de PLGA para direcionar moléculas ao tecido cerebral. Wang et al. (2010) observaram que NP recobertas com QTS apresentaram maior acúmulo em cérebros de camundongos quando injetadas via caudal que NP sem QTS. Chandy et al. (2000) encapsularam 5-FU em NP de PLA/QTS com a mesma finalidade. Quanto aos testes de citotoxidade, Hu et al. (2005) também demostraram maior eficiência destas NP em células de glioma.

Quando ao direcionamento em tumores de pulmão, ovário e mama a estratégia de recobrir NP com QTS também é largamente empregada. Yang et al. (2009) concluíram que a formação de micro-agregados de nanoparticulas de PLGA/QTS contendo Paclitaxel aumenta seu direcionamento para o pulmão. Chakaravarthi & Robinson (2011) observaram que NP de PLGA/QTS aumentam os efeitos de Paclitaxel em células de câncer de mama.
V. CONCLUSÕES

O planejamento experimental possibilitou obter as condições mais apropriadas para aumentar o carregamento do fármaco 5-FU nas nano-esferas de PLGA realizando um menor número de experimentos possível, onde foi observado que a quantidade inicial do fármaco, o volume de surfatante utilizado, a temperatura, o pH, o tempo e a velocidade de centrifugação são fatores que influenciam na preparação das partículas e, portanto, nas suas características.

A formulação final de nano-esferas de PLGA contendo 5-FU foi obtida nas seguintes condições: 30 mL de solução aquosa de TPGS 0,03%; 1,25 mL de solução aquosa supersaturada de 5-FU 21,5 mg/mL entre 0 - 10°C, com lavagem realizada a 20800 xg por 30 minutos a 4 °C. Dessa forma, foi obtido um carregamento em torno de 11% e eficiência de encapsulação de 32%, com rendimento de 41%. O diâmetro médio das partículas obtidas foi de 91 nm, com polidispersão de apenas 0,129 e potencial ζ de -32,9mV.

Após a purificação da quitosana (forma neutra de cloridrato) e a sua caracterização, foi possível estudar dois métodos de preparação de NP catiônicas e sintetizar folato de quitosana, com a finalidade de acoplá-lo à superfície das partículas para aumentar o direcionamento destas quando administradas.

No estudo de preparação de NP catiônicas, observou-se que pelo método de entrelaçamento de cadeias, o fármaco difunde para a solução, diminuindo drasticamente a encapsulação do fármaco. Com segundo método, por adsorção simples, possibilitou acoplar tanto QTS quanto QTSFOL à superfície das NP e obter a concentração mais adequada para obter partículas estáveis com o tempo.

A estabilidade coloidal das três formulações foi estudada com relação ao pH e a força iônica do meio. As três formulações apresentam boa resistência quanto à variação de pH do meio, importante para a diferença de pH no local de ação. No entanto, o acoplamento de QTS e QTSFOL à superfície das NP levou à menor estabilidade coloidal de NPQTS e NPQTSFOL em relação à força iônica e, portanto, estas duas formulações são provavelmente impróprias para aplicação endovenosa. Contudo, devido ao potencial superficial positivo e as propriedades da quitosana, essas formulações podem ser excelentes para aplicação tópica, como para tratamento de câncer de pele e de cólon, via administração retal.

Nas caracterizações, obtivemos que os perfis de liberação destas formulações são típicos de fármaco hidrofílico, apresentam um *burst* inicial e a liberação rápida. Assim, como há necessidade de liofilizar estas formulações devido a rápida liberação do fármaco, este estudo foi realizado com o emprego de diferentes crioprotetores em diversas concentrações, onde a concentração de sacarose 250 mmol/L possibilitou manter as características iniciais das partículas.

Para armazenar essas partículas de maneira apropriada, foi feita a medida da degradação tanto da suspensão das NP e quanto das formulações em pó mantendo-as a 4, 25 e 37 °C, tendo como resposta o pH das suspensões, onde se observou que as formulações liofilizadas são mais estáveis que as partículas em suspensão. Por fim, os ensaios *in vitro* forneceram um indício da eficácia destas nanoparticulas, com o IC₅₀ similar ou menor ao do fármaco livre.

As figuras 79, 80 e 81 mostram um resumo das etapas e dos resultados obtidos neste trabalho:



Figura 79. Fluxograma I – Etapas da preparação da formulação NP.



Figura 80. Fluxograma II – Etapas da preparação das formulações NPQTS e NPQTSFOL.



Figura 81. Fluxograma III – Etapas de caracterização das formulações NP, NPQTS e NPQTSFOL.

VI. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para prosseguir com esta linha de pesquisa, são propostos os seguintes trabalhos:

- ✓ Acompanhar a degradação das formulações através da medida de concentração dos monômeros de ácido lático e ácido glicólico;
- ✓ Testes "in vivo" com camundongos;
- ✓ Testes da toxicidade das formulações em células sadias;
- ✓ Estabilidade das formulações em plasma sanguíneo;
- ✓ Interações das formulações com albumina de soro humano (HSA);
- ✓ Estudar outros modos de reduzir o tempo de liberação de 5-FU das nanoparticulas;
- ✓ Desenvolvimento de formulação comercial para possível uso em humanos.

Abdelwahed W., Degobert G., Satinmesse S., Fessi H. (2006) Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage. *Advanced Drug Delivery Reviews* **15**, 1688-1713.

Abreu F.R., Campana-Filho S.P. (2005) Preparation and characterization of carboxymethylchitosan. *Polímeros* **15**, 79-83.

Ahlin P, Kristl J, Kristl A, Vrecer F. (2002) Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration. *International Journal of Pharmaceutics* **239**, 113-120.

Allen T.M., Cullis P.R. (2004) Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* **303**, 1818-1822.

André Romero da Silva, Tese de Doutorado: "Preparação, caracterização e avaliação de nano-esferas de PLGA (50:50) contendo In(III)-meso-tetrafenilporfirina para aplicação em terapia fotodinâmica", Instituto de Química, Unicamp, 2006.

Baker R.W., Lonsdale H.S. Controlled release: mechanisms and rates. In: "Controlled release of biologically active agents." ed. A.C. Taquary, R.E. Lacey, Plenum Press, New York, 15-71, 1974.

Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. Journal of Molecular Biology, 13, 238-252.

Barros Neto B., Scarmínio I.S., Bruns R.E. "Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e indústria". 3ª ed., Editora da UNICAMP, Campinas, 2007.

Bayomi S.M., Al-Badr A.A. Analytical Profile of Fluorouracil. In: "Analytical Profiles of Drug Substances". Ed. K. Florey, Academic Press, 18, 599-639, 1989.

Birnbaum D.T., Kosmala J.D., Brannon-Peppas L. (2000) Optimization of preparation techniques for poly(lactic acid-co-glycolid acid). *Journal of Nanoparticle Research* **2**, 173-180.

Blanco M.D., Sastre R.L., Teijón C., Olmo R, Teijón J.M. (2005) Spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(lactide-co-glycolide) polymers: characterization and drug release. *Journal of Microencapsulation: Micro and Nano Carriers* **22**, 671-682.

Blanco M.D., Sastre R.L., Teijón C., Olmo R., Teijón J.M. (2005b) Preparation and characterization of 5-Fluorouracil-loaded poly(ɛ-caprolactone) microspheres for drug administration. *Drug Development Research.* **63**, 41-53.

Bonechi C., Donati A., Lampariello R., Martini S., Picchi M.P., Ricci M., Rossi C. (2004) Solution structure of folic acid: molecular mechanics and NMR investigation. *Spectrochimica Acta Part A* **60**, 1411–1419.

Bozkir A., Saka O.M. (2005) Formulation and investigation of 5-FU nanoparticles with factorial design-based studies. *II Farmaco* 60, 840-846.

Byrne J. D., Betancourt T., Brannon-Peppas L. (2008) Active Targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1615-1626.

Caliceti P., Salmaso S., Semenzato A., Carofiglio T., Fornasier R., Ferneglia M., Ferrone M., Prici S.(2003) Synthesis and physicochemical characterization of folate-cyclodextrin bioconjugate for active drug delivery. *Bioconjugate Chemistry.* **14**, 899-908.

Chakaravarthi S.S., Robinson D.H. (2011) Enhanced cellular association of paclitaxel delivered in chitosan-PLGA particles. *International Journal of Pharmaceutics* **409**, 111-120.

Chandy T., Das G.S., Rao G.H. (2000) 5-Fluorouracil-loaded chitosan coated polylactic acid microspheres as biodegradable drug carriers for cerebral tumours. *Journal of Microencapsulation* **17**, 625-638.

Cifti K., Kas H.S., Hincal A.A., Ercan T.M., Güven O., Ruacan S. (1996) *In vitro* and *in vivo* evaluation of PLGA (50/50) microspheres containing 5-fluorouracil prepared by a solvent evaporation method. *International Journal of Pharmaceutics* **131**, 73-82.

Costa P., Lobo J.M.S. (2001) Modeling and comparison of dissolution profiles – Review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **13**, 123-133.

Costa P.J.C. (2002) Avaliação *in vitro* da bioequivalência de formulações farmacêuticas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **38**, 141-153.

D'Souza S.S., DeLuca P.P. (2006) Methods to assess *in vitro* drug release from injectable polymeric particulate systems. *Pharmaceutical Research* **23**, 3, 460-474.

Dalwadi G., Benson H.A.E., Chen Y. (2005) Comparison of diafiltration and tangential flow filtration for purification of nanoparticle suspensions. *Pharmaceutical Research* 22, 2152-2162.

Date P.V., Samad A., Devarajan P.V. (2010) Freeze thaw: a simple approach for prediction of optimal cryoprotectant for freeze drying. *AAPS PharmSciTech* 11, 304-313.

De S., Robinson D.H. (2004) Particle size and temperature effect on the physical stability of PLGA nanospheres and microspheres containing bodipy. *AAPS PharmSciTech* **5**, article 53.

Dintaman J.M., Silverman J.A. (1999) Inhibition of P-glycoprotein by D-αtocopheryl polyethylene glycol 1000 (TPGS). *Pharmaceutical Research* **16**, 1550-1556.

Dorati R., Genta I., Montanari L., Cilurzo F., Buttafava A., Faucitano A., Conti B. (2005) The effect of γ -irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin. *Journal of Controlled Release* **107**, 78-90.

Douglass Jr., H.O., Mittelman, A. (1974) Metabolic studies of 5-fluorouracil—II. Influences of the route of administration on the dynamics of distribution in man. *Cancer* **34**, 1878–1881.

Dubé D., Francis M., Leroux J.C., Winnik F.M. (2002) Preparation and tumor cell uptake of poly(N-isopropylacrylamide) folate conjugates. *Bioconjugate Chemistry* **13**, 685-692.

Elorza B., Elorza M.A., Frutos G., Chantres J.R. (1993) Characterization of 5-Fluorouracil loaded liposomes prepared by reverse phase evaporation or freezingthawing extrusion methods: study of drug release. *Biochimica et Biophysica Acta* **1153**, 135-142.

Esmaeili F., Atyabi F., Dinarvand R. (2007) Preparation of PLGA nanoparticles using TPGS in the spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Journal of Experimental Nanoscience* **3**, 183-192.

Esteves M.I., Quintilio W., Sato R.A., Raw I., Araujo P.S., Costa M.H.B. (2000) Stabilisation of immunoconjugates by trehalose. *Biotechnology Letters* **22**, 417-420.

Faisant N, Siepmann J, Benoit J.P. (2002) PLGA based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *European Journal of Pharmaceutical Science* **15**, 355–366.

Feng S.S., Chien S. (2003) Chemotherapeutic engineering: application and futher development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. Review. *Chemical Engineering Science* **58**, 4087-4114.

Florence A.T., Attwood, D. "*Princípios físico-químicos em farmácia.*" Edusp, São Paulo, 2003.

Fresta M., Villari A., Puglisi G., Cavallaro G. (1993) 5-Fluorouracil: various kinds of loaded liposomes: encapsulation efficiency, storage stability and fusogenic properties. *International Journal of Pharmaceutics* **99**, 145-156.

Glavas-Dodov M., Fredro-Kumbaradizi E., Goracinova K., Simonoska M., Calis S., Trajkovic-Jolevska S., Hincal A.A. (2005) The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. *International Journal of Pharmaceutics* **291**, 79-86.

Goodhew P.J., Humphreys, F.J. "Electron Microscopy Analysis." 2^a ed., Taylor & Francis, London, 1988.

Göpferich A. (1996) Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* **17**, 103-114.

Govender T., Garnett M.C., Illum L., Davis S.S. (1999) PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of water soluble drug. *Journal of Controlled Release* **57**, 171–185.

Gregoriadis G. (1973) Drug entrapment in liposomes. FEBS Letters 36, 292-296

Greim H., Klein D., Summer K.H. (1993) Toxicological evaluation of the incorporation of polymers and copolymers base on L- and D-lactide and glycolide. *Boehringer Ingelheim KG*, 1-24.

Griffin V.J.; Laye P.G. Differential Thermal Analysis and Differential Scanning Calorimetry. In: "Thermal Analysis – Techniques and Application". ed. E.L. Charley, S.B. Warrington, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1982.

Guo C., Gemeinhart R.A. (2008) Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly(lactide-co-glycolide) particles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **70**, 597-604.

Guterres S.S., Alves M.P., Pohlman A.R. (2002) Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. *Drug Target Insights* **2**, 147-157.

Hahn R.G, Moertel C.G, Schutt A.J., Bruckner H.D. (1975) A double-blind comparison of intensive course 5-fluoruracil by oral vs. intravenous route in the treatment of colorectal carcinoma. *Cancer* **35**, 1031-1035.

Heux L., Brugnerotto J., Desbrières J., Versali M.-F., Rinaudo M. (2000) Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromolecules* **1**, 746-751.

Hickey A.J., Mansour H.M., Telko M.J., Xu Z., Smyth H.D.C., Mulder T., Mclean R., Landridge J., Papahadjopoulos D. (2007) Physical characterization of component

particles included in dry powder inhalers. I. Strategy review and static characteristics. *Journal of PharmaceuticalScience* **96**, 1282-1319.

Higuchi T. (1961) Rate release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of PharmaceuticalScience* **50**, 874-875.

Higuchi T. (1963) Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Science* **52**, 1145-1149.

Hilgenbrink A.R., Low P.S. (2005) Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics. *Journal of PharmaceuticalScience* **94**, 2135-2146.

Hitzman C.J., Elmquist W.F., Wattenberg L.W., Wiedmann T.S. (2006) Development of a respirable, sustained release microcarrier for 5-Fluorouracil I: *in vitro* assessment of liposomes, microspheres, and lipid coated nanoparticles. *Journal of PharmaceuticalScience* **95**, 1114-1126.

Hoffman A.S. (2002) Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **43**, 3-12.

Holland J.F., Frei E., Bast R.C., Kufe Jr. D.W., Morton D.L., Weichselbaum R.R. (eds.) "Cancer Medicine". Lea & Febiger, Philadelphia, 924–948, 1997.

http://www.inca.gov.br – acesso Março/2010

Hu Y., Chang J., Guo Y., Yuan X., Kang C., Pu P. (2005) Preparation and evaluation of 5-FU/PLGA/gene nanoparticles. *Key Engineering Materials* **288-289**, 147-150.

Huber C.H., Maruiama C.H., Almeida W.P. (2010) Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. *Química Nova* **33**, 2148-2154.

Hyung W., Ko H, Park J., Lim E., Park S.B., Park Y.J., Yoon H.G., Suh J.S., Haam S., Huh Y.M. (2008) Novel hyaluronic acid (HA) coated drug carriers (HCDCs) for human breast cancer treatment. *Biotechnology and Bioengineering* **99**, 442-454.

Immordino M.L., Dosio F., Cattel L. (2006) Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine* **1**, 297–315.

Jorgensen L., Moeller E.H., van de Weert M., Nielsen H.M., Frokjaer S. (2006) Preparing and evaluating delivery systems for proteins. *European of Journal of Pharmaceutical Science* **29**, 174-182.

Kalra A.V., Campbell R. (2006) Development of 5-FU and doxorubicin-loaded cationic liposomes against human pancreatic cancer: implication for tumor vascular targeting. *Pharmaceutical Research* **23**, 2809-2817.

Kamen B.A., Capdevila A. (1986) Receptor-mediated folate accumulation is regulated by the cellular folate content. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 5983-5987.

Kaparissides C., Alexandridou S., Kotti K., Chaitidou S. (2006) Recent Advances in Novel Drug Delivery Systems. *Journal of Nanotechnology Online* **2**, 1-11.

Kim S.H., Jeong J.H., Chun K.W., Park T.G. (2005) Target-specific cellular uptake of PLGA nanoparticles coated with poly(L-lysine)-poly(ethylene glycol)-folate conjugate. *Langmuir* **21**, 8852-8857.

Klose D, Siepmann F, Elkhamz K, Siepmann J. (2008)\ PLGA based drug delivery systems: Importance of the type of drug and device geometry. *International Journal of Pharmaceutics* **354**, 95–103.

Korsmeyer R.W., Gurny R., Doelker E., Buri P., Peppas N.A. (1983) Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics* **15**, 25-35.

Korsmeyer R.W., Peppas N.A. (1981) Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems. In: "Controlled release delivery systems." Ed. T.J Roseman, S.Z. Mansdorf, New York, Marcel Dekker Inc., 77-90.

Kumar M.N.V.R., Bakowsky U., Lehr C.M. (2004) Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials* **25**, 1771-1777.

Lee R.J., Low P.S. (2000) Folate as targeting device for proteins utilizing folate receptor-mediated endocytosis. In: "Drug Targeting: Strategies, Principles, and Applications (Methods in Molecular Medicine - Methods in Molecular Biology)." Ed. E. Francis, C. Delgado, Humana Press, 68-70.

Lemarchand C., Gref R., Couvreur P. (2004) Review article: polysacharidedecorated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **58**, 327-341.

Li S., Wang A., Jiang W., Guan Z. (2008) Pharmacokinetic characteristics and anticancer effects of 5-Fluorouracil loaded nanoparticles. *BMC Cancer* **8**, 103-111.

Mäder K., Mehnert W. Chapter 1: Solid Lipid Nanoparticles - Concepts, procedures, and physicochemical aspects. In: "Lipospheres in drug targets and delivery: approaches, methods, and applications". Ed. C. Nastruzzi, CRC Press, Denver, 2005.

Mansouri S., Cuie Y., Winnik F.M., Shi Q., Lavigne P., Benderdour M., Beaumont E., Fernandes J.C. (2006) Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy. *Biomaterials* **27**, 2060-2065.

Mayer R.J. (2001) Oral versus intravenous fluoropyrimidines for advanced colorectal cancer: by either route, it's all the same. Editorial. *Journal of Clinical Oncology* **19**, 4093-4096.

Mazumbere A. (1981) Effect of liposome entraped 5-fluorouracil on Ehrlich ascites tumour bearing mice. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **18**, 120-123.

McCarron P.A., Woofson A.D., Keating S.A.N.M. (2000) Sustained release of 5-Fluorouracil from polymeric nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **52**, 1451-1459.

Moghimi S.M., Vega E., Garcia M.L., Al-Hanbali O.A.R., Rutt K.J. Polymeric nanoparticles as drug carriers and controlled release implant devices In: "Nanoparticulates as drug carriers". Ed. V.P. Torchilin, Imperial College Press, Massachusetts, 29-42, 2006.

Mohanraj V.J., Chen Y. (2006) Nanoparticles – A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **5**, 561-573.

Montgomery J.A., Ananthan S. In: "Cancer Chemotherapeutic Agents". ed. W.O. Foye, ACS Professional Reference Book, Washington, 47-55, 1995.

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55-63.

Motta A.C., Duek E.A.R. (2006) Síntese, caracterização e degradação *in vitro* do poli(L-ácido láctico-*co*-ácido glicólico). *Revista Matéria* **11**, 340–350.

Mu L., Feng S.S. (2002) Vitamin E TPGS used as emulsifier in solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol ®). *Journal of Controlled Release* **80**, 129-144.

Mu L., Seow P., Ang S., Feng S. (2004) Study on surfactant coating of polymeric nanoparticles for controlled delivery of anticancer drug. *Colloid & Polymer Science* **283**, 58-65.

Mulye N.V., Turco S.J. (1995) A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dehydrate matrices. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **21**, 943-953.

Murakami H., Kobayashi M., Takeuchi H., Kawashima Y. (1999) Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *International Journal of Pharmaceutics* **187**, 143-152.

Muzzalupo R., Nicoletta F.P., Trombino S., Cassano R., Iemma F., Picci N. (2007) A new crown ether as vesicular carrier for 5-Fluoruracil: synthesis, characterization and drug delivery evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **58**, 197-202.

Nafee N., Schenider M., Schaefer U.F., Lehr C.-M. (2009) Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile. *International Journal of Pharmaceutics* 381, 130-139.

Nahar M., Dutta T., Murugesan S., Asthana A. (2006) Functional polymeric nanoparticles: an efficient and promising tool for active delivery of bioactives. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **23**, 259-318.

Narayanan S., Binulal N.S., Mony U., Manzoor K., Nair S., Menon D. (2010) Folate targeted polymeric 'green' nanotherapy for cancer. *Nanotechnology* 21, 1-13.

Owens III D.E., Peppas N.E (2006) Opsonization, biodistribuition, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. Review. *International Journal of Pharmaceutics* **307**, 93-102.

Ozer A.Y. (1992) Stability studies on 5-Fluorouracil Liposomes. *Drug Targeting Delivery* **1**, 151-160.

Paek S.-H., Xuan J.-J., Choi H.-G., Park B.C., Lee Y.-S., Jeong T.-C., Jin C.H., Oh Y.-K., Kim J.-A. (2006) Poloxamer 188 and propylene glycol-based rectal suppository enhances anticancer effect of 5-fluorouracil in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **29**, 1060-1063.

Parikh R.H., Parikh J.R., Dubey R.R., Soni H.N., Kapadia K.N. (2003) Poly(D,Llactide-co-glycolide) microspheres containing 5-fluorouracil: optimization of process parameters. *AAPS PharmSciTech.* **4**, Article 13.

Park T.G. (1995) Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. *Biomaterials* **16**, 1123-1130.

Pathak P., Katyiar V.K. (2007) Multi-functional nanoparticles and their role in cancer drug delivery – A Review. *Journal of Nanotechnology Online* **3**, 1-17.

Peppas N.A. (1985) Analysis of Fickian and non Fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica* Acta *Helvetiae* **60**, 110-111.

Peters G.J., Backus H.H.J., Freemantle S., van Triest B., Codacci Pisanelli G., van der Wilt C.L., Smid K., Lunec J., Calvert A.H., Marsh S., McLeod H.L., Bloemena E., Meijer S., Jansen G., van Groeningen C.J., Pinedo H.M. (2002) Induction of

thymidalate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. Review. *Biochimica et Biophisica Acta* **1587**, 194-205.

Peters G.J., Lankelma J., Kok R.M., Noordhuis P., van. Groeningen C.J., van der Wilt C.L., Meyer S., Pinedo H.M. (1993) Prolonged retention of high concentrations of 5-fluorouracil in human and murine tumours as compared with plasma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **31**, 269-276.

Quintilio W., Sato R.A., Sant'Anna O.A., Esteves M.I., Sesso A., Araujo P.S., Costa M.H.B. (2000) Note: Large unilamellar vesicles as trehalose-stabilised vehicles for vaccines: storage time and in vivo studies. *Journal of Controlled Release* **67**, 409-413.

Reis C.P., Neufeld R.J., Ribeiro A.J., Veiga F. (2006) Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2**, 8-21.

Rey L. Glimpses into the realm of freeze-drying: classical issues and new ventures. In: "Freeze drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products". ed. L. Rey, J.C. May, Informa Healthcare, Londres, 1-28, 2010.

Rezende C.A., Duek E.A.R. (2003) Blendas de poli (ácido lático-*co*-ácido glicólico)/poli (ácido lático): degradação *in vitro. Polímeros: Ciência e Tecnologia.* **13**, 36-44.

Rieux A., Fievez V., Garinot M., Schneider Y.J., Préat V. (2006) Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *Journal of Controlled Release* **116**, 1-27.

Riley T., Govender T., Stolnik S., Xiong C.D., Garnett M.C., Illum L, Davis S.S. (1999) Colloidal stability and drug incorporation aspects of micellar-like PLA–PEG nanoparticles. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* **16**, 147-159.

Rokhade A.P., Shelke N.B., Patil S.A., Aminabhavi T.M. (2007) Novel hydrogel microspheres of chitosan and pluronic F-127 for controlled release of 5-fluorouracil. *Journal of Microencapsulation* **24**, 274-288.

Rudy B.C., Senkowski B.Z. Fluorouracil. In: "Analytical profiles of drug substances". **2**, 221-244, ed. K. Florey, Academic Press, New York, 1973.

Satish C.S., Satish K.P., Shivakumar H.G. (2006) Hydrogels as controlled delivery systems: synthesis, crosslinking, water and drug transport mechanism." *Indian Journal of Pharmaceutical Science*. **68**, 133-140.

Schaffazick S.R., Guterres S.S., Freitas L.L., Pohlmann A.R. (2003) Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova* **26**, 726-737. Sharma S., Sharma N., Kumar S., Gupta G.D. (2009) Liposomes: A review. *Journal of Pharmacy Research* **2**, 1163-1167.

Siepmann J., Göpferich A. (2001) Mathematical modeling of bioerodile, polymeric drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **48**, 229-247.

Siepmann J., Siepmann F. (2008) Review: Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **364**, 328-343.

Signini R., Campana Filho S.P. (2001) Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **11**, 2, 58-64.

Simperler A., Kornherr A., Chopra R., Bonnet P.A., Jones W., Motherwell W.D.S., Zifferer G. (2006) Glass transition temperature of glucose, sucrose, and trehalose: an experimental and in silico study. *Journal of Physical Chemistry B* **110**, 19678-19684.

Singh P., Tyagi G., Mehrotra R., Bakhshi A. K. (2009) Thermal stability studies of 5-fluorouracil using diffuse reflectance infrared spectroscopy. *Drug Testing and Analysis* **1**, 240–244.

Sinha V.R., Singla A.K., Wadhawan R., Kaushik R., Kumria R., Bansal K., Dhawan S. (2004) Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **274**, 1-33.

Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A. "Princípios de Análise Instrumental". 5ª ed., Bookman, Porto Alegre, 2002.

Solomons T.W.G., Fryhle C.B. "Química Orgânica". 9^a ed., vol. 2, Editora LTC, Rio de Janeiro, 2008.

Song C.X., Labhasetwar V., Murphy H., Qu X., Humphrey W.R., Shebuski R.J., Levy R.J. (1997) Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *Journal of Controlled Release* **43**, 197-212.

Storm G., Belliot S.O., Daemen T., Lasic D.D. (1995) Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Advanced Drug Delivery Reviews* **17**, 31-48.

Sun P., Xiang J.-B., Chen Z.-Y. (2009) Meta-analysis of adjuvant chemotherapy after radical surgery for advanced gastric cancer. *British Journal of Surgery* **96**, 26-33.

Szejtli J. "Cyclodextrin Technology". Ed. J.E.D. Davis, Kluwer Academic, Dordrecht, 186-293, 1988.

Tan S.C., Khor E., Tan T.M., Wong S.M. (1998) The degrees of desacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta* **45**, 713-719.

Thomas C.B., Burg K.J.L. Absorbable biodegradable polymers. In: "Advances in polymeric biomaterials". Ed. S.W. Shalaby, K.J.L. Burg, CRC Press, Florida, 159-174, 2004.

Thomas M. (1978) Effect of route of administration of 5-fluorouracil on its concentration in blood and lymph. *British Journal of Cancer* 37, 105-108.

Torchilin V.P. (2007) Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAPS Journal* **9**, 129-147.

Vora A., Riga A., Dollimore D., Alexander K. (2004) Thermal stability of folic acid in the solid-state. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **75**, 709-717.

Wan A., Sun Y., Li H. (2008) Characterization of folate-graft-chitosan as a scaffold for nitric oxide release. *International Journal of Macromolecules* **43**, 415-421.

Wang S., Low P.S. (1998) Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells. *Journal of Controlled Release* **53**, 39-48.

Wang Z.H., Wang Z.Y., Sun C.S., Wang C.Y., Jiang T.Y., Wang S.L. (2010) Trimethylated chitosan-conjugated PLGA nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. *Biomaterials* **31**, 1878-5905.

Wilkinson J.M. (2003) Nanotechnology applications in medicine. *Medical Device Technology*. **14**, 29-31.

Yang Y., Yang S., Shim W., Cui F., Cheng G., Kim I., Kim D., Chung S., Shim C. (2009) Lung-specific delivery of paclitaxel by chitosan modified PLGA nanoparticles via transient formation of microaggregates. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98, 970-984.

Yokoyama M. Polymeric micelles for targeting of hydrophobic drugs. In: "Polymeric Drug Delivery Systems". ed. G.S. Kwon, Taylor & Francis, Florida, 533-575, 2005.

Yu L., Mishra D.S., Rigsbee D.R. (1998) Determination of the glass properties of D-mannitol using sorbitol as an impurity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **87**, 774-777.

Yurdasiper A., Sevgi F. (2010) An overview of modified release chitosan, alginate, and eudragit RS microparticles. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **2**, 704-721.

Zambaux M.F., Bonneaux F., Gref R., Maincent P., Dellacherie E., Alonso M.J., Labrude P., Vigneron C. (1998) Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *Journal of Controlled Release* **50**, 31-40.

Zhang H., Bei J., Wang S. (2007) Preparation and drug release behaviors of 5fluorouracil loaded poly(glycolide-co-lactide-co-caprolactone) nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science* **106**, 3757-3767.

Zhang J., Rana S., Srivastava R.S., Misra R.D.K. (2008) On the chemical synthesis and drug delivery response of folate receptor-activated, polyethylene glycol-functionalized magnetite nanoparticles. *Acta Biomaterials* **4**, 40–48.

Zhang Y., Xue C., Xue Y., Gao R., Zhang X. (2005) Determination of the degree of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research* **340**, 1914-1917.

Zhang Z., Feng S-S. (2006) Nanoparticles of poly(lactide)/vitamin E TPGS copolymer for cancer chemotherapy: Synthesis, formulation, characterization and in vitro drug release. Biomaterials 27, 262-267.

Zhang Z., Lee S.H., Feng S. (2007b) Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)vitamin E-TPGS nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomaterials* **28**, 1889-1899.

Zweers M.L.T., Engbers G.H.M., Grijpma D.W., Feijen J. (2004) *In vitro* degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide). *Journal of Controlled Release* **100**, 347-356.

A. Formulações iniciais

A.1. Estudo de lavagem das nanoparticulas



Figura A1. Micrografias das NP – 20800 xg por 30 min.



Figura A2. Micrografias das NP - 20800 xg por 60 min.



Figura A3. Micrografias das NP – 83000 xg por 30 min.



Figura A4. Micrografias das NP - 83000 xg por 60 min.



Figura A5. Micrografias das NP - 186800 xg por 30 min.



Figura A6. Micrografias das NP – 186800 xg por 60 min.

A.2. Liofilização





Figura A7. a) 0% crioprotetor; b) 10% sacarose; c) 25% sacarose; d) 50% sacarose; e) 10% trealose; f) 25% trealose; g) 50% trealose.

B. Curvas de porcentagem de inibição vs. concentração de 5-FU (μ g/mL) obtidas para cada linhagem de célula no primeiro teste realizado com 5-FU e NP.











Figura A8. Curvas de porcentagem de inibição vs. concentração de 5-FU (μg/mL) obtidas para cada linhagem de células no primeiro teste realizado com 5-FU e NP.

C. Curvas obtidas para cada linhagem de células no segundo teste realizado com 5-FU e as formulações de NP, NPQTSFOL, NPQTS e NP_{BRANCO}.



175



Figura A9. Gráfico de IC₅₀ para as diferentes linhagens de células obtidas no segundo teste realizado com 5-FU e as formulações de NP, NPQTSFOL, NPQTS e NP_{BRANCO}.