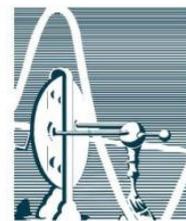




Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho



Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio

DESENVOLVIMENTO DE NANORRADIOFÁRMACOS DE  
EDTMP PARA O TRATAMENTO DA SÍNDROME INCURÁVEL  
DA METÁSTASE ÓSSEA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

Rio de Janeiro

2012

BEATRIZ FERREIRA DE CARVALHO PATRICIO

DESENVOLVIMENTO DE NANORRADIOFÁRMACOS DE EDTMP PARA O  
TRATAMENTO DA SÍNDROME INCURÁVEL DA METÁSTASE ÓSSEA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Biologia Molecular e Estrutural da Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Weissmüller  
Co-Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira

**P314d** Patrício, Beatriz Ferreira de Carvalho.

Desenvolvimento de nanorradiofármacos de EDTMP para o tratamento da síndrome incurável da metástase óssea/ Beatriz Ferreira de Carvalho Patrício; orientador Gilberto Weissmüller, co-orientador Ralph Santos-Oliveira. – Rio de Janeiro : UFRJ, IBCCF, 2012.

127f. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Radiofarmácia. 2. Síndrome incurável da metástase óssea. 3. Nanotecnologia. 4. Microscopia de força atômica. I. Weissmüller, Gilberto. II. Santos-Oliveira, Ralph. III. Título.

**CDD 615.19**

BEATRIZ FERREIRA DE CARVALHO PATRICIO

DESENVOLVIMENTO DE NANORRADIOFÁRMACOS DE EDTMP PARA O  
TRATAMENTO DA SÍNDROME INCURÁVEL DA METÁSTASE ÓSSEA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Biologia Molecular e Estrutural da Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Aprovado em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Prof. Dr. Gilberto Weissmüller, IBCCF, UFRJ

---

Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira, IEN, CNEN

---

Prof. Dr. Kildare Rocha de Miranda, IBCCF, UFRJ

---

Prof. Dr. Marcelo Henrique Mamede Lewer, FM, UFMG

---

Prof. Dr. Marcos Farina de Souza, ICB, UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilian Terezinha Costa, IBCCF/Polo Xerém, UFRJ

---

Prof. Dr. Paulo Mascarello Bisch, IBCCF, UFRJ

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Física Biológica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho localizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro e no Laboratório de Nanorradiofármacos do Instituto de Engenharia Nuclear sob orientação do Prof. Dr. Gilberto Weissmüller e co-orientação do Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira.

Os auxílios financeiros foram concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN).

O aluno recebeu bolsa do CNPq / CNEN durante os dois anos do desenvolvimento deste projeto.

## Agradecimentos

À minha família, especialmente minha mãe, por tudo na minha vida.

À minha irmã Elisa por todo carinho.

À minha madrinha pelo apoio incondicional em tudo.

Ao meu pai por sempre acreditar em mim.

Aos amigos do Laboratório de Física Biológica, da Unidade Multidisciplinar de Genômica e do Laboratório de Nanorradiofármacos por todos os momentos de aprendizado, discussões científicas e também de descontração, fundamentais para minha formação.

À Marta, por todo apoio, carinho e ajuda.

Ao Gustavo, por todo o ensino e discussão científica.

À Samira, fundamental e paciente em todos os momentos.

Às amigas, Luiza, Lis, Polli, Alice e Julia pelo apoio incondicional.

À Sandrinha e à Gabi, por toda a paciência e solicitude.

À Lilian, por protagonizar um ótimo trabalho de revisão. Agradeço muito, não só pela revisão, mas por toda a paciência e aprendizado.

Aproveito para agradecer antecipadamente aos membros da banca, pela atenção e disponibilidade.

Finalmente, e principalmente, aos meus orientadores Gilberto e Ralph, meus orientadores, pelo zelo, apoio incondicional e por sempre acreditar em mim. Sem eles, esse projeto teria sido impossível.

## Resumo

O câncer é um problema de ordem mundial e as perspectivas futuras são preocupantes. Os dois tipos de maior incidência no Brasil e no mundo, de mama e de próstata, levam com elevada frequência à metástase óssea, essa corresponde a 99% dos tumores malignos que acometem o tecido ósseo. Apesar de não possuir cura, tratamentos paliativos melhoram a qualidade de vida e aumentam a sobrevivência do paciente. Dentre esses, destaca-se o tratamento com radiofármacos, que consistem de um vetor biológico ligado a um radionuclídeo emissor de partículas beta (para o tratamento) ou gama (para o diagnóstico). O Ácido [bis(metilfosforo)amino]metil fosfórico ligado ao radioisótopo samário-153 ( $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ ) é o que tem apresentado mais vantagens clínicas, com uma melhora entre 70-80% dos pacientes com metástase óssea. A grande desvantagem deste radiofármaco é sua atuação superficial, o que requer, em muitos casos, múltiplas doses. A nanofarmacologia é um ramo que está crescendo por propiciar propriedades como: liberação controlada, prolongada e sustentada do princípio ativo; diminuição da dose necessária para o efeito terapêutico e dos efeitos tóxicos; e biodirecionamento. Com o objetivo de eliminar as deficiências do radiofármaco  $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ , nesse trabalho o EDTMP foi encapsulado em nanopartículas poliméricas de ácido poli-láctico e álcool polivinílico (PLA/PVA) pelo método de dupla emulsificação. A caracterização das nanocápsulas foi realizada com a técnica de microscopia de força atômica a qual revelou tamanhos na faixa de 100-500nm. As nanopartículas foram testadas quanto à resistência à radiação gama: alterações foram identificadas nas imagens de fase, mas somente naquelas irradiadas com doses muito altas. Foi realizado também um estudo preliminar com ratos Wistar sadios, nos quais foram comparadas as biodistribuições das nanocápsulas de PLA/PVA/EDTMP, nanocápsulas PLA/PVA e somente EDTMP, todas as amostras marcadas com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Em imagens adquiridas em uma câmara gama, foi observado que as nanocápsulas com EDTMP direcionam-se ao osso na mesma quantidade que o EDTMP não encapsulado. No entanto, lá permanecem em maior quantidade por um período de 2h30min, sugerindo uma ação mais prolongada em relação ao EDTMP não encapsulado. Nanocápsulas de PLA/PVA não são encontradas nos ossos, como esperado. Os resultados obtidos sugerem possíveis vantagens para uma formulação com nanocápsulas.

## Abstract

Cancer is a problem of worldwide concern and future perspectives are worrisome. The two types of highest incidence, breast and prostate cancer, lead with high frequency to bone metastasis, which include 99% of malignant tumors that affect bone tissue. Despite having no cure, palliative treatments improve the quality of life and increase survival time. Among them treatment with radiopharmaceuticals stands out. Radiopharmaceuticals consist of a biological vector linked to a radionuclide emitter of beta particles (for treatment) and/or gamma (for diagnosis). The [bis(phosphonomethyl)amino]methylphosphonic acid attached to Samarium-153 ( $^{153}\text{Sm}$ -EDTMP) is known to have the most clinical benefits, and around 70-80% of patients show a clear improvement. The major disadvantage of this radiopharmaceutical is its superficial acting, which requires, in many cases, multiple doses. The nanopharmacology is a growing branch promising properties such as controlled, prolonged and sustained release of the active ingredient, reduction of the required dose for therapeutic effect and of the toxic effects and also biotargeting. In order to circumvent the deficiencies of the radiopharmaceutical  $^{153}\text{Sm}$ -EDTMP, in this work, EDTMP was enclosed in polymeric nanocapsules by double emulsification method. The characterization of the (PLA/PVA/EDTMP) nanocapsules was performed with atomic force microscopy which revealed sizes in the range 100-500nm. Nanoparticles were tested for resistance to gamma radiation; alterations were observed in the phase images, but only in those irradiated with very high doses. Preliminary biodistribution assays were performed with Wistar rats. PLA/PVA/EDTMP nanocapsules were compared with PLA/PVA ones and with an EDTMP solution. All samples were labeled with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  and images were acquired on a gamma camera. The amount of nanocapsules with EDTMP in bones is the same as unencapsulated EDTMP. However, they remain in larger quantities for a period of 2h30min, suggesting a more prolonged action compared to unencapsulated EDTMP. Nanocapsules of PLA/PVA are not found in the bones, as expected. The results suggest potential benefits for a formulation with nanocapsules.

## Lista de Figuras

FIGURA 1: RELAÇÃO DE INCIDÊNCIA E MORTALIDADE POR CÂNCER NA POPULAÇÃO MUNDIAL EM 2008, EXCLUINDO O CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA.....	19
FIGURA 2: ESTRUTURA DE DIFERENTES NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	42
FIGURA 3: PREPARO DE NANOCÁPSULAS PELO MÉTODO DE DUPLA-EMULSIFICAÇÃO.....	45
FIGURA 4: ESQUEMA DA INTERAÇÃO ENTRE A PONTEIRA E A AMOSTRA EM UM STM.....	50
FIGURA 5: DIAGRAMA SIMPLIFICADO DO FUNCIONAMENTO DE UM AFM.....	51
FIGURA 6: DIAGRAMA DO FUNCIONAMENTO DO MODO DE VARREDURA POR DUPLO HARMÔNICO.....	55
FIGURA 7: ESQUEMA DE PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS PELO MÉTODO DE DUPLA EMULSIFICAÇÃO. A.....	59
FIGURA 8: FIGURA ILUSTRATIVA DO PROCESSO CROMATOGRÁFICO FEITO PARA A ANÁLISE DA MARCAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	66
FIGURA 9: IMAGEM ILUSTRATIVA DE COMO FOI CALCULADA A CAPTAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP NO FÊMUR.....	68
FIGURA 10: IMAGEM TOPOGRÁFICA FEITA POR AFM NO MODO CONTATO DE NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP PRODUZIDAS PELO MÉTODO DE DUPLA EMULSÃO E EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE.....	70
FIGURA 11: IMAGEM EM 3D DE ALTURA NO MODO DE VARREDURA POR CONTATO DAS NANOPARTÍCULAS PLA/PVA/EDTMP PRODUZIDO PELA METODOLOGIA DESCRIDA NO ITEM 3.1.....	71
FIGURA 12: IMAGEM TOPOGRÁFICA DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP, FEITA PELO MODO DE VARREDURA CONTATO INTERMITENTE, APÓS A ALTERAÇÃO DO TEMPO DE ULTRASSONICAÇÃO NA SEGUNDA ETAPA PARA 3 CICLOS DE 1 MIN COM INTERVALO DE 10S ENTRE ELES.....	71
FIGURA 13: IMAGENS TOPOGRÁFICA FEITA POR MODO DE VARREDURA CONTATO INTERMITENTE DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP APÓS ALTERAÇÃO DO TEMPO DE ULTRASSONICAÇÃO DA PRIMEIRA ETAPA PARA 2 CICLOS DE 30S, COM INTERVALO DE 10S ENTRE ELES.....	74
FIGURA 14: IMAGEM TOPOGRÁFICA TRIDIMENSIONAL DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP FEITA POR AFM NO MODO DE VARREDURA CONTATO INTERMITENTE APÓS ALTERAÇÃO NO TEMPO DE ULTRASSONICAÇÃO PARA 2 CICLOS DE 30S COM INTERVALO DE 10S ENTRE ELES.....	74
FIGURA 15: IMAGEM TOPOGRÁFICA DAS NANOPARTÍCULAS DE EDTMP/PVA/PLA, NO MODO DE VARREDURA CONTATO INTERMITENTE, APÓS MODIFICAÇÃO NO TEMPO DE ULTRASSONICAÇÃO DA PRIMEIRA ETAPA DA PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS (2 CICLOS DE 30S) E DIMINUIÇÃO DA VELOCIDADE DE ULTRACENTRIFUGAÇÃO PARA 117660XG POR 20MIN.....	76
FIGURA 16: IMAGEM TOPOGRÁFICA EM MENOR ESCALA DAS NANOPARTÍCULAS DE EDTMP/PVA/PLA, NO MODO DE VARREDURA CONTATO INTERMITENTE, APÓS MODIFICAÇÃO NO TEMPO DE ULTRASSONICAÇÃO DA PRIMEIRA ETAPA DA PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS (2 CICLOS DE 30S) E DIMINUIÇÃO DA VELOCIDADE DE ULTRACENTRIFUGAÇÃO PARA 117660XG POR 20MIN.....	77
FIGURA 17: IMAGEM DE ALTURA TRIDIMENSIONAL DAS NANOPARTÍCULAS DE EDTMP/PVA/PLA, NO MODO DE VARREDURA CONTATO INTERMITENTE, APÓS MODIFICAÇÃO NO TEMPO DE ULTRASSONICAÇÃO DA PRIMEIRA ETAPA DA PRODUÇÃO DO NANOCOMPOSTO (2 CICLOS DE 30S) E DIMINUIÇÃO DA VELOCIDADE DE ULTRACENTRIFUGAÇÃO PARA 117660XG POR 20MIN.....	77
FIGURA 18: IMAGEM TOPOGRÁFICA DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP PRODUZIDAS PELO MODO DE VARREDURA CONTATO INTERMITENTE. AS NANOPARTÍCULAS FORAM PRODUZIDAS POR DOIS CICLOS DE ULTRASSONICAÇÃO DE 30S PARA FORMAR A EMULSÃO O/W, EM SEGUIDA, FOI FEITO UM CICLO DE ULTRASSONICAÇÃO DE 1MIN PARA PRODUZIR A EMULSÃO A/O/A. POR FIM, AS NANOPARTÍCULAS FORAM LAVADAS TRÊS VEZES POR CENTRIFUGAÇÃO À 24238XG POR 10MIN.....	79
FIGURA 19: IMAGENS DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP ADQUIRIDAS PELO MODO DE VARREDURA CONTATO INTERMITENTE. AS NANOPARTÍCULAS FORAM PRODUZIDAS ATRAVÉS DE 2 CICLO DE ULTRASSONICAÇÃO DE 30S PARA FORMAR A EMULSÃO O/W, EM SEGUIDA, FOI FEITO 1 CICLO DE ULTRASSONICAÇÃO DE 1MIN PARA PRODUZIR A EMULSÃO A/O/A. POR FIM, AS NANOPARTÍCULAS FORAM LAVADAS TRÊS VEZES POR CENTRIFUGAÇÃO À 24238XG POR 10MIN.....	80
FIGURA 20: IMAGENS DO SOBRENADANTE, REALIZADAS, PELO MODO DE VARREDURA CONTATO INTERMITENTE DA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP CONFORME O PROTOCOLO: 2 CICLO DE ULTRASSONICAÇÃO DE 30S PARA FORMAR A EMULSÃO O/W, EM SEGUIDA, FOI FEITO 1 CICLO DE	

ULTRASSONICAÇÃO DE 1MIN PARA PRODUZIR A EMULSÃO A/O/A. POR FIM, AS NANOPARTÍCULAS FORAM LAVADAS TRÊS VEZES POR CENTRIFUGAÇÃO À 24238XG POR 10MIN.....	81
FIGURA 21: IMAGENS TOPOGRÁFICA DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP FEITA EM MODO DE VARREDURA CONTATO INTERMITENTE. AS PARTÍCULAS FORAM PRODUZIDAS CONFORME O PROTOCOLO: 2 CICLOS DE ULTRASSONICAÇÃO DE 30S PARA FORMAR A EMULSÃO O/W E 2 CICLOS DE ULTRASSONICAÇÃO DE 1MIN PARA PRODUZIR A EMULSÃO A/O/A. POR FIM, AS NANOPARTÍCULAS FORAM LAVADAS TRÊS VEZES POR CENTRIFUGAÇÃO À 24238XG POR 10MIN. ....	81
FIGURA 22: IMAGENS DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP FEITAS PELO MODO DE VARREDURA DO DUPLO HARMÔNICO. AS NANOPARTÍCULAS FORAM PRODUZIDAS ATRAVÉS DE 2 CICLO DE ULTRASSONICAÇÃO DE 30S PARA FORMAR A EMULSÃO A/O, EM SEGUIDA, FOI FEITO 2 CICLOS DE ULTRASSONICAÇÃO DE 1MIN PARA PRODUZIR A EMULSÃO A/O/A. POR FIM, AS NANOPARTÍCULAS FORAM LAVADAS TRÊS VEZES POR CENTRIFUGAÇÃO À 24238XG POR 10MIN. ....	84
FIGURA 23: IMAGENS TOPOGRÁFICA DAS NANOESFERAS DE PLA/PVA FEITA EM MODO DE VARREDURA CONTATO INTERMITENTE. A. NANOESFERAS ANTES DE SEREM AQUECIDAS EM ESTUFA; B. NANOESFERAS DEPOIS DE SEREM AQUECIDAS EM ESTUFA; C. IMAGEM DE ALTURA TRIDIMENSIONAL DAS NANOESFERAS DE PLA/PVA APÓS TEREM SIDO AQUECIDAS EM ESTUFA. ....	89
FIGURA 24: IMAGENS TOPOGRÁFICA DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP FEITA EM MODO DE VARREDURA CONTATO INTERMITENTE. A. NANOPARTÍCULAS ANTES DE SEREM AQUECIDAS EM ESTUFA; B. NANOPARTÍCULAS DEPOIS DE SEREM AQUECIDAS EM ESTUFA; C. IMAGEM DE ALTURA TRIDIMENSIONAL DAS NANOPARTÍCULAS PLA/PVA/EDTMP APÓS TEREM SIDO AQUECIDAS EM ESTUFA. ....	90
FIGURA 25: IMAGENS TOPOGRÁFICA DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP IRRADIADAS FEITA EM MODO DE VARREDURA DUPLO HARMÔNICO. ....	92
FIGURA 26: IMAGENS DE FASE 1 DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP IRRADIADAS FEITA EM MODO DE VARREDURA DUPLO HARMÔNICO. ....	93
FIGURA 27: IMAGENS DE FASE 2 DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP IRRADIADAS FEITA EM MODO DE VARREDURA DUPLO HARMÔNICO. ....	94
FIGURA 28: IMAGEM ESTÁTICA DOS RATOS APÓS INJEÇÃO DOS COMPOSTOS AO LONGO DO TEMPO. ....	103

## Lista de Tabelas

<b>TABELA 1:</b> PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (IC%) CELULAR DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP FRENTE A TRÊS LINHAGENS TUMORAIS TESTADAS NA CONCENTRAÇÃO ÚNICA DE 5 µG/ML. .....	98
---	----

## Lista de Gráficos

GRÁFICO 1: GRÁFICO DE ABSORBÂNCIA POR COMPRIMENTO DE ONDA (NM). A LINHA CINZA REPRESENTA O ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA DO EDTMP, ENQUANTO A LINHA VERMELHA REPRESENTA O DO PVA. ....	97
GRÁFICO 2: PORCENTAGEM DE NANOPARTÍCULAS DE EDTM/PLA/PVA MARCADAS COM DIFERENTES QUANTIDADES DE AGENTE REDUTOR NA SOLUÇÃO AO LONGO DO TEMPO. ....	101
GRÁFICO 3: BIODISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE EDTMP/PVA/PLA EM 15MIN, 2H30MIN E 3H APÓS RETIRADA DOS ÓRGÃOS E CONTAGEM EM UM CONTADOR GAMA, A. %ID/ÓRGÃO; B. %ID/G POR ÓRGÃO...	105
GRÁFICO 4: : BIODISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PVA/PLA EM 2H E 24H APÓS RETIRADA DOS ÓRGÃOS E CONTAGEM EM UM CONTADOR GAMA. ....	106
GRÁFICO 5: BIODISTRIBUIÇÃO DO EDTMP NÃO ENCAPSULADO EM 2H E 2H30MIN APÓS RETIRADA DOS ÓRGÃOS E CONTAGEM EM UM CONTADOR GAMA. ....	107
GRÁFICO 6: GRÁFICO COMPARATIVO DA CAPTAÇÃO NO FÊMUR DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP (AZUL), EDTMP NÃO ENCAPSULADO (VERMELHA) E NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA (VERDE) AO LONGO DO TEMPO. ....	108

## Lista de Abreviaturas

%ID – Porcentagem da dose injetada (por órgão ou por massa)

a/o/a - Água/óleo/água

a/o – Água/óleo

AFM - Microscópio de Força Atômica

AINES - Analgésicos não esteroidais

AMP - Adenosina monofosfato

ATP – Adenosina trifosfato

BMPs – Proteínas morfogênicas do osso

CAMs - Moléculas de adesão celular

CBFA1 – Fator de ligação à superfície  $\alpha$ -1

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear

CO<sub>2</sub> – Gás carbônico

COOX-2 – Inibidores da ciclooxigenase-2

c-Src – Proto-oncogene proteína tirosina quinase Src

CSCL12 – Fator derivado do estroma 1

CT – Tomografia Computadorizada

cyt-PTPe - Fosfatases de tirosina quinase épsilon

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EDTMP - Ácido [bis(metilfósforo)amino]metil fosfórico  
ou Ácido etilenodiaminotetrametileno-fosfórico

EUA – Estados Unidos da América

FGFs - Fator de crescimento de fibroblastos

HEDP - Hidroxietileno difosfonato

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

IGF - Fator de crescimento similar a insulina

IL-6 – Interleucina-6

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

LOE – Laboratório de Oncologia Experimental

MMPs - Metaloproteinases

MDP - Mendronato de sódio

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

<sup>99</sup>Mo – Molibdênio-99

NOX – Número de Oxidação

OMS – Organização Mundial de Saúde

<sup>32</sup>P-Ortofosfato - Fósforo-32 Ortofosfato

PDGF - Fator de crescimento derivado da plaqueta

pH – Potencial hidrogenioiônico

PLA – Ácido poli-láctico

PSA – Serino Protease

PTHrP – Hormônio da paratireoide

PVA – Álcool polivinílico

Pyk2 – Tirosina quinase Pyk2

*PET Scan* - Tomografia por emissão de pósitrons

RANK – Receptor ativador do fator nuclear kB

RANKL – Ligante do receptor ativador do fator nuclear kB

<sup>186</sup>Re-HEDP - Rênio-186 ligado a hidroxietileno difosfonato

<sup>188</sup>Re-HEDP - Rênio-188 ligado a hidroxietileno difosfonato

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RNA – Ácido ribonucleico

ROI – Região de Interesse

RUNX-2 – Fator de transcrição relacionado ao *runt 2*

SDF-1 – Fator derivado do estroma 1

SIMO - Síndrome Incurável da Metástase Óssea

<sup>153</sup>Sm-EDTMP - Samário-153 ligado à ácido etileno diamina tetrametileno fosfórico

SnCl<sub>2</sub> – Cloreto Estanoso

SPM - Microscopia de Varredura por Sonda

<sup>89</sup>SrCl - Cloreto de Estrôncio-89

<sup>99m</sup>Tc- Tecnécio 99 metaestável

TGF-β - Fator de crescimento tumoral beta

TNF - Fator de necrose tumoral

uPA – Ativador de Plasminogênio Tipouroquinase

UV - Ultravioleta

# Sumário

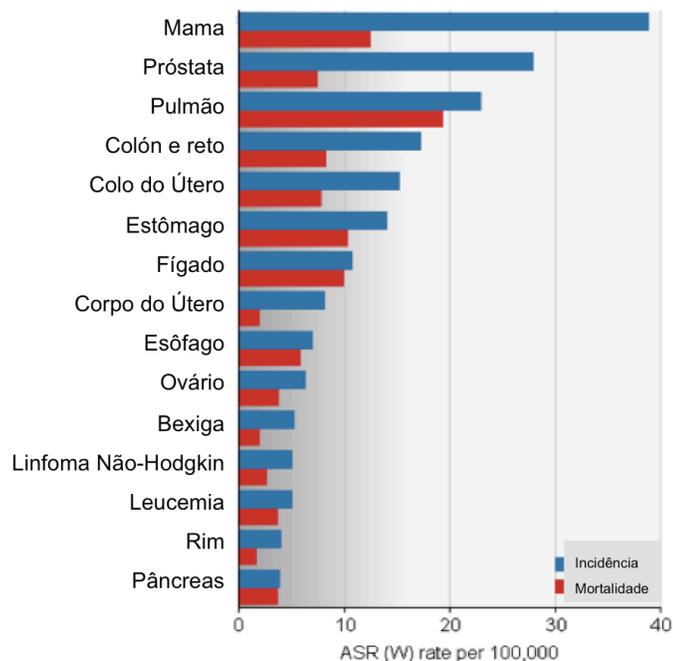
<b>1. INTRODUÇÃO:</b> .....	<b>18</b>
1.1: CÂNCER E SUA INCIDÊNCIA:.....	18
1.2: TECIDO ÓSSEO: .....	21
1.3. SÍNDROME INCURÁVEL DO CÂNCER ÓSSEO:.....	23
1.4. DIAGNÓSTICO DA SÍNDROME INCURÁVEL DA METÁSTASE ÓSSEA: .....	27
1.5. TRATAMENTO DA SÍNDROME INCURÁVEL DA METÁSTASE ÓSSEA:.....	28
1.5.1: <i>Radiofármacos usados no tratamento da SIMO:</i> .....	33
1.6. NANOTECNOLOGIA E NANORRADIOFÁRMACOS: .....	37
1.6.1. <i>Nanopartículas poliméricas:</i> .....	42
1.7. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS:.....	47
1.7.1. <i>Microscopia de varredura por sonda:</i> .....	49
1.7.2. <i>Microscopia de Força Atômica:</i> .....	50
1.7.3. <i>Modo de varredura por contato:</i> .....	52
1.7.4. <i>Modo de varredura por contato intermitente:</i> .....	52
1.7.5. <i>Espectroscopia de força:</i> .....	53
1.7.6. <i>Modo de varredura com harmônicos superiores:</i> .....	54
<b>2. OBJETIVO:</b> .....	<b>56</b>
2.1. OBJETIVO GERAL: .....	56
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	56
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS:</b> .....	<b>57</b>
3.1. PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE EDTMP:.....	57
3.1.1. <i>Método de dupla emulsificação seguida pela evaporação do solvente:</i> .....	57
3.1.2. <i>Alterações no protocolo de preparo das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP pelo método dupla emulsificação seguida pela evaporação do solvente:</i> .....	58
3.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DIMENSIONAL DAS NANOPARTÍCULAS:.....	59
3.3. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DEFINIR SE AS NANOPARTÍCULAS SÃO CÁPSULAS OU ESFERAS MACIÇAS: .....	60
3.4. RESISTÊNCIA DAS NANOPARTÍCULAS À IRRADIAÇÃO COM RAIOS GAMA ( $\Gamma$ ):.....	61
3.5. ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DO EDTMP NAS NANOPARTÍCULAS: .....	62
3.6. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS:.....	63
3.6.1: <i>Material utilizado:</i> .....	63
3.6.2: <i>Método utilizado para análise da citotoxicidade:</i> .....	64
3.6.3: <i>Método de análise dos resultados:</i> .....	64
3.7. MARCAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS COM TECNÉCIO-99M: .....	65
3.7.1. <i>Processo de marcação das nanopartículas pelo método direto:</i> .....	65
3.7.2. <i>Caracterização do processo de marcação das nanopartículas:</i> .....	65
3.7.3. <i>Processo de marcação das nanopartículas pelo método direto para avaliação da biodistribuição:</i> .....	66
3.8.2: <i>Avaliação da biodistribuição das nanopartículas marcadas com <math>^{99m}\text{Tc}</math>:</i> .....	67
<b>4. DISCUSSÃO DE RESULTADOS:</b> .....	<b>69</b>
4.1. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS: .....	69
4.2. CLASSIFICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP EM NANOCÁPSULAS OU NANOESFERAS:....	87
4.3. ANÁLISE DA RESISTÊNCIA DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP À DIFERENTES DOSES DE RADIAÇÃO GAMA: .....	91
4.4. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO EDTMP NAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP: .....	96

4.5. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP: .....	98
4.6. DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE MARCAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA/PVA/EDTMP COM <sup>99m</sup> Tc E AVALIAÇÃO DE SUA BIODISTRIBUIÇÃO IN VIVO: .....	99
<b>4. CONCLUSÕES: .....</b>	<b>110</b>
<b>5. PERSPECTIVAS: .....</b>	<b>111</b>
<b>6.REFERÊNCIA:.....</b>	<b>113</b>

## **1.Introdução:**

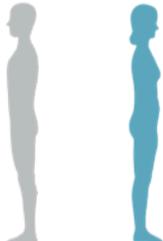
### **1.1: Câncer e sua incidência:**

Mutações acumuladas no genoma podem acarretar uma falta de controle em processos essenciais à célula, como proliferação, morte e diferenciação, levando a um possível desenvolvimento de câncer. Essas células se tornam auto-suficientes quanto a fatores de crescimento, insensíveis a fatores inibitórios de proliferação, não respondendo à apoptose e morte programada, em consequência, possuem um grande potencial replicativo, estimulando a angiogênese e podem possuir a capacidade de invadir tecidos diferentes do seu de origem (Melo *et al.*, 2003). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2030 são esperados 27 milhões de novos casos de câncer e 17 milhões de mortes (Inca, 2011). Dados da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) revelam que em 2008 os cânceres com maior incidência na população mundial, excluindo o câncer de pele não melanoma, foram os de próstata, mama e pulmão (figura 1).



**Figura 1:** Relação de incidência e mortalidade por câncer na população mundial em 2008, excluindo o câncer de pele não melanoma. Estão entre os mais incidentes, os cânceres de mama, próstata, pulmão e rins. Fonte: Adaptado de OMS-IARC.

No Brasil, estima-se a ocorrência de aproximadamente 500.000 novos casos de câncer em 2012, sendo a mesma expectativa para 2013. Aqueles com maior incidência na população masculina serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago, somando um total de aproximadamente 250.000 novos casos. Já na população feminina, os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula da tireóide serão os de maior incidência, somando um total de aproximadamente 260.000 novos casos (figura 2) (Inca, 2011).

Localização primária			Localização primária				
	casos novos	percentual				casos novos	percentual
			<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>			
Próstata	60.180	30,8%			Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

\*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

**Figura 2:** Tipos de câncer com maior incidência estimados para 2012 na população brasileira, exceto pele não melanoma. Encontram-se entre os mais incidentes, os cânceres de próstata e pulmão na população masculina e os cânceres de mama, glândulas tireóide e pulmão na população feminina (Inca, 2011).

A incidência de câncer ósseo como fonte primária é rara, sendo este caso comum ainda na infância, principalmente na região dos joelhos. A forma mais recorrente de acometimento do tecido ósseo é devido a um processo oncológico secundário, conhecido como metástase (Pandit-Taskar *et al.*, 2004; Serafini, 2001; Stevens & Lowe, 2001). Esta segunda forma caracteriza a síndrome incurável da metástase óssea, sendo responsável por 99% dos tumores malignos que acometem o tecido ósseo (Meohas *et al.*, 2005). Os locais de metástase são comumente as vértebras, arcos costais, pelve e fêmur. Os principais focos tumorais primários, responsáveis por 80% dos casos de metástase óssea são: próstata, mama, pulmão, rins e tireóide (Meohas *et al.*, 2005; Pandit-Taskar *et al.*, 2004; Serafini, 2001; Smith, 2011). Tanto os tumores primários de próstata quanto os de mama são aqueles de maior incidência no mundo e também no Brasil (figuras 1 e 2) (Inca, 2011).

## **1.2: Tecido ósseo:**

O tecido ósseo humano é um tecido de sustentação caracterizado pela sua rigidez e dureza. Suas principais funções são: apoio mecânico, locomoção, proteção e reservatório metabólico. Outra importante característica dos ossos é a hematopoiese que acontece na medula. Este tecido é composto por uma matriz mineralizada composta de sais minerais inorgânicos depositados em uma matriz não mineralizada de colágeno e glicosaminoglicanas com dois principais tipos celulares: células de sustentação (osteoblastos) e células remodeladoras (osteoclastos) (Stevens & Lowe, 2001).

A matriz extracelular é composta por um material especializado denominado osteóide, que é constituído por fibras de colágeno tipo I e, entre elas, infiltrados de proteoglicanas e glicosaminoglicanas, que se ligam fortemente a íons cálcio e outros sais minerais inorgânicos (Pandit-Taskar *et al.*, 2004; Stevens & Lowe, 2001). Osteoblastos têm a função de moldagem do osso, pois secretam o osteóide e sais minerais para a formação da matriz óssea. Dentre os sais encontram-se complexos cristalinos de hidróxido de cálcio e fosfato, denominados hidroxiapatita. Essas células são encontradas nas superfícies externas dos ossos (osteoblastos) e em pequenos espaços denominados lacunas (osteócitos) e são originárias de células precursoras denominadas osteoprogenitoras (Stevens & Lowe, 2001). Para a diferenciação, alguns fatores de transcrição são cruciais, como exemplo temos o fator RUNX-2, também denominado fator de ligação à superfície  $\alpha$ -1 (CBFA1). A diferenciação e proliferação dos osteoblastos são estimuladas por hormônio da paratireóide, prostaglandinas, citocinas e fatores de crescimento, dos quais se destacam o fator de crescimento

derivado da plaqueta (PDGF), produzido pelos linfócitos, e fatores de crescimento presos à matriz óssea, tais como proteínas morfogênicas do osso (BMPs), fator de crescimento tumoral (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento similar à insulina (IGFs) e fator de crescimento de fibroblastos (FGFs) (Roodman, 2004).

Já os osteoclastos remodelam o osso conforme as tensões mecânicas locais, degradando a matriz óssea e liberando os íons cálcio. Eles se encontram em forma de colônias direcionadas para a matriz óssea e se aderem a mesma, via integrinas e proteínas do citoesqueleto, sendo o sítio predominante de adesão, os receptores de vitronectina (integrina  $\alpha v \beta 3$ ) que reconhecem sequências de proteínas específicas da matriz óssea. Tal processo é facilitado pela catepsina k que expõe a região  $\alpha v \beta 3$  do colágeno (Pandit-Taskar *et al.*, 2004; Serafini, 2001; Smith, 2011; Stevens & Lowe, 2001). A ativação dessas integrinas leva ao recrutamento de c-Src, dependente de Pyk2, para a membrana plasmática que, então, fosforila as isoformas das fosfatases de tirosina quinase épsilon (cyt-PTPe), permitindo então a adesão dos osteoclastos à matriz e a consequente ativação e formação de uma estrutura dinâmica conhecida como podossomo. Tal estrutura é selada de forma que os osteoclastos liberem ácido clorídrico e proteases a fim de realizar a reabsorção óssea apenas naquele local (Smith, 2011).

O processo de digestão da matriz inorgânica se dá através da produção de ácido clorídrico. O pH nessa região pode atingir 4,5, dissolvendo a matriz orgânica e ativando algumas proteínas, por exemplo, a cisteína proteinase catepsina k, a qual é ativada à baixo pH e degrada o colágeno tipo I (Smith, 2011).

Tanto o processo de reabsorção óssea quanto o processo de remodelamento são dinâmicos e contínuos, sendo muito bem controlados pelo organismo e regulados por paratormônio, citocinas estimuladoras de osteoclastos e fatores de crescimento. Durante a reabsorção óssea, fatores de crescimento e íons minerais são liberados pela matriz óssea. Esse processo pode ser inibido pela calcitonina, quando os níveis séricos de íons cálcio encontram-se elevados.

No entanto, no caso de algumas doenças ósseas, como o câncer, ocorre um desequilíbrio, principalmente na matriz orgânica, que leva a um crescimento exagerado dos ossos ou a completa depleção do mesmo. Neste caso, os osteoclastos parecem realizar uma reabsorção inadequada, perdendo sua mobilidade, o que leva a uma perfusão profunda (Smith, 2011).

### **1.3. Síndrome Incurável do Câncer Ósseo:**

O processo metastático nos ossos acomete 50% dos pacientes diagnosticados com câncer (Smith, 2011). Aproximadamente 65% dos pacientes com câncer de próstata ou mama e 35% daqueles com câncer avançado de pulmão, tireóide e rim terão metástase óssea sintomática (Paes *et al.*, 2011). Alguns fatores favorecem o surgimento de metástase nos ossos, tais como fluxo sanguíneo aumentado nas regiões de medula vermelha e uma matriz com fatores de crescimento armazenados, que são liberados com o desenvolvimento do tumor (Meohas *et al.*, 2005; Paes *et al.*, 2011; Paes & Serafini, 2010; Pandit-Taskar *et al.*, 2004; Roodman, 2004; Serafini, 2001; Smith, 2011). A metástase ocorre através de um processo patológico complexo. Para

esta ocorrer são necessários os seguintes passos: i) crescimento tumoral no foco primário; ii) invasão da matriz extracelular e migração para o estroma intersticial; iii) angiogênese e linfangiogênese que ajuda tanto na expansão em tamanho do tumor quanto na possibilidade de metástase, uma vez que, através desses vasos, a célula tumoral pode atingir a corrente sanguínea ou linfática; iv) desligamento das células cancerosas; v) extravasamento do tecido; vi) sobrevivência na circulação; vii) quimioatração por alguns fatores como fator derivado do estroma 1 (SDF-1 ou CXCL12); viii) arrastamento na parede endotelial da medula óssea; ix) extravasamento para o tecido ósseo e menor adesão célula-célula óssea; x) estabelecimento de um microambiente metastático via um *cross-talk* entre as células cancerosas e os osteoblastos; x) proliferação no parênquima do tecido ósseo (Finlay *et al.*, 2005).

As células tumorais possuem moléculas de adesão alteradas, uma vez que, para invadirem outros tecidos precisam interagir com proteínas da matriz, com células do estroma e com células endoteliais e sanguíneas. As proteínas comumente modificadas são: a caderina, principalmente a E-caderina nos carcinomas de mama, próstata e tireóide; as moléculas de adesão celular (CAMs) para interação célula-célula; e as integrinas para a interação célula-matriz extracelular. Essas alterações permitem a proliferação descontrolada dessas células, ou ainda, potencializam a interação com fibroblastos e células endoteliais, o que permite a mobilidade e invasão do tecido pelas células tumorais (Melo *et al.*, 2003).

As integrinas sinalizam à célula sadia quais as adequações necessárias para se adaptar ao meio extracelular, podendo sinalizar à mesma que ela foi desalojada, permitindo que se inicie um processo de morte celular programada por apoptose. Nas

células cancerosas há uma variação no padrão de expressão e função das integrinas, principalmente quanto à integrina  $\alpha6\beta1$ , que se torna responsável pelo processo de migração disfuncional. Essa migração pode ocorrer pelo movimento individual (migração amebóide) ou pelo movimento celular coletivo carreando células heterogêneas entre si (Melo *et al.*, 2003).

As células tumorais recrutam células endoteliais a fim de formarem estruturas vasculares que garantam ao tumor um influxo de nutriente e oxigênio. Tal processo é conhecido como angiogênese, no entanto, os vasos formados possuem diâmetro irregular, paredes finas e mais permeáveis. Quando formados esses vasos sanguíneos, algumas células tumorais podem se soltar do tumor e migrar para dentro dos mesmos, diferentemente das células normais que durante tal processo se fragmentariam (Melo *et al.*, 2003).

Uma vez no tecido ósseo, as células cancerosas não conseguem destruí-lo por si só, no entanto, podem secretar fatores parácrinos, por exemplo: o peptídeo relacionado ao hormônio da paratireóide (PTHrP), que estimula a expressão de RANKL; proteína inflamatória de macrófago 1 e interleucina-6 (IL-6). Juntos, esses fatores levam ao estímulo dos osteoblastos e/ou osteoclastos. As células cancerosas estimulam o sistema RANKL/RANK e por conseguinte a osteoclastogênese. Além disso, o ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA), aumentado na região do tumor, ativa a capacidade proteolítica das metaloproteinases (MMPs) constituintes da matriz óssea. Essas por sua vez ajudam na desestruturação do tecido (Melo *et al.*, 2003; Roodman, 2004; Smith, 2011). Não obstante, no caso do tumor primário ser câncer de próstata, há

a produção de uma serino protease (PSA), que quando secretada no tecido ósseo degrada a matriz desse, permitindo a liberação de alguns fatores de crescimento, como IGF e TGF- $\beta$ . Estes, por sua vez, estimulam os osteoblastos (Roodman, 2004). Os quadros apontados acima culminam com o desenvolvimento da metástase óssea osteoblástica (superprodução de osso) e/ou osteolítica (quebra/disrupção óssea) (Pandit-Taskar *et al.*, 2004; Serafini, 2001; Smith, 2011). A maioria dos pacientes com câncer de mama apresenta metástase óssea osteolítica, já em pacientes com câncer de próstata é mais comum a metástase osteoblástica (Roodman, 2004).

Esse quadro da metástase óssea pode causar: osteopenia, que aumenta o risco de fraturas patológicas e lesões na medula espinhal devido à desestruturação do osso no local do tumor, sendo mais comum em pessoas que apresentam apenas um local de metástase; hipercalemia maligna e problemas metabólicos, uma vez que a degradação da matriz óssea libera íons cálcio; além de uma dor profunda e constante, que no início é fraca e de baixa intensidade, no entanto, conforme a doença avança, a dor alcança um estado crônico com episódios agudos e lancinante, mesmo o paciente estando medicado com analgésico (Coleman, 2000; Paes *et al.*, 2011; Pandit-Taskar *et al.*, 2004; Smith, 2011). Passaremos a nos referir sobre esse conjunto de sinais e sintomas “Síndrome Incurável da Metástase Óssea” (SIMO).

A dor é um dos principais sintomas e acomete 83% dos pacientes diagnosticados com SIMO (Smith, 2011). Os receptores de dor dos tecidos corpóreos são terminações nervosas livres espalhadas por todos os tecidos do corpo e com maior concentração na pele. Diferentes fatores são responsáveis por esse estímulo, como o estresse

mecânico, extremos de calor e frio, substâncias químicas (bradicinina, serotonina, histamina, íons potássio) entre outros (Guyton, 1984).

A dor na SIMO pode ser proveniente de diversos fatores que causam hiperalgesia e alodinia<sup>1</sup>; osteólise elevada que pode levar a fratura patológica; inflamação de astrócitos<sup>2</sup> da medula espinhal; diminuição do pH na região do tumor; instabilidade mecânica de ossos fracos; alta pressão inter-óssea; e estimulação de nervos nociceptores periféricos devido à produção de mediadores, como citosinas, prostaglantina E, bradicinina, serotonina, substância P, fator de necrose tumoral (TNF), entre outros, pelas próprias células cancerosas ou por células sadias vizinhas (Meohas *et al.*, 2005; Paes *et al.*, 2011; Roodman, 2004).

A dor aumenta com a atividade física, assim como o risco de fratura. Além disso, atividades que normalmente não causam dor, como tossir e movimentos leves com os braços, são descritos como muito dolorosos (Guyton, 1984; Paes *et al.*, 2011; Paes & Serafini, 2010; Smith, 2011; Stevens & Lowe, 2001).

#### **1.4. Diagnóstico da Síndrome Incurável da Metástase Óssea:**

O diagnóstico da metástase óssea se inicia com testes laboratoriais, tais como hemograma completo, dosagem de eletrólitos (sódio, potássio, cálcio entre outros), dosagem de enzimas como a fosfatase alcalina e a desidrogenase láctica, dosagem de

---

<sup>1</sup> Alodinia: crescimento ósseo desregulado que leva ao estiramento ou compressão de estruturas sensíveis como nervos e vasos sanguíneos e linfáticos.

<sup>2</sup> Astrócitos: são células que fazem parte do cérebro e da medula espinhal e possuem como principais funções a sustentação e a nutrição dos neurônios.

marcadores tumorais, dosagem hormonal, entre outros (Meohas *et al.*, 2005). O diagnóstico tem continuidade com estudos por imagem. Iniciando, segundo Coleman (2000) e Meohas *et al.* (2005), por uma radiografia simples do local acometido, com o intuito de ser realizada uma primeira análise da gravidade do tumor.

Em seguida pode-se realizar um diagnóstico mais preciso e completo por um dos seguintes métodos: cintilografia óssea usando Mendronato de sódio (MDP) marcado com  $^{99m}\text{Tc}$ , tomografia de ressonância magnética nuclear (RMN) utilizando Gadolínio como contraste, tomografia por emissão de pósitrons (*PET Scan*) ou tomografia por emissão de pósitrons associada a tomografia computadorizada (PET/CT) usando fluordeoxiglicose marcada com  $^{18}\text{F}$ . O último é aquele que apresenta resultados mais satisfatórios no diagnóstico da SIMO. Nesses exames de imagem, a metástase óssea pode ser classificada como: osteoblástica, osteoclástica, ou mista. Além disso, podem delinear a extensão e gravidade da doença e advertirem para o risco de fratura e compressão do nervo (Even-Sapir *et al.*, 2006; Meohas *et al.*, 2005; Paes *et al.*, 2011).

### **1.5. Tratamento da Síndrome Incurável da Metástase Óssea:**

Apesar de incurável os tratamentos disponíveis para a SIMO visam à melhora de qualidade de vida do paciente, através do alívio total ou parcial da dor, por uma diminuição da morbidade esquelética, menor chance de fraturas patológicas e descompressão neurológica (Meohas *et al.*, 2005; Smith, 2011; Stevens & Lowe, 2001). É importante ressaltar que, nenhum tratamento sozinho é adequado para o controle

efetivo da dor gerada pela SIMO, sendo necessário combinar pelo menos um tratamento de ação sistêmica com um de ação local (Paes *et al.*, 2011).

O tratamento tradicional segue o Guia de Analgésico para Alívio da Dor da OMS e a Monografia para Alívio de Dor por Câncer, que já foi validado em vários países (Smith, 2011). Inicia-se o tratamento com dipirona, paracetamol e os analgésicos não esteroidais (AINES), principalmente os inibidores da ciclooxigenase-2 (COOX-2) seletivos que tem propriedades anti-tumor e antiangiogênica, para dor fraca à moderada. Em seguida, conforme a doença progride, utilizam-se os opióides fracos e de ação curta juntamente com aspirina e paracetamol, até substituir o uso destes por opióides de longa duração, como a morfina. Essa classe farmacêutica, em geral, leva ao alívio da dor, mas possui uma dose limitada devido aos seus efeitos colaterais, tais como: constipação, náusea, disforia, sonolência, tolerância, imunossupressão, limitação mental e vício (Paes & Serafini, 2010; Smith, 2011).

Alguns hormônios podem ser usados no tratamento da SIMO, dentre eles o mais comum é a calcitonina que inibe a função de reabsorção óssea pelos osteoclastos (Meohas *et al.*, 2005; Smith, 2011; Stevens & Lowe, 2001). No entanto, de acordo com Paes *et al.* (2010), conforme a doença progride, os tumores se tornam resistentes a hormônios e a dor reincide.

Os bifosfonatos inibem a função dos osteoclastos e assim o processo de reabsorção óssea (Meohas *et al.*, 2005; Smith, 2011; Stevens & Lowe, 2001). Aqueles de primeira geração dão origem à metabólitos dentro da célula, análogos de ATP, que interferem no potencial de membrana das mitocôndrias e levam essas células à

apoptose; ou de segunda geração, que são internalizados pelos osteoclastos sem sofrerem metabolização e atuam em enzimas cruciais para essas células, principalmente nas modificações pós-transcricionais de várias GTPases bloqueando, assim, o transporte vesicular dentro das células, impossibilitando a formação da zona selada pelos osteoclastos. Essa última geração de bifosfonatos também podem ser conjugados a adenosina monofosfato (AMP), formando um análogo de adenosina trifosfato (ATP) que levam essas células à apoptose (Coleman, 2000; Smith, 2011). Além disso, eles estimulam a diferenciação dos osteoblastos levando a formação e reparo do osso, o que é uma vantagem na regeneração deste no caso de metástases osteoclásticas e uma desvantagem no caso de metástases mistas. Os bifosfonatos são recomendados nos seguintes casos: redução de fraturas patológicas e compressão da medula óssea em consequência à SIMO (Paes & Serafini, 2010). Os efeitos colaterais dos bifosfonatos são: dores estomacais e refluxo; sintomas similares à gripe quando injetados; astralgia; febre; mialgia; aumento da dor óssea nas primeiras horas pós-injeção; falência renal; e osteonecrose da mandíbula e maxila devido ao uso prolongado (Paes & Serafini, 2010; Passeri *et al.*, 2011).

O tratamento cirúrgico é o mais eficiente em muitos casos, pois melhora tanto os sintomas como a doença propriamente dita. Ele pode ser uma cirurgia de intervenção, remoção de parte do tecido, bloqueio do nervo ou aumento vertebral por vertebroplastia através da injeção de polimetilmetacrilato. (Coleman, 2000; Smith, 2011). No entanto, segundo Smith (2011), dificilmente o paciente consegue se submeter à cirurgia, uma vez que sua saúde encontra-se muito debilitada sendo o risco cirúrgico maior do que o benefício.

A quimioterapia visa à morte celular e a destruição do tumor. No entanto, não há nenhum medicamento dessa classe específico para metástase óssea. Além disso, a administração é difícil e tem muitos efeitos adversos (Meohas *et al.*, 2005; Paes *et al.*, 2011; Stevens & Lowe, 2001).

A radioterapia externa tem se mostrado um tratamento bastante eficiente, pois reduz a intensidade da dor; melhora a analgesia, com conseqüente diminuição do uso de analgésicos; e diminui o risco de fraturas (Paes *et al.*, 2011; Smith, 2011). Essa terapia atua de diferentes modos: através da morte de células cancerosas e progenitoras de osteoclastos e pela inativação de osteoblastos radiosensíveis, o que também reduz a ativação dos osteoclastos (Meohas *et al.*, 2005; Smith, 2011; Stevens & Lowe, 2001). Assim, a radioterapia externa é o tratamento indicado para metástase óssea localizada em uma região, não sendo eficiente para metástase multifocal, nem em locais que já foram submetidos anteriormente à radiação (Paes *et al.*, 2011). Além disso, ela também não é recomendada para locais que sofreram fraturas patológicas, uma vez que inibe a condrogênese, não permitindo a cura dessa fratura (Coleman, 2000). O tratamento de radioterapia apresenta alguns efeitos colaterais como supressão da medula óssea, diarreia, náusea, linfodema, fadiga, pneumonite devido à radiação, perda de cabelo, dentre outros (Paes *et al.*, 2011).

Recentemente, os radiofármacos vêm despontando como um tratamento local contra a dor desenvolvida na SIMO, principalmente para aqueles pacientes com metástases ósseas múltiplas e que já foram previamente tratados com outras terapias sem melhora significativa na clínica (Paes *et al.*, 2011). Essa classe farmacêutica é constituída de duas partes principais. A primeira consiste em um radionuclídeo, que é

responsável pelas propriedades físicas desse medicamento. Estes podem ser principalmente emissores de beta (terapêutica). A segunda parte da molécula é um vetor fisiológico que possui a função de carrear o radionuclídeo até o órgão desejado (Santos- Oliveira, 2010). Segundo Paes *et al.* (2011), uma vantagem desse tipo de estrutura é que a radiação pode ser direcionada seletivamente a tumores pequenos e subclínicos.

Os radiofármacos são indicados para o tratamento da dor óssea provinda de metástases osteoblástica ou mista. Esse tratamento apresenta algumas vantagens, tais como: evita o uso de radioterapia externa, são de fácil administração intravenosa, tratam de sítios múltiplos e diversos e, por fim, diminuem o uso de quimioterápicos e analgésicos, diminuindo a dependência, no caso de opióides. Apresentam poucos efeitos adversos como enjôo, vômito, diarreia e possível dano aos tecidos. Dessa forma, esta terapia representa aumento de qualidade de vida do paciente, assim como, de sua sobrevida, principalmente quando usadas no paciente recém-diagnosticado, podendo ser seguida de quimioterápicos ou radioterapia. Além disso, são medicamentos com doses individualizadas, baseadas nas características do paciente (Paes & Serafini, 2010).

Os radiofármacos podem ser usados na forma de monoterapias ou conjuntamente com outras terapias e, em geral, apresentam boa tolerância. Eles possuem como contra-indicação absoluta a gravidez (6-12 meses depois de ser administrada a dose) e, também, a amamentação (Brenner *et al.*, 2001; Paes *et al.*, 2011; Pandit-Taskar *et al.*, 2004; Serafini, 2001; Smith, 2011). Outra contra-indicação é a citopenia devido à possível mielossupressão causada pela administração dos

radiofármacos. Por conta disso, os candidatos para o uso desses fármacos devem ter feito exame sanguíneo com contagem completa de plaquetas e células brancas (Paes *et al.*, 2011; Serafini, 2001).

### **1.5.1: Radiofármacos usados no tratamento da SIMO:**

Os radiofármacos - todos emissores de partícula beta - atualmente utilizados no tratamento da dor óssea causado pela Síndrome Incurável da Metástase Óssea são: Fósforo-32 Ortofosfato ( $^{32}\text{P}$ -Ortofosfato), Cloreto de Estrôncio-89 ( $^{89}\text{SrCl}$ ), Rênio-186 ou Rênio-188 ligado à hidroxietileno difosfonato ( $^{18\text{X}}\text{Re}$ -HEDP) e Samário-153 ligado ao ácido etilenodiaminatetrametilenofosfórico ( $^{153}\text{Sm}$ -EDTMP) (Paes & Serafini, 2010; Paes *et al.*, 2011; Smith, 2011).

O Fósforo-32 ortofosfato possui grande atração pelo tecido ósseo devido ao elemento Fósforo, que é um dos constituintes dos cristais de hidroxiapatita presentes na matriz inorgânica desse tecido. Pelo mesmo motivo, ele pode ser incorporado na estrutura do DNA e/ou RNA (Paes *et al.*, 2011). O  $^{32}\text{P}$  decai via emissão de partículas beta de alta energia (1,7MeV) e seu tempo de meia-vida física é igual a 14,3 dias (Saha, 2010). Segundo Smith (2011), 83% dos pacientes apresentam alívio da dor. No entanto, este radiofármaco por ser incorporado aos ácidos nucleicos e ao tecido ósseo, foi o que apresentou, até agora, mais casos de mielossupressão acentuada e irreversível, sendo, por conta disso, o menos utilizado na prática clínica (Brenner *et al.*, 2001; Paes & Serafini, 2010; Pandit-Taskar *et al.*, 2004; Smith, 2011).

O estrôncio-89 é um cátion divalente que no meio biológico comporta-se como cálcio, sendo incorporado nos cristais de hidroxiapatita, depositando-se na matriz

inorgânica do tecido ósseo (Paes *et al.*, 2011). O  $^{89}\text{Sr}$  emite partículas beta com o máximo de energia de 1,43MeV e, dentre os radionuclídeos usados no tratamento da SIMO é o que possui maior tempo de meia-vida físico: 50,6 dias (Saha, 2010). Assim, segundo Smith (2011), 80% dos pacientes que fazem uso desse medicamento apresentam trombocitopenia e leucopenia profunda. Dessa forma, o uso dessa terapia não mostrou grande diferença em relação à radioterapia externa (Paes *et al.*, 2011; Pandit-Taskar *et al.*, 2004; Saha, 2010; Serafini, 2001; Smith, 2011).

O radiofármaco  $^{186}\text{Re}$ -HEDP tem uso aprovado apenas na Europa para a administração contra a dor óssea causada pelo SIMO. Ele possui uma meia vida física de 89,3h e emite partículas beta com energia igual a 1,07MeV. O alívio da dor pode variar de 1-12 meses, sendo os principais efeitos adversos uma mielosupressão reversível em 8 semanas e um aumento leve na dor em alguns dias após a injeção (Brenner *et al.*, 2001; Paes & Serafini, 2010; Sciuto *et al.*, 2000).

O radionuclídeo  $^{188}\text{Re}$  é o emissor beta de mais alta energia (2,12MeV) dentre os cinco usados no tratamento da SIMO. Devido à alta energia das partículas beta emitida por esse radionuclídeo, sua penetração no tecido ósseo pode chegar a 10,4mm (Paes & Serafini, 2010; Palmedo *et al.*, 2000; Palmedo *et al.*, 2003). Os principais efeitos colaterais são leucopenia e trombopenia (Smith, 2011). Esse radiofármaco ainda está sob pesquisa clínica (Palmedo *et al.*, 2000; Palmedo *et al.*, 2003).

O radiofármaco  $^{153}\text{Sm}$ -EDTMP é comumente usado na clínica para tratamento da dor da SIMO e, segundo Serafini (2001), 70-80% dos pacientes tratados apresentaram alívio total ou parcial da dor sendo observada em alguns casos a regressão da

metástase (Paes *et al.*, 2011). Em um estudo comparativo com o radiofármaco  $^{89}\text{SrCl}$ , o  $^{153}\text{Sm-EDTMP}$  apresentou melhores resultados (Baczyk *et al.*, 2007). O grupamento EDTMP faz com que o complexo se concentre no osso, principalmente por se ligar aos cristais de hidroxiapatita presentes neste tecido, em áreas em que a atividade osteoblástica está aumentada. Assim, este radiofármaco possui uma preferência por metástase osteoblástica (Paes *et al.*, 2011).

O  $^{153}\text{Sm-EDTMP}$  é produzido pelo bombardeio de nêutrons no óxido de  $^{152}\text{samário}$ , que é, então, complexado com o Ca-EDTMP (Paes *et al.*, 2011; Saha, 2010). O  $^{153}\text{Sm}$  possui emissão de partículas beta de diferentes energias: 810 keV 20%, 710 keV 50% e 640 keV 30%, sendo a maior parte de média energia. Desta forma, atua mais superficialmente nos ossos, atingindo a medula óssea em menor quantidade quando comparado aos outros radiofármacos citados. Seu tempo de meia-vida física é de 46,5h, sendo consideravelmente menor do que o dos outros (Eary *et al.*, 1993; Paes *et al.*, 2011; Pandit-Taskar *et al.*, 2004; Saha, 2010; Serafini, 2001; Smith, 2011). Em ossos saudáveis e com poucos orifícios, a penetração é muito pequena, não chegando a atingir a medula de forma significativa. A penetração em tecidos moles é relativamente baixa e existe a vantagem do EDTMP ter atração pelas células ósseas (Brenner *et al.*, 2001; Eary *et al.*, 1993; Pandit-Taskar *et al.*, 2004; Serafini, 2001). De acordo com Paes *et al.* (2011), a dose no osso varia entre 15-95% dependendo da atividade osteoblástica, acumulando cinco vezes mais na metástase do que no tecido ósseo saudável. A medula e a bexiga também são irradiadas com uma dose menor. Os outros órgãos não recebem doses mensuráveis (Paes & Serafini, 2010). O  $^{153}\text{Sm}$  emite partículas gama de 103keV, o que pode ser utilizado para fazer o acompanhamento do

tratamento depois da administração e controlar sua distribuição no tecido. Esse exame é comparável ao feito com  $^{99m}\text{Tc-MDP}$  e, através dele, pode-se individualizar a dose conforme o paciente (Brenner *et al.*, 2001; Eary *et al.*, 1993; Even-Sapir *et al.*, 2006; Meohas *et al.*, 2005; Paes *et al.*, 2011; Pandit-Taskar *et al.*, 2004; Saha, 2010; Serafini, 2001; Smith, 2011).

A administração do  $^{153}\text{Sm-EDTMP}$  é por via intravenosa e a dose recomendada é de 1.0mCi/kg (37MBq/kg). O alívio da dor tem início entre 48h a quatro semanas após a injeção e pode permanecer por até 16 semanas. Em muitos casos, o uso de analgésicos é diminuído, chegando algumas vezes a ser retirado por completo (Brenner *et al.*, 2001; Eary *et al.*, 1993; Meohas *et al.*, 2005; Pandit-Taskar *et al.*, 2004; Saha, 2010; Serafini, 2001; Smith, 2011). O tempo de meia-vida biológico desse radiofármaco é de 65min, restando apenas 1% na circulação sanguínea após uma hora da administração. A excreção se dá por via renal e está completa após 6h da administração (Brenner *et al.*, 2001; Eary *et al.*, 1993; Paes *et al.*, 2011; Serafini, 2001; Smith, 2011).

Apesar da eficiência de uma única dose, a administração de repetidas doses com um espaçamento de seis a oito semanas mostrou-se mais eficaz no alívio da dor (Paes & Serafini, 2010; Saha, 2010; Smith, 2011). No entanto, neste caso se observa uma maior chance de mielossupressão, mesmo que reversível (Saha, 2010). Este efeito adverso ocorre devido ao tratamento crônico com partículas beta. Pacientes com maior comprometimento do tecido ósseo, devido à metástase, apresentam maior toxicidade na medula, pois a penetração até esta é mais fácil, o que pode levar a uma trombocitopenia. Nesta, células brancas e vermelhas do plasma decaem nas primeiras

três a quatro semanas. No entanto, na grande maioria dos pacientes, estas células voltam ao normal depois de oito semanas (Paes & Serafini, 2010). O uso de  $^{153}\text{Sm}$ -EDTMP é contra-indicado em pacientes alérgicos a fosfato e não deve ser administrado no mesmo dia que bifosfonatos, pois, apesar de não comprovada, pode haver uma competição pelo sítio ativo nos cristais de hidroxiapatita. O uso em pacientes com insuficiência renal deve ser monitorado, visto que o rim é o órgão responsável pela excreção desse fármaco (Paes *et al.*, 2011; Pandit-Taskar *et al.*, 2004; Saha, 2010; Serafini, 2001; Smith, 2011).

Comparando todas as características dos diversos radionuclídeos descritos acima, podemos compreender porque o  $^{153}\text{Sm}$ -EDTMP é considerado o principal radionuclídeo de escolha no combate à SIMO (Paes *et al.*, 2011). O EDTMP pode ter sua biodistribuição estudada independente do radionuclídeo, uma vez que ele é o vetor biológico. Assim, devido às vantagens apresentadas anteriormente este foi o composto de escolha deste trabalho, pois os resultados obtidos apenas com o EDTMP podem ser estendidos ao radiofármaco  $^{153}\text{Sm}$ -EDTMP.

### **1.6. Nanotecnologia e nanorradiofármacos:**

O desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, tanto para uso na terapia quanto no diagnóstico, mostrou-se um dos desafios na área da saúde nas últimas décadas (Kanzaki *et al.*, 2010; Mosconi *et al.*, 2010; Peterson & Gropler, 2010; Roca *et al.*, 2010). Ao longo dos anos, problemas como retenção ou degradação de agentes terapêuticos, baixa solubilidade, baixo direcionamento e efeitos colaterais

impossibilitaram o uso de muitas formulações (Bhirde *et al.*, 2011; Formariz *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2005; Schaffazick *et al.*, 2003).

Os recentes avanços no campo da nanotecnologia podem ser aplicados à farmacologia no intuito de resolver os problemas acima citados e têm se mostrado excelentes ferramentas. De acordo com Mora-Huertas, Fessi & Elaissari (2010), as pesquisas já abrangem diferentes classes farmacêuticas, tais como: antineoplásicos, antiinflamatórios, imunossupressores, antígenos, hormônios, antivirais, antibióticos, antifúngicos, diuréticos, vitamínicos, entre outros. O advento do desenvolvimento de radiofármacos em escala nanométrica, chamados nanorradiofármacos, propicia um novo paradigma tanto para a Medicina Nuclear quanto para a Radioproteção e Dosimetria e desponta como alternativa viável ao tratamento e diagnóstico de tumores (Garnett & Kallinteri, 2006; Ting *et al.*, 2010).

Na área farmacêutica os nanocompostos mais utilizados são: dendrímeros, micelas, nanopartículas poliméricas, nanoemulsões e lipossomas (Bhirde *et al.*, 2011; Koo *et al.*, 2005; Schaffazick *et al.*, 2003). Cada uma dessas formulações apresenta características particulares, mas a escolha adequada permite, a princípio, vantagens no transporte de fármacos até um alvo específico, ou seja, um maior biodirecionamento, levando a uma maior eficácia terapêutica; modificação na distribuição tecidual do fármaco; proteção gastrointestinal; maior estabilidade do princípio ativo; capacidade diferenciada de ultrapassar barreiras biológicas; liberação controlada/sustentada; capacidade de mascarar sabores indesejáveis e baixos índices de efeitos colaterais (menor toxicidade). Tais estruturas apresentam tamanho diminuto, variando, em geral, entre 100-500nm. O tamanho da nanopartícula também influencia as propriedades

citadas acima, em particular, o biodirecionamento, distribuição tecidual e liberação controlada (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

Em geral, os nanomateriais não conseguem penetrar membranas facilmente, sendo dependente da anatomia e fisiologia do organismo para determinar sua distribuição. Uma vez feita a administração intravenosa, os nanofármacos não conseguem seguir a rota paracelular, que seria por entre as junções das células endoteliais vasculares, pois esse espaçamento é menor que 2nm (Garnett & Kallinteri, 2006). Uma rota alternativa que pode ser usada é por dentro das células endoteliais, conhecido como transcistose. No entanto, esse processo também é dependente do tamanho, em geral, quanto maior a nanoestrutura, mais difícil é sua passagem (Garnett & Kallinteri, 2006). Entretanto, em patologias como tumores sólidos e locais inflamados, o endotélio está defeituoso e fenestrado, permitindo a entrada de estruturas maiores. No caso específico de tumores, a falta de vasos linfáticos funcionais e a maior fenestração (100 a 600nm) nos vasos sanguíneos permitem o acúmulo e a retenção do material nanométrico nessa região (Cho *et al.*, 2008; Garnett & Kallinteri, 2006).

Como mencionado anteriormente, o pH na região tumoral pode chegar a 4,5 (Smith, 2011). Assim, a nanoencapsulação dos fármacos os protege da ação do pH e das enzimas, permitindo que este mantenha sua forma e atue melhor sobre as células tumorais. Outro ponto favorável do encapsulamento do fármaco em sistemas nanoestruturados seria sua proteção contra os mecanismos de resistência a drogas das células, como é o caso da resistência mediada pela glicoproteína-P, aumentando assim a concentração do princípio ativo na célula cancerígena (Cho *et al.*, 2008).

A fim de acompanhar a biodistribuição *in vivo*, alguns métodos de marcação das nanopartículas foram desenvolvidos, estes são considerados de grande valia, uma vez que não são invasivos e permitem a análise quantitativa da distribuição das partículas ao longo do tempo por imagens (Pysz *et al.*, 2010; Soundararajan *et al.*, 2009). O processo mais comum é encapsular na nanopartícula o fármaco complexado com  $^{99m}\text{Tc}$  para visualização em gama câmara ou, então, complexá-lo com gadolínio ou outro metal coloidal, para imagem por RMN. No entanto, como a sonda não faz parte da estrutura em si ela pode ser liberada gerando um falso resultado (Vauthier & Bouchemal, 2009). Outro meio é marcar diretamente o polímero, tanto durante a formação da nanopartícula quanto após a formação desta (Ting *et al.*, 2010; Vauthier & Bouchemal, 2009). Como exemplo, temos a marcação direta com  $^{99m}\text{Tc}$  ou a substituição do próton por um agente fluorescente (Patricio *et al.*, 2011; Vauthier & Bouchemal, 2009). A principal desvantagem dessa metodologia é o aumento da nanopartícula, o que pode alterar a distribuição real da partícula (Vauthier & Bouchemal, 2009).

É possível modular a biocompatibilidade das nanoestruturas com tecidos e células por meio da composição química adequada de seus constituintes, por exemplo, associando um ou mais ligantes específicos em sua superfície (Formariz *et al.*, 2004; Koo *et al.*, 2005; Mora-Huertas *et al.*, 2010; Morales, 2007; Schaffazick *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003). Inúmeras alternativas têm sido testadas: a conjugação de moléculas bioativas ou de ligantes específicos na sua superfície, em especial peptídeos e anticorpos; mudanças na hidrofobicidade; mudanças na carga da superfície; entre outros. Tais alterações na superfície das nanoestruturas têm mostrado excelentes

resultados, uma vez que aumenta sua quimiotaxia pelas células alvos, sem alterar a estrutura do princípio ativo e sua eficácia (Cho *et al.*, 2008; Mora-Huertas *et al.*, 2010; Morales, 2007; Vauthier & Bouchemal, 2009).

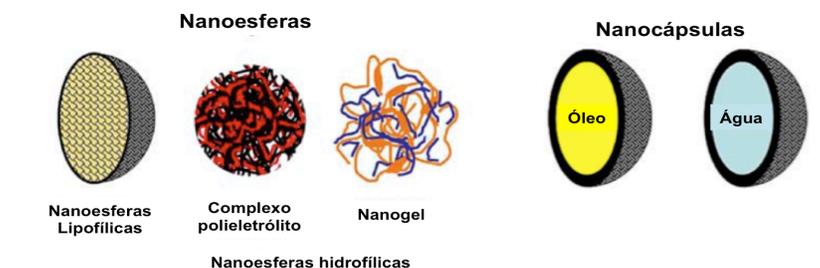
Além dessas características, propriedades adicionais podem ser obtidas conjugando esses compostos a outros elementos nanoestruturados ou mesmo utilizando polímeros biocompatíveis dotando-os, dessa forma, de características superiores a sua formulação original (Duncan, 2006; Formariz *et al.*, 2004; Mora-Huertas *et al.*, 2010; Mosconi *et al.*, 2010). Como exemplo, temos o uso do polímero PVA (acetato de polivinila) que quando na composição de nanopartículas fornece uma hepatoproteção, sendo de grande utilidade para a manutenção do fármaco na circulação sanguínea (Vauthier & Bouchemal, 2009).

As nanopartículas, quando ainda na circulação sanguínea, podem ser cobertas por proteínas do soro, como anticorpos e fatores do sistema complemento, que atuam como opsoninas. Essas facilitam a ligação das nanopartículas às células fagocíticas, principalmente macrófagos e neutrófilos. Como há grande concentração de fagócitos mononucleares nos órgãos pertencentes ao sistema retículo endotelial, principalmente fígado, baço e nódulos linfáticos, essas nanopartículas podem ser retiradas da circulação sanguínea em menos de 5 min (Garnett & Kallinteri, 2006). Esse processo é dependente de características físico-químicas dos nanocompostos tais como: tamanho, carga e hidrofobicidade (Cho *et al.*, 2008; Duncan, 2006; Formariz *et al.*, 2004; Garnett & Kallinteri, 2006; Mora-Huertas *et al.*, 2010; Mosconi *et al.*, 2010). Nanocompostos menores que 200nm conseguem ultrapassar as fenestras entre as células de Kupffer no fígado, com isso são aprisionados nesse órgão com mais facilidade (Cho *et al.*, 2008).

Nanopartículas carregadas negativamente possuem um tempo de depuração menor que compostos neutros ou carregados positivamente. Por fim, alguns estudos mostram que o recobrimento das nanopartículas com copolímeros hidrofílicos, como polietileno glicol, diminuem o reconhecimento das partículas pelo sistema imunológico e permitem que estas permaneçam na circulação sanguínea por mais tempo (Garnett & Kallinteri, 2006; Mora-Huertas *et al.*, 2010; Schaffazick *et al.*, 2003; Vauthier & Bouchemal, 2009).

### 1.6.1. Nanopartículas poliméricas:

As nanopartículas poliméricas são divididas principalmente em: nanoesferas e nanocápsulas. As nanoesferas são sistemas maciços nos quais os fármacos estão dispersos ou solubilizados em sua matriz polimérica. Já as nanocápsulas são normalmente constituídas por um invólucro polimérico ao redor de um núcleo líquido hidrofóbico ou hidrofílico, no qual o princípio ativo pode estar no núcleo, embebido na membrana polimérica ou na superfície da estrutura dependendo do momento em que se adiciona o fármaco (figura 3) (Duncan, 2006; Formariz *et al.*, 2004; Mora-Huertas *et al.*, 2010; Mosconi *et al.*, 2010; Vauthier & Bouchemal, 2009).



**Figura 2:** Estrutura de diferentes nanopartículas poliméricas. À esquerda é possível observar estruturas maciças classificadas como nanoesferas. Já à direita observam-se estruturas com um núcleo líquido recoberto por um invólucro polimérico classificado como nanocápsulas (Vauthier and Bouchemal, 2009).

As vantagens de sistemas nanoencapsulados como carreadores de fármacos são principalmente: uma possível alta eficiência do encapsulamento, uma vez que o fármaco está solúvel no núcleo; menor quantidade de polímero quando comparado com nanoesferas; existência de um invólucro protetor contra a degradação do fármaco por alguns fatores como pH e luz; e menor irritação dos tecidos que entram em contato com a formulação farmacêutica (Mora-Huertas *et al.*, 2010). Alguns estudos mostram algumas outras vantagens como: favorecem a farmacocinética dos fármacos, aumentam a biodisponibilidade do princípio ativo, aumentam o efeito terapêutico, reduzem a hepatotoxicidade, permitem a penetração na mucosa da pele e podem possuir biocompatibilidade com a mucosa ocular (Jeong *et al.*, 2008; Mainardes *et al.*, 2010; Nassar *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2008; Prego *et al.*, 2006; Vila *et al.*, 2002). Devido ao tamanho, que pode variar entre 100-500nm, os meios de administração podem ser diversos: oral, retal, transdérmico, ocular, nasal, subcutâneo, intraperitoneal, intramuscular e intravenoso (Mora-Huertas *et al.*, 2010; Vauthier & Bouchemal, 2009).

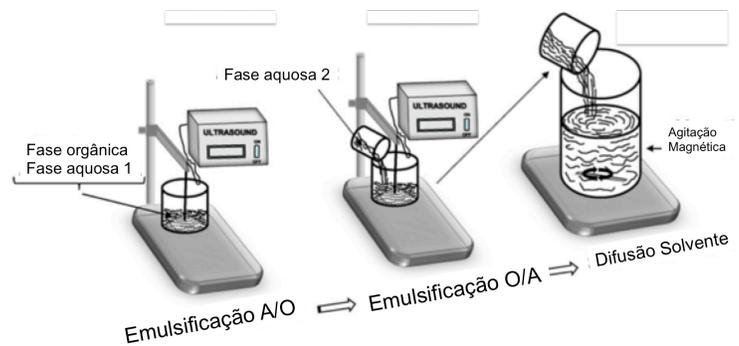
Segundo Mora-Huertas *et al.* (2010), existem seis métodos de preparação de nanocápsulas: nanoprecipitação, emulsificação-difusão, dupla emulsificação, emulsificação-coacervação, revestimento polimérico e camada por camada. Esses seguem como preceito básico formar uma emulsão e, a partir dessa, as nanopartículas são formadas. Em geral o invólucro polimérico pode ser formado de duas formas: por meio da polimerização dos monômeros entre a fase dispersa e a fase contínua ou pela precipitação do polímero na superfície das gotículas devido à retirada do solvente orgânico onde o polímero estava disperso. A polimerização de monômeros possui algumas desvantagens como: poucos polímeros com tais características estão

disponíveis para aplicação *in vivo* e a contaminação da solução final com nanoesferas e monômeros é grande (Vauthier & Bouchemal, 2009).

As características físico-químicas do fármaco, principalmente a solubilidade e objetivo terapêutico, determinam a escolha do polímero, do tensoativo e da técnica de produção da nanocápsula. Apesar de existirem muitos polímeros no mercado apenas alguns podem ser utilizados *in vivo*, uma vez que devem apresentar algumas características, tais como: biodegradabilidade, rápida eliminação do organismo, baixa toxicidade e imunogênico. Além disso, a escolha do polímero determina a porosidade e espessura do invólucro que são parâmetros importantes na proteção e liberação do fármaco. Os tensoativos usados são anfifílicos, com uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica, estabilizando a emulsão. Outros parâmetros que também são considerados para a escolha da técnica de preparo de nanocápsulas são: estabilidade do princípio ativo à técnica operacional da metodologia, eficiência de encapsulação do método, geração de contaminantes e metodologia de purificação (Mora-Huertas *et al.*, 2010; Vauthier & Bouchemal, 2009).

O método mais comumente usado e especialmente desenvolvido para nanoencapsular fármacos hidrossolúveis é o de dupla-emulsificação, que consiste em uma emulsão de emulsão formando um sistema água/óleo/água (a/o/a). A fase dispersante é uma emulsão, na qual as gotículas de óleo presentes são originárias de uma emulsão de partículas aquosas. A fase oleosa é composta por um solvente orgânico com o polímero disperso, e a fase aquosa contém o fármaco. O tensoativo pode estar disperso em qualquer uma das fases ou em ambas. A primeira emulsificação é realizada com um ultrassonicador e forma gotículas de

água/tensoativo/fármaco dispersas na fase oleosa. Essa é então vertida sobre uma solução de água/tensoativo, e é mais uma vez levada ao ultrassonicador para formar a emulsão a/o/a. O solvente orgânico deve ter um coeficiente de partição suficientemente alto para difundir para o meio externo aquoso e poder ser retirado por rota-evaporação (evaporação a vácuo). Quando o solvente é completamente retirado, tem-se uma camada de polímero em torno de um núcleo (ou núcleos) aquoso, isto é, estruturas semelhantes às cápsulas (figura 3). O tensoativo possui dois papéis importantes nessa metodologia: estabilização das partículas aquosas na fase oleosa e, posteriormente, estabilizador das partículas oleosas na fase aquosa; finalmente, depois do solvente orgânico ser retirado, a presença do tensoativo na superfície das nanocápsulas, previne a precipitação destas (Mainardes *et al.*, 2010; Mora-Huertas *et al.*, 2010).



**Figura 3:** Preparo de nanocápsulas pelo método de dupla-emulsificação. Inicia-se com a ultrassonicação de uma fase aquosa 1 com o princípio ativo em uma fase orgânica que contém o polímero. Forma-se então uma emulsão água em óleo. Em seguida, verte-se sobre essa emulsão uma solução aquosa 2 e, então, esse novo sistema é ultrassonicado. Por fim, o solvente orgânico se dispersa para a solução aquosa e, após a evaporação a vácuo deste, formam-se estruturas com um núcleo líquido recoberto por um invólucro polimérico (Mora-huertas *et al.*, 2010).

Após a formação das nanocápsulas, independente do método, a suspensão formada pode estar contaminada com solvente, agregados e restos de polímero, tensoativo, impurezas e outros compostos. Dessa forma, se faz necessária a purificação das soluções de nanocápsulas para administração *in vivo*, além do controle da concentração destas (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

Uma vez que, os nanocompostos estão dispersos no meio em que foram produzidos. A fim de purificar, concentrar e estabilizar a suspensão de nanocápsulas, algumas técnicas são comumente usadas, tais como a evaporação à vácuo, lavagem com água, ultracentrifugação, diálise, filtração em gel, filtração em papel, entre outras (Mainardes *et al.*, 2010; Mora-Huertas *et al.*, 2010; Vauthier & Bouchemal, 2009). A técnica de evaporação a vácuo é comumente usada para a retirada do solvente orgânico da formulação e concentração da mesma. Já a filtração ou centrifugação com baixa força de gravidade são comumente usadas quando as nanopartículas serão administradas pelo sistema intravenoso, com o objetivo de retirar agregados de polímeros e partículas grandes (Vauthier & Bouchemal, 2009).

Para a lavagem e concentração das nanopartículas, comumente se utiliza a ultracentrifugação, no entanto, nanocápsulas são estruturas frágeis e a aplicação de vários ciclos dessa técnica, necessários para a lavagem, podendo rompê-las. A filtração por diálise pode ser usada, mas é um processo demorado e pode gerar contaminação microbiológica, sendo mais recomendado o uso de outras técnicas como filtração *cross-flow* ou ultrafiltração (Vauthier & Bouchemal, 2009).

### **1.7. Caracterização das nanocápsulas:**

A caracterização das nanopartículas pode ser realizada durante, ou após, o processo de fabricação. Alguns parâmetros são comumente avaliados, tais como: dimensão, que, em geral, varia entre 100-500nm; morfologia; potencial zeta, que normalmente está na faixa entre -25 a -30mV; eficiência de encapsulação, que se encontra idealmente na faixa de 65 a 80%; estabilidade da formulação frente a parâmetros físico-químicos; e velocidade de liberação do fármaco (Mora-Huertas *et al.*, 2010; Sitterberg *et al.*, 2010). Tais características variam segundo alguns fatores de escolha na produção das nanocápsulas, tais como: a própria escolha do método de preparo; propriedades físico-químicas do polímero, do solvente orgânico, do óleo e do surfactante escolhido; espessura do invólucro; velocidade de evaporação do solvente orgânico, uma vez que a coalescência das partículas ocorre nesse momento; tamanho das gotículas nas emulsões; pH do meio; e modo de acondicionamento (Khoee & Yaghoobian, 2009; Lu *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2001; Mora-Huertas *et al.*, 2010; Pohlmann *et al.*, 2008; Stella *et al.*, 2007; Vauthier & Bouchemal, 2009; Zhua *et al.*, 2005).

Quanto à velocidade de liberação do fármaco, segundo Mora-Huertas *et al.* (2010), as técnicas de preparação de nanopartículas podem ser organizadas, em ordem decrescente: emulsificação-difusão, emulsificação-coacervação, nanoprecitação, revestimento polimérico, camada por camada e dupla emulsificação. Todas seguem o modelo bifásico de liberação do fármaco. Nestes, a primeira fase consiste na liberação do princípio ativo que está na superfície da nanopartícula. Já a segunda fase corresponde à liberação do ativo devido à erosão da nanocápsulas (Perez *et al.*, 2001).

No caso de nanorradiofármacos poliméricos, a fina parede das cápsulas não é capaz de bloquear de forma relevante as partículas beta.

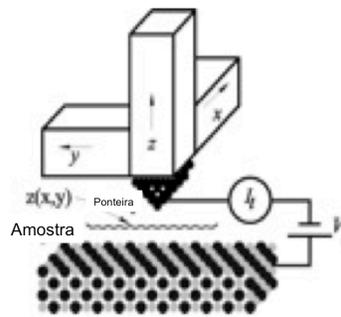
A caracterização da morfologia e dimensão das nanopartículas pode ser realizada por inúmeras técnicas, por exemplo, as diversas microscopias de alta resolução, espectroscopia por emissão de fótons, espalhamento de luz, eletroforese, ressonância magnética nuclear, espectroscopia eletrônica de análise química, calorimetria diferencial de varredura (DSC), difração de raios X e espectroscopia de infravermelho (Schaffazick *et al.*, 2003; Sitterberg *et al.*, 2010).

As técnicas de microscopia são as mais amplamente usadas para determinação morfológica e dimensional das nanocápsulas, dentre elas, as mais usadas são: microscopia confocal, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Even-Sapir *et al.*, 2006) e as diversas microscopias de varredura por sonda (SPM), em particular, a microscopia de força atômica (Morales, 2007; Schaffazick *et al.*, 2003; Sitterberg *et al.*, 2010). Apesar de a microscopia eletrônica ser a técnica mais usada na caracterização morfológica e dimensional das nanopartículas, ela apresenta algumas desvantagens, tais como: dificuldade no preparo da amostra, impossibilidade de realizar imagens em líquidos, apenas realiza imagens em duas dimensões e a necessidade do vácuo para uma melhor resolução (Sitterberg *et al.*, 2010). Por sua vez, a família SPM vem de destacando, por possibilitar a obtenção de imagens topográficas com alta resolução, formação de mapas tridimensionais reais, além da caracterização das propriedades elásticas e adesivas da amostra (Morales, 2007; Morris *et al.*, 2009).

### 1.7.1. Microscopia de varredura por sonda:

A família das SPMs utiliza uma sonda que é colocada próxima à amostra ou em contato com ela promovendo forças de interação entre elas. A partir desse ponto, a sonda varre a superfície da amostra e um mecanismo de *feedback* detecta as variações na interação sonda-amostra, ajustando a distância entre elas a fim de manter a interação relativamente constante. Através dessa varredura é possível identificar diferentes características da amostra além de sua topografia (Morales, 2007; Sitterberg *et al.*, 2010).

A família SPM teve início com a microscopia de varredura por tunelamento (STM) em 1981 com os pesquisadores Gerd Binnig e Henrich Rocher, sendo o primeiro aparelho a gerar uma imagem tridimensional com resolução atômica. Para a varredura, esse aparelho utiliza uma ponteira condutora e muito afilada. Uma diferença de potencial é imposta entre a sonda e a amostra, que também deve ser condutora, gerando uma corrente de tunelamento. Apesar da resolução ser subnanométrica em três dimensões, ela tem um grande impedimento que é a necessidade do material ser condutor, ou seja, essa técnica só pode ser usada para estudar a superfície de materiais condutores de eletricidade. Isto é uma desvantagem para as aplicações biológicas, uma vez que poucos materiais são condutores, sendo necessário um recobrimento da amostra para a análise (figura 5) (Sitterberg *et al.*, 2010). Entretanto, as mesmas ideias que levaram ao STM foram generalizadas para o desenvolvimento de um grande número de outras microscopias.

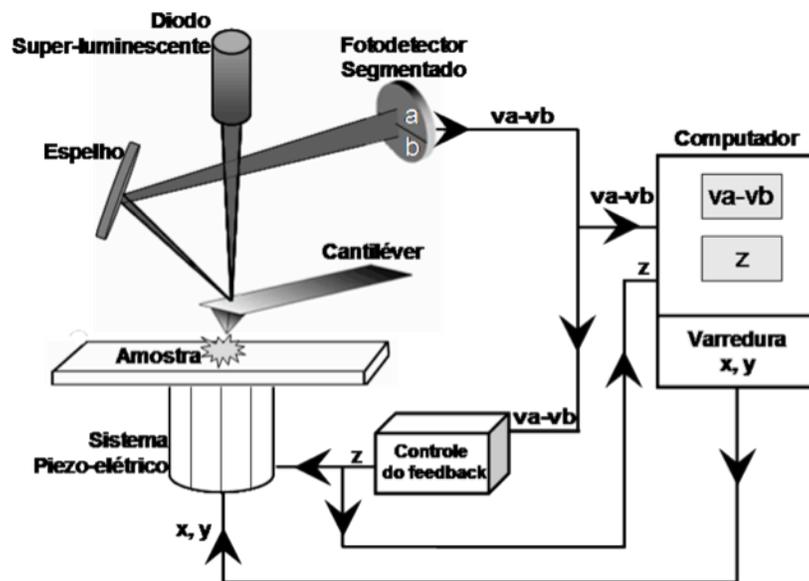


**Figura 4:** Esquema da interação entre a ponteira e a amostra em um STM. Entre a amostra e a ponteira surge uma corrente elétrica de tunelamento, a qual é mantida constante durante a varredura por meio de ajustes nos posicionadores piezoelétricos .

### 1.7.2. Microscopia de Força Atômica:

Em 1985, Binnig e colaboradores desenvolveram o microscópio de força atômica (AFM) que possui as vantagens do STM somado à capacidade de visualizar amostras biológicas ou inorgânicas, condutoras ou não, no seu meio ambiente fisiológico, em ar ou em líquido (Morales, 2007; Morris *et al.*, 2009; Sitterberg *et al.*, 2010). Na técnica de AFM, a sonda é uma ponteira afilada localizada na extremidade livre de uma haste, conhecida como cantiléver. Durante a varredura, conforme as forças de atração e repulsão entre a sonda e a amostra variam, o cantiléver flexiona e consegue acompanhar a topografia em três dimensões. Um laser de baixa potência, como um laser-diodo, incide na parte superior do cantiléver e é refletido para um fotodetector segmentado que, devido à diferença de potencial elétrico entre os segmentos, gera o sinal de deflexão do cantiléver. Esse sinal é enviado a um sistema de retroalimentação negativa (*feedback*) que irá responder à variação de altura da amostra com o reposicionamento da plataforma de varredura no eixo Z. Com isso, conforme há uma deflexão do cantiléver sobre a amostra, ocorre uma mudança no sinal

do fotodetector que aciona o sistema de *feedback* que corrige, por sua vez, a distância entre a amostra e a ponteira, gerando a imagem topográfica (Morris *et al.*, 2009). A imagem da diferença de potencial elétrico, que ocorre devido à uma variação de sinal no fotodetector, ocasionada por uma variação na altura da amostra, é conhecida como imagem de erro (figura 6).



**Figura 5:** Diagrama simplificado do funcionamento de um AFM. A amostra encontra-se sobre uma plataforma e o cantiléver realiza a varredura. Um laser diodo incide acima do cantiléver, na superfície lisa, e é refletido para um espelho, que o direciona a um fotodetector segmentado. No momento em que há uma variação na deflexão do cantiléver, ocorre uma variação na diferença de potencial entre os segmentos. Essa diferença de potencial é enviada ao controle de feedback, que tentará, por meio do reposicionamento do sistema piezo-elétrico, anulá-la. Esta diferença de potencial também é enviada diretamente ao computador para gerar a imagem de erro, isto é, as pequenas diferenças que não são corrigidas pelo *feedback*.

Existem diferentes modos de varredura na técnica de AFM: modo contato, modo contato intermitente, não-contato, microscopia de força lateral, entre outros. Um uso especial do AFM corresponde à espectroscopia de força, com a qual medimos a força de interação entre a sonda e a amostra em função da distância entre elas. Os principais métodos para análise de nanoestruturas são os modos contato e contato intermitente e a espectroscopia de força (Sitterberg *et al.*, 2010).

### **1.7.3. Modo de varredura por contato:**

No modo de varredura por contato, a ponteira está constantemente em contato com a amostra, exercendo uma força constante sobre ela. Como a força é proporcional à deflexão do cantiléver, podemos também dizer que a deflexão se mantém constante durante a varredura. Assim, o *feedback* deve aproximar ou afastar o sistema piezoelétrico, com o objetivo de manter a força. Essa técnica é comumente usada para imagens de alta resolução, no entanto, durante a varredura ocorre a ação de forças laterais que, por muitas vezes, levam ao arraste da amostra, principalmente se for macia, danificando a mesma (Morales, 2007; Morris *et al.*, 2009; Sitterberg *et al.*, 2010).

### **1.7.4. Modo de varredura por contato intermitente:**

O modo de varredura por contato intermitente, também conhecido como *tapping mode*, é o mais utilizado para análise de amostras biológicas, uma vez que danifica menos as mesmas devido à menor ação de forças laterais. Aqui, o cantiléver é excitado com uma frequência de oscilação próxima a sua frequência natural de ressonância. Tal excitação é realizada por um pequeno cristal piezoelétrico situado no suporte do cantiléver. Durante a varredura, a haste oscila a uma amplitude constante e a ponteira toca a amostra periodicamente. Agora, o sistema de *feedback* ajusta a altura do

sistema piezoelétrico com propósito de manter constante a amplitude de oscilação. Novamente, a resposta do *feedback* gera a imagem topográfica, entretanto, é das pequenas variações de amplitude remanescentes, que obtemos a imagem de erro. Quanto maior a amplitude de oscilação, menor a força de interação entre a amostra e a ponteira, e menor o risco de causar algum dano à amostra (Morales, 2007; Morris *et al.*, 2009; Sitterberg *et al.*, 2010).

Ainda no modo de varredura por contato intermitente gera-se uma imagem de fase. Esta permite a análise das propriedades viscoelásticas e adesivas dos materiais. Durante a varredura, no momento que a ponteira entra em contato com a amostra ocorrem diferentes interações entre elas, que podem gerar uma interferência na oscilação do cantiléver, acarretando uma defasagem (atraso) entre a oscilação da haste e a excitação periódica aplicada pelo elemento piezoelétrico do suporte. Assim, ao registrarmos uma imagem da diferença de fase entre as oscilações, regiões da amostra que apresentam diferentes propriedades viscoelásticas ou adesivas, aparecerão com contraste (Morales, 2007; Morris *et al.*, 2009; Sitterberg *et al.*, 2010).

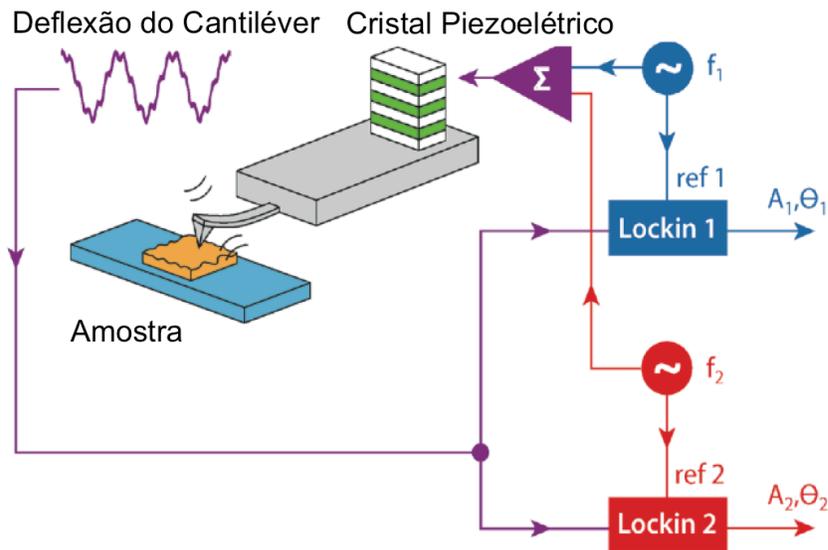
#### **1.7.5. Espectroscopia de força:**

A elasticidade e a adesividade podem ainda ser investigadas pela espectroscopia de força. Nesta, o cantiléver é aproximado da amostra por uma distância pré-determinada e exerce uma força sobre a mesma. Em seguida, o cantiléver é afastado, gerando uma curva de força, na qual é possível identificar as diferentes interações entre o cantiléver e a amostra e, então, determinar as propriedades desta. Ainda há a possibilidade de funcionalização da ponteira e observação da força de interação entre a molécula imobilizada e a amostra. Neste caso a ponteira pode ser

funcionalizada para mimetizar uma outra superfície com a qual a partícula entrará em contato no organismo, por exemplo, a matriz extracelular ou a parede celular (Morales, 2007; Morris *et al.*, 2009).

#### **1.7.6. Modo de varredura com harmônicos superiores:**

Mais recentemente foi lançado um novo modo de varredura conhecido como varredura com duplo harmônico ou harmônicos ainda mais altos. No caso da varredura por duplo harmônico, o cantiléver é excitado com a soma de duas frequências, sendo uma correspondente à frequência fundamental e a outra, ao segundo harmônico de sua oscilação natural. A deflexão do cantiléver contém a informação das duas frequências, sendo essa separada na controladora por dois *lockins* (figura 7). Em um dos *lockins* encontram-se as informações coletadas da frequência da excitação fundamental (*lockin* 1). Estas correspondem ao modo de varredura por contato intermitente e gera três principais imagens: de altura, que seria a topográfica, de fase 1 e de amplitude 1. O feedback, como no modo contato intermitente, usa a informação do *lockin* 1, para correção sendo a imagem de amplitude 1 a imagem de erro. Já o *lockin* 2 contém as informações correspondentes à frequência mais alta e gera duas principais imagens: amplitude 2 e fase 2 (Preiner *et al.*, 2007). Segundo Martinez *et al.*(2006) e Stark *et al.*(2002), a resposta de harmônicos superiores, principalmente a imagem de fase 2, é ainda mais sensível às propriedades viscoelásticas e adesivas dos materiais e gera imagens com maior contraste, revelando diferenças muitas vezes não observadas na imagem de fase 1.



**Figura 6:** Diagrama do funcionamento do modo de varredura por duplo harmônico. Nesse é possível observar que o cantiléver é excitado por um elemento piezoelétrico com a soma de duas frequências. A deflexão do cantiléver durante a varredura possui a informação dessa soma, que gera um sinal para a controladora, que então separa essa informação em dois *lockins*. No *lockin 1* são geradas três imagens: altura, amplitude 1 e fase 1. Já no *lockin 2* são geradas duas imagens: amplitude 2 e fase 2.

O AFM é uma técnica capaz de visualizar a morfologia, dimensão, rugosidade, composição química, elasticidade e interação de diferentes amostras, em diferentes ambientes. Assim, essa técnica tem sido amplamente aplicada no acompanhamento do preparo de nanocápsulas, pois além da determinação do tamanho das nanopartículas e na análise morfológica, o AFM permite a caracterização da propriedade de diferentes materiais na superfície da nanoestrutura (Dailey *et al.*, 2003; Morales, 2007; Moughton & Reilly, 2008; Oliva *et al.*, 2003; Roe *et al.*, 2004; Sitterberg *et al.*, 2010).

## 2. Objetivo:

### 2.1. Objetivo Geral:

Desenvolver nanopartículas poliméricas de EDTMP e caracterizá-las através de testes físico-químicos, avaliação morfológica e testes de biodirecionamento para avaliar a eficiência dessas nanopartículas.

### 2.2. Objetivos específicos:

- ❖ Produção de nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP;
- ❖ Definir um protocolo para caracterização morfológica desta nanopartículas;
- ❖ Desenvolver uma metodologia para definir se as nanopartículas são cápsulas ou esferas maciças;
- ❖ Definir a resistência das nanopartículas à irradiação com raios  $\gamma$ ;
- ❖ Estudar a eficiência de encapsulação do EDTMP nas nanopartículas;
- ❖ Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas *in vitro*;
- ❖ Desenvolver um protocolo de marcação das nanopartículas com  $^{99m}\text{Tc}$ ;
- ❖ Avaliar a biodistribuição/ biodirecionamento em ratos saudáveis.

## 3. Materiais e Métodos:

### 3.1. Produção de nanopartículas de EDTMP:

Devido às características hidrossolúveis do EDTMP as metodologias de preparo de nanopartículas são mais limitadas (Mora-Huertas *et al.*, 2010; Schaffazick *et al.*, 2003). Nesse trabalho utilizou-se o método de dupla emulsificação.

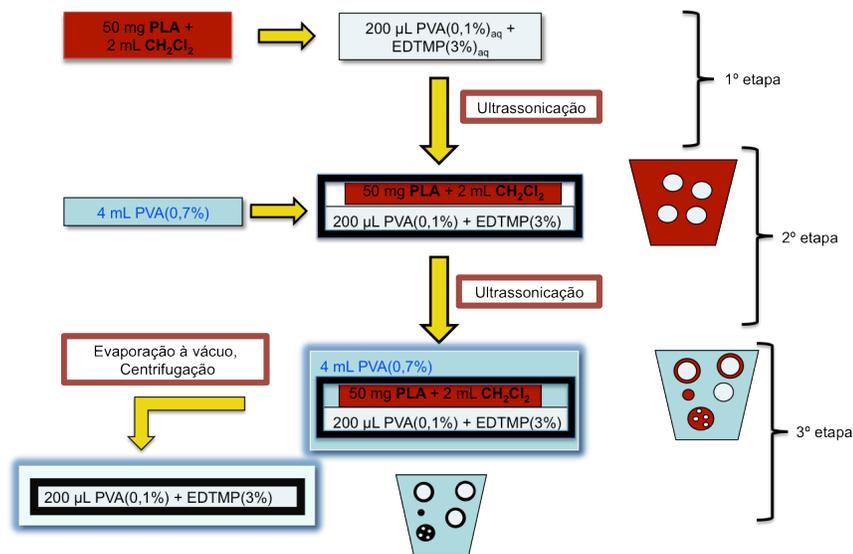
#### 3.1.1. Método de dupla emulsificação seguida pela evaporação do solvente:

As nanopartículas foram preparadas pelo método de dupla emulsificação seguido pela evaporação do solvente, segundo o protocolo descrito por Mainardes *et al.* (2010). Na primeira etapa do método de preparo das nanopartículas, em 2mL de diclorometano foram diluídos 50mg de ácido poli-láctico (PLA, 40–100 kDa, viscosidade 0,15-0,25 da Sigma-Aldrich). Essa solução foi vertida sobre 200µL de uma solução aquosa 4% EDTMP e 0,1% de álcool poli-vinílico (PVA, 85% hidrolizado, Sigma-Aldrich) formando uma mistura bifásica que foi, então, emulsificada por um ultrassonicador (Ultrasonic processor, GEX600, Sigma, St Louis, MO) à 55W por um ciclo de 30s. No final desse processo foi obtida uma emulsão a/o. Em seguida foi iniciada a segunda etapa de preparo das nanopartículas, vertendo sobre a emulsão 4mL de uma solução aquosa 0,7% de PVA. Depois, realizou-se uma nova emulsificação à 55W por um ciclo de 1min. Obteve-se, então, uma emulsão a/o/a com o polímero na fase orgânica envolvendo as gotículas de água com o EDTMP. Por fim, na terceira e última etapa, o diclorometano é evaporado sob vácuo à 37°C durante 20min, de forma que, o polímero formasse um invólucro sobre as gotículas de água contendo o fármaco. As nanopartículas foram

recuperadas e lavadas três vezes por ultracentrifugação à 168000xg por 20min à 23°C (LB-70M-Ultracentrifuge, Beckman), afim de retirar o excesso de PVA (figura 7).

### **3.1.2. Alterações no protocolo de preparo das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP pelo método dupla emulsificação seguida pela evaporação do solvente:**

Nesse trabalho foram alterados o tempo de ultrassonicação, para a formação da emulsão a/o do protocolo anterior, para 2 ciclos de 30s com intervalo de 10s entre eles. Também realizou-se algumas modificações no tempo de ultrassonicação para formação da emulsão a/o/a, do protocolo descrito no subitem 3.1.1, para um ciclo de 1min seguido por um ciclo de 30s com intervalo de 10s entre eles; dois ciclos de 1min com intervalo de 10s entre eles e; três ciclos de 1min com intervalo de 10 s entre eles. Alterou-se, também, a velocidade e o tempo de centrifugação para: 117600xg por 20min à 23°C (LB-70M-Ultracentrifuge, Beckman) e 20238xg por 10min à temperatura ambiente (Centrifuge 5424, Eppendorf).



**Figura 7:** Esquema de preparação das nanopartículas pelo método de dupla emulsificação. A cor vermelha corresponde ao solvente orgânico diclorometano, a escala de cor verde corresponde aos graus de concentração de PVA na solução aquosa, assim, o verde mais escuro corresponde a alta concentração de PVA na água e o verde mais claro corresponde a ausência de PVA na água.

### 3.2. Caracterização morfológica e dimensional das nanopartículas:

A morfologia e dimensão das nanopartículas foram analisadas por AFM (MFP-3D-BIO™). Em uma superfície de mica lisa, recém clivada, depositou-se 10µL da amostra, após lavagem, e aguardou-se 2h à temperatura ambiente, de forma que a solução de nanopartículas secasse e estas conseguissem aderir na superfície de mica. Em geral, mostramos apenas uma imagem representativa de um conjunto de 10-20 imagens coletadas em diferentes regiões e diferentes preparações. A análise por AFM foi feita através de três modos de varredura: (i) modo de contato com cantiléver triangular NPS com constante de mola igual a 0.06N/m e comprimento igual a 205µm, o set point variando entre 0,5-0,8; contato intermitente e duplo harmônico com cantiléver

retangular AC240TS, constante de mola 2N/m e comprimento de 240 $\mu$ m, como o set point variando entre 0,7-0,9 e um *target* amplitude de 1V.

Nos três modos produziu-se imagens topográficas, na qual foram observadas a morfologia e dimensão das nanopartículas. A análise dimensional foi feita manualmente pelo software do microscópio (*MFP3D*) na imagem topográfica. Além dessa imagem, no modo contato intermitente e duplo harmônico foram produzidas imagens de fase que permitiram analisar a dispersão do polímero nos diferentes preparos da amostra.

### ***3.3. Desenvolvimento de metodologia para definir se as nanopartículas são cápsulas ou esferas maciças:***

Durante esse trabalho procurou-se desenvolver uma metodologia de análise para classificar as nanopartículas em nanocápsulas ou nanoesferas. Para isso, foram produzidas nanopartículas conforme descrito no item 3.1.1 e em seguidas essas foram analisadas conforme o item 3.2.

Para a produção de nanoesferas seguiu-se o seguinte protocolo: sobre uma solução de 2mL de diclorometano são dissolvidos 50mg de PLA. Nesta solução foram vertidos 4mL de uma solução aquosa 0,7% de PVA e realizou-se uma emulsificação à 55W durante 2 ciclos de 1min com intervalo de 10s entre eles. Obteve-se, então, uma emulsão o/a. Em seguida, o diclorometano foi evaporado à vácuo, à 37°C, durante 20min e a dispersão foi centrifugada por três vezes à 20238xg por 10min à temperatura ambiente, a fim de retirar o excesso de PVA. Obteve-se, então, uma emulsão, com estruturas esféricas e maciças dispersa em uma solução aquosa. Estas estruturas foram, então, caracterizadas conforme descrito o item 3.2.

Após a caracterização das duas emulsões, as lâminas analisadas no AFM foram levadas a uma estufa e aquecidas à 55°C por 1h. Após esse período, a amostra foi, então, analisada por AFM novamente nos modo de varredura contato intermitente.

### **3.4. Resistência das nanopartículas à irradiação com raios gama ( $\gamma$ ):**

Devido à dificuldade de irradiar as nanopartículas com partículas  $\beta$  em um laboratório, foi feita a irradiação com raios  $\gamma$ , segundo o preceito da radiobiologia de equivalente de dose, ou seja, após a irradiação com determinada dose de radiação  $\gamma$  é possível inferir qual seria o equivalente de dose partícula  $\beta$  que, causaria o mesmo dano a amostra (Tauhata *et al.*, 2011). Para calcular o equivalente de dose de radiação  $\beta$  que a amostra estaria recebendo utilizou-se a fórmula abaixo:

$$H = D \times Q$$

Onde,

H= dose equivalente de radiação;

D = dose absorvida pela amostra;

Q= fator de qualidade médio, que corresponde a um fator de peso baseado na simplificação dos valores da efetividade biológica relativa dos diferentes tipos de radiações na indução de determinado efeito biológico. No caso da equivalência da radiação  $\gamma$  com a  $\beta$ , esse corresponde a 10, segundo a norma CNEM-NE-3.01.

Assim, as amostras foram irradiadas pelo grupo da Dra. Helen Jamil Khoury do Laboratório de Metrologia das Radiações Ionizantes na Universidade Federal de

Pernambuco. A irradiação das partículas com radiação  $\gamma$  foi feita em um irradiador de célula gama de Cobalto-60 (Nordion Gammacell 220 Excel) que opera a 6766kGy/h. As doses de radiação  $\gamma$  usadas foram de 7, 10, 50, 70 e 100 kGy. Em seguida, 10 $\mu$ L de cada uma das amostras foi depositada sobre uma superfície de mica recém clivada e analisada por AFM pelos modos de varredura contato intermitente e duplo harmônico, como descrito no item 3.2.

### **3.5. Estudo da eficiência de encapsulamento do EDTMP nas nanopartículas:**

A medida do fármaco incorporado à nanopartícula foi analisada de forma indireta, ou seja, mediu-se a quantidade de EDTMP no sobrenadante da primeira centrifugação e, através da diferença deste valor para o peso inicial determinou-se o quanto realmente foi encapsulado. Para tal análise utilizou-se a técnica de espectrometria por ultravioleta, que, segundo a literatura, tem mostrado uma alta eficiência na quantificação de diferentes fármacos (Chandran *et al.*, 2000; Saha *et al.*, 2002).

Primeiramente preparou-se uma solução aquosa de EDTMP com concentração igual a  $1,527 \times 10^{-6}$  mol/mL. Fez-se a leitura no espectrômetro de ultravioleta (Shimadzu modelo UV-2450) em uma cubeta de quartzo a fim de determinar o melhor comprimento de onda ( $\lambda$ ) de absorção do EDTMP. O mesmo foi feito com o PVA, com o objetivo de determinar se sua absorção não iria influenciar na absorção do EDTMP. Após a determinação do  $\lambda$  de cada um dos compostos, foi determinado a absortividade molar de cada um através da fórmula:

$$A = \varepsilon \times b \times c$$

onde,

A=absorbância,

$\epsilon$ = absorvidade molar,

b= caminho óptico que é igual a 1cm,

c= concentração.

A partir da absorbância do EDTMP no sobrenadante e utilizando a fórmula acima, seria possível determinar a concentração do EDTMP neste. Esse valor é, então, subtraído do peso inicial e por diferença seria possível determinar quanto foi realmente encapsulado.

### ***3.6. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas:***

Foi feita uma análise inicial para determinação do potencial citotóxico das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP pelo Laboratório de Oncologia Experimental (LOE), pelo grupo da professora Claudia Pessoa da Universidade do Ceará.

#### **3.6.1: Material utilizado:**

As linhagens das células utilizadas foram: MDA-MB-435 (melanoma – humano), HCT-8 (adenocarcinoma colorretal - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano). Essas foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa à 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras foram dissolvidas em água mili-Q na concentração estoque de 1 mg/mL.

### **3.6.2: Método utilizado para análise da citotoxicidade:**

A citotoxicidade da amostra foi avaliada pelo método colorimétrico MTT (Mosmann 1983). As células foram cultivadas em placas de 96 cavidades nas seguintes densidades:  $0,7 \times 10^5$  (HCT-8),  $0,1 \times 10^6$  (SF-295) e  $0,1 \times 10^6$  (MDA-MB-435). As amostras foram incubadas juntamente com as células em concentração única de 5  $\mu\text{g/mL}$ , por 72h, em estufa à 37°C e 5% de atmosfera de  $\text{CO}_2$ . Ao término desta incubação, elas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram novamente incubadas por 3h. Após este período foram, novamente, centrifugadas e o sobrenadante retirado, formando um precipitado, denominado azul de formazan, nas células consideradas viáveis. O precipitado foi ressuscitado em 150  $\mu\text{l}$  Dimetilsulfóxido (DMSO) estéril e agitado por cerca de 20 minutos, até completa dissolução. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa com comprimento de onda do UV igual a 595 nm. A Doxorubicina (Dox) foi utilizada como controle positivo.

### **3.6.3: Método de análise dos resultados:**

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes. O potencial citotóxico da amostra foi avaliado segundo uma escala de intensidade de cor permitindo avaliar a atividade tóxica das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP.

### **3.7. Marcação das nanopartículas com tecnécio-99m:**

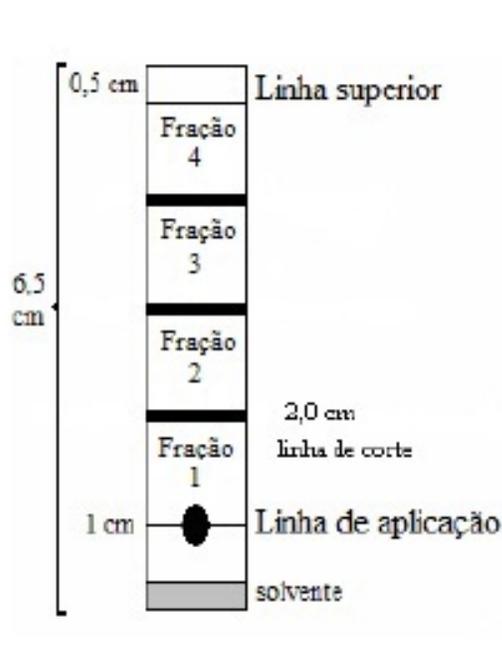
#### **3.7.1. Processo de marcação das nanopartículas pelo método direto:**

A marcação das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP foi realizada pelo método direto com o radionuclídeo  $^{99m}\text{Tc}$  (Patricio *et al.*, 2011). O processo de marcação consiste na incubação, por 10min, de 150 $\mu\text{L}$  da solução das nanopartículas em 150 $\mu\text{L}$  de solução aquosa de cloreto de sódio 0,9% com diferentes concentrações de cloreto estanoso diidratado ( $\text{SnCl}_2$ , Aldrich): 3, 7, 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$ . Após esse período, adiciona-se à solução anterior 100 $\mu\text{Ci}$  de  $^{99m}\text{Tc}$  em 300 $\mu\text{L}$  de solução aquosa de cloreto de sódio 0,9% (IPEN/CNEM) e aguarda o processo de marcação por 10 min.

#### **3.7.2. Caracterização do processo de marcação das nanopartículas:**

A fim de avaliar a eficiência de marcação das nanopartículas com  $^{99m}\text{Tc}$ , utilizou-se a metodologia de cromatografia em papel. Nessa, o papel *Whatmam* nº1 corresponde à fase estacionária e a acetona P.A. (Sigma) foi utilizada como fase móvel. Primeiramente cortou-se tiras de papéis de tamanho iguais (14cm por 1cm), no qual, determinou-se a origem e o topo a 1cm da parte inferior e superior, respectivamente (figura 8). No local onde foi marcada a origem do papel adicionou-se 2 $\mu\text{L}$  da amostra marcada com uma pipeta automática. Após esse procedimento, a tira foi incubada em uma cuba de vidro saturada e vedada com 0,7 $\mu\text{L}$  de acetona (fase móvel). A acetona ascende pela tira de papel. Após atingir o topo da tira, o processo foi interrompido, e, a mesma, foi colocada para secar à temperatura ambiente por aproximadamente 20min e cortada em 4 partes: origem 1, origem 2, topo 1 e topo 2 (figura 8) . Cada uma dessas partes foi colocada dentro de um tubo de ensaio e, em seguida se procedeu a leitura da atividade em um contador gama (Packard, Cobra II). Por fim, foi calculada a

porcentagem de atividade em cada uma das partes de uma mesma tira e determinou-se o local onde as nanopartículas marcadas se encontrava. O mesmo procedimento foi realizado com  $^{99m}\text{Tc}$  não marcado, para fins comparativos.



**Figura 8:** Figura ilustrativa do processo cromatográfico feito para a análise da marcação das nanopartículas.

### 3.7.3. Processo de marcação das nanopartículas pelo método direto para avaliação da biodistribuição:

As amostras de nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP, nanopartículas de PLA/PVA e EDTMP não encapsulados foram marcadas conforme procedimento descrito no item 3.7.1. No entanto, utilizou-se um volume maior da solução de amostra, 250 $\mu\text{L}$ . Devido a isso, foi necessário aumentar tanto o volume quanto a concentração das outras soluções: 250 $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de cloreto de sódio 0,9% com

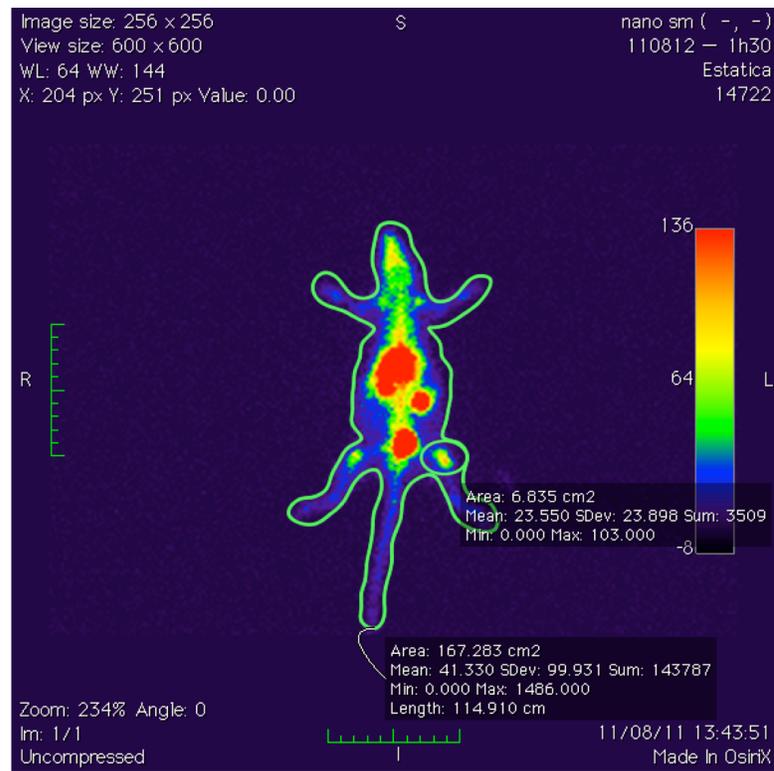
30 $\mu$ g/mL de SnCl<sub>2</sub> e 0,5mL de uma solução aquosa de cloreto de sódio 0,9% com 2mCi de <sup>99m</sup>Tc.

### **3.8.2: Avaliação da biodistribuição das nanopartículas marcadas com <sup>99m</sup>Tc:**

Foram administrados por via intravenosa, através da veia jugular, em oito ratos Wistar saudáveis, 0,2mL das amostras marcadas no item 3.8.1, a fim de, verificar a biodistribuição do material conforme aprovação do comitê de ética de estudos em animais. Imagens foram obtidas em 30 min, 1h e 30min, 2h e 2h30min, após a injeção em uma gama câmara Millennium (GE Healthcare, Cleveland, USA). A contagem no aparelho é adquirida por 5 minutos em uma janela a 15% centrada em 140 keV.

A partir das imagens obtidas, com o programa *OsiriX*, foram traçadas as regiões de interesse (ROIs) sobre o fêmur esquerdo do animal e ele como um todo, para a aquisição de suas respectivas contagens. Em seguida, com a razão das contagens obtivemos a porcentagem de captação dos compostos no fêmur (figura 9).

Os animais foram então sacrificados e seus órgãos removidos, pesados e a radioatividade medida em um contador gama (Packard-Cobra II). Os resultados das contagens foram expressos em dose por órgão (%ID/órgão) e dose por grama de tecido (%ID/g) (Patricio *et al.*, 2011; Soundararajan *et al.*, 2009).



**Figura 9:** Imagem ilustrativa de como foi calculada a captação das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP no fêmur.

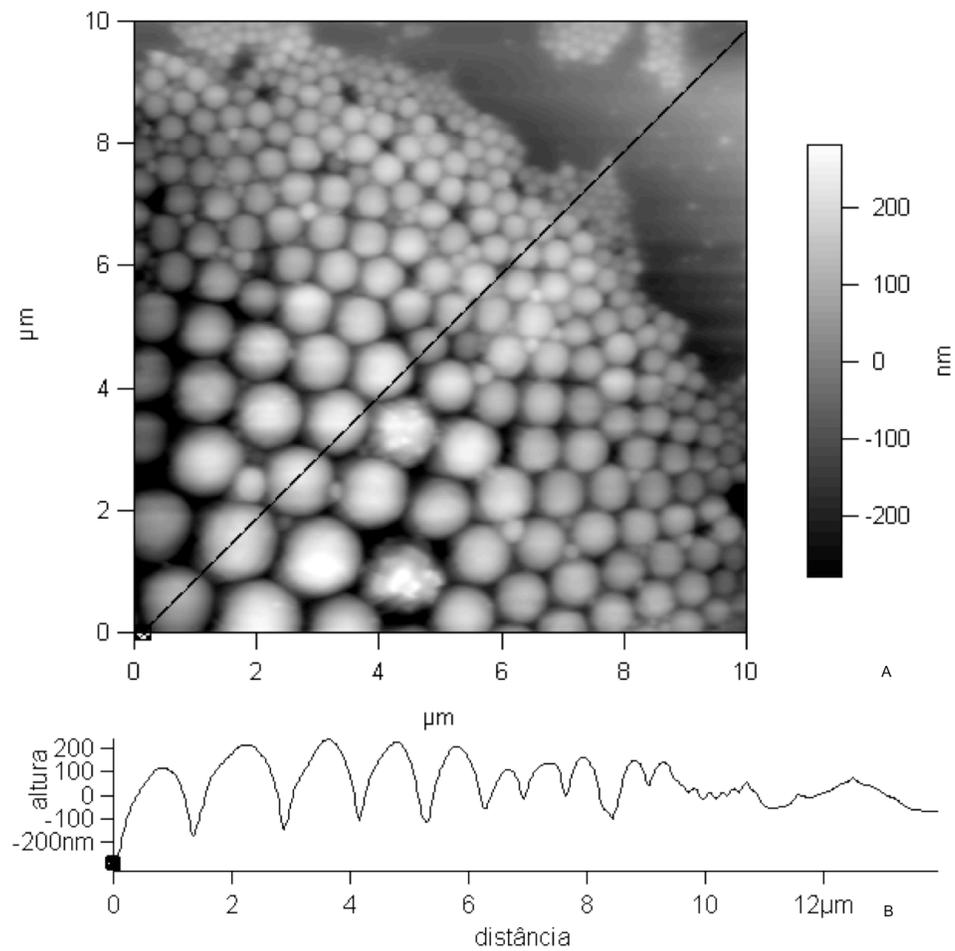
## 4. Discussão de Resultados:

### 4.1. Produção e caracterização das nanopartículas:

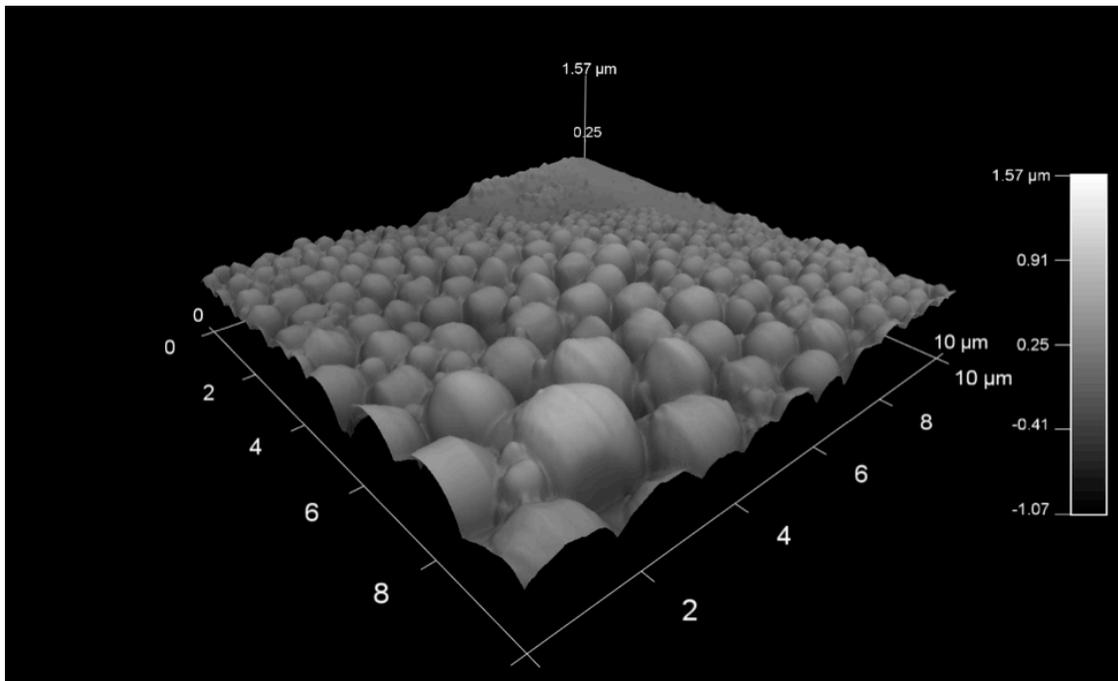
Através do método de dupla emulsificação, seguido da evaporação do solvente foram produzidas nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP. Inicialmente, a produção dessas seguiu o protocolo determinado por Mainardes *et al.* (2010) descrito no item 3.1.1. Este experimento foi realizado em triplicata (três preparações). A análise dessa produção foi feita por AFM como descrito no item 3.2. Nas figuras 10 e 11, é possível observar as nanopartículas produzidas por essa metodologia.

Com um microscópio ótico, observa-se que as nanopartículas se organizam em estruturas circulares em determinadas regiões da superfície de mica. Nas figuras 10 e 11 observamos apenas um quadrante dessas estruturas no AFM. Devido a essa organização, na imagem bidimensional (figura 10) tem-se a impressão que as nanopartículas estão em perspectiva, mas o perfil mostra que a imagem é planar, assim como a imagem tridimensional (figura 11). As nanopartículas se estruturam de forma que as maiores estão ao centro da estrutura circular e as menores na borda. Entre as partículas maiores, também, é possível observar estruturas menores.

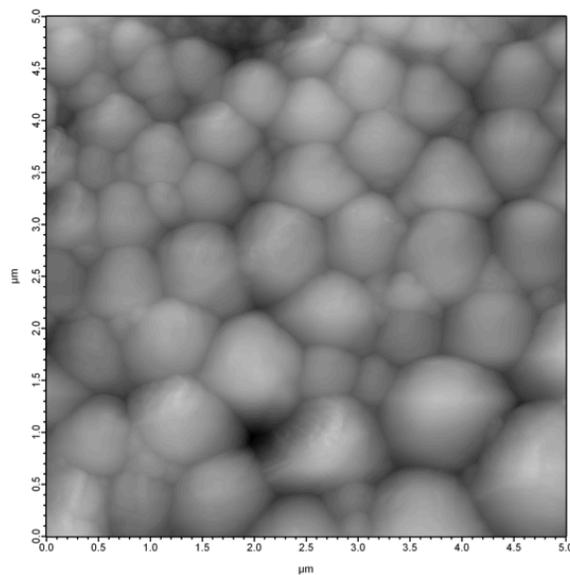
Ainda nas figuras 10 e 11 é possível observar a formação de nanopartículas com o tamanho variando entre 100nm a 2,0 $\mu$ m. Algumas das partículas maiores apresentam uma superfície não lisa, com algumas protuberâncias. Dessa forma, conclui-se que a metodologia usada, para produção das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP, precisava de algumas modificações de parâmetros, uma vez que estas apresentavam uma grande dispersão de tamanho e alterações em sua superfícies.



**Figura 10:** Imagem topográfica feita por AFM no modo contato de nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP produzidas pelo método de dupla emulsão e evaporação do solvente (Mainardes *et al.*, 2010). O perfil mostrado está indicado na imagem.



**Figura 11:** Imagem em 3D de altura no modo de varredura por contato das nanopartículas PLA/PVA/EDTMP produzido pela metodologia descrita no item 3.1.



**Figura 12:** Imagem topográfica das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP, feita pelo modo de varredura contato intermitente, após a alteração do tempo de ultrassonicação na segunda etapa para 3 ciclos de 1 min com intervalo de 10s entre eles.

Segundo Mora-Huertas *et al.* (2010), alguns parâmetros podem ser alterados na metodologia de preparo das nanopartículas por dupla emulsificação e evaporação do solvente, a fim de serem formadas nanopartículas com maior homogeneidade estrutural e dimensional. Essas alterações são principalmente quanto ao volume das soluções; tipo e concentração do tensoativo usado; tempo e velocidade de ultrassonicação e centrifugação. Durante este trabalho optamos por alterar o tempo de ultrassonicação, tanto da primeira etapa como o da segunda etapa, assim como o tempo e velocidade de centrifugação (figura 7).

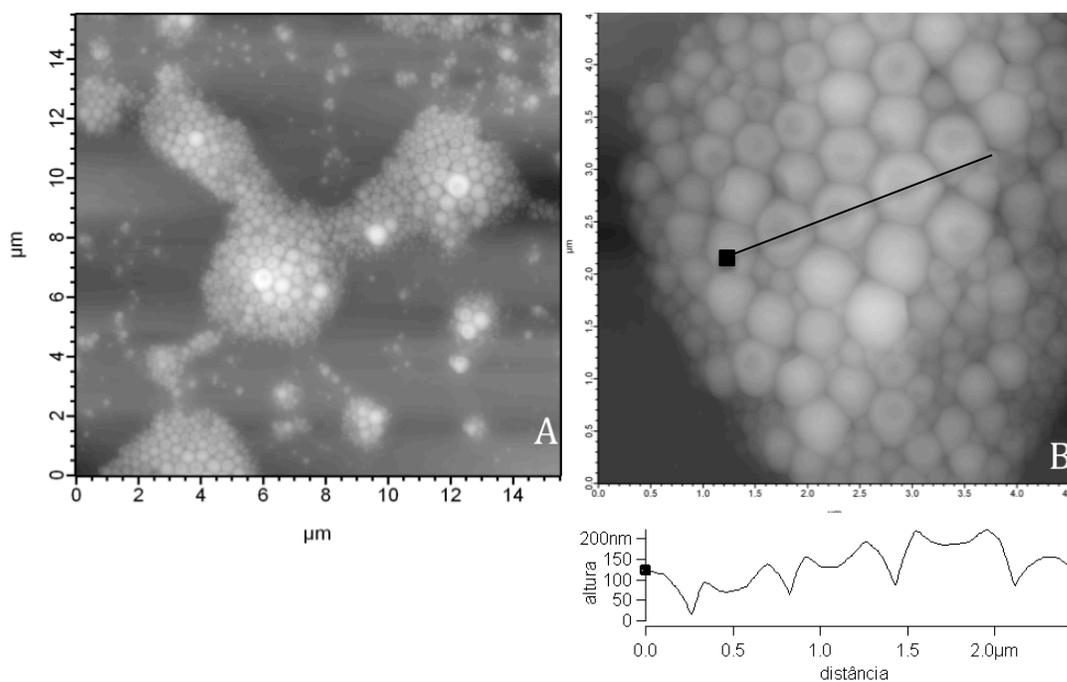
A primeira modificação testada foi quanto ao tempo de ultrassonicação na segunda etapa do protocolo de fabricação das nanopartículas. Foram, então, utilizados três ciclos de 1min, com intervalo de 10s entre eles, ao invés de um ciclo de 1min. Este experimento foi feito em duplicata. As caracterizações morfológicas e dimensionais das nanopartículas formadas foram feitas por AFM, conforme metodologia descrita no item 3.2. Na figura 12 é possível observar as modificações resultantes.

Após o aumento do tempo de ultrassonicação da segunda etapa para três ciclos de 1 min com intervalo de 10s entre eles foi possível observar algumas alterações na morfologia das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP, que não mais se apresentaram esféricas. Por fim, observou-se que, em geral, formaram-se nanopartículas maiores, com tamanho variando de 500nm a 2 $\mu$ m (figura 12). Dessa forma, pode-se concluir que alterar apenas o tempo de ultrassonicação da segunda etapa de preparação das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP não foi vantajoso, uma vez que o tamanho das nanopartículas aumentou.

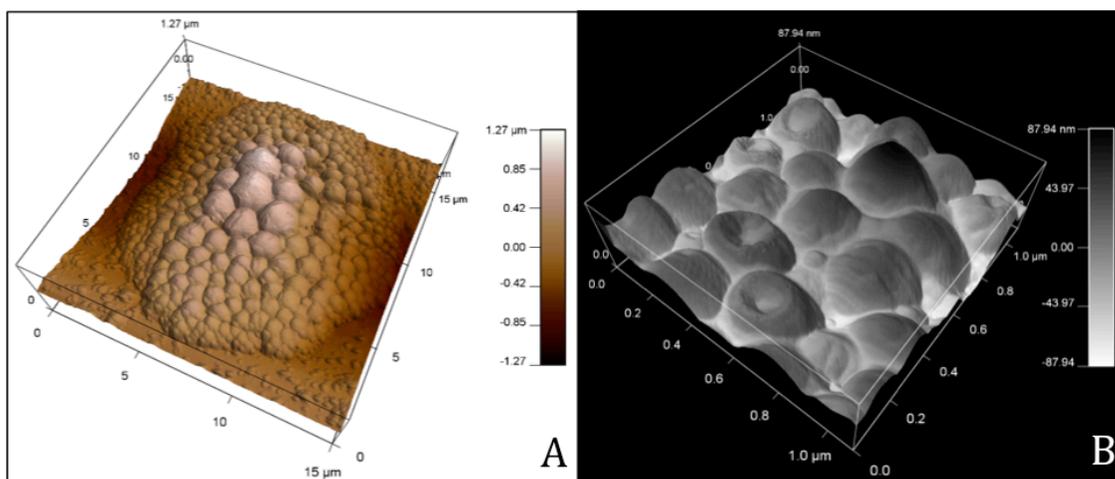
O segundo parâmetro modificado foi quanto ao tempo de ultrassonicação para formação da emulsão a/o, alterando-o para dois ciclos de 30s com intervalo de 10s, ao invés de um ciclo de 30s. Esse experimento foi feito em duplicata. Todos os outros parâmetros foram mantidos inalterados frente ao protocolo de preparação das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP descrito no item 3.1.1. A caracterização das nanopartículas formadas foi feita por AFM em modo contato intermitente. Nas figuras 13 e 14, observa-se o resultado dessa alteração.

As nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP apresentaram uma menor dispersão de tamanho após aumento no tempo de ultrassonicação da primeira etapa para dois ciclos de 30s. Apesar de ainda existirem estruturas na faixa de micrômetros (figura 14.A), as partículas apresentaram uma variação dimensional de 200-800nm (figura 13 e 14.B). Isso se dá, provavelmente, devido à diminuição das gotículas de água dispersas no solvente orgânico na emulsão a/o formada. Com isso, ao formar a emulsão a/o/a as gotículas aquosas internas estão menores, permitindo que o invólucro do polímero, disperso no solvente orgânico, também seja menor (Zambaux *et al.*, 1998). Dessa maneira, produziu-se nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP de tamanhos reduzidos

Também é possível observar que, após tal modificação no protocolo de preparo das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP, essas continuaram a se organizar na mica em aglomerados circulares, no qual, as partículas maiores estavam ao centro e as menores na borda. Além disso, as nanopartículas permaneceram esféricas (figura 13 e 14).



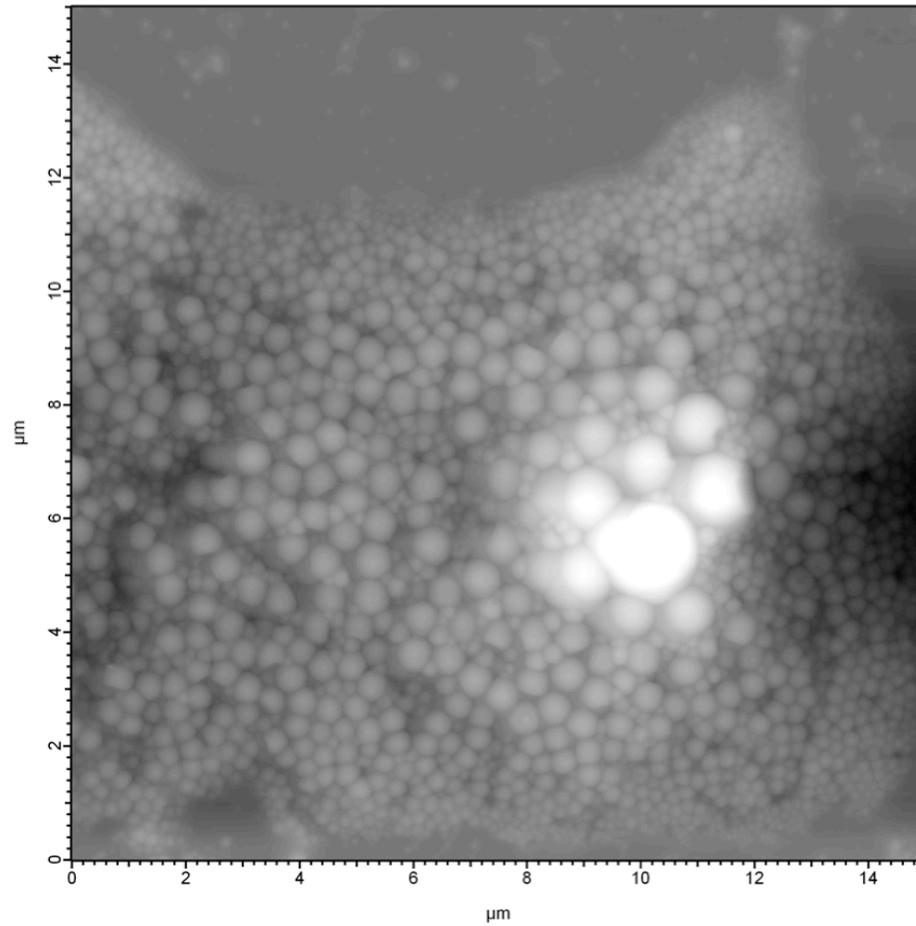
**Figura 13:** Imagens topográfica feita por modo de varredura contato intermitente das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP após alteração do tempo de ultrassonicação da primeira etapa para 2 ciclos de 30s, com intervalo de 10s entre eles. O perfil mostrado foi obtido na região indicada na figura B.



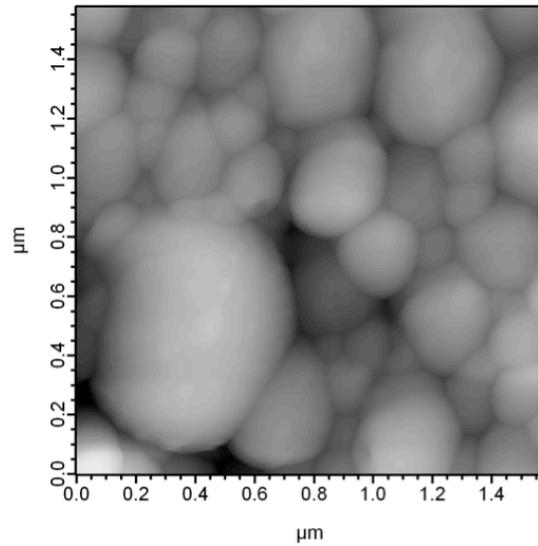
**Figura 14:** Imagem topográfica tridimensional das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP feita por AFM no modo de varredura contato intermitente após alteração no tempo de ultrassonicação para 2 ciclos de 30s com intervalo de 10s entre eles.

Por fim, na figura 13 é possível observar depressões na superfície das nanopartículas de EDTMP/PVA/PLA, principalmente naquelas com tamanho variando entre 400 e 800nm. Através das figuras 13.B e 14.B verifica-se que as depressões são profundas e centralizadas, sugerindo que as nanopartículas colabaram devido à alta força centrípeta (168000xg) a que são submetidas. Dessa forma, o fato das nanopartículas de EDTMP/PVA/PLA formarem depressões em sua superfície sugere que essas sejam cápsulas e não esferas maciças. Este fato está de acordo com a literatura, uma vez que, nesta está definido que o processo de fabricação de nanopartículas poliméricas pelo método de dupla emulsão produz nanocápsulas (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

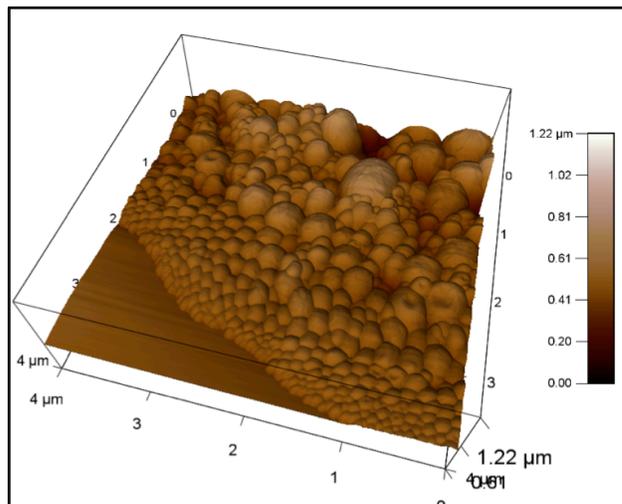
Para investigar se as depressões na superfície das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP são realmente devido à alta velocidade de centrifugação utilizada, foi realizada uma alteração nesse parâmetro. Assim, para produzir as nanopartículas foram utilizadas 2 ciclos de ultrassonicação de 30s, com intervalo de 10s entre ele, na produção da emulsão a/o; e 1 ciclo de 1 min na produção da emulsão a/o/a. A centrifugação, usada na lavagem, foi alterada para 70% do valor inicial (117600xg por 20min). Este experimento foi realizado em duplicata.



**Figura 15:** Imagem topográfica das nanopartículas de EDTMP/PVA/PLA, no modo de varredura contato intermitente, após modificação no tempo de ultrassonicação da primeira etapa da produção das nanopartículas (2 ciclos de 30s) e diminuição da velocidade de ultracentrifugação para 117660xg por 20min.



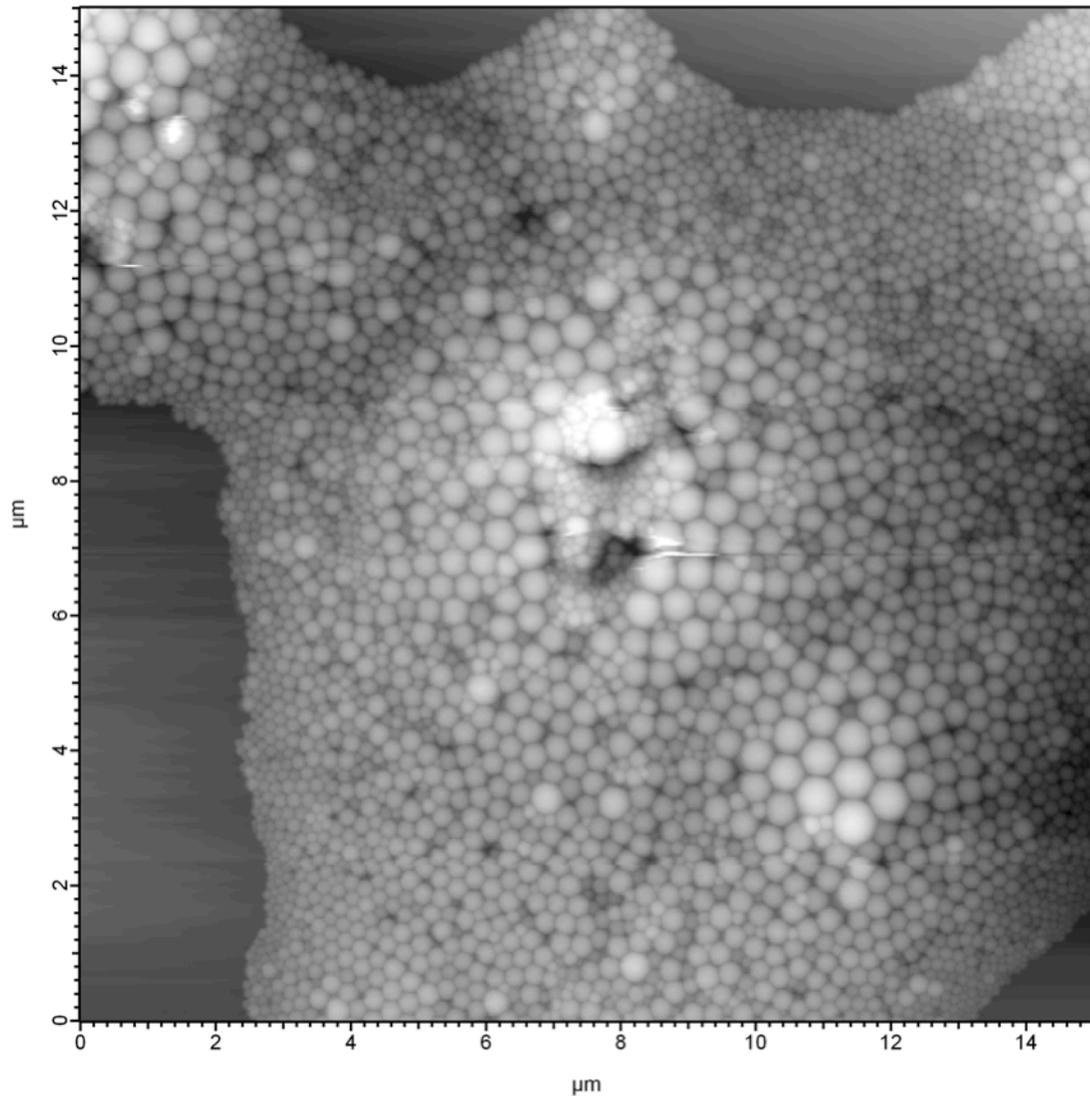
**Figura 16:** Imagem topográfica em menor escala das nanopartículas de EDTMP/PVA/PLA, no modo de varredura contato intermitente, após modificação no tempo de ultrassonicação da primeira etapa da produção das nanopartículas (2 ciclos de 30s) e diminuição da velocidade de ultracentrifugação para 117660xg por 20min.



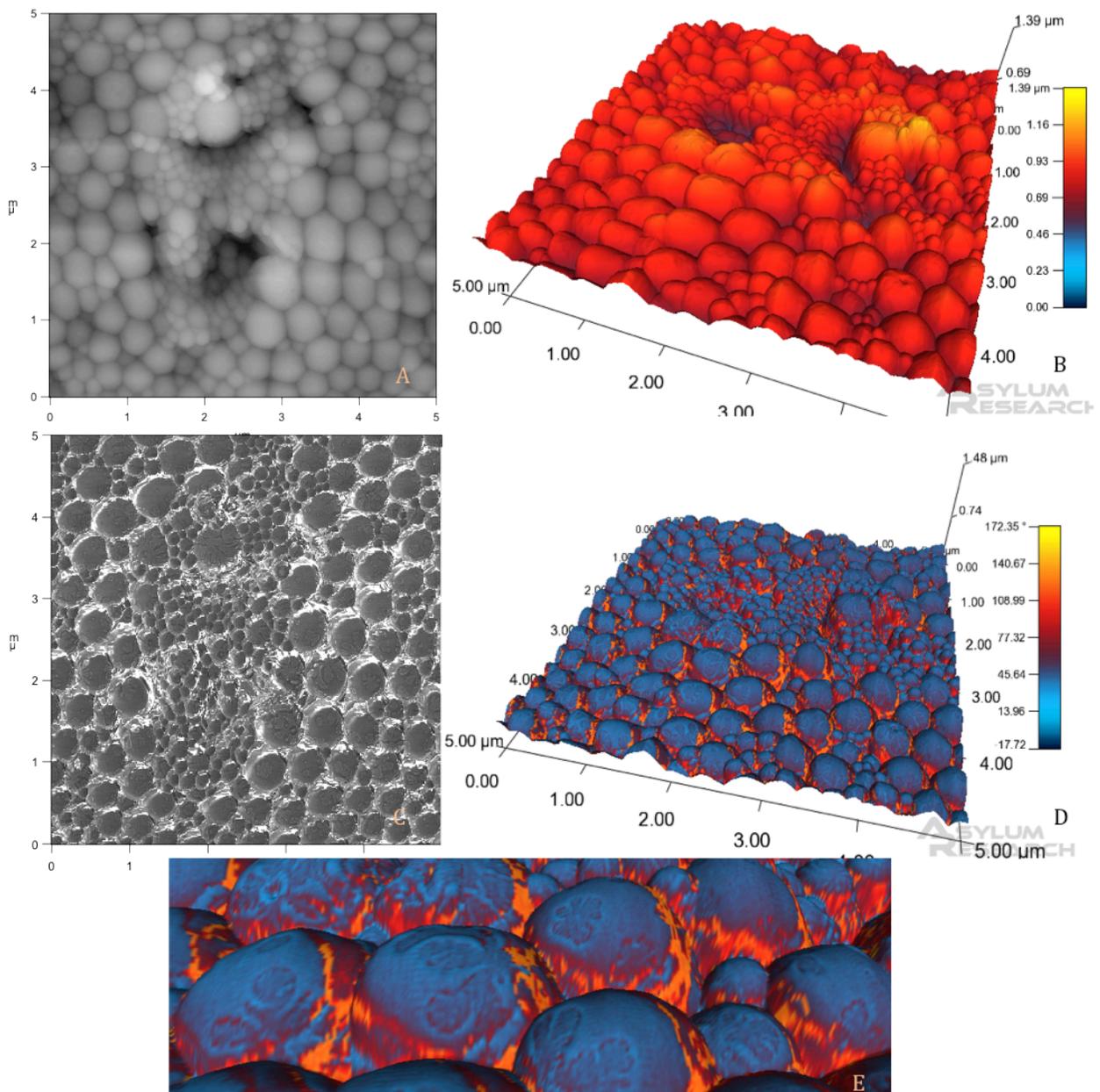
**Figura 17:** Imagem topográfica tridimensional das nanopartículas de EDTMP/PVA/PLA, no modo de varredura contato intermitente, após modificação no tempo de ultrassonicação da primeira etapa da produção do nanocomposto (2 ciclos de 30s) e diminuição da velocidade de ultracentrifugação para 117660xg por 20min.

As figuras 15, 16 e 17, mostram nanopartículas de EDTMP/PVA/PLA com dimensões variando entre 200-800nm organizadas em aglomerados circulares sobre a mica, no qual as partículas maiores estão ao centro do aglomerado e as menores nas extremidades. Na figura 17, ainda é possível observar nanopartículas com depressões em sua superfície, no entanto, essas aparentam ser menos profundas. Por conta disso, manteve-se a produção das nanopartículas conforme descrito no parágrafo anterior e reduzimos, ainda mais, a velocidade da centrifugação para 24238xg (12% do valor inicial) e o tempo para 10min. Novas imagens foram realizadas para avaliação desse novo protocolo de produção das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP. Com este protocolo fizemos quatro preparações independentes.

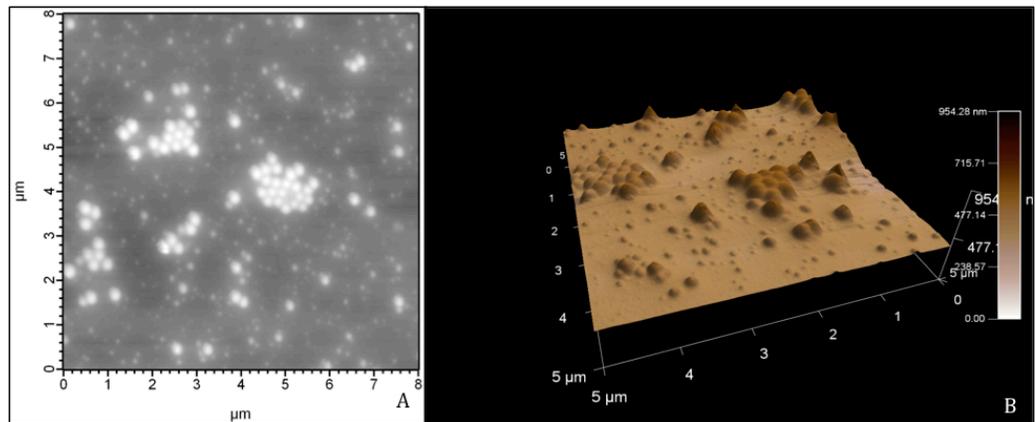
Ao diminuir a velocidade e o tempo de centrifugação formaram-se nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP que se organizaram em aglomerados na superfície da mica, entretanto, não mais circulares. No centro dessas estruturas estavam as partículas maiores e na borda as menores, estando, essas últimas, dispersas também entre as maiores (figura 18). As partículas possuem uma dispersão de tamanho que varia entre 200 e 600nm. Tamanho esse menor do que qualquer um dos observado nos outros protocolos, conforme consta nas figuras 18 e 19.A. Isso se deve, provavelmente, ao fato que durante a ultracentrifugação as partículas tenham colidido umas com as outras com mais força e, dessa forma se aglomeravam em estruturas maiores (figuras 10 e 13).



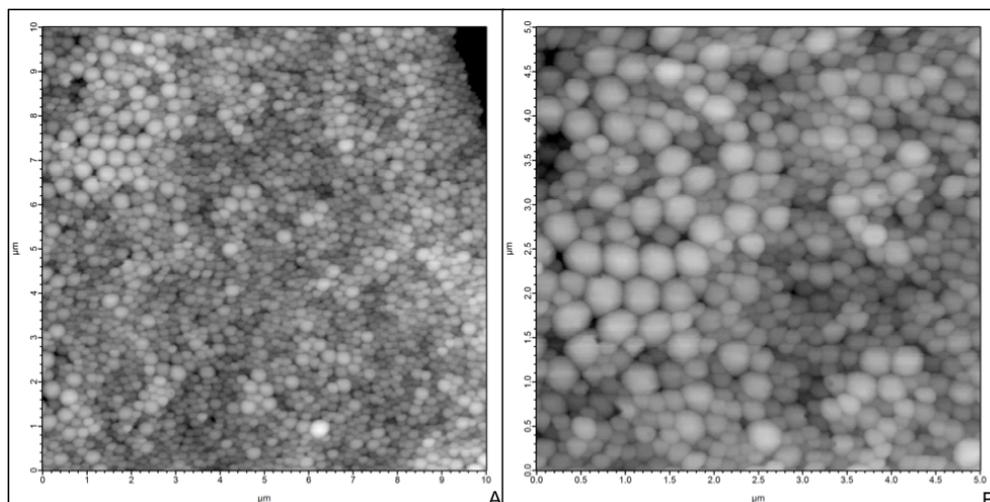
**Figura 18:** Imagem topográfica das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP produzidas pelo modo de varredura contato intermitente. As nanopartículas foram produzidas por dois ciclos de ultrassonicação de 30s para formar a emulsão o/w, em seguida, foi feito um ciclo de ultrassonicação de 1min para produzir a emulsão a/o/a. Por fim, as nanopartículas foram lavadas três vezes por centrifugação à 24238xg por 10min.



**Figura 19:** Imagens das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP adquiridas pelo modo de varredura contato intermitente. As nanopartículas foram produzidas através de 2 ciclos de ultrassonicação de 30s para formar a emulsão o/w, em seguida, foi feito 1 ciclo de ultrassonicação de 1min para produzir a emulsão a/o/a. Por fim, as nanopartículas foram lavadas três vezes por centrifugação à 24238xg por 10min. A. Imagem topográfica bidimensional; B. Imagem topográfica tridimensional; C. Imagem de fase bidimensional; D. Imagem topográfica tridimensional com sobreposição da imagem de fase bidimensional (colorido); E. Zoom da imagem D.



**Figura 20:** Imagens do sobrenadante, realizadas, pelo modo de varredura contato intermitente da produção de nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP conforme o protocolo: 2 ciclo de ultrassonicação de 30s para formar a emulsão o/w, em seguida, foi feito 1 ciclo de ultrassonicação de 1min para produzir a emulsão a/o/a. Por fim, as nanopartículas foram lavadas três vezes por centrifugação à 24238xg por 10min. A. Imagem topográfica bidimensional; B. Imagem topográfica tridimensional.



**Figura 21:** Imagens topográfica das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP feita em modo de varredura contato intermitente. As partículas foram produzidas conforme o protocolo: 2 ciclos de ultrassonicação de 30s para formar a emulsão o/w e 2 ciclos de ultrassonicação de 1min para produzir a emulsão a/o/a. Por fim, as nanopartículas foram lavadas três vezes por centrifugação à 24238xg por 10min. A. Imagem de altura bidimensional de 10 $\mu$ m por 10 $\mu$ m; B. Imagem de altura bidimensional 5 $\mu$ m por 5 $\mu$ m.

Na figura 19 observa-se um comparativo entre a imagem de altura (topográfica) e a imagem de fase obtidas no AFM pelo modo de varredura contato intermitente. Nas imagens de altura, tanto bidimensional (19.A) quanto tridimensional (19.B), as nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP apresentam uma superfície lisa. No entanto, nas imagens de fase (figura 19.C e 19.D) é possível observar estruturas diferentes nessa mesma superfície. Essa variação na superfície é bem nítida na figura 19.E, na qual é possível observar claramente estruturas, em formatos dendriméricos, dispersas na superfície da partícula.

Na imagem de fase, obtida por contato intermitente, é possível distinguir materiais com propriedades elásticas e adesivas diferentes. Essa observação baseia-se na propriedade que materiais mais macios ou mais elásticos atrasam a oscilação do cantiléver, devido à sua interação com a ponteira, e com isso geram uma modificação no sinal de deflexão do mesmo, que gera, por sua vez, uma modificação na imagem. Essa afirmação é corroborada por Morris *et al.* (2009). Baseado na literatura e nas imagens 19.C, 19.D e 19.E, pode se dizer que os materiais dispersos de forma aleatória na superfície da partícula correspondem à materiais distintos.

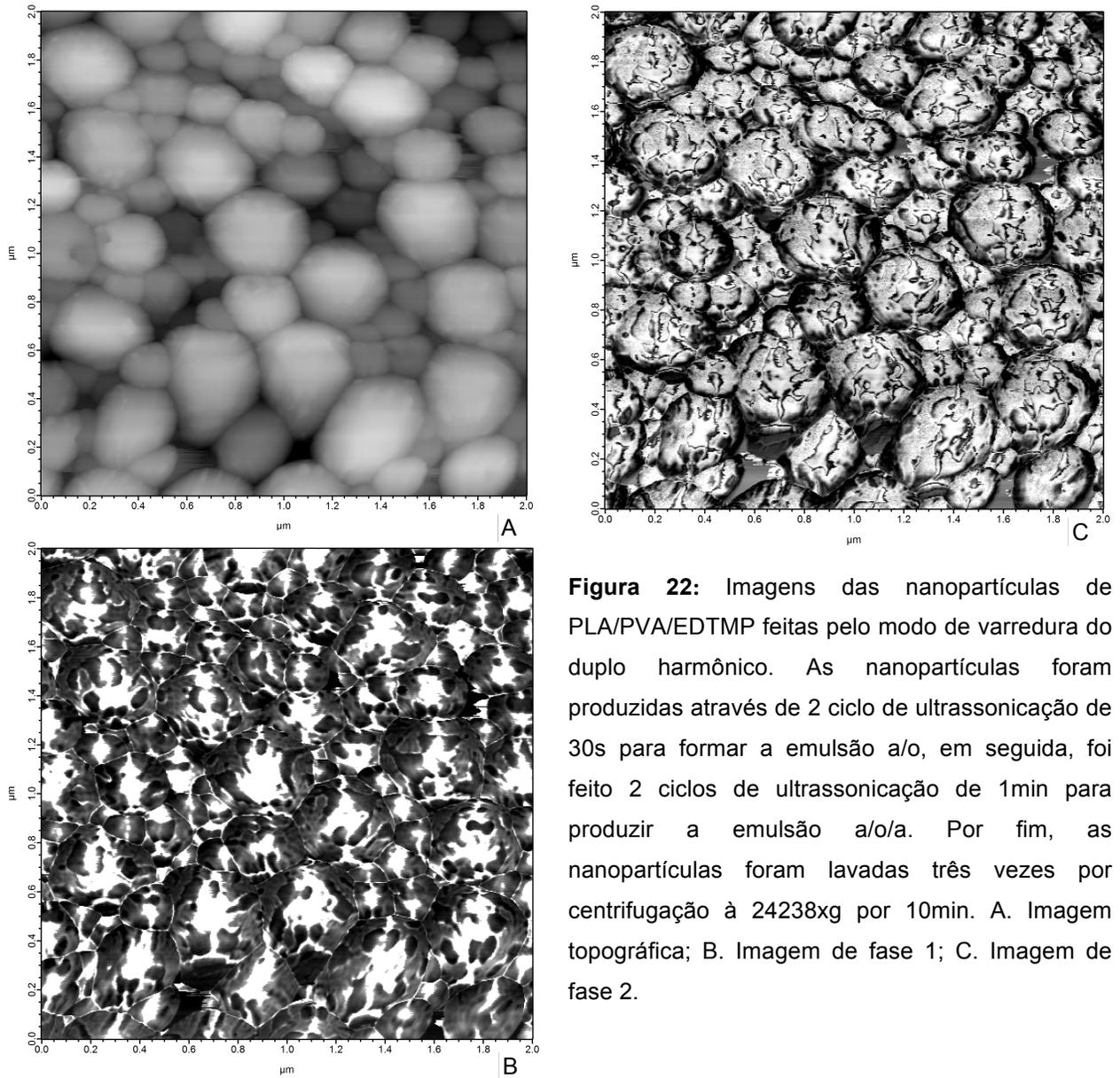
Tal fato condiz com a metodologia de preparo das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP, uma vez que fazem parte da composição da nanopartícula um polímero (PLA) e um dispersante (PVA).

Devido à modificação da velocidade de centrifugação para 12% do valor inicial, analisou-se o sobrenadante de modo a averiguar se ocorria perda de nanopartículas neste. Foi possível observar nesse, a presença de nanopartículas menores do que

150nm (figura 20). No entanto, infere-se que essas estruturas sejam esferas poliméricas maciças, correspondentes a gotículas de solvente orgânico que se forma no momento que a solução aquosa é vertida sobre a emulsão a/o, não possuindo a gotícula de água dentro. Assim, cabe-se informar, que é interessante a retirada dessas estruturas da solução final, uma vez que nessas não encontram-se o fármaco e sim apenas o polímero, o que pode acarretar em efeitos estéricos ou mesmo, na competição com os sítios de interesse fisiopatológicos.

Pode-se, assim, concluir que a diminuição na velocidade e tempo de centrifugação para 24238xg e 10min, respectivamente, foi interessante no preparo das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP, uma vez que contribuiu na formação de partículas com menores dimensões e dispersão de tamanho. Além disso, essa velocidade de centrifugação serviu como método de separação, fazendo com que, as estruturas poliméricas maciças menores permanecessem no sobrenadante.

Por fim, fez-se mais uma modificação na metodologia de preparo das nanopartículas de EDTMP/PVA/PLA com o objetivo de buscar uma homogeneidade ainda maior quanto ao tamanho dessas. As alterações foram 2 ciclos de ultrassonicação de 30s, com intervalo de 10s entre eles, para formação da emulsão a/o; 2 ciclos de 1min, com intervalo de 10s entre eles para formação da emulsão a/o/a; e centrifugação à 24238xg por 10min. Com este protocolo também temos quatro preparações independentes.



**Figura 22:** Imagens das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP feitas pelo modo de varredura do duplo harmônico. As nanopartículas foram produzidas através de 2 ciclo de ultrassonicação de 30s para formar a emulsão a/o, em seguida, foi feito 2 ciclos de ultrassonicação de 1min para produzir a emulsão a/o/a. Por fim, as nanopartículas foram lavadas três vezes por centrifugação à 24238xg por 10min. A. Imagem topográfica; B. Imagem de fase 1; C. Imagem de fase 2.

Após essa modificação, as nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP apresentaram uma dispersão de tamanho de 200 a 500nm (figura 21.B). Essa variação pode ser considerada satisfatória, e é corroborada por Davis *et al.* (2008)<sup>3</sup>.

Ainda é possível notar que as nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP continuaram a formar grandes aglomerados na superfície da mica. No entanto, essas estruturas não mais possuem um formato definido, tão pouco, se organizam de forma que as maiores estejam no centro do aglomerado e as menores na borda. Tal fato provavelmente ocorre devido à menor dispersão do tamanho das partículas, que inicialmente variavam entre 150nm a 2 $\mu$ m (figura 10) e após as modificações no protocolo de preparo das nanopartículas passou a variar de 200 a 500nm. Essas também não apresentam depressões em sua superfície, isso se deve, ao uso da menor velocidade de centrifugação (figura 21).

Por fim, na figura 22 é possível observar as imagens produzidas pelo modo de varredura de duplo harmônico. Na figura 22.C tem-se a imagem de altura tridimensional, das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP. É observado que as nanopartículas apresentam uma superfície em geral lisa, com pequenas protuberâncias.

A figura 22.A corresponde a imagem de altura tridimensional com a imagem de fase 1 bidimensional (variação na intensidade da escala de preto e branco) sobreposta à essa. As imagens de fase são relativamente difíceis de interpretar, pois podem refletir a topografia e diferentes propriedades viscoelasticidades ou adesividades dos

---

<sup>3</sup> Davis et al. (2008) explicam que na região do tumor a distância entre as células endoteliais pode chegar a 600nm, enquanto as fenestras nas células renais variam entre 150 a 200nm. Dessa forma, o tamanho das nanopartículas deve ser maior que 200nm, em busca, de um direcionamento para o tumor.

materiais. Uma observação cuidadosa das imagens permite concluir que a topografia não é a causa do contraste, portanto podemos supor que existem diferentes viscoelasticidades/adesividades na superfície das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP. Como temos dois polímeros, supomos que a estrutura dendrímica corresponda à estruturação destes polímeros na interface. Essa variação de estrutura na superfície da nanopartícula é mais bem definida na imagem 22.B que corresponde a imagem de fase 2.

Em resumo, conclui-se que a variação no tempo de ultrassonicação, assim como na velocidade e tempo de centrifugação são parâmetros importantes no controle da dispersão de tamanho das nanopartículas poliméricas. A metodologia que apresentou menor variação dimensional das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP foi a que consiste em dois ciclos de ultrassonicação de 30s com intervalo de 10s na formação da emulsão a/o (1º etapa), dois ciclos de ultrassonicação de 1min com intervalo de 10s entre eles na formação da emulsão a/o/a (2º etapa) e recuperação e lavagem das partículas por centrifugação à 24238xg por 10min. As nanopartículas formadas apresentam dispersão de tamanho entre 200-500nm, correspondendo a tamanhos aceitáveis, de acordo com relatos internacionais Davis *et al.* (2008) e Mora-Huertas *et al.* (2010).

A metodologia de preparo das nanopartículas para análise por AFM permitiu um maior detalhamento na caracterização morfológica e dimensional dessas, de forma a permitir a seleção do melhor método de produção das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP. Foi visto também que o modo de varredura por duplo harmônico se destacou na caracterização morfológica dessas nanopartículas, produzindo imagens de fase com maior detalhamento estrutural.

Por fim, através das imagens por AFM foi possível caracterizar depressões na superfície das partículas quando essas foram submetidas à centrifugação de 168000xg e 117600xg, sugerindo que essas estruturas fossem realmente nanocápsulas como era esperado, uma vez que o método de preparo utilizado foi através de dupla emulsificação (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

#### **4.2. Classificação das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP em nanocápsulas ou nanoesferas:**

Na literatura é difícil encontrar a classificação experimental das nanopartículas poliméricas em nanocápsulas e nanoesferas. Essa classificação é, em geral, baseada na teoria de formação das nanopartículas. Segundo Mora-Huertas *et al.* (2010), o processo de formação de nanopartículas poliméricas pelo método de dupla emulsificação produz, predominantemente, nanocápsulas. Entretanto, as alterações drásticas no tempo e potência de ultrassonicação que fizemos, coloca em dúvida essa premissa, uma vez que, uma ultrassonicação intensa pode levar a mistura de um grande número de nanoesferas as cápsulas. Além disso, a mudança na velocidade de centrifugação também questiona esse ponto da literatura, uma vez que, intuitivamente, as nanoesferas são mais pesadas que as nanocápsulas, precipitando primeiro.

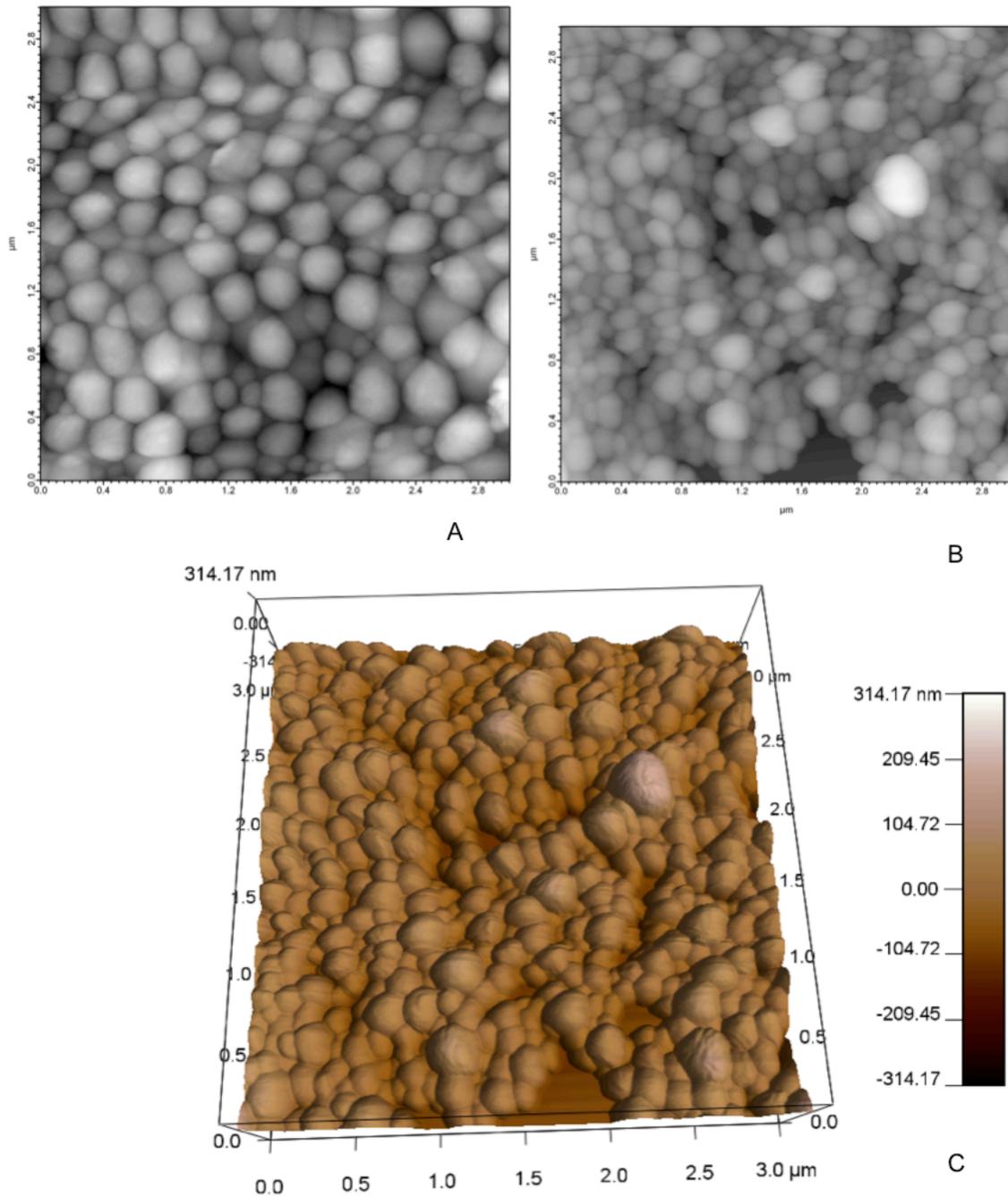
Para classificar as nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP como nanocápsulas ou nanoesferas foi utilizada a metodologia descrita no item 3.3. Neste, ao aquecer as nanopartículas em estufa, aquelas que possuem seu núcleo preenchido por uma solução aquosa irão formar depressões na superfície, uma vez que a água irá evaporar. Por outro lado, as nanopartículas maciças não sofrerão nenhuma alteração significativa

na sua estrutura. Assim, essa metodologia consegue diferenciar nanocápsulas de nanoesferas. Esse experimento foi realizado em triplicata. Os resultados estão expostos nas figuras 23 e 24.

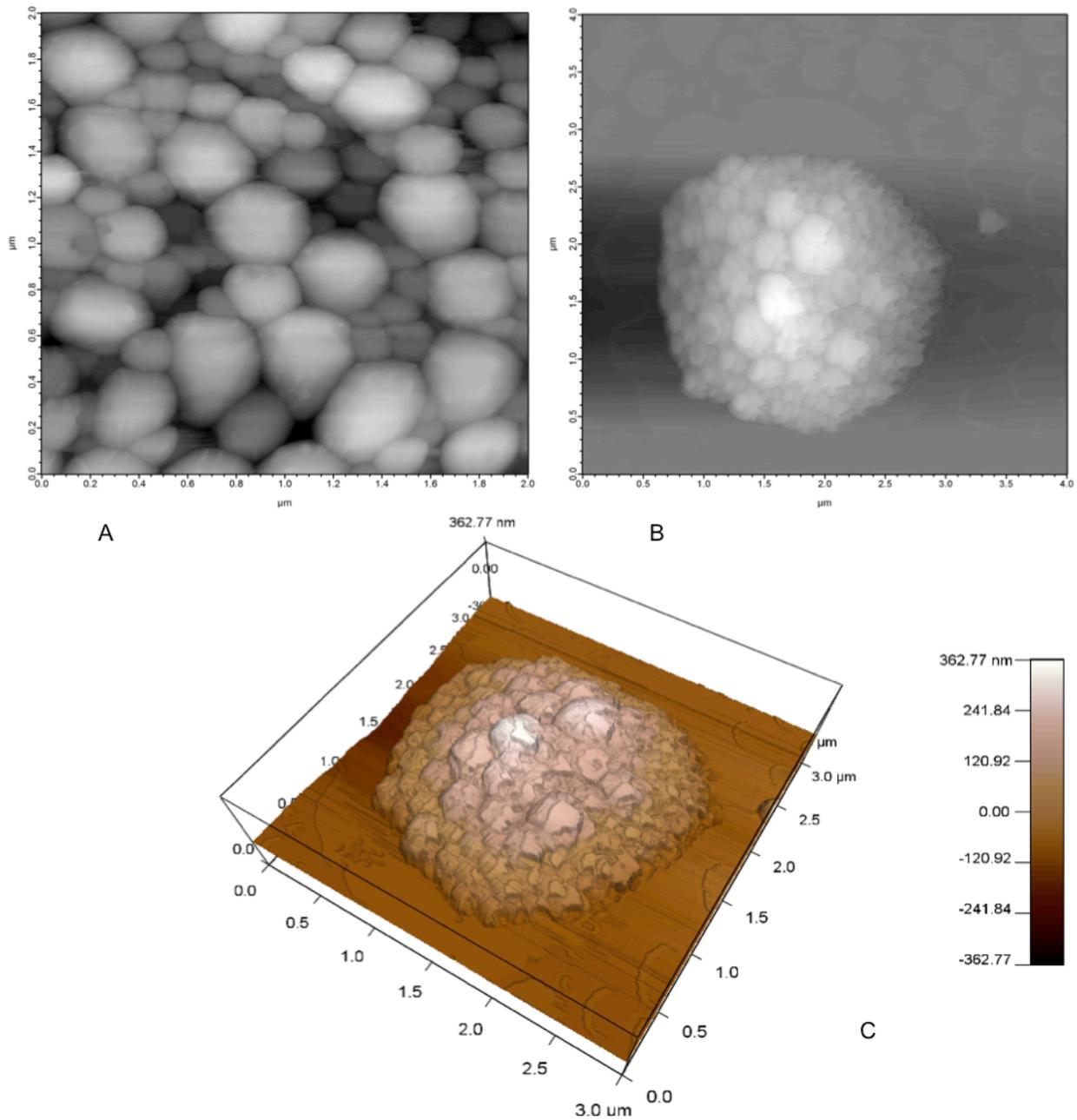
Na figura 23 estão as imagens feitas por AFM no modo de varredura por contato intermitente das nanoesferas de PLA/PVA. É possível observar que ocorreram poucas alterações na estrutura morfológica da partícula.

A figura 24 demonstra as nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP produzidas pelo método de dupla emulsificação e analisadas por AFM no modo de varredura por contato intermitente. Na figura 24.A observou-se as nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP logo após terem sido produzidas, nesta é possível observar que as partículas possuem uma estrutura esférica e a superfície lisa. No entanto, após serem levadas ao aquecimento em estufa à 53°C por 1h (figura 24.B) as nanopartículas apresentaram uma superfície não uniforme, com depressões por toda ela. Essa estruturação é ainda mais nítida na imagem 24.C, na qual as partículas aparentam perda de tonicidade.

Os resultados experimentais confirmaram a hipótese inicial que nanoesferas, após serem aquecidas, não sofrem alterações morfológicas significativas. No entanto, as nanopartículas produzidas pelo método de dupla emulsificação apresentam depressões em sua superfície devido à perda d'água. Dessa forma, é possível afirmar que as nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP eram nanocápsulas, uma vez que, ao serem levadas à estufa apresentaram depressões em sua superfície, consistente à perda d'água do núcleo destas.



**Figura 23:** Imagens topográficas das nanoesferas de PLA/PVA feita em modo de varredura contato intermitente. A. Nanoesferas antes de serem aquecidas em estufa; B Nanoesferas depois de serem aquecidas em estufa; C. Imagem topográfica tridimensional das nanoesferas de PLA/PVA após terem sido aquecidas em estufa.



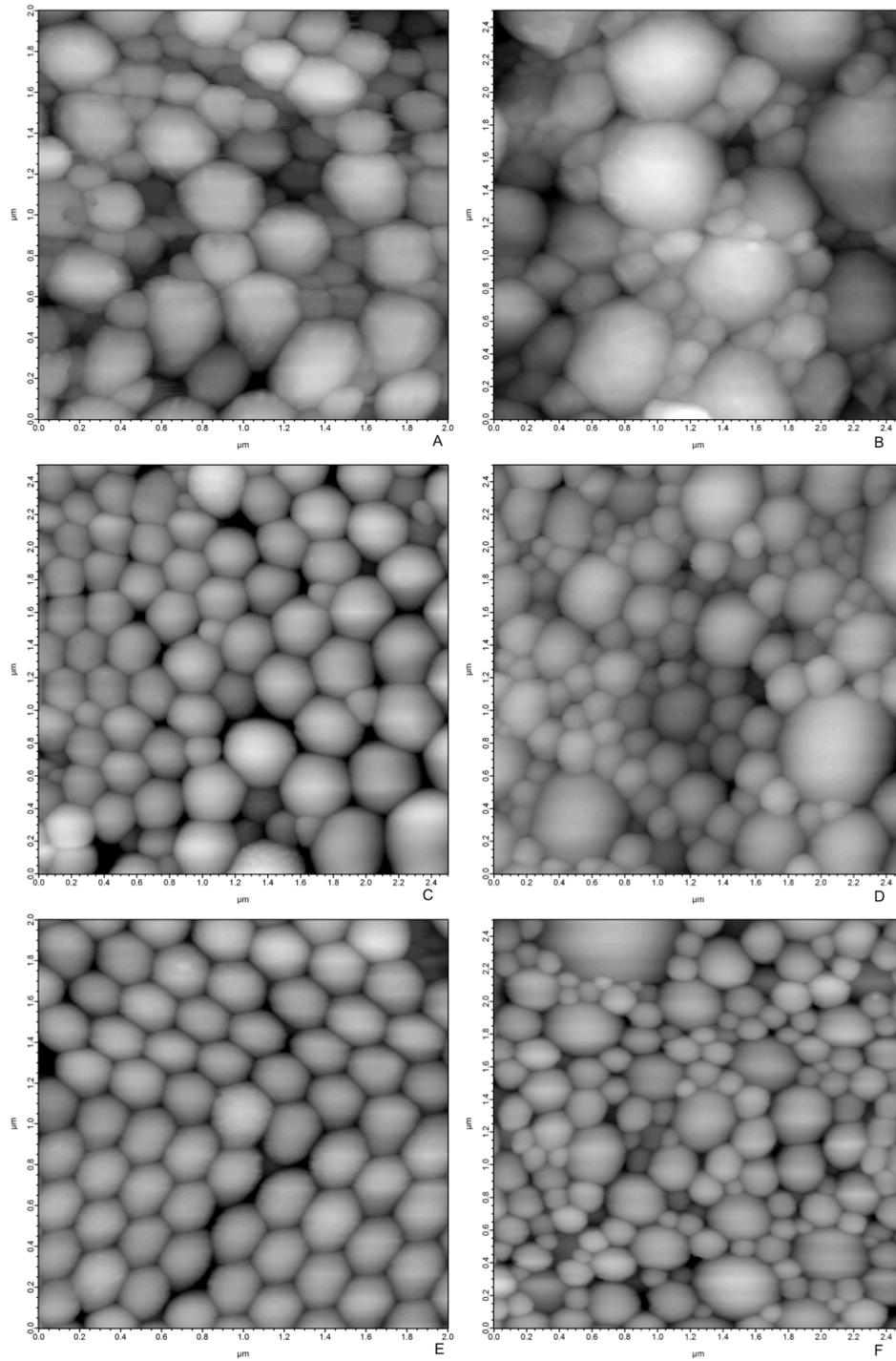
**Figura 24:** Imagens topográfica das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP feita em modo de varredura contato intermitente. A. Nanopartículas antes de serem aquecidas em estufa; B. Nanopartículas depois de serem aquecidas em estufa; C. Imagem topográfica tridimensional das nanopartículas PLA/PVA/EDTMP após terem sido aquecidas em estufa.

### **4.3. Análise da resistência das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP à diferentes doses de radiação gama:**

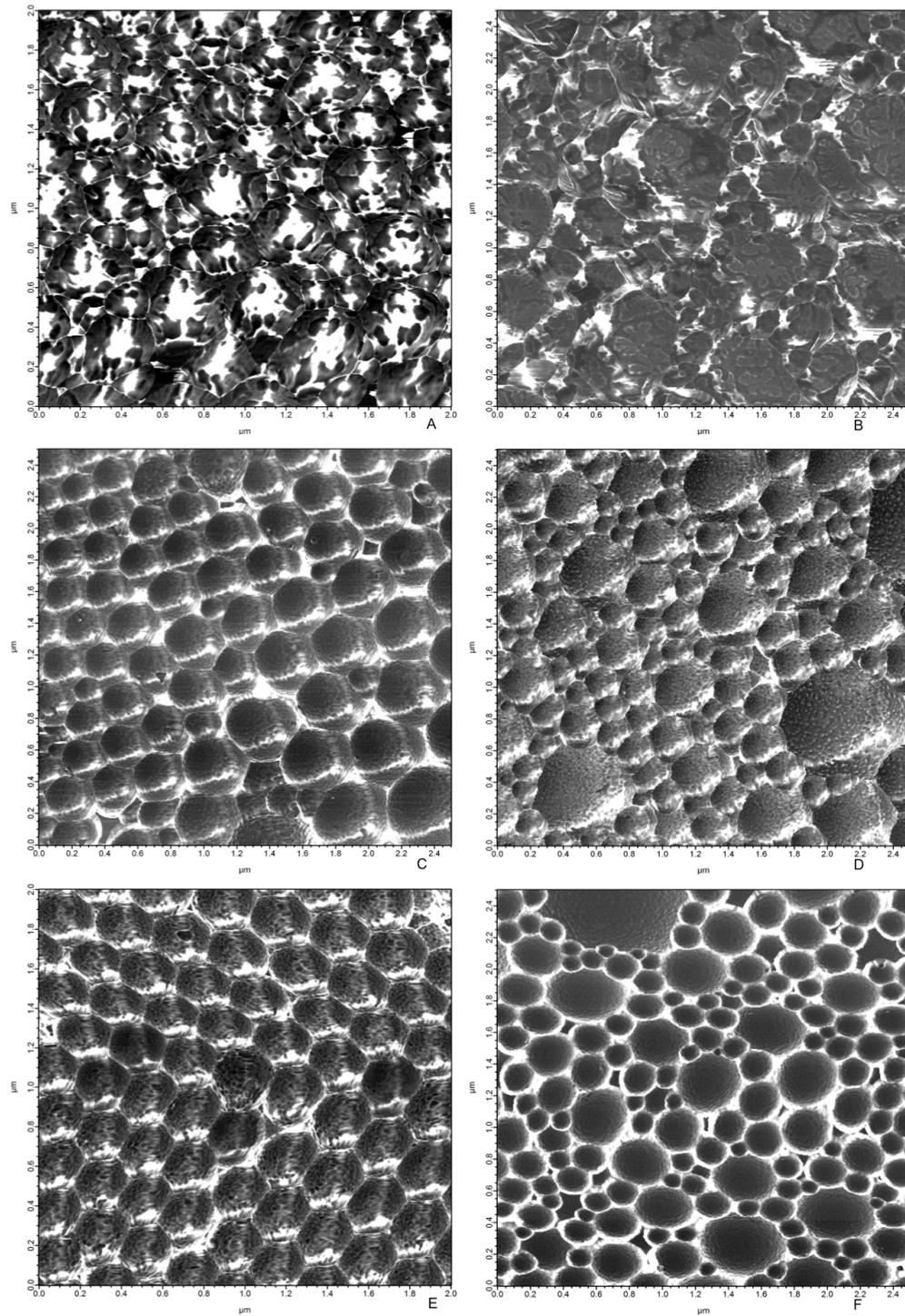
A análise da resistência das nanopartículas a irradiação por partículas  $\beta$  se faz necessária, uma vez que, futuramente elas serão carreadoras do radiofármaco  $^{153}\text{Sm}$ -EDTMP. No entanto, a irradiação das nanopartículas por partículas  $\beta$ , em altas doses, é algo difícil de ser feito em laboratório, pois apresenta grande risco ao operador. Dessa forma, as nanopartículas foram irradiadas com raios  $\gamma$  nas doses de 7,0; 10; 50; 70 e 100 kGy. Em seguida, baseado nos preceitos da radiobiologia, utilizando a fórmula descrita no item 3.4, foram calculados as doses equivalentes de radiação  $\beta$  que as nanopartículas receberam que foram iguais a: 0,7; 1,0; 5,0; 7,0 e 10 kGy (Tauhata *et al.*, 2011).

As nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP, após serem irradiadas, tiveram suas estruturas analisadas no AFM pelo modo de varredura de duplo harmônico em busca de possíveis modificações morfológicas. Os resultados dessa irradiação estão expostos nas figuras 25, 26 e 27.

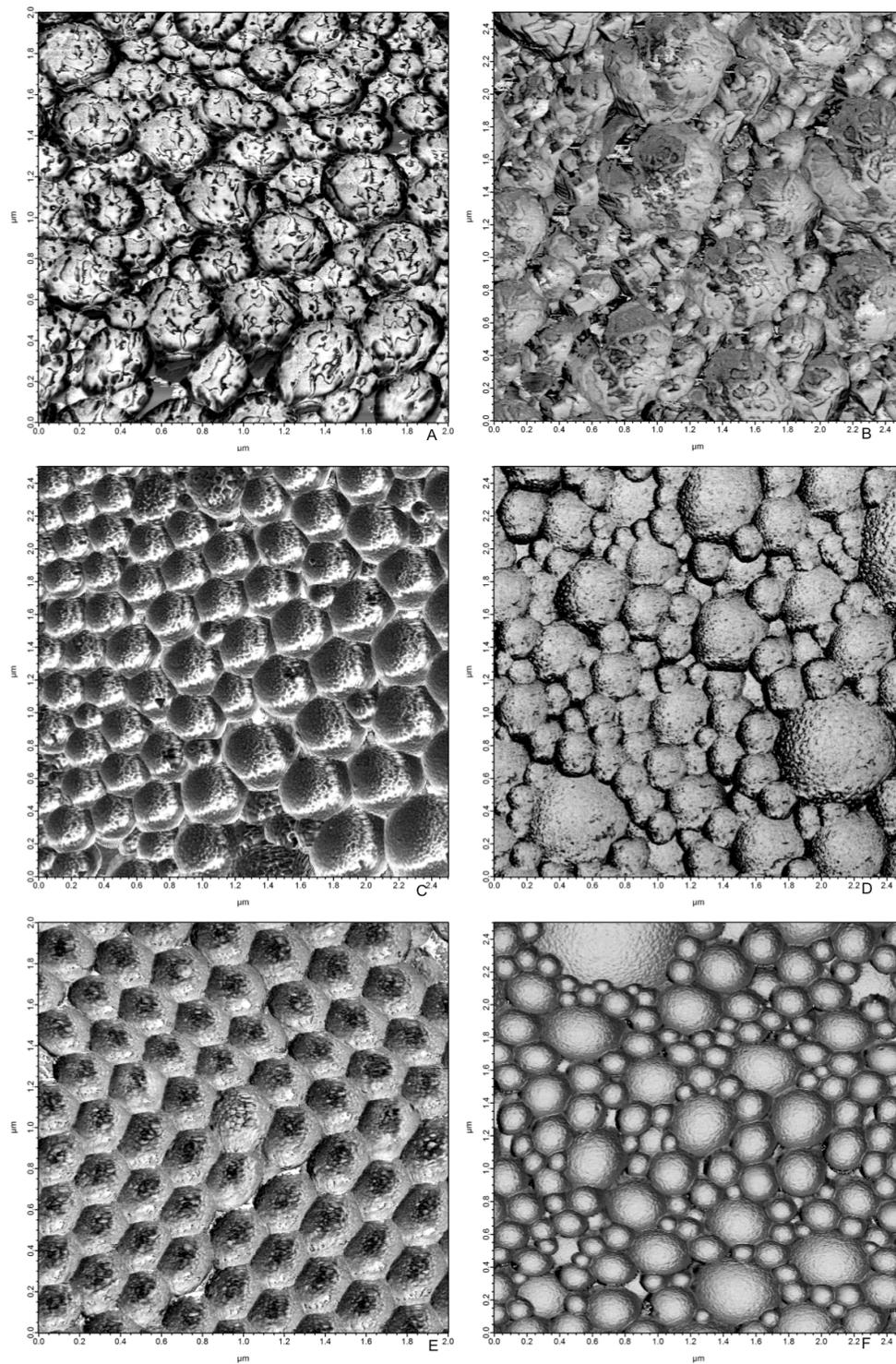
Nas imagens topográficas não foi possível identificar nenhuma variação evidente na morfologia das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP (figura 25). No entanto, nas imagens de fase 1 e fase 2, observa-se uma clara alteração na superfície das partículas com o aumento da dose de radiação (figura 26 e 27).



**Figura 25:** Imagens topográficas das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP irradiadas feita em modo de varredura duplo harmônico. A. Não irradiada; B. 7kGy; C. 10kGy; D. 50kGy; E. 70kGy; F. 100kGy.



**Figura 26:** Imagens de fase 1 das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP irradiadas feita em modo de varredura duplo harmônico. A. Não irradiada; B. 7kGy; C. 10kGy; D. 50kGy; E. 70kGy; F. 100kGy.



**Figura 27:** Imagens de fase 2 das nanopartículas de PLGA/PVA/EDTMP irradiadas feita em modo de varredura duplo harmônico. A. Não irradiada; B. 7kGy; C. 10kGy; D. 50kGy; E. 70kGy; F. 100kGy.

Ambas as imagens, de fase 1 e fase 2, as nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP não irradiadas e irradiadas com 7kGy, apresentaram em suas superfícies, estruturas diferentes, dispersas com forma dendrímica (figura 26 e 27. A e B). Essas correspondiam a dois materiais de propriedade diferentes, como dito anteriormente. Nas imagens de fase 2 é possível observar com maior detalhamento a dispersão dessas estruturas (figura 27. A e B). Há um maior contraste entre as duas estruturas devido a uma maior variação na fase do segundo harmônico.

No entanto, as nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP após serem irradiadas com 10kGy apresentam modificações, não sendo mais possível a identificação das estruturas dendrímicas (figura 26.C e 27.C). Nessas imagens, a superfície dessas nanopartículas apresentaram uma fragmentação, que fica mais nítida com o aumento da dose de irradiação das partículas, ficando bastante clara nas imagens destas após serem irradiadas com 100kGy (figuras 26.F e 27.F). Nas imagens de fase 2, na qual se utiliza uma frequência de excitação do cantiléver maior, há um maior detalhamento da imagem, com maior contraste na imagem de fase. Dessa forma, a fragmentação na superfície da partícula fica ainda mais nítida (figura 27).

Após a análise, é possível afirmar que as nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP se mostraram resistentes a uma dose de radiação  $\gamma$  igual a 7kGy. Essa equivale a 700Gy de uma irradiação por partículas  $\beta$ . No entanto, a dose de  $^{153}\text{Sm-EDTMP}$  usada em pacientes não ultrapassa 15Gy. Dessa forma, tanto o polímero, PLA, quanto o tensoativo, PVA, se mostraram resistentes o suficiente para carrear esse radiofármaco e serem utilizados na clínica moderna.

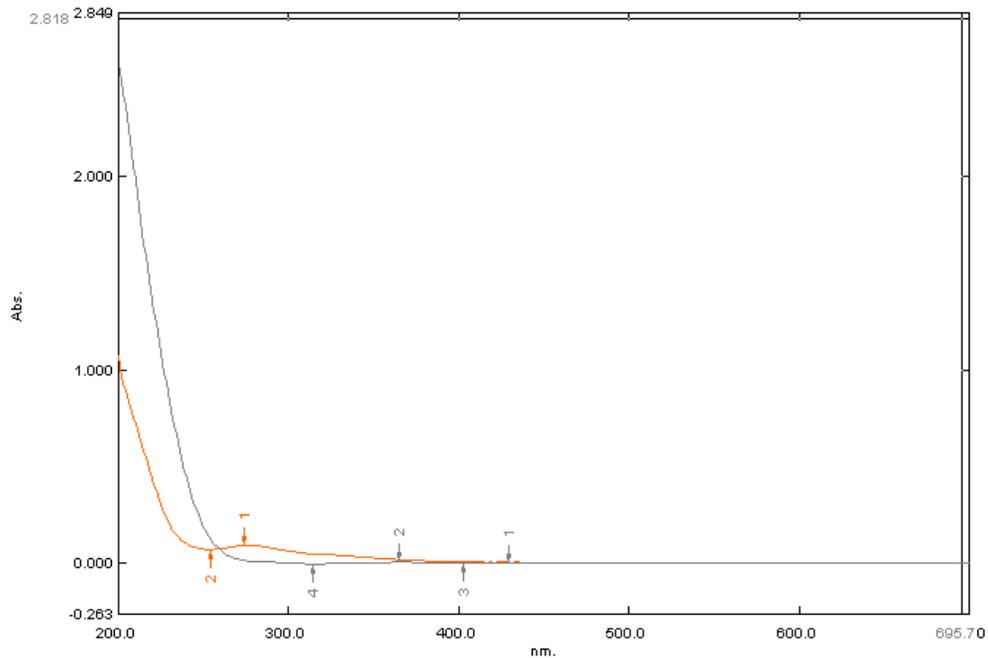
Além disso, através das imagens de fase 1, e, mais nitidamente nas imagens de fase 2, produzidas pela técnica de AFM, foi possível observar a degradação das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP após serem irradiadas com 10kGy de raios  $\gamma$ . Tal degradação não é observada nas imagens topográficas, que não apresentam quaisquer variações evidentes com o aumento da dose de irradiação. Dessa forma, pode-se dizer que um protocolo foi estabelecido para caracterização do efeito da radiação nas nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP. Este protocolo possivelmente poderá ser usado na avaliação de outros sistemas poliméricos irradiados, por exemplo, como um controle para as técnicas de esterilização por radiação gama.

#### ***4.4. Avaliação da eficiência de encapsulação do EDTMP nas nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP:***

A quantificação do fármaco encapsulado na nanopartículas poliméricas, através da técnica de espectroscopia de UV, é geralmente realizada de maneira indireta, ou seja, a partir da quantificação do fármaco no sobrenadante (Mainardes *et al.*, 2010; Vauthier & Bouchemal, 2009). Logo, o primeiro passo na análise da encapsulação do EDTMP consiste em fazer a curva de absorvância de todos os compostos existentes no sobrenadante (PVA e EDTMP) com o intuito de escolher o melhor comprimento de onda para analisar o EDTMP, sem que haja interferência dos demais componentes.

Essa análise seguiu a metodologia descrita no item 3.5 e o resultado está expresso em forma de gráfico comprimento de onda (nm) x absorvância (gráfico 1).

Pelo gráfico 1 pode-se observar que tanto o EDTMP como o PVA absorvem no mesmo comprimento de onda ( $\lambda=238$  nm). Dessa forma, em uma mistura dos dois compostos, que acontece no sobrenadante, haverá uma sobreposição das absorbâncias no pico correspondente a  $\lambda=238$  nm, não permitindo que se calcule a concentração do EDTMP. Assim, através da técnica de espectroscopia de UV não foi possível calcular a eficiência de encapsulação do EDTMP.



**Gráfico 1:** Gráfico de absorbância por comprimento de onda (nm). A linha cinza representa o espectro de absorbância do EDTMP, enquanto a linha vermelha representa o do PVA.

#### **4.5. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP:**

A avaliação da toxicidade dos fármacos *in vitro* é um dos testes, exigidos pelo Guia para a Condução de Estudos Não-Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos (Anvisa, 2010), para compostos que aspiram ser, futuramente, medicamentos comercializados. Baseado nisso, foi feita uma avaliação citotóxica inicial das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP segundo descrito no item 3.6.

**Tabela 1:** Percentual de inibição do crescimento (IC%) celular das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP frente a três linhagens tumorais testadas na concentração única de 5 µg/mL.

Linhagem celular	HCT-8	MDAMB-435	SF-295
	IC% (média)	IC% (média)	IC% (média)
Nanopartícula de PLA/PVA/EDTMP	Sem citotoxicidade	Sem citotoxicidade	Baixa atividade citotóxica (1%)

As nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP não apresentaram nenhuma atividade citotóxica frente às linhagens celulares HCT-8 (adenocarcinoma colorretal) e MDAMB-435 (melanoma). Essas nanopartículas apresentaram baixa toxicidade frente à linhagem celular SF-295 (glioblastoma) que não é considerada significativa (tabela1).

Dessa forma, as nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP não apresentaram atividade citotóxica frente a nenhuma das linhagens celulares testadas. Esse resultado já era esperado, uma vez que tanto o polímero (PLA) quanto o tensoativo (PVA) são estruturas biocompatíveis (Vauthier & Bouchemal, 2009). Além disso, o EDTMP já é

usado na clínica como vetor biológico, adquirindo atividade farmacológica ao ser complexado a um radionuclídeo emissor de partícula beta, como o  $^{153}\text{Sm}$  (Smith, 2011).

#### **4.6. Desenvolvimento de um protocolo de marcação das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP com $^{99m}\text{Tc}$ e avaliação de sua biodistribuição in vivo:**

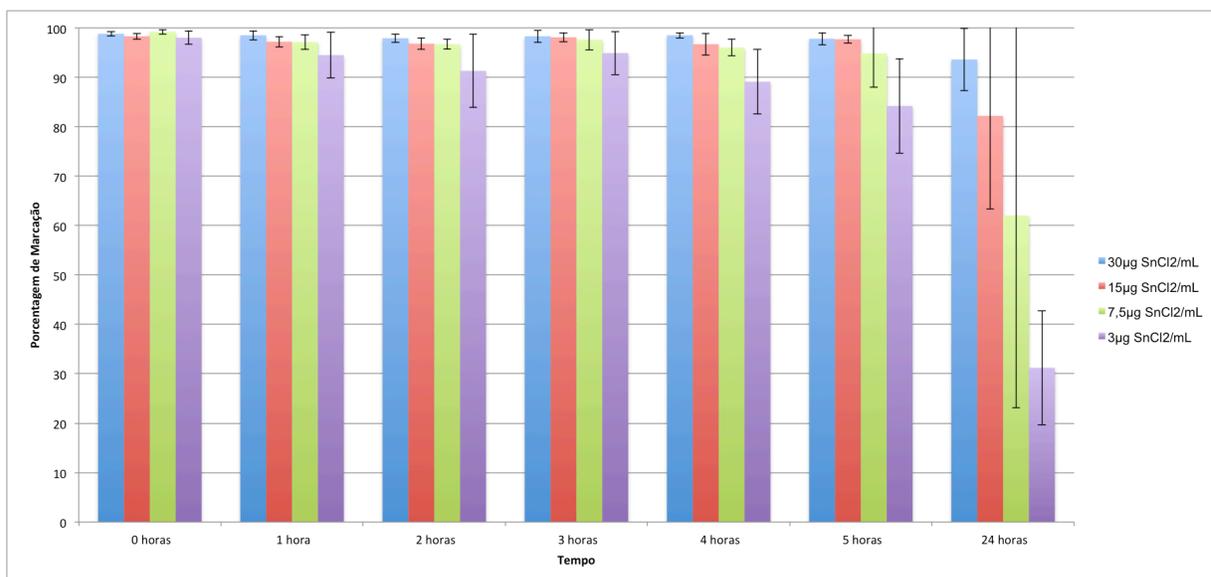
O presente trabalho tem como objetivo o uso do radiofármaco  $^{153}\text{Sm}$ -EDTMP na fabricação das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP para uso no tratamento da SIMO. No entanto, esse radionuclídeo, por ser emissor de partícula  $\beta$ , é mais lesivo, sendo mais difícil seu manuseio. Assim, para um estudo inicial, o uso do  $^{99m}\text{Tc}$  apresenta algumas vantagens, tais como: fácil obtenção através de geradores molibdênio-99/tecnécio-99m ( $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ); diversos protocolos de marcação estabelecidos na literatura; permite a marcação das nanopartículas após essas estarem prontas, ou seja, o trabalho com o material radioativo se dá apenas na análise da biodistribuição e não na produção das nanopartículas; tempo de meia-vida menor (6h), o que facilita o descarte do material radioativo; entre outras. Assim, esse composto é comumente usado na clínica ligado à diferentes vetores biológicos, com o intuito de diagnosticar diversas patologias: óssea, renal, cardíaca, gástrica, entre outras (Saha, 2010; Santos-Oliveira, 2010).

O  $^{99m}\text{Tc}$  obtido no gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  está na forma de sal de pertecnetato de sódio ( $^{99m}\text{Tc}-\text{NaTcO}_4$ ), no qual o tecnécio possui número de oxidação (Nox) igual a +7, não sendo uma espécie reativa. Assim, para a complexação com outros compostos, se faz necessária a redução deste metal para um estado de oxidação menor. Inúmeros agentes redutores podem ser usados no processo de marcação, dentre eles, o mais

comumente utilizado é o cloreto estanoso ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Esse reduz o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  de Nox +7 para +5 e +4, em solução com pH igual a 7, havendo uma mistura das duas espécies. A desvantagem no uso desse agente redutor é que o íon  $\text{Sn}^{+2}$  pode sofrer hidrólise em soluções aquosas com pH variando entre 6 a 7, formando estruturas coloidais insolúveis que se ligam ao  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , diminuindo eficiência de marcação da amostra. Dessa forma, a quantidade de  $\text{Sn}^{+2}$  necessária deve ser pequena, uma vez que o eluato obtido no gerador está em uma concentração muito baixa de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (aproximadamente um milimolar). No entanto, deve ser suficiente para garantir a completa redução do íon pertecnetato ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) (Saha, 2010).

Além disso, a quantidade de amostra deve ser suficiente para se ligar a pelo menos 90% do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  e  $\text{Sn}^{+2}$  reduzidos. Essa ligação é diretamente dependente da afinidade com a amostra, ou seja, a existência de grupamentos OH, COOH,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{SO}_2$  e outras na estrutura do composto a ser marcado (Saha, 2010).

Assim, como um dos objetivos deste trabalho, desenvolvemos um protocolo de marcação das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP. Para isso, foi preciso determinar a quantidade de agente redutor,  $\text{SnCl}_2$ , necessária para que a marcação fosse estável, ou seja, mantivesse acima de 90% de eficiência de marcação, por até 24 horas. Essa faixa de tempo foi escolhida com o intuito de, no momento que fossem feitas as análises *in vivo*, pudessem ser tomados qualquer intervalo dentro desta faixa. O resultado está expresso no gráfico 2.



**Gráfico 2:** Porcentagem de nanopartículas de EDTM/PLA/PVA marcadas com diferentes quantidades de agente redutor na solução ao longo do tempo. A barra azul corresponde à concentração de 30µg/mL de SnCl<sub>2</sub>, a vermelha de 15µg/mL, a verde de 7,5µg/mL e, por fim, a roxa de 3µg/mL.

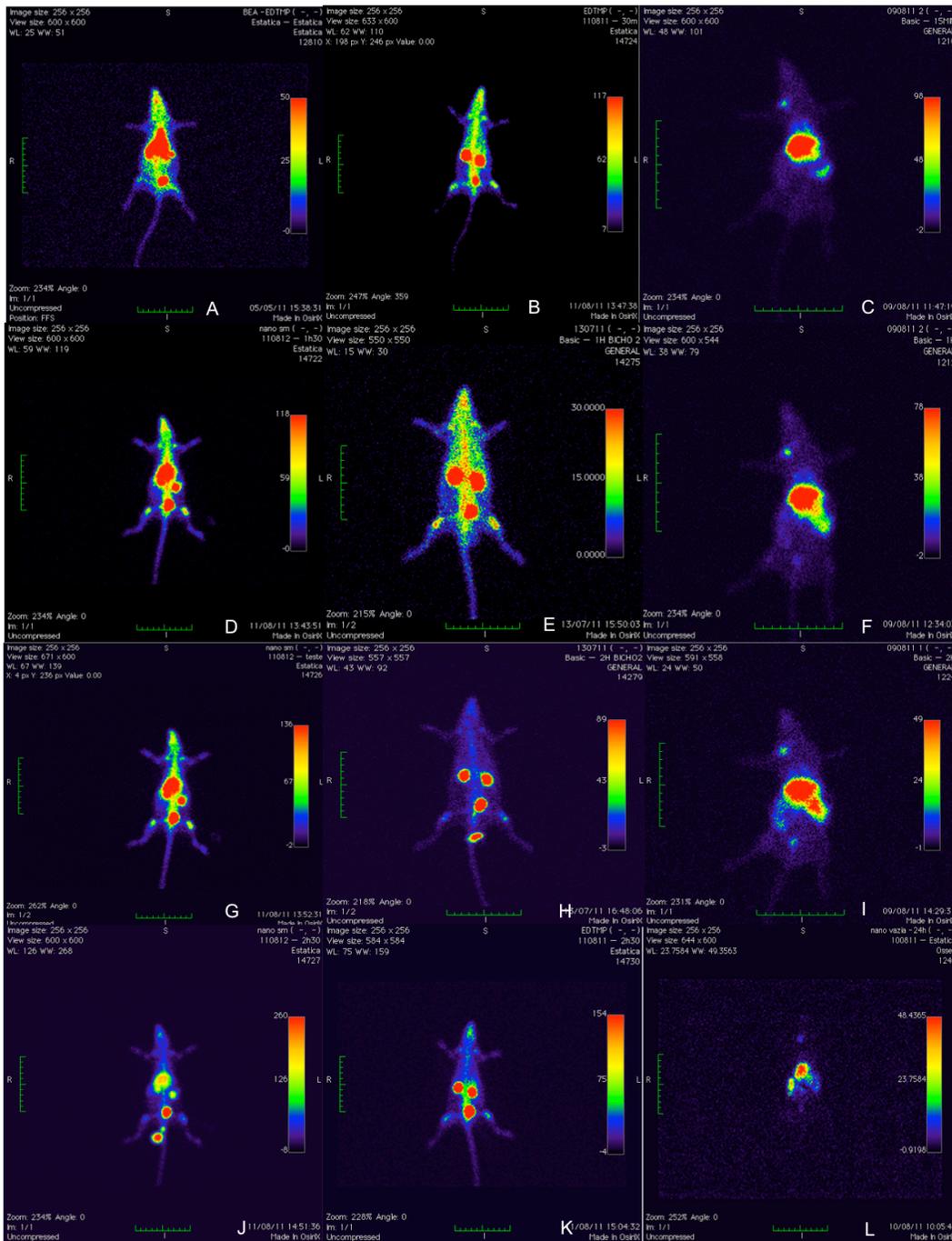
Analisando o gráfico 2 é possível identificar que a marcação das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP com <sup>99m</sup>Tc se manteve acima de 90%, por até 3h nas quatro concentrações de SnCl<sub>2</sub> testados. No entanto, a partir desse tempo as marcações utilizando 3µg/mL de cloreto estanofo foram diminuindo até atingir aproximadamente 30% em 24h. No uso de 7,5µg/mL e 15µg/mL, a porcentagem de nanopartículas marcadas diminuíram de 5h para 24h, atingindo aproximadamente 60% e 80%, respectivamente. Por fim, a marcação das nanopartículas poliméricas utilizando 30µg/mL e 100µCi de <sup>99m</sup>Tc permaneceu acima de 90% por até 24h. Assim, foi desenvolvido um protocolo de marcação das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP estável por até 24hs por meio do uso de cloreto estanofo na concentração de 30µg/mL.

Uma vez definido o protocolo de marcação das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP, essas foram marcadas com uma maior atividade de 2mCi <sup>99m</sup>Tc de

modo a permitir a realização das imagens dos animais fossem feitas na câmera gama ao longo do tempo. A mesma marcação foi feita no: i) EDTMP não encapsulado e ii) nas nanopartículas de PLA/PVA. Assim, tinha-se um controle positivo e negativo respectivamente. Após a marcação, esses compostos foram injetados por via intravenosa através da veia jugular. Em seguida foram feitas as imagens dos animais nos tempos de 30min, 1h, 2h e 2h30min (figura 28). Os animais foram sacrificados em diferentes tempos e, após a dissecação e respectiva contagem da atividade dos seus órgãos, foram gerados gráficos de biodistribuição dos compostos marcados ao longo do tempo para os diferentes órgãos (gráficos: 3, 4, 5).

Nas imagens A, D, G e J da figura 28 é possível analisar a biodistribuição das nanopartículas PLA/PVA/EDTMP em 30min, 1h, 2h e 2h30min, respectivamente. Nessas imagens foi possível observar que há uma grande captação das partículas pelo fígado já em 30 min, permanecendo alta por até 2h30min após a injeção. Esse fato também pode ser visto no gráfico 3 onde a %ID no fígado é igual a 44,4%, sugerindo que essas nanopartículas sofram algum efeito de primeira passagem nesse órgão, antes de ser efetivamente utilizado.

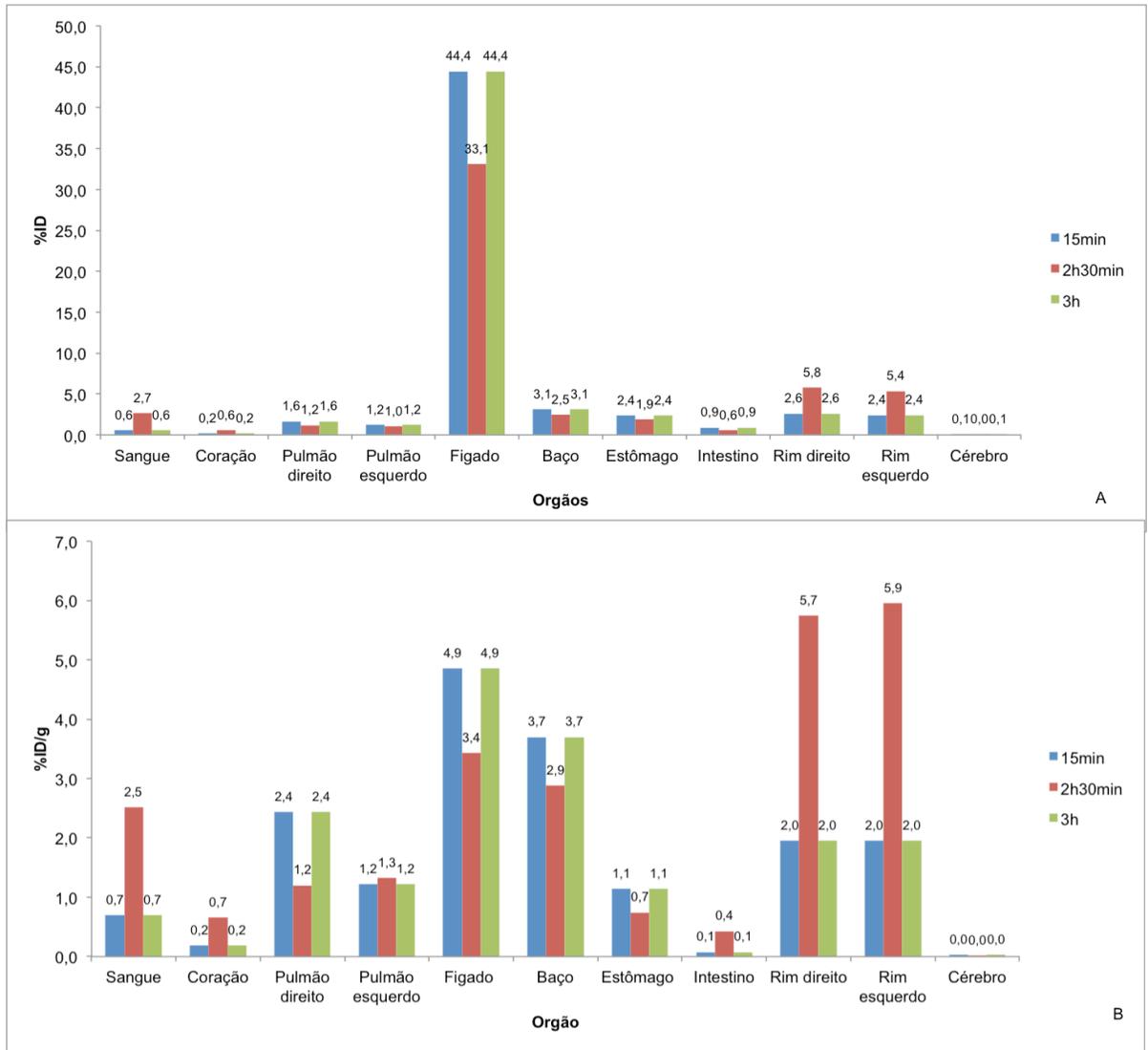
Por outro lado, essa captação varia entre 30 a 45% ao longo do tempo no fígado quando injetadas nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP. A captação pelo baço também é alta, com %ID/g variando entre 3 e 4% em um período de 3h. Esse fato também se repete nas nanopartículas de PLA/PVA, nas quais é possível observar uma captação no fígado em todas as imagens (figura 28. C, F, I, L). No gráfico 4, observa-se que o %ID no fígado é 65,6% e a %ID/g do baço é igual a 3,8% em 2h, ou seja, semelhante a nanopartícula de PLA/PVA/EDTMP em 2h30min.



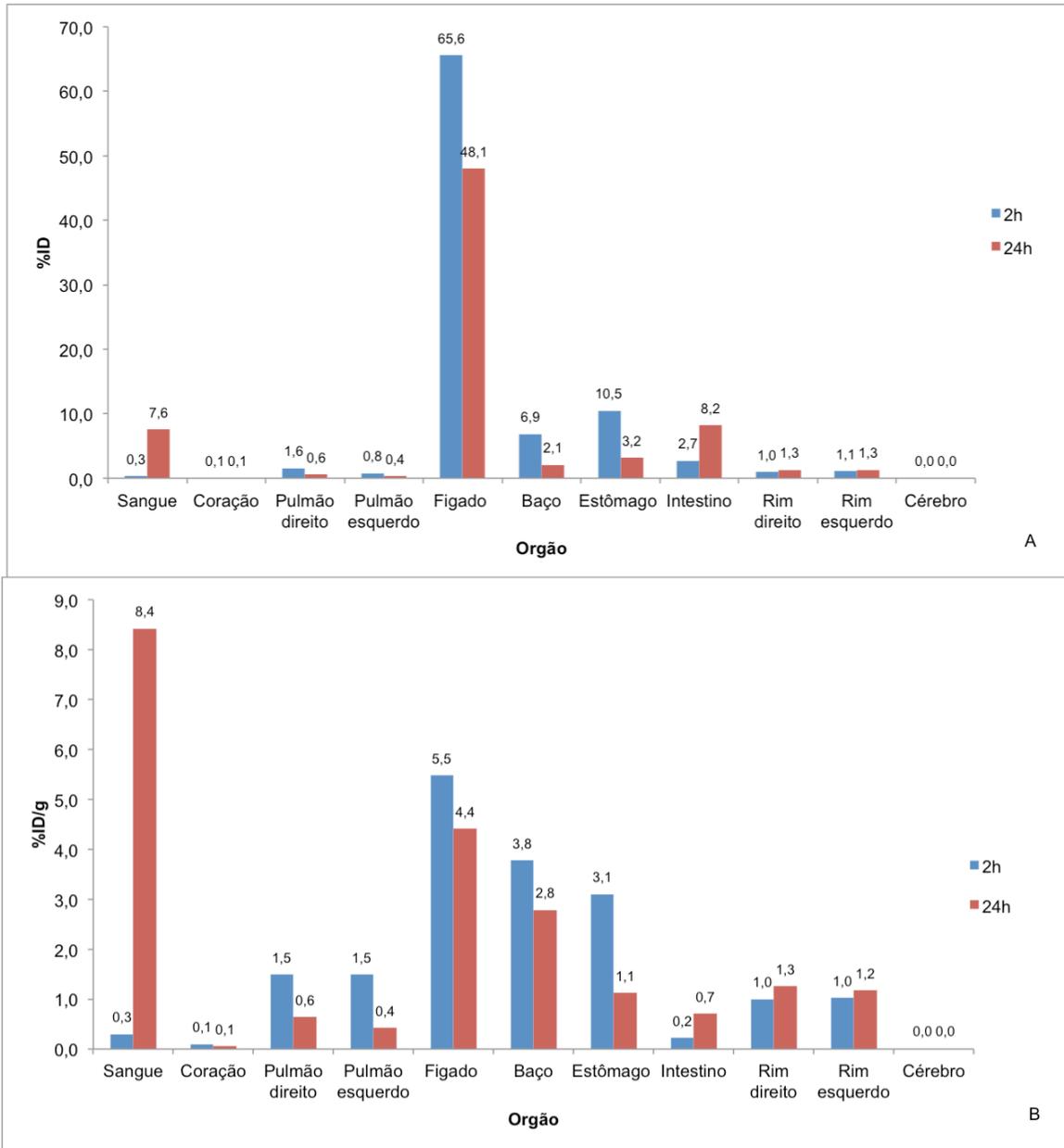
**Figura 28:** Imagem estática dos ratos após injeção dos compostos ao longo do tempo. As imagens A, D, G e J correspondem a nanopartículas de EDTMP/PLA/PVA- $^{99m}\text{Tc}$  30min, 1h, 2h 2h30min pós-injeção. As imagens B, E, H, K correspondem a biodistribuição do EDTMP- $^{99m}\text{Tc}$  não encapsulado nos tempos: 30min, 1h, 2h, 2h30min após a injeção. As imagens C, F, I, L correspondem a biodistribuição das nanopartículas de PLA/PVA ao longo dos tempos: 30min, 1h, 2h e 2h30min.

Segundo Davis *et al.* (2008) e Ganett & Kallinteri (2006), nanopartículas hidrofóbicas são rapidamente recobertas por proteínas do soro, o que facilita seu reconhecimento por macrófagos e neutrófilos, que estão em alta concentração em órgãos como baço e fígado. Esta seria uma das possíveis explicações para a alta concentração das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP no fígado e baço. Outro fator que contribui para a maior concentração das nanopartículas no fígado e baço está no fato do endotélio, nesses órgãos, ser fenestrado permitindo que compostos maiores que 100nm passem livremente por entre as células endoteliais (Garnett & Kallinteri, 2006).

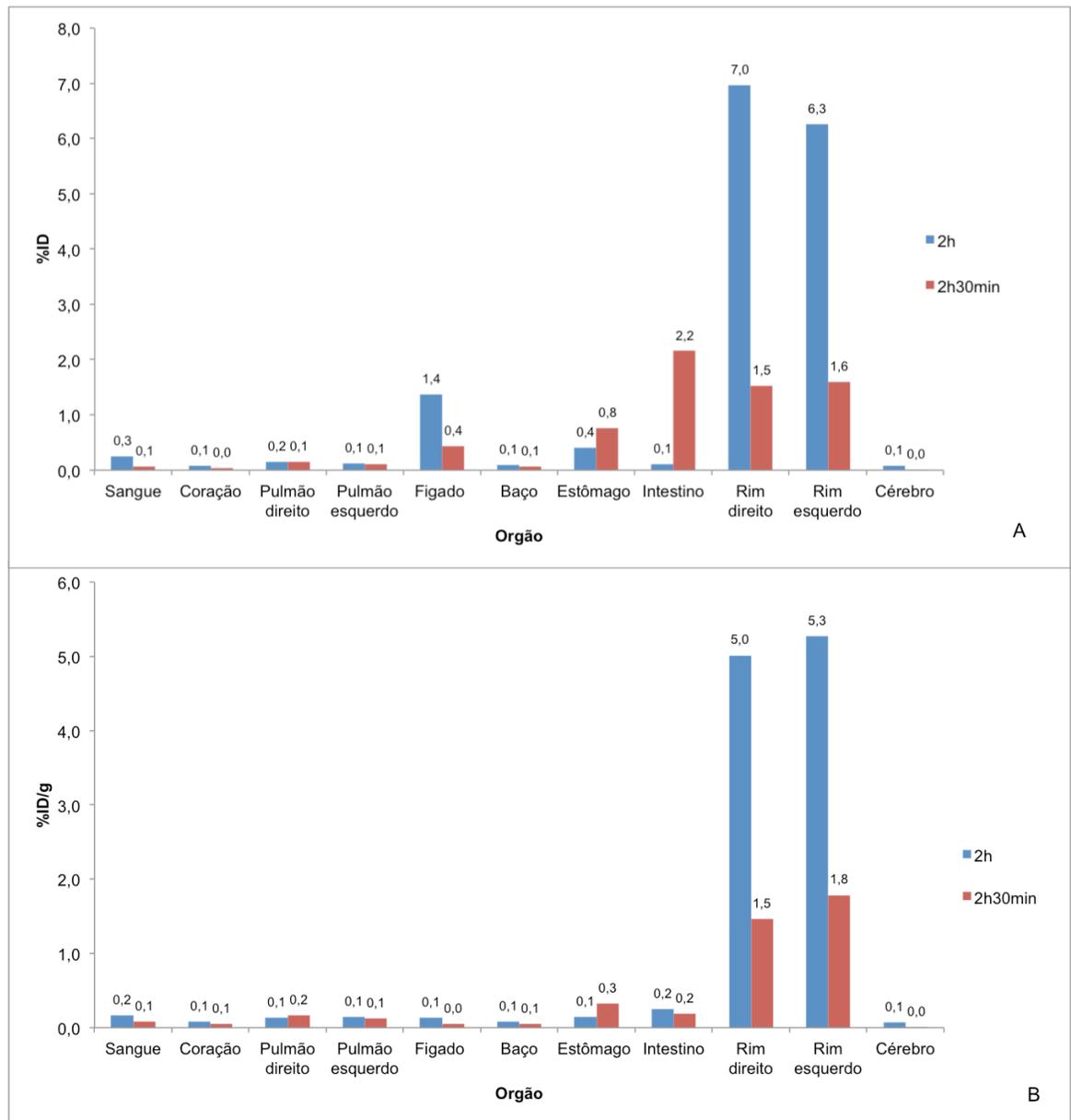
Ainda analisando as imagens A, D, G e J da figura 28, é possível observar uma captação das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP, em todas elas, no rim e bexiga, condizente com excreção renal. A contagem nos rins apontou uma captação de 2% dose/grama de tecido em 15min e 3h. Já em 2h30min, a captação foi de 5,7% dose/grama de tecido e 5,8% dose/órgão em 2h30min. Esse padrão de captação nos rins e na bexiga se repete nas imagens do EDTMP não encapsulado marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  (figura 28. B, E, H e K). A %ID/órgão e %ID/g foram de 7% e 5%, respectivamente, em 2h após a injeção e 1,5% para ambas em 2h30min pós-injeção (gráficos 5). Assim, sugere-se que a excreção renal se dá em 2h para o EDTMP não encapsulado e em 2h30min para o EDTMP encapsulado (gráficos 3 e 5).



**Gráfico 3:** Biodistribuição das nanopartículas de EDTMP/PVA/PLA em 15min, 2h30min e 3h após retirada dos órgãos e contagem em um contador gama, A. %ID/órgão; B. %ID/g por órgão.



**Gráfico 4:** Biodistribuição das nanopartículas de PVA/PLA em 2h e 24h após retirada dos órgãos e contagem em um contador gama, A. %ID/órgão; B. %ID/g por órgão.



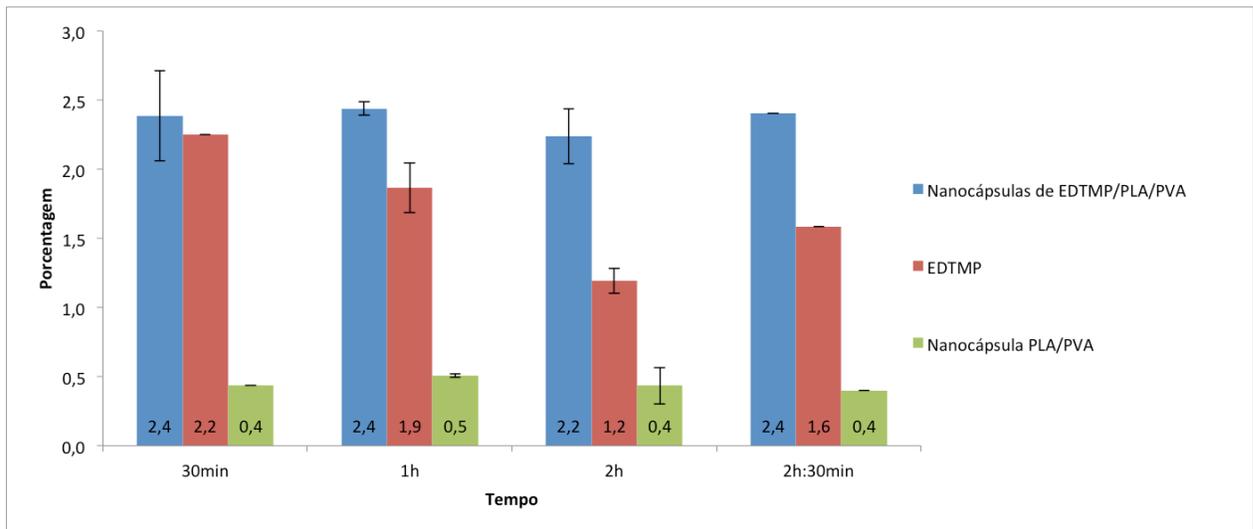
**Gráfico 5:** Biodistribuição do EDTMP não encapsulado em 2h e 2h30min após retirada dos órgãos e contagem em um contador gama, A. %ID/órgão; B. %ID/g.

As nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP apresentaram uma permanência no sangue em 2h30min pós-injeção: 2,5% da dose injetada por grama de tecido. Essa permanência no pool sanguíneo corrobora a afirmação de Davis et al. (2008) e Garnett

& Kallinteri (2006) e sugere uma forte interação com a proteínas plasmáticas, em particular a albumina.

As nanopartículas poliméricas com EDTMP apresentaram captação pulmonar %ID/g variando de 1,5 a 2,5% (gráficos 4). A captação cerebral não foi significativa para nenhum dos três compostos testados, o que era esperado, uma vez que nenhum deles tinha algum biodirecionamento para esse órgão.

Por último, foi feito um estudo para avaliar o biodirecionamento das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP para o osso. Seguindo o procedimento descrito no item 3.8, no qual, avaliou-se a captação no fêmur e comparou essa captação para os três compostos. O resultado está expresso no gráfico 6.



**Gráfico 6:** Gráfico comparativo da captação no fêmur das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP (azul), EDTMP não encapsulado (vermelha) e nanopartículas de PLA/PVA (verde) ao longo do tempo.

Observando o gráfico 6 é possível concluir que a captação das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP e do EDTMP não encapsulados são praticamente iguais em 30min.

No entanto, no caso das nanopartículas poliméricas de EDTMP, essa captação se mantém constante por até 2h30min após a injeção, provavelmente devido à liberação controlada desse fármaco no local de atuação assim como sua ligação mais acentuada a proteínas plasmáticas.

No tocante ao EDTMP, esse apresentou uma queda na captação por esse tecido ao longo do tempo. Esse fato é importante, pois, visando o uso no tratamento, as nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP apresentam uma permanência prolongada no tecido de interesse. As nanopartículas de PLA/PVA apresentaram uma captação óssea insignificante, como era o esperado.

Em resumo temos que as nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP possivelmente sofrem excreção renal. A captação dessas nanopartículas é alta no fígado e baço, provavelmente, devido à sua hidrofobicidade estrutural e a grande variação de tamanho. As nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP apresentaram uma captação óssea, inicialmente, igual ao EDTMP não encapsulado. No entanto, em um tempo prolongado sua permanência foi superior sustentando seu uso como *drug delivery system*.

## 4. Conclusões:

As nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP foram obtidas com sucesso pelo método de dupla emulsificação. A metodologia de caracterização por AFM mostrou-se eficiente e deve ter seu uso estendido para outros sistemas poliméricos. As nanopartículas apresentaram forma esférica, com dispersão de tamanho entre 100~500nm e superfície heterogênea.

As nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP se mostraram resistentes a uma irradiação de até 7kGy de raios  $\gamma$ . Através das imagens de fase 1 e fase 2 foi possível identificar as variações ocorridas nas nanopartículas poliméricas irradiadas com doses acima desta. Assim, desenvolvemos nesse trabalho um novo protocolo de avaliação de sistemas poliméricos irradiados.

A marcação pelo método direto com  $^{99m}\text{Tc}$  foi eficiente e a biodistribuição das nanopartículas feitas em animais sadios, mostrou um direcionamento dessas para o tecido ósseo, permanecendo nesse por mais tempo que o EDTMP não encapsulado. Este resultado nos leva à conclusão que a encapsulação do EDTMP constitui uma potencial vantagem às aplicações clínicas e, portanto, este estudo merece ser ampliado.

## 5. Perspectivas:

As perspectivas desse trabalho são primeiramente a determinação da eficiência de encapsulação das nanopartículas poliméricas de PLA/PVA/EDTMP. Tal ponto é importante tanto na seleção do melhor método de produção das nanopartículas quanto para quantificar a porcentagem de EDTMP que será injetado no paciente. Em seguida serão realizadas novas modificações no preparo das nanopartículas poliméricas a fim de buscar uma melhor uniformidade de tamanho das mesmas. Os parâmetros que podem ser, principalmente, alterados são: concentração e tipo do tensoativo, volume das soluções e potência e tempo da ultrassonicação.

Após as modificações nos parâmetros de produção das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP serão realizadas imagens tanto da suspensão das nanopartículas quanto do sobrenadante. Esses também serão analisados quanto ao fato de serem cápsulas ou esferas maciças, através do método desenvolvido nessa dissertação e por MET. Além disso, serão avaliadas a resistência das nanopartículas em diferentes pHs, visto que, na região da metástase óssea, o pH pode ser igual a 4,5.

Também pode ser feito a imagem das nanopartículas PLA/PVA/EDTMP em suspensão. Tal fato seria importante, uma vez que a secagem por ar pode acarretar em uma grande tensão superficial sobre a partícula e, com isso, causar uma deformação na mesma. Um modo de fazê-lo é por AFM em líquido. Outra forma de evitar tal problema é através da prévia liofilização das nanopartículas, transformando, assim, a solução em pó e analisando o mesmo.

Ainda como perspectiva temos a avaliação citotóxica das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP frente a um número maior de células. Outra seria a ampliação do estudo de biodistribuição das nanopartículas de PLA/PVA/EDTMP em animais saudáveis, por um período mais longo de avaliação. Nesses animais serão feitas análises histopatológicas e bioquímicas para análise dosimétrica detalhada dos órgãos, em especial da medula óssea, possibilitando observar se a mesma está sofrendo alteração.

Em seguida, nanopartículas poliméricas de  $^{153}\text{Sm}$ -EDTMP serão produzidas com o intuito da avaliação das mesmas frente a animais com metástase óssea. Por fim, serão pesquisadas possíveis modificações na superfície ds nanopartículas poliméricas a fim de aumentar o direcionamento das mesmas para o tumor.

## 6.Referência:

ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos.** Gerência de avaliação de segurança e eficácia - GESEF. SANITÁRIA, A. N. D. V. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária: 1-37 p. 2010.

BACZYK, M.; CZEPCZYŃSKI, R.; MILECKI, P.; PISAREK, M.; OLEKSA, R.; SOWIŃSKI, J.  **$^{89}\text{Sr}$  versus  $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ : comparison of treatment efficacy of painful bone metastases in prostate and breast carcinoma.** Nuclear medicine communications, v. 28, n. (4), p. 245-250, May 2007.

BHIRDE, A.; XIE, J.; SWIERCZEWSKA, M.; CHEN, X. **Nanoparticles for cell labeling.** Nanoscale, v. 3, n. (1), p. 142-153, Feb 2011.

BRENNER, W.; KAMPEN, W. U.; KAMPEN, A. M.; HENZE, E. **Skeletal uptake and soft-tissue retention of  $^{186}\text{Re-HEDP}$  and  $^{153}\text{Sm-EDTMP}$  in patients with metastatic bone disease.** Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine, v. 42, n. (2), p. 230-236, Mar 2001.

CHANDRAN, S.; SAGGAR, S.; PRIYA, K. P.; SAHA, R. N. **New Ultraviolet spectrophotometric method for the estimation of nimesulide.** Drug development and industrial pharmacy, v. 26, n. (2), p. 229-234, Mar 2000.

CHO, K.; WANG, X.; NIE, S.; CHEN, Z.; SHIN, D. M. **Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer**. *Clinical Cancer Research*, v. 14, n. (5), p. 1310-1316, Apr 01 2008.

COLEMAN, R. E. **Management of bone metastases**. *The Oncologist*, v. 5, n. (6), p. 463-470, 2000.

DAILEY, L. A.; KLEEMANN, E.; WITTMAR, M.; GESSLER, T.; SCHMEHL, T.; ROBERTS, C.; SEEGER, W.; KISSEL, T. **Surfactant-free, biodegradable nanoparticles for aerosol therapy based on the branched polyesters, DEAPA-PVAL-g-PLGA**. *Pharmaceutical Research*, v. 20, n. (12), p. 2011-2020, Dec 2003.

DAVIS, M. E.; CHEN, Z. G.; SHIN, D. M. **Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer**. *Nat Rev Drug Discov*, v. 7, n. (9), p. 771-782, Sep 2008.

DUNCAN, R. **Polymer conjugates as anticancer nanomedicines**. *Nature Reviews Cancer*, v. 6, n. (9), p. 688-701, Sep 10 2006.

EARY, J. F.; COLLINS, C.; STABIN, M.; VERNON, C.; PETERSDORF, S.; BAKER, M.; HARTNETT, S.; FERENCY, S.; ADDISON, S. J.; APPELBAUM, F. **Samarium-153-EDTMP biodistribution and dosimetry estimation**. *Journal of nuclear medicine* : official publication, Society of Nuclear Medicine, v. 34, n. (7), p. 1031-1036, Jul 1993.

EVEN-SAPIR, E.; METSER, U.; MISHANI, E.; LIEVSHITZ, G.; LERMAN, H.; LEIBOVITCH, I. **The detection of bone metastases in patients with high-risk prostate cancer: 99mTc-MDP Planar bone scintigraphy, single- and multi-field-of-view SPECT, 18F-fluoride PET, and 18F-fluoride PET/CT.** Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine, v. 47, n. (2), p. 287-297, Mar 2006.

FINLAY, L. G.; MASON, M. D.; SHELLEY, M. **Radioisotopes for the palliation of metastatic bone cancer: a systematic review.** The lancet oncology, 2005.

FORMARIZ, T. P.; WANCZINSKI, B. J.; SILVA JÚNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; OLIVEIRA, A. G. **Biotechnology de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer.** Infarma, v. 16, n. (1-2), p. 44-57, May 07 2004.

GARNETT, M. C.; KALLINTERI, P. **Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles.** Occupational medicine (Oxford, England), v. 56, n. (5), p. 307-311, Aug 2006.

GUYTON, A. C. **Textbook of Medical Physiology.** 6th. Rio de Janeiro: Interamericana, 1984. 1240

HAN, Y. J.; LOO, S. C. J.; PHUNG, N. T.; ONG, H. T.; RUSSELL, S. J.; PENG, K.-W.; BOEY, F.; MA, J. **Controlled size and morphology of EDTMP-doped hydroxyapatite**

**nanoparticles as model for <sup>153</sup>Samarium-EDTMP doping.** Journal of materials science. Materials in medicine, v. 19, n. (9), p. 2993-3003, Sep 2008.

INCA. **Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil.** ESTRATÉGICAS, C. G. D. A. e EDUCAÇÃO, C. D. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde e Instituto Nacional de Câncer José Alencar da Silva (INCA): 118 p. 2011.

JEONG, Y.-I.; NA, H.-S.; SEO, D.-H.; KIM, D.-G.; LEE, H.-C.; JANG, M.-K.; NA, S.-K.; ROH, S.-H.; KIM, S.-I.; NAH, J.-W. **Ciprofloxacin-encapsulated poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity.** International journal of pharmaceutics, v. 352, n. (1-2), p. 317-323, Apr 20 2008.

KANZAKI, R.; HIGASHIYAMA, M.; MAEDA, J.; OKAMI, J.; HOSOKI, T.; HASEGAWA, Y.; TAKAMI, M.; KODAMA, K. **Clinical value of F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography in patients with non-small cell lung cancer after potentially curative surgery: experience with 241 patients.** Interactive cardiovascular and thoracic surgery, v. 10, n. (6), p. 1009-1014, Jul 2010.

KHOEE, S.; YAGHOUBIAN, M. **An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion.** European journal of medicinal chemistry, v. 44, n. (6), p. 2392-2399, Jul 2009.

KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. **Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review.** *Nanomedicine Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 1, n. (3), p. 193-212, Sep 2005.

LU, Z.; BEI, J.; WANG, S. **A method for the preparation of polymeric nanocapsules without stabilizer.** *Journal of Controlled Release*, v. 61, n. (1-2), p. 107-112, Aug 27 1999.

MA, J.; FENG, P.; YE, C.; WANG, Y.; FANG, Y. **An improved interfacial coacervation technique to fabricate biodegradable nanocapsules of an aqueous peptide solution from polylactide and its block copolymers.** *Colloid and Polymer Science*, v. 279, p. 387-392, May 07 2001.

MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M.; GREMIÃO, M. P. D. **Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles.** *International journal of pharmaceutics*, v. 395, n. (1-2), p. 266-271, Aug 16 2010.

MARTINEZ, N. F.; PATIL, S.; LOZANO, J. R.; GARCIA, R. **Enhanced compositional sensitivity in atomic force microscopy by the excitation of the first two flexural modes.** *Applied Physics Letters*, v. 89, n. (15), p. 115-153, May 07 2006.

MELO, F. H. M.; JUNQUEIRA, M. S.; CHAMMAS, R. Mecanismos de invasão e metástases. In: (Ed.). 2ed. São Parulo: Tedmedd Editora, 2003. p.201-226.

MEOHAS, W.; PROBSTNER, D.; VASCONCELLOS, R. A. T.; LOPES, A. C. D. S.; REZENDE, J. F. N.; FIOD, N. J. **Metástase óssea: revisão da literatura**. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 51, n. (1), p. 43-47, 2005.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. **Polymer-based nanocapsules for drug delivery**. International journal of pharmaceutics, v. 385, n. (1-2), p. 113-142, Feb 29 2010.

MORALES, M. M. **Terapias avançadas: célula-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

MORRIS, V. J.; KIRBY, A. R.; GUNNING, A. P. **Atomic force microscopy for biologists**. 2ªed. Londres: Imperial College Pr, 2009. 406

MOSCONI, L.; RINNE, J. O.; TSUI, W. H.; BERTI, V.; LI, Y.; WANG, H.; MURRAY, J.; SCHEININ, N.; NAGREN, K.; WILLIAMS, S.; GLODZIK, L.; DE SANTI, S.; VALLABHAJOSULA, S.; DE LEON, M. J. **Increased fibrillar amyloid- burden in normal individuals with a family history of late-onset Alzheimer's**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 107, n. (13), p. 5949-5954, Apr 30 2010.

MOUGHTON, A. O.; REILLY, R. K. **Noncovalently connected micelles, nanoparticles, and metal-functionalized nanocages using supramolecular self-**

**assembly.** Journal of the American Chemical Society, v. 130, n. (27), p. 8714-8725, Jul 09 2008.

NASSAR, T.; ROM, A.; NYSKA, A.; BENITA, S. **Novel double coated nanocapsules for intestinal delivery and enhanced oral bioavailability of tacrolimus, a P-gp substrate drug.** Journal of Controlled Release, v. 133, n. (1), p. 77-84, Feb 05 2009.

OLIVA, M.; DÍEZ-PÉREZ, I.; GOROSTIZA, P.; LASTRA, C. F.; OLIVA, I.; CARAMELLA, C.; MARIÑO, E. L. **Self-assembly of drug-polymer complexes: a spontaneous nanoencapsulation process monitored by atomic force microscopy.** Journal of pharmaceutical sciences, v. 92, n. (1), p. 77-83, Feb 2003.

PAES, F. M.; SERAFINI, A. N. **Systemic metabolic radiopharmaceutical therapy in the treatment of metastatic bone pain.** Seminars in nuclear medicine, v. 40, n. (2), p. 89-104, Apr 2010.

PAES, F. M.; ERNANI, V.; HOSEIN, P.; SERAFINI, A. N. **Radiopharmaceuticals: when and how to use them to treat metastatic bone pain.** The journal of supportive oncology, v. 9, n. (6), p. 197-205, 2011.

PALMEDO, H.; GUHLKE, S.; BENDER, H.; SARTOR, J.; SCHOENEICH, G.; RISSE, J.; GRÜNWARD, F.; KNAPP, F. F.; BIERSACK, H. J. **Dose escalation study with rhenium-188 hydroxyethylidene diphosphonate in prostate cancer patients with**

**osseous metastases.** European journal of nuclear medicine, v. 27, n. (2), p. 123-130, Mar 2000.

PALMEDO, H.; MANKA-WALUCH, A.; ALBERS, P.; SCHMIDT-WOLF, I. G. H.; REINHARDT, M.; EZZIDDIN, S.; JOE, A.; ROEDEL, R.; FIMMERS, R.; KNAPP, F. F.; GUHLKE, S.; BIRSACK, H.-J. **Repeated bone-targeted therapy for hormone-refractory prostate carcinoma: tandomized phase II trial with the new, high-energy radiopharmaceutical rhenium-188 hydroxyethylidenediphosphonate.** Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, v. 21, n. (15), p. 2869-2875, Aug 01 2003.

PANDIT-TASKAR, N.; BATRAKI, M.; DIVGI, C. R. **Radiopharmaceutical therapy for palliation of bone pain from osseous metastases.** Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine, v. 45, n. (8), p. 1358-1365, Aug 2004.

PASSERI, L. A.; BÉRTOLO, M. B.; ABUABARA, A. **Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws.** Revista brasileira de reumatologia, v. 51, n. (4), p. 401-403, 407, Aug 01 2011.

PATRICIO, B. F. D. C.; LIMA-RIBEIRO, M. H. M.; CORREIA, M. T. D. S.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. D. A.; ALBERNAZ, M. D. S.; BARBOZA, T.; DE SOUZA, S. A. L.; SANTOS-OLIVEIRA, R. **Radiolabeling of cramoll 1,4: evaluation of the biodistribution.** International journal of peptides, v. 2011, 2011.

PEREIRA, M. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; RAMALDES, G. A.; CARDOSO, V. N. **PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with <sup>99m</sup>Techneium-HMPAO: release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy.** European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences, v. 33, n. (1), p. 42-51, 2008.

PEREZ, C.; SÁNCHEZ, A.; PUTNAM, D.; TING, D.; LANGER, R.; ALONSO, M. J. **Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA.** Journal of Controlled Release, v. 75, n. (1-2), p. 211-224, Jul 10 2001.

PETERSON, L. R.; GROPLER, R. J. **Radionuclide imaging of myocardial metabolism.** Circulation. Cardiovascular imaging, v. 3, n. (2), p. 211-222, Apr 2010.

POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; VENTURINI, C. D. G.; CRUZ, L.; BERNARDI, A.; JÄGER, E.; BATTASTINI, A. M. O.; DA SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. **Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A relation between light scattering and drug content.** International journal of pharmaceutics, v. 359, n. (1-2), p. 288-293, Jul 2008.

PREGO, C.; FABRE, M.; TORRES, D.; ALONSO, M. J. **Efficacy and Mechanism of Action of Chitosan Nanocapsules for Oral Peptide Delivery.** Pharmaceutical Research, v. 23, n. (3), p. 549-556, Apr 16 2006.

PREINER, J.; TANG, J.; PASTUSHENKO, V.; HINTERDORFER, P. **Higher harmonic atomic force microscopy: imaging of biological membranes in liquid.** Phys Rev Lett, v. 99, n. (4), p. 046102, Jul 27 2007.

PYSZ, M. A.; GAMBHIR, S. S.; WILLMANN, J. K. **Molecular imaging: current status and emerging strategies.** Clin Radiol, v. 65, n. (7), p. 500-516, Jul 2010.

ROCA, M.; VRIES, E. F. J.; JAMAR, F.; ISRAEL, O.; SIGNORE, A. **Guidelines for the labelling of leucocytes with  $^{111}\text{In}$ -oxine.** European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, v. 37, n. (4), p. 835-841, Apr 03 2010.

ROE, G.; MCDONNELL, L.; GHANEM, A. **A method for measuring the size distribution of latex particles by scanning force microscopy.** Ultramicroscopy, v. 100, n. (3-4), p. 319-329, Aug 2004.

ROODMAN, G. D. **Mechanisms of bone metastasis.** Discovery medicine, v. 4, n. (22), p. 144-148, Jul 01 2004.

SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy.** 6<sup>o</sup>ed. Nova Iorque: Springer Verlag, 2010. 409

SAHA, R. N.; SAJEEV, C.; JADHAV, P. R.; PATIL, S. P.; SRINIVASAN, N.

**Determination of celecoxib in pharmaceutical formulations using UV spectrophotometry and liquid chromatography.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 28, n. (3-4), p. 741-751, Jun 15 2002.

SANTOS- OLIVEIRA, R. **Radiofarmácia.** 1ªed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010. 161

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.

**Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.** Química Nova, v. 26, n. (5), p. 726-737, 2003.

SCIUTO, R.; TOFANI, A.; FESTA, A.; GIARNNARELLI, D.; PASQUALONI, R.; MAINI, C. L. **Short- and long-term effects of  $^{186}\text{Re}$ -1,1-hidroxyethylidene diphosphonate in treatment of painful bone metastases.** Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine, v. 41, p. 647-654, 2000.

SERAFINI, A. N. **Therapy of metastatic bone pain.** Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine, v. 42, n. (6), p. 895-906, Jul 2001.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. **Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 39, n. (1), p. 1-20, Mar 03 2003.

SITTERBERG, J.; OZCETIN, A.; EHRHARDT, C.; BAKOWSKY, U. **Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems.**

European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V, v. 74, n. (1), p. 2-13, Feb 2010.

SMITH, H. S. **Painful osseous metastases.** Pain physician, v. 14, n. (4), p. E373-403, Jul 2011.

SOUNDARARAJAN, A.; BAO, A.; PHILLIPS, W. T.; PEREZ III, R.; GOINS, B. A.

**[186Re]Liposomal doxorubicin (Doxil): in vitro stability, pharmacokinetics, imaging and biodistribution in a head and neck squamous cell carcinoma xenograft model.** Nuclear Medicine and Biology, v. 36, n. (5), p. 515-524, Jul 01 2009.

STARK, M.; STARK, R.; HECKL, W.; GUCKENBERGER, R. **Inverting dynamic force microscopy: From signals to time-resolved interaction forces.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 99, n. (13), p. 8473-8478, 2002.

STELLA, B.; ARPICCO, S.; ROCCO, F.; MARSAUD, V.; RENOIR, J.-M.; CATTEL, L.; COUVREUR, P. **Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules.** International journal of pharmaceutics, v. 344, n. (1-2), p. 71-77, Nov 01 2007.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia Humana**. 2<sup>o</sup>ed. São Paulo: Manole, 2001. 1-417

TAUHATA, L.; SALATI, I. P. A.; PRINZIO, R. D.; PRINZIO, A. R. D. **Radioproteção e dosimetria: fundamentos**. Rio de Janeiro: Comissão de Energia Nuclear/ Instituto de Radioproteção e Dosimetria, 2011. 135

TING, G.; CHANG, C.-H.; WANG, H.-E.; LEE, T.-W. **Nanotargeted radionuclides for cancer nuclear imaging and internal radiotherapy**. Journal of biomedicine & biotechnology, v. 2010, p. -, 2010.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. **Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles**. Pharmaceutical Research, v. 26, n. (5), p. 1025-1058, Jun 01 2009.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; TOBÍO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. **Design of biodegradable particles for protein delivery**. Journal of Controlled Release, v. 78, n. (1-3), p. 15-24, Feb 17 2002.

ZAMBAUX, M. F.; BONNEAUX, F.; GREF, R.; MAINCENT, P.; DELLACHERIE, E.; ALONSO, M. J.; LABRUDE, P.; VIGNERON, C. **Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method**. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, v. 50, n. (1-3), p. 31-40, Feb 02 1998.

ZHUA, Y.; GAOYONG ZHANGA, B.; YANGA, H.; HONGA, X. **Influence of Surfactants on the Parameters of Polylactide Nanocapsules Containing Insulin.** JOURNAL OF SURFACTANTS AND DETERGENTS,, v. 8,, n. (4), p. 353-557, Oct 26 2005.