



**Universidade Estadual de Campinas –
UNICAMP**
Instituto de Química – IQ
Departamento de Físico-Química

TESE DE DOUTORADO

**Sistemas poliméricos de liberação controlada
utilizando micro e nanopartículas encapsulando
violaceína: caracterização, atividade biológica,
conseqüências e perspectivas**

Aluno: Marcelo Mantovani Martiniano de Azevedo

Orientador: Prof. Dr. Nelson E. Durán Caballero

Campinas
Junho de 2005

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

Az25s

Azevedo, Marcelo Mantovani Martiniano de.
Sistemas poliméricos de liberação controlada
utilizando micro e nanopartículas encapsulando
violaceína: caracterização, atividade biológica,
conseqüências e perspectivas / Marcelo Mantovani
Martiniano de Azevedo. -- Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.

Tese – Universidade Estadual de Campinas, Instituto
de Química.

1. Nanoesferas. 2. Violaceína. 3. Câncer. 4. Apoptose.
I. Durán Caballero, Nelson Eduardo. II. Instituto de
Química. III. Título.

Título em inglês: Polymeric drug delivery systems using micro and nanospheres containing violacein: characterization, biological activity, consequences and perspectives.

Palavras-chave em inglês: Nanospheres, Violacein, Cancer, Apoptosis.

Área de concentração: Físico Química

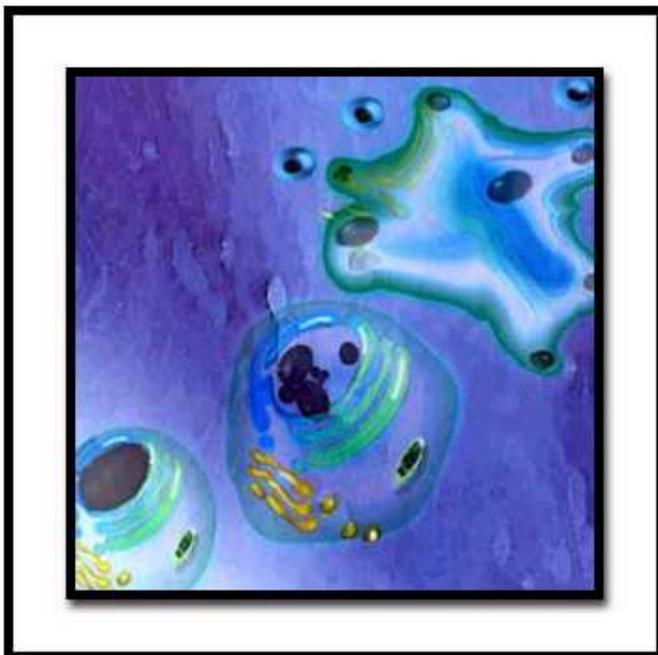
Titulação: Doutor em Ciências.

Banca examinadora: Nelson Eduardo Durán Caballero, Miguel Jafelicci Junior, Emília Celma de Oliveira Lima, Pedro Luiz Onófrío Volpe, Francisco Benedito Teixeira Pessine.

Data de defesa: 29/06/2005.



The Garden of Saint Paul's Hospital (**"The Fall of the Leaves"**), 1889.
Van Gogh Museum, Amsterdam (Vincent van Gogh Foundation)



Digital Art Museum (**"Apoptosis"**),
Judith Billingsley

O pintor de olho vertical
Olha fixamente para o muro
Descobre pouco a pouco
Uma perna um braço um tronco
O rosto de uma mulher
Uma floresta um peixe uma cidade
Uma constelação um navio...
Muro, *nuvem* do pintor.
(Murilo Mendes)

"É fácil ganhar dinheiro, se é dinheiro que você deseja. No entanto, com poucas exceções, o que as pessoas querem não é o dinheiro. Querem o fausto, querem amor e admiração."

(John Steinbeck famoso escritor americano, autor de " The Grapes of Wrath " e "Of Mice and Men" e outros romances, que chegaram a sucessos de cinema)

À minha família dedico esta Tese,
em especial à minha mãe.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente e acima de tudo, gostaria de agradecer ao meu orientador e amigo, o Prof. Dr. Nelson Durán, ao lado de quem aprendi e registrei episódios fundamentais para minha carreira científica e humanitária. Deixo aqui o meu muito obrigado.
- Ao Prof. Dr. Fernando Galembeck, que me ensinou e formou meu pensamento em físico-química de colóides de alto nível, por todas as conversas, por todos os cursos, por sempre me receber em seu laboratório, agradeço bastante.
- À Profa. Teresa Atvars e ao Prof. Marcelo Luiz de Andrade por toda a investigação competente da fotofísica dos sistemas carregadores de violaceína.
- Às professoras Inés Joeques e Concetta Kascheres por terem a paciência necessária em me iniciar em ciências, na hora certa.
- Ao Prof. Oswaldo Luiz Alves e à Profa. Iara Gimenez por toda a contribuição científica de fronteira e novas idéias para o futuro.
- Aos amigos do Laboratório de Química Biológica: Juliano, Sandrinha, Priscyla, Ana Paula, Lívia, Chico, Juliano, Rose, Aristar, Renato, Ana Olívia, Maruska, Marcia, Edna, Priscila, Mariângela, Raquel, Natália, Amanda, Camila, Dorival, Zaine e Patrícia que me apresentaram aspectos da vida que, hoje sei, são os mais belos e importantes.

- À amiga Profa. Patrícia da Silva Melo, com muito carinho, e ao pessoal de seu Laboratório de Cultura de Células e Biofármacos, pessoas fundamentais no desenvolvimento dos ensaios biológicos de meu trabalho.
- À Profa. Giselle Zenker Justo, por todas as discussões científicas e por ter me despertado para os ensaios biológicos.
- Ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini e todos de seu grupo do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular, por terem me acolhido com amizade e carinho e pela excelência científica em uma área fascinante para mim.
- À Silvana Oriente, por ter contribuído para todos os aspectos positivos que alcancei hoje, e por me ter feito uma pessoa melhor.
- À Silvana Rocco, por toda sua força, amizade, carinho e exemplo de trabalho, que me fizeram enxergar as coisas verdadeiramente importantes.
- À Dra. Giovanna Machado pela grande amizade e pelo auxílio em microscopia de transmissão.
- Aos laboratórios do Instituto de Biologia (Biomembranas e Microscopia eletrônica) por todo o suporte técnico prestado.
- Ao Instituto de Química da UNICAMP e a todo corpo técnico especializado;
- Aos órgãos financiadores FAPESP e Rede NANOBIOTEC, CNPq, MCT;

CURRICULUM VITAE

Marcelo Mantovani Martiniano de Azevedo

| | |
|----------------------------|---|
| Ensino Médio | Colégio Salesiano Liceu Nossa Senhora Auxiliadora Campinas – SP. |
| Curso Superior | Bacharelado em Química IQ-UNICAMP(03/92 a 12/97) |
| Mestrado em Físico-Química | Orientador: Fernando Galembeck IQ-UNICAMP (03/98 a 03/00) |
| Doutorado em Ciências | Orientador: Nelson Durán IQ-UNICAMP (09/00 a 06/05) |

Atividades acadêmicas

Prêmio CRQ-IV 2003 - maio/junho de 2003, conferido pelo Conselho Regional de Química – IV região ao trabalho “Obtenção e Caracterização de Microesferas de Poli(epsilon-caprolactona) para Encapsular Violaceína, pigmento produzido pela *Chromobacterium violaceum*” como orientador do aluno da ETEP-Escola Técnica de Paulínia, Paulínia-SP, Denis Gustavo Frantinato.

Atividades didáticas. “Processo Industriais” para o curso de graduação em química da UNICAMP, jun-dez 2002 e de jun-dez 2003 (monitoria). “ Nanobiotecnologia: Introdução, Aplicação e Perspectiva”- junho-2004 (monitoria).

Publicações em Revistas (período de 2000-2004)

1. M.B.M. De Azevedo, M.A.T. Zullo, J.B. Alderete, M.M.M. de Azevedo, T.J.G. Salva and N. Durán, “Characterization and propoerties of the inclusion complex of 24-epibrassinolide with beta-cyclodextrin”, *Plant Growth Regulation*, (2002), 37, 233,.
2. M. M. M. de Azevedo, I. M. S.,Bueno., C. U. Davanzo and F. Galembeck, “Coexistence of liquid phases in the sodium polyphosphate-chromium nitrate-water system”, *J. Colloid InterfaceSci.* 248,(2002), 185.
3. A.O. de Souza, R.R. Santos-, D.N. Sato, M.M.M. de Azevedo, D.A. Ferreira, P.S. Melo, M. Haun, P.S. Silva CL, N. Duran, ”Free 2-propen-1-amine derivative and inclusion complexes with beta-cyclodextrin: Scanning electron microscopy, dissolution, cytotoxicity and antimycobacterial activity” *J. Brazilian Chem. Soc.* 15, (2004), 682.

Publicações em Revistas (período anterior)

1. V.A. R Monteiro, E. F. de Souza, M. M. M. de Azevedo and F. Galembeck, Aluminum polyphosphate nanoparticles: preparation, particle size determination, and microchemistry, *J. Colloid Interface Sci.* 217, (1999), 237.

On-Line (Internet)

1. N. Durán and M.M.M. de Azevedo, “Nanociência e Nanotecnologia-Rede de Pesquisa em Nanobiotecnologia”, www.comciencia.br, 1-7 (2002).

2. M.M.M. de Azevedo “Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos”, http://lqes.iqm.unicamp.br/institucional/vivencia_lqes/ IBICT (ISSN 1677-5058)

Patentes

1. N. Durán, A.F. de Oliveira and M.M.M. De Azevedo, “Processo de obtenção de micro e nanoesferas de poli(epsilon-caprolactona) na incorporação de isoniazida, composto com atividade antimicobacteriana”, Patente brasileira, PIBr 0204125-1 (2002).

2. N. Durán and M.M.M. De Azevedo, “Nanopartícula polimérica incorporando um composto com propriedades farmacêuticas ou cosméticas, seu processo de obtenção e composição cosmética ou farmacêutica contendo as nanopartículas poliméricas, Patente Brasileira. PIBr. 0404306-5 (2004).

3. Gimenez, I. F., Anazetti, M. C., Melo, P. S., Haun, M., De Azevedo, M. M.M., Durán, N. e Alves, O. L. “Processo de produção e de formulação de nanopartículas de beta-ciclodextrina-auxílio-derivada/ violaceína para seu uso como antitumoral, antibacteriano e antiparasitário”, patente brasileira submetida (2005)

Resumos em anais e “Proceedings” completos

1. M.M.M. de Azevedo and N. Durán, “Micro and Nanospheres of E-polycaprolactone in the violacein encapsulation”, Proc. 11th. Latin Amer. Congr. Artificial Org. Biomaterials, Belo Horizonte, Brazil, December, p.1-3(2001).

2. A.O. De Souza, M.M.M. De Azevedo, C.L. Silva and N. Durán, “Morphological analysis of the inclusion complex between 3-(4'-bromo-[1.1'-biphenyl]-4-yl)-3-(4-bromophenyl)-N,N-dimethyl-2-propen-1-amine and beta-cyclodextrin”, Proc. VI Pharmatech, Recife, August, Brazil, 37-38 (2001).
3. M.M.M. De Azevedo, S.G. Moraes, P.S. Melo, G.Z. Justo, M. Haun and N. Durán, “3-[1,2-Dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ylidene]-1,3-dihydro-2H-indol-2-one encapsulated in a polycaprolactone microspheres: Cytotoxicity and antitumoral activities”, Proc. VI Pharmatech, Recife, August, Brazil, 37-38 (2001).
4. M.M.M. De Azevedo, A.F. de Oliveira and N. Durán, “Micro e nanospheres of poly (ϵ -caprolactone) in the anticancer, antituberculosis and antiulcer drugs encapsulation”, Proc. First Brazilian Winter School on Nanobiotechnology, S.P., Brazil, 173-174 (2002).
5. M.C. Anazetti, P.S. Melo, M.M.M. de Azevedo, N. Durán and M. Haun, “Cytotoxicity of epsilon-polycaprolactone nanospheres incorporating dehydrocrotonin on leukemic cells”, Proc. First Brazilian Winter School on Nanobiotechnology, S.P., Brazil 175-178 (2002)
6. G. Golçalves, A.P. Fernandes, E.A. Numan, M.M.M. De Azevedo and N. Durán, “Nanostructured lipid-free formulation of amphotericin”, Proc. First Brazilian Winter School on Nanobiotechnology, S.P., Brazil, 164-165 (2002).
7. N. Bromberg, G.Z. Justo, M.M.M. de Azevedo, M. Haun and N. Durán, “Cytotoxicity of Poly (epsilon-caprolactone) microspheres incorporating violacein in promyelocytic leukemia cells (HL60)”, Proc. First Brazilian Winter School on Nanobiotechnology, S.P., Brazil, 187-188 (2002),
8. N. Durán, M.M.M. De Azevedo, G.Z. Justo, P.D. Marcato, C.M.S. Buffo, R. de Pádua, P.S. Melo, A.º De Souza, M. Haun, L. Alves and Iara F. Gimenez, “ In vitro antitumoral and antibacterial activities of different compounds encapsulated as micro and nanoparticles in cyclodextrin and in biodegradable polymers”, Proc. 2nd Network Nanobiotechnology Meeting, Campinas, S.P., Brazil. 2, 141-142 (2003).
9. M.M.M. De Azevedo and N. Duran, “Nanospheres preparation from PLGA-pluronic and PLGA-Pluronic-PVA components: Violacein encapsulation, characterization, degradation and release behaviour”, Proc. 2nd Network Nanobiotechnology Meeting, Campinas, S.P., Brazil. 2, 131-132 (2003).

10. N. Bromberg, G.Z. Justo, M.M.M. De Azevedo, R.H. Wiltrout and N. Durán, “Cytotoxicity of violacein encapsulated in PLGA/PVA microspheres in different tumor cell lines”, Proc. 2nd Network Nanobiotechnology Meeting, Campinas, S.P., Brazil. 2, 71-72 (2003).
11. De Souza, A.O., Minarini, P.R.R., Ferreira, D.A., Marcelo M.M. De Azevedo, M.M.M., Andrade-Santana, M.H., Silva, C.S., Durán, N.”2-Propen-1-amine derivative in drug delivery systems for antimycobacterial activity”, Proc. 3th. Network Nanobiotechnology Meeting, São Pedro, S.P. 3, 38-39 (2005).
12. De Azevedo, M.M.M., Melo, P.S., Durán, N. Haun, M., “Comparative cytotoxicity of violacein and violacein-loaded poly (d, l-lactide-co-glycolide) nanoparticles in the promyelocytic leukemia cell line (HL60)”, Proc. 3th. Network Nanobiotechnology Meeting, São Pedro, S.P. 3, 46-47 (2005).
13. Melo, P.S., De Azevedo, M.M.M, Durán, N., Haun, M. “Violacein and violacein-loaded poly (d, l-lactide-co-glycolide) nanoparticles induce apoptosis via a mitochondrial pathway in human leukemic cells”, Proc. 3th. Network Nanobiotechnology Meeting, São Pedro, S.P. 3, 56-57 (2005).
14. Monteiro, P.A., De Carvalho, D.A., Melo, P.S., De Azevedo, M.M.M., Durán, N. Haun, M.” Cytotoxic evaluation of violacein and violacein-loaded poly (d, l-lactide-co-glycolide) nanoparticles in human colon adenocarcinoma cell lines”, Proc. 3th. Network Nanobiotechnology Meeting, São Pedro, S.P. 3, 58-59 (2005).

Publicações em Revistas (submetidas)

1. de Azevedo, M. M . M ., de Andrade, M. L ., Atvars, T. D. Z. e Durán, N. Photophysical properties of violacein dispersed in poly(epsilon-caprolactone) microspheres, submetido ao Journal of Luminescence em maio 2005.
2. Gimenez, I. F., Anazetti, M. C., Melo, P. S., Haun, M., De Azevedo, M. M.M., Durán, N. e Alves, O. L. Cytotoxicity on V79 and HL60 Cell Lines by Thiolated-beta- Cyclodextrin-Au/Violacein Nanoparticles, submetido ao Journal of Biomedical Nanotechnology em maio 2005.
3. Patricia Silva Melo, Marcelo M.M. De Azevedo, Marcela Haun e Nelson Durán Violacein and violacein-loaded poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles induce apoptosis via a mitochondrial pathway in human leukemic cells, submetido ao European Journal of Pharmacology em maio 2005.

RESUMO

SISTEMAS POLIMÉRICOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA UTILIZANDO MICRO E NANOPARTÍCULAS ENCAPSULANDO VIOLACEÍNA: CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE BIOLÓGICA, CONSEQÜÊNCIAS E PERSPECTIVAS. Neste trabalho investigamos sistemas poliméricos transportando a violaceína, composto de interesse farmacológico, mais especificamente antitumoral, obtido a partir da biossíntese da *Chromobacterium violaceum*. Entretanto, trata-se de um composto insolúvel em meio aquoso e como conseqüência apresenta toxicidade e baixa biodisponibilidade, justificando seu encapsulamento. As microesferas (PCL) foram preparadas segundo princípios conhecidos de obtenção e estabilização de sistemas coloidais, pelo método de emulsão e evaporação de solvente e as nanoesferas (PLGA) foram obtidas pelo método de “nanoprecipitação” (separação de fases). Os sistemas foram caracterizadas quanto às propriedades físico-químicas por microscopias ótica, eletrônica de varredura, eletrônica de transmissão, fluorescência, varredura a laser confocal e distribuição de tamanho, potencial zeta e tensão interfacial. As nanoesferas contendo violaceína promoveram citotoxicidade, diferenciação celular e apoptose em linhagem leucêmica promielocítica humana HL60 e fibroblastos V-79. A violaceína está incorporada duas formas: isolada e auto-associada, distribuída por toda a partícula e fluoresce apenas em solução diluída e quando dispersa na matriz polimérica. O sistema nanoparticulado é citotóxico para HL60, induz apoptose (constatado nas medidas de potencial transmembrana) e diferenciação celular. A inibição do intumescimento mitocondrial evidenciou um efeito selante conferido pelo Pluronic à membrana de mitocôndrias, sugerindo um direcionamento a um alvo específico da célula.

ABSTRACT

POLYMERIC DRUG DELIVERY SYSTEMS USING MICRO AND NANOSPHERES CONTAINING VIOLACEIN: CHARACTERIZATION, BIOLOGICAL ACTIVITY, CONSEQUENCES AND PERSPECTIVES. In this work we investigate polymeric systems transporting violacein, substance of pharmacological interest, more specifically antitumoral, obtained from the biosynthesis of *Chromobacterium violaceum*. However, violacein is an insoluble compound in water and as a consequence introduces toxicity and low bioavailability, justifying the entrapment. Microspheres (PCL) were obtained according to well-known principles of obtainment and stabilization of colloidal systems, by the solvent evaporation method and nanospheres (PLGA) were obtained by “nanoprecipitation method” (phase separation). These systems were characterized regarding the physical-chemistry properties by optical, fluorescence and laser confocal microscopies, scanning electronic microscopy, transmission electronic microscopy, diameter distribution, zeta potencial and interfacial tension. Violacein entrapped in nanospheres promoted cytotoxicity, cellular differentiation and apoptosis in leukaemia promyelocytic human HL60 cell line and fibroblasts V-79. Violacein in PCL microspheres is present in two forms: isolated and auto-associated, distributed along the particle and there is emission in diluted solution and when dispersed in the polymeric matrix. The nanoparticulated system is cytotoxic for HL60, induces apoptosis (verified by transmembrane potential measures) and induces cellular differentiation. Inhibition of the mitochondrial swelling occurrence is caused by Pluronic membrane sealing capability to mitochondrial membrane, suggesting the direction to a specific target of the cell.

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| <i>1.1. SISTEMAS COLOIDAIS E A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS.....</i> | <i>1</i> |
| 1.1.1. A motivação..... | 1 |
| 1.1.2. Sistemas coloidais e a encapsulação de medicamentos..... | 8 |
| 1.1.3. Os materiais utilizados: polímeros biodegradáveis..... | 20 |
| 1.1.4. Aplicações na área médica e farmacêutica..... | 26 |
| <i>1.2. A CANDIDATA À ENCAPSULAÇÃO: VIOLACEÍNA, UM PIGMENTO PRODUZIDO PELA CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM.....</i> | <i>32</i> |
| <i>1.3. A CULTURA DE CÉLULAS, OS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E OS FENÔMENOS DE APOPTOSE E NECROSE.....</i> | <i>34</i> |
| <i>1.4. CÂNCER E LEUCEMIAS.....</i> | <i>39</i> |
| 2. OBJETIVOS..... | 44 |
| 3. EXPERIMENTAL..... | 46 |
| <i>3.1 PRODUÇÃO DE VIOLACEÍNA A PARTIR DA CULTURA DE CÉLULAS DE CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM CCT 3496 EM FERMENTADOR ML-4100 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC), COM CAPACIDADE PARA 30 L.....</i> | <i>46</i> |
| <i>3.2. SISTEMA DE EMULSÃO ÓLEO (PCL-VIOLACEÍNA-ETAC) EM ÁGUA (TWEEN 40-ÁGUA) FORMANDO MICROESFERAS DE PCL CONTENDO VIOLACEÍNA.....</i> | <i>49</i> |
| 3.2.1. Metodologia de formulação das microesferas poliméricas por emulsificação e evaporação de solvente..... | 49 |
| 3.2.2. Caracterização morfoquímica das microesferas..... | 52 |
| a. Microscopia óptica..... | 52 |
| b. Microscopia eletrônica de varredura..... | 52 |
| c. Microscopia de Epifluorescência..... | 54 |
| d. Microscopia de varredura a laser confocal..... | 55 |
| 3.2.3. Comportamento fotofísico da violaceína em solução e incorporada às microesferas (estado sólido)..... | 56 |
| a. Excitação e emissão de violaceína em acetato de etila..... | 56 |
| b. Fotofísica no estado estacionário e resolvida no tempo: violaceína livre e encapsulada, no estado sólido..... | 57 |
| <i>3.3. Sistema nanométrico PLGA-PLURONIC-PVA-violaceína em água-acetona.....</i> | <i>58</i> |
| 3.3.1. Metodologia de formulação das nanoesferas poliméricas pelo método de nanoprecipitação (separação de fases). Eficiência de encapsulação e cinética de liberação..... | 58 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.2. Caracterização morfoquímica das nanoesferas..... | 59 |
| a. Microscopia eletrônica de varredura..... | 59 |
| b. Microscopia Eletrônica de Transmissão..... | 60 |
| c. Microscopia de varredura a laser confocal..... | 61 |
| 3.3.3. Tamanho médio de partícula por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (ζ) na superfície de cisalhamento..... | 62 |
| 3.3.4. Medidas de Tensão Superficial e Tensão Interfacial..... | 64 |
| 3.3.5. Atividade biológica das nanoesferas em cultura de células..... | 65 |
| a. Manutenção dos meios de cultura e contagem do número de células..... | 65 |
| b. Citotoxicidade e viabilidade celular..... | 66 |
| b1. Redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólio) | 67 |
| b2. Determinação da atividade fosfatásica..... | 67 |
| b3. Exclusão do corante Azul de Tripán e Incorporação do Corante Vermelho Neutro..... | 68 |
| c. Determinação da Diferenciação Celular através da Redução do NBT..... | 69 |
| d. Indução de morte celular por apoptose. Marcação com anexina V-FITC/PI analisada por citometria de fluxo..... | 69 |
| e. Indução de morte celular por apoptose. Análise do “swelling” mitocondrial..... | 70 |
| f. Indução de morte celular por apoptose. Análise de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial (JC1) | 71 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 72 |
| <i>4.1. SISTEMA DE EMULSÃO ÓLEO (PCL-VIOLACEÍNA-ETAC) EM ÁGUA (TWEEN 40-ÁGUA) FORMANDO MICROESFERAS DE PCL CONTENDO VIOLACEÍNA.....</i> | <i>72</i> |
| 4.1.1. Metodologia de formulação das microesferas poliméricas por emulsificação e evaporação de solvente..... | 73 |
| 4.1.2. Caracterização morfoquímica das microesferas..... | 76 |
| a. Microscopia óptica..... | 76 |
| b. Microscopia Eletrônica de Varredura. Espectroscopia de raios-X por dispersão em energia.. | 78 |
| c. Microscopia de Epifluorescência..... | 85 |
| d. Microscopia de varredura a laser confocal..... | 86 |
| 4.1.3. Comportamento fotofísico da violaceína em solução e incorporada às microesferas (estado sólido) | 88 |
| a. Comportamento fotofísico da violaceína em solução..... | 88 |
| b. Fotofísica no estado estacionário e resolvida no tempo: violaceína livre e encapsulada, no estado sólido..... | 93 |
| <i>4.2. SISTEMA NANOMÉTRICO PLGA-PLURONIC-PVA-VIOLACEÍNA –ÁGUA-ACETONA...96</i> | |
| 4.2.1. Metodologia de formulação das nanoesferas poliméricas pelo método de nanoprecipitação. Eficiência de encapsulação e cinética de liberação..... | 96 |
| 4.2.2. Caracterização morfoquímica das nanoesferas..... | 99 |
| a. Microscopia eletrônica de varredura..... | 99 |

| | |
|--|------------|
| b. Microscopia de varredura a laser confocal..... | 105 |
| c. Microscopia Eletrônica de Transmissão..... | 106 |
| 4.2.3. Diâmetro médio por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (ζ) na superfície de cisalhamento..... | 108 |
| 4.2.4. Medidas de Tensão Superficial e Interfacial..... | 111 |
| 4.2.5. Atividade biológica das nanoesferas em cultura de células..... | 112 |
| a. Citotoxicidade e viabilidade celular..... | 112 |
| a.1. Redução do MTT e Atividade de Fosfatase..... | 113 |
| a.2. Exclusão do Azul de Tripán..... | 116 |
| b. Determinação da Diferenciação Celular através da Redução do NBT..... | 118 |
| c. Indução de morte celular por apoptose. Marcação com anexina V-FITC/PI analisada por citometria de fluxo..... | 120 |
| d. Indução de morte celular por apoptose. Análise do “swelling” mitocondrial..... | 124 |
| e. Indução de morte celular por apoptose. Análise de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial..... | 126 |
| 5.CONCLUSÕES..... | 134 |
| 6.PERSPECTIVAS FUTURAS ABERTAS POR ESTE TRABALHO..... | 137 |
| 7.NANOBIOTECNOLOGIA: ANÁLISE CRÍTICA DO PASSADO RECENTE E O QUE PODEMOS ESPERAR PARA O FUTURO..... | 138 |
| 8.BIBLIOGRAFIA..... | 143 |

LISTA DE ABREVIATÖES

- τ - tempos de vida de fluorescência
- χ^2 - parâmetro de regressão mínimos quadrados não linear
- γ - tensão superficial
- λ (exc ,em)- comprimento de onda de excitação e emissão
- ψ - potencial mitocondrial transmembrana
- ΔG_M – variação da energia livre de mistura
- ADP – difosfato de adenosina
- ATP – trifosfato de adenosina
- Bcl-2 – *B cell leukaemia 2*
- V-FITC – proteína anexina V ligada a isotiocianato de fluoresceína
- CLSM – *Confocal Laser Scanning Microscopy*
- COX-2 – ciclo-oxigenase 2
- DMEM - meio Eagle modificado por Dulbecco
- DNA- ácido desoxiribonucléico
- EDS – espectroscopia dispersiva em energia
- EGTA - *ethylene glycolbis(2aminoethyl ether)*.
- EtAc – acetato de etila
- HL60 – linhagem celular de leucemia promielocítica aguda
- IC₅₀ - concentração inibitória responsável por 50% de morte celular
- iv- intravenoso
- JC1–5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzilimidazolilcarbo-cianina iodeto.

- LDL - *Low Density Lipoprotein*
- LLA - Leucemia Linfóide Aguda
- LLC - Leucemia Linfóide Crônica
- LMA - Leucemia Mielóide Aguda
- LMC - Leucemia Mielóide Crônica
- MTT - Brometo de (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)
- NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NBD – *nitro blue diformazan*
- NBT - *Nitro blue tetrazolium*
- NK- *natural killer*
- PCL – poli(epsilon-caprolactona)
- PEO-PPO-PEO – tensoativo não iônico de copolímero-bloco poli(etilenoglicol)-poli(propilenoglicol)-polietilenoglicol) (Pluronic[®], F-68)
- PI – iodeto de propídeo
- PLGA – poli(lactídeo-co-glicolídeo)
- PVA – álcool polivinílico
- Rpm- rotações por minuto
- RPMI-1640 - meio de cultura desenvolvido por Moore (1969) no Roswell Park Memorial Institute.
- SEM – *Scanning electron microscopy*
- SFB - soro fetal bovino
- TEM – *Transmission Electron Microscopy*
- TNF – fator de necrose tumoral
- UV-vis – espectroscopia no ultravioleta e visível
- V79 – linhagem celular de fibroblasto de hamster chinês

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1: Medidas de diâmetro médio das nanopartículas de PLGA obtidas por mobilidade eletroforética das partículas..... | 108 |
| Tabela 2 Medidas de potencial zeta (ξ) das nanopartículas de PLGA por espectroscopia de correlação de fótons..... | 111 |
| Tabela 3: Medidas de tensão superficial (para as soluções) e interfacial para os sistemas bifásicos utilizados nas emulsões para a preparação de nanopartículas..... | 112 |
| Tabela 4: Porcentagem de aumento ou diminuição (-) de “swelling” mitocondrial em células HL60 tratadas em relação ao controle..... | 126 |
| Tabela 5: Porcentagem de decréscimo do $\Delta\psi_m$ comparado às células do controle..... | 128 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 : (a) Perfis de liberação de drogas em função do tempo: convencional x controlada. (b) Os níveis temporais de um evento de liberação: da administração inicial à internalização em células e tecidos e posterior eliminação..... | 6 |
| Figura 2 : A distribuição espacial e as barreiras em um evento de liberação..... | 7 |
| Figura 3 : De 1 (natureza caroço-casca) para 5 (esfera), passando por 2,3,4 (graus crescentes de subdivisão dos domínios)..... | 11 |
| Figura 4 : Representação do método de emulsificação e evaporação de solvente | 14 |
| Figura 5 : Representação do método da emulsificação e difusão do solvente..... | 15 |
| Figura 6 : Sistema formando uma <i>quasi-emulsão</i> para preparação de nanoesferas..... | 16 |
| Figura 7 : Método de copolimerização interfacial para se preparar nanocápsulas..... | 18 |
| Figura 8 : Um novo método polimerização interfacial..... | 19 |
| Figura 9 : Imagem de emulsão supercrítica, formada por H ₂ O/CO ₂ supercrítico..... | 19 |
| Figura 10 : Estrutura química de vários polímeros biodegradáveis..... | 21 |
| Figura 11 : Estrutura química dos principais poliésteres utilizados em sistemas de liberação de fármacos..... | 22 |
| Figura 12 : Etapas da preparação de copolímeros-bloco compostos de PEO-PPO-PEO (relativamente hidrofílico) e poli(epsilon-caprolactona) (hidrofóbico)..... | 25 |
| Figura 13 : Domínios magnéticos: "bulk" (esquerda) e nanopartícula (direita)..... | 29 |
| Figura 14 : Diagramas mostrando o desenvolvimento embriológico dos gliomas nasais. Acima: fechamento normal dos ossos do crânio e face, abaixo: Corte mostrando um glioma extranasal..... | 31 |
| Figura 15 : Aspecto morfológico da <i>Chromobacterium violaceum</i> e estrutura molecular da violaceína..... | 33 |
| Figura 16 : Etapas de um evento de necrose..... | 36 |
| Figura 17 : Etapas de um evento de apoptose..... | 37 |

| | |
|--|----|
| Figura 18: Dispositivo utilizado na metodologia de formulação das microesferas PCL/violaceína..... | 51 |
| Figura 19: Representação da emulsão estabilizada no sistema PCL-violaceína/-surfatante-água..... | 73 |
| Figura 20: Aproximação de gotas de óleo estabilizadas por copolímero bloco e coalescência durante a quebra de uma emulsão. A seta indica uma descontinuidade da camada interfacial de surfatante..... | 74 |
| Figura 21: Micrografia obtida por microscopia óptica (a): objetiva de 10X; (b) e (c): objetiva de 100X..... | 76 |
| Figura 22: Microesferas de PCL/violaceína. Imagens obtidas por SEM, 20 kV: esquerda, 1200 x; direita, 2000 x..... | 78 |
| Figura 23: Microesferas de PCL/violaceína. Imagens SEI (topografia) (a): aumento de 200 x , (b): 350x , (c) 3500x, (d) 5000x. Tensões de 15 KV..... | 79 |
| Figura 24: Microesferas de PCL/violaceína. Imagens obtidas por SEI, 20 kV: superior, 4500 x; inferior, 1400 x..... | 80 |
| Figura 25 : Micrografia mostrando a distribuição dos elementos na partícula de PCL/violaceína: (a): C, (b): N, (c): O..... | 82 |
| Figura 26 : Micrografia obtida por SEM-EDS ampliada, mostrando a conformidade de distribuição dos elementos N e O na partícula de PCL/violaceína..... | 83 |
| Figura 27 : Micrografia obtida por SEM-EDS ampliada, mostrando que N e O têm perfis de distribuição ao longo de uma “linescan” são concordantes..... | 84 |
| Figura 28 : Micrografia obtida por SEM-EDS mostrando que a quantidade de N e O em presente diferentes microesferas é semelhante..... | 83 |
| Figura 29 : Micrografias obtidas por microscopia de fluorescência de (a) aglomerado de microesferas contendo violaceína. (b) Microesferas controle x microesferas contendo violaceína..... | 85 |
| Figura 30 : Microscopia Confocal: conjunto de microesferas de PCL contendo violaceína, que fluoresce Os vários planos focais diferentes: cortes do topo para baixo..... | 86 |
| Figura 31 : Microscopia Confocal: conjunto de microesferas de PCL contendo violaceína, que fluoresce Os vários planos focais diferentes: cortes do topo para baixo | 87 |

| | |
|---|-----|
| Figura 32 : (a) Espectro de excitação ($\lambda_{em} = 416$ nm) e (b) de fluorescência ($\lambda_{exc} = 370$ nm) de solução de violaceína em acetato de etila nas concentrações: 2,04 (—), 0,87 (-----) e 0,22 mmol L ⁻¹ (.....) | 90 |
| Figura 33 : Espectros de fluorescência ($\lambda_{exc} = 370$ nm) e excitação ($\lambda_{em} = 416$ nm) de solução de violaceína (2.32 mmol L ⁻¹) com várias quantidades de PCL: 0.1 (.....), 0.2 (----), and 5.5 mg L ⁻¹ (—) | 92 |
| Figura 34 : Espectros de absorção (.....) e fluorescência (—) de violaceína incorporada às microesferas de PCL; espectro de fluorescência de cristais de violaceína (----) | 92 |
| Figura 35 : Histograma de emissão de fluorescência para o sistema micrométrico contendo violaceína; $\lambda_{exc} = 276$ nm, $\lambda_{em} = 370$ nm | 95 |
| Figura 36 Aspecto das nanoesferas preparadas por separação de fases de polímero préformado | 97 |
| Figura 37 : Perfil de liberação <i>in vitro</i> de violaceína com o tempo de nanopartículas de PLGA-PLURONIC-PVA, acompanhada por 144 horas, em intervalos de 24 horas | 98 |
| Figura 38 : Nanoesferas de PLGA-PLURONIC-PVA contendo violaceína mostrando a baixa polidispersidade em diâmetro. Imagens obtidas por SEM, 20 kV, em aumento de 1500 x | 100 |
| Figura 39 Nanoesferas de PLGA-PLURONIC-PVA-violaceína mostrando padrões não regulares de organização. Imagens obtidas por SEM, 20 kV, em aumento de (a): 5000 x, (b): 4000 x, (c): 2500 x | 102 |
| Figura 40 : Nanoesferas formadas no sistema PLGA-PLURONIC-PVA, mostrando auto-organização, em aumentos sucessivos: (1) 950x, (2) 3000x e (3) 8000x | 103 |
| Figura 41 : Nanoesferas formadas no sistema PLGA-PLURONIC-PVA, após 50 dias em meio tampão fosfato pH=7.4 a 37 °C | 104 |
| Figura 42 : Microesferas formadas no sistema PCL-Tween 40-água-violaceína-EtAc mostrando heterogeneidade | 104 |
| Figura 43 : Dupla fluorescência em microscopia confocal : diferentes domínios do gel e das nanoesferas | 105 |
| Figura 44 : Nanopartículas formadas no sistema PLGA-PLURONIC-PVA contendo violaceína, evidenciando estrutura em camadas e a presença de esferas menores em seu interior | 107 |

| | |
|--|-----|
| Figura 45 : Esquema representativo da dupla camada elétrica..... | 110 |
| Figura 46 : Viabilidade das células HL60 tratadas com a violaceína ou com a violaceína/PLGA durante 72h avaliada através da redução do MTT e atividade fosfatásica . Cada ponto representa a média + desvio padrão de três experimentos em seis replicatas..... | 115 |
| Figura 47 : Número de células HL60 viáveis após diferentes tempos de tratamento com a violaceína ou com a violaceína/PLGA avaliado através da exclusão do corante azul de Tripan..... | 117 |
| Figura 48 : Redução do NBT por células HL60, induzidas a diferenciação, por violaceína livre e encapsulada em nanoesferas. Os dados mostrados são expressos como a porcentagem em relação ao controle (considerados como 100%) e são a média da quintuplicata \pm SD. O número de células foi fixado em $1,0 \times 10^6$ | 119 |
| Figura 49 : Esquema de um citômetro de fluxo..... | 120 |
| Figura 50 : Porcentagens de apoptose induzida pela violaceína em sua forma livre e encapsulada em nanoesferas de PLGA em diferentes tempos de exposição e concentrações baseadas nos dados obtidos por análise em citometria de fluxo..... | 123 |
| Figura 51 : Potencial de membrana mitocondrial avaliado por citometria de fluxo após incubação com o corante JC-1. As células foram previamente incubadas com a violaceína livre e encapsulada em diferentes tempos de tratamento: 3 h (A), 6 h (B), 12 h (C) e 24 h (D). JC-1 quando concentrado por mitocôndrias respirando ativamente forma agregados que fluorescem em 590 nm. Em concentrações menores, JC-1 se encontra na forma monomérica que fluoresce em 527 nm. Os números nos gráficos indicam as porcentagens da forma monomérica..... | 129 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistemas coloidais e a liberação controlada de fármacos

1.1.1. A motivação

É conhecido que o desenvolvimento de novos fármacos envolve prazos e custos elevados. A preocupação com este quadro tem levado a uma transformação sem precedentes na indústria farmacêutica, inserindo-a no que chamamos de tecnologia da informação. Para mencionar um exemplo ilustrativo, a *IBM Business Consulting Services*, divisão de consultoria da empresa IBM, apresentou um novo relatório mundial intitulado *Pharma 2010: Silicon Reality* (“A realidade de silício”)¹. Neste relatório a empresa faz um mapeamento das tecnologias da informação que permitirão às companhias do setor farmacêutico abandonar o modelo tradicional de medicina “universal” (uso de tipos únicos de ativo, que servem para todos) e orientar-se para soluções de tratamentos mais eficazes, abrangendo diagnósticos, ativos, dispositivos e serviços de suporte para pacientes com patologias específicas. O relatório identifica as tecnologias da informação que darão impulso à inovação e prevê que a utilização das mesmas ajudará a indústria farmacêutica a reduzir seus custos de desenvolvimento de fármacos para US\$ 200 milhões (um quarto do custo médio atual por medicamento) e diminuir o prazo médio de desenvolvimento de drogas dos atuais 12-14 anos para 3-5 anos. Estas tecnologias envolvem o uso de computadores e de redes em grade de alta potência que fazem simulações biomoleculares e de modelo biológico (biosimulação) em grande escala, “vestimentas” biomédicas (rastreamento individual), redes de

armazenamento e busca da *Web* (ferramentas que permitam analisar rápida e eficazmente grandes quantidades de dados, com maior benefício aos pacientes).

Ao lado dos esforços empregados em tecnologia da informação, e também se beneficiando desta, existem paralelamente pesquisas em busca de melhoramentos na segurança e eficácia de ativos já conhecidos, visando também a diminuição dos custos e do tempo empregado em se procurar por alternativas totalmente novas. Estes melhoramentos incluem novos dispositivos farmacêuticos, possibilitando novas formas de apresentação do ativo ao paciente. Um exemplo interessante é o da aspirina que, ao longo de sua história centenária sofreu duas grandes revoluções estruturais: uma na sua descoberta (com a solução estrutural de Felix Hoffman, o ácido acetil salicílico)² após longo uso de extratos da folha de salgueiro e do ácido salicílico puro, e outra recentemente, que em breve estará sendo comercializada: trata-se da “poliaspirina”³, desenvolvida pela química Kathryn Uhrich, da Rutgers University (NJ/US), que disponibiliza o ácido salicílico diretamente na corrente sanguínea, sem agressão ao trato gastrointestinal. A “poliaspirina” é produzida a partir de uma condensação do ácido salicílico benzilado com cloreto de sebacoíla (derivado do ácido 1,8-octanodicarboxílico), originando o poli(éster-anidrido). A hidrólise é bastante lenta em meio estomacal (ácido), mas ocorre em maior grau na corrente sanguínea, liberando ácido salicílico. Como a poliaspirina tem natureza polimérica, poderá também ser aplicada diretamente sobre os ferimentos, modelada como um pequeno adesivo. Tal como outros poliésteres, a poliaspirina pode ser utilizada nos fios para pontos cirúrgicos, possibilitando suturas com menor resposta inflamatória.

Ao longo dos tempos, a utilização da maioria dos compostos terapêuticos tem sido sempre limitada pela impossibilidade de aumento da sua dosagem. A retenção ou degradação do agente terapêutico, baixa solubilidade e, em especial, os efeitos colaterais perniciosos inerentes à sua utilização em concentrações elevadas,

tornam muitas vezes difícil a utilização da dosagem necessária para que este cumpra a sua função. Este problema levou, no decorrer das últimas décadas, a um grande esforço no sentido de desenvolver um sistema capaz de transportar um composto terapêutico (antitumorais, em especial as dirigidas a sítios específicos, além de antibióticos, enzimas, hormônios, agentes quelantes ou compostos modificadores da célula) até um alvo específico (órgão, tecido ou célula). Neste contexto, há um corrente e notável crescimento das áreas de pesquisa envolvidas na investigação de novos sistemas destinados à administração de medicamentos, freqüentemente descritos como sistemas de liberação controlada. Estas áreas representam um desenvolvimento relativamente novo e, quanto às nossas necessidades em saúde humana, podem melhorar a eficácia e a segurança na administração dos ativos.

A primeira proposta de um sistema direcionado de transporte de fármacos data do início do século XX, quando Paul Ehrlich propôs o seu modelo, que ficou conhecido por "Bala Mágica de Ehrlich" (Ehrlich's Magic Bullet)⁴. Neste modelo, o fármaco é ligado ao transportador, e idealmente exibirá a sua atividade farmacológica apenas no tecido alvo (mecanismos de especificidade, como a ligação entre antígeno e anticorpo, já eram conhecidos). Assim, os efeitos indesejáveis resultantes da sua ação em outros tecidos são largamente diminuídos, enquanto o aumento da eficiência permite o decréscimo da dose administrada. Porém, por mais atrativos e simples que possam parecer os conceitos de Ehrlich, os sucessos eram poucos.

As primeiras tentativas para a obtenção de um sistema transportador eficaz tiveram como base o encapsulamento das biomoléculas em vesículas de *nylon* e outros polímeros sintéticos⁵. Contudo, esta abordagem mostrou-se totalmente inadequada, uma vez que estes polímeros não biodegradáveis se acumulavam no organismo.

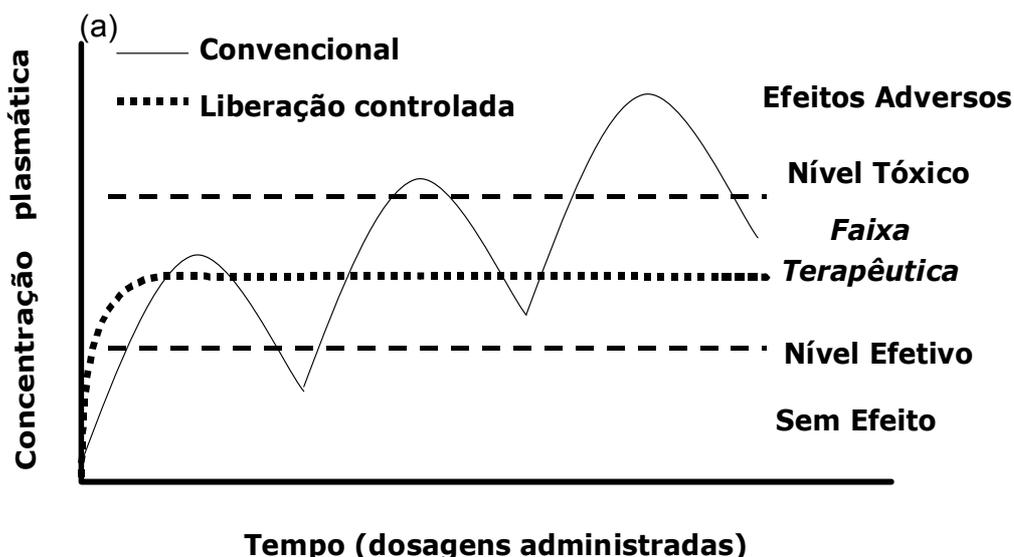
O primeiro grande passo nesta área deu-se em 1965, com a publicação por Alec Bangham e colaboradores de um trabalho⁶ de investigação fundamental acerca da difusão de íons através de membranas lipídicas artificiais, embora sem qualquer ligação imediata aos estudos de sistemas transportadores de fármacos. Neste trabalho foi feita a caracterização de um sistema de vesículas fosfolipídicas ao qual, três anos mais tarde, seria dado o nome de *lipossomas*. Imediatamente após o trabalho de Bangham, os lipossomas impuseram-se como um sistema modelo simples para o estudo de membranas biológicas. O sucesso na incorporação de enzimas em lipossomas despertou também o interesse da comunidade científica para a sua aplicação médica e farmacológica. Em 1971, Gregory Gregoriadis⁷ propôs pela primeira vez a utilização dos lipossomas como sistemas transportadores de fármacos, mantendo desde então um papel preponderante no desenvolvimento desta área⁸.

Vale salientar que os lipossomas são um caso notável de um sistema que teve uma passagem extremamente rápida do campo da investigação para a aplicação comercial, antes mesmo de suas propriedades e eficácia estarem completamente estudadas, devido à grande euforia desencadeada na década de 70 e início da década de 80 pelo potencial de aplicação dos lipossomas nas indústrias médica e farmacêutica⁷. O por que da euforia? Vamos nos lembrar das formas convencionais de administração e compará-las aos sistemas de liberação controlada.

Nas formas convencionais (spray, injeção, pílulas) a concentração do ativo na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina. Desde que cada composto sempre possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Isto será problemático se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica e também pelo fato de haver acúmulo de fármaco

e/ou metabólitos também tóxicos. O objetivo de um sistema de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis (ou seja, na faixa terapêutica) por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem^{9,10}. A diferença da variação de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada, pode ser melhor visualizado na **Figura 1a**.

Um evento temporal de liberação¹¹ pode ser modelado por compartimentos, nos quais a concentração muda com o tempo, desde a administração inicial, passando pela internalização em células e tecidos até a etapa de eliminação. As diferentes constantes cinéticas, representadas por k_{1-3} , sugerem uma farmacocinética para cada estágio. Este esquema está representado na **Figura 1b**. Um exemplo de alteração no evento temporal foi verificado na literatura, com a funcionalização de superfícies de lipossomas com poli(etilenoglicol)^{12,13}, cujas cadeias estão expostas ao exterior e solvatadas na circulação sanguínea, alterando a constante k_2 , levando a um perfil farmacocinético diferente do usual.



(b)

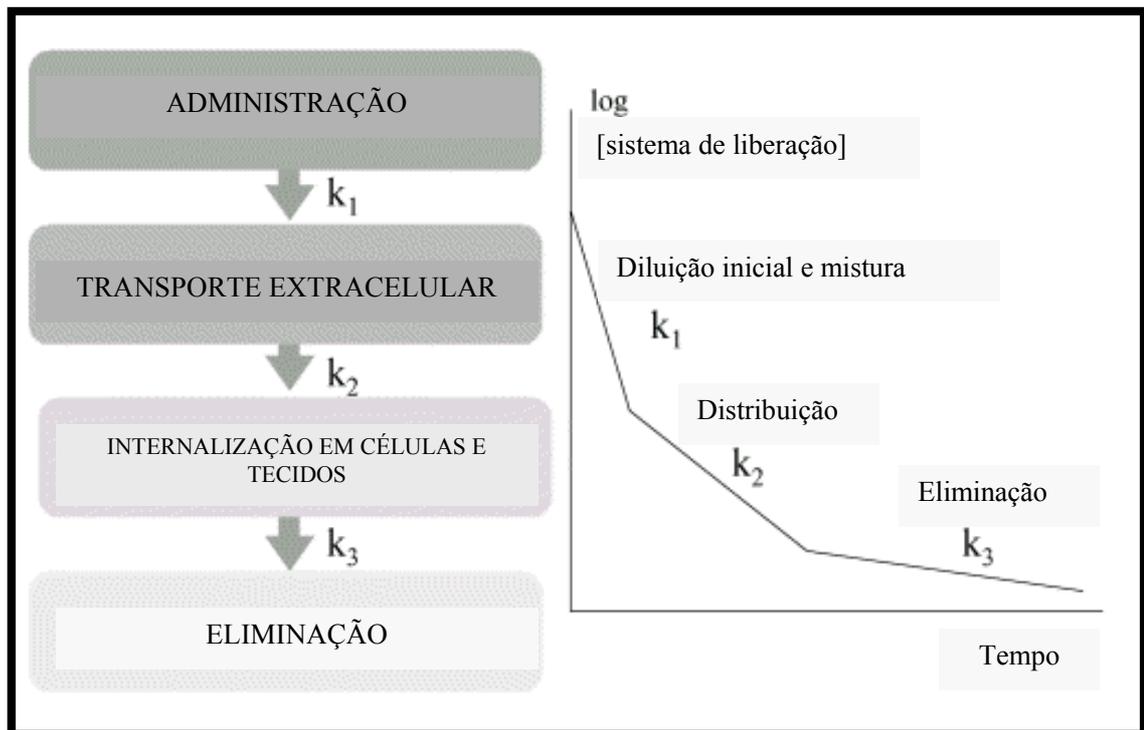


Figura 1: (a) Perfis de liberação de drogas em função do tempo: convencional x controlada. (b) Os níveis temporais de um evento de liberação: da administração inicial à internalização em células e tecidos e posterior eliminação¹⁰.

Outro importante fator a ser considerado para a efetividade dos sistemas de liberação é o nível de distribuição espacial, já que qualquer sistema farmacológico necessita ser absorvido, distribuído, atingir o alvo específico e interagir com o tecido e sua população celular. Neste percurso ocorrerá a interação com várias barreiras anatômicas¹⁰. A **Figura 2** ilustra um sistema de liberação percorrendo a biofase: a ordem de grandeza da escala na qual ocorrem as interações no meio biológico diminui significativamente durante o transporte, de centímetros (circulação sanguínea) a nanômetros (meio intracelular), local frequentemente restritivo, que funciona como barreira para liberação efetiva de ativos. Sistemas de

liberação controlada podem alterar esta distribuição, como por exemplo, na administração i.v. de nanopartículas funcionalizadas com polisorbato, que mimetizam lipoproteínas de baixa densidade e interagem com receptores de LDL. Isto leva à difusão pelas células endoteliais do cérebro, superando a barreira hemato-encefálica e alterando a distribuição em compartimentos ¹⁴.

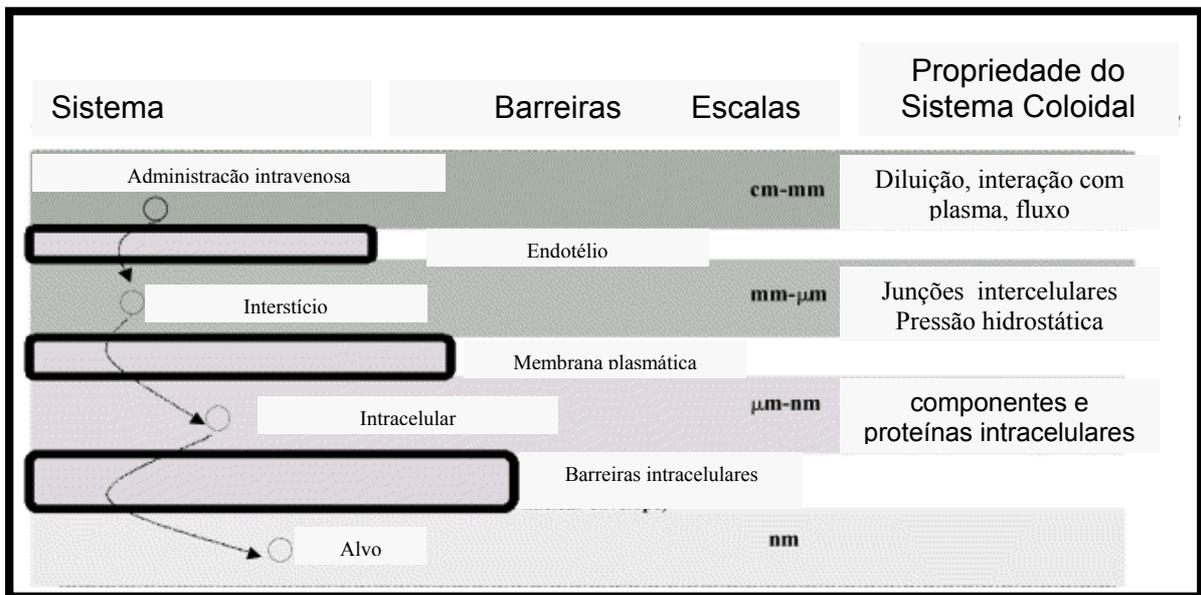


Figura 2: A distribuição espacial e as barreiras em um evento de liberação ¹⁰.

Finalmente, trabalhos recentes tratando de liberação controlada ^{15,16} têm fornecido numerosas evidências do seguinte:

- casos de um aumento na eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz e maior tempo de permanência na circulação;
- diminuição significativa da toxicidade, devido ao uso de doses menores;
- a natureza e composição dos veículos é muito variada e, ao contrário do que se poderia esperar, não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bio-inativação prematura), sendo sua administração

segura (sem causar reações inflamatórias locais) e conveniente ao paciente (menor número de doses);

- d. existe a possibilidade de direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas e tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas.

1.1.2. Sistemas coloidais e a encapsulação de medicamentos

Os sistemas de liberação controlada estão intimamente relacionados ao conhecimento da química de colóides, cujas leis determinam seu comportamento e o sucesso nas aplicações médicas e farmacêuticas.

No campo da ciência coloidal e de superfícies, muitas tentativas para definir rigorosamente o termo colóide serão insatisfatórias por serem pouco abrangentes, podendo inclusive restringir o número de sistemas que podem exibir comportamento coloidal mas não se enquadram em uma classificação padrão. Normalmente temos pouca dificuldade conceitual na compreensão de estados “bulk” da matéria (sólidos, líquidos e gasosos), em que se pode associar a cada um deles características bem determinadas, como rigidez, volumes fixos e transições de fase, em condições conhecidas. Compreendemos também boa parte das forças que controlam as interações em átomos, moléculas e soluções. Entretanto, a fronteira (que engloba colóides e interfaces) e que está entre o estado “bulk” e o nível molecular ainda necessita de compreensão (“The Twilight Zone”, segundo Myers)¹⁷. De maneira geral, o domínio coloidal envolve um sistema no qual um ou mais componentes tem pelo menos uma dimensão da ordem de nanômetros (10^{-9} m) até micrômetros (10^{-6} m), em que estes componentes podem ser moléculas grandes ou pequenas partículas (fase descontínua) dispersas em uma fase contínua.

Por esta razão, o adjetivo microheterogêneo confere uma descrição apropriada da maioria dos sistemas coloidais.

Na área de desenvolvimento médico-farmacêutica, a estabilidade coloidal é um fator sempre buscado, principalmente no tocante aos métodos de preparação dos sistemas de liberação controlada, que determinam a viabilidade das aplicações. Esta estabilidade pode ser entendida quando se estuda as forças de interação entre as partículas no meio de dispersão¹⁸. Estes efeitos podem ser resumidos como:

1. Efeitos eletrostáticos: originados de grupos ionizados na superfície. Usualmente são forças repulsivas e dependem da concentração de eletrólito;
2. Efeitos estéricos: referem-se à geometria e conformação das moléculas adsorvidas ou ligadas à superfície. Podem também incluir efeitos de carga, quando se tratar de polieletrólitos. Podem ser repulsivas ou atrativas e dependem da temperatura e da concentração de eletrólito;
3. Efeitos atrativos: relativo às forças de dispersão devidas à densidade e polarizabilidade das moléculas constituintes da partícula, diferente das moléculas do meio;
4. Efeitos de solvatação: originados da organização das moléculas de solvente e constituintes do “bulk” (volume estendido, interior da fase), próximos à interface.

Forças de van der Waals são ubíquas e devem ser balanceadas por interações estéricas ou repulsivas para se atingir o grau desejado de estabilidade coloidal¹⁹. No caso de partículas de polímeros biodegradáveis que são neutras e por isso floculam quando suspensas em água, as saídas para se regular a estabilização podem ser muito curiosas: a adição de uma fração de volume de nanopartículas carregadas promove estabilização. Medidas do potencial zeta mostraram que as microesferas exibiram uma carga efetiva na presença das espécies carregadas, porém, análises de refletometria indicaram a não adsorção das espécies carregadas

na superfície das microesferas. Neste caso as nanopartículas carregadas segregam as regiões próximas às microesferas, por ter forte repulsão coulômbica entre elas.

É importante neste momento definirmos alguns termos relacionados a micro/nanoencapsulação. Segundo a IUPAC (The International Union of Pure and Applied Chemistry) uma esfera polimérica (termo “polymer bead”, comumente encontrado) está na faixa de diâmetro (evitar o uso de “tamanho”) de 0,1 a poucos milímetros. Na faixa de 0,1 a 100 μm serão chamadas micropartículas poliméricas (não tem forma definida) e microesferas poliméricas (têm forma esférica). Na escala nanométrica, valem as definições análogas: nanopartícula polimérica não tem forma definida enquanto nanoesfera tem forma esférica e o diâmetro para classificação é de poucas unidades a centenas de nm)²⁰.

Para se definir o termo cápsula, temos que recorrer ao conceito de multicomponente, que se refere a uma partícula não homogênea quanto à composição química (por causa de incompatibilidade entre os domínios dos polímeros componentes ou da presença de fluidos insolúveis, líquidos ou gasosos). Estes sistemas multicomponentes dão origem à partícula do tipo “caroço-casca” (“core-shell”), compreendendo pelo menos dois domínios: o núcleo individualizado rodeado por uma “casca” composta pelo outro domínio. Portanto micro e nanocápsulas são partículas do tipo caroço-casca, na mesma ordem de grandeza considerada para as esferas²¹.

O termo micro/nanopartículas aplicado à liberação controlada de fármacos freqüentemente refere-se a dois tipos de estruturas diferentes, micro/nanoesferas e micro/nanocápsulas. Na definição clássica, denominam-se esferas aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica. Desta forma obtém-se um sistema “monolítico” onde não é possível identificar um núcleo diferenciado (na realidade, este sistema

mostra microheterogeneidade de composição química e também a presença de descontinuidades nestes monolitos). Micro/nanocápsulas, ao contrário, constituem sistemas do tipo reservatório, onde é possível identificar-se um núcleo diferenciado, que pode ser sólido, líquido ou gasoso. Neste caso, a substância encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleos do meio externo.

Nas diferentes áreas de aplicação das micro e nanopartículas, muitas vezes as terminologias são inconsistentes e freqüentemente são intercambiadas erroneamente, confundindo o leitor. A noção de fases com domínios diferentes e a importância do tamanho destes domínios não pode ser negligenciada: por exemplo, classicamente se considera como microesferas sistemas homogêneos que se formam de uma mistura entre polímero e fármaco (mas de fato são microheterogêneos, o que foi evidenciado em nossos resultados, como veremos adiante).

Micro/nanocápsulas têm pelo menos um subdomínio discreto contendo um ativo, mas quando este subdomínio torna-se progressivamente menor, as cápsulas tornam-se esferas, mas ainda heterogêneas, conforme ilustrado na **Figura 3**.

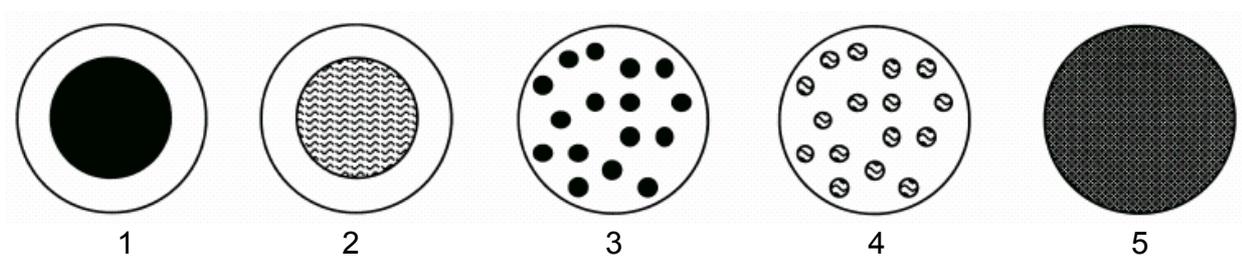


Figura 3: De 1 (natureza caroço-casca) para 5 (esfera), passando por 2,3,4 (graus crescentes de subdivisão dos domínios)¹⁸.

Em uma série de TV dos anos 70 e também no livro intitulado “Connections”, James Burke descreveu interações complexas na história da tecnologia que levou a invenções e progressos, freqüentemente por caminhos não antecipados entre si ²². A ciência aplicada à micro/nanoencapsulação constitui um dos exemplos de como a utilização de uma tecnologia em determinado campo pode se inter-relacionar com outras, aparentemente distantes: os primeiros registros de tentativas de aplicação desta idéia datam dos anos 30, mas o primeiro produto com material microencapsulado só surgiu em 1954. A empresa norte-americana *National Cash Register* foi a pioneira ao comercializar um papel de cópia sem carbono (“no carbon required”). Este papel recebia uma fina camada de microcápsulas (menores que 20 µm) contendo uma tinta sem cor. Tal camada era recoberta com um reagente também incolor. A pressão da ponta do lápis sobre a superfície do papel rompia as microcápsulas, liberando a tinta incolor que, ao entrar em contato com o reagente, tornava-se colorida, produzindo uma outra folha com cópia idêntica ao que estava sendo escrito no primeiro papel²³.

As pesquisas em torno da microencapsulação foram embasadas pelo trabalho de Würster, por volta de 1950, com o processo patenteado de encapsulamento de finas partículas sólidas em leito fluidizado²⁴. Em seguida vieram os processos de coacervação, (inicialmente para encapsulamento de líquidos e tempos mais tarde como técnica preparativa de micro e nanopartículas), implantes (primeiramente introduzidos nos anos 70) e aplicações transdérmicas (1980).

Ao longo do tempo, na grande maioria dos trabalhos, os sistemas que se mostraram particularmente interessantes foram nanopartículas de polímeros biodegradáveis. Tratava-se de sistemas em que o direcionamento do fármaco a sítios-alvo específicos do organismo eram claramente identificáveis, sendo também bastante estáveis e, dependendo de modificações, não sendo reconhecidos por macrófagos do sistema reticuloendotelial de defesa. Hoje em dia é um sistema

adequado para se investigar o comportamento de carregadores coloidais em organismos vivos, estritamente ligados à liberação controlada de fármacos.

Para a preparação de micro e nanoesferas^{25,26} de polímeros biodegradáveis é importante escolher um processo de encapsulação apropriado, que preencha alguns requerimentos:

1. Manutenção da estabilidade química e atividade biológica durante e após o processo de encapsulação;
2. Melhor eficiência de encapsulamento e rendimento possíveis;
3. Faixa de diâmetro compatível com a via de administração;
4. A formulação deve ter pequena distribuição no diâmetro das partículas e ser facilmente resuspendida em água.

Há um grande número de técnicas disponíveis para encapsulação de ativos, como o método de emulsificação e evaporação de solvente, *spray drying*, coacervação, polimerização interfacial e *in situ*. Cada método tem sua vantagem e desvantagem e a escolha depende do polímero, do ativo, do local de ação e da duração da terapia. O método de “nanoprecipitação” para nanoesferas será discutido na sessão 4.2.1 em detalhe. Vamos abordar aqui outras técnicas representativas e veremos que a característica comum de todas elas é a de separação de pelo menos duas fases, induzida externamente.

Emulsificação e evaporação de solvente. Emulsões simples óleo/água foram usadas primeiramente para encapsular drogas hidrofóbicas. O polímero é dissolvido em solvente orgânico volátil imiscível em água, juntamente com o ativo, que pode ser dissolvido ou suspenso. A mistura resultante é emulsificada em um grande volume de água, na presença de um surfatante (**Figura 4**). O solvente é removido da emulsão por evaporação, resultando na formação de partículas, cuja morfologia final é afetada pela taxa de evaporação deste solvente. Este método é

adequado apenas para encapsular compostos hidrofóbicos, pois os hidrofílicos particionam para a água, resultando em baixa eficiência de encapsulação. Uma alternativa para encapsular compostos hidrofílicos é a emulsificação óleo/óleo: dissolve-se o polímero e o ativo em um solvente orgânico miscível em água e utiliza-se um óleo como fase contínua da emulsão. As micropartículas são obtidas por remoção do solvente. Uma outra variante é a dupla emulsão, em que a maioria dos ativos hidrofílicos têm sido encapsuladas, em métodos água/óleo/água²⁷. Dissolve-se o ativo em água e o polímero em solvente orgânico e emulsifica-se sob ultrassom (emulsão água/óleo). Esta emulsão primária é transferida a um volume maior de água contendo surfatante, formando a emulsão água/óleo/água. As características das microesferas preparadas por esta variante do método são dependentes da propriedade do polímero (como composição e massa molar), a razão polímero/fármaco, a concentração do surfatante, temperatura e agitação²⁸.

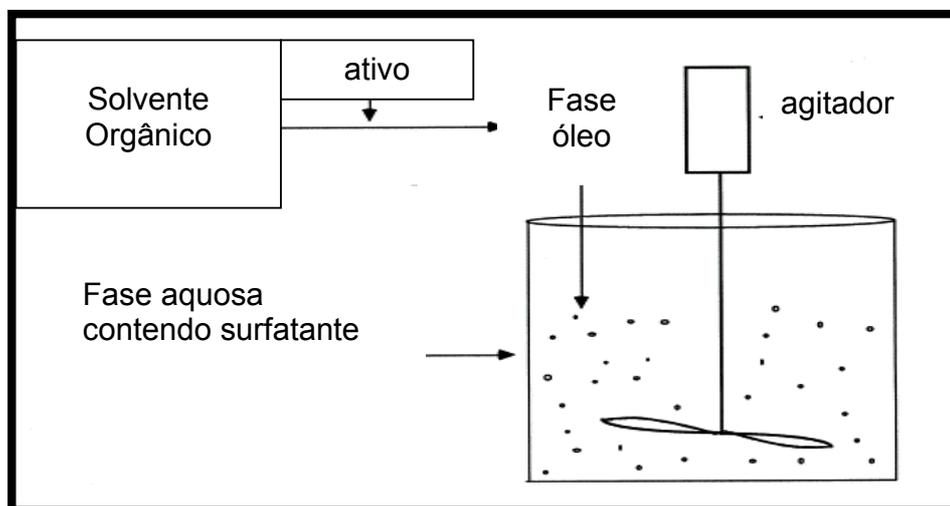


Figura 4: Representação do método de emulsificação e evaporação de solvente²⁷.

São necessárias modificações deste método para se obter nanopartículas. Por exemplo, no método de emulsificação e difusão de solvente ²⁹, usa-se uma mistura binária de solventes orgânicos, sendo um deles miscível em água. Esta mistura poderia ser constituída por acetona e diclorometano. Neste caso, acetona rapidamente difunde da gota de emulsão, levando ao colapso das cadeias poliméricas. (**Figura 5**).

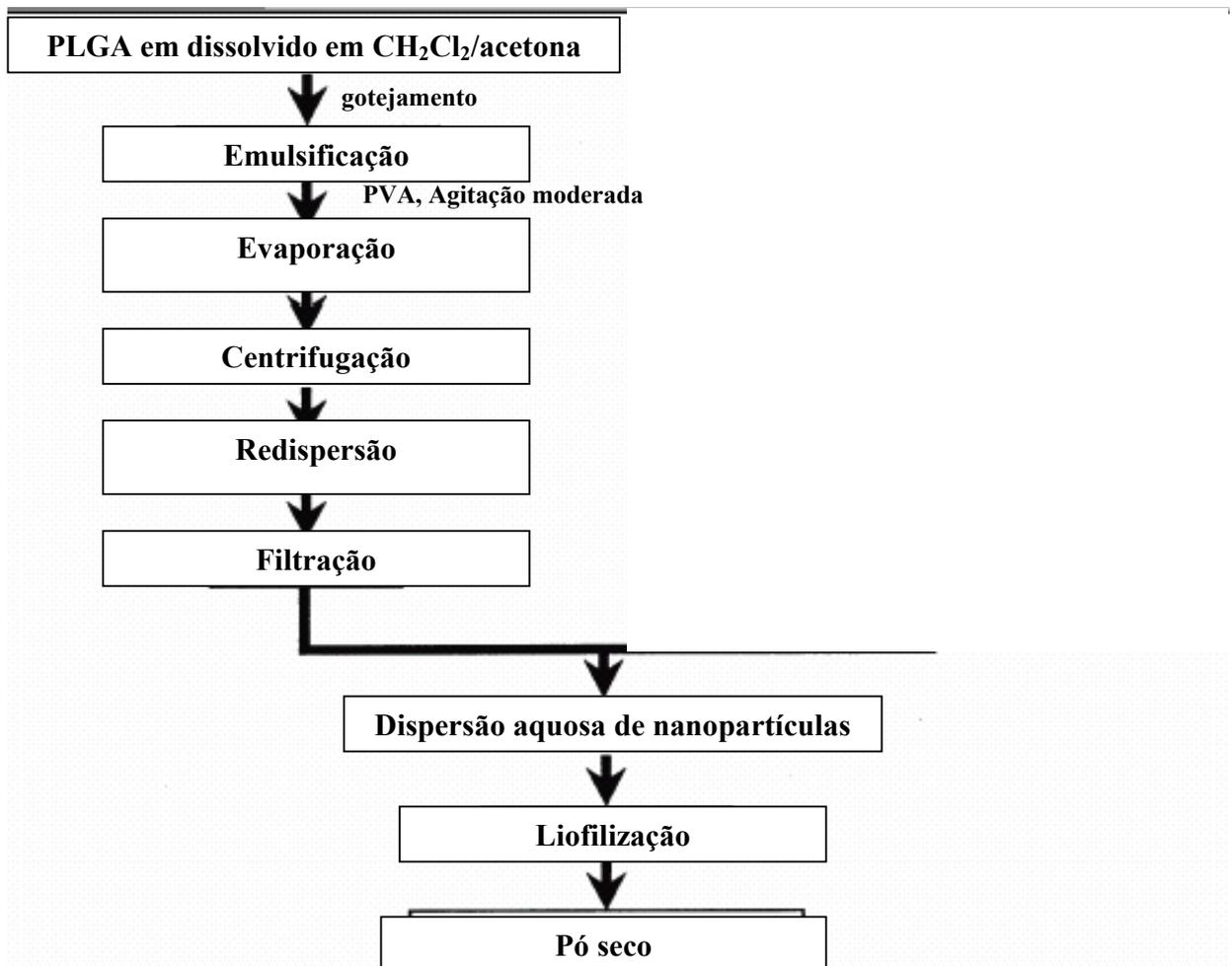


Figura 5: Representação do Método da emulsificação e difusão do solvente²⁸.

Uma variante seria a mistura binária de solventes miscíveis, como etanol e acetona, formando uma “quasi-emulsão” ³⁰, como mostrado na **Figura 6**.

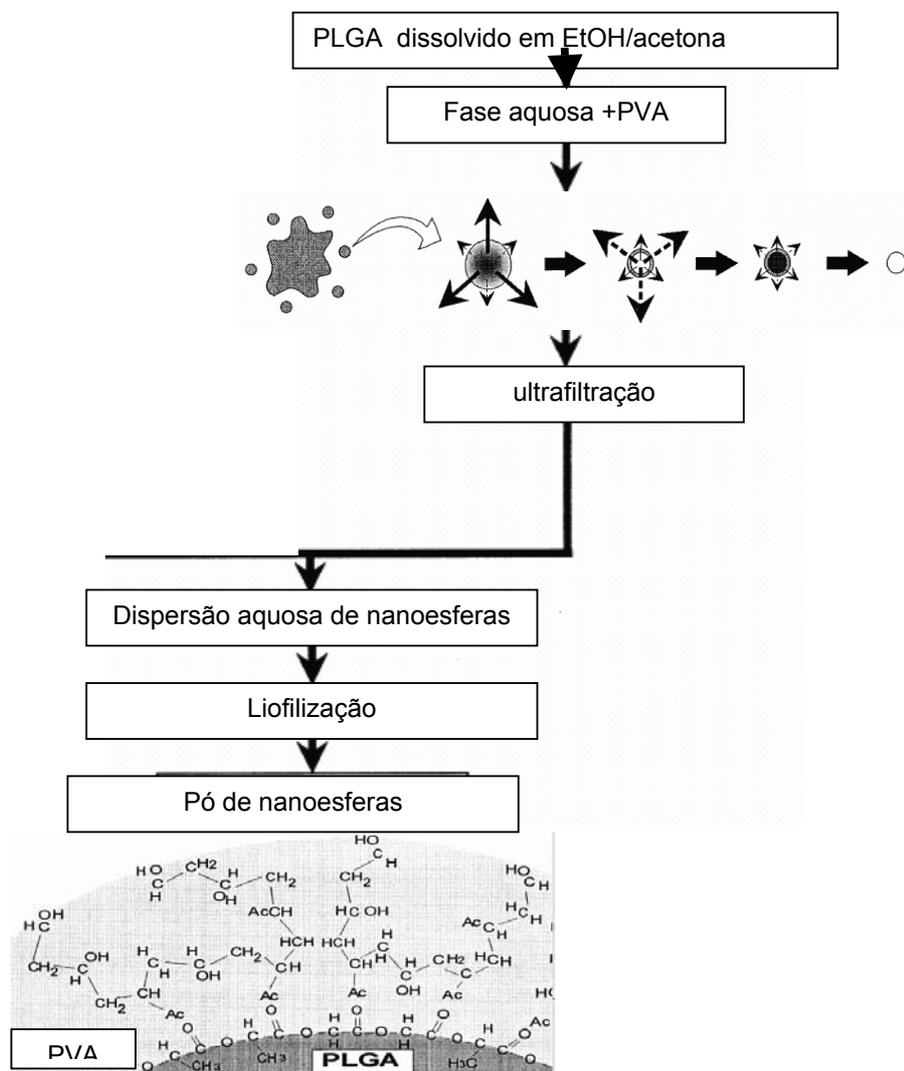


Figura 6: Sistema formando uma quasi-emulsão para preparação de nanoesferas²⁹.

Separação de fase. Este método trata da separação de fases de uma solução de um polímero por adição de um não-solvente. A droga é primeiro dispersa ou dissolvida na solução de polímero previamente preparada. O não solvente é adicionado em seguida (normalmente óleo de silicona, óleo vegetal ou parafina líquida), sob

agitação. No caso de coacervação, o não solvente causa a “precipitação do polímero” (na realidade, é uma separação de fases líquido-líquido, em que o polímero é segregado para uma das fases (dita rica em colóide) e a outra fase fica pobre em colóide. Estes processos de coacervação podem ser divididos em simples (por mudança no pH, força iônica, temperatura) ou complexos (complexação entre dois polieletrólitos de carga oposta). A taxa de adição do não-solvente é importante. A fase de coacervado é mais contraída por adição de outro não-solvente. Este método forma muitos agregados e não é muito utilizado³¹.

Secagem em spray (“spray-drying”). Comparada com outras técnicas, o “spray-drying” oferece a vantagem de ser menos dependente da solubilidade da droga e a possibilidade de alternativas para se melhorar a qualidade dos pós. Nesta técnica o ativo e o polímero são dissolvidos (ou a droga é dispersa na solução de polímero) em solventes voláteis como diclorometano ou acetona. O excesso de solvente é evaporado em rotoevaporador e a dispersão resultante é nebulizada em uma corrente de ar aquecido. O tamanho é determinado dependendo das condições de atomização. Isto é feito em uma câmara de evaporação, causando a rápida solidificação das gotículas atomizadas originando as partículas. Existem desvantagens desta técnica, como a perda de rendimento devido à adesão na torre de secagem, além de maior adesão capilar. A dupla injeção do spray pode diminuir a coalescência, sendo polímero/ativo nebulizado de um lado e solução aquosa de manitol de outro, cobrindo as partículas³².

Com esta técnica, um método de preparação muito interessante foi patenteado no Brasil³³. Trata-se da aplicação da técnica de “Spray Drying” envolvendo a adição de partículas de SiO₂ antes da secagem, na preparação de nanocápsulas ou nanoesferas para encapsulação de diclofenaco. Com isto se consegue maior estabilidade da dispersão, melhor distribuição do tamanho das

partículas, e uma viabilidade industrial para a produção das nanopartículas, evitando-se o processo de liofilização, que é mais caro.

Existem também métodos de polimerização *in situ* como por exemplo, a copolimerização interfacial³⁴, que ocorre na interface pelo contato entre os monômeros em água, formando nanocápsulas, conforme ilustrado na **Figura 7**.

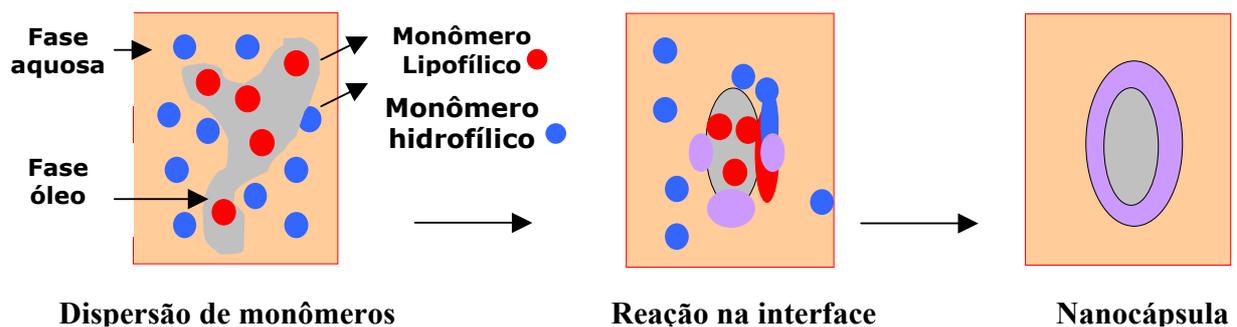


Figura 7: Método de copolimerização interfacial para se preparar nanocápsulas.

Recentemente, um novo método³⁵ para se preparar microcápsulas baseado também na polimerização interfacial foi desenvolvido (**Figura 8**). Dois diferentes tipos de gota (solução de polímero e solução de fármaco, de mais alta e mais baixa tensão superficial, respectivamente) são fabricadas separadamente através de um duplo microdispersador com dois bicos injetores. As gotas colidem e após a colisão o núcleo (solução do fármaco) permanece esférico devido à alta tensão superficial, enquanto que a solução polimérica espalha sobre o núcleo contendo fármaco. A microcápsula é formada devido à separação de fases interfacial e transferência de massa entre os solventes.

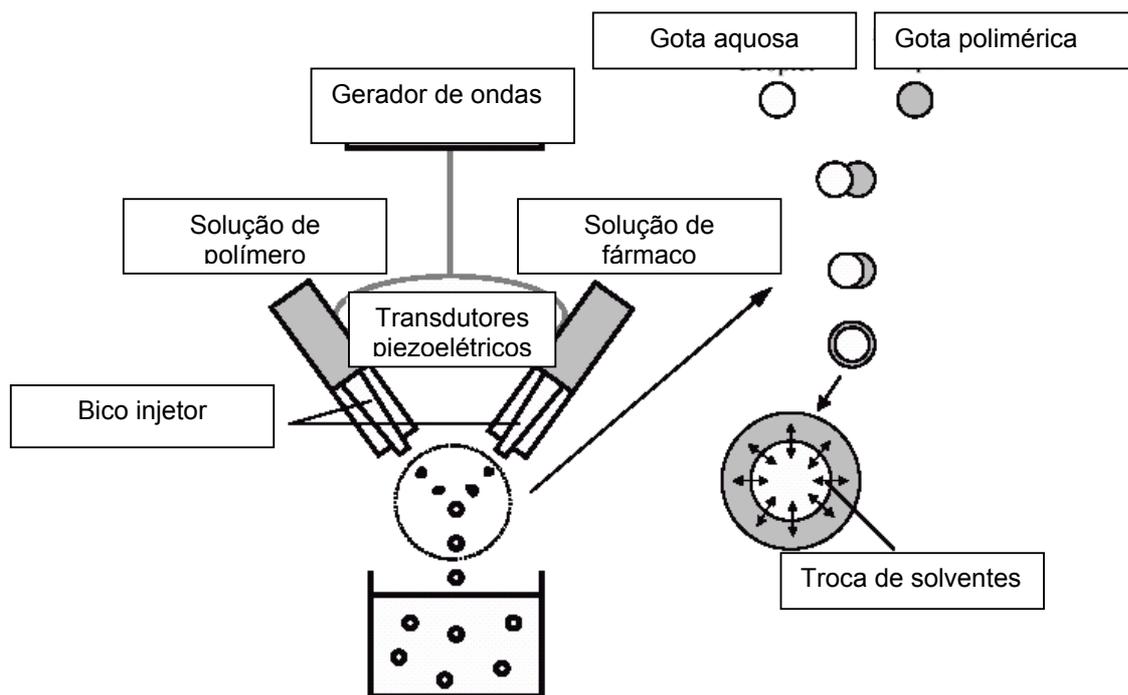


Figura 8: Um novo método de polimerização interfacial³⁵.

Métodos modernos também envolvem a formação de nanopartículas a partir de fluidos supercríticos, em emulsões do tipo H_2O/CO_2 supercrítico, conforme ilustrado na **Figura 9** (neste caso, não é qualquer surfatante que pode se utilizado, pois deve ter boa solubilidade em CO_2 , com fracas forças de dispersão das cadeias, como por exemplo, um perfluorpoliéter)³⁶.

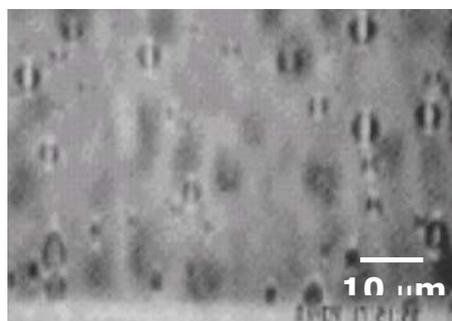


Figura 9: Imagem de emulsão supercrítica, formada por H_2O/CO_2 supercrítico³⁶.

1.1.3. Os materiais utilizados: polímeros biodegradáveis

Sistemas poliméricos de liberação de drogas são largamente utilizados e não só permitem uma liberação lenta e gradual do ingrediente ativo, como também podem possibilitar o direcionamento a alvos específicos do organismo a ser tratado, como um sítio de inflamação e tumor. Sejam sintéticos ou naturais, estes polímeros podem ser hidrolisados, resultando em compostos biocompatíveis.

Se a matriz polimérica não é degradada na biofase, dependendo da aplicação ela deve ser removida cirurgicamente, implicando em um alto custo e incômodo para o paciente. Já existiam registros, no passado, de sistemas alternativos para administração de vacinas³⁷. Foi demonstrado que a produção de anticorpos em camundongos imunizados com uma única dose de um antígeno contido numa matriz polimérica não degradável, mantinha-se por mais de seis meses em níveis comparados aos dos camundongos imunizados por duas vezes com o mesmo antígeno. Entretanto, a aplicação desta estratégia suscitou a preocupação sobre os possíveis efeitos adversos que a presença deste material no organismo poderia ocasionar, criando-se, desta forma, a necessidade de remoção cirúrgica do implante, após a liberação do antígeno. Neste sentido, a síntese de polímeros biodegradáveis contribuiu para a melhoria destes sistemas, visto que eles não requerem remoção cirúrgica e apresentam poucos efeitos colaterais.

Matrizes poliméricas biodegradáveis²⁵ já são biocompatíveis e degradáveis, isto é degradam *in vivo* em fragmentos menores que podem ser excretados. Estes produtos de degradação não são tóxicos, e não devem provocar nenhuma resposta inflamatória. Outra característica importante é a degradação ocorrer em um razoável período de tempo, requerido pela aplicação.

É importante se fazer aqui uma distinção entre alguns termos aplicados a esta classe de polímeros. Muitos materiais utilizados em aplicações biomédicas são ditos *biocompatíveis*. No caso de implantes, biocompatível significa que o polímero, após implantado, torna-se isolado dos tecidos do corpo por uma encapsulação natural de colágeno. Portanto, eles são realmente rejeitados mas não induzem a um efeito danoso, graças ao biofilme gerado em sua superfície. Entretanto, existem os polímeros biologicamente degradáveis, que tendem a se fragmentar em unidades menores. Dois tipos de materiais podem ser incluídos neste caso: os biodegradáveis e os bioabsorvíveis. Estritamente falando, polímeros biodegradáveis são aqueles que degradam em fragmentos menores devido à ação de enzimas no organismo, enquanto que o termo bioabsorvível refere-se a polímeros menos estáveis à presença de água.

Alguns exemplos de polímeros biodegradáveis usados na preparação de micro e nanoesferas incluem poliésteres, polianidridos, poli(ortoésteres), polifosfazanas e polissacarídeos. A **Figura 10** mostra a estrutura química de vários destes polímeros.

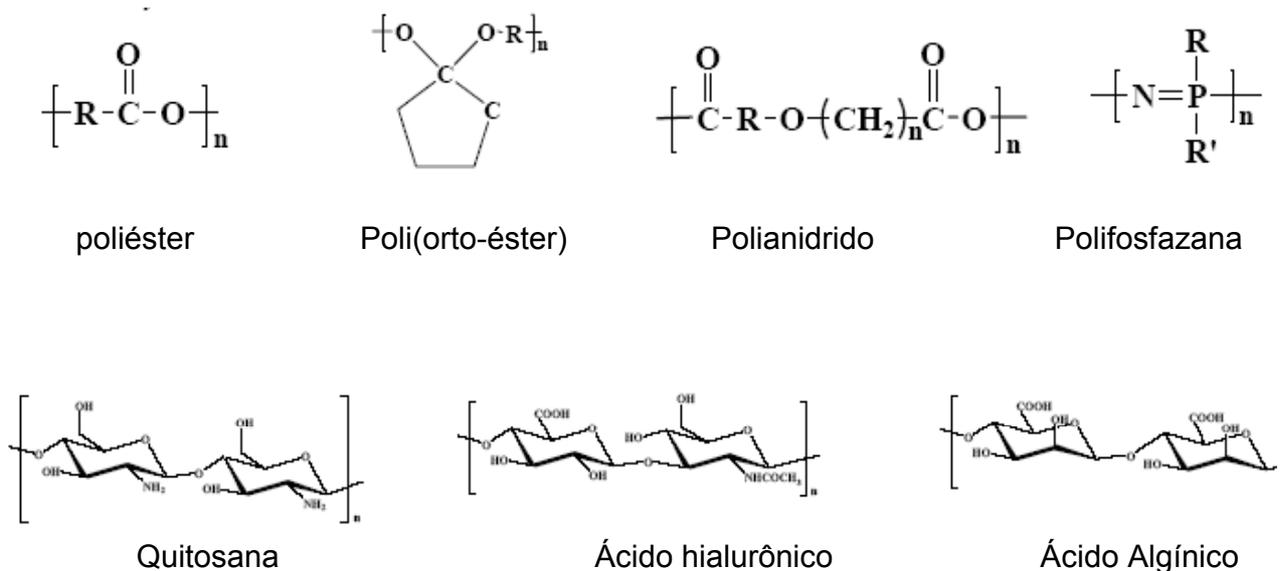


Figure 10: Estrutura química de vários polímeros biodegradáveis²⁵.

Poliésteres alifáticos atraem interesse significativo como veículos carregadores devido à biocompatibilidade e biodegradabilidade. Esta classe de polímeros degrada via quebra da ligação éster da cadeia. A estrutura química dos poliésteres mais representativos está mostrada na **Figura 11**.

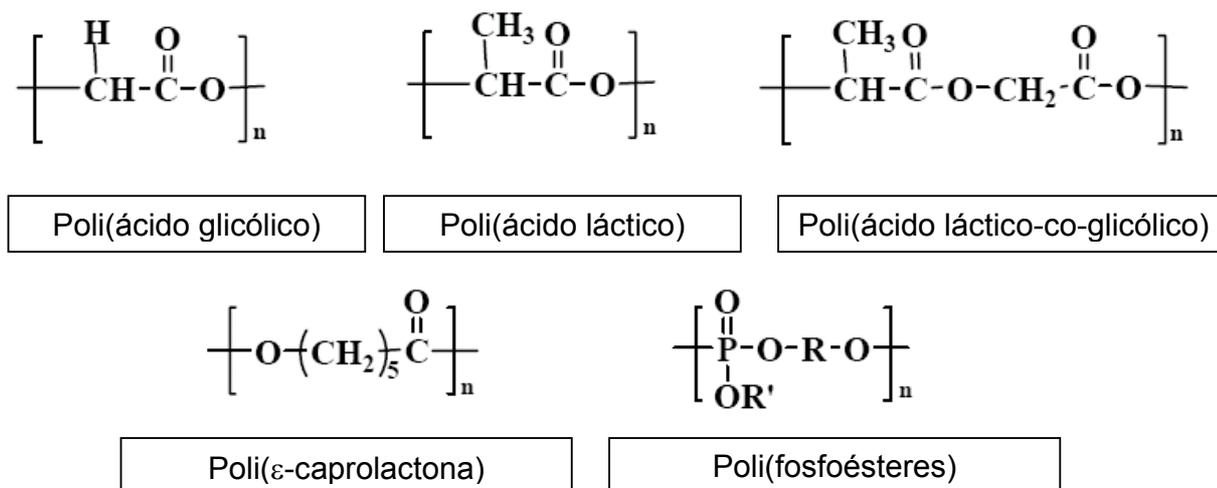


Figura 11: Estrutura química dos principais poliésteres utilizados em sistemas de liberação de fármacos²⁵.

Copolímeros de poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) são os mais empregados devido à sua biocompatibilidade, aprovação legalizada do uso e porque a taxa de degradação e as propriedades mecânicas podem ser moduladas, por variar a razão lactídeo/glicolídeo e por alterar a massa molar. Estes polímeros são quebrados em ácidos láctico e glicólico, os quais são facilmente eliminados na forma de CO₂ e água. A taxa em que ocorre a degradação é crítica para determinar o perfil de liberação de um ativo e depende do grau de cristalinidade, hidrofobicidade e massa molar³⁸. Em geral, PLGA rico em unidades glicólicas

(acima de 70%) são amorfos e degradam mais rapidamente. Por outro lado, quando se tem uma diminuição na massa molar do polímero, a degradação é mais acentuada devido ao aumento no número de grupos carboxílicos de final de cadeia, acelerando a catálise ácida. A massa molar e a distribuição de massa molar também exercem influência na taxa de degradação do polímero. Uma larga distribuição de massas molares pode levar a um número grande de grupos carboxílicos de final de cadeia, favorecendo a degradação auto-catalítica. Durante a degradação da partícula, a matriz polimérica sofre quebras ramdomicas preservando a conformação até que 90% tenha sido degradado.

Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero semicristalino biodegradável de baixa temperatura de transição vítrea (60 °C), também bastante utilizado no encapsulamento de drogas. Devido à sua cristalinidade e hidrofobicidade, a degradação *in vitro* de PCL é mais lenta, fazendo com que seja um polímero adequado para dispositivos que exijam longos períodos de liberação ou mesmo modular a liberação na forma de blendas compatíveis com outros polímeros³⁹. Os dispositivos a base de PCL mantêm sua forma durante a fase inicial de biodegradação, onde a massa molar decresce severamente por conta da hidólise das ligações éster no *bulk*. Em uma segunda fase, continua a diminuição de massa molar e os produtos de clivagem são pequenos o suficiente para difundir para fora da matriz e a taxa de hidrólise vai decrescendo nesta segunda fase, devido a um aumento na cristalinidade.

Os outros polímeros, como os poli(fosfoésteres) degradam via hidrólise levando à clivagem de ligações fosfato no esqueleto, não gerando ambientes ácidos. A taxa desta degradação é controlada pelo conteúdo de fosfato (é maior em concentração alta de fosfato). Já os poli(ortoésteres) não degradam homogeneamente ao longo da matriz como os poliésteres, mas sofrem erosão de

superfície pela alta hidrofobicidade e impermeabilidade à água. Este fato conduz a uma liberação mais lenta e evita o “burst” (liberação inicial brusca) inicial⁴⁰.

Polianidridos já são bastante hidrofóbicos, com grupos anidrido susceptíveis à hidrólise, com erosão localizada preferencialmente na superfície, pois depende da taxa de entrada de água (que por sua vez é determinada pela hidrofobicidade e cristalinidade). Mostram mínima reação inflamatória *in vivo* e os produtos de degradação são ácidos monoméricos, não mutagênicos e não tóxicos.

Polifosfazanas são uma classe interessante de polímeros biodegradáveis. Eles são sintetizados como polímeros lineares, compostos por um esqueleto inorgânico com átomos de fósforo e nitrogênio e seu método de síntese é conhecido desde 1965, com o poli(diclorofosfazana)⁴¹. Quando expostos a um ambiente aquoso estes polímeros são clivados em compostos não tóxicos de baixo peso molecular como fosfatos e amônia.

Entre os polímeros naturais, destaca-se a quitosana, composta primariamente de 2-amino-2-deoxi- β -D-glucopiranosose é obtida da quitina, o segundo mais abundante polissacarídeo natural, e tem mostrado excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa imunogenicidade⁴².

Um exemplo de preparação de polímeros biodegradáveis sintéticos é o caso de copolímeros-bloco compostos de PEO-PPO-PEO (Pluronic, um copolímero-bloco relativamente hidrofílico) e poli(epsilon-caprolactona) (hidrofóbico) obtido a partir da abertura de anel de epsilon-caprolactona na presença de PEO-PPO-PEO e catalisador octanoato estanhoso⁴³, conforme esquematizado na **Figura 12**.

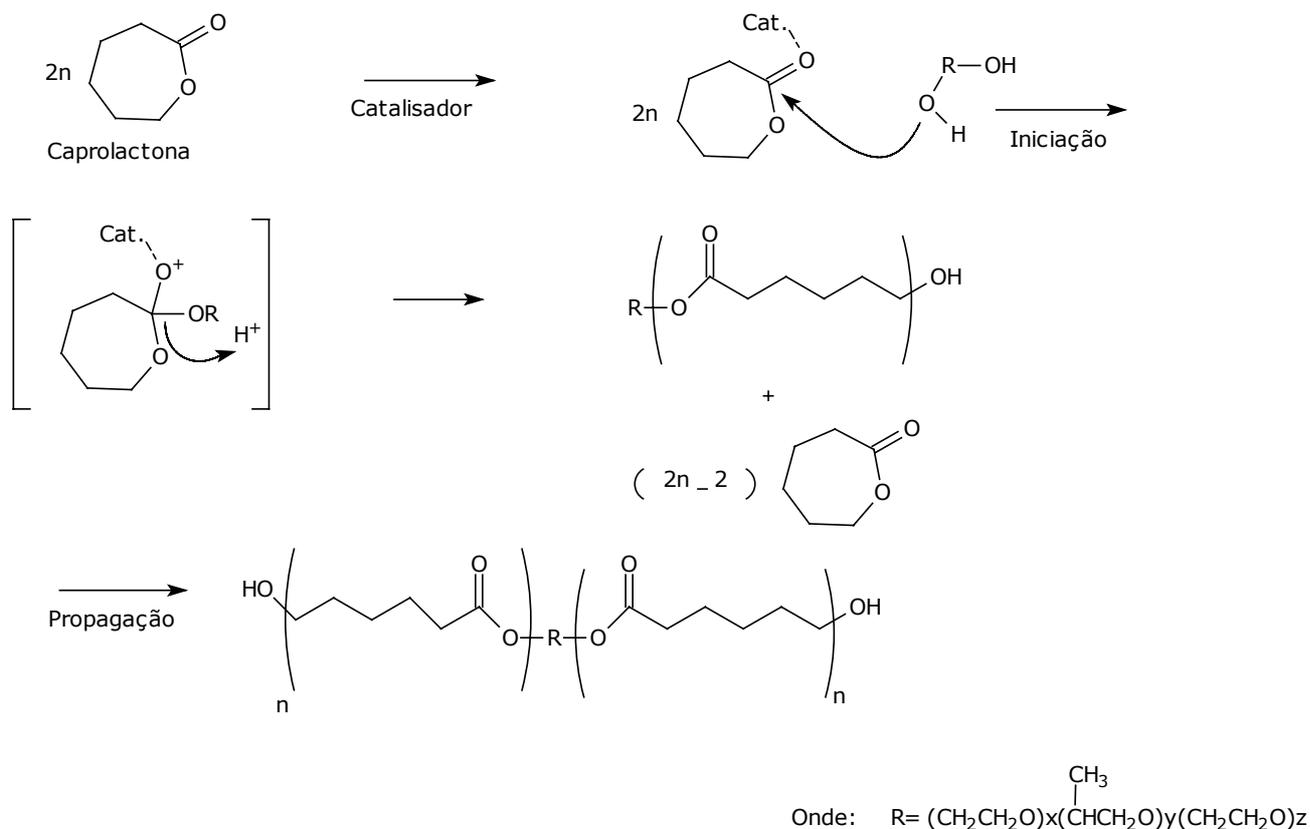


Figura 12: Etapas da preparação de copolímeros-bloco compostos de PEO-PPO-PEO (relativamente hidrofílico) e poli(ϵ -caprolactona) (hidrofóbico)⁴³.

Os polímeros hidrofílicos, ou que possuem heteroátomos na cadeia, que são amorfos e que tem menor massa molar são mais facilmente degradados que polímeros hidrofóbicos, com predominância de ligações C-C, cristalinos e de mais alta massa molar. É geralmente considerado que o mecanismo de degradação de micro e nanoesferas de poliésteres alifáticos é hidrolítico. Estudos *in vitro* e *in vivo* com microesferas de PLGA demonstraram que a degradação é dependente da escala de tamanho do dispositivo⁴⁴, sendo heterogênea nas microesferas maiores que 300 μm e homogênea nas menores (comparando-se a extensão da erosão entre núcleo e superfície da partícula). Foi demonstrado também que a taxa de

degradação depende da proporção entre os domínios amorfos e cristalinos, sendo que para poliésteres semicristalinos a degradação ocorre primeiro nas regiões amorfas e depois nas cristalinas. Durante a degradação a cristalinidade gradualmente aumenta, devido a uma maior mobilidade das cadeias após a hidrólise, que permite um rearranjo e realinhamento⁴⁵.

Partículas de polímeros biodegradáveis apresentam sempre algum grau de porosidade, outro fator importante na biodegradação. Trabalhos da literatura já compararam microesferas de PLGA 75:25, mais porosas, com outras confeccionadas com PLGA 74:26, menos porosas. As primeiras degradaram em 3 semanas, enquanto que as outras em 20 semanas. A porosidade também aumenta a difusão de oligômeros e produtos de baixa massa molar advindos da hidrólise⁴⁵.

1.1.4. Aplicações na área médica e farmacêutica

A entrega de um fármaco à biofase envolve quatro etapas⁴⁶:

1. **fase farmacêutica** (propriedades físico-químicas do ingrediente ativo, síntese e *design* das formulações);
2. **fase farmacocinética** (destino do fármaco, que envolve a liberação, absorção, distribuição, metabolismo e excreção, fazendo uso de modelos fisiológicos bem estabelecidos, com individualização dos regimes de dosagens);
3. **fase farmacodinâmica** (mecanismo de ação, verificado através da interação do ativo com tecidos e células envolvendo receptores específicos);
4. **fase terapêutica** (em que está contida a farmacologia clínica, avaliando os efeitos tóxicos e terapêuticos)

O fato novo e importante é o de que a chegada dos sistemas de liberação controlada levou a alterações significativas nestas etapas de administração, trazendo uma série de vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos. Trata-se de carregadores⁴⁷ coloidais como agregados micelares, géis, emulsões múltiplas e inversas, microemulsões, pontos quânticos, além de nano e micropartículas, ciclodextrinas e dendrímeros⁴⁸.

O campo conhecido como nanomedicina compreende, juntamente com o de novos materiais, a aplicação das ferramentas e dispositivos utilizados no estudo dos sistemas nanométricos em uma área altamente instigante e motivadora: medicina e cuidados sociais com a saúde e prevenção.

É instrutivo considerar brevemente os segmentos que compreendem este campo, que de fato tem sua origem na biologia estrutural. Estes são a biofarmacêutica, dispositivos e materiais para implantes e cuidados cirúrgicos e, de grande importância médica, as ferramentas para diagnóstico. Frequentemente estas áreas envolvem hoje aspectos da liberação de drogas a partir de materiais nanoestruturados e o uso de protocolos sofisticados na descoberta de novos ativos.

Materiais implantáveis seguros são utilizados em transplante de tecido, reparo ósseo e os tão chamados “materiais inteligentes”, como no uso de polímeros-suporte para o crescimento de uma população de células saudáveis. Um exemplo bastante recente é o tratamento da aplasia (ausência de desenvolvimento) das glândulas salivares. Esta é uma hipofunção conhecido como xerostomia (manifestação clínica conhecida como “boca seca”), que é grave e pode se apresentar com ausência quase completa de saliva, provocando muito desconforto (predisposição à cáries, halitose, inflamação e dor). Já é possível se pensar em glândulas salivares artificiais, semeando a linhagem epitelial de glândula salivar humana em poli(L-ácido lático), poli(ácido glicólico), e copolímeros. Amostras de polímeros com células e polímero sem células foram implantadas subcutaneamente

em ratos. Os implantes foram retirados com 2, 4 e 8 semanas para análise fenotípica e funcional. Surpreendentemente, células epiteliais de glândula salivar mostraram fenótipo típico, com formação de estruturas morfológicas muito próximas das da glândula salivar, além de recuperar características funcionais⁴⁹.

Outro avanço de grande destaque tecnológico e portador de benefícios para o paciente fica por conta das ferramentas diagnósticas. Neste campo as nanopartículas magnéticas desempenham um papel importante, como por exemplo, nas imagens de ressonância magnética. Vamos procurar definir, em linhas gerais, uma nanopartícula magnética e como se obtém uma imagem por ressonância magnética^{50,51,52}.

A susceptibilidade magnética é uma característica intrínseca de cada material e sua identidade está relacionada com a estrutura atômica e molecular. Os átomos têm momentos de dipolo magnético em virtude do movimento orbital dos respectivos elétrons. Além disso, cada elétron tem um momento de dipolo magnético intrínseco associado ao seu spin. O momento magnético de um átomo depende da disposição dos elétrons no seu interior. Um material pode produzir um campo magnético tanto porque está magnetizado, como porque conduz uma corrente de transporte de portadores de carga. Quando um material está na presença de um campo magnético, este é modificado por causa da magnetização resultante do momento de dipolo molecular. Esta magnetização pode ser puramente devido à interação do campo aplicado com a matéria, conforme ocorre com os materiais diamagnéticos e paramagnéticos ou pode já existir mesmo na ausência do campo externo, conforme ocorre com os materiais ferromagnéticos. O diamagnetismo ocorre em todos os materiais, pois todas as moléculas exibem um momento de dipolo magnético induzido e antiparalelo ao campo magnético aplicado em virtude da deformação da distribuição da corrente eletrônica. A sua magnetização tende a enfraquecer o campo externo. Geralmente o efeito

diamagnético nos materiais é mascarado pelo comportamento paramagnético e ferromagnético. O paramagnetismo resulta da tendência dos momentos magnéticos moleculares alinharem-se com o campo magnético aplicado, reforçando o campo aplicado⁵³. Em síntese, o elétron pode ser visto como uma partícula carregada girando em torno do próprio eixo (produzindo momento magnético intrínseco), enquanto que suas órbitas ao redor do núcleo produzem momento orbital. Estes dois tipos de momento magnético, quando observados em escalas macroscópicas, produzem a força de atração entre dois ímãs. Os momentos magnéticos de dois átomos vizinhos podem se alinhar de forma paralela (nos ferromagnetos) ou antiparalela (antiferromagnetos). Como eles são em grande número, tendem a reduzir a energia magnética gerada, formando diversos conjuntos de átomos (domínios magnéticos) em direções aleatórias, de forma que a soma dos momentos dos domínios seja essencialmente zero.

Porém, se as dimensões do material considerado são reduzidas drasticamente, até alguns nanômetros, estes domínios serão fundidos em um único, gerando o que se conhece como uma partícula monodomínio, a nanopartícula magnética. O momento de cada partícula perturba o das partículas vizinhas e em geral, esta interação atua no sentido de alinhar os momentos magnéticos, situação energética mais favorável. Estas definições estão ilustradas na **Figura 13**.

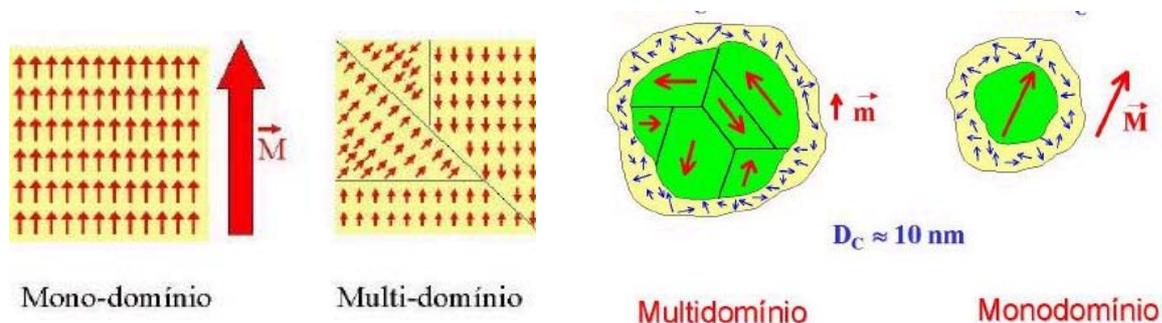


Figura 13: Domínios magnéticos: "bulk" (esquerda) e nanopartícula (direita)⁴⁹.

Para ser útil numa aplicação em que as partículas sejam dirigidas a alvos específicos, tem que ser possível fazer com que respondam a um campo externo. Este fato é conseguido através de energia térmica e oscilação, provocando desordenamento e fazendo com que o momento de uma partícula não “enxergue” a de outra e o coletivo de partículas responda ao campo externo.

Em 1945, a descoberta do momento nuclear magnético foi feita independentemente pelo suíço naturalizado americano Felix Bloch (1905-1983) e pelo americano Edward Mills Purcell (1912-). Esta descoberta lhes deu o prêmio Nobel em física de 1952. Em 1966, os trabalhos do suíço Richard R. Ernst (1933-) com a aplicação da modulação com sinais de rádio e o uso da transformada de Fourier no sinal da NMR (ressonância nuclear magnética) lhe garantiu o prêmio Nobel em química em 1991. Este desenvolvimento pode finalmente ser utilizado em 1973 por Damadian e Lauterbur na geração das primeiras imagens por MRI (Magnetic Resonance Imaging - Ressonância Nuclear Magnética). As vantagens da MRI são principalmente seu enorme contraste entre os vários órgãos, como veias, artérias, nervos e tumores, que não geram sombra nas radiografias.

Para se obter uma MRI, eletromagnetos poderosos criam um campo magnético da ordem de 30 000 vezes o terrestre, que causam o alinhamento dos prótons nos átomos de hidrogênio no corpo. Ondas de rádio, emitidas 25 vezes ou mais por segundo, desalinham temporariamente estes prótons. Quando o pulso de rádio é desligado, os prótons se re-alinham com o campo em alguns segundos, emitindo radiação hiperfina característica, que são detectadas, produzindo as imagens⁵⁴.

Outro exemplo interessante em terapêutica é a remoção de gliomas, como os gliomas nasais infantis apresentados na **Figura 14**. Gliomas nasais são tumores benignos raros, constituídos de tecido glial e astrócitos. São divididos

anatomicamente em extranasais (60%), intranasais (30%) e mistos (10%). A remoção cirúrgica era o único tratamento de escolha até recentemente, e era realizada no começo da infância, para prevenir efeitos deformantes do tumor sobre ossos da face e comprometimento respiratório por lesões intranasais. Deve ser lembrado que procedimentos cirúrgicos extensos neste caso devem ser evitados, devido à possibilidade de comunicação com a meninge. Outro fato importante é que ocorrem gliomas malignos, que são os tumores intracranianos de difícil detecção⁵⁵. Neste cenário a nanotecnologia apresenta uma melhoria em diagnóstico, que é o uso de nanopartículas magnéticas cobertas com poli(etilenoglicol), que se acumulam nos gliomas, servindo como um promotor de contraste, diagnosticando o tumor. As nanopartículas podem ser associadas a um peptídeo, clorotoxina, para melhor direcionamento a tumores intracranianos e tratamento nas fases iniciais da doença.⁵⁶

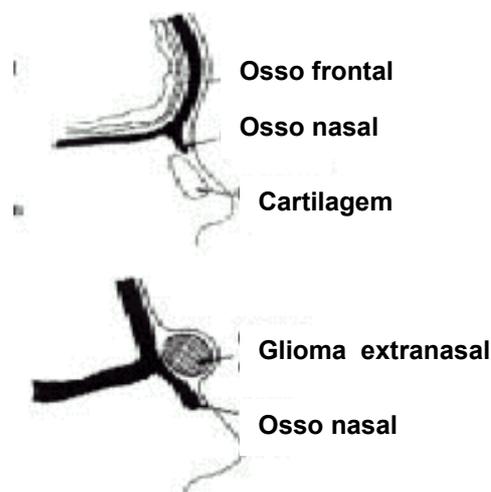


Figura 14: Diagramas mostrando o desenvolvimento embriológico dos gliomas nasais. Acima: fechamento normal dos ossos do crânio e face, abaixo: Corte mostrando um glioma extranasal.

1.2. A candidata à encapsulação: violaceína, um pigmento produzido pela *Chromobacterium violaceum*

Para os brasileiros, a *Chromobacterium violaceum* vem sendo motivo de orgulho devido à sua escolha como “bactéria-modelo” para dar partida ao Programa Genoma Brasileiro⁵⁷, patrocinado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia, através do Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. Na realidade esta bactéria já era estudada no Brasil há anos, pois a *Chromobacterium violaceum* foi isolada em 1976 quando uma amostra de água do Rio Negro foi analisada, revelando grandes quantidades da bactéria. A propriedade fotobiológica da violaceína foi proposta por Caldas quando estudos sobre a natureza da coloração do Rio Negro (AM - Brasil) foram realizados⁵⁸. Em seguida, o potencial terapêutico da violaceína foi investigado^{59,60}.

Historicamente, a *Chromobacterium violaceum* foi descoberta por volta do final do século 19 (Curzio Bergonzini identificou a bactéria em 1881)⁶¹ e vários metabólitos secundários (antibióticos, cianeto, proteases) entre eles um pigmento principal, a violaceína, teve sua estrutura química elucidada somente em 1960.

A violaceína é um derivado indólico caracterizado como 3-(1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona. A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria violeta-pigmentada, Gram-negativa, anaeróbica facultativa, em forma de bastonete, pertencente à família *Rhizobiaceae* e à ordem *Eubacteriales*⁶². Seu crescimento celular é induzido pela liberação extracelular de N-hexanoil-L-homoseril lactona, um mecanismo conhecido como “quorum sensing”⁶³. Trata-se de uma bactéria saprófita encontrada em águas e solos de regiões tropicais e subtropicais e é de grande importância científica e

tecnológica. A (**Figura 15**) mostra uma micrografia da bactéria, obtida por microscopia eletrônica de varredura e a estrutura da violaceína.

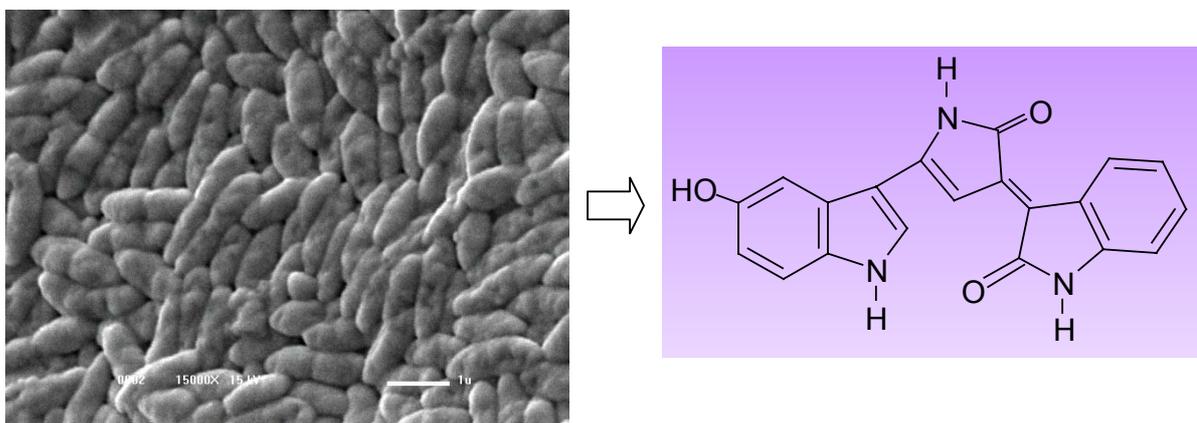


Figura 15: Aspecto morfológico da *Chromobacterium violaceum* e estrutura molecular da violaceína.

A partir do estabelecimento da cepa CCT 3496 da *Chromobacterium violaceum*, a produção, extração e purificação do pigmento foram padronizados⁶⁴. Diversos trabalhos atribuíram à violaceína diferentes atividades biológicas tais como bactericida⁶⁵, tripanocida⁶⁶, antiviral⁶⁷, antioxidante⁶⁰, antimicobacteriana⁶⁸, antiulcerogênica⁶⁹, antileishmania⁷⁰ e antitumoral^{71,72}.

No tocante a nosso interesse em tratamento de câncer, ensaios de determinação de citotoxicidade para diferentes marcadores celulares utilizando fibroblastos V 79 de pulmão de hamster chinês, mostraram um potencial citotóxico da violaceína, com valores de IC₅₀ (concentração inibitória responsável por 50% de morte celular) de 5-12 µmol L⁻¹. A investigação da capacidade da violaceína de induzir apoptose em cultura de células V 79 foi demonstrada⁷³.

A solubilidade reduzida da violaceína em soluções aquosas pode causar diminuição da sua atividade *in vivo*. Neste sentido, modificações das suas

propriedades físico-químicas foram inicialmente obtidas com a preparação de complexos de inclusão com β -ciclodextrina (β -CD), solubilizando a violaceína em água⁷⁴. Resultados preliminares obtidos em células de leucemia, linhagem HL 60, mostram o potencial da violaceína livre e complexada à β -CD como indutor de diferenciação celular e apoptose⁷⁵.

Neste contexto as partículas poliméricas surgiram como alternativa para carregar violaceína, permitindo uma liberação mais lenta ou uma diferente forma de apresentação, que previna sua decomposição e possibilite o direcionamento a possíveis alvos específicos na célula tumoral.

1.3. A cultura de células, os ensaios de citotoxicidade e os fenômenos de apoptose e necrose.

Uma cultura primária de células é aquela que deriva diretamente dos tecidos ou órgãos (ex. pele, rim, fígado). Estes devem ser obtidos em condições assépticas e levados ao laboratório rapidamente, imersos em meio de cultura, para manutenção da viabilidade celular. Ela é o ponto de partida para as chamadas linhas celulares, que resultam da seleção de culturas primárias. São clones capazes de sobreviver e de se multiplicar indefinidamente (por exemplo, por 50 gerações)⁷⁸.

A cultura de células *in vitro* pode ser usada para a avaliação basal da toxicidade e da toxicidade em órgãos-alvo. A citotoxicidade pode ser definida como a propriedade de ativação dos mecanismos de morte celular por um composto químico, ou por uma célula mediadora (célula T citotóxica). O termo citotoxicidade não indica um mecanismo de morte celular específico, pois, a citotoxicidade de um composto pode combinar aspectos de apoptose e necrose

(veremos mais adiante a distinção entre estes dois fenômenos de morte celular)⁷⁶. Estes testes *in vitro* são úteis na determinação da citotoxicidade basal, assim como no estabelecimento da faixa de concentração na qual o composto apresenta atividade.

O estabelecimento da concentração onde 50% de células são afetadas (IC₅₀) permite comparar quantitativamente a resposta de um mesmo composto em diferentes sistemas, ou de vários compostos em um único sistema⁷⁷. Em todos estes testes, as células são cultivadas em placas para culturas com várias concentrações da substância adicionadas ao meio de cultura. Este meio é composto por soro e nutrientes, fatores de crescimento, e antibióticos sob atmosfera adequada). Após um período de exposição à substância-teste, procedimentos de análise são desenvolvidas, com testes de citotoxicidade específicos.

Os alvos (“endpoints”) celulares dos testes de citotoxicidade são baseados, principalmente, na perda seletiva da permeabilidade celular, na redução da função mitocondrial e nas mudanças na morfologia e replicação celular. Cada tipo celular responde por meio de diversos mecanismos bioquímicos à presença de diferentes compostos. Algumas dessas respostas são comuns e podem ser utilizadas como marcadores precoces de citotoxicidade, dentre elas a perda das funções mitocondriais^{73,78}. Na seção **4.2.5** veremos detalhadamente cada um destes testes e a qual função metabólica da célula eles se referem.

A citotoxicidade pode combinar aspectos de necrose e apoptose, que são dois mecanismos distintos pelos quais a célula pode morrer. A necrose é a morte acidental, induzida por injúria química ou física.

A apoptose é a morte programada da célula. O termo é derivado do grego "apoptwsiz", e referia-se à queda das folhas das árvores no outono - um exemplo de morte fisiológica programada e também apropriada, pois implicava em renovação.

Vamos procurar distinguir estes dois fenômenos. A morte celular por necrose, em resposta à injúria severa às células, é caracterizada morfológicamente por inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular. Conseqüentemente, ocorre a geração de uma resposta inflamatória, que pode causar injúria e até morte de células vizinhas⁷⁹. O fenômeno de necrose está ilustrado na **Figura 16**.

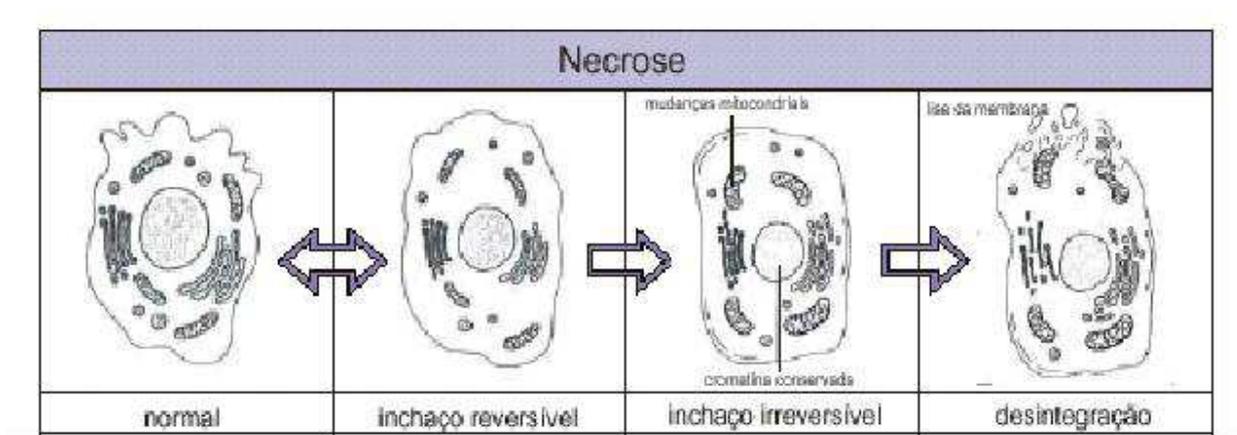


Figura 16: Etapas de um evento de necrose.

A apoptose, por outro lado, possui um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual e é importante em certas condições patológicas, incluindo o câncer. A morte celular por apoptose é morfológicamente caracterizada pelo encolhimento da célula e diminuição do contato entre células vizinhas, formação de vacúolos citoplasmáticos, fragmentação da membrana nuclear e condensação cromatínica, despolarização de membrana mitocondrial, fragmentação do DNA e alterações na assimetria de fosfolipídeos de membrana plasmática (**Figura 17**). Ela pode ser iniciada por diversos estímulos tais como hipotermia, estresse oxidativo e depleção de fatores de crescimento, em muitos tipos celulares⁸⁰. Hoje se sabe que falhas nos processos de regulação da proliferação celular levam a um crescimento

desordenado característico de células cancerosas, onde a proliferação é ativada enquanto a apoptose é inibida⁸¹.

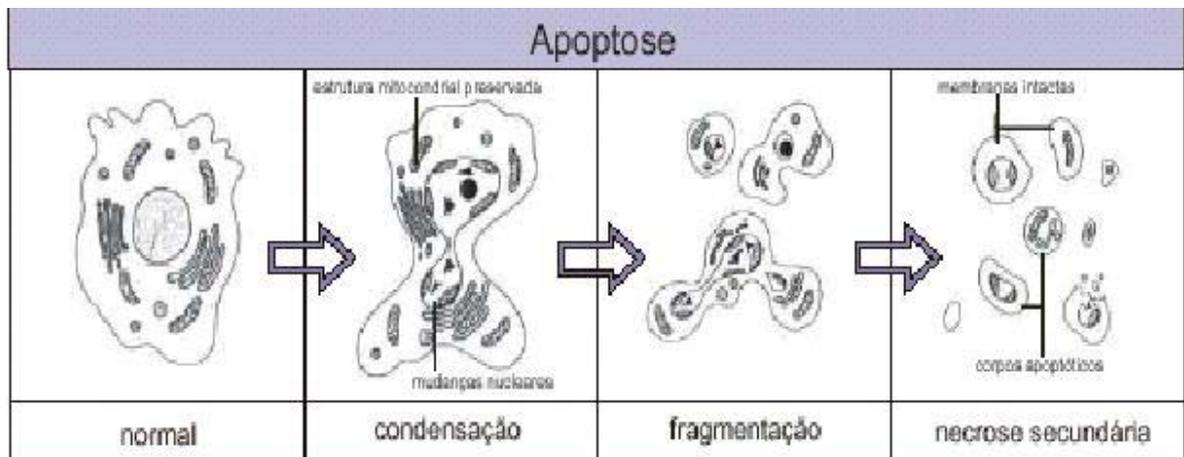


Figura 17: Etapas de um evento de apoptose.

A degradação do DNA via ativação de endonucleases e a desintegração nuclear originam os “corpos apoptóticos”, bem característicos do processo de apoptose⁸². Estes corpos apoptóticos são rapidamente retirados do tecido por macrófagos. O fato de culminar em corpos apoptóticos é devido a uma série de cisteíno proteases, chamadas caspases, que são ativadas especificamente em células em apoptose. Estas enzimas possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo e clivam substratos que possuem resíduos de ácido aspártico em sequências específicas. As alterações morfológicas são comuns a todas as células em apoptose explícita, independentemente do agente indutor do processo. Isso significa que a ação destas caspases representa uma via final comum que opera em todas as células programadas para morrer.

É importante para nós a sinalização apoptótica via mitocôndria, que passa pela ativação das caspases. A via mitocondrial é frequentemente ativada em resposta a danos no DNA, envolvendo a ativação de um membro pró-apoptótico

chamado Bcl-2, que regula a liberação de citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna (poros na membrana mitocondrial levam ao extravasamento do citocromo c para o citosol). Bcl-2 se associa com vários receptores de morte (como o fator de necrose tumoral, TNF) forma o apoptossomo. Caspases subsequentes são ativadas, culminando na clivagem de substratos específicos e morte celular por apoptose. Agentes quimioterapêuticos ativam predominantemente a via mitocondrial, com envolvimento de alterações de permeabilidade de membrana mitocondrial e liberação do citocromo c para o citosol.

Portanto, estudos *in vitro* fornecem importantes ferramentas para ampliar os conhecimentos sobre os efeitos citotóxicos causados por agentes químicos e para estimar estes efeitos em humanos⁸³. Além disso, conforme descrito na literatura⁸⁴ a toxicidade é um fator limitante na liberação e consumo de fármacos e, portanto, a análise de toxicidade versus atividade biológica de um composto é fundamental para determinar sua aplicação estabelecendo-se o índice terapêutico. Por motivos éticos e financeiros, em se tratando de utilização de animais para estudos toxicológicos, considera-se mais vantajoso o estudo *in vitro* de toxicidade. Esses ensaios fornecem informações sobre diferentes funções ou compartimentos celulares. O desenvolvimento de novas técnicas terapêuticas contra o câncer é objetivo de vários estudos. Atualmente eles visam limitar sua proliferação e a ocorrência de metástases através de estratégias que envolvem o controle do ciclo e da proliferação celular, e de várias drogas que agem induzindo a morte celular por apoptose. Desta forma, a indução de apoptose em células tumorais tem sido considerada um prognóstico favorável da resposta do organismo ao tratamento.

1.4. Câncer e leucemias

Câncer é um nome genérico dado a um conjunto de doenças caracterizadas por uma série de mudanças fenotípicas^{85,86}, dentre as quais se destaca a proliferação descontrolada de determinados tipos celulares no organismo (conhecida como anomalia da multiplicação celular ou malignidade celular). Portanto, câncer não é uma doença isolada, mas um espectro de doenças que podem surgir e se disseminar em quaisquer tecidos. Essas células acabam por ter suas funções alteradas, passando a ser chamadas de transformadas e, ao se multiplicarem, passam a formar aglomerados denominados de tumores⁶⁸.

Cada tipo de câncer tem um padrão característico de crescimento, apresentação, bem como abordagem diagnóstica, estadiamento e tratamento. Câncer é uma palavra derivada do grego *karkinos*, que significa caranguejo assim como o termo neoplasia (*neo*, novo e *plasma*, algo formado) e tumor (inflamação). Chama-se de tumor a qualquer aumento de volume localizado em um órgão, independentemente da causa, em que o edema resulta do processo inflamatório. Atualmente o termo é empregado para designar a proliferação celular anormal, cuja denominação correta seria neoplasia (novo crescimento). A perda do controle normal da multiplicação e crescimento leva a uma perda da capacidade de diferenciação celular, provocando a invasão de tecidos locais e também à distância (metástases). A célula tumoral perde a característica de inibição de crescimento por contato com outras células, devido a rearranjos nos carboidratos de superfície e perde as proteínas de reconhecimento celular com outras células.

Os tumores recebem a denominação segundo o tipo de tecido em que se desenvolvem, ou seja, os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células. Por exemplo, existem muitos tipos de câncer de pele porque a pele é formada por mais de um tipo de célula. Este câncer, que tem início em tecidos epiteliais ou mucosas é denominado carcinoma, que é um tumor sólido e constitui a forma mais comum. Entre os tumores sólidos existem também os sarcomas, que se desenvolvem em tecidos conectivos como cartilagens, ossos, músculos e tecido adiposo.

O que se chama de linfomas são tumores causados pela proliferação de células transformadas em órgãos linfóides, como o baço e os linfonodos⁶⁸, e as leucemias, que nos interessam mais de perto, referem-se um número anormal de leucócitos produzidos na medula óssea^{68,87}.

As células tumorais passam por uma série de alterações morfo-funcionais de expressão gênica que passam a conferir o fenótipo tumoral. De fato, o câncer é entendido, recentemente, como uma doença genética decorrente de uma série de mutações que se acumulam em uma mesma célula, denominadas *hits*⁶⁸. Essas mutações ocorrem principalmente em genes cujos produtos estão envolvidos com a indução da proliferação celular^{68,88}, explicando o crescimento descontrolado do tumor, e com o processo de apoptose, o que explica a grande sobrevivência do tumor. Estes genes, cujos produtos normalmente regulam positivamente o ciclo celular e negativamente a via apoptótica, são denominados proto-oncogenes. Eles são finamente regulados por proteínas produzidas por um outro grupo de genes denominados genes supressores tumorais. Mutações que promovam a perda de função dos genes supressores tumorais e o ganho de função dos proto-oncogenes (que já passam a se chamar oncogenes) desencadeiam o processo tumoral.

As leucemias são doenças nas quais existe uma alteração genética adquirida nas células primitivas da medula óssea, que levam a um aumento na concentração

de leucócitos. Há quatro formas principais de leucemia, divididas em dois tipos, mielóide e linfóide. Por sua vez esses dois tipos se dividem em formas crônica e aguda. As leucemias agudas são doenças rapidamente progressivas que afetam a maioria das células primitivas (ainda não totalmente diferenciadas ou desenvolvidas). As leucemias crônicas são doenças de progressão lenta, permitindo o crescimento de maior número de células já desenvolvidas). A leucemogênese é um fenômeno complexo caracterizado por anomalias de proliferação e diferenciação resultando em bloqueio de maturação e expansão clonal de células leucêmicas⁸⁹. A habilidade em responder a fatores exógenos de diferenciação apresenta-se diminuída em células da leucemia, podendo ocorrer alteração na expressão de produtos gênicos específicos necessários para a diferenciação celular. A classificação atual das leucemias é a seguinte⁹⁰:

Leucemia Linfóide Aguda (LLA). A leucemia linfóide aguda resulta na produção descontrolada de blastos de características linfóides e no bloqueio da produção normal de glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas. Na maioria das vezes, a causa da LLA não é evidente. Também nestes casos, acredita-se que haja alguma relação com radiação devido ao aumento de casos no Japão pós-guerra.

Leucemia Linfóide Crônica (LLC). Também resulta em crescimento descontrolado das células linfocitárias na medula óssea, levando a um número aumentado de linfócitos no sangue. Esse aumento de células na medula óssea não impede a produção de células normais, como ocorre na Leucemia Linfóide Aguda, explicando o curso insidioso da doença e a sua descoberta, geralmente, em pacientes submetidos a exames médicos e laboratoriais rotineiros. A leucemia linfóide (ou linfocítica) crônica não está associada a altas doses de irradiação ou à exposição ao benzeno. Observa-se uma maior prevalência familiar.

Leucemia Mielóide Aguda (LMA). A Leucemia Mielóide Aguda caracteriza-se pelo crescimento descontrolado e exagerado das células

indiferenciadas (blastos), precursores granulocíticos-macrofágicos da medula óssea. Estas células não apresentam as funções normais dos leucócitos. Além disso, existe um bloqueio na fabricação das células normais havendo uma deficiência de glóbulos vermelhos (anemia), plaquetas (plaquetopenia) e glóbulos brancos (neutropenia).

Leucemia Mielóide Crônica (LMC). A leucemia mielóide crônica se caracteriza pela presença de uma anormalidade genética adquirida e que foi chamada de cromossomo Philadelphia, pois foi descoberta na Universidade da Pensilvânia. O cromossomo Philadelphia é uma anormalidade que envolve os cromossomos de números 9 e 22. Esses cromossomos se quebram e trocam partes entre si. Esta alteração é chamada translocação. Uma pequena proporção de pacientes pode ter a sua doença relacionada à irradiação.

A linhagem celular HL60 estudada neste trabalho representa um subtipo de Leucemia Mielóide Aguda (LMA). Trata-se da **leucemia promielocítica aguda (M3)**, responsável por 10% de todas as LMAs. Geralmente, o tratamento deste tipo de leucemia consiste de quimioterapia e uso de ácido trans-retinóico. O crescimento acelerado que as células da leucemia promielocítica aguda apresentam *in vivo*, em relação às células normais, está relacionado à incapacidade funcional para maturação e diferenciação celular e não a um aumento na taxa de crescimento. Esta doença oferece oportunidade de se estudar a patofisiologia molecular da leucemia humana, representando um modelo para o entendimento da origem da leucemia no nível de desenvolvimento e genética molecular. Desta maneira, novas técnicas terapêuticas, diferentes da quimioterapia citotóxica convencional poderão ser desenvolvidas. Dados clínicos e biológicos obtidos na última década despertaram o interesse de pesquisadores neste subtipo de leucemia com o intuito de desenvolver novas formas de terapia⁹¹. Grande parte dos conhecimentos atuais sobre a biologia celular da LPA adveio de estudos realizados em linhagens celulares estabelecidas a

partir de pacientes⁹², como a HL60. Estas células proliferam continuamente em culturas em suspensão, consistindo morfológica e histoquimicamente, predominantemente em promielócitos, dos quais cerca de 4-15 % apresentam características morfológicas de células mielóides mais maduras: mielócitos, metamielócitos e leucócitos polimorfonucleares. As células da leucemia mielóide humana constituem um modelo apropriado para estudos de regulação da proliferação e diferenciação celular visto que algumas destas linhagens de células são induzidas *in vitro* à diferenciação terminal por vários compostos químicos.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral: Formulação da violaceína em sistemas de liberação controlada (micro e nanoesferas) visando o potencial biológico da violaceína (como antitumoral) avaliado *in vitro* em linhagem celular promielocítica humana HL60.

Objetivos específicos:

Preparar micro e nanoesferas poliméricas redispersáveis após liofilização pelos métodos de emulsificação seguida da evaporação de solvente no primeiro caso e nanoprecipitação no segundo caso, utilizando-se os polímeros biodegradáveis poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA, 50:50). As microesferas serão formadas a partir do sistema de emulsão óleo (PCL-violaceína-EtAc) em água (Tween 40-água). As nanoesferas serão formadas a partir do sistema PLGA-PLURONIC-PVA-acetona.

Caracterizar estes sistemas quanto à morfologia através de uso combinado das diversas microscopias, propriedades fotofísicas, eficiência de encapsulação, perfil de liberação, mobilidade eletroforética, potencial zeta e tensão interfacial.

Verificar o potencial da violaceína livre e encapsulada em nanoesferas de PLGA no balanço apoptose/proliferação de células tumorais, usando como parâmetros:

1. Citotoxicidade basal em cultura de células contra a linhagem de leucemia promielocítica humana (HL60)
2. Avaliar o potencial indutor de diferenciação celular e apoptose dos ativos, e a implicação na morte celular induzida por estes ativos.

3. Esclarecimento do mecanismo de ação da violaceína encapsulada em nanoesferas, comparando os efeitos do ativo livre e encapsulado, investigando as vias metabólicas ativadas ou suprimidas durante os eventos de apoptose e seu possível direcionamento a alvos específicos.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Produção de violaceína a partir da cultura de células de *Chromobacterium violaceum* CCT 3496 em fermentador ML-4100 (New Brunswick Scientific), com capacidade para 30 L.

a) Preparação do inóculo de *Chromobacterium violaceum*.

Em frascos Erlenmeyer de 50 mL esterilizados preparou-se inicialmente o pré-inóculo em 20 mL de meio nutriente, também esterilizado (D-glicose anidra 0,5%, peptona bacteriológica 0,5%, extrato de levedura 0,2%, triptofano 0,03%, em água destilada). Incubou-se o frasco por 18 horas em shaker rotatório (a 30 °C e 200 rpm). A partir do pré-inóculo, preparou-se 300mL de inóculo, em Erlenmeyer contendo 300 mL do meio nutriente e incubou-se por 10 h, a 30 °C e 200 rpm.

b) Preparação do meio de cultura para o bioreator.

Em um Erlenmeyer de 1000mL adicionou-se 160 g de glicose anidra e 500 mL de água destilada, obtendo-se uma solução que foi autoclavada a 110 °C por 30 minutos.

Em um Becker de 5 L pesou-se os outros componentes do meio de cultura (20 g de peptona, 336 g de extrato de levedura, 20 g de triptofano, e 0,33 g de sulfato de zinco heptahidratado) em um volume de 4 L de água. Transferiu-se o conteúdo do Becker a um bioreator ML-4100 (fermentador de aço inoxidável New Brunswick Scientific, capacidade 30 L). Completou-se o volume do bioreator para 19,2L. Esterilizou-se este meio de cultura no bioreator (120 °C, por 20 minutos, sem ainda adicionar a glicose e o inóculo).

Após o bioreator esfriar à temperatura ambiente, adicionou-se os 500 mL de glicose e 300 mL de inóculo, totalizando aproximadamente 20 L.

Realizou-se a fermentação nas seguintes condições:

Tempo total de fermentação: 29 h;

Agitação: 120 rpm;

Temperatura: 33 °C

pH: 6,5 a 7,0 (foi monitorado em pHâmetro digital, retirando-se alíquotas de 3 mL de 2 em 2 h. No aumento do pH durante a fermentação (7,0 para 8,0), adicionou-se HCl 0,5 M até que este pH voltasse a 7,0.

Agitação: 120 rpm (durante 12 h iniciais) e 250 rpm (todo o restante da fermentação);

Pressão: 5 PSIG;

Fluxo de ar: 15 L min⁻¹ (durante as 12 horas iniciais) e 50 L min⁻¹ (todo o restante da fermentação);

Adição de anti-espumante concentrado (grau biológico) quando necessário, até se observar uma diminuição no volume de espuma.

A cada duas horas, durante o tempo de fermentação, retirou-se alíquotas do fermentador para se acompanhar o crescimento celular nas primeiras 16 h do processo ($\lambda=720$ nm, em espectrofotômetro). Dosou-se a glicose em alguns pontos durante o processo, para verificar se havia sido consumida, através do método enzimático-colorimétrico, segundo Trinder. Após 16 horas de fermentação foi adicionada mais glicose ao meio, no mesmo volume e concentração da glicose inicial. As amostras foram armazenadas em freezer, para utilização posterior, se necessário.

O crescimento celular passou a ser mais rápido após 10 horas de fermentação e essa taxa aumentou após se passar o fluxo de ar de 15 L min⁻¹ para 50 L min⁻¹. A adição direta do anti-espumante sem diluição evitou que se formasse espuma em

excesso., permitindo que se trabalhasse neste regime. O pH nas 8 primeiras horas de permaneceu por volta de 6,4. Passou a 7,0 após 14 horas e chegou a 8 com 26 horas de fermentação, abaixando-se para 7,5 após a adição de HCL 0,5 mol L⁻¹.

Após o tempo total de 29 horas de fermentação, o meio de cultura estava com uma coloração violeta bastante intensa. O meio de cultura foi recolhido com o auxílio de 2 galões de 10 L e congelado por 2 semanas.

Os galões foram retirados do *freezer* e deixados no laboratório à temperatura ambiente, até descongelarem, em 4 dias.

Todo o conteúdo dos galões foi centrifugado em centrífuga Sorvall RC-3B em 4.500rpm por 20 minutos, a 25 0C, em tubos de plástico com capacidade para 250mL

c) Extração e purificação da violaceína

Após se realizar a centrifugação nas condições acima mencionadas, observou-se a separação de um precipitado gelatinoso, de cor violeta intensa, devido à massa de células (biomassa). O sobrenadante continuou com uma coloração violeta intensa, da mesma cor do precipitado obtido, por mais que se centrifugasse a suspensão, o que indicava que poderia haver muita violacína livre no sobrenadante e que células deveriam ter sofrido lise, após o período de congelamento nos galões.

Portanto, o sobrenadante e o precipitado foram tratados separadamente, para extração da violaceína.

Sobrenadante: alíquotas de 300 mL do sobrenadante foram colocadas em um funil de separação. A extração foi realizada com acetato de etila (aproximadamente 100 mL). Após a adição do acetato de etila, formava-se uma emulsão que dificultava a separação das fases orgânica e aquosa. Adicionou-se solução saturada de NaCl até para se quebrar a emulsão.

Após a extração, observou-se a formação de duas fases líquidas: uma aquosa inferior, de coloração amarelada e outra orgânica superior, de coloração violeta intensa. Esta fase foi separada e lavada 3 vezes com água destilada. Transferiu-se a fase orgânica a um balão de 250 mL e adicionou-se 100 mL de água destilada. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, na temperatura de 40 °C, resultando numa dispersão de partículas violetas em água, que ainda tinha cor amarelada. Esta dispersão foi filtrada em papel de filtro comum e lavada, até que não fosse observada cor amarela no filtrado. Secou-se esta dispersão em estufa, no próprio papel de filtro.

Precipitado (biomassa): Após a centrifugação, a biomassa foi seca em estufa a 50 °C, obtendo-se uma massa de 125 g. Este precipitado está sendo purificado por extração em soxhlet e recristalização. A biomassa seca foi colocada diretamente no soxhlet e extraída com etanol. Este extrato é rotoevaporado a 40 °C, com um pouco de água, formando uma suspensão de violacína bruta em água, após a evaporação do etanol. Esta suspensão é filtrada e colocada de novo em soxhlet, utilizando-se a seguinte seqüência de solventes: clorofórmio, éter etílico e etanol⁶³. A recristalização foi feita com água / metanol.

3.2. Sistema de emulsão óleo (PCL-violaceína-EtAc) em água (Tween 40-água) formando microesferas de PCL contendo violaceína

3.2.1. Metodologia de formulação das microesferas poliméricas por emulsificação e evaporação de solvente

As microesferas poliméricas de PCL (polímero biodegradável poli(ϵ -caprolactona, Sigma-Aldrich Chemical Co., MW = 65.000) foram preparadas pelo método de emulsão por evaporação de solvente⁹³:

1. Em um Becker de 250 mL preparou-se uma solução aquosa de surfatante (Tween 40- Sigma-Aldrich Chemical Co.) na concentração de 3% (massa/massa), sob agitação magnética, evitando-se a formação de espuma, que é indesejável quando se quer formar partículas por um processo de emulsificação;
2. Colocou-se o Becker com solução aquosa de tensoativo em um banho de óleo de silicone até que se estabilizasse à temperatura desejada (50,0 °C);
3. Em um outro Becker de 50 mL dissolveu-se o polímero PCL em acetato de etila (0,65% m/v em acetato de etila PA -Synth, 20,0 mL). Para que se possa incorporar a violaceína ao polímero esta também é dissolvida na mesma solução, com massa de 5,0 mg;
4. Com auxílio de uma pipeta (uma microseringa adaptada com a borracha da pipeta na parte superior, **Figura 18**), adicionou-se gota a gota, sob agitação, a fase orgânica (solvente + polímero + violaceína) à fase aquosa contendo o surfatante. É importante que esta adição seja feita lentamente e que as gotas sejam direcionadas para o centro do Becker, próxima à região de maior agitação, a fim de que se tenha uma dispersão mais perfeita das gotículas de fase orgânica na fase aquosa;

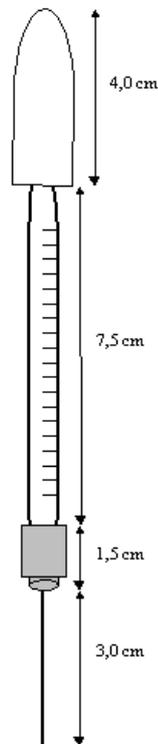


Figura 18: Dispositivo utilizado na metodologia de formulação das microesferas PCL/violaceína

5. Completada a adição, observou-se a formação do sistema bifásico de emulsão (dispersão turva de óleo em água) e deixou-se sob agitação, ainda no banho de óleo, por 5 horas, até que todo o solvente fosse evaporado;
6. Centrifugou-se a 4.000 rpm esta dispersão por 30 min para recolher as micropartículas e lavou-se 3 vezes com água destilada por centrifugação;
7. As micropartículas foram redispersas em água destilada novamente, em um balão volumétrico. A dispersão foi congelada dentro deste balão em N₂ (l) e

transferida para liofilização, que durou 24 horas. Após esta liofilização obteve-se um pó seco e fino composto pelas micropartículas contendo violaceína, de cor levemente violeta.

A mesma metodologia foi utilizada para se obter microesferas de PCL como controle, sem violaceína.

Em função da má qualidade das redispersões em água, a eficiência de encapsulamento e o perfil de liberação somente foram realizados para as nanoesferas, as quais, inclusive, visivelmente incorporaram maior quantidade de violaceína (cor violeta intensa dos pós).

3.2.2. Caracterização morfoquímica das microesferas

a. Microscopia óptica

A morfologia das microesferas foi analisada através de microscopia óptica em microscópio triocular (Coleman), objetivas de 10X a 100X e par de oculares 10X e 16X com Câmera CCD color 1/3 0,9 Lux BCL 470 linhas TVL24 VAC. As amostras foram preparadas através de uma suspensão em água destilada e posterior gotejamento em lâmina de vidro, deixando-se secar ao ar. As micrografias foram obtidas com lente de 100X e 10X.

b. Microscopia eletrônica de varredura

Em relação à técnica de microscopia óptica, além da possibilidade de maiores aumentos, o microscópio eletrônico utilizando-se de elétrons secundários proporciona maior profundidade de foco, com detalhamento da topografia de superfície.

Na técnica de microscopia eletrônica de varredura convencional, utilizada neste trabalho, a passagem de corrente elétrica por um filamento de tungstênio promove uma elevação de temperatura (em torno de 2.500 °C), o que gera uma emissão térmica de elétrons. Duas ou três lentes condensadoras magnéticas demagnificam a dispersão do feixe, produzindo uma sonda, que varre uma área selecionada. O volume de interação elétron-amostra (penetração da sonda na amostra) depende da energia e ângulo do feixe e da massa atômica dos elementos presentes.⁹⁴

Esta interação do feixe de elétrons com a amostra produz elétrons retroespalhados, Auger, secundários, além de raios X. Neste trabalho utilizamos apenas elétrons secundários e raios x para a composição das imagens. Os elétrons retroespalhados fornecem menor resolução espacial mas informam sobre a composição (elementos de maior número atômico aparecem mais brilhantes). Estes elétrons têm maior energia, pois se aproximam muito do núcleo, sofrem espalhamento e re-emergem da superfície, chegando ao detector. Os elétrons Auger são aqueles emitidos de camadas mais externas em pequeno número, necessitando de instrumentação e detectores sofisticados.

Os elétrons secundários são os ejetados dos átomos com energia abaixo de 50 eV, são gerados próximos à superfície e promovem um alta resolução espacial e facilidade de foco e contraste. O feixe de elétrons secundários, originado da interação do feixe primário com a amostra é coletado pelo cintilador e depois convertido em sinal eletrônico. A imagem é formada ponto a ponto, apresentando regiões claras e escuras. O detector fica em ângulo e a imagem é tridimensional, de alta resolução.

Raios-x característicos, detectados por microsonda acoplada, são gerados quando o feixe de elétrons de alta energia desloca elétrons de camadas mais internas, e estas vacâncias são preenchidas por elétrons mais externos. A interação do feixe

primário de elétrons com os átomos origina raios-X de energia característica de cada elemento (análise dispersiva em energia). Os valores de energia são obtidos em um intervalo fixo de tempo e são comparados com uma biblioteca de padrões na qual são identificadas as energias características de cada elemento. O fenômeno de retroespalhamento dos elétrons incidentes, absorção parcial de raio-X da amostra antes de ser coletado e a fluorescência produzida pela radiação característica do elemento introduzem erros, que são corrigidos na análise quantitativa. A morfologia das microesferas foi analisada através de microscopia eletrônica de varredura, utilizando os microscópios eletrônicos de varredura JEOL JSM-T300 e JEOL 5800LV. Foram obtidas imagens da superfície das partículas formadas por elétrons secundários, com o microscópio operando em 20 KeV e também imagens por espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS), utilizando-se uma microsonda de raios-X acoplada a um *software* processador de dados. Nesta análise por EDS foram mapeados e quantificados os elementos C, N e O presentes nas microesferas.

Para a preparação das amostras, uma pequena quantidade de microesferas liofilizadas foi dispersa ao ar e fixada em “stubs” (porta-amostras metálicos próprios para microscopia) previamente cobertos com uma fita adesiva condutora de carbono. As partículas foram cobertas com uma fina camada de ouro no metalizador pelo processo de “sputtering”, utilizando-se um metalizador BAL-TEC.

c. Microscopia de Epifluorescência

Observou-se, em lâminas de vidro, as microesferas de PCL contendo ou não violaceína, em um microscópio de fluorescência marca Carl Zeiss modelo Jenalunar. Utilizou-se lâmpada de Hg de 100W para excitação no UV-vis e filtro

de barreira para excitação $\lambda_{exc} > 244$ nm observando-se a fluorescência para $\lambda_{exc} > 410$ nm, selecionada por filtros ópticos. Estas imagens também foram obtidas em um microscópio invertido Leica DM IRB com uma lâmpada de Hg HBO-100 W. Foi selecionada a faixa de 330-380 nm para a excitação no UV-vis e a imagem de emissão foi observada em $\lambda_{exc} > 410$ nm, com auxílio de um espelho dicróico. Neste microscópio a captura das imagens foi feita em uma câmera digital a Samsung SDC-311 processada pelo *software* Linksys v. 2.38 software.

d. Microscopia de varredura a laser confocal

O microscópio de varredura confocal utiliza uma fonte de luz laser para promover a excitação. Nesse caso, o microscópio, através de um conjunto de lentes seriadas, é capaz de focar um cone de luz laser em uma profundidade pré-determinada do espécime a ser estudado. Mudando-se o ponto focado (mantida a profundidade), é possível iluminar (excitar) todo o plano em estudo, ponto a ponto. Ao retornar, através do mesmo sistema de lentes, a luz emitida pelo fluoróforo é separada da usada na excitação por um divisor de feixe (“beam splitter”). Em seguida, a luz emitida passa por um pequeno orifício capaz de separar apenas a luz proveniente do ponto focado, eliminando a emitida por pontos fora de foco. Com isso, só a luz dos pontos em foco é registrada, com a ajuda de tubos fotomultiplicadores e computadores acoplados, o que permite construir imagens bidimensionais precisas. A obtenção de imagens sucessivas de diferentes planos do mesmo espécime, utilizando esse método, possibilita construir imagens tridimensionais ou mesmo imagens tridimensionais em movimento. Esse seccionamento do espécime (óptico, e não físico) e a visualização tridimensional

são as maiores vantagens dessa técnica em relação à microscopia de fluorescência com câmera CCD.

As microesferas foram observadas em microscópio a laser confocal (LSM510, Zeiss, New York, NY) empregando laser de Ar⁺ (458, 477, 488, 514 nm), tendo-se disponível o comprimento de onda 488 nm para excitação.

Para a preparação das amostras foi necessária a fixação das partículas sobre lamínulas de 20mm x 20mm, apoiadas em lâmina. As lâminas foram previamente lavadas em agitador circular (orbital shaker) em solução de NaOH (7,12M) em etanol 95% 2:1, por 2h, enxaguadas em água destilada por 1h, incubadas com poli-(L-Lisina) 0,1% em PBS pH 7,4 por 45 minutos e colocadas para secar, à temperatura ambiente. Dispersou-se uma quantidade pequena de amostra (da ordem de 0,5 mg), diluída em água Milli-Q (aproximadamente 5 mL), sobre a lamínula e deixou-se secar (período de aderência).

3.2.3. Comportamento fotofísico da violaceína em solução e incorporada às microesferas (estado sólido)

a. Excitação e emissão de violaceína em acetato de etila

Os espectros de excitação e emissão das soluções de violaceína em acetato de etila, em várias concentrações (2.04, 0.87 e 0.22 mMol L⁻¹) e de soluções de violaceína (2.32 μ Mol L⁻¹) com várias concentrações de poli(ε-caprolactona): 0.2, 0.3 5 5.5 mg L⁻¹, foram obtidos. Utilizou-se um espectrofluorímetro PTI LS100 (Photon Technology) operando no modo estacionário, com resolução de 2 nm. O comprimento de onda de excitação foi determinado em um espectrofotômetro com arranjo de diodos HP8542A, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm. Espectros de excitação foram coletados na faixa de of 230-400 nm, utilizando $\lambda_{em} = 416$ nm.

Para o espectro de emissão as soluções foram excitadas em 370 nm e a emissão foi coletada na faixa de 380-600 nm.

b. Fotofísica no estado estacionário e resolvida no tempo: violaceína livre e encapsulada, no estado sólido

Espectros de reflectância difusa de violaceína livre e incorporada às microesferas foram obtidos em um espectrofotômetro Varian CARY 02, equipado com esfera integradora. Para o estado sólido, os espectros de fluorescência foram obtidos no modo de iluminação “front-face”, com a amostra entre duas lâminas de quartzo.

Os decaimentos de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro Edinburgh Analytical FL900, UK usando o método “time correlated single photon counting (TCSPC)”. Para excitação, utilizou-se uma lâmpada de hidrogênio controlada por um tubo Thyatron pulsada a uma frequência de repetição de 40 kHz. Isto permitiu a contagem de fótons durante o decaimento. O comprimento de onda de excitação foi de 276 nm e a emissão foi coletada em 370 nm. As amostras foram alinhadas a 45° da radiação incidente e a emissão foi coletada em “back-face” (face oposta à que a amostra foi prensada na cubeta). A deconvolução do pulso da lâmpada foi obtida pelo método dos mínimos quadrados não linear, utilizando-se o software da Edinburg. O melhor ajuste foi obtido com χ^2 (chi - quadrado) próximo de 1 com distribuição dos resíduos é randômica.

3.3. Sistema nanométrico PLGA-PLURONIC-PVA-violaceína em água-acetona

3.3.1. Metodologia de formulação das nanoesferas poliméricas pelo método de nanoprecipitação (separação de fases). Eficiência de encapsulação e cinética de liberação

As nanopartículas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação^{30,95} utilizando-se o polímero biodegradável PLGA poli(DL-lactídeo-co-glicolídeo 50:50 (massa molar 55.000 - 75.000, Sigma-Aldrich Chemical Co.), acetona PA - Nuclear, violaceína, PLURONIC (F-68, $M_n = 8400$,) e PVA ($M_w = 127.000$ Sigma-Aldrich Chemical Co.). A mesma metodologia foi utilizada para se obter microesferas de PLGA como controle, sem violaceína.

1. Em um Becker de 400 mL preparou-se uma 80 g de solução aquosa de Pluronic e PVA (na concentração de 1,2 % cada um), agitando-se a 400 rpm;
2. Em outro Becker de 50 mL dissolveu-se o PLGA em acetona (5 mL) na concentração de 2,9% massa/volume juntamente com 4,0 mg de violaceína;
3. Utilizando-se de um funil de vidro de 24,5 cm construído com haste longa de 20 cm, verteu-se, lentamente, sob agitação mecânica de 400 rpm, a fase orgânica (solvente + polímero + violaceína) à fase aquosa contendo Pluronic e PVA;
4. Deixou-se sob agitação por 12 h, à temperatura ambiente, até que todo o solvente tenha evaporado e centrifugou-se a 4,0 °C, 10.000 rpm por 30 min;
5. Lavou-se 3 vezes por centrifugação, redispersou-se o precipitado novamente em água destilada e congelou-se a suspensão de nanopartículas em N₂ (l) para a liofilização por 24 horas.

6. Após esta liofilização obteve-se um pó seco e fino, de coloração violeta forte, composto pelas nanoesferas poliméricas contendo a violaceína encapsulada.
7. Devido ao sucesso desta preparação, estas nanoesferas foram empregadas em testes biológicos de citotoxicidade. Para isto se fez necessário se determinar o conteúdo total de violaceína encapsulada e seu perfil de liberação. O conteúdo total de violaceína encapsulada foi obtido por espectroscopia no UV-vis, em 564 nm. Dissolveu-se, em duplicata, 0,0100 g de formulação em 11,0 mL de acetona e fez-se a leitura da concentração destas amostras, de posse de uma curva de calibração. Para o monitoramento de violaceína liberada pelas partículas com o tempo foi realizado o seguinte procedimento: 6 mg de nanoesferas foram adicionadas a 5 mL de tampão fosfato (pH=7,4) contendo 10% de Pluronic foram mantidos em incubadora a 37,0 +/- 0,10C, com agitação de 150 rpm. Em dados intervalos de tempo, os tubos foram centrifugados em 3.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante separado para análise em espectrofotômetro de UV-vis, para medida de absorbância em 580 nm. Após a leitura, a solução foi devolvida ao tubo original e colocada de volta na incubadora, para posterior centrifugação e medida de absorbância. Os espectros de 800 nm a 190 nm foram obtidos a cada 24 h e registrou-se a absorbância em 580 nm.

3.3.2. Caracterização morfoquímica das nanoesferas

a. Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das microesferas foi analisada através de microscopia eletrônica de varredura, utilizando os microscópios eletrônicos de varredura JEOL JSM-T300

e JEOL 5800LV. Foram obtidas imagens da superfície das partículas formadas por elétrons secundários, com o microscópio operando em 20 KV.

Para a preparação das amostras, uma pequena quantidade de microesferas liofilizadas foi dispersa ao ar e fixada em “stubs” (porta-amostras metálicos próprios para microscopia) previamente cobertos com uma fita adesiva condutora de carbono. As partículas foram cobertas com uma fina camada de ouro no metalizador pelo processo de “sputtering”, utilizando-se um metalizador BAL-TEC.

b. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Utilizou-se o microscópio eletrônico de transmissão modelo JEM-1200 EX II, operando em 80 kV. A imagem é formada fazendo-se incidir um feixe de elétrons sobre uma amostra, recolhendo e focalizando os elétrons emergentes sobre uma tela luminescente (que permite observação visual), sobre uma chapa fotográfica (que permite o registro fotográfico) ou sobre uma câmara de vídeo. A técnica baseia-se na emissão de elétrons que, ao atingirem a amostra, interagem com ela e são detectados. Ao atingirem a amostra, os elétrons podem ser espalhados elástica (sem perda de energia, mas com mudança da trajetória) ou inelasticamente (perde-se energia de diversas maneiras, como emissão de elétrons secundários, emissão de raio X, ionização de camadas internas, etc).

O microscópio de transmissão convencional fornece três tipos de imagens: i) imagens de campo claro; ii) imagens de campo escuro; iii) difratogramas de elétrons.

As imagens de campo claro são as mais comuns, e devem ser lidas como se lê uma chapa radiológica: os campos mais escuros são regiões mais espessas, ou regiões formadas por material mais denso (e retêm mais elétrons) que os campos

mais claros. As imagens de campo escuro, não mostradas aqui, já são produzidas por elétrons difratados por domínios cristalinos da amostra, e são conseguidas bloqueando-se o feixe principal, mas coletando elétrons difratados. Sua qualidade é freqüentemente inferior à de campo claro, mas contêm uma informação preciosa, que é a presença, posição e extensão de domínios cristalinos na amostra. Difrátogramas de elétrons são obtidos operando o microscópio como se fosse uma câmara de Laue. Prestam-se à obtenção de informação cristalográfica (como os difratogramas de raios-X) com uma grande vantagem: pode-se obter reflexões de áreas escolhidas da amostra, selecionando-se as partículas ou porções da amostra sobre as quais se quer informação cristalográfica.

Para a observação das amostras, foram preparadas telinhas de 200 Mesh com filme de parlódio suportado, preparado por espalhamento do parlódio (filme polimérico de nitrato de celulose) sobre a superfície de água deionizada, em uma cuba de vidro. Em seguida, com auxílio de um palito de madeira com aro de cobre na ponta, um filme de água contendo nanoesferas foi obtido no aro após mergulho em uma dispersão de nanoesferas em água. Encostou-se este aro levemente sobre papel de filtro para se eliminar o excesso e depositou-se parte do filme líquido sobre a telinha, por contato entre o filme e a tela. Deixou-se secar por 12 horas. Sobre uma lâmina de parafina adicionou-se uma gota de solução de OsO_4 (2%) e depositou-se a telinha sobre esta gota. Deixou-se por 10 minutos, e observou-se as amostras após secagem.

c. Microscopia de varredura a laser confocal

As nanoesferas foram observadas em microscópio a laser confocal (LSM510, Zeiss, New York, NY) empregando laser de Ar^+ (458, 477, 488, 514 nm), tendo-se disponível o comprimento de onda 488 nm para excitação.

Para a preparação das amostras foi necessária a fixação das partículas sobre lamínulas de 20mm x 20mm, apoiadas em lâmina. As lâminas foram previamente lavadas em agitador circular (orbital shaker) em solução de NaOH (7,12M) em etanol 95% 2:1, por 2h, enxaguadas em água destilada por 1h, incubadas com poli-(L-Lisina) 0,1% em PBS pH 7,4 por 45 minutos e colocadas para secar, à temperatura ambiente. Dispersou-se uma quantidade pequena de amostra (da ordem de 0,5 mg), diluída em água Milli-Q (aproximadamente 5 mL), sobre a lamínula e deixou-se secar.

3.3.3. Tamanho médio de partícula por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (ζ) na superfície de cisalhamento⁹⁶.

A técnica de espalhamento de luz dinâmico ou espectroscopia de correlação de fótons baseia-se na determinação das flutuações na intensidade da luz espalhada pelas partículas, em função do tempo, e no cálculo da respectiva função de autocorrelação. Uma grande vantagem desta técnica sobre o espalhamento de luz estático é permitir a determinação da distribuição do diâmetro das partículas, e não apenas um valor médio de diâmetro. Uma outra vantagem importante é a possibilidade da obtenção de informações sobre a composição superficial das partículas, considerando que o método é sensível ao diâmetro hidrodinâmico efetivo, isto é o raio da partícula somado ao raio da camada de solvatação.

Para entendermos este fenômeno, devemos nos lembrar de algumas definições. Partículas em um meio líquido movem-se ao acaso (movimento Browniano), devido a colisões com as moléculas do meio de dispersão. Partículas menores se movimentam mais rapidamente que partículas grandes, e portanto possuem coeficiente de difusão (D) maior.

A medida da intensidade de luz espalhada por uma dispersão permite detectar e analisar este movimento browniano das partículas. A luz espalhada por uma dispersão em um dado instante é combinada, formando um padrão de interferência que depende das posições relativas das partículas. À medida que as partículas sofrem deslocamentos aleatórios, o padrão de interferência acompanha estas modificações, produzindo uma variação da intensidade de luz espalhada no detector. Embora a flutuação da intensidade espalhada seja aleatória por natureza, ela ocorre em uma escala de tempo de micro a milisegundos. O movimento lento de partículas grandes causará lentas alterações na intensidade da luz espalhada. Por outro lado, a movimentação rápida de partículas pequenas provocará uma flutuação muito rápida na intensidade de luz espalhada.

Para uma dispersão de partículas com viscosidade η , em uma temperatura constante T , o coeficiente de difusão D é inversamente proporcional ao diâmetro hidrodinâmico d_h das partículas, como mostra a equação de Stokes-Einstein,

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_h}$$

onde k é a constante de Boltzmann.

As flutuações de intensidade de luz espalhada ao longo do tempo são representadas através de uma função de correlação. No caso de partículas pequenas, essa função de correlação entre as intensidades diminui mais rapidamente com o tempo, do que no caso de partículas grandes. No tempo $t = t_0 = 0$, a intensidade de espalhamento e a função de correlação possui um valor máximo. Com o passar do tempo, a intensidade de espalhamento em um tempo $(t_0 + \tau)$ estará cada vez menos correlacionada com a intensidade de espalhamento

inicial, e a média dos produtos das intensidades tende a zero. Para partículas esféricas e monodispersas, a função decai exponencialmente num intervalo de tempo t , e a constante de decaimento da curva exponencial gerada pela função de correlação está relacionada com o coeficiente de difusão translacional das partículas. A constante de decaimento dependem do índice de refração do líquido que dispersa as partículas, do ângulo de detecção da luz espalhada e do comprimento de onda da luz incidente.

Nestas medidas, para que haja um decaimento da função de autocorrelação (de 1 para 0) as dispersões tiveram de ser muito diluídas, uma vez que a técnica mede a flutuação na intensidade de luz espalhada com o tempo, e verifica se o espalhamento em um tempo t está correlacionado a um espalhamento no tempo $t + dt$ (tempo em que a partícula se moveu em frente do detector). Por este motivo, trabalhamos com alíquotas de 200 μL de suspensões de 0,2 mg /mL em água deionizada, que foram diluídos a 3 mL para leitura na cubeta. O diâmetro médio efetivo das partículas e sua dispersão foram determinados através da técnica de espalhamento dinâmico de luz em um aparelho ZetaPlus (Brookhaven Inst. Corp.), a um ângulo de detecção da luz espalhada fixo em 90° , na temperatura de 25°C , usando laser de estado sólido (12,21 mW, $\lambda = 633\text{ nm}$)⁶² e um sistema Peltier para controle de temperatura.

O potencial zeta (ζ) das partículas foi determinado através da técnica de espalhamento de luz eletroforético, no aparelho ZetaPlus (Brookhaven Inst. Corp.), a um ângulo de detecção da luz espalhada fixo em 15° , na temperatura de 25°C , em cubetas de acrílico, na forma de dispersão diluída em KCl $10^{-3}\text{ Mol L}^{-1}$.

3.3.4. Medidas de Tensão Superficial e Tensão Interfacial

As medidas de tensão superficial e interfacial para o sistemas água + acetato de etila + violaceína (com e sem surfatante) foram obtidas usando-se um tensiômetro automático (KSV Instruments, modelo Sigma 701 (Helsinki, Finlândia) empregando-se o método do anel. As medidas forma conduzidas em uma cela com controle de temperatura, mantida em $25 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ ⁹⁷ .

3.3.5. Atividade biológica das nanoesferas em cultura de células

Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram realizados utilizando-se uma linhagem celular de fibroblastos de Hamster chinês (V79), saudável, e outra tumoral, de leucemia promielocítica humana (HL60).

a. Manutenção dos meios de cultura e contagem do número de células

Os fibroblastos V79 foram mantidos em cultura contínua através de repiques periódicos, até atingirem a densidade de confluência. Este cultivo foi realizado em meio DMEM (Dulbeccos modified Eagles medium) contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram descoladas usando solução de tripsina versene-tripsina a 0,1% e versene a 0,016%. O número de células viáveis para o cultivo e plaqueamento foi determinado homogenizando-se uma alíquota da suspensão celular com a quantidade equivalente de solução de Azul de Tripán a 0,1%, contando as células em câmara de Neubauer e excluindo as células que incorporam o corante. O cultivo foi realizado em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. A incubação foi feita em estufa a 37°C sob atmosfera úmida e contendo 5% de CO₂.

As células HL60 também foram mantidas em cultura até atingirem a densidade de confluência. O cultivo foi realizado em meio RPMI 1640 (Bio Whittaker, MD) suplementado com piruvato de sódio (1mM), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), solução de aminoácidos não essenciais (1% v/v) e soro fetal bovino (10% v/v). A incubação foi realizada em estufa de cultura a 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

As células foram diluídas com uma solução de Azul de Tripán (1:1, v/v) e contadas na câmara de Neubauer, selecionando as viáveis⁹⁸.

b. Citotoxicidade e viabilidade celular

Os testes que avaliam a viabilidade das células V79 e HL60 foram realizados sob condições experimentais que permitem analisar o efeito citotóxico em células V79 e HL60 induzido pela violaceína livre e por nanopartículas de PLGA/violaceína.

Para a linhagem V79 realizou-se o plaqueamento inoculando 3×10^4 células/mL em cada poço de uma placa de 24 cavidades e incubando a 37°C por 48 h (meio de cultura contendo 0,25% de dimetilsulfóxido), para posterior exposição a diferentes concentrações de violaceína livre e veiculada em nanoesferas.

As células HL60 foram cultivadas em placas de 96 cavidades a uma densidade de $3,0 \times 10^5$ células/mL e incubadas a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, durante 72 horas. Após este período, foram tratadas com diferentes concentrações das preparações, nas formas livre e encapsulada.

Os testes que foram aplicados para avaliar a viabilidade celular foram: função mitocondrial (redução do MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólio), exclusão do corante azul de Tripán e atividade fosfatásica.⁹⁹

Estes testes, que avaliam a viabilidade celular e citotoxicidade, foram realizados sob condições experimentais que permitem analisar o efeito citotóxico sobre as linhagens celulares HL60 e V79, o qual é induzido pela violaceína e por nanopartículas de PLGA/violaceína.

b1. Redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)

As células foram cultivadas em placas de 96 cavidades a densidades de $3,0 \times 10^5$ células/mL (HL60) e $3,0 \times 10^4$ células/mL (V79), tratadas com diferentes concentrações das preparações, nas formas livre e encapsulada, no intervalo de 0 a $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, e incubadas a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , durante 72 horas (HL60) e 48 h (V79).

Em seguida, o meio foi removido e trocado por outro sem soro contendo o corante MTT (1 mg/mL), e as células foram incubadas por 4 h, tempo necessário para a redução acontecer. Este meio foi retirado cuidadosamente e foi adicionado 1 mL de etanol para solubilização do formazan (formado no caso de redução do MTT). As placas foram agitadas por 10 min e a absorbância correspondente a cada cavidade foi obtida por UVvis em 570 nm. As células não tratadas foram consideradas com 100% de viabilidade.

b2. Determinação da atividade fosfatásica

As células foram cultivadas em placas de 96 cavidades em densidades de $3,0 \times 10^5$ células/mL (HL60) e $3,0 \times 10^4$ células/mL (V79), tratadas com diferentes concentrações das preparações, nas formas livre e encapsulada, no intervalo de 0 a

$2 \mu \text{mol L}^{-1}$, e incubadas a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , durante 72 horas (HL60) e 48 h (V79).

O meio de cultura foi retirado cuidadosamente das placas de cultura de 96 cavidades. Adicionou-se em cada cavidade $150 \mu\text{L}$ do substrato p-nitrofenilfosfato em solução com tampão acetato 1mol L^{-1} pH 5,5 (que leva à lise das células, com extravasamento da enzima de interesse), a uma concentração final de 75m mol L^{-1} . Em seguida a placa foi agitada por 30 minutos com auxílio de um agitador de placas. Após 40 minutos, a reação foi paralisada com adição de $150 \mu\text{L}$ de NaOH 1mol L^{-1} . A absorbância em 405 nm foi obtida por UV-vis, devida ao p-nitrofenol.

b3. Exclusão do corante Azul de Tripan e Incorporação do Corante Vermelho Neutro

As células foram cultivadas em placas de 96 cavidades a densidades de $3,0 \times 10^5$ células/mL (HL60) e $3,0 \times 10^4$ células/mL (V79), tratadas com diferentes concentrações das preparações, nas formas livre e encapsulada, no intervalo de 0 a $2 \mu \text{mol L}^{-1}$, e incubadas a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , durante 72 horas (HL60) e 48 h (V79). Em seguida, as células foram diluídas com uma solução de Azul de Tripan (1:1, v/v) e contadas na câmara de Neubauer.

Após o tratamento, o meio de cultura contendo as drogas foi substituído por meio de cultura sem soro contendo $100 \mu\text{L}$ do reagente vermelho neutro $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ (previamente incubado à 37°C e filtrado em membrana de $0,22 \mu\text{m}$ para remoção dos cristais formados). A microplaca foi incubada a 37°C (5% CO_2) por 2 horas para a incorporação do corante pelos lisossomas das células e estas foram lavadas/fixadas com tampão fosfato. A cada cavidade da microplaca foi adicionado $100 \mu\text{L}$ de ácido acético 1% em etanol a 50% para solubilização do corante. A

microplaca foi agitada por 20 minutos e a absorvância foi determinada em leitor de placas Metertech Inc. modelo 960.

c. Determinação da Diferenciação Celular através da Redução do NBT

As células HL60 foram tratadas em garrafas de cultura de 50 mL, a uma densidade de $3,0 \times 10^5$ células/mL, adicionando violaceína ou PLGA/violaceína (dissolvidos em meio de cultura completo contendo 0.25% de DMSO) a uma concentração final de 0,5 e 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (violaceína) e 1,0 e 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (PLGA/violaceína). Após 12, 24, 48 e 72 horas de incubação a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , as células foram contadas em Câmara de Newbauer. Cerca de $1,0 \times 10^6$ células foram transferidas a tubos de centrífuga e centrifugadas a 3000 x g por 7 minutos. O precipitado foi ressuspensão em 0,5 mL de meio de cultura RPMI contendo 20% de SFB.

Foi adicionado 0,5mL da mistura NBT-TPA (200 $\mu\text{g/mL}$ de NBT, 1 mg/mL de TPA dissolvidos em tampão fosfato) aos 0,5mL de suspensão celular, agitando suavemente. A reação foi incubada a 37°C em estufa contendo 5% CO_2 durante 30 minutos.

Após incubação o material foi centrifugado a 10.000 g por 5 minutos e o formazan (produto de redução do NBT) presente no precipitado foi solubilizado com 600 μL de etanol. A absorvância foi medida em 570nm obtendo-se a concentração da espécie reduzida¹⁰⁰.

d. Indução de morte celular por apoptose. Marcação com anexina V-FITC/PI analisada por citometria de fluxo.

Células apoptóticas foram detectadas utilizando o kit “ApoDETECT™ Annexin V-FITC”. Baseado em sua alta afinidade e especificidade pela fosfatidilserina (PS), a anexina V pode ser utilizada como um marcador sensível para detecção de células em apoptose, com externalização de PS característica deste processo. As células HL60 (3×10^5 /mL) foram tratadas com 0,5; 0,8 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína ou 1,0; 1,5 e 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PLGA/violaceína durante 3, 6, 12, 24, 48 e 72 h. Após lavagem em PBS, pH 7,4, as células (1×10^6 células/mL) foram resuspensas em tampão de ligação (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2) contendo anexina V-FITC (diluição de 1:500). As células foram incubadas em temperatura ambiente por 10 min e lavadas com tampão de ligação. Após a adição de 20 μg de iodeto de propídeo/mL, as células foram analisadas por citometria de fluxo utilizando um citômetro de fluxo FACS Calibur (Laboratório de Marcadores Celulares-Hemocentro-UNICAMP) em comprimento de onda de excitação de 488 nm (para o PI) e 530 nm (para FITC). Os dados foram obtidos utilizando o software CellQuest, versão 3.3 (BD Biosciences). Um total de 10.000 eventos foram coletados para cada amostra e analisados com auxílio do programa WinMDI versão 2.8.

e. Indução de morte celular por apoptose. Análise do “swelling” mitocondrial

Para detecção de intumescimento mitocondrial, as mitocôndrias foram isoladas de células HL60 após o tratamento com violaceína (0,5; 0,8 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) ou PLGA/violaceína (1,0; 1,5 e 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 3, 6, 9, 12 e 24 horas. A indução de entumescimento mitocondrial por ambos os compostos foi determinada conforme descrito por Schneider & Hogeboom (1950) com algumas modificações. As concentrações dos compostos utilizadas foram próximas aos valores de IC_{50} . As células foram centrifugadas a $12.100 \times g$ por 10 min a 4°C . O sedimento foi

suspenso em solução de sacarose 250 mmol L⁻¹ contendo EGTA 0,3 mmol L⁻¹ tamponada com Hepes 1,0 mM e em seguida centrifugado nas mesmas condições descritas. O sedimento foi suspenso em solução de sacarose 250 mM, obtendo uma suspensão mitocondrial com concentração de 100 µg de proteína/mL, determinada pelo método de Bradford. As mitocôndrias foram suspensas em tampão CFS (220 mmol L⁻¹ manitol/68 mmol L⁻¹ sacarose/2,0 mmol L⁻¹ NaCl/5,0 mmol L⁻¹ KH₂PO₄/2,0 mmol L⁻¹ MgCl₂/10 mmol L⁻¹ Hepes-NaOH, pH 7,4/ 5,0 mmol L⁻¹ succinato/ 2,0 µmol L⁻¹ rotenona). A absorbância foi medida em 520 nm em 15 min a 25°C utilizando espectrofotômetro. Uma diminuição da absorbância decorre de um aumento do espalhamento, que é consistente com um intumescimento mitocondrial.¹⁰¹

f. Indução de morte celular por apoptose. Análise de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial (JC1)

As células HL60 (3 X 10⁵ células/mL) foram tratadas com 0,5; 0,8 e 1 µM de violaceína ou 1,0; 1,5 e 2,0 µmol L⁻¹ de PLGA/violaceína durante 3, 6, 12 e 24 h. Após serem lavadas com solução fisiológica (NaCl 0,9%) as células foram ressuspensas em tampão fosfato (pH 7,4) contendo 10% de JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina). As células foram incubadas a 37°C durante 15 minutos e lavadas duas vezes com tampão fosfato (400 X g durante 5 minutos em temperatura ambiente). O sedimento celular foi ressuspenso em 0,5 mL de tampão fosfato e analisadas por citometria de fluxo.

As células foram analisadas por citometria de fluxo utilizando um citômetro de fluxo FACS Calibur (Laboratório de Marcadores Celulares – Hemocentro – UNICAMP) em comprimento de onda de excitação de 488 nm, sendo que os

monômeros de JC-1 emitem a 527 nm e os agregados a 590 nm. Os dados foram obtidos utilizando o software Cell Quest, versão 3.3 (BD Biosciences). Um total de 10.000 eventos foi coletado para cada amostra e analisado com auxílio do programa Win MDI versão 2.8.

Cada experimento foi realizado pelo menos três vezes (quatro replicatas cada) e os resultados foram expressos como porcentagens (média \pm SD) dos controles, em relação aos ensaios de citotoxicidade. Comparações estatísticas foram feitas utilizando teste de uma via ANOVA ou teste-t de Student como calculado pelo programa Origin versão 6.0 $P < 0,05$ foi considerada significativa.

4. Resultados e Discussão

4.1. Sistema de emulsão óleo (PCL-violaceína-EtAc) em água (Tween 40-água) formando microesferas de PCL contendo violaceína

4.1.1. Metodologia de formulação das microesferas poliméricas por emulsificação e evaporação de solvente

No processo de formação das microesferas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) temos uma emulsão do tipo óleo/água, em que uma fase óleo (PCL e violaceína dissolvidos em acetato de etila, volátil) está dispersa noutra fase, a aquosa (água + surfatante). Esta formação de microesferas sólidas (PCL + violaceína) é explicada pela difusão para a fase aquosa de pequena quantidade do solvente contido nas gotas de fase óleo e posterior evaporação deste solvente (processo denominado emulsificação e evaporação de solvente)^{102,103}. Emulsões são termodinamicamente instáveis devido à alta tensão interfacial γ entre óleo e água. O incremento de

energia ∂G devido a um aumento de área ∂A é definida como $\partial G = \partial A \times \gamma$, a T e P constantes. Este aumento de energia livre é desfavorável e o sistema, para um $\Delta G_M > 0$, irá separar fase para decrescer a área interfacial total¹⁰⁴.

A presença do surfatante (no caso, o surfatante não-iônico Tween 40) na interface líquido-líquido provoca abaixamento da tensão interfacial. Este fato auxilia na diminuição da taxa de separação de fase e, principalmente, dificulta a coalescência por impedimento estérico, levando a uma estabilização cinética do sistema de emulsão (**Figura 19**).

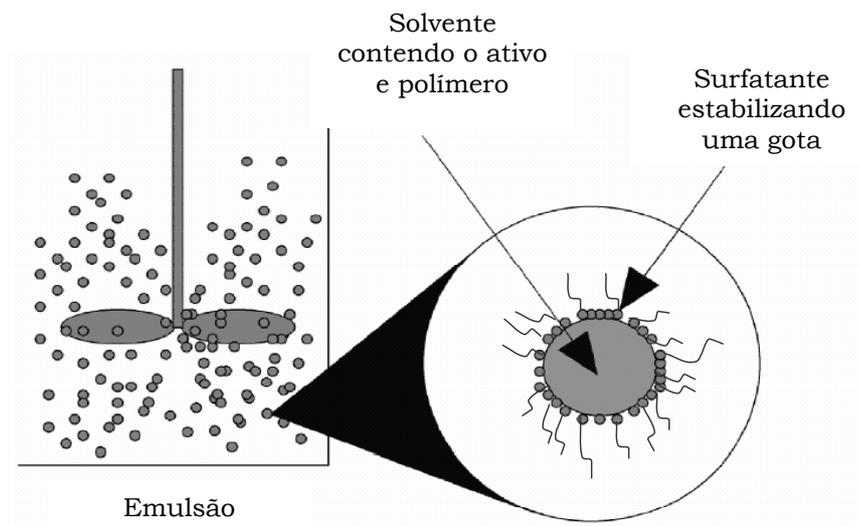


Figura 19: Representação da emulsão estabilizada no sistema PCL-violaceína/-surfatante-água¹⁰⁵.

O termo "coalescência"¹⁰⁶ descreve um fenômeno crítico e deve ser utilizado com cautela, em uma situação experimental bem determinada. Ela pode ocorrer tanto entre gotas de óleo como nas partículas já formadas (neste caso há "fusão de partículas com a expulsão de espécies tensoativas que foram usadas para estabilizar

a dispersão)¹⁰⁷. No caso em que duas partículas de óleo fundem-se, ocorre quebra do filme líquido que as separa. Inicialmente, as duas gotas que se deformam e ficam separadas por um filme planar. Devido à flutuações locais de concentração ocorrem descontinuidades no filme, que leva a uma falha local do surfatante. Esta falha permite o contato entre as fases internas das gotas de óleo, com formação de pescoços; a descontinuidade se propaga, permitindo que ocorra fusão entre as gotas⁷⁴. Este processo está ilustrado na **Figura 20**.

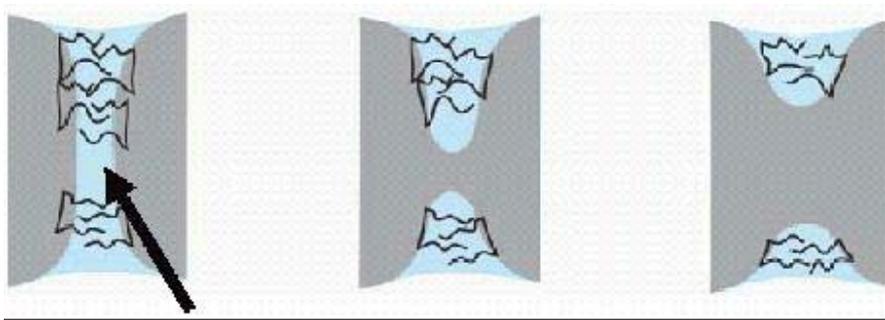


Figura 20: Aproximação de gotas de óleo estabilizadas por copolímero bloco e coalescência durante a quebra de uma emulsão⁷⁴. A seta indica uma descontinuidade da camada interfacial de surfatante.

A separação de fases segue um caminho complexo, envolvendo vários mecanismos diferentes de desestabilização. Um deles envolve diferenças de densidade entre a fase dispersa e a fase contínua, o que frequentemente leva à migração das gotas de acetato de etila à superfície (fenômeno conhecido como “creaming”). A velocidade desta migração depende, além da densidade dos componentes (ρ), da viscosidade da fase contínua (μ), do raio da gota de óleo (R) e da aceleração da gravidade (g). Isto explica a necessidade de agitação mecânica, a

fim de se obter gotas com raios menores, já que existe dependência quadrática com o raio, conforme a equação:

$$v = \frac{2R^2(\rho_1 - \rho_2)g}{9\mu}$$

O tamanho das gotas é importante por um outro motivo. Diferenças na pressão interna (pressão de Laplace) entre gotas de menor e maior raio de curvatura causam uma diferença de potencial químico e de solubilidade. As gotas menores podem se dissolver na fase contínua mais facilmente do que as maiores e o material solubilizado migrar para as gotas maiores. Este processo é conhecido como “Envelhecimento de Ostwald” ou desproporcionamento e causa aumento do tamanho das gotas, desestabilizando a emulsão^{108,109}.

Nestas formulações o diâmetro médio obtido para as partículas é influenciado pela concentração de polímero. Foi verificado experimentalmente que concentrações maiores que 0,65 % de PCL não levam à formação de partículas. Por outro lado, em concentrações menores, elas são obtidas. Este fato é explicado pela menor viscosidade da fase interna da emulsão (fase orgânica menos concentrada em polímero), o que facilita o rompimento mecânico das gotas, deixando-as menores. A taxa de coalescência destas gotas, como vimos, depende da taxa de transferência de massa do interior ou da superfície das gotas para a região intersticial e também da existência de um filme interfacial orientado que permita estabilização¹¹⁰. O volume de solução aquosa (100 mL) é maior que o volume da fase orgânica (20 mL) na formulação das emulsões. Este procedimento diminui a possibilidade de coalescência das gotas de óleo devido à menor probabilidade de choques entre elas.

4.1.2. Caracterização morfoquímica das microesferas

a. Microscopia óptica

A morfologia das microesferas foi analisada através de microscopia óptica (**Figura 21**). A micrografia **21.a** sugere tamanhos diferentes entre as partículas e também heterogeneidade quanto à distribuição de violaceína na superfície, representada por regiões escuras mais concentradas que outras. As micrografias **21.b** e **21.c** em maior aumento, não permitem que se obtenha informação sobre a morfologia de superfície das partículas, apenas informa quanto à heterogeneidade de tamanho e esfericidade, podendo sugerir acúmulo de violaceína em partículas menores.

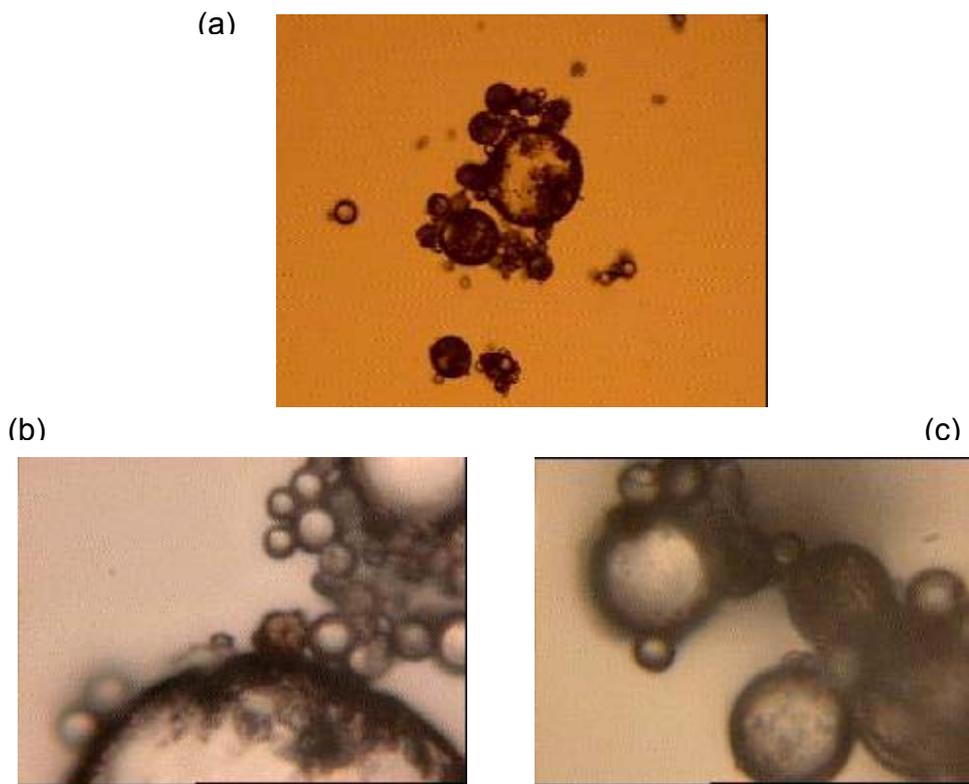


Figura 21: Micrografia obtida por microscopia óptica (a): objetiva de 10X; (b) e (c): objetiva de 100X.

b. Microscopia Eletrônica de Varredura. Espectroscopia de raios-X por dispersão em energia

Na **Figura 22** estão mostradas microesferas de PCL contendo violaceína preparadas segundo as condições descritas na parte experimental.

Nota-se que a superfície das microesferas é lisa. No processo de formação das partículas é importante que o solvente sofra difusão da fase descontínua (gota) para a fase externa aquosa. Esta difusão é dependente do maior ou menor grau de miscibilidade deste solvente. Uma alta taxa de difusão do solvente na água tenderia a formar partículas com alta porosidade, facilitando uma liberação mais rápida do ativo na partícula seca. Como acetato de etila e água são ligeiramente miscíveis (10% v/v), é esperada baixa porosidade das partículas de PCL. De fato, as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostram que os poros não chegam a ser evidentes na superfície das partículas.

Mais detalhadamente nota-se que, ademais das diferenças em tamanho das partículas, ocorre o fenômeno de adesão capilar, discreto (observe a seta em azul). A existência de esferas maiores e menores é esperada, devido à etapa de emulsificação, quando da quebra das gotas de fase dispersa em gotículas menores. A adesão capilar ocorreu durante a secagem.

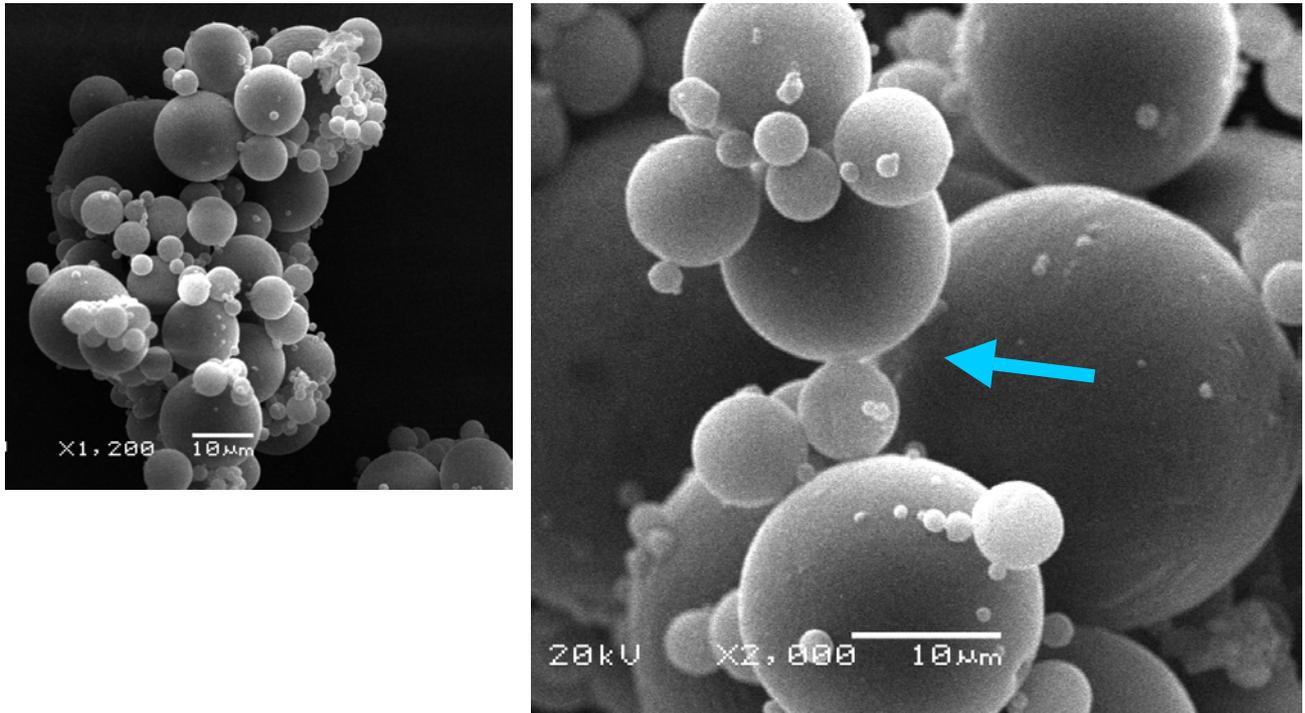


Figura 22: Micrografias de microesferas de PCL/violaceína. Imagens obtidas por elétrons secundários, 20 kV: esquerda, 1200 x; direita, 2000 x

Na **Figura 23** (aumentos diferentes de 1 a 4) mostramos que o método de emulsificação pode levar à coalescência severa das microesferas (mais evidente nas etapas 4 e 5, que mostra a formação de “pescoços” inter-partículas).

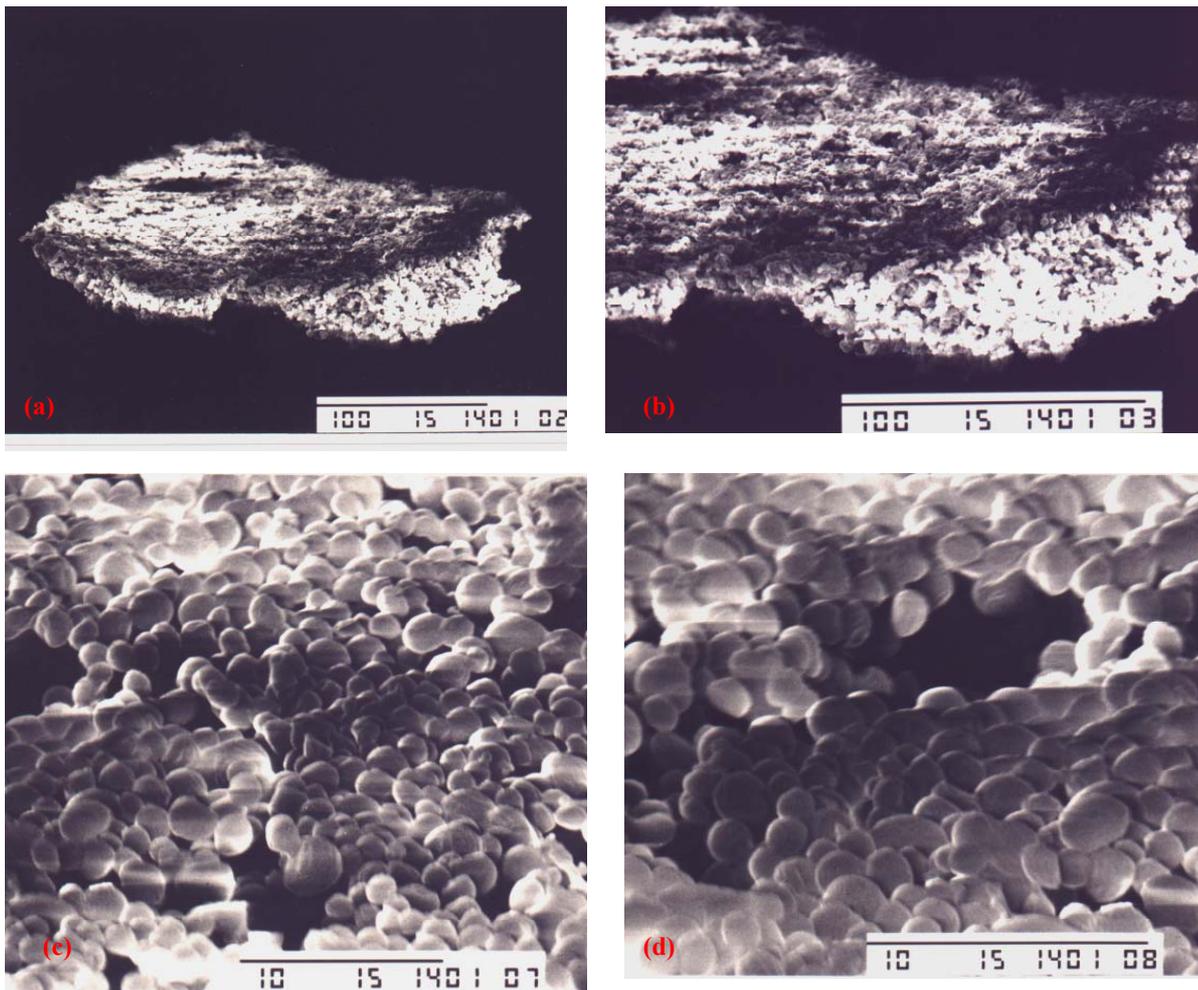


Figura 23: Microesferas de PCL/violaceína. Imagens obtidas por elétrons secundários (topografia); (a): aumento de 200 x , (b): 350x , (c) 3500x, (d) 5000x. Tensões de 15 KV

Em outra micrografia (**Figura 24**) notamos também um detalhe morfológico interessante: existe uma heterogeneidade na superfície de algumas partículas, que mostram ser formadas por pequenas nanoesferas. Este fato ocorreu para duas amostras diferentes, em partículas de tamanho intermediário. As partículas menores podem estar adsorvidas nas maiores. Entretanto, é importante salientar que a presença de pequenas partículas foi observada também no interior de

nanoesferas de PLGA, por microscopia eletrônica de transmissão. Isto nos faz pensar em microheterogeneidade destes sistemas.

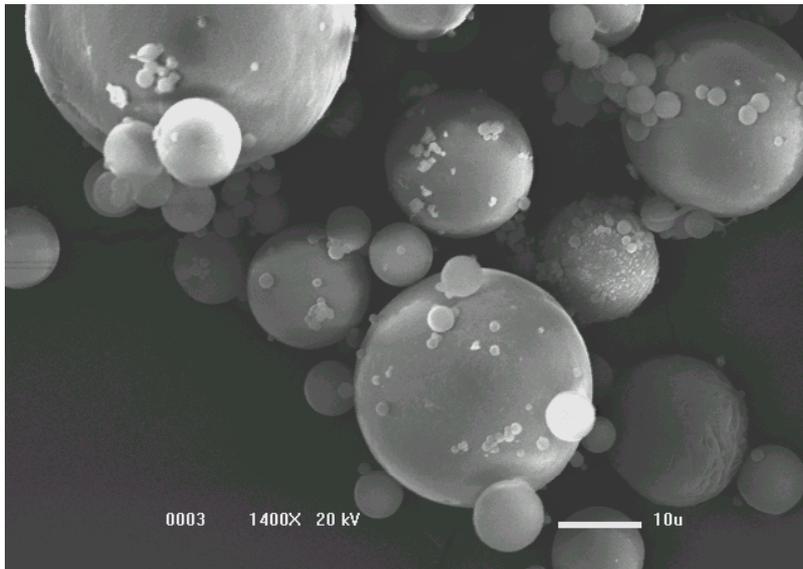
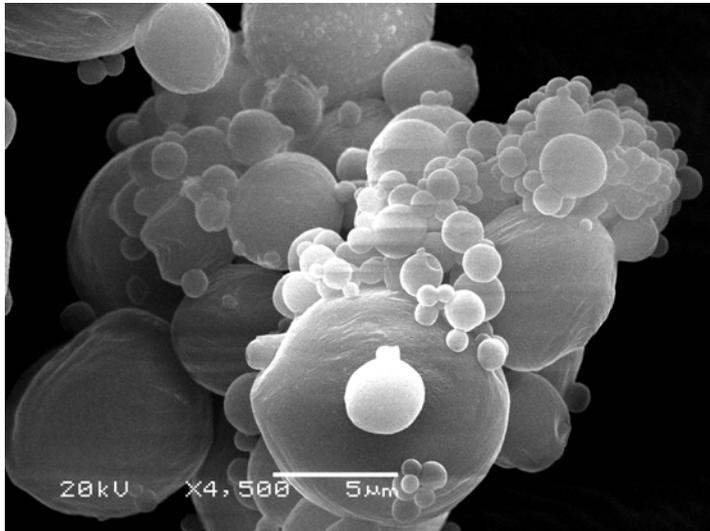


Figura 24: Micrografias de microesferas de PCL/violaceína. Imagens obtidas por elétrons secundários, 20 kV: superior, 4500 x; inferior, 1400 x

A análise por EDS (espectroscopia dispersiva em energia) das microesferas de PCL/violaceína levou a algumas proposições importantes:

1. **Mapeamento elementar.** Embora a presença de carbono (**Figura 25 a, b, c**) seja dominante e bem distribuída por toda a amostra, é interessante notar uma evidência de que a violaceína está incorporada às microesferas poliméricas: a presença de N nas partículas;
- 2 **Mapeamento elementar e perfil de distribuição nas partículas.** Nas **Figura 26** temos as micrografias 25.b e 25.c ampliadas. Nota-se uma distribuição similar entre N e O, ambos presentes na violaceína, ao longo da partícula. Este fato é reforçado por perfis de distribuição dos elementos C, N e O mostrado na **Figura 27**: C está presente majoritariamente, mas N e O são minoritários e seus perfis de distribuição ao longo de uma “linescan” são semelhantes.
- 3 **Análise quantitativa.** A quantidade de N e O em diferentes microesferas é próxima de uma constante, indicando que a violaceína se distribui bem entre várias microesferas (**Figura 28**)

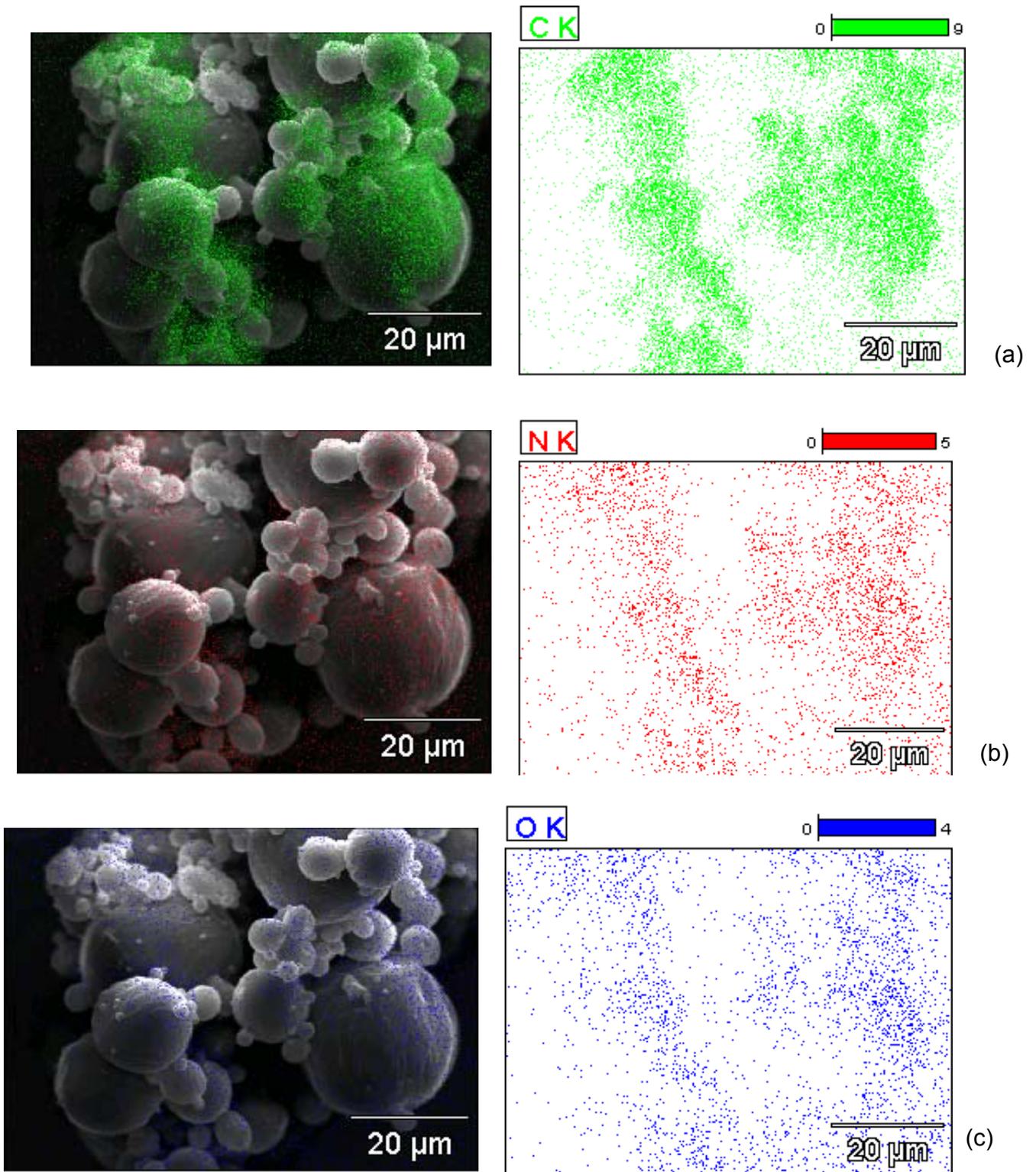


Figura 25: Micrografia mostrando a distribuição dos elementos na partícula de PCL/violaceína: (a): C, (b): N, (c): O.

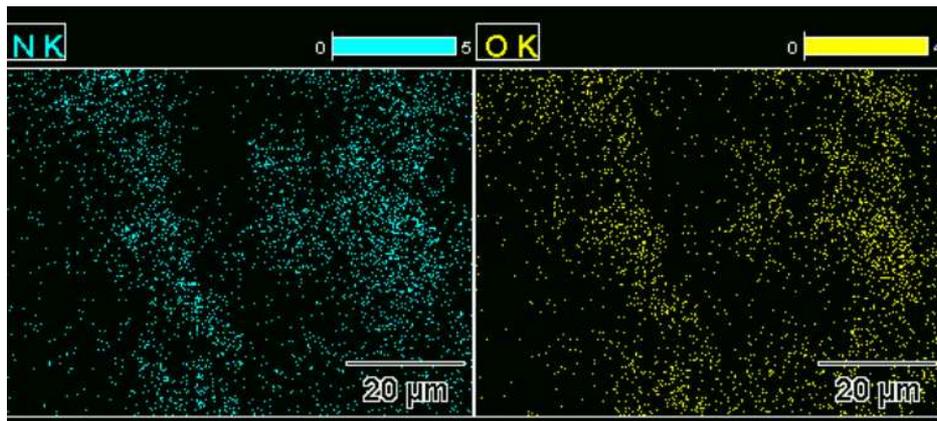


Figura 26: Micrografia obtida por SEM-EDS ampliada, mostrando a conformidade de distribuição dos elementos N e O na partícula de PCL/violaceína.

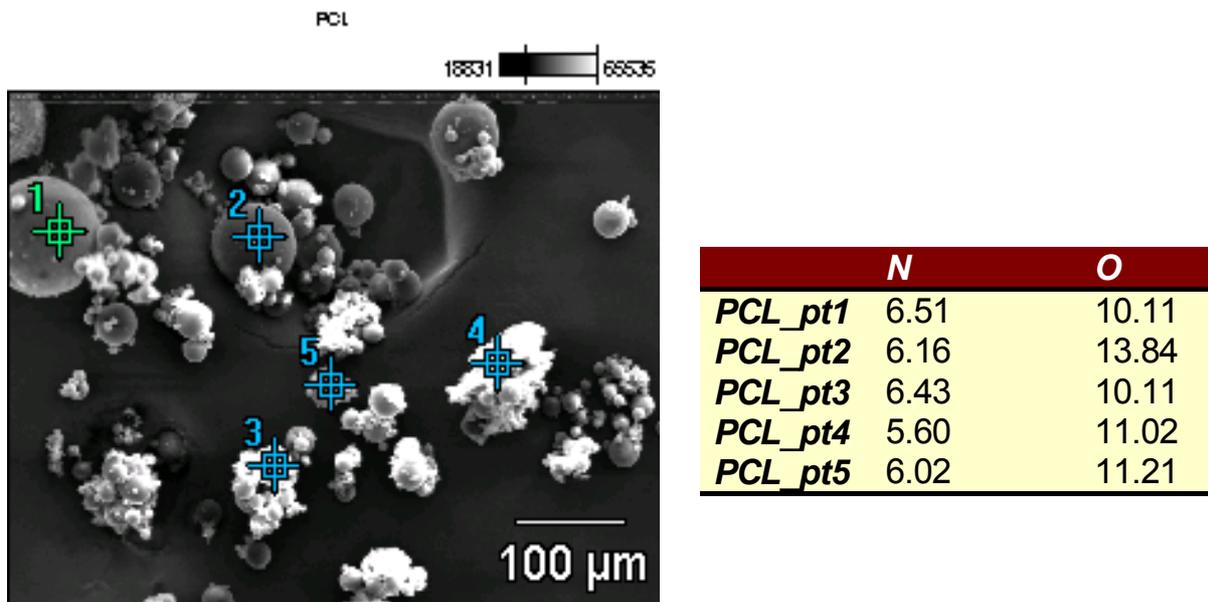


Figura 28: Micrografia obtida por SEM-EDS mostrando que a quantidade de N e O em presente diferentes microesferas é semelhante.

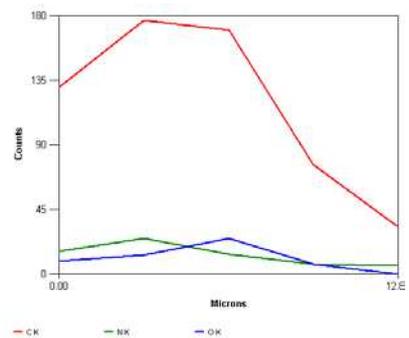
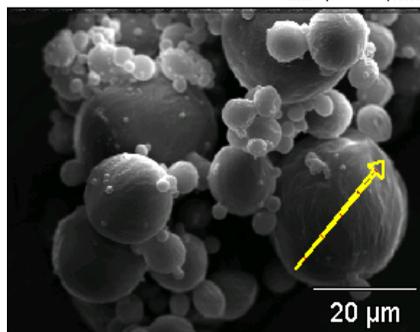
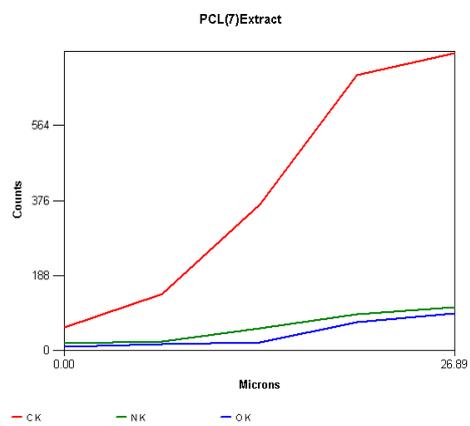
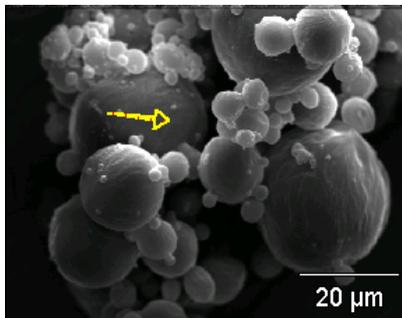
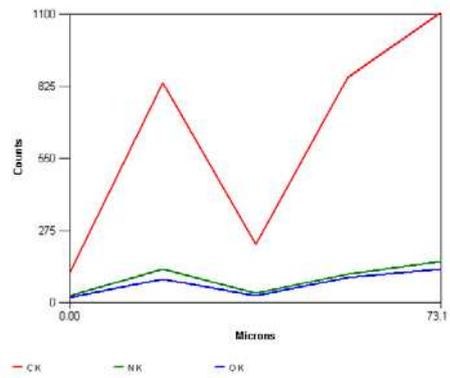
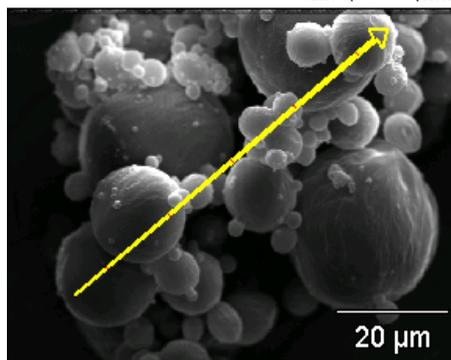


Figura 27: Micrografia obtida por SEM-EDS ampliada, mostrando que N e O têm perfis de distribuição ao longo de uma “linescan” são concordantes.

c. Microscopia de Epifluorescência

Foi observado que microesferas de PCL/violaceína são fortemente fluorescentes na faixa de 330-380 nm para a excitação no UV-vis (**Figura 29-a**). Adicionalmente, é interessante notar que PCL puro não é fluorescente (seta, **Figura 29-b**). As espécies fluorescentes correspondem ao sistema matriz polimérica-violaceína, desde que nem cristais de violaceína nem poli(ϵ -caprolactona) são fluorescentes. A partir da constatação destas propriedades, foi investigado o comportamento fotofísico destes sistemas em solução e no estado sólido.

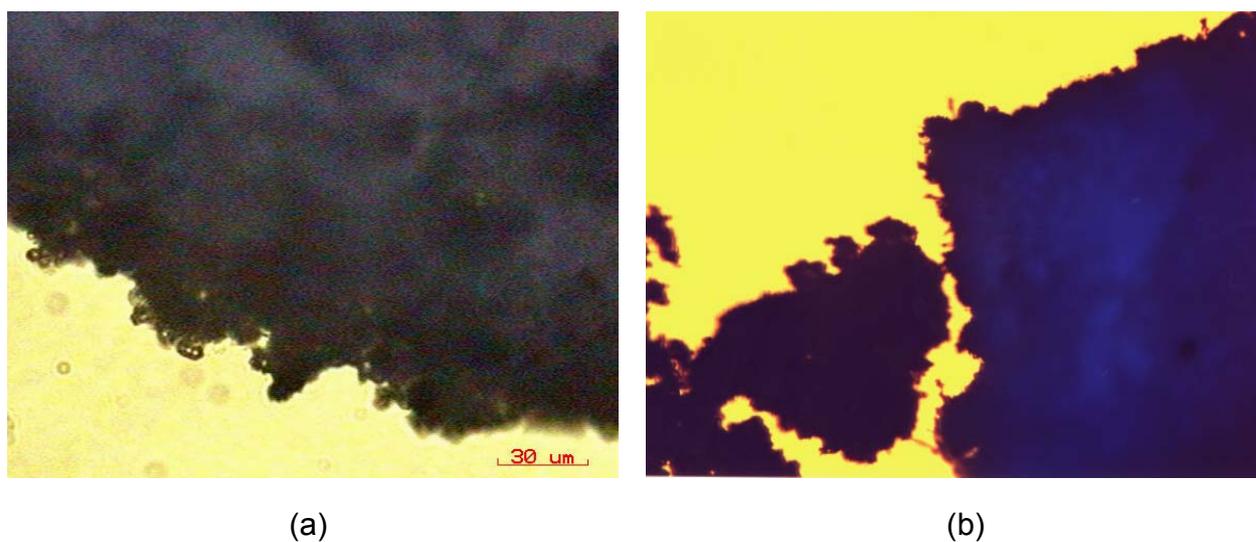


Figura 29: Micrografias obtidas por microscopia de fluorescência de (a) aglomerado de microesferas contendo violaceína. (b) Microesferas controle x microesferas contendo violaceína.

d. Microscopia de varredura a laser confocal

Já que o sistema PCL-violaceína era fluorescente, a análise por microscopia confocal foi muito informativa, pois demonstrou que a violaceína está sempre presente, independente do plano focal, ou seja, distribuída por todo o interior da partícula polimérica, em diferentes profundidades. (**Figuras 30 e 31**).

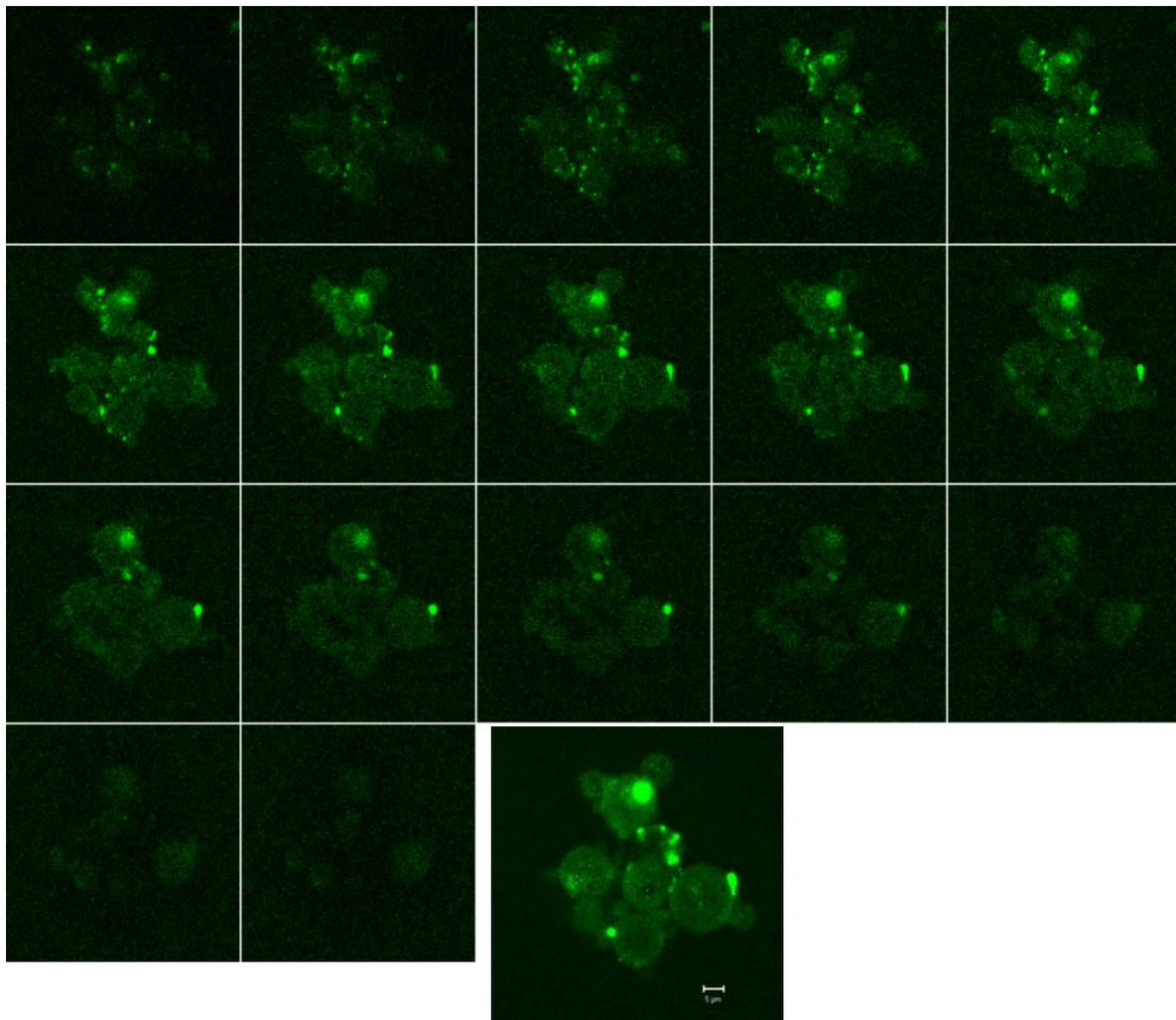


Figura 30: Microscopia Confocal: conjunto de microesferas de PCL contendo violaceína, que fluoresce. Os vários planos focais diferentes: cortes do topo para baixo

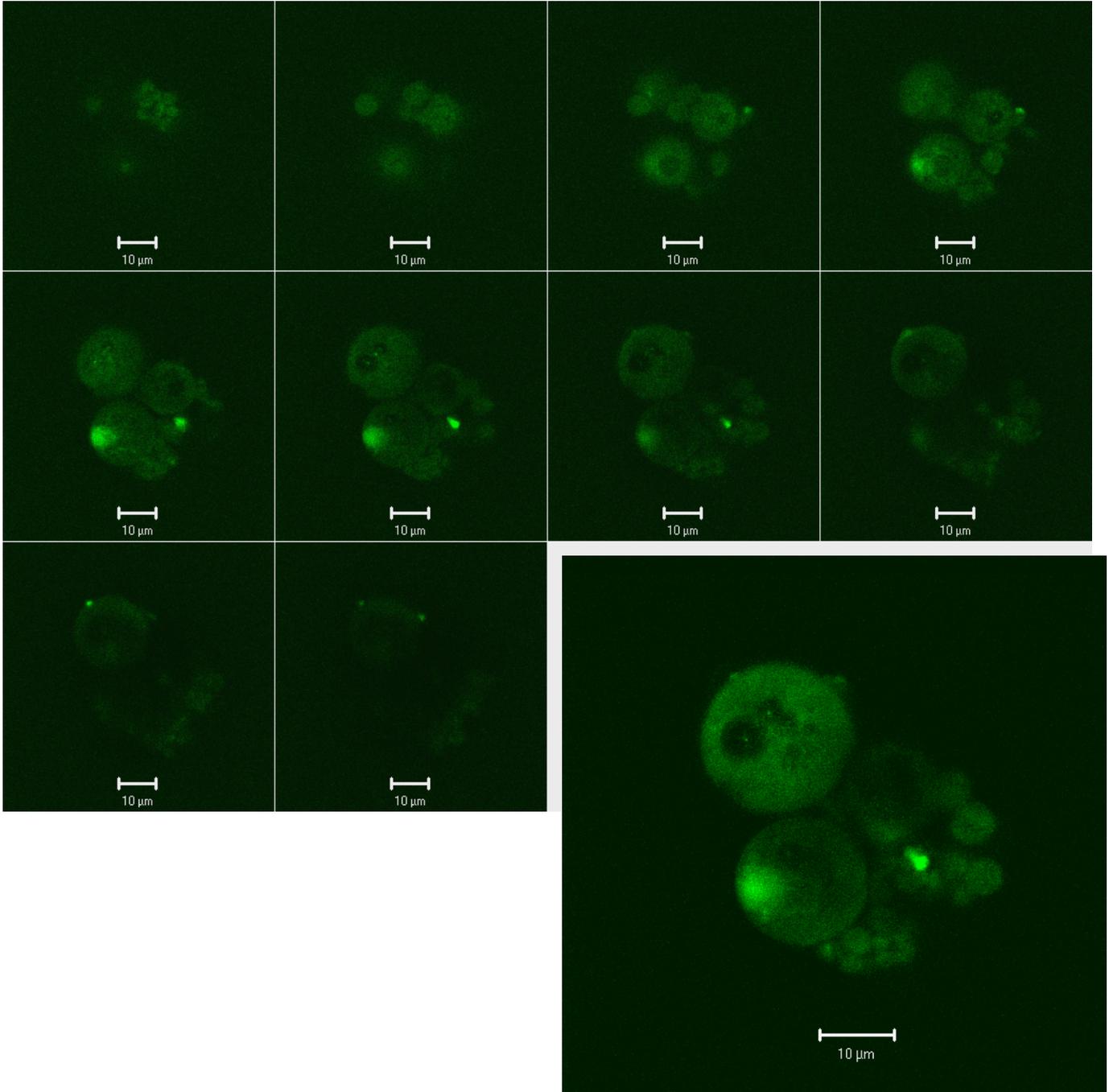


Figura 31: Microscopia Confocal: conjunto de microesferas de PCL contendo violaceína, que fluoresce. Os vários planos focais diferentes: cortes do topo para baixo

4.1.3. Comportamento fotofísico da violaceína em solução e incorporada às microesferas (estado sólido)

a. Comportamento fotofísico da violaceína em solução

O processo de agregação intermolecular¹¹¹ é observado em muitas soluções de compostos orgânicos, em particular de corantes, e depende da concentração, da solubilidade e do tipo de solvente. Quando a concentração de corante aumenta, monômeros podem originar desde dímeros a agregados moleculares de mais alta ordem. Estes agregados são caracterizados por diferentes estruturas e por mudanças nas suas propriedades físicas (incluindo as espectroscópicas), quando comparadas a moléculas isoladas.

Neste trabalho, observamos na **Figura 32 (a,b)** que os espectros de excitação e a emissão (b) para violaceína dissolvida em acetato de etila indicam a presença de agregados moleculares quando esta solução passa do regime diluído para o concentrado. O espectro de excitação ($\lambda_{em} = 416$ nm) desta solução mostrou uma severa mudança quando passa do regime diluído ($0,22$ mMol L⁻¹) para o concentrado ($2,04$ mMol L⁻¹):

1. Na solução concentrada, há a presença de agregados de violaceína misturada a poucas moléculas isoladas. Este espectro exhibe uma única banda centrada em 360 nm. Um crescimento na intensidade relativa em 360 nm com um ombro em 330 nm indica que a agregação é predominante em solução mais concentrada.

2. Por outro lado, na solução diluída duas bandas de excitação (desdobramento) são observadas em 279 nm e 354 nm. Moléculas isoladas e dímeros são responsáveis pelas transições eletrônicas apresentadas.
3. O espectro obtido em 0.87 mmol L^{-1} , considerando a concentração muito baixa apresenta um banda atribuída a praticamente espécies não agregadas de violaceína, pois a contribuição dos agregados é pequena.
4. A presença de um ponto isobéstico ao redor de 300 nm no espectro de absorção sugere um equilíbrio entre violaceína e espécies agregadas.¹¹²
5. Não foram observadas mudanças no espectro de fluorescência para as mesmas soluções, desde que a emissão ocorre do estado excitado de mais baixa energia e apenas moléculas isoladas e pequenos agregados, como os dímeros, são fluorescentes. Os agregados maiores não são fluorescentes e este comportamento é consistente com o fato de cristais de violaceína, por analogia, formados por muitas moléculas, não fluorescerem.

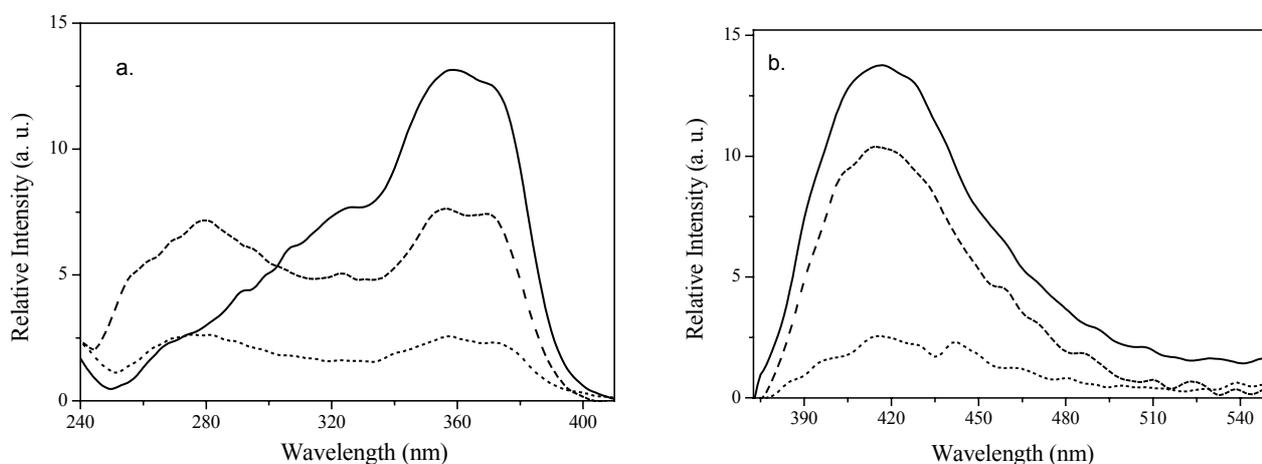


Figura 32. (a) Espectro de excitação ($\lambda_{em} = 416$ nm) e (b) de fluorescência ($\lambda_{exc} = 370$ nm) de solução de violaceína em acetato de etila nas concentrações: 2,04 (—), 0,87 (-----) e 0,22 mmol L⁻¹ (.....).

A **Figura 33** mostra o espectro de excitação e fluorescência de soluções de violaceína (2.32 m Mol L⁻¹) na presença de várias concentrações de PCL (0.1, 0.2 e 5.5 mg L⁻¹). Embora haja alguma similaridade em relação às soluções sem polímero, independente da quantidade de PCL ambos os espectros apresentam desdobramento em duas bandas: excitação em 376 e 387 nm e emissão em 412 e 433 nm. Admite-se que pelo menos duas espécies estão emitindo neste sistema: espécies isoladas e moléculas associadas. A independência da intensidade e do perfil do espectro com a variação de concentração do polímero é surpreendente. Este comportamento é similar aos observados em outros sistemas microheterogêneos,¹¹³ no qual a presença de cadeias poliméricas induz à formação de um novo microambiente para o fluoróforo, com propriedades de solvatação distintas. O coeficiente de partição da molécula entre a gaiola do solvente e a cadeia de polímero é controlada pela interação corante-meio. Tão logo a violaceína

seja solvatada no ambiente rico em cadeias de polímero, ela experimenta maior viscosidade e o espectro torna-se mais fino, com a estrutura vibrônica mais resolvida.

Estas características espectrais nos levam a fazer uma comparação: solução de PCL+vioaceína (**Figura 33**) e violaceína/PCL no estado sólido (**Figura 34**). As diferenças podem ser explicadas com base no modelo proposto por Kasha e co-autores para desdobramento excitônico¹¹⁴. De acordo com este modelo, duas moléculas do fluoróforo podem formar um dímero, que possui um eixo molecular. Os dipolos de transição se orientam em relação a este eixo do dímero. Quando o momento de dipolo está em ângulo de 90° relativo ao eixo do momento de transição, a transição a um estado eletrônico de mais baixa energia é proibida enquanto que a transição a um estado eletrônico de mais alta energia é permitida. Assim, a violaceína em solução de polímero (que absorve em 380 nm) possui o nível excitado de mais baixa energia (transição proibida) enquanto que a violaceína em polímero no estado sólido (que absorve em 260 nm) possui o nível excitado de mais alta energia, caracterizando o “blue-shifted”.

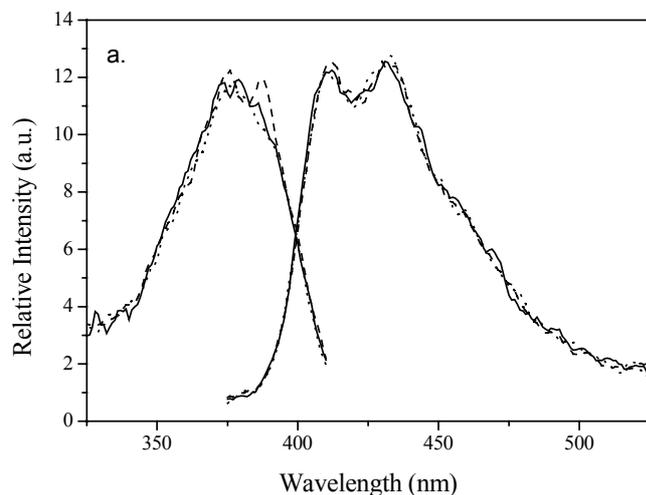


Figura 33: Espectros de fluorescência ($\lambda_{exc} = 370$ nm) e excitação ($\lambda_{em} = 416$ nm) de solução de violaceína (2.32 mMol L^{-1}) com várias quantidades de PCL: 0.1 (.....), 0.2 (----), and 5.5 mg L^{-1} (—).

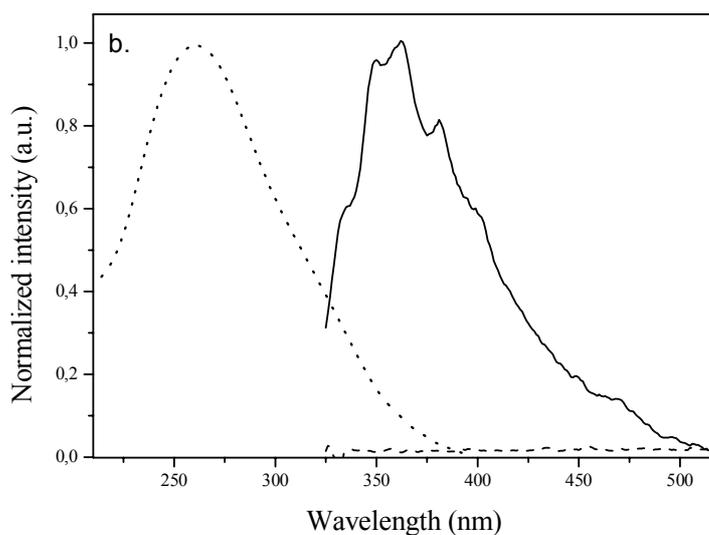


Figura 34. Espectros de absorção (.....) e fluorescência (—) de violaceína incorporada às microesferas de PCL; espectro de fluorescência de cristais de violaceína (----).

b. Fotofísica no estado estacionário e resolvida no tempo: violaceína livre e encapsulada, no estado sólido

A violaceína no estado sólido não é fluorescente no intervalo de 200-600 nm, enquanto que a incorporada na matriz polimérica é fluorescente. A organização molecular da violaceína presente nas microesferas é necessariamente diferente que no estado cristalino, ambos no estado sólido. Como ocorre com outros corantes, as interações corante-corante na fase cristalina não levam à emissão enquanto que a predominância das interações polímero-violaceína levam a uma resposta emissiva. Este resultado concorda com alguns trabalhos que investigam corantes na presença de polímeros. A dextrorubicina incorporada a nanoesferas de poli(isohexilcianoacrilato), que formam espécies com diferentes estruturas por utilizar diferentes metodologias para o encapsulamento (dextrorubicina livre, incorporada durante o processo de polimerização e apenas adsorvida a partícula pré-formada)¹¹⁵. Foi observada emissão de violaceína quando adsorvida em microesferas de PCL, centrada em $\lambda_{em} = 360$ nm, com um longo prolongamento no intervalo 450-550, associada com a emissão azul visualizada nas imagens de fluorescência. O espectro de reflectância mostra absorção em 260 nm **(Figura 34)**.

O tempo de vida de fluorescência de um fluoróforo representa o tempo médio que ele passa no estado excitado antes de chegar ao estado fundamental e é sensível ao ambiente químico em que é encontrado. A técnica que escolhemos para estudar o tempo de vida da violaceína presente nas microesferas foi a de contagem de fótons unitários correlacionada com o tempo (mais conhecida como “time-correlated single-photon counting”). A amostra foi excitada através de uma fonte pulsátil de luz de frequência alta, e a resposta da amostra a estes pulsos

(decaimento emissivo) é rapidamente detectada e permite a contagem do fóton emitido após a relaxação da molécula do estado excitado para o fundamental. O método “time-correlated single-photon counting” reconstrói o perfil de decaimento no intervalo de tempo entre o fóton emitido e o pulso de excitação.

As microesferas contendo violaceína foram estudadas quanto ao tempo de vida de fluorescência e distribuição destes tempos de vida. Devido ao fato de diferentes fluoróforos terem tempos de decaimento distintos, diferentes populações de fótons podem ser detectadas no estado excitado, dando informação sobre a microheterogeneidade da partícula, se houver diferentes ambientes moleculares para este fluoróforo.

A **Figura 35** mostra o perfil da curva de decaimento de fluorescência da violaceína incorporada em microesferas de PCL ($\lambda_{em} = 370$ nm e $\lambda_{exc} = 276$ nm). Trata-se de um gráfico de intensidade de fluorescência da amostra versus o tempo (em ns), em que se faz um ajuste exponencial (teórico) selecionando os os tempos de vidas que levam ao melhor ajuste possível. A análise das curvas de decaimento temporal foi feita pelo método de mínimos quadrados não linear, minimizando o parâmetro χ^2 . A curva experimental foi consruída a partir da função multiexponencial:

$$I(t) = A_1 \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(\frac{-t}{\tau_2}\right) + A_3 \exp\left(\frac{-t}{\tau_3}\right)$$

Em que τ_1 , τ_2 , and τ_3 são os tempos de vida de fluorescência e A_i são os termos pré-exponenciais. Excluindo o componente de espalhamento da lâmpada, dois tempos de decaimento foram observados: um mais longo ($\tau_1 = 14.0$ ns) e outro mais curto ($\tau_2 = 3.6$ ns). Decaimentos biexponenciais são usualmente observados

em meios microheterogêneos e são atribuídos à presença de duas populações de violaceína: uma população de moléculas está completamente isolada e não interage com outra dentro do tempo de vida do estado excitado. O tempo de vida mais longo é atribuído a esta população. A segunda população exibe significativa supressão da fluorescência, a qual é originada de moléculas que ou são agregados no estado eletrônico fundamental ou formam excímeros e exiplexos¹¹⁶.

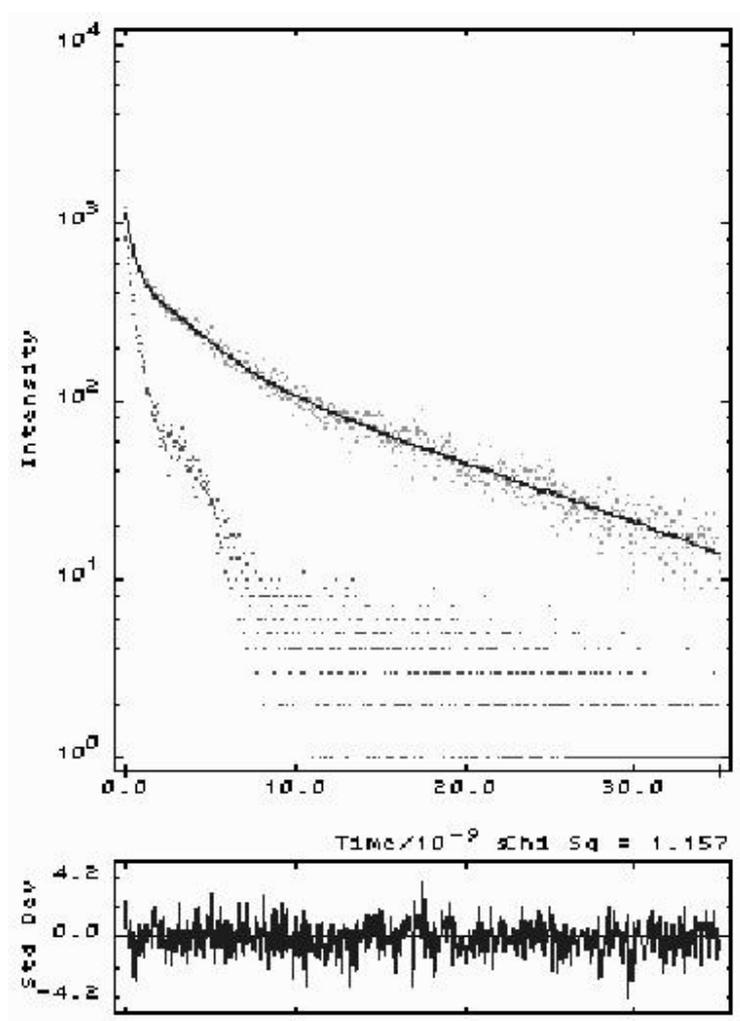


Figura 35: Histograma de emissão de fluorescência para o sistema micrométrico contendo violaceína; $\lambda_{\text{exc}} = 276 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 370 \text{ nm}$.

4.2. Sistema nanométrico PLGA-PLURONIC-PVA-violaceína –água-acetona

4.2.1. Metodologia de formulação das nanoesferas poliméricas pelo método de nanoprecipitação. Eficiência de encapsulação e cinética de liberação.

Nanoesferas pertencem a uma classe de sistemas multifásicos na qual uma ou mais microfases estão dispersas em uma matriz contínua de composição ou estado físico diferente. A principal característica das suspensões de nanoesferas é a grande área interfacial entre as fases dispersa e contínua. Dispersões coloidais são metaestáveis e podem exibir significativa estabilidade cinética, que previne agregação.

O método da “nanoprecipitação” é o chamado método do deslocamento de solvente, no qual o polímero, o fármaco e se necessário um surfatante lipofílico são dissolvidos em um solvente miscível em água, como acetona.

A fase orgânica é vertida, sob agitação, sobre uma fase aquosa, contendo surfatante. Nanoesferas são formadas instantaneamente (separação de fases líquido-líquido) com rápida difusão do solvente e agregação do polímero em gotas individuais¹¹⁷. As nanopartículas são formadas por rápida difusão do solvente, que é eliminado sob pressão reduzida e ocorre agregação do polímero como uma fase separada.

As nanoesferas preparadas pelo método de “nanoprecipitação” formam-se quase que instantaneamente, pois a força dirigente é a separação de fases. A **Figura 36** mostra o aspecto da dispersão assim que a fase orgânica foi adicionada. Nota-se uma grande homogeneidade da dispersão, sem a presença de coágulos e um tom azulado devido ao espalhamento causado pela dispersão das nanoesferas.

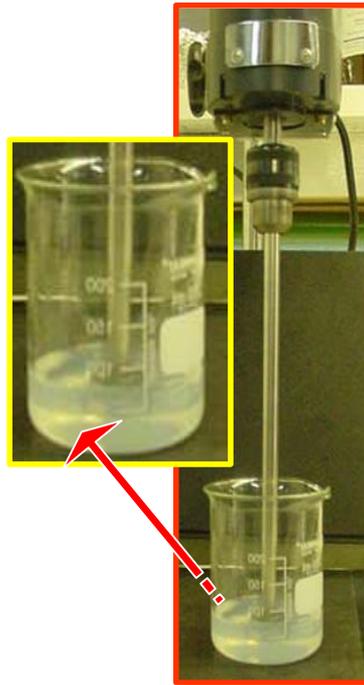


Figura 36: Aspecto das nanoesferas preparadas por separação de fases de polímero pré-formado.

A formação e o tamanho pequeno das partículas pode ser entendido, se pensarmos que elas se formam devido a uma separação de fases líquido-líquido, após adição da fase orgânica, tendo-se uma fase rica em material polimérico,¹¹⁸ (interior da micela, hidrofóbico) e outra rica em acetona e água¹¹⁹

A quantificação da massa total de violaceína incorporada às nanoesferas é importante para a aplicação nos ensaios biológicos *in vitro*. O resultado desta quantificação foi o seguinte (duplicatas, I e II):

a. Amostra (I): 0,0100 g de formulação em 11,0 mL de acetona

$C = 1,495 \times 10^{-5}$ g de violaceína/ mL de solvente.

Massa total de violaceína (g): $1,644 \times 10^{-4}$ g de violaceína.

A amostra I possui, portanto $1,628 \times 10^{-2}$ g de violaceína/g de formulação.

b. Amostra (II): 0,0100 g de formulação em 11,0 mL de acetona

$C = 1,362 \times 10^{-5}$ g de violaceína/ mL de solvente.

Massa total de violaceína: $1,498 \times 10^{-4}$ g de violaceína.

A amostra II possui, portanto $1,498 \times 10^{-2}$ g de violaceína/g de formulação.

Existem (0.016 ± 0.002) mg de violaceína/mg de formulação de nanopartículas. A eficiência de encapsulamento obtida, em relação à massa de violaceína inicialmente adicionada (4 mg): $0,0018$ g de violaceína incorporada / $0,004$ g (total de violaceína adicionada) * $100 \cong 45\%$ de violaceína foi aproveitada.

A cinética de liberação de violaceína encapsulada, em meio contendo Pluronic a 10%, está mostrada na **Figura 37**. A liberação foi acompanhada por UV-vis (580 nm) durante 144 horas, em intervalos de 24 horas, em sistema fechado.

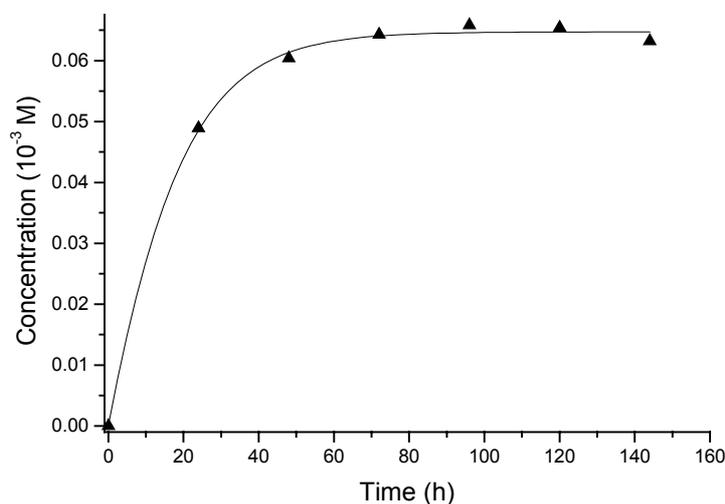


Figura 37: Perfil de liberação *in vitro* de violaceína com o tempo de nanopartículas de PLGA-PLURONIC-PVA, acompanhada por 144 horas, em intervalos de 24 horas.

A quantidade total encapsulada é de $(0,016 \pm 0,002)$ mg de violaceína/mg de formulação. Neste ensaio, foram adicionados 6 mg de formulação, veiculando-se, portanto, 0,096 mg de violaceína. Logo, a concentração final de violaceína esperada no frasco no final do ensaio, considerando-se o desvio padrão, é de $(0,056 \pm 0,007) 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Observando-se o gráfico, nas primeiras 24 horas ocorreu um “burst”¹²⁰, em que quase a quantidade total de violaceína foi liberada. Em seguida esta concentração não variou mais, atingido um patamar, cujo valor indica que todo o composto foi liberado da matriz polimérica.

4.2.2. Caracterização morfoquímica das nanoesferas

a. Microscopia eletrônica de varredura

As nanoesferas de PLGA contendo violaceína foram observadas por microscopia eletrônica de varredura, com elétrons secundários. Durante esta caracterização, ocorreu deformação e fusão de algumas partículas devido à exposição à temperatura alta conferida pelo feixe de elétrons e, portanto, as imagens tiveram de ser rapidamente capturadas.

A primeira observação que pode ser feita com relação à morfologia destas nanoesferas é que elas apresentam diferenças de tamanho bem menor quando comparadas às microesferas, como se pode observar na **Figura 38**. Este fato pode ser entendido, se pensarmos na rápida difusão da acetona após a “nanoprecipitação” (separação de fase) e no crescimento das nanoesferas no núcleo de micelas do copolímero-bloco Pluronic (PEO-PPO-PEO). Este núcleo funciona

como um ambiente lipofílico no qual as cadeias de polímero podem ficar confinadas.

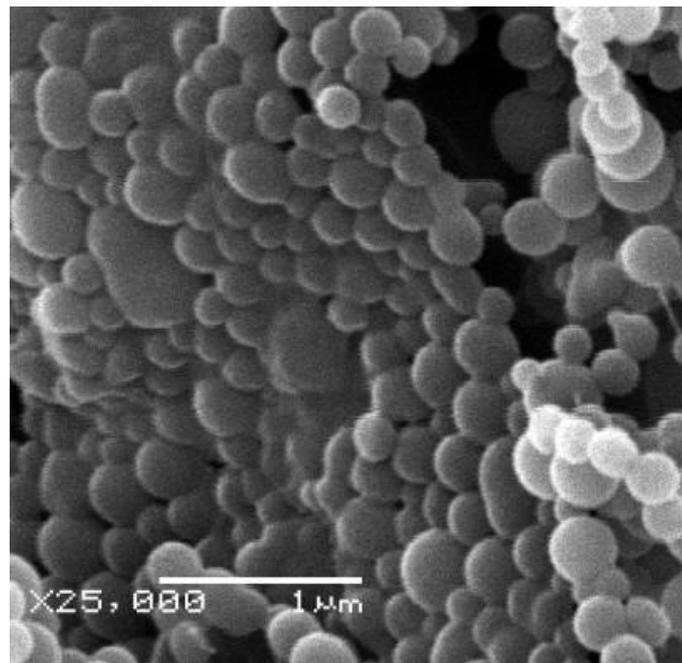
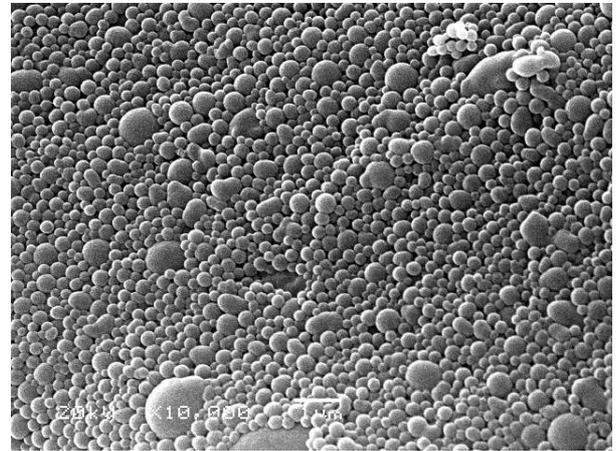
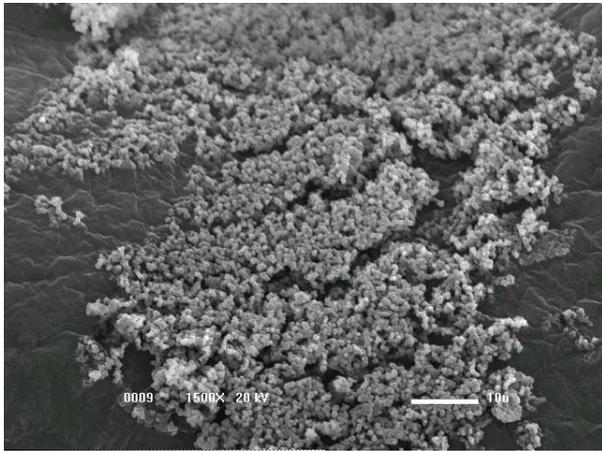
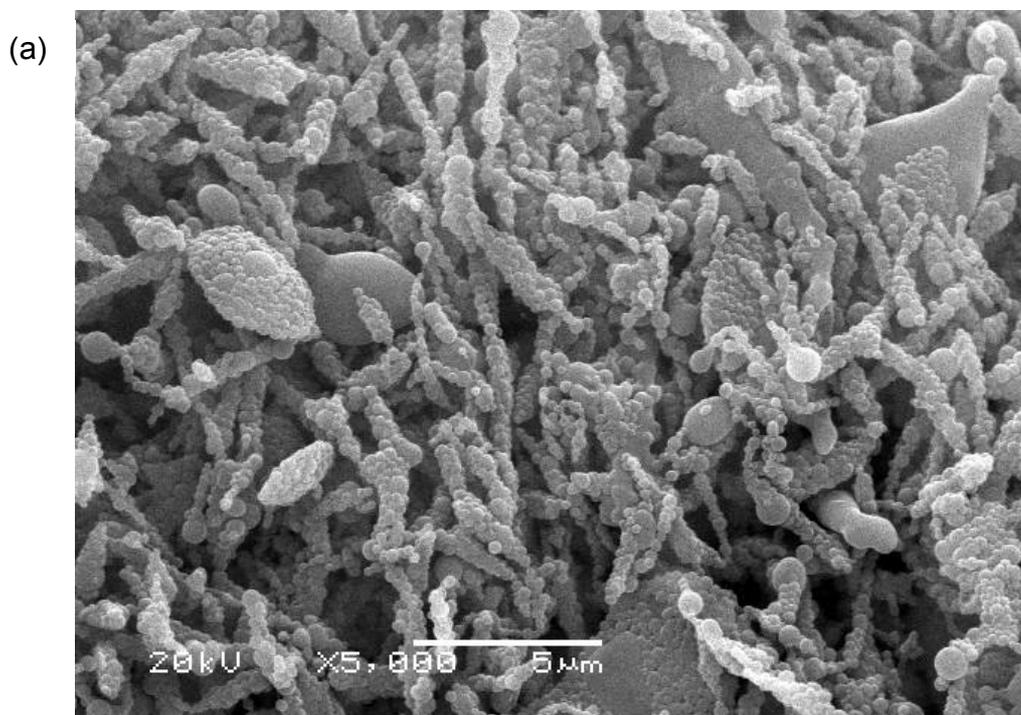


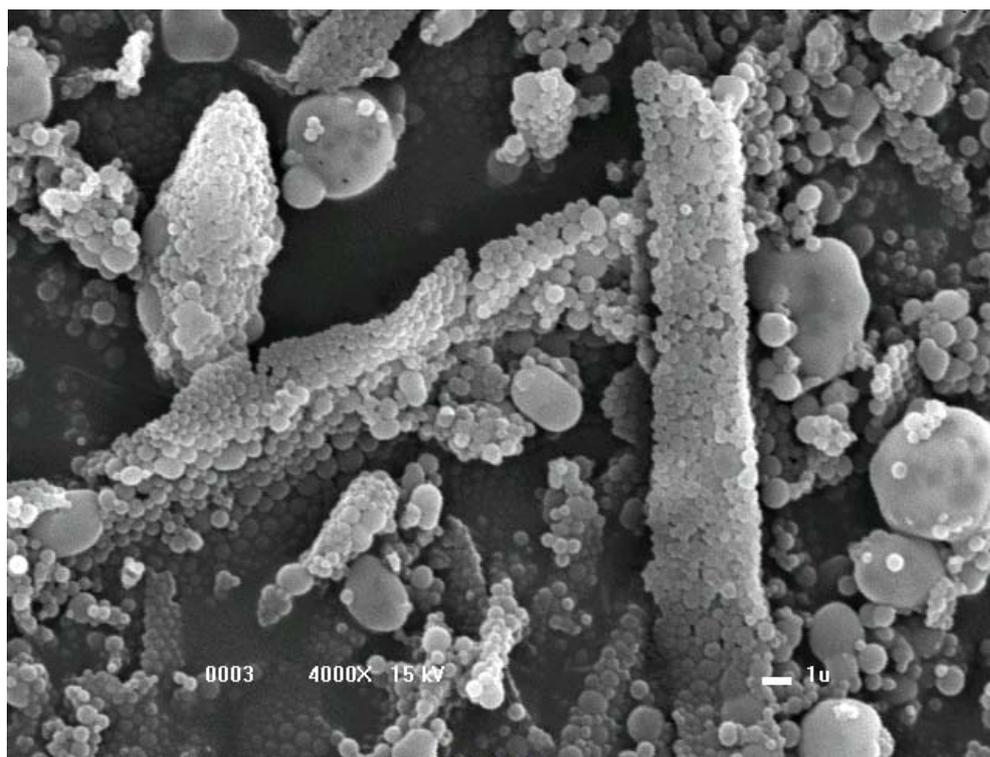
Figura 38: Nanoesferas de PLGA-PLURONIC-PVA contendo violaceína mostrando pouca diferença em diâmetro. Imagens obtidas por SEM, 20 kV, em aumento de 1500 x.

É importante notar que embora as partículas pareçam ter sofrido coalescência, este fato não se verifica: houve boa redispersão das nanoesferas em água. O que ocorre é a formação concomitante de traços de gel, provavelmente originados da dissolução de PVA de alta massa molar. A presença deste gel permeando as partículas foi observado por microscopia confocal, como descrito no item b desta sessão.

Uma característica morfológica muito interessante é o confinamento da nanoesferas mostrando padrões não regulares de organização. Em alguns casos até mesmo uma discreta auto-organização é observada, formando estruturas esféricas grandes compostas por nanoesferas (**Figuras 39 e 40**). O que aparentava agregados macroscopicamente refere-se a estruturas como estas e por isso flutuavam no ar quando se faziam amostragens das partículas para análise no microscópio.



(b)



(c)

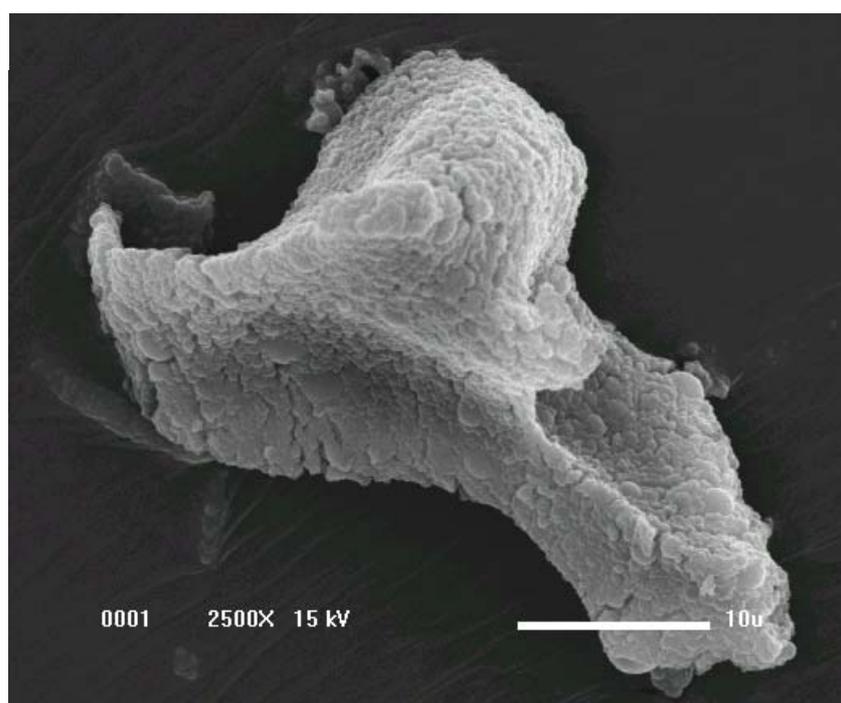


Figura 39: Nanoesferas de PLGA-PLURONIC-PVA-violaceína mostrando padrões não regulares de organização. Imagens obtidas por SEM, 20 kV, em aumento de (a): 5000 x, (b): 4000 x, (c): 2500 x.

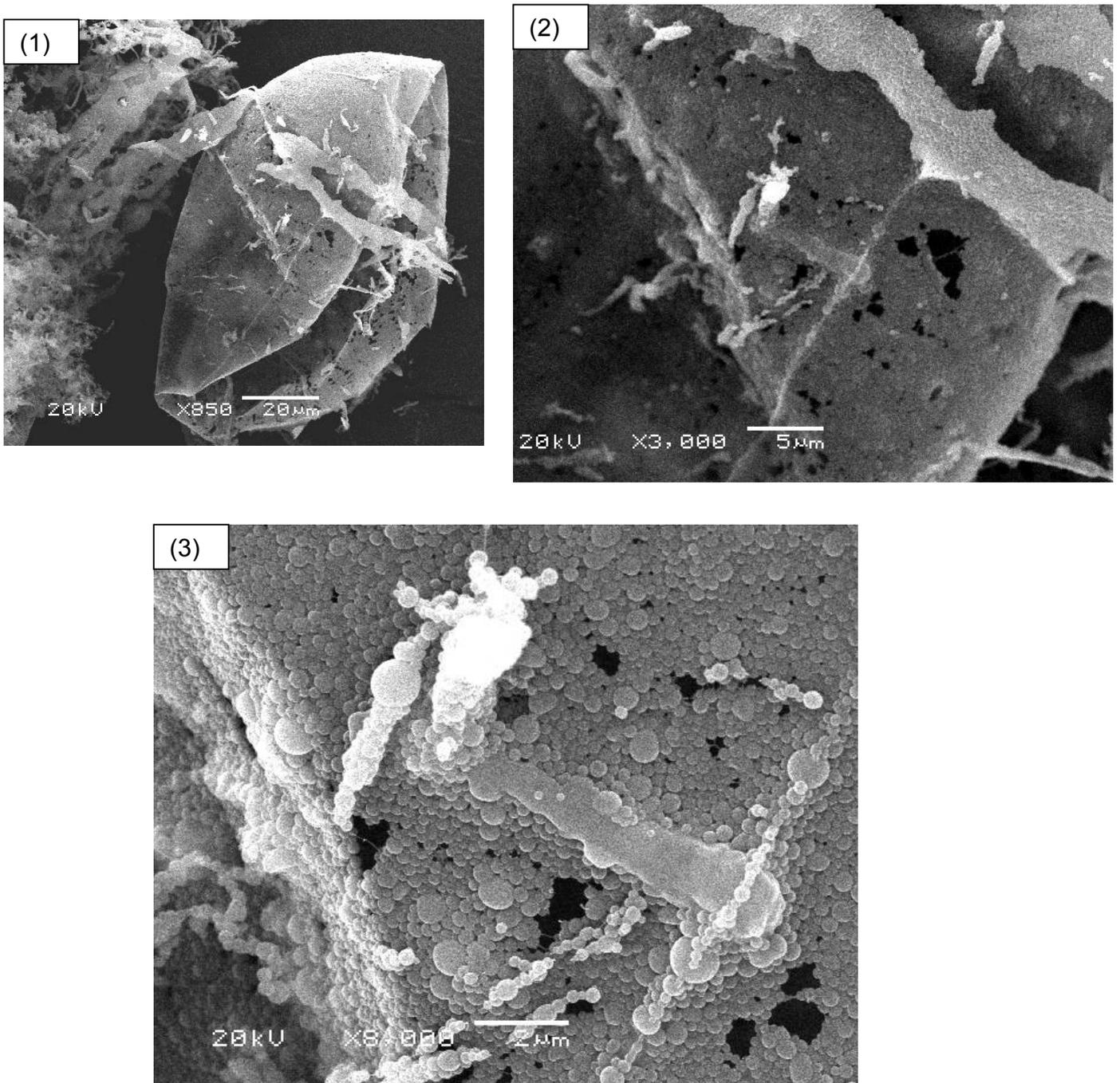


Figura 40: Nanoesferas formadas no sistema PLGA-PLURONIC-PVA, mostrando auto-organização, em aumentos sucessivos: (1) 950x, (2) 3000x e (3) 8000x.

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi útil também para verificar a extensão da degradação nas partículas do sistema PLGA-PLURONIC-

PVA, após o ensaio de cinética de liberação em meio tampão fosfato pH=7.4 a 37 °C. As amostras ficaram em contato com o tampão por aproximadamente 50 dias. Observa-se na **Figura 41** que as nanopartículas se degradam por desfolhamento, o que é uma informação acerca de sua estrutura, provavelmente formada por estruturas em lamelas compactadas.

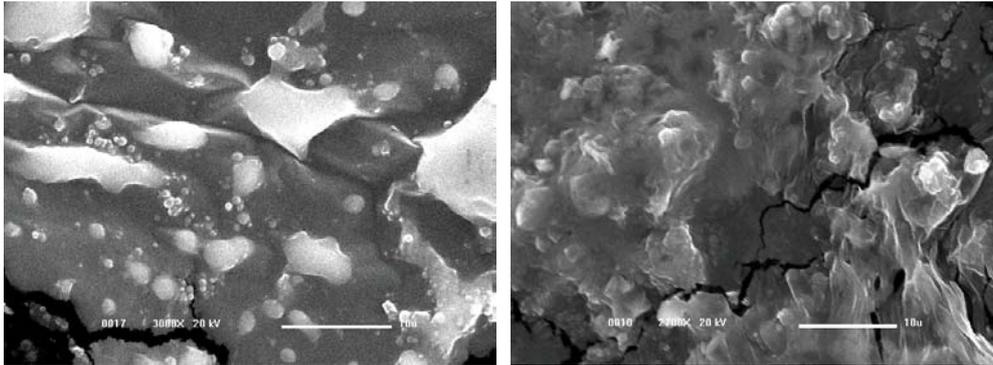


Figura 41: Nanoesferas formadas no sistema PLGA-PLURONIC-PVA, após 50 dias em meio tampão fosfato pH=7.4 a 37 °C.

Estas lamelas apareceram também nas microesferas, como notamos em um detalhe (seta) na **Figura 42**.

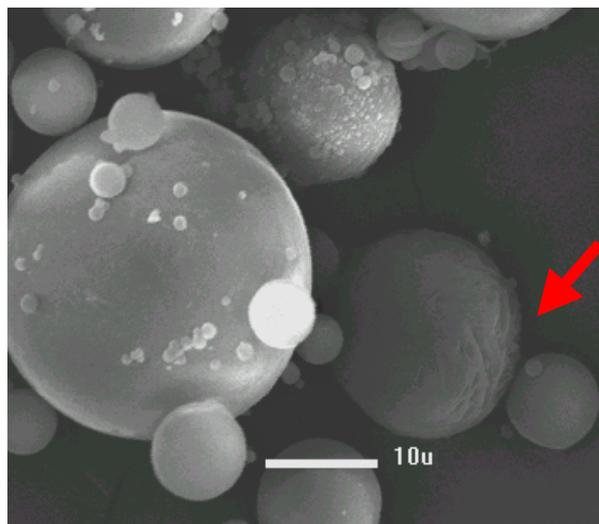


Figura 42: Microesferas formadas no sistema PCL-Tween 40-água-vioaceína-EtAc mostrando heterogeneidade.

b. Microscopia de varredura a laser confocal

Em uma tentativa para verificar se há algum indício de diferença na composição entre os domínios do gel (provavelmente advindos do PVA, que possui dificuldade de dissolução) e das nanopartículas, foi feita uma análise da dispersão por microscopia confocal. Este resultado mostrou que houve dupla fluorescência (**Figura 43**): verde (para a partícula, λ obtido por filtro passa-banda de 505 a 530 nm) e vermelha (para o gel, λ acima de 570nm). Este resultado foi obtido por “multitracking”, ou seja, as imagens foram adquiridas ao mesmo tempo, independentemente. De fato nanopartículas pertencem a um domínio e gel a outro.

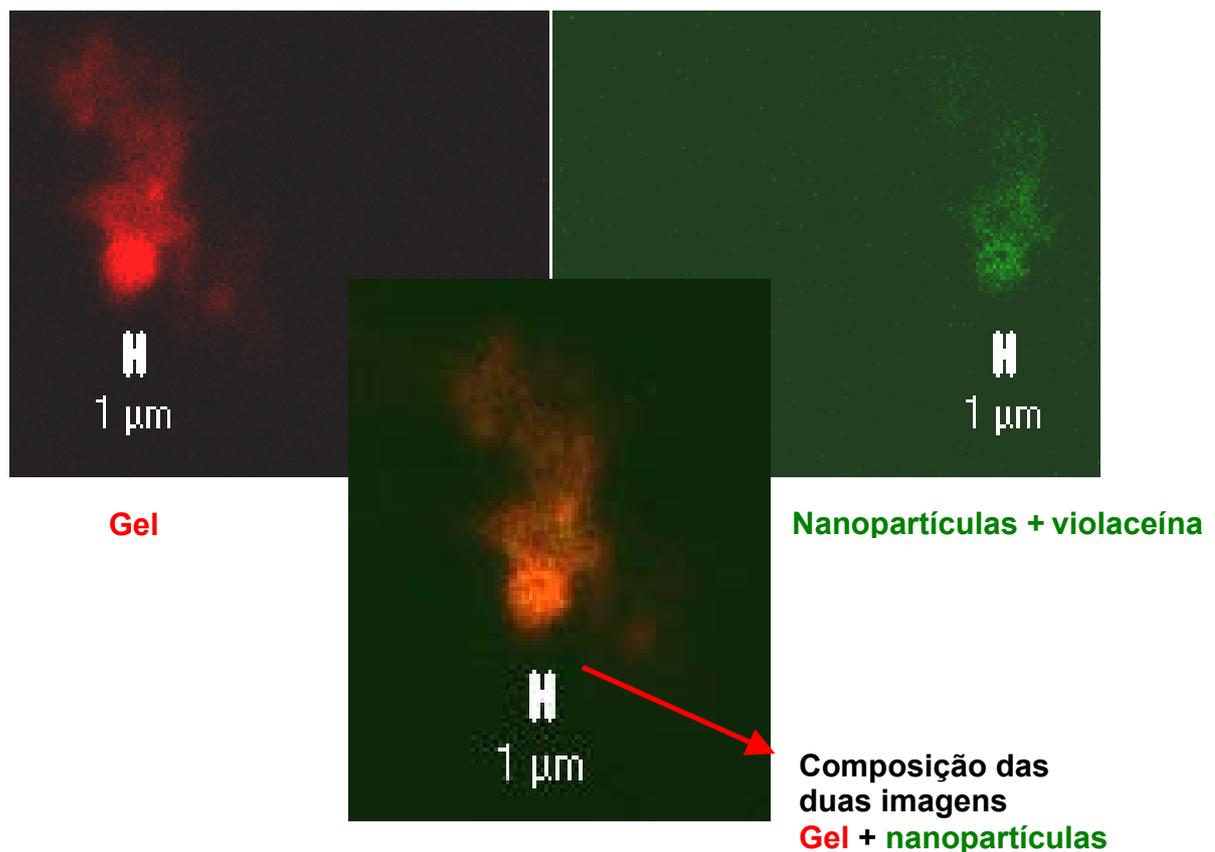


Figura 43: Dupla fluorescência em microscopia confocal : diferentes domínios do gel e das nanoesferas.

c. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A **Figura 44** apresenta micrografias eletrônicas de transmissão das nanoesferas de PLGA-PLURONIC-PVA, com imagens obtidas em campo claro.

As micrografias obtidas por TEM mostraram que as nanopartículas com ou sem violaceína não são formadas por uma matriz maciça. Elas podem possuir estrutura folheada, em camadas superpostas. Este fato se pode observar na heterogeneidade (como em microesferas) das partículas contendo violaceína (figura 14-a) ou nas laterais das partículas em aumentos maiores (setas em 14-b); há muitos espaços vazios no interior da partícula provocados pela presença de partículas ainda menores, contrariando o sistema monolítico defendido na literatura¹²¹.

Concluimos que o interior da nanopartícula não é um contínuo, mas é formada por estruturas esféricas finamente divididas, que podem ser agregados de cadeias poliméricas. Este fato questiona a uniformidade das micro e nanoesferas “maciças” corrente na literatura, comumente classificadas como estruturas matriciais, monolíticas. Esta definição clássica deve ser vista com cuidado, uma vez até mesmo a presença de água nas gotículas de fase orgânica pode levar à microheterogeneidade no interior das esferas.

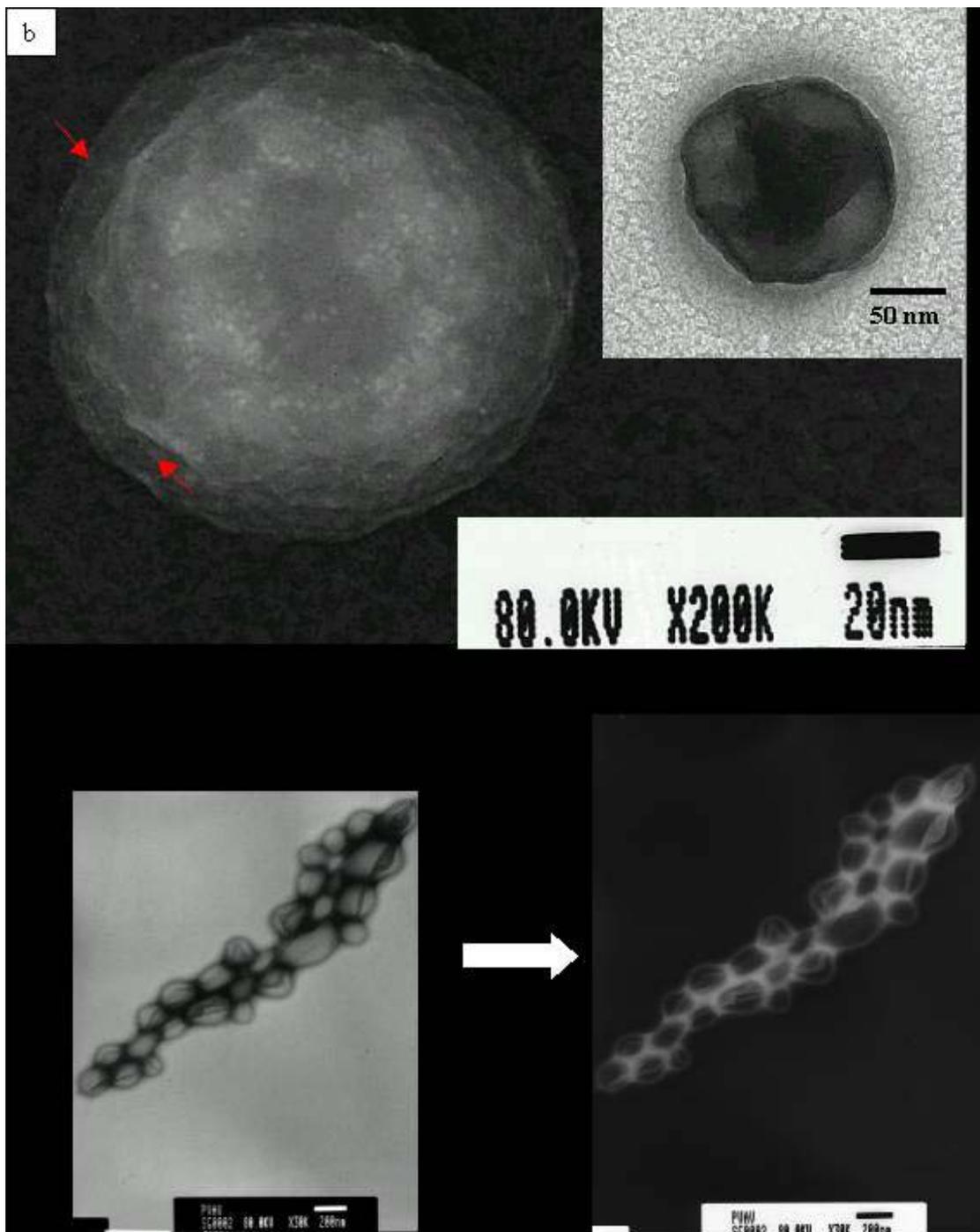


Figura 44: Nanopartículas formadas no sistema PLGA-PLURONIC-PVA contendo violaceína, evidenciando estrutura em camadas e a presença de esferas menores em seu interior.

4.2.3. Diâmetro médio por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (ζ) na superfície de cisalhamento

Os resultados de diâmetro médio das partículas (controle e com violaceína) estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Medidas de diâmetro médio das nanopartículas de PLGA obtidas por mobilidade eletroforética das partículas.

| <i>Medidas (nm)</i> | <i>Nanopartículas (controle)</i> | <i>Índice de polidispersidade (controle)</i> | <i>Nanopartículas (com violaceína)</i> | <i>Índice de polidispersidade (com violaceína)</i> |
|--------------------------------|---|---|---|---|
| diâmetro 1 | 553.7 | 0.305 | 814.4 | 0.302 |
| diâmetro 2 | 507.0 | 0.257 | 802.4 | 0.288 |

Estes valores representam o diâmetro efetivo das nanopartículas. Normalmente este diâmetro é maior que o observado nas microscopias. Isto é devido à presença, na superfície das partículas, de uma camada de hidratação e também devido à adsorção de cadeias poliméricas do surfactante, que se projetam em direção à fase aquosa (forte solvatação) e são denominadas “cabelos” (hairs), ocasionando um aumento do diâmetro (hidrodinâmico, efetivo) da partícula.¹²² É o caso aqui, em que provavelmente temos cadeias de PLURONIC adsorvidas na superfície e expostas à água.

Os índices de polidispersidade são baixos e sua flutuação se deve à possível presença de resíduos de surfactante solubilizados. As partículas contendo violaceína apresentam 330 nm em média a mais no diâmetro, o que ainda não é muito entendido. A literatura mostra casos de um aumento no tamanho mas

também de diminuição, após incorporação do fármaco^{123,124}. Há algumas hipóteses: a presença da violaceína no meio altera o tamanho crítico das gotas na separação de fase, pode indicar maior solvatação pela água (cadeias mais relaxadas expõe melhor os grupos carboxilato ao exterior) ou maior adsorção de Pluronic na superfície de partículas bastante hidrofóbicas pela presença de violaceína. A formação das partículas é alterada pela presença do fármaco, como por exemplo, nos casos em que a presença de perfloxacina adicionada durante a preparação em nanopartículas de poli(alquicianoacrilato), na presença de Pluronic, prolongava o tempo de polimerização, levando à obtenção de partículas com mais alta massa molar.¹²⁵

As medidas de potencial zeta se baseiam no seguinte: a carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contraíons junto à superfície. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. Essa dupla camada divide-se em duas regiões: uma região interna que inclui íons fortemente ligados à superfície e uma região exterior onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico. Dessa forma, o potencial nessa região decai com o aumento da distância da superfície até uma distância suficientemente grande, atingir o potencial da solução. Esse potencial é convencionalmente chamado de potencial zero. Em um campo elétrico, como em microeletroforese, cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade, e o potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é chamada potencial zeta (**Figura 45**).

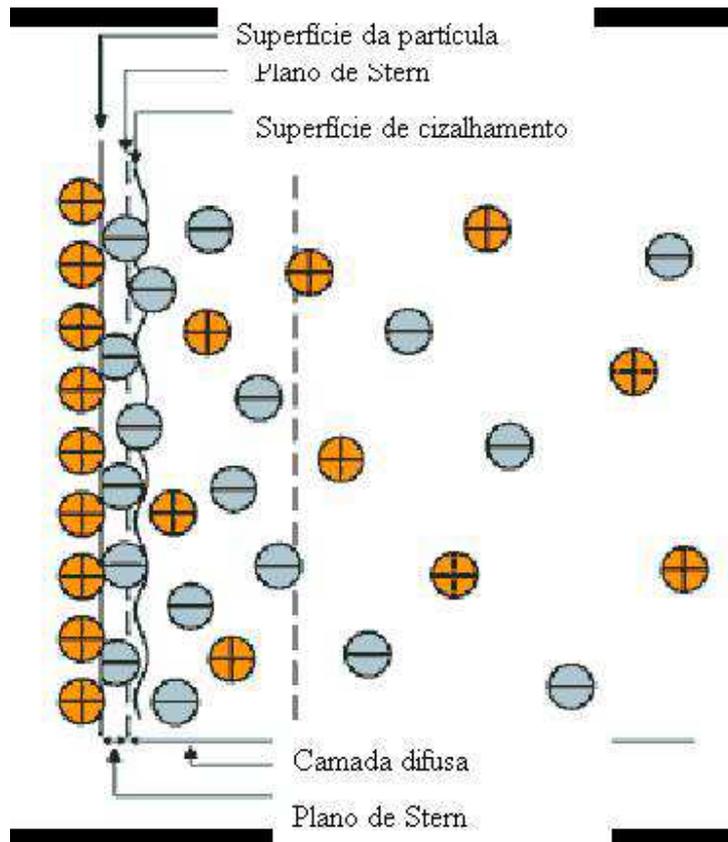


Figura 45: Esquema representativo da dupla camada elétrica.

Quando uma camada de macromoléculas é adsorvida na superfície da partícula, ela move o plano de cisalhamento para longe da superfície, alterando o potencial zeta. 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.

Os valores medidos de potencial zeta para o controle e para nanopartículas contendo violaceína estão apresentados na **Tabela 2**. O valor do potencial zeta para nanoesferas contendo violaceína é mais negativo que para nanoesferas sem violaceína. Uma possível explicação para isso é a ionização dos grupos carboxílicos presentes como grupos pendentes no polímero, que se posicionam na interface partícula/água devido à relaxação das cadeias poliméricas intumescidas. Pode ter ocorrido um desbalanceamento de íons no plano de Stern, o que reflete na

superfície de cisalhamento¹²⁶

Tabela 2: Medidas de potencial zeta (ξ) das nanopartículas de PLGA por espectroscopia de correlação de fótons.

| <i>Medidas (mV)</i> | <i>Nanopartículas (controle)</i> | <i>Nanopartículas (com violaceína)</i> |
|---------------------|----------------------------------|--|
| potencial 1 | -2,66 ± 0.80 | -11,30 ± 0.55 |
| potencial 2 | -1,49 ± 0.98 | -12,06 ± 0.99 |

4.2.4. Medidas de Tensão Superficial e Interfacial

Para simularmos o sistema de emulsão utilizado neste trabalho, nas mesmas concentrações das usadas na preparação, medimos a tensão interfacial entre água e solução de violaceína em acetato de etila (EtAc) (acetona não seria possível, pois é miscível em água) nas seguintes condições: água/solução de violaceína em EtAc; água/solução de violaceína em EtAc com PLURONIC + PVA, água e cada surfatante separados e misturados (**Tabela 3**).

Tabela 3: Medidas de tensão superficial (para as soluções) e interfacial para os sistemas bifásicos utilizados nas emulsões para a preparação de nanopartículas.

| <i>Amostra</i> | <i>Tensão Superficial / Interfacial (mN m⁻¹)</i> |
|---|---|
| água deionizada | 73.45 ± 0.91 |
| solução aquosa de PVA 2.5% | 53.82 ± 0.16 |
| solução aquosa de F-68 2.5% | 47.68 ± 0.14 |
| solução aquosa de PVA+F-68 2.5% | 48.57 ± 0.15 |
| água + violaceína em EtAc (2 fases) | 25.90 ± 0.62 (interfacial) |
| água + violaceína em EtAc com PVA+F-68 2.5 % (2 fases) | 29.49 ± 0.37 (interfacial) |

Estes resultados mostram três fatos importantes:

1. Há um abaixamento próximo da tensão superficial da água quando se troca PVA por F-68, sendo melhor o F-68;
2. Não há vantagem (em termos de redução da tensão superficial) em se adicionar 2 surfactantes; o abaixamento é igual ao provocado pelo F-68;
3. a tensão interfacial de um sistema água/óleo é semelhante com e sem surfactante, o que indica que a estabilização é devida à maior viscosidade do filme interfacial devido à adição de PVA.

4.2.5. Atividade biológica das nanoesferas em cultura de células

a. Citotoxicidade e viabilidade celular

A citotoxicidade basal da violaceína incorporada em nanoesferas foi comparada à de violaceína livre, em cultura de células V79 (linhagem de

fibroblastos) e HL-60 (linhagem leucêmica promielocítica humana), através de uma série de testes de citotoxicidade *in vitro*, que estão analisados a seguir: a redução do MTT, atividade de fosfatase, método de exclusão do azul de tripan e incorporação do vermelho neutro.

a.1. Redução do MTT e Atividade de Fosfatase

O ensaio de redução do MTT se baseia na redução do sal MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio), um substrato amarelo escuro solúvel em água, pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase de células viáveis, originando como produto o formazan, um composto azul escuro solúvel em solventes orgânicos¹²⁷. A enzima succinato desidrogenase atua como uma doadora de elétrons na redução do MTT, através da succinato desidrogenase mitocondrial. De fato, este ensaio avalia predominantemente o balanço redox NAD^+/NADH . Este processo ocorre apenas quando a mitocôndria está viável, ou seja, com o sistema enzimático funcionando corretamente, mantendo a atividade de desidrogenases¹²⁸. O MTT (composto tetrazólico) é bio-reduzido pelas células em um produto colorido, formazan (sal tiazólico). Esta conversão provavelmente ocorre às custas de NADPH ou NADH produzidos por desidrogenases em células metabolicamente ativas¹²⁹.

Uma vez que esta conversão ocorre apenas em células vivas, a quantidade de formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis na cultura. Os valores de absorvância sendo menores que o controle indicam uma redução na taxa de proliferação celular e o contrário é observado no caso de haver proliferação.

O outro parâmetro de citotoxicidade medido foi a atividade de fosfatases, hidrolases que utilizam como substrato monoésteres e participam de diversos eventos de fosforilação envolvidos em mecanismos de transdução de sinais controlando o crescimento e a diferenciação celular¹³⁰. Trata-se de um método

geral para avaliar viabilidade celular: se a célula estiver viva, estará com atividade das enzimas fosfatases alta. Logo, coloca-se um substrato (p-nitrofenilfosfato, incolor) que sofre a ação da enzima fosfatase, perdendo o grupo fosfato na posição para e originando o p-nitrofenol. O p-nitrofenol, quando em meio alcalino, está em ressonância com o anel quinônico, originando uma cor amarela.

Com estes dois ensaios, o efeito citotóxico da violaceína livre e encapsulada em nanopartículas foi examinado no crescimento e viabilidade das células tumorais HL60 após 72 h em cultura.

Os resultados de redução do MTT e atividade de fosfatase estão apresentados na **Figura 46**. Com a violaceína livre a viabilidade celular diminuiu após o tratamento de forma dose-dependente. O valor de IC_{50} da violaceína livre para os dois ensaios foi de 0,6 e 0,7 $\mu\text{Mol L}^{-1}$, respectivamente.

A violaceína encapsulada foi menos citotóxica quando comparada com a livre **Figura 46**, tanto pelo ensaio do MTT (na concentração de 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ houve 40% de redução na viabilidade celular), quanto por atividade fosfatásica (IC_{50} próximo de 1,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Para a linhagem de células V79 a violaceína livre apresentou uma citotoxicidade na concentração de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a encapsulada de 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (pelo método de redução do MTT).

A menor citotoxicidade por conta das nanoesferas contendo violaceína pode se referir a uma hipótese: o ensaio de MTT responde melhor à violaceína livre no meio. Há dificuldade de liberação de violaceína para o meio de cultura que possui muito pouco DMSO, não solubilizando violaceína liberada. Adicionalmente, veremos à frente que as partículas foram boas indutoras de apoptose, o que sugere que o par violaceína+partícula seja o sistema ativo, sendo a liberação um fator secundário.

Uma grande vantagem das nanoesferas neste ensaio de MTT é a possibilidade de ministrar doses altas de violaceína sem matar todas as células, viabilizando o ensaio em doses maiores. Outra vantagem é a proteção de violaceína enquanto na matriz polimérica.

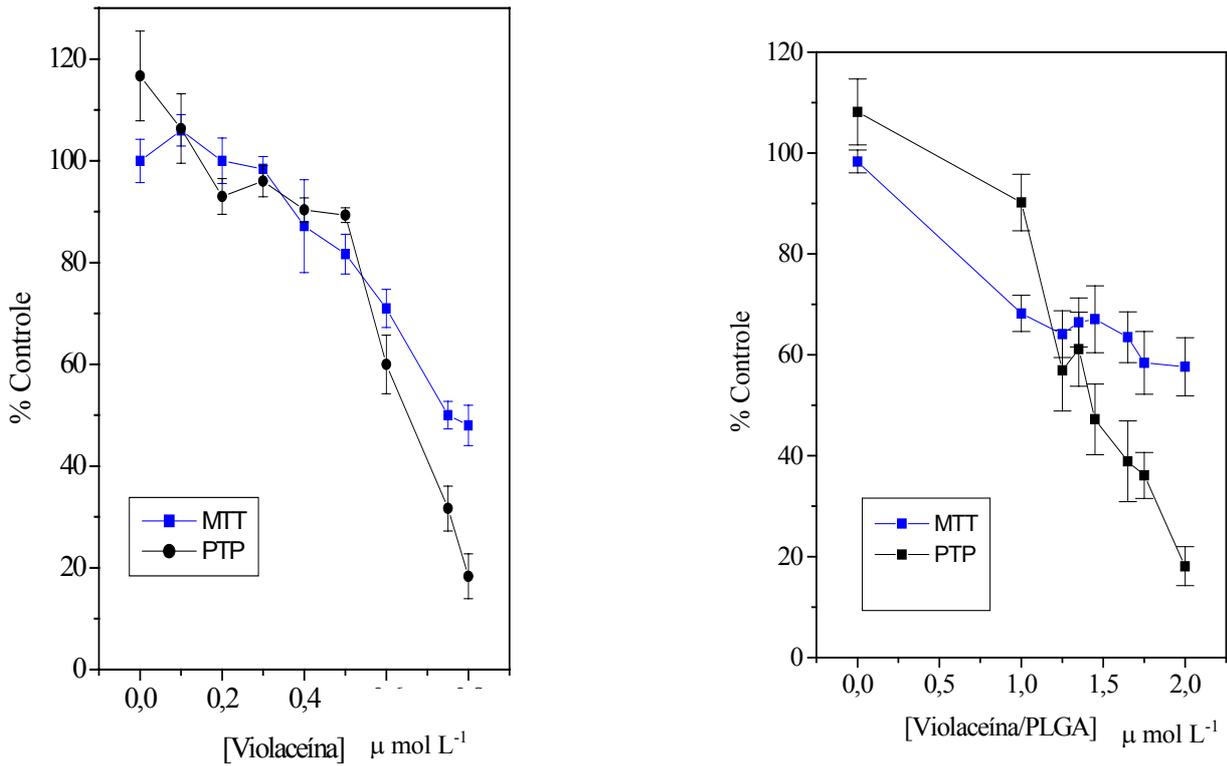


Figura 46. Viabilidade das células HL60 tratadas com a violaceína ou com a violaceína/PLGA durante 72h avaliada através da redução do MTT e atividade fosfatásica (PTP). Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de três experimentos em seis replicatas.

a.2. Exclusão do Azul de Tripán

A análise da viabilidade celular da cultura HL60, evidenciada com o auxílio de corantes, neste caso o azul de tripan, foi feita com o método de Exclusão do Azul de Tripán. Esta técnica é utilizada para avaliar a integridade da membrana celular e neste caso o fenômeno que chamamos de morte celular está baseado em mudanças da permeabilidade da membrana. Na célula morta, não viável, este corante se difunde rapidamente para dentro do citoplasma, sendo incorporado.¹³¹

Os resultados estão na **Figura 47**, mostram o número de células viáveis, excluindo-se as coradas com o Azul de Tripán. Por estes resultados percebe-se que nenhuma morte celular importante ocorre nos períodos de 6 h e 12 h. As variações são mais notórias a partir de 48 h, em que há diminuição das células viáveis com violaceína encapsulada na concentração de $2 \mu \text{mol L}^{-1}$ em violaceína. O composto livre foi citotóxico com $1 \mu \text{mol L}^{-1}$, após 72 h. O tratamento das células durante 72 h com a violaceína livre ($1 \mu \text{mol L}^{-1}$) e encapsulada em nanopartículas ($2 \mu \text{mol L}^{-1}$) afetou em cerca de 50% o crescimento das células, resultados que reforçam as a tendência do ensaio anterior.

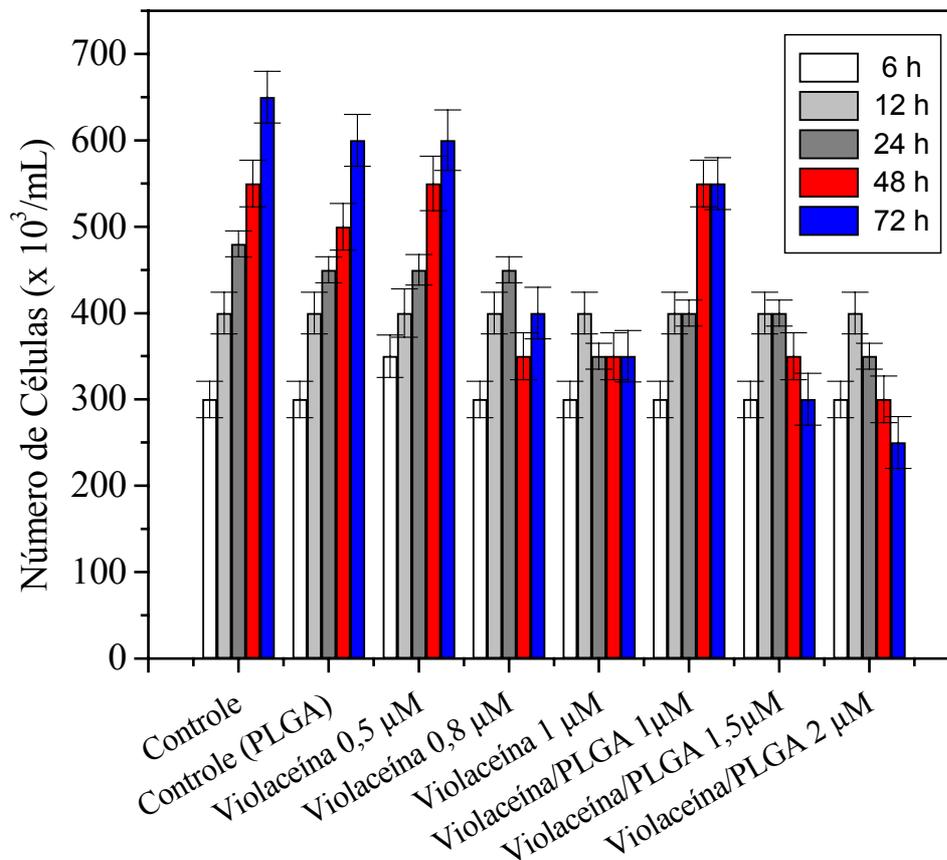


Figura 47. Número de células HL60 viáveis após diferentes tempos de tratamento com a violaceína ou com a violaceína/PLGA avaliado através da exclusão do corante azul de Tripan.

Para se avaliar a citotoxicidade das nanoesfras contendo violaceína em linhagem não tumoral foi escolhida a cultura V-79 (fibroblastos de Hamster chinês), na faixa de concentração de 0 a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína. A toxicidade foi avaliada por três experimentos diferentes: atividade de proteína fosfatase, redução do MTT e incorporação de vermelho neutro. Este último (teste do vermelho neutro) evidencia viabilidade celular por coramento. O vermelho neutro, corante solúvel em água, pode atravessar a membrana plasmática, concentrando-se

nos lisossomos. Se a membrana estiver danificada, há um decréscimo na captura do vermelho neutro.

Como a análise por fosfatase não atingiu o IC_{50} , foram aplicados os outros dois métodos. A Redução do MTT forneceu $IC_{50} = 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a incorporação de vermelho neutro forneceu um $IC_{50} = 5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A citotoxicidade de violaceína livre em V79 por MTT atingiu $IC_{50} = 5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, o que mostra que o sistema encapsulado pode ainda ser tóxico para linhagens não tumorais.

b. Determinação da Diferenciação Celular através da Redução do NBT

A terapia diferenciadora é baseada no desenvolvimento e uso de agentes especificamente selecionados, capazes de reiniciar ou iniciar o processo de diferenciação e eventual eliminação das células tumorais, com restauração do equilíbrio celular normal (homeostasia). A maioria das células tumorais permanece em um estado altamente proliferativo, devido à incapacidade de sofrerem maturação terminal em direção a células adultas, com capacidade não replicativa. Portanto, a perspectiva terapêutica para leucemias consiste na tentativa de controlar esta proliferação pela exposição das células tumorais a agentes antineoplásicos indutores de diferenciação celular terminal. As células da leucemia promielocítica HL60 representam um modelo para estudos dos mecanismos envolvidos na indução de diferenciação e apoptose em resposta a agentes anti-tumorais, por constituírem uma linhagem de células bloqueadas para diferenciação no estágio de promielócitos¹³².

As células HL60 quando diferenciadas em monócitos, macrófagos e granulócitos maduros produzem ânions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) quando estimuladas

com acetato de forbol-tetradecanoila. O ânion superóxido reduz o NBT produzindo depósitos de *nitro blue diformazan* (NBD) de cor preto-azulado¹³³.

Os dados observados na **Figura 48** mostram a quantificação da redução do NBT. A violaceína livre e encapsulada induziram diferenciação celular nas concentrações testadas. A violaceína livre induziu diferenciação em torno de 30 a 40% nas diferentes concentrações e nos diferentes tempos de tratamento (12, 24, 48 e 72 h). Em contraste, a violaceína/PLGA induziu diferenciação celular mais acentuada somente na concentração de 1,5 μM , sendo que no tempo de 48 h chegou a 100% de diferenciação celular. Este tempo de 48 horas sugere que diferenciação pode ser dependente, como nos ensaios de citotoxicidade, da violaceína que foi liberada da partícula.

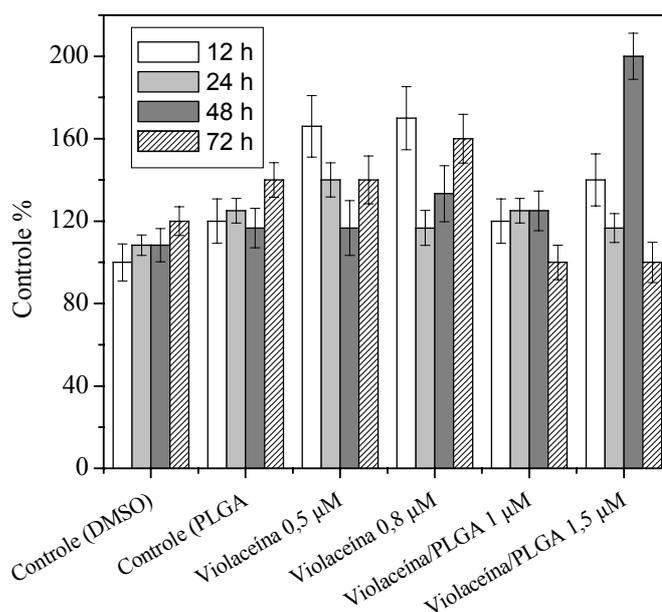


Figura 48. Redução do NBT por células HL60, induzidas a diferenciação, por violaceína livre e encapsulada em nanoesferas. Os dados mostrados são expressos como a porcentagem em relação ao controle (considerados como 100%) e são a média da quintuplicata \pm SD. O número de células foi fixado em $1,0 \times 10^6$.

c. Indução de morte celular por apoptose. Marcação com anexina V-FITC/PI analisada por citometria de fluxo.

Um citômetro de fluxo¹³⁴ é um instrumento dinâmico em que a amostra a ser analisada é movida passando pelos sistemas de excitação e detecção como mostrado na **Figura 49**.

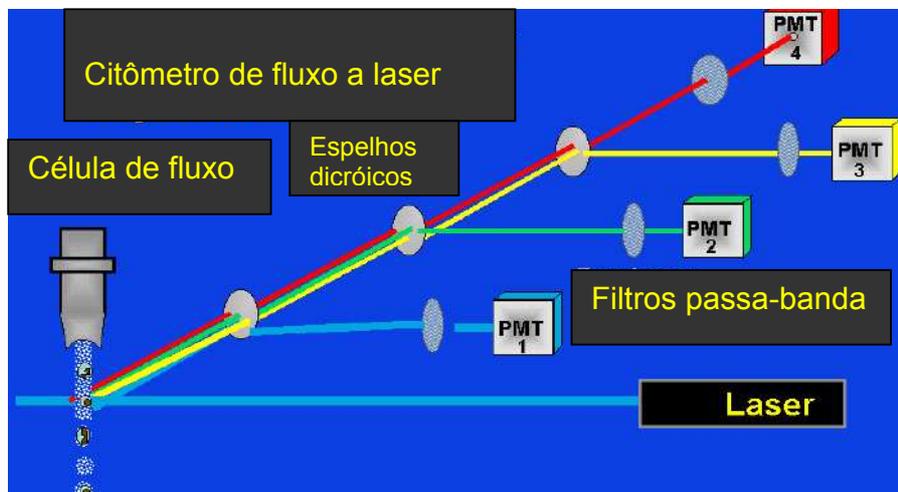


Figura 49: Esquema de um citômetro de fluxo

Durante a leitura, a dispersão de células marcadas com composto fluorescente desce sob pressão em um capilar. Neste caminho a corrente de células é exposta por 1-10 μ s a um feixe de laser, que deflagará um “burst” de fótons. Estes fótons, com auxílio de espelhos dicróicos e filtros, são detectados em um fotodetector. Pelo uso de marcadores apropriados é possível identificar diferentes células que passam através do feixe de laser. É possível se acoplar sistemas nos quais células que passaram pelo laser sejam separadas por aplicação de campo

magnético que deflete seu caminho para vários compartimentos, utilizando-se vários fluoróforos.

Este sistema foi útil para nós na verificação de ocorrência de apoptose nas células HL60. Este é um dado de grande importância, pois um dos principais objetivos da quimioterapia atual é a destruição das células tumorais pela indução de morte celular por apoptose¹³⁵. Diferentes compostos podem regular o crescimento de células tumorais e/ou tumorigênese via indução de apoptose¹³⁶. Como a maioria dos indutores de diferenciação em células da leucemia induz apoptose, nós verificamos se a citotoxicidade da violaceína livre e encapsulada foi devido à indução de apoptose.

Em resultados anteriores do grupo¹³⁷ foi demonstrado que a violaceína induz apoptose em células HL60. A indução de apoptose foi demonstrada através da visualização da condensação cromatínica, uma alteração morfológica típica do processo apoptótico.

Dando continuidade aos estudos dos mecanismos de ação da violaceína livre e encapsulada sobre as células HL60, com o intuito de obter evidências bioquímicas de indução de apoptose destas formulações, tratamos as células leucêmicas com a forma livre e particulada por 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 h em concentrações de 0,5; 0,8 e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (violaceína) e 1; 1,5 e 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (violaceína/PLGA), seguido de marcação com anexina V-FITC (proteína anexina V unida à isotiocianato de fluoresceína) e iodeto de propídeo. Estas concentrações foram escolhidas por estarem próximas aos valores de IC_{50} das formas livres e particuladas.

O método se baseia na translocação da fosfatidilserina para a face externa da membrana plasmática, fato que ocorre nas fases iniciais da apoptose, e forma um complexo com Anexina V-FITC. Este complexo permite a detecção de processo apoptótico, indicado por fluorescência no verde. Por outro lado, na célula que

tenha sofrido necrose, a membrana está extremamente danificada e não exclui corantes, como o iodeto de propídeo, fluorescendo no vermelho.

A **Figura 50 (A)** mostra a porcentagem das células apoptóticas determinada por citometria de fluxo. Apoptose afeta aproximadamente 55% das células após 12 h de tratamento com nanoesferas contendo violaceína na concentração at $2 \mu \text{mol L}^{-1}$.

Nos dados de citometria de fluxo (**Figuras 50-a e 50-b**) observamos dois citogramas (à esquerda) e seus respectivos histogramas (à direita), com as correspondentes marcações por anexina V-FITC e iodeto de propídeo (PI) após tratamento de células HL60. O quadrante inferior esquerdo de cada “dot plot” representa células viáveis (anexina V-/PI-), o quadrante inferior direito representa as células em apoptose precoce ou inicial (anexina V+/PI-), o quadrante superior direito mostram as células em apoptose tardia ou necrose secundária (anexina V+/PI+) e o quadrante superior esquerdo representa as células em necrose (anexina V-/PI+).

Como exemplos temos a **Figura 50 (B)**, que não mostra apoptose, após 48 h de tratamento com nanoesferas sem violaceína (controle). Por outro lado, em **Figura 50 (C)** após 12h de tratamento com nanoesferas de PLGA contendo violaceína tem-se aproximadamente 50% das células em apoptose. Os valores em porcentagem representam a soma dos valores correspondentes aos quadrantes superior e inferior direitos, fornecidos pela análise estatística do programa Cell Quest.

A **Figura 50 (D)** mostra uma imagem de microscopia de fluorescência das células HL-60 tratadas, após exposição aos reagentes: vermelho significaria necrose, verde apoptose e o vermelho-verde mostra os dois fenômenos, sugerindo apoptose tardia.

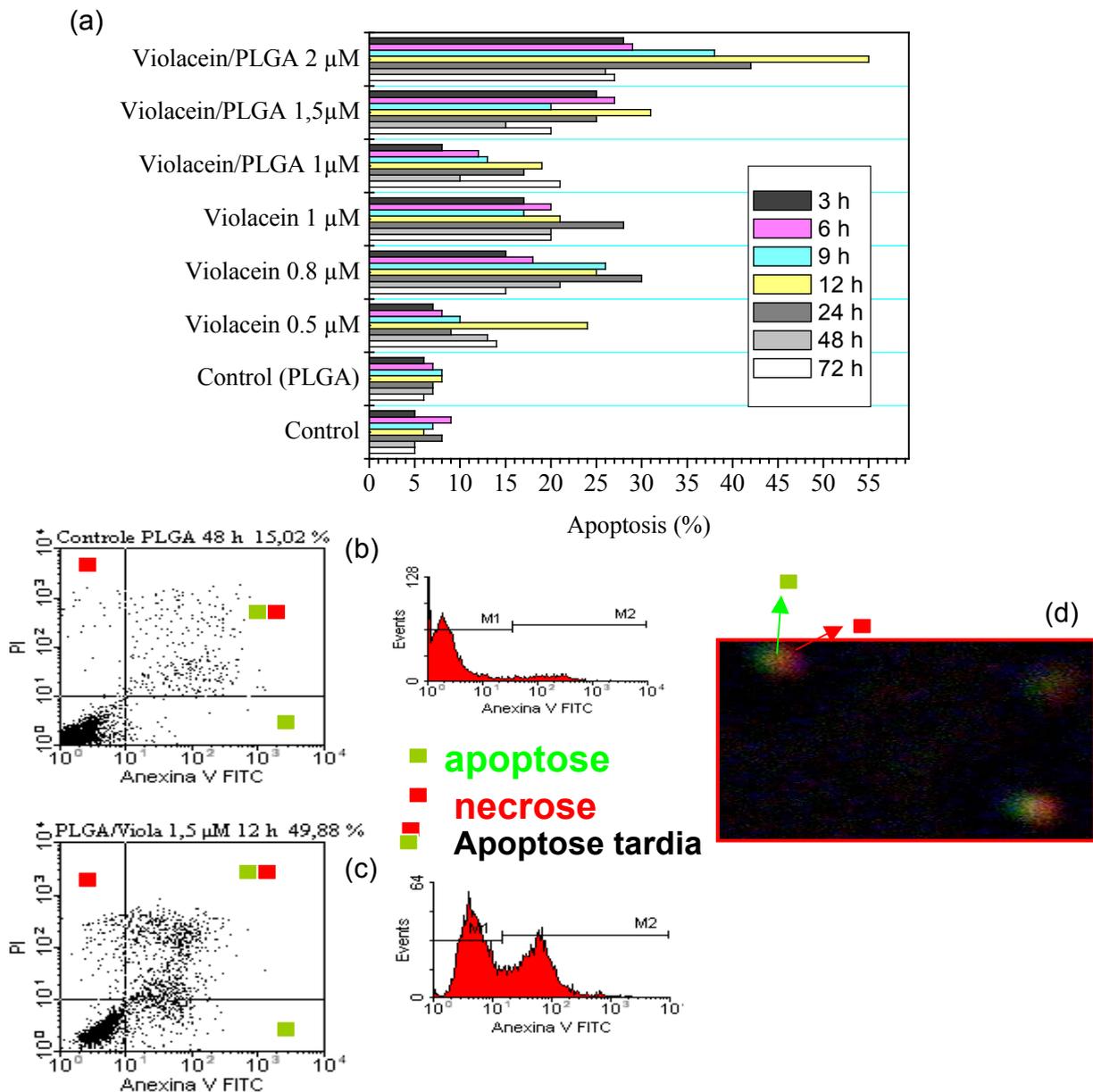


Figura 50: Porcentagens de apoptose induzida pela violaceína em sua forma livre e encapsulada em nanoesferas de PLGA em diferentes tempos de exposição e concentrações baseadas nos dados obtidos por análise em citometria de fluxo.

De modo geral, foi observado a apoptose já a partir de 3h de tratamento com a violaceína livre (1 μM) e com a violaceína encapsulada (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e também, tanto a violaceína livre quanto encapsulada induziram mais eficientemente a morte celular por apoptose após 12 h de tratamento

Duas técnicas complementares para avaliação de apoptose foram também empregadas, utilizando-se como critério a integridade mitocondrial: “Swelling” Mitocondrial e Medida do Potencial de Membrana (JC1), que serão vistos a seguir.

d. Indução de morte celular por apoptose. Análise do “swelling” mitocondrial

A respiração celular promove um gradiente na concentração de prótons entre o interior da mitocôndria e o espaço que separa suas membranas interna e externa – gerando um potencial eletroquímico que a célula usa como fonte de energia para fosforilar a adenosinadifosfato (ADP), sintetizando ATP. Portanto, é de extrema importância se estudar a impermeabilidade da membrana interna. Mesmo prótons, só atravessam essa membrana se transportados por moléculas específicas, e essa característica é essencial para a integridade da síntese de ATP e também para a saúde da célula ¹³⁸.

De fato, constatou-se que a perda de permeabilidade constitui, em muitas condições patológicas, um evento chave no processo de morte celular programada. Alguns estudos indicam que a liberação de fatores mitocondriais associados a apoptose e colapso do potencial transmembrana resultem na formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, o qual permite a passagem de componentes das membranas mitocondriais interna e externa para o citosol ¹³⁹. Outra consequência da abertura de poros de transição de permeabilidade é a alteração do volume mitocondrial. Desde que as cristas da membrana mitocondrial têm uma larga área superficial quando comparadas à membrana mitocondrial externa, a expansão da matriz mitocondrial causa a ruptura da membrana e, conseqüentemente, a liberação de proteínas presentes no espaço intermembranas. Segundo Araragi e colaboradores ¹⁴⁰, o aumento no intumescimento mitocondrial

pode ser acompanhado por UV-vis, em que uma diminuição da absorbância é indicativo da indução de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial. Nos experimentos de “swelling” mitocondrial nós obtivemos um crescimento de 50 % em volume após tratamento com violaceína livre, o que era esperado pela indução de apoptose promovida pela violaceína.

Entretanto, observou-se um resultado surpreendente: um decrescimento (uma contração) de 5 a 19% após tratamento com nanopartículas contendo violaceína. E mais importante: ao se tratar as células com mistura física de nanopartículas (controle, sem encapsular o ativo) + violaceína livre, não se observou o intumescimento promovido pela violaceína livre. Estes resultados estão apresentados na **Tabela 4** e sugerem que violaceína só atua na mitocôndria na ausência de partículas.

De fato, como mostra a **Tabela 4**, usando diferentes concentrações de violaceína (0,5; 0,8 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), foram obtidos aumentos de entumescimento mitocondrial de 42 a 63 % em diferentes tempos de tratamento (3 a 24 h) das células HL60. Ao contrário, quando as mitocôndrias foram isoladas de células tratadas com a violaceína encapsulada este efeito não foi observado e foi verificado um aumento na absorbância que, comparados em relação ao controle, indicariam uma diminuição no “swelling” mitocondrial. Portanto, os resultados evidenciam a indução de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial somente pela violaceína livre. Em seguida, conduzimos os experimentos utilizando a marcação com JC-1, um corante catiônico que traduz o potencial de membrana mitocondrial, com o intuito de interpretar adequadamente estes diferentes resultados em relação às alterações mitocondriais em células tratadas com a violaceína livre comparada com a forma encapsulada.

Tabela 4. Porcentagem de aumento ou diminuição (-) de “swelling” mitocondrial em células HL60 tratadas em relação ao controle

| AMOSTRAS | TEMPOS DE TRATAMENTO | | | |
|---|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| | 3 h | 6 h | 12 h | 24 h |
| Controle | - | - | - | - |
| Controle (PLGA) | - | - | - | - |
| Violaceína 0,5 $\mu\text{ mol L}^{-1}$ | 63,85% | 66,41% | 60,48% | 46,96% |
| Violaceína 0,8 $\mu\text{ mol L}^{-1}$ | 61,91% | 53,32% | 50,03% | 48,87% |
| Violaceína 1 $\mu\text{ mol L}^{-1}$ | 56,83% | 49,0% | 47,07% | 42,37% |
| Violaceína/PLGA $\mu\text{ mol L}^{-1}$ | - 9,12% | - 13,48% | - 1,26% | - 4,73% |
| Violaceína/PLGA $\mu\text{ mol L}^{-1}$ | - 4,96% | - 18,86% | - 3,23% | - 5,53% |
| Violaceína/PLGA $\mu\text{ mol L}^{-1}$ | - 9,85% | - 17,73% | - 4,70% | - 6,39% |
| Violaceína + PLGA 0,5 $\mu\text{ mol L}^{-1}$ | - 23 % | - 15 % | - 13 % | - 5 % |
| Violaceína + PLGA 0,8 $\mu\text{ mol L}^{-1}$ | - 21 % | - 10 % | - 11 % | - 12 % |
| Violaceína + PLGA 1,0 $\mu\text{ mol L}^{-1}$ | - 25 % | - 13 % | - 15 % | - 17 % |

e. Indução de morte celular por apoptose. Análise de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial

Para confirmarmos se houve dano à mitocôndria, realizamos uma determinação precisa do potencial de membrana, que implica em uma transição de permeabilidade. Uma diminuição do potencial de membrana indica atividade

mitocondrial comprometida, a mesma informação conferida por um intumescimento desta organela. Conduzimos, portanto, os experimentos utilizando a marcação com JC-1, um corante catiônico que traduz o potencial de membrana mitocondrial.

Esta análise é verificada por citometria de fluxo em que a emissão do marcador JC-1 é utilizada como uma medida sensível do potencial de membrana mitocondrial. A atividade mitocondrial comprometida (diminuição do potencial de membrana) é confirmada pela menor intensidade de fluorescência na região do vermelho após o tratamento. A emissão no vermelho (agregados de JC-1) corresponde ao potencial de membrana mitocondrial enquanto que a fluorescência no verde (monômeros de JC-1) é indicativa de massa mitocondrial¹⁴¹.

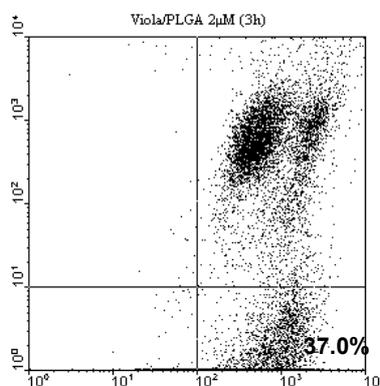
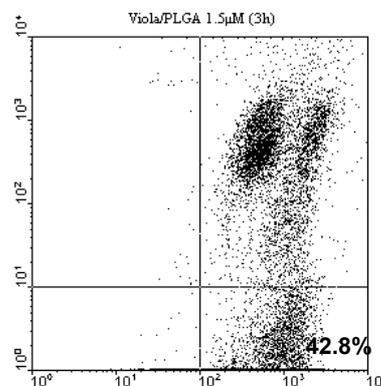
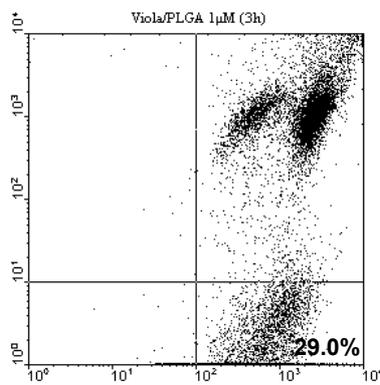
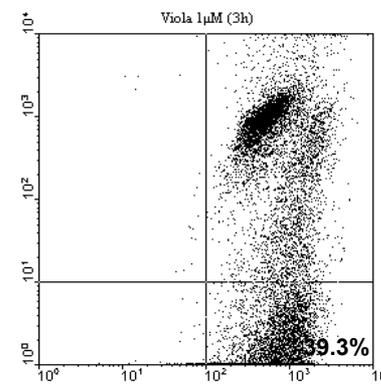
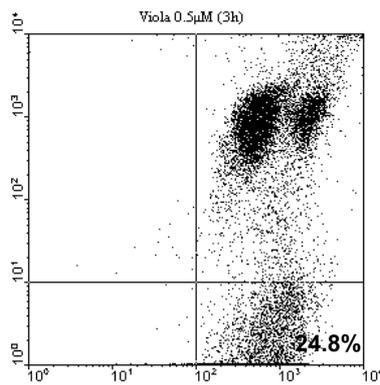
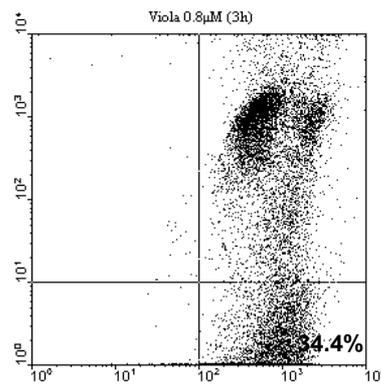
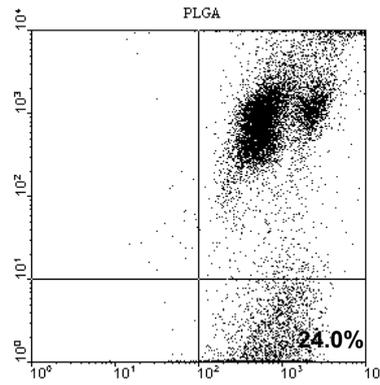
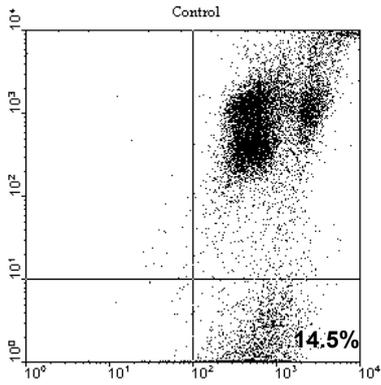
Os resultados de citometria por JC1 confirmaram comprometimento da mitocôndria, com a diminuição do potencial de membrana ($\Delta\psi_m$), tanto para violaceína livre como encapsulada. A **Tabela 5** e a **Figura 51** mostram estes resultados.

Tabela 5. Porcentagem de decréscimo do $\Delta\psi_m$ comparado às células do controle.

| Tratamento | TEMPO DE TRATAMENTO | | | |
|---|---------------------|------|------|------|
| | 3 h | 6 h | 12 h | 24 h |
| Violaceína 0.5 μM | 11 % | 11 % | 12 % | 14 % |
| Violaceína 0.8 μM | 20 % | 27 % | 35 % | 26 % |
| Violaceína 1 μM | 25 % | 40 % | 37 % | 32 % |
| Violaceína /PLGA 1 μM | 5 % | 4 % | 13 % | 8 % |
| Violaceína /PLGA 1.5 μM | 19 % | 36 % | 21 % | 39 % |
| Violaceína /PLGA 2 μM | 13 % | 28 % | 13 % | 33 % |
| Violaceína + PLGA 0.5 μM | 10 % | 8 % | 13 % | 5 % |
| Violaceína + PLGA 0.8 μM | 26 % | 42 % | 30 % | 31 % |
| Violacená + PLGA 1 μM | 30 % | 38 % | 42 % | 43 % |

A

Agregados de JC1 (fluorescência)

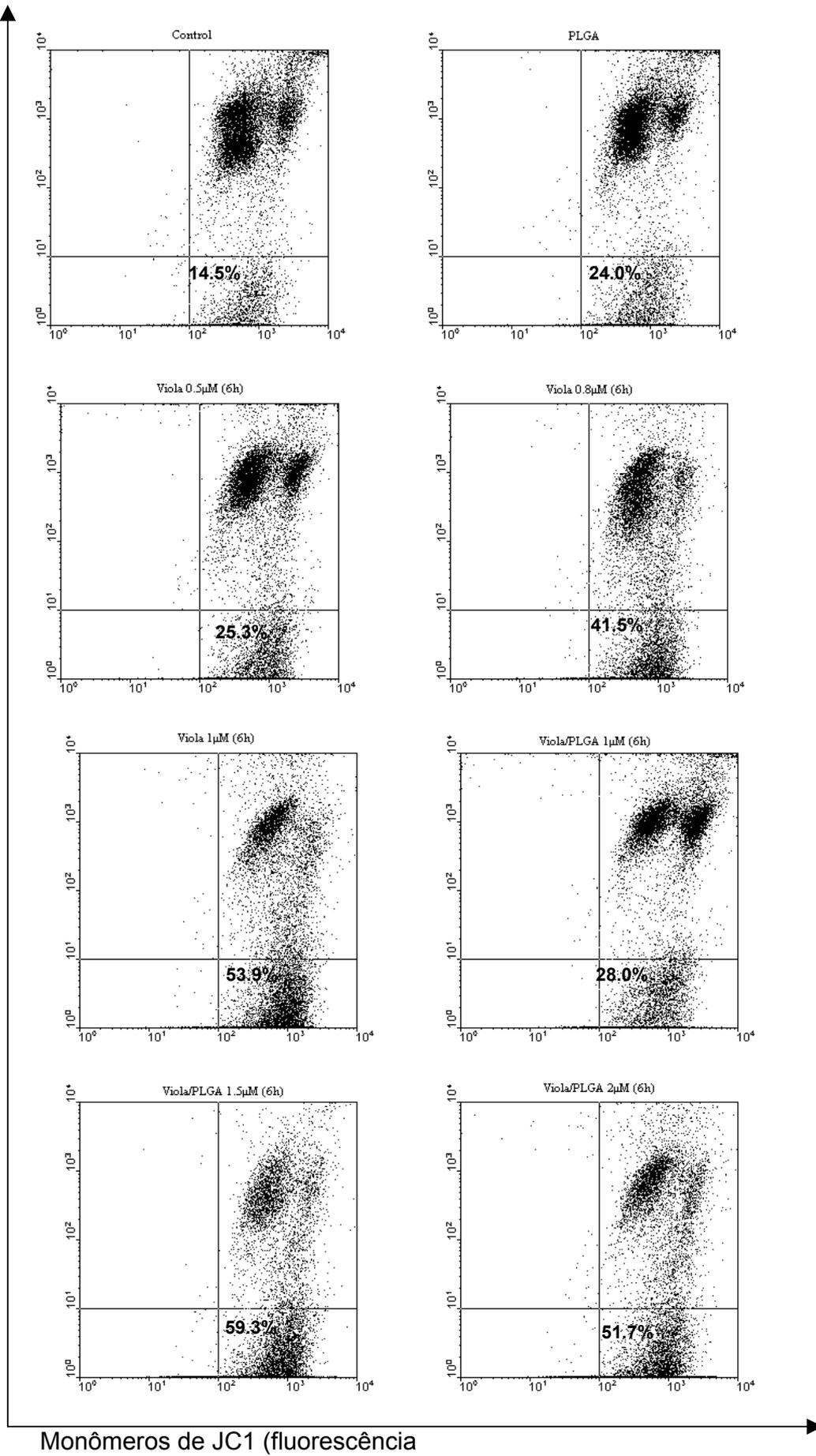


Monômeros de JC1 (fluorescência)

Figura 51: Potencial de membrana mitocondrial avaliado por citometria de fluxo após incubação com o corante JC-1. As células foram previamente incubadas com a violaceína livre e encapsulada em diferentes tempos de tratamento: 3 h (A), 6 h (B), 12 h (C) e 24 h (D). JC-1 quando concentrado por mitocôndrias respirando ativamente forma agregados (no espaço intermembranas predominam interações JC-1/JC-1 que fluorescem em 590 nm.. Em concentrações menores, JC-1 se encontra na forma monomérica (interagindo com a membrana) e fluoresce em 527 nm. Os números nos gráficos indicam as porcentagens da forma monomérica.

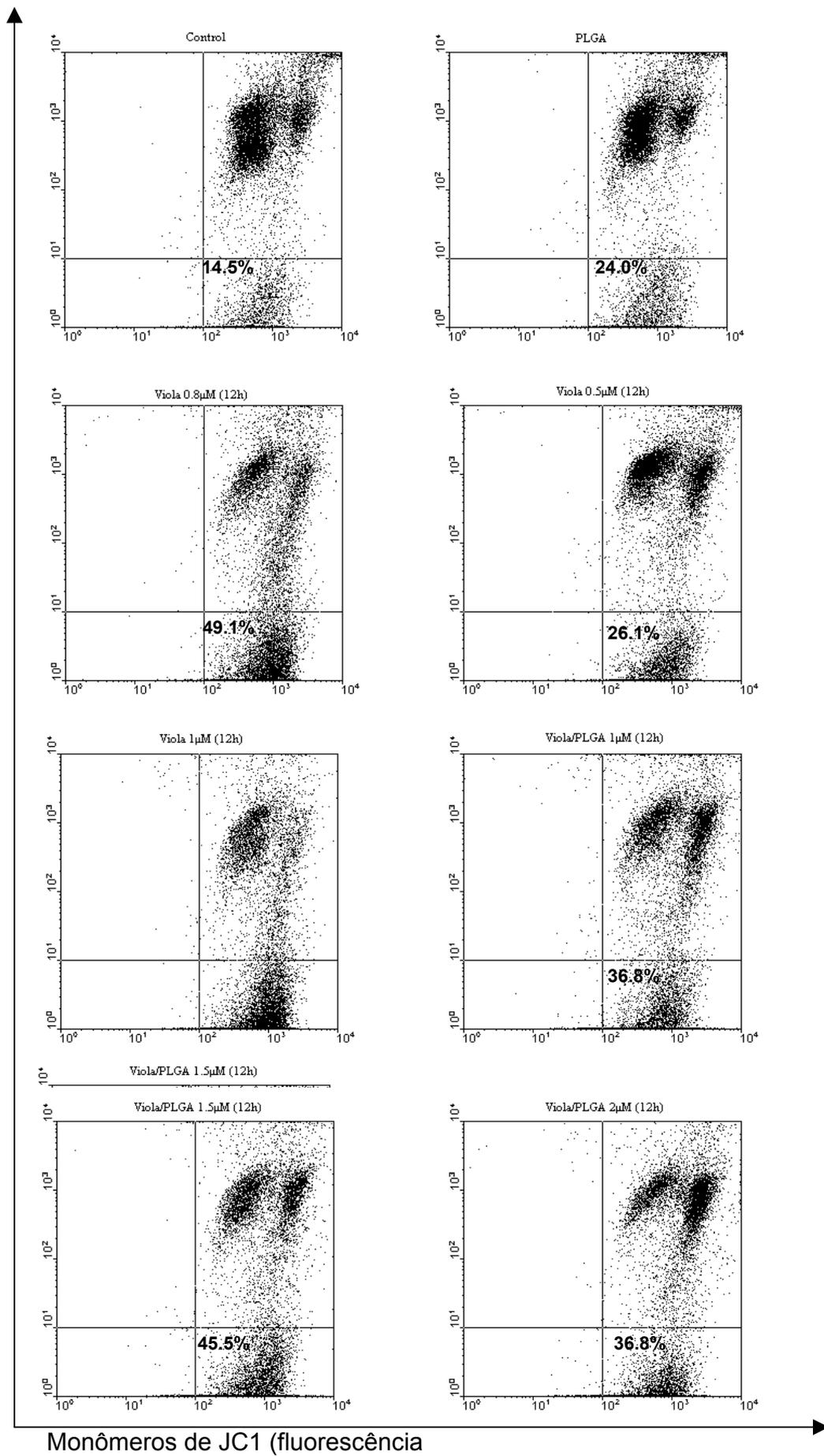
B

Agregados de JC1 (fluorescência)



Monômeros de JC1 (fluorescência)

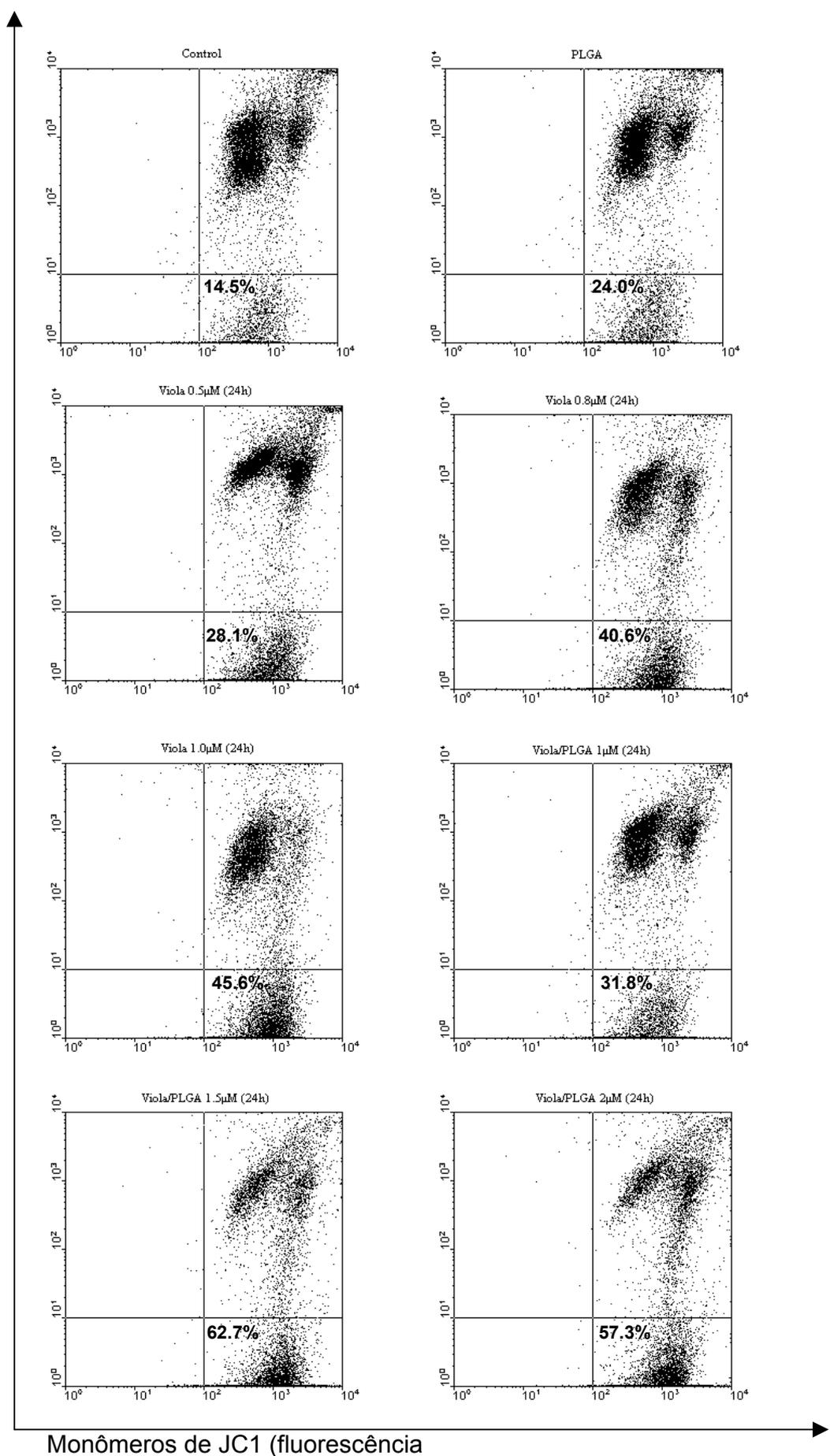
Agregados de JC1 (fluorescência)



C

D

Agregados de JC1 (fluorescência)



A emissão de fluorescência do marcador JC-1 verificada por citometria de fluxo é utilizada como uma medida sensível do potencial de membrana mitocondrial. Ela confirma a atividade mitocondrial comprometida tendo uma diminuição do potencial de membrana, indicada pela baixa fluorescência na região do vermelho após o tratamento com a violaceína livre e encapsulada nos diferentes tempos de tratamento (**Figura 51 A-D**). A fluorescência na região do vermelho dos agregados de JC-1 correspondem ao potencial de membrana mitocondrial. Tanto a violaceína livre quanto encapsulada induziram um decréscimo no potencial de membrana, variando de acordo com a concentração e tempo de tratamento utilizados. Os resultados de citometria indicam uma perda do potencial de membrana mitocondrial em tempos relativamente curtos de tratamento (3h) tanto com a violaceína livre quanto encapsulada (**Figura 51**). Porém, a violaceína livre foi mais efetiva em induzir alterações no potencial de membrana após 6 h de tratamento (concentração de $1 \mu\text{ol L}^{-1}$, 42 % de diminuição no potencial de membrana comparativamente às células controle).

Então, se houve diminuição do potencial de membrana evidenciado pelo ensaio do JC1, como se explica a diminuição do volume mitocondrial, se o que esperávamos era um intumescimento, concordante com a diminuição do potencial de membrana, que mostraria que a mitocôndria não está viável ?

Foi descoberto que o efeito das nanopartículas (contendo ou não violaceína) em inibir o “swelling” mitocondrial é causado pela presença de Pluronic, que tem uma capacidade selante da membrana¹⁴². O mecanismo pelo qual este surfatante polimérico atua já foi demonstrado em neurônios, em que polietilenoglicol (PEO ou PEG) exerce efeito neuroprotetor através da interação direta com a mitocôndria¹⁴³, o que promove uma restauração da membrana, protegendo neurônios. De fato, a existência da interação membrana mitocondrial-PLURONIC mascara o dano à mitocôndria em ensaios por intumescimento, mas não em ensaios

por potencial de membrana. Este é um resultado importante deste trabalho, uma vez que as partículas de PLGA contendo violaceína têm um efeito dirigido a um alvo específico (“target”), a mitocôndria, uma das várias vias de ação que podem estar envolvidas concomitantemente.

5. CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho são:

- 1) Micro e nanoesferas poliméricas contendo violaceína foram preparadas pelo método de emulsão seguida da evaporação de solvente e nanoprecipitação, utilizando-se os polímeros biodegradáveis poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e poli(lactídeo-co-glicólídeo) (PLGA). O encapsulamento do composto nas nanoesferas poliméricas é viável e mostrou razoável eficiência, com liberação quantitativa de violaceína.
- 2) As micro e nanoesferas foram caracterizadas quanto às suas propriedades físico-químicas. Mais especificamente:
 - a) Verificamos que nanopartículas contendo violaceína possuem potencial zeta mais negativo e diâmetro maior quando comparadas às nanopartículas controle, sem violaceína. Pensando em sua aplicação, a boa cobertura da superfície por cadeias de surfatante leva a uma facilidade de redispersão em água. Isto pode promover maior tempo na circulação sistêmica, pois a nanoesferas pode não ser reconhecida pelo sistema reticuloendotelial, devido à cobertura por grupos PO (polióxido de etileno) do surfatante.

- b) Com relação à incorporação de violaceína pelas microesferas de PCL o comportamento fotofísico destes sistemas mostrou diferenças importantes nos espectros de emissão e excitação de violaceína livre, em solução com acetato de etila e incorporada à microesfera. Este fato leva a um maior entendimento da interação corante-polímero. Existem agregados em solução concentrada não responsáveis pela emissão, em analogia ao sólido. Em solução diluída moléculas não agregadas de violaceína são fluorescentes, assim como as dispersas na matriz polimérica. Foi demonstrado por microscopia confocal que a violaceína encontra-se distribuída por toda a matriz. Verificou-se também que há diferentes espécies com tempo de vida no estado excitado e que portanto a violaceína está incorporada às microesferas de PCL de duas formas: isolada, interagindo com a matriz, e associada a outras moléculas de violaceína.
- c) As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostram que a superfície das microesferas é lisa. Entretanto, existe heterogeneidade morfológica na superfície com a presença de partículas menores, que podem estar adsorvidas nas maiores. Há indício também de superfície formada por lâminas finas de material polimérico e surfatante, que se descolam em meio aquoso. O interior das nanoesferas de PLGA possui multidomínios e descontinuidade, com presença de estruturas esféricas de menor tamanho. Este fato questiona a uniformidade das micro e nanoesferas “maciças” corrente na literatura, comumente classificadas como estruturas matriciais, monolíticas.
- d) Há uma distribuição concordante para N e O pertencentes à violaceína na superfície da microesfera polimérica.
- e) A determinação da tensão superficial e interfacial entre as fases orgânica e aquosa contendo o surfatante e PVA mostra que o fator termodinâmico de fato não é o responsável pela estabilidade destes sistemas. Esta estabilidade depende

do efeito estérico promovido pelo surfatante na interface e também do aumento de viscosidade do meio, conferido pelo PVA.

3). Estudos de citotoxicidade da violaceína livre e encapsulada em micro e nanoesferas foram realizados em linhagens de célula tumoral e mostraram que o sistema nanoparticulado é citotóxico para linhagem tumoral HL60 e que permite se adicionar violaceína muito acima de seu IC_{50} quando livre. Ou seja, a realização de ensaios em concentração maior de violaceína, que não seria possível com violaceína livre, é possível com violaceína encapsulada em nanoesferas.

4). No tempo de 48 h a violaceína encapsulada (1,5 μ M) induziu cerca de 100% de diferenciação celular. Este resultado é importante, uma vez que o controle da proliferação celular é modulado pelo processo de diferenciação: em células normais o progresso em direção à diferenciação terminal conclui a proliferação celular, enquanto que em células neoplásicas, o bloqueio no processo de diferenciação constitui possível causa de proliferação celular descontrolada.

5). Baseado nas mudanças de $\Delta\psi$ mitocondrial, tanto violaceína livre quanto encapsulada deflagram apoptose em células HL60. Adicionalmente, os ensaios de intumescimento mitocondrial evidenciaram um surpreendente efeito selante conferido pelo Pluronic à membrana de mitocôndrias. A existência da interação membrana mitocondrial-PLURONIC mascara o dano à mitocôndria em ensaios por intumescimento, mas não em ensaios por potencial de membrana, sugerindo que as nanoesferas de PLGA que contém violaceína podem ter um efeito por uma via mitocondrial, além das outras possíveis.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS ABERTAS POR ESTE TRABALHO

Os resultados obtidos por este trabalho em culturas de células da linhagem promielocítica humana HL60 são encorajadores, ao se considerar o potencial do sistema como indutor de diferenciação celular e apoptose. Eles apoiam estudos futuros também *in vivo* para entendimento do mecanismo de ação como antitumoral e utilização de novas formas ou formas combinadas de veiculação. Considerando que a técnica do NBT (nitro blue formazan) é inespecífica, monócitos e granulócitos podem responder positivamente. Assim, será necessária a realização de estudos complementares, incluindo a determinação das outras células do sistema fagocitário mononuclear presentes após o tratamento, utilizando determinantes antigênicos específicos em células diferenciadas.

Foi descoberto um sistema de liberação controlada que pode atuar em uma via mitocondrial. O conhecimento sobre o potencial de membrana e como é alterado durante os processos de apoptose (diminuição do potencial de membrana), necrose (despolarização) e bloqueio no ciclo celular (hiperpolarização) pode auxiliar no esclarecimento da participação da mitocôndria na morte celular por apoptose e em outros processos celulares, correlacionando mudanças no potencial de membrana mitocondrial com bloqueios no ciclo celular. Posteriormente seria interessante investigar a ação da violaceína (livre e encapsulada) quanto ao mecanismo de ação em relação a este ciclo celular.

Produtos que encapsulem agentes ativos em micro e nanopartículas de polímero biodegradável são altamente desejáveis e promissores. Atualmente estão sendo aprovados pelo FDA para uso clínico em humanos. Um exemplo é produto ABRAXANE[®] que já está em fase III dos testes para desenvolvimento clínico,

com bons resultados em triagem com 460 pacientes. Trata-se de nanopartículas de albumina carreando o paclitaxel (Taxol[®]) para tratar metástases de câncer de mama.

Devido à proliferação desregulada e à inibição de apoptose serem eventos comuns no desenvolvimento de tumores em geral, os aspectos abordados neste trabalho (como apoptose e diferenciação) são alvos de intervenção terapêutica em todos os tipos de câncer.

7. NANOBIOTECNOLOGIA: ANÁLISE CRÍTICA DO PASSADO RECENTE E O QUE PODEMOS ESPERAR PARA O FUTURO

Desenvolvendo algumas idéias a respeito das conseqüências advindas da aplicação da nanobiotecnologia (em particular dos sistemas de liberação controlada) em soluções para uma sociedade, procurarei expor alguns fatos positivos e também analisar algumas possíveis correntes de incerteza relacionadas a estas tecnologias.

Nos textos apresentados foi discutida uma parte das inúmeras vantagens relacionadas a sistemas de liberação controlada de fármacos. Entretanto, é bom lembrar que a descoberta sobre a eficácia terapêutica destes dispositivos deveu-se ao grande desenvolvimento das ferramentas que a possibilitaram. Dispositivos eletrônicos com dimensões comparáveis à das macromoléculas biológicas atingiram alto grau de sofisticação, possibilitando conciliar microeletrônica e biotecnologia e realizar trabalhos antes não imaginados, como as várias microscopias por sonda, que investigam o maquinário celular com pouca interferência. Já se está muito próximo de se construir, por exemplo, uma fonte compacta de raios X capaz de emitir de forma totalmente coerente, como em um

laser. O raio x é gerado por uma seqüência focalizada de pulsos rápidos e intensos de luz vermelha incidindo sobre átomos de hélio, o que converte a luz do laser (com comprimento de onda de 700 nanômetros) em raios X (com comprimento de onda de 1 nanômetro). Átomos de hélio excitados por laser emitem raios X. Um gerador de raios X em breve permitirá que as imagens de radiografias sejam gravadas com alta resolução, e, o mais importante, com apenas uma fração da dose de radiação hoje utilizada. O resultado seria, além da diminuição do risco para os pacientes, o diagnóstico de doenças como o câncer em estágios muito preliminares da doença¹⁴⁴.

É consenso geral que progressos científicos e inovações tecnológicas são necessárias para aumentar os níveis de produtividade e prosperidade no mundo, possibilitando um desenvolvimento sustentável. Mas existe uma ambivalência, uma vez que qualquer avanço tecnológico representa também riscos ambientais e mudanças que afetam uma população, envolvendo saúde, privacidade, propriedade e ofertas de trabalho. Por este motivo, qualquer debate público terá posições que sejam favoráveis e também que sejam extremamente contrárias à nanotecnologia e estes debates e decisões devem ser sempre embasados em conceitos éticos. Ética pode ser definida como "Estudo dos juízos de apreciação referente a conduta humana suscetível de qualificação do ponto de vista do bem e do mal, seja relativamente a determinada sociedade, seja de modo absoluto".¹⁴⁵ Em outras palavras, ética e moral referem-se ao conjunto de costumes tradicionais de uma sociedade... "¹⁴⁶ Como se aplicam os conceitos de ética em termos de segurança e recursos bélicos? A nanotecnologia é um recurso que poderá ser explorado de diversas formas nesta área: criando materiais que escapem à detecção de radares, reconhecimento molecular para alvos biológicos e novos dispositivos para destruição em massa. Ray Kurzweil, ganhador do prêmio americano "The National Medal of Technology" em 1999, fez uma interessante comparação entre uma

entidade “auto-replicante”, nanométrica e não biológica (os vírus de computador) e os dispositivos nanotecnológicos. Enquanto há recursos para o desenvolvimento de software antivírus e se tem grande êxito contra as “patologias computacionais”, novos produtos contra o avanço rápido do bioterrorismo nanotecnológico teriam que passar pelos órgãos de regulamentação.

O conjunto de tecnologias denominado “drug delivery systems” significa sistemas de entrega de ativos e não propriamente sistemas em que esta entrega esteja totalmente controlada. Uma dificuldade seria interromper a ação farmacológica do medicamento, no caso de intoxicação ou alguma intolerância, inclusive com risco de acúmulo do fármaco se não for acompanhada a sua farmacocinética. Isto já não é problemático no caso das medicações transdérmicas, em que é possível retirá-las. Outro importante fator são as diferenças individuais, fazendo com que sejam necessários vários estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, pois não se pode ter certeza de reprodutibilidade (variações de idade, estado de saúde, metabolismo, como por exemplo, a variação de volume de esvaziamento gástrico ou uma velocidade de liberação mais lenta ou pouca absorção intestinal). Além disto, os riscos biológicos de manipulação de nanopartículas de forma indiscriminada podem levar, desde acumulação em microorganismos e contaminação de cadeias alimentares até a infiltração direta no organismo, como por inalação de partículas de 10 micrômetros até a região alveolar. Ao ocorrer o “clearance” das partículas dos pulmões, está ocorrendo a ativação de macrófagos, o que leva à liberação de citocinas e conseqüente inflamação. Se houver material particulado formando fibras ou que se auto-associem, haverá problemas de “clearance” muito lento.

Muito se comenta que o custo elevado dos polímeros biodegradáveis pode ser um empecilho, com o que concordo, em parte. Em parte porque se pode diminuir este custo utilizando-se de misturas poliméricas (por exemplo,

copolímeros com materiais naturais que são abundantes e freqüentemente descartados), viabilizando a obtenção de polímeros biodegradáveis de menor preço. Este é um investimento compensatório, pois aumenta a possibilidade de uso de novos materiais biodegradáveis em dispositivos avançados, podendo levar à redução do custo de manutenção de uma parte dos pacientes em hospitais, diminuindo remoções cirúrgicas de implantes convencionais. Para o desenvolvimento racional de biomateriais o entendimento da físico-química dos polímeros é importante, mas não é suficiente para sistemas de liberação controlada: é necessário conhecer os princípios que governam a farmacocinética e farmacodinâmica da liberação sustentada. Estes sistemas minimizam as flutuações de concentração no sangue porém, para se ter uma idéia, há uma pronunciada e complexa relação não-linear entre a concentração do ativo e o efeito farmacológico (isto é, farmacodinâmica). E mais, para avaliar o efeito de alguns ativos, o importante é a duração da exposição, mais do que a concentração plasmática. Por exemplo, para o folato, antagonista do metotrexato, um crescimento de 10x no tempo de exposição aumenta cerca de 100 vezes sua citotoxicidade, enquanto que um crescimento de dez vezes na concentração causa um aumento de apenas três vezes na citotoxicidade¹⁴⁷.

A possibilidade de patentear fármacos mais antigos, pela reformulação em micro/nanoesferas é uma possibilidade interessante, valendo-se de um novo processo para apresentação e também de uma melhoria da resposta farmacológica. Existem, aqui, situações um tanto quanto curiosas: por exemplo, hoje há esforços para se encapsular diclofenaco, um antiinflamatório, (o que já se conseguiu, com sucesso, com diminuição dos efeitos colaterais). Entretanto, paralelamente foi desenvolvido o Vioxx[®], medicamento dito de última geração e que não provoca os habituais problemas gástricos, inibindo especificamente a enzima COX-2, em pacientes com inflamação severa, como artrite reumatóide e osteoartrite.

Entretanto, pacientes que tomaram Vioxx[®] tiveram o dobro do risco de desenvolver problemas cardiovasculares e acidente vascular cerebral. De fato, é mais seguro o encapsulamento do diclofenaco, cujos efeitos adversos pelo menos são conhecidos há mais tempo.

A nanociência mostra ferramentas novas em busca de aplicações e mudando velhos paradigmas de visão de mundo, trazendo impactos reais para a sociedade. Esta revolução tecnológica é um desafio para o Brasil, pois os riscos são elevados em termos de volume de investimento, mas como podemos ser competitivos, principalmente na área de medicamentos com as nossas “bibliotecas de compostos” e na área de processos biotecnológicos com microorganismos, o ganhos podem ser enormes: o “nanomundo” é extremamente “espaçoso” ... para todos.

8. BIBLIOGRAFIA

- 1 Lefever, G., Vander, B., Hammond, M., Drayton, S. (2004). "Pharma 2010: Silicon Reality." Relatório-IBM Business Consulting Services.
- 2 Jack, D.B. (1997), *Lancet*, **350**, 439.
- 3 Liu, H.B., Farrell, S., Uhrich, K. (2000). *J. Control. Rel.*, **68**, 167.
- 4 Ehrlich, P. (1906). "Collected Studies on Immunology". JohnWiley & Sons, Londres.
- 5 Chang, T. M. S., Poznansky, M. J. (1968). *Nature*, **218**, 243.
- 6 Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C. (1965) *J. Mol. Biol.*, **13**, 238.
- 7 Gregoriadis, G., Leathwood, P. D., Ryman, B.E. (1971). *FEBS Lett.*, **14**, 95.
- 8 Santos, N. C., Castanho, M. A. R. B. (2002). *Quím. Nova*, **25**,1181.
- 9 Dumitriu, S. (1994). "Polymeric Biomaterials". Marcel Dekker, New York.
- 10 Allen, T. M., Cullis, P. R. (2004). *Science*, **303**, 1818.
- 11 Kostarelos, K. (2003). *Adv. Colloid Interface Sci.*, **106**, 147.
- 12 Duncan, R. (2003). *Nat. Ver. Drug. Discov.* **2**, 347.
- 13 Mukherjee, A., Prasad,T. K., Rao, N. M., Banerjee, R. (2005). *J. Biol. Chem.* **280**, 15619.
- 14 Kreuter, J. (2001). *Adv. Drug Delivery Rev.*, **47**, 65.
- 15 Langer, R.,Tirrell, D. (2004). *Nature*, **428**, 487.
- 16 Hamman J.H., Enslin G.M., Kotze, A.F. (2005). *Biodrugs* **19**, 165.

-
- 17 Myers, D. (2004). “ Surfaces, Interfaces and Colloids – Principles and Applications ”. Wiley-VCH, New York.
- 18 Buscall, R., Corner, T., Stageman, J. F. (1985). “Polymer colloids”. Elsevier Applied Science Publishers, London, New York.
- 19 Tohver, V., Smay, J.E., Braem, A., Braun, P.V., Lewis, J.A. (2001). Proc. Nat. Acad. Sci. **98**, 8950.
- 20 Everett, D.H., Koopal, L. K. (2001), “Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units”, IUPAC Council, Washington DC.
- 21 Birnbaum, D.T., Brannon-Peppas, L. (2003). “Drug Delivery Systems in Cancer Therapy”, Humana Press, New Jersey.
- 22 Burke, J. (1978). “Connections”. Little Brown, Boston.
- 23 Filho, N. A., de Oliveira, A. G. (1999). *Infarma*, **9**, 18.
- 24 Wurster, D. E. (1964). US patent 3253944-A.
- 25 Fukushima, S., Kishimoto, S. Takeuchi, Y. Fukushima, M. (2000). *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **45**, 65.
- 26 Park, J. H., Ye, M., Park, K.(2005). *Molecules*, **10**, 146.
- 27 Sinha, V. R., Trehan, A. (2003). *J. Control. Release*, **90**, 261.
- 28 Jain, R. A. (2000). *Biomaterials*, **21**, 2475.
- 29 Allémann, E., Gurny, R., Doelker, E. (1992). *Int. J. Pharm.* **87**, 247.
- 30 Murakami, H., Kobayashi, M., Takeuchi, H., Kawashima, Y.(1999). *Int. J. Pharm.* **187**, 143.
- 31 Mallarde, D., Boutignon, F., Moine, F., Barre, E., David, S., Touchet, H., Ferruti, P., Deghenghi, R. (2003). *Int. J. Pharm.*, **261**, 69.

-
- 32 Takada, S., Uda, Y., Toguchi, H., Ogawa, Y. (1995). *J. Pharm. Sci. Technol.* , **49**, 180.
- 33 Linck Bassani, K., Muller, C. R., Pohlmann, A., Guterres, S., Tavares Dalla Costa, T. C., Linck, B. V., Raffin, P. A., Stanikuaski, S. S., Tavares da Costa, T. C. (2001) PIBr 9906081-A.
- 34 Ichiura , H., Morikawa, M., Fujiwara, K.(2005), *J. Mater. Sci.*, **40**, 1987.
- 35 Yeo, Y., Basaran, O. A., Park, K. (2003). *J. Control. Release*, **93**, 161.
- 36 Lee, C. T., Psathas, P. A., Johnston, K. P. (1999). *Langmuir*, **20**, 6781.
- 37 Preis, I., Langer, R.S. (1979). *J. Immunol. Methods*, **28**, 193.
- 38 Jalil, R., Nixon, J. R. (1990). *J. Microencapsul.*, **7**, 297.
- 39 Sinha, V. R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., Trehan, A. (2004). *Int. J. Pharm.*, **278**, 1.
- 40 Xu, X., Yee, W. C., Hwang, P. Y., Yu, H., Wan, A. C., Gao, S., Boon, K. L., Mao, H. Q., Leong, K. W., Wang, S. (2003) *Biomaterials*, **24**, 2405.
- 41 Lakshmi, S., Katti, D. S., Laurencin, C. T. (2003). *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **55**, 467.
- 42 Park, J. H., Cho, Y. W., Chung, H., Kwon, I. C., Jeong, S. Y. (2003). *Biomacromolecules*, **4**, 1087.
- 43 Ha, J. C., Lee, Y. M., Kim, S. Y. J. (2000). *J. Control. Release*, **62**, 381.
- 44 Spenlehauer, G., Vert, M., Benoit, J.P., Boddaert, A. (1989), *Biomaterials*, **10** 557.
- 45 Anderson , J. M., Shive, M. S. (1997) *Adv. Drug Del. Rev.*, **28**, 5.
- 46 Abdel-Rahman, S. M., Kauffman, R. E. (2004). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **44**, 11.

-
- 47 Müller-Goymann, C. C. (2004). *Eur. J. Pharm. Biopham.*, **58**, 343.
- 48 Namazi, H., Adeli, M. (2005). *Biomaterials*, **26**, 1175.
- 49 Joraku, A., Sullivan, C. A., Yoo, J. J., Atala, A. (2005) *Laryngoscope*, **115**, 244.
- 50 Goya, G. F. (2005), <http://macbeth.if.usp.br/~goya/index.html>, página do Laboratório de Materiais Magnéticos – Instituto de Física-USP acessada em julho de 2005.
- 51 Kuckelhaus, S., Reis, S.C., Carneiro, M.F., Tedesco, A.C., Oliveira, D.M., Lima, E.C.D., Morais, P.C., Azevedo, R.B., Lacava, Z.G.M. (2004). *J. Magn. Magn. Mater.* **272-276**, 2402.
- 52 Lacava, Z. G., Morais, P. C. (2004). *Parcerias estratégicas*. **18**, 73.
- 53 Carneiro, A. A. O., Touse, A. T., Baffa, O. (2003). *Quím. Nova*, **26**, 952.
- 54 Filho, K S O (2005), <http://www.if.ufrgs.br/ast/med/imagens/node1.htm>, Fundamentos de Radiodiagnóstico por Imagem - Instituto de Física- UFRGS acessada em julho de 2005
- 55 Derkay, C.S., Tunnessen, W.W. (1994). *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, **148**, 953.
- 56 Gunn, J., Veisoh, O., Sun, C., Ellenbogen, R., Olson, J., Sze, R., Hallahan A., Zhang, M.(2005) Abstracts-NSTI Nanotechnology Conference & Trade Show.
- 57 Brazilian Genome Project (2002),<http://www.brgene.lncc.br/cviolaceum/>, acessado em junho de 2005.
- 58 Caldas, L. R., Leitão, A. A. C., Santos, S. M. & Tyrrell, R. M. (1978). “Proceedings of the International Symposium on Current Topics in Radiology and Photobiology”. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro,121.
- 59 Durán, N., Faljoni-Alario, A.(1980), *An. Acad. Bras. Ciências* **52**, 297.
- 60 Durán, N., Menck, C.F.M. (2001) , *Crit. Rev. Microbiol.* **27**,201.

-
- 61 Bergonzini, C.(1881). *Ann. Soc. Nat. Mod.* **14**, 149.
- 62 Sneath, P.H.(1974). “Bergey’s manual of determinative bacteriology”. Williams and Wilkins, Baltimore.
- 63 McClean, K.H., Winson, M.K, Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., Williams, P. (1997). *Microbiology*, **143**, 3703.
- 64 Rettori, D. e Durán, N.(1998). *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 685.
- 65 Lichstein, H.C., Van de Sand, V.F. (1945) *J. Inf Diseases* **76**, 47.
- 66 Durán, N., Antonio, R.V., Haun, M., Pilli, R.A. (1994). *W. J. Microbiol. Biotechnol* **10**, 686.
- 67 Andrighetti-Fröhner, C.R., Antonio, R.V., Creczynski-Pasa, T.B., Barardi, C.R.M. e Simões, C.M.O.(2003) .*Mem Inst Oswaldo Cruz*, **98**, 843.
- 68 De Souza, A.O., Aily, D.C.G., Sato, D.N. e Durán, N.(1999). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **58**, 59.
- 69 Durán, N., Justo, G.Z., Melo, P.S., De Azevedo, M.B.M., Souza-Brito, A.R.M., Almeida, A.B.A. e Haun, M.(2003). *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **81**, 387.
- 70 Leon, L.L., Miranda, C.C., De Souza, A. O. e Durán, N.(2001). *J. Antimicrob. Chemother.*, **48**, 449.
- 71 Melo, P.S., Justo, G.Z., Xavier, A.L., De Azevedo, M.B.M., Durán, N. e Haun, M.(2001). *FASEB J.*, **15**, A172.
- 72 Saraiva, V.S., Marshall, J.C., Cools-Lartigue, J., Burnier Jr., M.N.(2004). *Melanoma Res.*, **14**, 421.
- 73 Melo, P.S., Maria, S.S., Vidal, B.C., Haun, M., Durán, N. (2000). *In Vitro Cell Dev. Biol.-Animal.*, **36**, 539.

74 De Azevedo, M.B.M., Alderete, J., Rodriguez, J.A, Souza, A.O., Rettori, D., Torsoni, M.A., Faljoni-Alario, A., Haun, M. e Durán, N.(2000), *J. Incl. Phen. Macr. Chem.*, **37**, 93.

75 Melo, P.S., Justo, G.Z., de Azevedo, M.B.M., Durán, N., Haun, M. (2003). *Toxicol.* **186**, 217.

76 Krähenbühl, O., Tschopp, J. (1991). *Immunol Today*, **12**, 399.

77 Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R., Kleiner, J. (2002). *Food Chem Toxicol.* **40**, 193.

78 Renzi, D., Valtolina, M., Forster, R. (1993). *ATLA*, **21**, 89.

79 Curtin, J.F., Donovan, M.; Cotter, T.G. (2002). *J. Immunol. Methods.*, **265**, 49.

80 Leira, F., Vieites, J.M., Vieytes, M.R., Botana, L.M. (2001). *Toxicol. In vitro*, **15**, 199.

81 Vaux, D.L. (2002). *Toxicol.*, **182**, 3.

82 Arends, M.J., Morris. R.G., Wyllie, A.H. (1990). *Am. J. Pathol.*, **136**, 593.

83 Melo, P.S., Maria S.S., Vidal, B.C., Haun, M., Duran, N. (2000). *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, **36**, 539.

84 Freshney, R.I. (2000). "Culture of animal cells: a manual of basic technique". John Wiley & Sons Inc., NY.

85 Pelczar Jr., J. M., Chan, E. C. S., Krieg, N. R.. " Microbiologia: conceitos e aplicações" (1996). MAKRON Books, São Paulo.

86 Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M. (2000). "An Introduction to Genetic Analysis", W.H. Freeman and Company, New York.

87 Madingam, M. T., Martinko, J. M., Parker, Jack. (2000) "Brock Biology of Microorganisms", Prentice-Hall, Inc., New Jersey.

-
- 88 Abbas, A.K., Lichtman, A. H. (2003). “Cellular and Molecular Immunology”, W.B. Saunders, Filadélfia.
- 89 Uzunoglu, S., Uslu, R., Tobu, M., Saydam, G., Terzioglu, E., Buyukkececi, F., Omay, S.B. (1999). *Leuk. Res.*, **23**, 507.
- 90 Uemura, T. (2005). <http://www.abrale.org.br>, página da ABRALE (Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia) acessada em junho de 2005.
- 91 Drexler, H.G., Quentmeier, H., MacLeod, R.A.F., Uphohh C.C., Hu, Z.B. (1995). *Leuk. Res.*, **19**, 681.
- 92 Drexler, H.G., Matsuo, Y., MacLeod, R.A.F. (2000). *Leuk. Res.*, **24**, 881.
- 93 O'Donnell, P. B., McGinity, J W. (1997). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **28**, 25.
- 94 Vernon-Parry, K. D. (2000). *III-Vs Review*, **13**, 44.
- 95 Schaffazick SR, Pohlmann AR, Dalla-Costa T, Guterres SS (2003). *Eur J. Pharm Biopharm.* **56**, 501.
- 96 Pecora, R. “Dynamic Light Scattering-Applications of Photon Correlation Spectroscopy” (1985), Plenum Press, New York, London.
- 97 Dole, M., Swartout, J. A. (1940). *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 3039.
- 98 Renzi, D., Valtolina, M., Forster, R. (1993). *ATLA.*, **21**, 89.
- 99 Denizot, F.; Lang, R. (1986). *J. Immunol. Methods.*, **89**, 271.
- 100 Kohroki, J., Muto, N., Tanaka, T., Otoh, N., Inada, A., Tanaka, K. (1998). *Leuk. Res.*, **22**, 405.
- 101 Araragi, S., Kondoh, M., Kawase, M., Saito, S., Higashimoto, M., Sato, M. (2003). *Toxicology.*, **184**, 1.
- 102 O'Donnell, P. B., McGinity, J. W. (1998) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45**, 83.

-
- 103 Wanli, K., Yi, L., Baoyan, Q., Guangzhi, L., Zhenyu, Y., Jichun, H. (2000). *Colloids Surf. A*, **175**, 243.
- 104 Davis, S.S., Hadgraft, J., Palin, J.K., (1985). “Encyclopedia of Emulsion Technology.”, Marcel Dekker, New York.
- 105 Brannon-Peppas, L. (2002). “Polymers in controlled release”, Wiley, New York.
- 106 Y. Chevalier, C. Pichot, C. Graillat, M. Joanicot, K. Wong, J. Maquet, P. Lindner, B. Cabane (1992). *Colloid Polym. Sci.*, **270**, 806.
- 107 Galembeck, F. (2005). <http://www.paginas.terra.com.br/educacao/fernagal/pdocumentos3.htm>, página do texto básico de ensino “O estado Coloidal” acessada em junho de 2005.
- 108 Kapilashrami, A. (2004). “Interfacial Phenomena in two-phase systems: emulsions and slag foaming”. Doctoral Thesis, Material Science and Engineering, Division of Materials Process Science, Royal Institute of Technology, Estocolmo, Suécia.
- 109 Deiss, J. L., Anizan, P., El Hadigui, S., Wecker, C. (1996). *Colloids Surf. A*, **106**, 59.
- 110 Chevalier, Y., Pichot, C., Graillat, C., Joanicot, M., Wong, K., Maquet, J., Lindner, P., Cabane, B. (1992). *Colloid Polym. Sci.*, **270**, 806.
- 111 Bojarski, P., Matczuk, A., Bopjarski, C., Kawski, A., Kuklinski, B., Zurcowska, G., Diehl, H. (1996). *Chem. Phys.*, **210**, 485.
- 112 Nishikiori, H., Fujii, T. (1997). *J. Phys Chem. B*, **101**, 3680.
- 113 Lackowicz, J. R. (1999). “Principles of Fluorescence Spectroscopy”, Kluwer Academic & Plenum Publications, New York.
- 114 Proposito, P., Casalboni, M., De Matteis, F., Pizzoferrato, R. (1999) *Superficies y Vacío*, **9**, 85.

115 Henry-Toulmé, N., Decout, A., Lalanne, J., Nemati, F., Dubernet, C., Dufourq, J. (1994). *J. Colloid Interf. Sci.*, **162**, 236.

116 Zhang, G., Thomax, J. K. (1995). *J. Phys. Chem.*, **99**, 11203.

117 Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J-Ph., Ammoury, N., Benita, S.(1989). *Int.J. Pharm.*, **55**, r-1.

118 Johnson, B. K., Prud'homme, R.K. (2003), *Abstr Pap Am Chem S*, **226**, 186.

119 Jones, M-C., Leroux, J-C.(1999), *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **48**, 101.

120 Kwon, Y.M., Kim, S.W. (2004). *Pharm Res*, **21**, 339 .

121 Rembaum, A.; Tokés, Z. A. (1988). “Microspheres: Medical and Biological Applications”, CRC Press, Boca Raton.

122 J. E. Seebergh, J.C. Berg, 1995.*Colloids Surf.*, **100**, 139.

123 Govender, T., Stolnik, S., Garnet, M. C., Illum, L., Davis, S. S. (1999). *J. Controlled Release*, **57**, 171.

124 Guterres, S. S., Fessi, H., Barratt, G., Devissaguet, J-Ph., Puisieux, F. (1995). *Int. J. Pharm.*, **113**, 57.

125 Fresta, M., Puglisi, G., Giammona, G. Cavallaro, G, Micali, N., Furneri, P. M. (1995), *J. Pharm. Sci.*, **84**, 895.

126 Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., Freitas, L. L. Pohlmann, A. R. (2003). *Quím. Nova*, **26**, 726.

127 Berridge, M. V., Tan, A. S. (1993). *Archiv. Biochem. Biophys.*, **303**, 474.

128 Mosmann, T. (1983). *J. Immunol. Methods.*, **65**, 55.

129 Berridge, M.V., Tan, A.S. (1993). *Acta Biochem Biophys.* **303**, 474.

130 Freire, A.C.G., Melo, P.S., Aoyama, H., Haun, M., Durán, N., Ferreira, C.V. (2003). *Planta Med.*, **69**, 67.

-
- 131 Loveland, B.E., Johns, T.C., Mackay, I.R., Vaillant, F., Wang, Z.X., Hertzog, P. (1992). *Assays Biochem. Int.*, **27**, 501.
- 132 Verlinden, L., Verstuyf, A., Mathieu, C., Tan, B.K., Bouillon, R. (1997). *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **60**, 87.
- 133 Breitman T.R., (1990). *Methods Enzymol* **190**, 118.
- 134 Ichinose, N., Schwedt, G., Schnepel, F. M., Adachi, K. (1991). “Fluorometric Analysis in Biomedical Chemistry”, Wiley-Interscience, New York.
- 135 Wyllie, A.H., (1985). *Anticancer Res.*, **5**, 131.
- 136 Kaufmann, S.H.; Earnshaw, W.C. (2000). *Experimental Cell Res.*, **256**, 42.
- 137 Melo, P.S., Justo, G.Z., de Azevedo, M.B.M., Durán, N., Haun, M. (2003). *Toxicol.* **186**, 217.
- 138 Vercesi, A. E. (2003). *Ciência Hoje* **34**, 16
- 139 Gottlieb, R.A. (2000). *Crit. Rev. Eukaryot Gen Expr.* **10**, 231.
- 140 Araragi, S., Kondoh, M., Kawase, M., Saito, S., Higashimoto, M.; Sato, M. (2003), **184**, 1.
- 141 Sokol, R.J., Straka, M.S., Dahl, R., Devereaux, M.W., Yerushalmi, B., Gumprich, E., Elkins, N., Everson, G. (2001). *Pediatric Res.*, **49**, 519.
- 142 Shi, R., Borgens, R.B. (2000). *J. Neurocytology*, **29**, 633.
- 143 Luo, J., Borgnes, R., Shi, R.Y. (2004). *J. Neurotrauma*, **21**, 894.
- 144 Seres, J., Seres, E., Verhoef, A. J., Tempea, G., Strelis, C., Wobruschek, P., Yakovlev, V., Scrinzi, A., Spielmann, C., Krausz, F. (2005). *Nature*, **433**, 596.
- 145 de Holanda, A. B.(1986). “Novo dicionário da língua portuguesa”, Nova Fronteira, Rio de Janeiro.

146 Chauí, M. (1995). “Convite à filosofia”, Ática, São Paulo.

147 Hoffman, A (1998). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **33**, 185.