



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE MEDICAMENTOS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

VÂNIA EMERICH BUCCO DE CAMPOS

“ESTUDO DA POTENCIALIDADE DE ÁCIDOS AMINADOS ENCAPSULADOS
EM NANOPARTÍCULAS DE POLI- ϵ -CAPROLACTONA PARA USO NA
ELETROTHERAPIA DO CÂNCER”

Rio de Janeiro

2008

VÂNIA EMERICH BUCCO DE CAMPOS

**“ESTUDO DA POTENCIALIDADE DE ÁCIDOS AMINADOS ENCAPSULADOS
EM NANOPARTÍCULAS DE POLI- ϵ -CAPROLACTONA PARA USO NA
ELETROTERAPIA DO CÂNCER”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Carla Holandino Quaresma

Prof. Dr. Eduardo Ricci Júnior

Rio de Janeiro

2008

C198e

Campos, Vânia Emerich Bucco de.

Estudo da potencialidade de ácidos aminados encapsulados em nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona para uso na eletroterapia do câncer / Vânia Emerich Bucco de Campos - Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Farmácia, 2008.

125 p.: il.; 30 cm.

Orientadores: Carla Holandino Quaresma; Eduardo Ricci Júnior

Dissertação (mestrado) - UFRJ/Faculdade de Farmácia/Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2008.

Referências bibliográficas: p.110 - 119.

1. Neoplasias – terapêutica.
2. Terapia por estimulação elétrica.
3. Medicamentos – análise. I. Quaresma, Carla Holandino. II. Ricci Júnior, Eduardo. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD 616.994

VÂNIA EMERICH BUCCO DE CAMPOS

“ESTUDO DA POTENCIALIDADE DE ÁCIDOS AMINADOS ENCAPSULADOS EM NANOPARTÍCULAS DE POLI-ε-CAPROLACTONA PARA USO NA ELETROTHERAPIA DO CÂNCER.”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

Orientadores:

Prof^a Dr^a. Carla Holandino Quaresma
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof. Dr. Eduardo Ricci Júnior
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Telló
Pontifícia Universidade Católica – PUC/RS

Prof. Dr. Mauro Sola-Penna
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof. Dr. Márcio Lourenço Rodrigues
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ

Marcos Eduardo Machado Paschoal
Faculdade de Medicina – UFRJ

Carlos Rangel Rodrigues
Faculdade de Farmácia - UFRJ

*Ao Carlos, esposo amado e companheiro;
e ao meus pais, Volmar e Oneida,
exemplos pra toda vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, o criador de todas as coisas, por me dar as condições físicas, emocionais e espirituais para realização deste trabalho. A Ele toda honra e toda glória.

A prof.^a Dr.^a Carla Holandino, orientadora deste trabalho, a quem tenho grande admiração pela sua competência e seriedade, exemplo de educadora. Obrigada por possibilitar essa conquista e pela confiança, carinho e atenção que me foram dedicados.

Ao prof. Dr. Eduardo Ricci, orientador deste trabalho, por aceitar este desafio e contribuir grandemente para realização deste sonho. Sua dedicação, atenção e conhecimento fizeram a diferença e me ensinaram que um bom trabalho se faz com muita disciplina.

Ao meu querido esposo, pelo apoio e por ser companheiro, paciente, carinhoso e sempre preocupado com meu bem estar. Seu amor e incentivo me encorajaram a conquistar esse sonho.

Aos meus pais pelo cuidado e proteção desde o meu nascimento, por todo sacrifício que passaram para que me proporcionassem um ambiente familiar saudável, ensinando-me a andar nos caminhos de Deus. Obrigada pelo incentivo à minha formação acadêmica e profissional.

Aos meus irmãos: Eliel e família, Junior e família e Wesley pelos momentos alegres que passamos juntos durante suas visitas ao Rio e por todo apoio emocional, financeiro e espiritual.

A todos do Laboratório Multidisciplinar de Ciências Farmacêuticas, em especial a Gleyce Moreno pela sua paciência e prontidão em nos ajudar.

A doutoranda Luciana Spinelli e ao Laboratório de Macromoléculas e Colóides na Indústria de Petróleo – (LMCP / IMA), pelas análises no Zetasizer.

A todos os laboratórios e técnicos pelo apoio e suporte nos tempos necessários.

A todos os amigos que me apoiaram e incentivaram durante esse trabalho. Em especial a Fabiana Passamani, pela contribuição valiosa nas análises de modelagem molecular e a Elisa Portugal, pela assessoria no design dos trabalhos gráficos.

A família Orla Rio, pelo apoio emocional e espiritual que exerceram nesses anos no Rio de Janeiro.

A banca de acompanhamento, Prof.^a Dr.^a Mônica Freimam e Prof.^a Dr.^a Sheila Garcia, pelas contribuições carinhosamente cedidas durante todo o período da pesquisa.

A banca examinadora que gentilmente aceitou o convite de participar na defesa desta dissertação.

A todos funcionários e professores do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, pelo carinho e respeito.

A Capes, pela bolsa de mestrado.

“E sabemos que todas as coisas contribuem juntamente para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados por seu decreto.”

RESUMO

CAMPOS, Vânia Emerich Bucco. Estudo da potencialidade de ácidos aminados encapsulados em nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona para uso na eletroterapia do câncer. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Diversas pesquisas em todo mundo estão sendo realizadas com o objetivo de encontrar a cura para os diferentes tipos de câncer. Entre os tratamentos atuais para esta doença, destaca-se, a Eletroterapia Tumoral (ETT), que usa uma corrente elétrica contínua de baixa intensidade (CECBI) para induzir mudanças químicas capazes de causar a destruição de células tumorais. Um dos mecanismos responsáveis pela atividade antitumoral da ETT é a geração de espécies oxidantes, conhecidas como cloraminas, que são resultantes da reação entre espécies cloradas presentes no meio eletrolítico e ácidos aminados (AAs) existentes no meio celular. O uso de sistemas nanoparticulados para a liberação de fármacos permite um direcionamento seletivo do ativo dentro das células tumorais. Com o objetivo de otimizar os efeitos da ETT, nanopartículas (Np) de poli- ϵ -caprolactona (PCL) foram utilizadas para encapsulação de L-triptofano (L-trp) e L-tirosina (L-tir) e associados com CECBI. Este estudo iniciou com o desenvolvimento e a caracterização dos parâmetros físico-químicos dos novos sistemas nanoparticulados. Em seguida, a citotoxicidade destas Nps foi avaliada *in vitro* em melanoma murino da linhagem celular B16F10. As Nps foram preparadas pelo método da dupla emulsificação e evaporação do solvente, e as análises de microscopia eletrônica revelaram que as Nps tinham uma forma elíptica, com bordas regulares e superfície lisa, e apresentaram um diâmetro médio de $245 \pm 2,05$ nm. Após o processo de encapsulação esses parâmetros foram significativamente modificados para $259,90 \pm 1,22$ nm para L-trp-encapsulado ($p < 0,05$) e $269,00 \pm 4,90$ nm para L-tir-encapsulada ($p < 0,01$). As Np encapsuladas e não encapsuladas apresentaram cargas negativas e o tratamento com CECBI modificou significativamente o potencial zeta das Np encapsuladas com Trp, tornando a superfície das Np mais eletronegativas ($p < 0,05$). O rendimento do processo de encapsulação foi cerca de 50% e a proporção de L-tir e L-trp encapsulados foram de $30,0\mu\text{g}/\text{mg}$ e $115,6\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente. Os ensaios de liberação *in vitro* mostraram que após 3 horas 98 % dos AAs já haviam sido liberado. A viabilidade das células de melanoma murino foi medida pelo ensaio de MTT e mostrou que estas células foram sensíveis ao tratamento com CECBI e, quando os AAs foram introduzidos na suspensão eletrolítica, a toxicidade foi potencializada. A associação de Nps encapsuladas com L-tirosina à CECBI mostrou um

aumento significativo ($p < 0,01$) na citotoxicidade. O presente estudo mostrou que o uso de Nps encapsuladas com L-tirosina em associação com CECBI, uma perspectiva promissora para a terapia do câncer.

Palavras-chave: eletroterapia; câncer; nanotecnologia; células B16F10.

ABSTRACT

CAMPOS, Vânia Emerich Bucco. Study of the potential of amino acid loaded poly- ϵ – PCL nanoparticles for use in cancer electrotherapy. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Some studies worldwide are being conducted with the objective of finding the cure for different types of cancer. Among the actual treatments for this illness, Tumoral Electrotherapy (TET), which uses a low direct electric current (DC) to induce chemical changes capable of causing tumoral cell destruction, stands out as a new therapy. One of the mechanisms responsible for the antitumoral TET activity is the generation of oxidative species, known as chloramines, which are a result from the reaction between chloride species present in the electrolytic medium and the amino acids (AAs) existent in the cell suspension. The use of nanoparticle systems for the delivery of drugs allows a selective redirection of actives into tumoral cells. With the aim of optimizing the TET effect, poly- ϵ – PCL nanoparticles were loaded with Tryptofan (Trp) and Tyrosin (Tyr) amino acids and these nanoparticle (Np) systems were associated with DC. This study began with the development and characterization of the physical and chemical parameters of the new Np systems. Following that, the cytotoxicity of these Nps was evaluated *in vitro* on B16F10 melanoma mouse cell lines. The Nps were prepared by the double emulsion solvent evaporation method, and the electron microscopy analyses showed that the Nps had an elliptical shape, regular edges and a smooth surface and showed a mean diameter of 245 ± 2.05 nm. After the loading process this parameter was significantly modified to 259.90 ± 1.22 nm for Trp-loaded ($p < 0.05$) and 269.00 ± 4.90 nm for Tyr-loaded ($p < 0.01$). Loaded and unloaded Nps were negatively-charged, whereas unloaded nanoparticles displayed a significantly different zeta potential (-1.38 mV, $p < 0.01$) from Trp-loaded (-1.78 mV) and Tyr-loaded (-1.76 mV). The DC-treatment modified all the zeta potentials significantly, making these Nps more electronegative ($p < 0.05$). The yield of the loading process was about 50 % and the rates of Tyr-loaded Np and Trp-loaded Np were 30.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ and 115.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively. The *in vitro* delivery assays indicated that after three hours we had a peak of delivery of AAs from the Nps. The viability of B16F10 melanoma mouse cells was measured by MTT assay and showed that these cells were sensitive to DC treatment and, when AAs were introduced into the electrolytic suspension, the toxicity of this treatment increased. The association of Tyr-loaded Nps with DC stimulation showed a significant increase ($p < 0.01$) in the cytotoxicity. The present study

showed that the use of Tyr-loaded Nps in association with DC is a promising perspective for cancer therapy.

Keywords: electrotherapy; cancer; nanotechnology; B16F10 cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Demonstração esquemática do princípio da eletroquimioterapia.	9
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo iontoforético.	14
Figura 3. Esquema da liberação de sistemas nanoparticulados no tecido tumoral.	19
Figura 4. Estrutura da poli- ϵ -caprolactona.	22
Figura 5. Sistema experimental para estímulo elétrico.	31
Figura 6. Fluxograma do processo de obtenção de nanopartículas pelo método DEES.	37
Figura 7. Esquema do processo de sonicação.	38
Figura 8. Cella capilar com eletrodo.	41
Figura 9. Variação do potencial com a distância à superfície de uma partícula carregada.	42
Figura 10. Esquema do dissolutor utilizado nos estudos de liberação <i>in vitro</i> .	46
Figura 11. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10 submetidas a 2mA de estímulo anódico em diferentes tempos e seu respectivo controle.	48
Figura 12. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10 submetidas a 2mA de estímulo eletroiónico em diferentes tempos e seu respectivo controle.	48
Figura 13. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10 submetidas a 2mA de estímulo catódico em diferentes tempos e seu respectivo controle.	49
Figura 14. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10 imediatamente e 24 h após o estímulo anódico e seu respectivo controle.	50
Figura 15. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10 imediatamente e 24 h após o estímulo eletroiónico e seu respectivo controle.	51
Figura 16. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10 imediatamente e 24 h após o estímulo catódico e controle seu respectivo controle.	52
Figura 17. Número de células B16F10, quantificado pelo corante azul de tripan, após fluxo anódico de 4', 6' e em células sem estímulo elétrico.	53
Figura 18. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10, após 3 h do tratamento no FA na presença de ácidos aminados livres, realizado pelo método MTT.	54

Figura 19. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10, após 24 h do tratamento no FA na presença de ácidos aminados livres, realizado pelo método MTT.	55
Figura 20. Aspectos macroscópicos na preparação de nanopartículas (Np) de poli- ϵ -caprolactona (PCL).	56
Figura 21. Micrografia das partículas de PCL encapsuladas com L-triptofano e preparadas com ultra-turrax® .	57
Figura 22. Micrografia das nanopartículas de PCL encapsuladas com L-triptofano e preparadas com o sonicador.	58
Figura 23. Micrografia eletrônica de Np de PCL sem ácidos aminados encapsulados.	59
Figura 24. Micrografia eletrônica de Np de PCL contendo L-triptofano. Barra de aumento: 1 μ m.	60
Figura 25. Micrografia eletrônica de Np de PCL contendo L-triptofano. Barra de aumento: 100 nm.	60
Figura 26. Micrografia eletrônica de Np de PCL contendo L-tirosina. Barra de aumento: 1 μ m.	61
Figura 27. Micrografia eletrônica de Np de PCL contendo L-tirosina. Barra de aumento: 100 nm.	61
Figura 28. Distribuição de tamanho das nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona.	63
Figura 29. Distribuição de tamanho das nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona encapsuladas com L-triptofano.	63
Figura 30. Distribuição de tamanho das nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona encapsuladas com L-tirosina.	64
Figura 31. Curva analítica do L-triptofano em água destilada.	66
Figura 32. Curva analítica da L-tirosina em água destilada.	67
Figura 33. Perfil de liberação do L-triptofano encapsulado em nanopartículas de PCL.	69
Figura 34. Perfil de liberação da L-tirosina encapsulada em nanopartículas de PCL.	70
Figura 35. Percentual de viabilidade da linhagem B16F10 pré-incubada com Np de L-triptofano e L-tirosina, após 3 h do estímulo anódico.	71
Figura 36. Percentual de viabilidade da linhagem B16F10 pré-incubada com Np de L-triptofano e L-tirosina, após 24 h do estímulo anódico.	72
Figura 37. Estrutura química da L-tirosina submetida ao programa SPARTAN 06	100

para obtenção do Mapa de Potencial Elétrico (MEP).

Figura 38. Estrutura química do L-triptofano submetida ao programa SPARTAN 06 para obtenção do Mapa de Potencial Elétrico (MEP). 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentuais médios de viabilidade de células B16F10 após 3 h e 24 h de eletroestimulação no fluxo anódico e sem estímulo (controle).	94
Tabela 2 – Percentuais médios de viabilidade de células B16F10 após 3 h e 24 h de eletroestimulação no fluxo eletroiónico e sem estímulo (controle).	94
Tabela 3 – Percentuais médios de viabilidade de células B16F10 após 3 h e 24 h de eletroestimulação no fluxo catódico e sem estímulo (controle).	95
Tabela 4- Média do nº de células ($\times 10^5$ cél/ml) quantificado por azul de tripan.	95
Tabela 5 – Percentual médio de viabilidade de B16F10 após 3 h e 24 h de eletroestimulação.	96
Tabela 6 - Diâmetro médio e índice de polidispersividade das Np.	96
Tabela 7 – Potencial Zeta das nanopartículas.	96
Tabela 8 - Curva analítica do L-triptofano.	97
Tabela 9 - Curva analítica da L-tirosina.	97
Tabela 10 - Rendimento e Eficiência de Encapsulação (μg de AA/ mg Np) do processo.	97
Tabela 11 - Perfil de liberação das nanopartículas contendo L-triptofano.	97
Tabela 12 - Perfil de liberação das nanopartículas contendo L-tirosina.	98
Tabela 13 – Percentual médio de viabilidade de B16F10 após 3 h e 24 h do estímulo anódico em associação com as Np de L-triptofano e L-tirosina.	98

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Número de células/ml.	32
Equação 2. Equação de Henry.	40
Equação 3. Cálculo do rendimento do processo.	44
Equação 4. Cálculo da eficiência de encapsulação.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácidos Aminados
A/O	Água/Óleo
A/O/A	Água/Óleo/Água
CE	Corrente Elétrica
CECBI	Corrente Elétrica Contínua de Baixa Intensidade
DCM	Diclorometano
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
Cl ⁻	Íon cloreto
Cl ₂	Cloro
DEES	Dupla emulsificação e evaporação do solvente
DL ₅₀	Dose letal para 50% da população testada
DMEM	Dulbeco Modified Eagles's Médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Eficiência de encapsulação
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EQT	Eletroquimioterapia
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETT	Eletroterapia tumoral
FA	Fluxo Anódico
FC	Fluxo Catódico
FEI	Fluxo Eletroiónico
HCIO	Ácido Hipocloroso

HEPES	N-(2-hydroxyethyl-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
KCL	Cloreto de potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio monobásico
MEP	Mapa de potencial elétrico
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
MO	Microscópio óptico
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Np	Nanopartículas
Np-tir	Nanopartículas contendo L-triptofano
Np-trp	Nanopartículas contendo L-tirosina
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão salina fosfato
PCL	Poli-ε-caprolactona
pH	Potencial hidrogeniônico
PS	Estreptomicina e penicilina
PVA	Álcool polivinílico
R	Rendimento de processo
r	Coefficiente de correlação
RPM	Rotação por minuto
SFB	Soro fetal bovino
UV – Vis	Ultra-violeta e visível

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Percentual
nm	Nanômetro(s)
°C	Graus Celsius
ml	Mililitro(s)
g/l	Gramas por litro
cm ³	Centímetro(s) cúbico(s)
mA	Miliampére
mg/ml	Miligramas por mililitro(s)
µl	Micro litro(s)
mM	Milimolar (milimoles / litro)
mg	Miligramas(s)
R (%)	Rendimento do processo
M _S	Massa de partículas recuperada após o processo de secagem
M _F	Massa de PCL mais a massa do ácido aminado da formulação
n	Número de amostras
µm	Micrômetro(s)
% (p/v)	Percentual peso (g) / volume (ml)
% v/v	Percentual volume (ml) / volume (ml)
e ⁻	Elétron(s)
D	Coeficiente de difusão
d _h	Diâmetro hidrodinâmico das partículas
T	Temperatura constante
k	Constante de Boltzmann

U_E	Mobilidade eletroforética
ζ	Potencial Zeta
ε	Constante dielétrica
η	Viscosidade
$f(ka)$	Função de Henry
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

FOLHA DE ROSTO	i
FOLHA DE APROVAÇÃO	ii
DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
EPÍGRAFE	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE EQUAÇÕES	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvi
LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 CÂNCER	4
2.1.2 Melanoma	5
2.2. ESTUDO DAS ALTERAÇÕES INDUZIDAS POR CORRENTE ELÉTRICA CONTÍNUA DE BAIXA INTENSIDADE EM CÉLULAS TUMORAIS	6
2.2.1 Utilização da corrente elétrica em organismos vivos	6
2.2.2 Utilização da corrente elétrica na terapia antitumoral	7
2.2.3 Utilização da corrente elétrica associada a fármacos antitumorais	9
2.2.4 Tumores resistentes à múltiplas drogas (MDR)	13
2.2.5 Iontoforese	13
2.2.6 Vantagens e desvantagens da eletroterapia tumoral (ETT)	15
2.2.7 Mecanismos de ação envolvidos com a ETT	15
2.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NANOPARTICULADOS	19
2.3.1 Nanopartículas poliméricas	20
2.3.2 Propriedades da Poli-ε-caprolactona (PCL)	22
2.3.3 Estratégias para a encapsulação de fármacos	23

2.3.4 Seleção de ácidos aminados e de derivados para geração de cloraminas	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 MATERIAIS	26
4.1.1 Solventes, reagentes e meio de cultura	26
4.2 EQUIPAMENTOS	27
4.3 MÉTODOS	28
4.3.1 Preparo do meio DMEM	28
4.3.2 Preparo da Tripsina	28
4.3.3 Preparo do PBS	28
4.3.4 Preparo do Azul de Tripán	29
4.3.5 Preparo do MTT	29
4.3.6 Preparo das soluções de ácidos aminados livres	29
4.3.7 Preparo da suspensão de Np para análise no MET e no Zetasizer	30
4.3.8 Preparo da suspensão celular para análise do potencial Zeta	30
4.3.9 Manutenção das culturas de células	30
4.3.10 Modelo experimental para estimulação elétrica	31
4.3.11 Preparo das células para o tratamento com CECBI	32
4.3.12 Ensaios de citotoxicidade pelo método MTT	33
4.3.13 Citotoxicidade do tratamento elétrico	33
4.3.14 Quantificação do número de células após estímulo anódico	34
4.3.15 Citotoxicidade do tratamento elétrico quando associada a ácidos	35

aminados livres	
4.3.16 Preparo das Np de poli-ϵ-caprolactona encapsuladas com AA	35
4.3.16.1 Caracterização das nanopartículas através de microscopia óptica	38
4.3.16.2 Caracterização da morfologia das nanopartículas por MET	39
4.3.17 Análise do tamanho das partículas	39
4.3.18 Análise do potencial eletrocinético das Np	39
4.3.19 Quantificação do ácido aminado por espectrofotometria	42
4.3.19.1 Obtenção da curva analítica do L-triptofano	43
4.3.19.2 Obtenção da curva analítica da L-tirosina	44
4.3.20 Rendimento do processo e eficiência de encapsulação	44
4.3.21 Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i>	45
4.3.22 Citotoxicidade do tratamento elétrico quando associado à nanopartículas	46
de L-tirosina e L-triptofano	
5 RESULTADOS	47
5.1 CITOTOXICIDADE DO TRATAMENTO ELÉTRICO	47
5.1.1 Avaliação da citotoxicidade imediatamente após o estímulo elétrico	47
5.1.2 Avaliação da citotoxicidade após 24 horas do estímulo elétrico	49
5.2 QUANTIFICAÇÃO DO Nº DE CÉLULAS APÓS O ESTÍMULO ANÓDICO	52
5.3 CITOTOXICIDADE CELULAR QUANDO ASSOCIADA A ÁCIDOS	53
AMINADOS LIVRES	
5.4 PREPARO DAS NP DE POLI-E-CAPROLACTONA ENCAPSULADAS COM	56
AA	
5.4.1 Caracterização das nanopartículas através de microscopia óptica	57
5.4.1.1 Preparo das Np com auxílio do ultra-turrax®	57

5.4.1.2 Preparo das Np com auxílio do sonificador	58
5.4.2 Caracterização da morfologia das nanopartículas por MET	59
5.5 ANÁLISE DO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS	62
5.6 ANÁLISE DO POTENCIAL ELETROCINÉTICO DAS NP	65
5.7 QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO AMINADO POR ESPECTROFOTOMETRIA	66
5.7.1 Curva analítica do L-triptofano	66
5.7.2 Curva analítica da L-tirosina	67
5.8 RENDIMENTO DO PROCESSO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	68
5.9 ESTUDO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	68
5.10 CITOTOXICIDADE DO TRATAMENTO ELÉTRICO QUANDO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE L-TIROSINA E L-TRIPTOFANO	71
6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84
ANEXO A	93
ANEXO B	99

1 INTRODUÇÃO

O câncer ainda é um grande desafio para a ciência e para a medicina porque a cura de muitos tipos de tumores ainda não foi descoberta e os tratamentos atuais apresentam muitos efeitos colaterais. Os fármacos antitumorais, em geral, são tóxicos às células que estão em rápido crescimento e divisão, como as células cancerígenas. Entretanto, esses fármacos não possuem seletividade e especificidade e acabam sendo tóxicos para as células normais. Além disso, as células cancerígenas podem desenvolver uma variedade de alterações, as quais as tornam ainda mais resistentes aos tratamentos convencionais. Dentre estes mecanismos pode-se citar a resistência a múltiplas drogas (MDR), característica que confere às células que apresentam este fenótipo, a capacidade de realizar o efluxo de fármacos para o meio extracelular através de transportadores de membrana, o que as torna refratárias a fármacos citotóxicos (WONG *et al.*, 2007). Os novos tratamentos têm modificado o alvo de atenção, com o desenvolvimento de novos fármacos que visam exclusivamente à célula tumoral. A sítio especificidade de alguns sistemas de liberação pode reduzir os efeitos colaterais e aumentar a eficácia da terapia contra o câncer (SODEN *et al.*, 2004).

A associação de pulsos elétricos de alta voltagem a antineoplásicos constitui uma nova abordagem terapêutica conhecida por eletroquimioterapia (EQT). Tumores previamente estimulados com pulsos elétricos de alta voltagem tornam-se mais permeáveis a quimioterápicos aumentando, dessa maneira, os efeitos citotóxicos desejados (MIR *et al.*, 1998; RAMIREZ *et al.*, 1998; JANIGRO *et al.*, 2006). Correntes elétricas contínuas de baixa intensidade (CECBI) também vêm sendo utilizadas largamente em medicina, constituindo a chamada eletroterapia tumoral (ETT) (SERSA *et al.*, 2008). Recentemente, foi evidenciado pelo nosso grupo que as CECBI são capazes de destruir células tumorais através de dois mecanismos distintos: a apoptose e a necrose (VEIGA *et al.*, 2005). Estas diferenças no

mecanismo de morte celular parecem ser devidas ao tipo de polaridade aplicada, uma vez que células leucêmicas quando estimuladas pelo fluxo anódico (FA) programam-se para morrer, através de eventos apoptóticos, enquanto que, o fluxo catódico (FC) é capaz de induzir a morte celular exclusivamente por necrose. A ausência de produtos de eletrólise e de espécies oxidantes, situação gerada pelo fluxo eletroíônico (FEI), não induz alterações morfológicas e nem tão pouco na viabilidade celular. Um fato interessante que chama a atenção, é que nestas três situações experimentais foi verificado que há uma diminuição da proliferação celular e esta parece ser independente dos produtos de eletrólise gerados pela CECBI (HOLANDINO *et al.*, 2000, 2001; VEIGA *et al.*, 2000, 2005).

Veiga e colaboradores (2005) demonstraram ainda que o mecanismo de morte celular programada parece ser disparado por espécies oxidantes, conhecidas por cloraminas, as quais são geradas exclusivamente pelo FA, através da reação entre espécies cloradas (Cl^- , Cl_2 , HOCl) presentes no meio eletrolítico e ácidos aminados presentes na suspensão celular. Esta hipótese foi confirmada quando ao meio eletrolítico foi acrescentado o ácido aminado glutamina sob a forma livre. O potencial oxidante de cloraminas, assim como a apoptose induzida por estas espécies oxidantes, foi descrita previamente por outros autores em diferentes modelos experimentais (WAGNER *et al.*, 2002; ENGLERT & SHACTER, 2002).

Diversas pesquisas buscam desenvolver novos sistemas de liberação e tecnologias que visam direcionar o fármaco ao seu sítio alvo, através do processo de vetorização. Entre os novos sistemas de liberação de fármacos encontram-se as nanopartículas (Np) que são objeto de estudo da Nanociência e da Nanotecnologia (ALEXIS *et al.*, 2008). O conceito de nanotecnologia nas Ciências Farmacêuticas, direcionada à liberação de fármacos, está baseado na produção de nanopartículas capazes de encapsular fármacos a serem liberados exclusivamente no órgão alvo ou em aglomerados de células, como os que se formam em tumores (ALEXIS *et al.*, 2008). A liberação sítio específica de fármacos é uma vantagem no

tratamento do câncer porque reduz os efeitos colaterais. Estudos recentes realizados em camundongos com câncer mostraram que os sistemas de liberação nanoparticulados podem acumular-se na célula cancerosa exibindo notável eficácia, além de citotoxicidade específica. O controle da liberação do fármaco encapsulado e a sítio especificidade reduzem significativamente os efeitos colaterais comuns nos tratamentos com quimioterápicos (FAROKHZAD *et al.*, 2006).

No presente trabalho foi avaliado o potencial antitumoral destas espécies oxidantes conhecidas por cloraminas. As cloraminas foram produzidas a partir da reação de ácidos aminados com os derivados de cloro gerados no meio eletrolítico, durante a estimulação elétrica. Com o objetivo de potencializar os efeitos antitumorais da cloramina, os ácidos aminados foram encapsulados em Np de Poli-ε-Caprolactona (PCL), através da técnica de dupla emulsificação e evaporação de solvente (RICCI, 2005). As nanopartículas contendo os ácidos aminados foram caracterizadas por microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e por espalhamento de luz dinâmica. A eficácia do processo de encapsulação e o tempo de liberação dos ácidos aminados incorporados em Np foram previamente determinados. Finalmente o potencial antitumoral das nanopartículas desenvolvidas foi testado frente à linhagem de melanoma murino resistente a múltiplas drogas (B16F10) e a citotoxicidade destas formulações foi avaliada de acordo com protocolo já estabelecido (HOLANDINO *et al.*, 2000, 2001; VEIGA *et al.*, 2005).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (**metástase**). Devido ao crescimento descontrolado, estas células tendem a ser muito invasivas, determinando o acúmulo de células cancerosas ou **neoplasias malignas**. Por outro lado, um **tumor benigno** significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplica vagarosamente e se assemelha ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (PETRULIO *et al.*, 2006). Os diferentes tipos de câncer podem ainda serem classificados de acordo com a sua origem: quando o câncer tem início em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, ele é denominado **carcinoma**; por outro lado, se sua origem é em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de **sarcoma** (BIRD *et al.*, 2006).

Existem três modalidades terapêuticas principais para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Esta última é, nos últimos anos, objeto de extensa investigação na busca por novos quimioterápicos cada vez mais seletivos. A maior parte dos fármacos com atividade antitumoral originalmente derivou-se de produtos naturais; dois bons exemplos são os alcalóides da Vinca (vincristina e vimblastina) utilizados na quimioterapia do câncer (DEWICK, 1997) e o Taxol (Paclitaxel®) (GOODMAN & GILMAN, 1991). No entanto, apesar do grande número de agentes antitumorais, a resistência específica de alguns tumores para determinados quimioterápicos, assim como, o problema da resistência a múltiplas drogas, torna necessária a busca por novas terapias antitumorais (CAPELLA & CAPELLA, 2003).

2.1.2 Melanoma

O melanoma é um câncer de pele que se origina no melanócito, cuja função principal é a produção de melanina, pigmento que confere cor à pele. Ele é um dos tumores mais agressivos, com grande capacidade de invasão local e à distância, sendo resistente a quase todas as modalidades terapêuticas disponíveis no momento (PEREZ & ZELL, 2006).

O melanoma inicia-se como uma lesão escura que aumenta de tamanho em extensão e/ou profundidade, com alteração de suas cores originais, surgimento de pontos pigmentados ao redor da lesão inicial, ulceração, sangramento ou sintomas como coceira, dor ou inflamação. A profundidade é o parâmetro que define a gravidade da lesão, sendo que quanto mais profunda, mais grave, pois aumenta os riscos de metástases (LÁZAR-MOLNAR *et al.*, 2000).

O melanoma de pele é menos freqüente que os outros tumores de pele (basocelulares e de células escamosas), no entanto, sua letalidade é mais elevada. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, anualmente, ocorram cerca de 132 mil casos novos desse câncer no mundo e, no que se refere à prevalência, cerca de 2,5 % serão do tipo melanoma. Tem-se observado um expressivo crescimento na incidência desse tumor em populações de pele branca (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>, acessado em 10/01/2008). Segundo Prignano e colaboradores (2002) a sobrevida de pacientes com melanoma cutâneo tem aumentado nos últimos 10 anos devido ao diagnóstico precoce do câncer; entretanto este aspecto ainda não é suficiente para a eficácia do tratamento. Em geral, os melanomas têm baixa sensibilidade aos agentes citotóxicos e ainda podem desenvolver o mecanismo de resistência a múltiplas drogas, o que dificulta a eficácia do tratamento. Portanto, as pesquisas *in vitro* são necessárias para o desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes e direcionados à célula tumoral, diminuindo os efeitos colaterais indesejáveis, melhorando a

qualidade de vida e a sobrevivência do paciente. O melanoma murino da linhagem B16F10 foi escolhido neste trabalho por ser um modelo biológico extensivamente pesquisado por diversos autores (NUCCITELLI *et al.*, 2006; BICEK *et al.*, 2007; KANG *et al.*, 2008; SERSA *et al.*, 2008), por apresentar características semelhantes ao melanoma humano e por possuir o fenótipo de resistência a múltiplas drogas.

2.2. ESTUDO DAS ALTERAÇÕES INDUZIDAS POR CORRENTE ELÉTRICA CONTÍNUA DE BAIXA INTENSIDADE EM CÉLULAS TUMORAIS

2.2.1 Utilização da corrente elétrica em organismos vivos

Entre as principais descobertas da ciência realizadas no século XVIII, destacam-se os estudos da eletricidade em tecidos vivos, feitos por Luigi Galvani, em 1791. Galvani é considerado o pai da eletrofisiologia; seus estudos na condução nervosa e na contração muscular lançaram os fundamentos para eletrofisiologia, como também abriram caminho para a invenção da pilha elétrica por Alessandro Volta em 1799. O desenvolvimento da eletricidade nesta época trouxe importantes avanços na área da ciência, da física e consequentemente para a humanidade como um todo (PICCOLINO *et al.*, 2006).

Após Galvani outros pesquisadores deram continuidade aos estudos com correntes elétricas (CE) em seres vivos. Dineur (1891) e Verwon (1896) investigaram a galvanotaxia de leucócitos e amebas, respectivamente (DINEUR, 1981; VERWON, 1896). Outros autores relataram o efeito bactericida e bacteriostático de CE em *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (TOKUDA *et al.*, 1995); *Listeria monocytogenes* (YE *et al.*, 2001); *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *E.coli* (LI *et al.*, 1995; VENKITANARAYANAN *et al.*, 1999); *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (COSTERTON *et al.*, 1994) e *Staphylococcus*

epidermidis (KHOURY *et al.*, 1992). Os efeitos bactericidas e bacteriostáticos utilizando corrente elétrica contínua de baixa intensidade envolvem aumento da temperatura, mudança de pH e eventos eletroquímicos (BIRBIR & BIRBIR, 2006).

Vários estudos clínicos demonstram o efeito benéfico da aplicação de corrente elétrica contínua na cicatrização de úlceras cutâneas crônicas; entretanto, o mecanismo principal sobre os efeitos regenerativos da CE ainda não estão bem elucidados, embora saibam-se dos efeitos da CE sobre a síntese de colágeno, à migração de fibroblastos, o efeito bactericida e o aumento do fluxo sanguíneo nos locais eletroestimulados (PETERS *et al.*, 2001; BOGIE *et al.*, 2006).

No campo da traumatologia, a capacidade regenerativa da corrente elétrica tem incentivado seu uso na cicatrização de fraturas ósseas (KIM *et al.*, 2006), na melhoria da mineralização do calo ósseo (EL-HAKIM *et al.*, 2004) e na regeneração de nervo ciático (MENDONÇA *et al.*, 2003).

2.2.2 Utilização da CE na terapia antitumoral

Bjorn Nordenström, médico sueco radiologista, é considerado o pioneiro no tratamento de tumores com corrente elétrica contínua. No final dos anos setenta, Nordenström começou a tratar o câncer pulmonar primário através da aplicação de corrente elétrica contínua entre dois fios de platina (eletrodos). Um teste preliminar em cinco pacientes foi publicado em 1978 (NORDENSTRÖM, 1978). No seu livro, escrito em 1983, Nordenström relatou os resultados do tratamento de 26 tumores pulmonares em 20 pacientes. A regressão foi obtida em 12 dos 26 tumores e não foram detectados sinais de reaparecimento após 2-5 anos do tratamento. Entre os efeitos secundários, Nordenström notava ligeira febre e dor local durante o tratamento (NORDENSTRÖM, 1983).

Nordenström (1983) discutiu exaustivamente possíveis mecanismos envolvidos na eletroterapia tumoral (ETT), como: alterações de pH; transporte electro-osmótico da água e os efeitos dos transportes iônicos transmembranar. Ele também apontou que a maioria dos tumores possui um excesso de cargas eletronegativas sobre a sua superfície e, por conseguinte, só o ânodo deveria ser colocado dentro do tumor, para prevenir a propagação de micrometástases durante o tratamento (NORDENSTRÖM, 1984). No entanto o autor obteve resultados positivos quando colocou o cátodo no tumor (NORDENSTRÖM, 1989). Esses mecanismos e outros estão descritos na seção 2.2.7.

Nordenström e colaboradores (1990) investigaram ainda os efeitos da ação combinada da CE com a adriamicina, tendo como objetivo principal avaliar a influência da eletropositividade da adriamicina durante o tratamento elétrico. Quando infundida no tumor através de um eletrodo anódico, a eletropositividade da adriamicina foi modificada, por eletroforese, levando a uma distribuição uniforme da droga no tecido circundante. Assim, a adriamicina pôde ser concentrada dentro da região tumoral quando aplicada por via endovenosa. Usando essa técnica, os autores esperavam minimizar os efeitos colaterais da quimioterapia sistêmica. Efeitos benéficos foram obtidos através deste estudo preliminar com 14 pacientes com câncer pulmonar que foram considerados incuráveis por métodos convencionais.

Os últimos trabalhos publicados por Nordenström e seus colegas relataram resultados positivos no tratamento eletroquímico em pacientes com câncer de mama. Mamografias realizadas a cada seis meses em um período de dois anos após o tratamento mostraram que não havia vestígios de recidiva do tumor (AZAVEDO *et al.*, 1991).

2.2.3 Utilização da corrente elétrica associada a fármacos antitumorais

Pesquisas no tratamento do câncer baseadas na eletroquimioterapia estão sendo alvo de intensas investigações na área de liberação de fármacos. A eletroquimioterapia (EQT) é um tratamento que envolve a administração de um agente quimioterápico seguido pela liberação de pulsos elétricos. Conforme demonstrado na Figura 1, quimioterápicos não permeáveis ou pouco permeáveis são injetados pela via intravenosa ou intratumoral. A aplicação de pulso elétrico adequado causa um aumento na permeabilidade da membrana, o que favorece a entrada do quimioterápico no interior da célula (SERSA *et al.*, 2008).

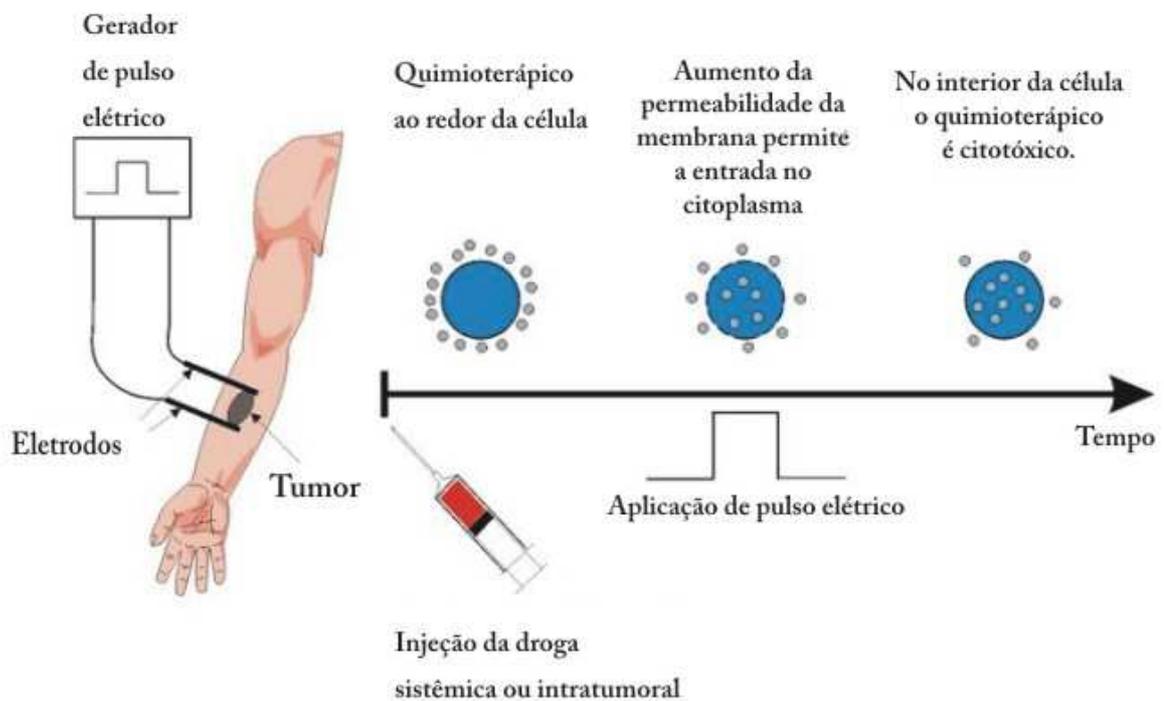


Figura 1. Demonstração esquemática do princípio da eletroquimioterapia (adaptado de SERSA *et al.*, 2008).

Os pulsos elétricos aumentam a liberação da droga nas células tumorais por um mecanismo chamado eletropermeabilização ou eletroporação (SERSA *et al.*, 2008). Isto ocorre porque o tratamento elétrico desestabiliza a bicamada lipídica aumentando a permeabilidade da membrana celular (JAROSESKI *et al.*, 1997). Vários fármacos antitumorais foram testados nas células em combinação com pulsos elétricos; porém somente dois destes fármacos apresentaram resultados satisfatórios, são elas: bleomicina e cisplatina. O transporte da bleomicina através da membrana plasmática é mediado por proteínas carreadoras que internalizam, via endocitose, o fármaco; no entanto, em células tumorais, o número dessas proteínas membranares é menor. A aplicação de pulsos elétricos através do mecanismo de eletroporação facilita o acesso direto da bleomicina ao citoplasma. Em contrapartida, a cisplatina é transportada para o interior da célula por dois mecanismos: difusão passiva que contribui com cerca de 50 % do transporte; transporte por proteínas carreadoras. Como nas células tumorais a entrada de fármacos citotóxicos é limitada e a aplicação de pulsos elétricos favorece esta penetração levando a um acúmulo citoplasmático do fármaco (SERSA *et al.*, 2008).

Desde o seu surgimento em 1980, diversos tipos de tumores vêm sendo tratados com EQT, como: fibrosarcomas, melanomas, carcinomas e adenocarcinomas. A utilização dessa nova modalidade terapêutica, a eletroquimioterapia foi introduzida por Okino e Mir (OKINO & MOHRI, 1987; MIR *et al.*, 1991). Os primeiros estudos clínicos em tumores de cabeça e pescoço foram publicados em 1991 (MIR *et al.*, 1991). Desde então, outros autores têm aplicado com sucesso a eletroquimioterapia em tumores de cabeça e pescoço (DEV & HOFMAN, 1994; TELLÓ *et al.*, 2007).

Jaroseski e colaboradores (1997) investigaram a eletroporação *in vivo* em combinação com bleomicina no tratamento de tumores de fígado. A regressão completa obtida nos animais tratados sugere que a eletroquimioterapia pode ser um tratamento eficaz para hepatomas.

Diversos trabalhos evidenciam a efetividade antitumoral da bleomicina quando potencializada por pulsos elétricos; além disso, uma dose menor da droga é necessária para produzir os efeitos citotóxicos desejáveis, o que leva a uma diminuição dos efeitos colaterais sistêmicos do tratamento (MIKLAVCIC *et al.*, 1998; GOTHELF *et al.*, 2003). A efetividade antitumoral da cisplatina foi aumentada com aplicação de pulsos elétricos após a injeção intravenosa sistêmica e intratumoral, em melanomas B16F10 e em fibrossarcomas de camundongos, respectivamente. Usando os mesmos parâmetros de aplicação de pulsos elétricos na aplicação intravenosa e intratumoral, esses autores evidenciaram que a injeção intratumoral é mais eficaz na redução do tumor quando comparada à intravenosa, o que se deve a uma maior quantidade do fármaco liberado diretamente nas células tumorais (CEMASAR *et al.*, 2006).

Muitos estudos *in vitro* estão sendo realizados na busca por novos tratamentos para o câncer. A combinação de uma nova droga chamada NAMI-A, que contém Rutênio e Imidazol, com pulsos elétricos, em células B16F10, demonstrou que somente 10 % das células sobreviveram, enquanto que com a droga sozinha a sobrevivência foi de 90 %. Nesses estudos a associação de NAMI-A com eletroporação reduziu significativamente a viabilidade celular (BICEK *et al.*, 2007).

Em pesquisas publicadas por Miklavcic e colaboradores (1997) foi investigado o efeito de EQT (0,6 mA por 1 h) sobre a perfusão e o crescimento tumoral de fibrossarcoma (LPB e SA-1) em camundongos. A corrente foi aplicada por dois eletrodos de platina-irídio, colocados em lados opostos do tumor; a fim de avaliar a perfusão e o crescimento do tumor injetou-se nos camundongos uma solução do corante azul de violeta. A diminuição do crescimento tumoral foi obtida em ambos os modelos tumorais. A ausência quase completa de coloração obtida pelo corante azul de violeta, nos tumores SA-1, sugeriu que o retardo no crescimento tumoral foi resultante da prolongada oclusão vascular devido à eletroterapia. No

entanto, tumores LPB tiveram uma ligeira diminuição na coloração, indicando, assim, menores danos vasculares.

As pesquisas realizadas por Sersa e colaboradores (2008) têm contribuído grandemente para o avanço da eletroquimioterapia tumoral. Esses mesmos autores observaram a efetividade antitumoral com diferentes imunomoduladores, como: fator de necrose tumoral (TNF- α); interferon- α (IFN- α) e interleucina-2 (IL-2). Estas combinações terapêuticas indicaram um envolvimento da resposta imune nos efeitos antitumorais observados em fibrossarcoma e em melanoma de camundongos. Esses mesmos autores investigaram a resposta imune em camundongos imunocompetentes e imunodeficientes e compararam o crescimento e a cura do tumor após tratamento eletroquímico entre eles. Na pesquisa foi observado que nos camundongos imunocompetentes a diminuição no crescimento tumoral foi duas vezes menor e 80 % destes tumores foram curados, enquanto que nos ratos imunodeficientes o tratamento foi menos eficiente. Os autores concluíram que a eficácia do tratamento eletroquímico é fortemente dependente da resposta imune do hospedeiro (SERSA *et al.*, 2008).

Em síntese, os principais mecanismos envolvidos com a eletroquimioterapia são: a eletroporação, a qual aumenta a efetividade do fármaco por facilitar a entrada deste na célula; a redução reversível do fluxo sanguíneo, após aplicação de pulsos elétricos; o mecanismo de oclusão vascular que favorece a morte celular ao redor dos vasos e o envolvimento da resposta imune no tratamento antitumoral (SERSA *et al.*, 2008).

Estudos recentes realizados seguindo o padrão europeu para procedimentos com eletroquimioterapia demonstraram que, a eletroquimioterapia é fácil, segura, eficaz no tratamento de nódulos de tumores malignos cutâneos e subcutâneos e proporciona benefícios clínicos imediatos. O tratamento com pulsos elétricos associados à administração intratumoral de bleomicina ou cisplatina foi realizado em 41 pacientes; 150 dias após o tratamento, 85 %

dos pacientes obtiveram resposta ao tratamento, sendo que destes, 73,7 % tiveram resposta completa (MARTY *et al.*, 2006).

2.2.4 Tumores resistentes a múltiplas drogas (MDR)

Alguns tumores desenvolvem a resistência a múltiplas drogas mediada por um mecanismo especializado de extrusão da droga causado por uma superexpressão do gene *mdr1*. Esse gene *mdr1* codifica uma glicoproteína de membrana plasmática denominada glicoproteína P. Janigro e colaboradores (2006) revelaram em seus estudos que a corrente alternada de baixa intensidade e baixa frequência é capaz de reduzir a resistência a múltiplas drogas por alterar o fenótipo *mdr1*; além disso, esses mesmos autores evidenciaram um efeito citostático e a possibilidade de diminuir a quantidade de droga necessária ao tratamento o que reduziria os efeitos colaterais associados ao quimioterápico. Holandino e colaboradores (2001) verificaram que a CECBI é capaz de modificar a viabilidade, mas não a expressão e atividade da glicoproteína-P, evidenciando que tumores MDR podem ser um alvo para CECBI.

2.2.5 Iontoforese

A iontoforese é uma técnica muito utilizada atualmente. Seu princípio consiste na associação de uma corrente elétrica contínua ou alternada a fármacos com aplicação tópica (Figura 2), a qual potencializa a liberação transdérmica de fármacos através do extrato córneo, aumentando, em muito, a eficácia terapêutica de diversos tratamentos (KASTING & BOWMAN, 1990; HOWARD *et al.*, 1995; TOKUMOTO *et al.*, 2006; PATEL *et al.*, 2007). Várias são as aplicações clínicas da iontoforese, a partir de diversas associações, como a

associação com anestésicos locais (MALONEY *et al.*, 1992; BEZZANT *et al.*, 1988); a associação com antibióticos, acompanhada de aumento no transporte de penicilina em até 200 vezes (RAPPERPORT *et al.*, 1965; RIGANO *et al.*, 1992); a associação com fármacos antivirais, permitindo o uso da iontoforese no tratamento de pacientes com herpes simplex e labialis (LEKAS, 1979; HENLEY-COHN & HAUSFELD, 1984; GANGAROSA *et al.*, 1989); a associação de nanoesferas de triptorelin para a administração iontoforética transdérmica no tratamento de doenças hormonais (NICOLI *et al.*, 2001); a associação com sistemas nanoparticulados para aumentar a penetração de fármacos no tecido ocular (BINSTOCK *et al.*, 2008); a associação com sistemas de liberação transdérmico, para aumentar a permeação de fármacos como: cafeína, cloridrato de lidocaína e cloridrato de doxiciclina (FAN *et al.*, 2008).

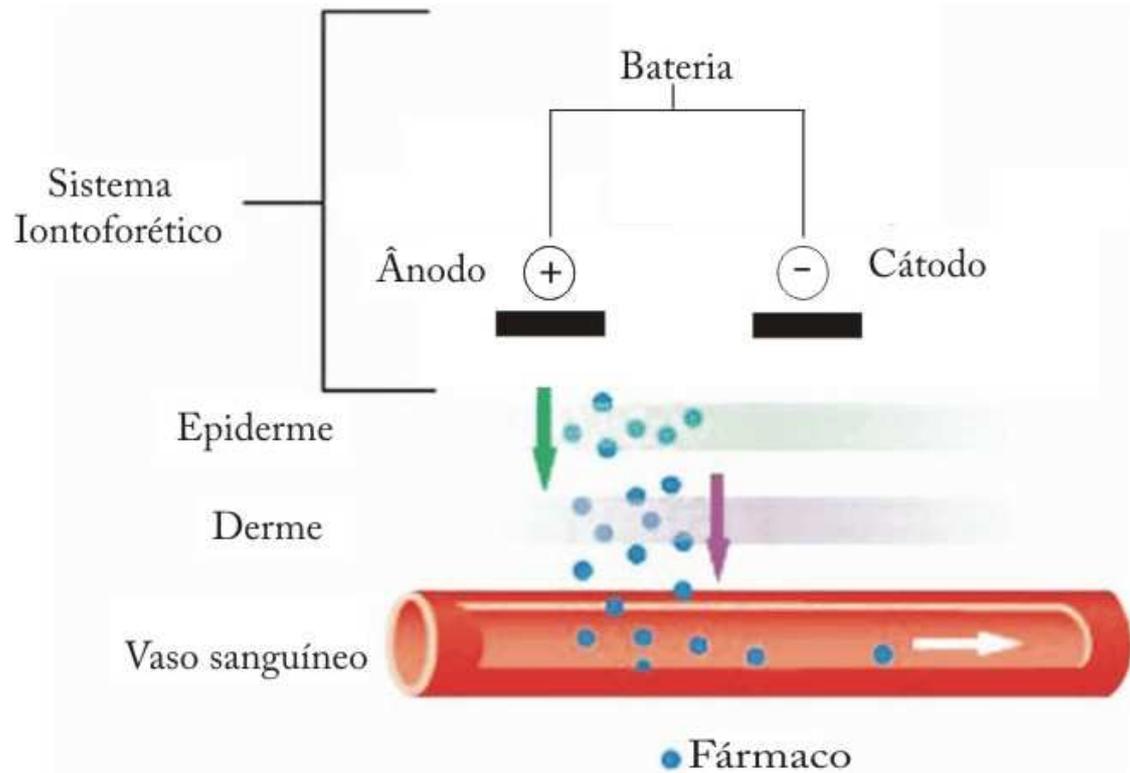


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo iontoforético (adaptado de MINKOWITZ, 2007).

2.2.6 Vantagens e desvantagens da eletroterapia tumoral (ETT)

A importância da eletroterapia tumoral na prática médica deve-se a inúmeras vantagens, tais como: (1) baixa toxicidade a células normais, por ser uma terapia localizada; (2) baixos efeitos colaterais; (3) forte estimulação do sistema imunológico (SERSA *et al.*, 2008); (4) baixo custo quando comparada aos tratamentos usuais; (5) possibilidade de uso em pacientes que não respondem a tratamentos convencionais; (6) facilidade do manuseio do equipamento (TELLÓ *et al.*, 2004). Entretanto, essa terapia não é aplicável a todos os tipos de câncer e também não é recomendada para pacientes cardíacos que fazem uso de marca-passo ou pacientes que utilizam terapia anticoagulante (SERSA *et al.*, 2008). Finalmente, a ausência de conhecimentos acerca dos seus mecanismos de ação impede a sua ampla utilização na clínica médica.

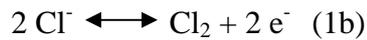
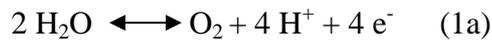
2.2.7 Mecanismos de ação envolvidos com a ETT

Os efeitos antitumorais da terapia com CE são estudados por diversos autores na tentativa de elucidar os mecanismos de morte celular. Até o presente momento muitas alterações físicas e biológicas decorrentes da eletroterapia estão sendo investigadas. Euler e colaboradores (2004) sugeriram que mecanismos secundários como resposta inflamatória, injúria isquêmica do tumor e formação de radicais, contribuem para regressão do tumor. Outros estudos que incluem eletrólise, com mudanças no pH, mudanças do potencial transmembrana, formação de microtrombose nos vasos tumorais, ativação e atração de células do sistema imunológico e indução de apoptose estão envolvidos no processo de destruição celular causadas pela aplicação da corrente elétrica (VEIGA *et al.*, 2005; SCHAEFER *et al.*, 2008). Wartenberg e colaboradores (2007) investigaram os efeitos do tratamento de câncer de

mucosa oral com corrente elétrica, demonstrando que o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi aparentemente devido a ativação de NADPH oxidase pela CE. Os baixos níveis de EROs têm sido associados a processos de diferenciação e proliferação celular; no entanto, os altos níveis de EROs estão associados à apoptose e à morte celular.

Estudos *in vitro*, envolvendo análises ultraestruturais da membrana plasmática, revelaram que a corrente elétrica causa danos como, perda da continuidade da membrana plasmática, aparecimento de bolhas (blebs) na superfície celular, perda de resíduos aniógenos da membrana plasmática, mitocôndrias edemaciadas e com cristas condensadas, rarefação da matriz citoplasmática e nuclear, aumento do volume citoplasmático e presença de debris (resíduos celulares) (HOLANDINO *et al.*, 2001; VEIGA *et al.*, 2000). Esses mesmos autores em outro estudo com células tumorais P815 indicaram que a polaridade do eletrodo e o tempo de estimulação são parâmetros importantes para a destruição tumoral (HOLANDINO *et al.*, 2000). Estes trabalhos contribuíram para evidenciar que as polaridades dos eletrodos promovem danos ultraestruturais distintos. Samuelsson e Jönsson (1980) foram os primeiros a relatar as alterações de pH decorrentes do estímulo elétrico, evidenciando a acidificação na região anódica e a alcalinização na região catódica. Eles observaram que as alterações de pH induzem danos biológicos nas células tumorais. Estas alterações no pH extracelular (pHe) resultam em modificações no pH intracelular (pHi), pois levam a diminuição do pHe gerando um gradiente de concentração entre os meios extra e intracelular, que induz a entrada, por difusão, de íons H^+ para o meio intracelular. Essa difusão de prótons, visando o equilíbrio nas concentrações de íons H^+ nos compartimentos intra e extracelular, resulta numa momentânea diminuição do pHi. A acidificação do meio intracelular parece estar relacionada com a hidrólise do DNA e a alterações típicas de processos apoptóticos (BARRY *et al.*, 1993; VEIGA *et al.*, 2005). O mecanismo de destruição em pH elevado observado na região

catódica deve estar relacionado ao aumento de íons hidroxila, uma vez que essa condição destrói várias enzimas e proteínas, resultando em desnaturação e precipitação, respectivamente (NORDENSTRÖM, 1983). A destruição celular também está relacionada com a geração de compostos tóxicos como, ácido hipocloroso (HClO), íons cloreto (Cl⁻), oxigênio (O₂) e gás cloro (Cl₂) no ânodo, e geração de hidroxilas (OH⁻) e gás hidrogênio (H₂) no cátodo (SAMUELSON & JÖNSEN, 1980; HOLANDINO, 2000). As reações eletroquímicas que ocorrem no ânodo (1a, 1b, 1c) e no cátodo (2) podem ser melhor visualizadas a seguir (NILSSON *et al.*, 2000; VEIGA *et al.*, 2000; VIJH, 2004):



No ânodo, as principais reações são a decomposição da água (1a) e a oxidação do cloro (1b). A maior reação eletroquímica que ocorre no cátodo é a decomposição da água em gás hidrogênio e íons hidroxila (2). Esses produtos podem ser difundidos pelo tecido, pela diferença do gradiente de concentração ou pela migração do potencial de carga que algumas espécies possuem. Os diferentes íons e espécies contendo oxigênio e cloro são localmente destrutivos para o tecido. Além disso, os produtos gerados podem reagir com os constituintes orgânicos e inorgânicos do tecido gerando novos compostos tóxicos. O cloro, por exemplo, reage com a água, para formar ácido hipocloroso, íons cloreto e hidrogênio (1c) (NILSSON *et*

al., 2000). O mecanismo pelo qual a corrente elétrica afeta o crescimento e a sobrevivência celular ainda não está estabelecido, mas é muito provável que este seja um processo complexo. A corrente elétrica causa um fluxo intersticial de água (eletro-osmose) do ânodo para o cátodo; conseqüentemente, a região ao redor do ânodo sofre desidratação, enquanto que ao redor do cátodo observa-se um edema (NORDENSTRÖM, 1983; TELLÓ *et al.*, 2004; VIJH, 2004).

Veiga e colaboradores (2000) descreveram que compostos clorados gerados por reações eletrolíticas, tais como, ácido hipocloroso (HClO), íons cloreto (Cl⁻) e gás cloro (Cl₂), inibem a proliferação de mastocitomas de camundongos. Observaram que eventos celulares como necrose e apoptose celular estão associados à morte celular, onde o estímulo anódico induz apoptose e necrose e o estímulo catódico leva a lise celular e necrose, mas não a apoptose (VEIGA *et al.*, 2005).

Estudos realizados sobre os efeitos tóxicos de compostos clorados detectaram que estes podem reagir com diferentes ácidos aminados formando compostos denominados por cloraminas, os quais são potencialmente indutores de apoptose (ENGLERT & SHACTER, 2002). Esta hipótese foi testada por Veiga e colaboradores (2005) a partir do tratamento das células tumorais em tampão PBS acrescido de glutamina. Nessas condições foi observado um progressivo aumento da permeabilidade celular, identificado através do corante azul de tripan, além de alterações morfológicas típicas do processo apoptótico quando estas células foram submetidas ao estímulo anódico. Visando a potencialização dos efeitos antitumorais destas cloraminas geradas por CE, associou-se a eletroterapia a sistemas de liberação nanoparticulados no presente trabalho e avaliou-se a citotoxicidade desta combinação terapêutica frente a melanomas murinos MDR (linhagem B16F10).

2.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NANOPARTICULADOS

O desenvolvimento de sistemas de transporte de fármacos contribuiu para o surgimento de novos carreadores capazes de atingir um alvo específico. Os exemplos mais comuns de carreadores, ou seja, veículos de liberação em nanoescala são: lipossomas, niosomas, ciclodextrinas, dendrímeros, nanopartículas magnéticas, micropartículas e nanopartículas poliméricas. O transporte de fármacos pelos carreadores melhora a sua biodisponibilidade. Os sistemas nanoparticulados apresentam liberação sítio-específica, o que permite um maior controle da absorção e distribuição tecidual do fármaco, potencializando os efeitos terapêuticos e reduzindo os efeitos toxicológicos dos fármacos. As propriedades dos sistemas nanoparticulados em atingir um alvo específico, reduzir os efeitos colaterais e controlar a liberação do fármaco, aumentam a sua utilização no tratamento do câncer (ALEXIS *et al.*, 2008). Como mostra a Figura 3, as Np podem ser concentradas no interstício tumoral pela passagem passiva através das pequenas aberturas do endotélio vascular. O funcionamento anormal do sistema linfático e a alta permeação pelos capilares sanguíneos resultam na retenção das nanopartículas no interstício das células tumorais, levando a um aumento dos efeitos citotóxicos do fármaco na região tumoral (ALEXIS *et al.*, 2008).

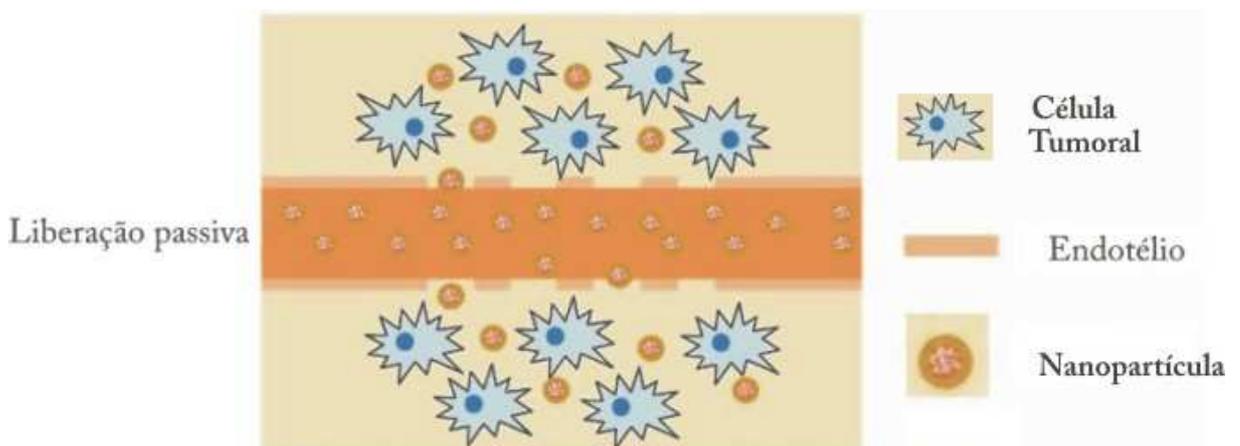


Figura 3. Esquema da liberação de sistemas nanoparticulados no tecido tumoral (adaptado de ALEXIS *et al.*, 2008).

O conceito de nanotecnologia em aplicações farmacêuticas, mais especificamente na liberação de fármacos, está baseado na produção de nanopartículas que contêm moléculas do fármaco a serem liberadas exclusivamente no órgão alvo, ou em grupamento de células específicas, como as tumorais em melanomas (KIRPOTIN *et al.*, 2006; RICCI & MARCHETTI, 2006).

2.3.1 Nanopartículas poliméricas

As Np têm sido extensivamente estudadas e constituem sistemas modernos e promissores para a liberação sustentada e seletiva de fármacos. As Np podem ser definidas como partículas coloidais sólidas que contêm um fármaco encapsulado em sua estrutura, podendo ser preparadas por métodos físicos, físico-químicos ou químicos (HANS & LOWMAN, 2002; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998). As nanopartículas podem ser utilizadas para a liberação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos, proteínas, vacinas e peptídeos. Esses carreadores podem ser formulados para serem liberados em diferentes órgãos do organismo, tais como: cérebro, rins, fígado, pulmão, pele ou ainda permanecerem por longo tempo na circulação sistêmica (HANS & LOWMAN, 2002).

Os termos micro e nanopartículas são genéricos, sendo usados de acordo com o tamanho das partículas. As partículas com tamanho entre 1 a 999 nm são denominadas nanopartículas, enquanto que partículas maiores que 1000 nm são ditas micropartículas (HANS & LOWMAN, 2002; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

As Np podem ser classificadas quanto a sua estrutura interna em nanoesferas e nanocápsulas. As nanoesferas constituem sistemas matriciais ou monolíticos que apresentam o fármaco homogeneamente disperso na matriz polimérica. As nanocápsulas constituem sistemas reservatórios com o fármaco localizado no núcleo do sistema, o qual é envolvido por

uma parede polimérica externa que forma a cápsula (SOPPIMATH *et al.*, 2001; JAIN *et al.*, 1998).

Esses sistemas apresentam excelente estabilidade o que é uma vantagem quando comparados aos sistemas microemulsivos e lipossomais (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1988). A estabilidade também é excelente durante o processo de preparação e de armazenamento, sendo que as Np podem ser liofilizadas, esterilizadas por radiação e posteriormente, redispersas, sem problemas de alteração do tamanho e do conteúdo do fármaco (VENIER-JULIENE, 1990).

As nanopartículas podem ser administradas por qualquer via devido ao seu tamanho nanométrico, permitindo ainda que sejam injetadas na circulação sanguínea sem riscos à saúde, uma vez que seu tamanho é menor que o diâmetro dos menores capilares (HANS & LOWMAN, 2002; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Existem diferentes métodos para preparação de nanopartículas e a escolha está condicionada as propriedades físico-químicas do fármaco e da rota de liberação desejada. As principais características a serem avaliadas nas nanopartículas são: tamanho, eficiência de encapsulação, potencial zeta e perfil de liberação (HANS & LOWMAN, 2002).

A liberação do fármaco das nanopartículas depende de uma série de fatores, como: (1) desorção do fármaco adsorvido na superfície da partícula; (2) difusão do fármaco através dos poros e canais da matriz polimérica; (3) difusão do fármaco através da parede polimérica, no caso de nanocápsulas; (4) erosão da matriz polimérica que provoca desprendimentos de fragmentos de polímero formando poros e canais e (5) erosão combinada com difusão (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

2.3.2 Propriedades da Poli-ε-Caprolactona (PCL)

Embora a maioria dos polímeros seja susceptível de sofrer degradação sob certas condições, a grande maioria não sofre ataque no organismo, porque as condições fisiológicas não são particularmente agressivas à sua estrutura. O único tipo de degradação esperada no interior do organismo é a hidrólise, embora existam poucos polímeros com estruturas hidrolisáveis (RICCI & MARCHETTI, 2006). A poli-ε-caprolactona (Figura 4) é um poliéster biodegradável com baixo ponto de fusão, cerca de 60 °C, que tem sido estudado como polímero para sistemas de liberação de fármacos, sendo geralmente obtido pela polimerização por abertura do anel ε-caprolactona (ROSA, 2002).

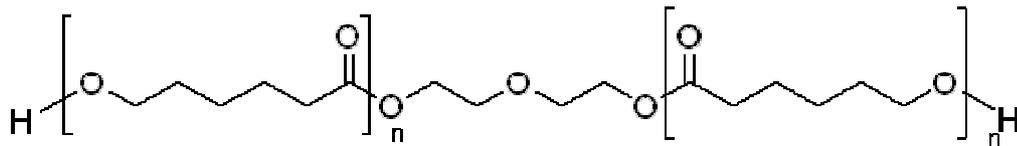


Figura 4. Estrutura da poli-ε-caprolactona.

A degradação *in vitro* ocorre essencialmente por erosão homogênea em dois estágios: o primeiro ocorre por cisão dos grupos ésteres da cadeia, acompanhada por perda linear do peso molecular, sendo sua duração dependente do peso molecular inicial. O segundo estágio começa na faixa de massa molecular abaixo de 15.000 Daltons e além da perda em massa molecular, ocorre também perda da força de tensão (PITT, 1981). A degradação *in vitro* pode ser aumentada na presença da enzima lipase (AMIJI & CHAWLA, 2002). A PCL é solúvel à temperatura ambiente em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2-nitropropano. Apresenta ainda baixa solubilidade em acetona, 2-butanona, etil acetato, dimetilformaldeído, acetonitrila e é insolúvel em álcool e dietil éter (SINHA *et al.*, 2004). A degradação *in vivo* é acelerada por esterases e por adsorção de proteínas plasmáticas (THOMA & SCHUTERMANN, 1991). Esta adsorção faz com que as

moléculas do polímero passem para uma forma expandida, aumentando a sua solubilidade e, conseqüentemente, acelerando a sua degradação (MAKINO *et al.*, 1987).

2.3.3 Estratégias para a encapsulação de fármacos

Na escolha do método de encapsulação é importante conhecer as características físico-químicas da substância a ser encapsulada e do polímero. Quanto à substância, deve-se conhecer a polaridade, a solubilidade e a estabilidade frente à luz, ao oxigênio e ao calor; e, com relação ao polímero, deve-se conhecer a polaridade, a solubilidade, a taxa de degradação, a estabilidade e o ponto de fusão. Essas características auxiliam na escolha do método de encapsulação (RICCI & MARCHETTI, 2006). Devido à solubilidade preferencial em solventes orgânicos voláteis, o método a ser utilizado para a preparação de nanopartículas de PCL nesta dissertação, foi o método da dupla emulsificação e evaporação do solvente (HANS & LOWMAN, 2002).

2.3.4. Seleção de ácidos aminados e de derivados para geração de cloraminas

Quando as células são expostas ao ácido hipocloroso na presença de ácidos aminados, esses compostos reagem entre si e formam as cloraminas que podem induzir apoptose celular (ENGLERT & SHACTER, 2002). Estudos feitos por outros autores avaliaram o potencial de alguns ácidos aminados para indução de apoptose (WAGNER *et al.*, 2002). A glutamina foi testada em várias concentrações e foi capaz de induzir apoptose celular quando em associação a CECBI, comprovada através da fragmentação de DNA e de testes morfológicos (VEIGA *et al.*, 2005). As cloraminas têm diferentes níveis de estabilidade que dependem da estrutura dos aminogrupos. Assim, foram selecionados ácidos aminados com diversidades estruturais com o intuito de avaliar tanto o comportamento na nanopartícula e a sua influência no processo de biodisponibilidade, quanto à estabilidade e a importância estérica e eletrônica, as quais estão

diretamente ligadas à formação de derivados do tipo cloramina. De posse destes dados, os seguintes ácidos aminados foram selecionados: L-tirosina e L-triptofano por apresentarem anel aromático em sua estrutura permitindo assim a sua análise por espectrofotometria UV-Vis e a glutamina. Até o presente momento não foram publicados trabalhos que associem ácidos aminados à eletroterapia tumoral, com exceção da glutamina que foi testada por Veiga e colaboradores (2005) em linhagens humanas leucêmicas.

Os efeitos da corrente elétrica podem ser potencializados quando associado a outras formas terapêuticas, como: quimioterápicos (JANIGRO *et al.*, 2006; SERSA *et al.*, 2008); fármacos de aplicação tópica (HOWARD *et al.*, 1995); terapia gênica (KANG *et al.*, 2008) e nanoesferas para liberação transdérmica (NICOLI *et al.*, 2000). A efetividade da eletroterapia já está bem estabelecida, no entanto, o desafio atual é aumentar ainda mais a sua eficácia. Com objetivo de potencializar os efeitos antitumorais da eletroterapia foram produzidas nanopartículas de PCL contendo ácidos aminados, as quais foram adicionadas ao meio eletrolítico e associadas ao fluxo anódico, visando avaliar se sob estas condições experimentais a morte celular por apoptose poderia ser otimizada.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver um sistema de liberação nanoparticulado de poli- ϵ -caprolactona contendo um ácido aminado e submetê-lo a uma corrente elétrica contínua de baixa intensidade visando avaliar sua toxicidade frente à linhagem de melanoma murino B16F10.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir curvas de dose resposta da linhagem B16F10 frente ao estímulo elétrico;
- Avaliar a reversibilidade dos danos celulares induzidos pela CECBI;
- Avaliar a citotoxicidade da associação da corrente elétrica contínua com ácidos aminados livres;
- Selecionar ácidos aminados para encapsulação em Np de poli- ϵ -caprolactona;
- Utilizar o método de dupla emulsificação e evaporação do solvente para a produção dos sistemas nanoparticulados;
- Caracterizar as nanopartículas através de microscopia óptica e eletrônica;
- Analisar o tamanho das nanopartículas pela técnica de espalhamento de luz dinâmica;
- Determinar a carga superficial das Np pelo potencial Zeta;
- Avaliar o rendimento do processo e a eficiência de encapsulação;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* dos sistemas nanoparticulados;
- Avaliar a citotoxicidade da associação do fluxo anódico com os sistemas nanoparticulados frente à linhagem B16F10.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Solventes, reagentes e meio de cultura

Álcool Polivinílico (PVA) – VETEC;

Antibióticos (Estreptomicina/Penicilina) – GIBCO;

Azul de tripan – VETEC;

Diclorometano (DCM) – VETEC;

Dimetilsulfóxido (DMSO) – SIGMA-ALDRICH®;

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético – SIGMA-ALDRICH®;

Glutamina – GIBCO;

HEPES – Ácido N-2 [4- Hidroxietil piperazina] N- 2 etano sulfônico – SIGMA®;

L-tirosina – VETEC;

L-triptofano – VETEC;

Meio Dulbeco' s Modificado (DMEM) – GIBCO;

MTT: [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] – SIGMA®;

Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) – GIBCO;

Hidróxido de sódio (NaOH) – GIBCO;

Poli- ϵ -caprolactona (PCL) – SIGMA-ALDRICH®;

Soro Fetal Bovino (SFB) – GIBCO;

Tampão Salina Fosfato (PBS);

Tripsina – SIGMA-ALDRICH®.

4.2 EQUIPAMENTOS

Agitador mecânico – ULTRA-TURRAX[®] – T 25, Ika;

Balança analítica – METTLER TOLEDO – AG 204;

Banho de Ultrasson – THORNTON – T14;

Capela de Fluxo Laminar – VECO – ULFS 12;

Centrífuga clínica – 802B – MINISTAR;

Espectrofotômetro – SHIMADZU UV 2401 PC;

Estufa de cultura – FANEM – 002CB;

Fonte de Corrente Elétrica Contínua – INSTRUTERM – FA-3050;

Lavadora - Ultrasonic Clear 700 - UNIQUE;

Leitora Automática de Microplacas de 96 Poços (Elisa) – THERMOPLATE;

Liofilizador – Freeze Dry System – LABCONCO;

Microscópio Eletrônico de Transmissão – MORGANI/FEI;

Microscópio óptico AXOPLAN II / ZEISS;

Multímetro digital – ICEL – MD-6500;

Sonicador – Ultrasonic Processor – UP 100 H;

Ultracentrífuga refrigerada - BECKMAN COULTER AVANTI J-25;

Zetasizer – MALVERN, UK – Nano ZS.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Preparo do meio DMEM

Para o preparo de 900 ml de meio de cultura DMEM foram pesados 3,0 g de HEPES, 0,2 g de NaHCO_3 , 0,3 g de glutamina e dissolvidos em 900 ml de água purificada. O pH do meio, quando necessário, foi ajustado para 7,4 com NaOH 1 N. A solução final foi filtrada em membrana celular de 0,22 μm , em capela de fluxo laminar; as soluções foram distribuídas em recipientes de vidro fechados e um frasco contendo o meio recém preparado foi mantido em estufa a 37 °C, por no mínimo 48 h, para teste de esterilidade.

4.3.2 Preparo da Tripsina

A solução aquosa de tripsina foi preparada contendo: 8,0 g de NaCl, 0,4 g de KCL, 0,1 g de dextrose, 0,58 g de NaHCO_3 , 0,5 g de tripsina, 0,2 g de EDTA, 0,45 ml de vermelho fenol 1 % os quais foram dissolvidos em quantidade suficiente de água purificada para preparar 1000 ml de solução. Em seguida, a solução foi filtrada, distribuída em recipientes de vidro fechado e mantida em freezer a - 20 °C (solução estoque) e em geladeira a 8 °C (solução para uso).

4.3.3 Preparo do PBS

O tampão salina fosfato foi preparado a partir da dissolução de: 0,2 g de fosfato de potássio monobásico, 8,0 g de cloreto de sódio, 0,2 g de cloreto de potássio e 1,44 g de fosfato de sódio bibásico desidratado dissolvidos em quantidade suficiente de água purificada para preparar 1000 ml de solução. O pH da solução foi ajustado, quando necessário, para 7,4

com NaOH 1 N. A solução foi distribuída em recipientes de vidros fechados e autoclavados durante 20 min a 120 °C. Após o resfriamento os frascos foram mantidos em geladeira.

4.3.4 Preparo do Azul de Tripán

Foi preparada inicialmente uma solução estoque de 0,4 % do corante da seguinte maneira: 400 mg do corante azul de tripan foi adicionado a 90 ml de água purificada contendo 810 mg de NaCl e 60 mg de K₂HPO₄, em seguida o volume da solução foi ajustado para 100 ml com água purificada. A solução foi aquecida até solubilização completa e o pH ajustado para 7,2 com auxílio da solução de NaOH 1N. Essa solução estoque foi diluída à concentração de 0,2 %, com água purificada e mantida em geladeira.

4.3.5 Preparo do MTT

A solução de Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio foi obtida pela diluição de 50 mg de MTT em 10 ml de PBS (5 mg/ml). A solução foi armazenada ao abrigo da luz e em geladeira.

4.3.6 Preparo das soluções de ácidos aminados livres

Uma solução estoque de cada um dos ácidos aminados foi preparada na concentração de 10 mM. Para tanto, foram pesados 58,4 mg; 36,2 mg e 40,8 mg de glutamina, L-tirosina e L-triptofano, respectivamente, os quais foram diluídos em quantidade suficiente para 20 ml de PBS.

4.3.7 Preparo da suspensão de Np para análise no MET e no Zetasizer

As nanopartículas foram preparadas conforme descrito na seção 4.8, em seguida foram centrifugadas a 10000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de Np foi resuspenso em água destilada. A concentração final de Np em suspensão foi de 2,5 mg/ml para análise de tamanho no equipamento Zetasizer e 0,5 mg/ml para análise de morfologia no MET.

4.3.8 Preparo da suspensão celular para análise do potencial Zeta

As células foram soltas da garrafa de cultura com auxílio da solução de tripsina. A suspensão celular foi centrifugada para remoção da solução de tripsina e ressuspensa em 2,0 ml de DMEM. Após a homogeneização em meio de cultura, as células foram contadas em câmara de Neubauer e uma suspensão celular de 5×10^5 céls/ml teve seu potencial Zeta avaliado no equipamento zetasizer.

4.3.9 Manutenção das culturas de células

Neste estudo foi utilizada a linhagem celular aderente de melanoma murino resistente a múltiplas drogas (B16F10). Para manutenção do estoque, as culturas foram congeladas em nitrogênio líquido com 95 % de SFB e 0,5 % de dimetilsulfóxido (DMSO). Durante os experimentos as células foram mantidas em garrafas de cultivo de 25 cm², com três passagens ou repiques semanais, usando como fonte nutricional o meio DMEM acrescido de glutamina, bicarbonato de sódio, tampão HEPES, estreptomicina e penicilina, suplementado com soro fetal bovino a 10 %.

4.3.10 Modelo experimental para estimulação elétrica

O modelo experimental de eletroestimulação é constituído por uma placa de 24 poços com volume interno de 3 cm^3 , interligados por pontes de papel de filtro que permitem a passagem do fluxo eletroiónico (FEI). A esta placa foi adaptada uma tampa removível contendo eletrodos de platina de 1 cm^2 , que ficam embebidos nos poços conforme observado na Figura 5. Esse sistema experimental possibilita a avaliação dos eventos associados à polaridade da corrente aplicada: o poço conectado ao pólo positivo é chamado de fluxo anódico (FA); o poço conectado ao pólo negativo é chamado de fluxo catódico (FC) e o poço que tem contato apenas com o fluxo de elétrons gerado pela corrente é chamado de fluxo eletroiónico (FEI). Uma fonte de corrente elétrica externa gera a diferença de potencial (ddp) a qual é monitorada por um multímetro digital (VEIGA *et al.*, 2005).



Figura 5. Sistema experimental para estímulo elétrico. À esquerda: Fonte geradora de CE; no centro: multímetro digital; à direita: garrafa para cultivo de células e placa acrílica com tampa removível a qual foram adaptados eletrodos de platina e cabos condutores.

4.3.11 Preparo das células para o tratamento com CECBI

Para os experimentos de estimulação elétrica, as células foram lavadas duas vezes com 2 ml de PBS para remoção do meio de cultura; em seguida, foram removidas da placa de 24 poços com 2 ml de tripsina, por 2 min, e resuspensas com 2 ml de meio DMEM com 10 % de SFB, para neutralização da tripsina. Para quantificação do número de células foram transferidas para um tubo falcon e centrifugadas por 1 min, a 1000 rpm, em centrífuga clínica; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspensão em 2 ml de meio DMEM para contagem em câmara de Neubauer. Para a contagem foram utilizados 25 µl da suspensão de células e 25 µl de uma solução aquosa de azul de tripan 0,4% (p/v). Este corante possui alta massa molecular e somente permeia as células com membrana plasmática danificada. No microscópio óptico as células íntegras se apresentam translúcidas, enquanto que as células com rupturas na membrana celular se apresentam coradas. A câmara de Neubauer foi utilizada para quantificação do número de células, de acordo com a equação 1:

$$N^{\circ} \text{ de células/ml} = \frac{(\text{Total das células presente nos 4 quadrantes}) \times 2 \times 10^4}{4} \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

4 – Média aritmética do total de células contadas nos quatro quadrantes maiores da câmara de Neubauer;

2 – Fator de diluição;

10⁴ – Fator de conversão da câmara de Neubauer.

Após quantificação, as células B16F10, na concentração de 5,0 x 10⁵ células/ml, foram distribuídas em placa de 24 poços contendo meio nutricional DMEM acrescido de 10 % SFB. Após 24 horas (tempo necessário para adesão celular) o meio foi retirado e 2 ml de PBS foram adicionados a cada um dos poços.

4.3.12 Ensaio de citotoxicidade pelo método MTT

O método MTT mede a atividade mitocondrial de células viáveis, sendo sensível para avaliar a citotoxicidade e a atividade celular (MOSMANN, 1983). O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT pelas células, o qual é reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazan. Este produto de coloração púrpura é acumulado dentro da célula e após solubilização no solvente dimetilsulfóxido (DMSO) pode ser quantificado em espectrofotômetro do tipo ELISA ($\lambda = 490 \text{ nm}$). Alterações na atividade mitocondrial celular resultam em mudanças na quantidade de formazan produzido e, conseqüentemente na absorbância, o que permite quantificar a citotoxicidade do tratamento de maneira indireta (MOSMANN, 1983).

Em nossas condições experimentais 180 μl da suspensão celular foram incubadas com 20 μl de MTT (5,0 mg/ml em PBS), por 3 horas e 24 horas a 37 °C, na ausência de luz. Em seguida, as células, distribuídas em quintuplicata, foram centrifugadas e ressuspensas em 200 μl de DMSO. A absorbância foi lida em leitor de placas do tipo ELISA e comparada com aquela obtida com as células sem tratamento.

4.3.13 Citotoxicidade do tratamento elétrico

Após o preparo das células descrito na seção 4.3.11 as células foram estimuladas com 2 mA, utilizando o modelo experimental demonstrado na seção 4.3.10. Os tempos escolhidos para a construção da curva dose-resposta foram: 2, 4, 6, 8, 10 minutos, com intervalo de 5 minutos a cada 2 minutos de eletroestimulação (HOLANDINO *et al.*, 2000). Após a estimulação elétrica o meio reacional foi retirado e as células foram ressuspensas em meio nutricional e distribuídas em placas de 96 poços para ensaio de citotoxicidade, de acordo com a

seção 4.3.12. Os estudos de quantificação do número de células foram realizados como descrito na seção 4.3.14.

4.3.14 **Quantificação do número de células após estímulo anódico**

A quantificação do número de células foi realizada pelo método de exclusão do azul de tripan que avalia a integridade da membrana celular e permite a quantificação do número de células. Nesta análise, as células eletroestimuladas, assim como as que não receberam o estímulo elétrico (grupo controle), foram lavadas por centrifugação, para retirada dos produtos de eletrólise e meio eletrolítico (tampão PBS) e resuspensas em 2 ml de meio DMEM, suplementado com 10% (v/v) de SFB, na concentração de cerca de $1,5 \times 10^5$ cél/ml. Em seguida, as células foram plaqueadas novamente em placa de 96 poços e incubadas a 37°C , por 24 e 48 horas. Ao final desta incubação, as células foram tripsinizadas com 50 μL de tripsina por cerca de 2 min e, em seguida, foram adicionados 50 μL de meio com soro para neutralização da tripsina. Alíquotas de 20 μL foram retiradas de cada situação experimental e diluídas com o mesmo volume do corante azul de tripan. O número de células foi então quantificado em câmara de Neubauer, através de microscopia óptica (HOLANDINO *et al.*, 2000). Foram consideradas como número de células iniciais (tempo zero de incubação) a quantidade de células distribuídas em cada poço após estimulação anódica.

4.3.15 Citotoxicidade do tratamento elétrico quando associada a ácidos aminados livres

As células utilizadas nesse estudo foram preparadas de acordo com a seção 4.3.11; no entanto, após a remoção do meio de cultura foram adicionados 2 ml de PBS contendo um dos seguintes ácidos aminados: L-tirosina (L-tir), L-triptofano (L-trp) e glutamina (Glut). Foram utilizadas três diferentes concentrações de ácidos aminados, a saber: 0,5; 1,0 e 1,5 mM (VEIGA *et al.*, 2005). O sistema foi então submetido ao fluxo anódico (2 mA) por 6 minutos, com intervalo de 5 minutos a cada 2 minutos de eletroestimulação, utilizando o modelo experimental descrito na seção 4.3.10. A citotoxicidade do tratamento foi analisada pelo ensaio do MTT (ver seção 4.3.12).

4.3.16 Preparo das Np de poli- ϵ -caprolactona encapsuladas com AA

Vários métodos são utilizados na preparação de nanopartículas poliméricas. Para encapsular compostos de natureza hidrofílica, o mais utilizado é a técnica de emulsão múltipla ou método da dupla emulsificação e evaporação do solvente (DEES). Inicialmente a droga hidrofílica e um estabilizante são dissolvidos em água; essa primeira emulsão é preparada pela dispersão da fase aquosa dentro de um solvente orgânico contendo o polímero dissolvido, o qual é então reemulsificado em outra fase aquosa contendo um estabilizante. Por último, o solvente orgânico é evaporado e as nanopartículas são coletadas por centrifugação, lavadas e liofilizadas (LOWMAN & HANS, 2002).

Para a preparação das nanopartículas cerca de 10,0 mg/ml de L-trp e 0,4 mg/ml de L-tir foram pesados. A solubilização foi feita com 1,0 ml de água destilada, com o auxílio de um banho de ultrassom por 20 minutos. A cada uma das duas soluções foi adicionada 1,0 ml de uma fase aquosa contendo PVA 2%. Conforme esquematizado na Figura 6, 2 ml da fase aquosa foram emulsificados em 5,0 ml de diclorometano contendo 100 mg de PCL (fase

orgânica). Essa primeira emulsão (A/O) foi gotejada por 5 minutos em uma solução aquosa externa de PVA a 0,5 % contendo 300 mg de L-triptofano e 30 mg de L-tirosina, para a preparação de Np contendo L-triptofano e L-tirosina, respectivamente. Em um primeiro momento foi utilizado o equipamento Ultra-turrax® (T 25, Ika) na velocidade de 15000 rpm, mas também foi realizado o mesmo procedimento com o auxílio de um sonificador (Ultrasonic Processor – UP 100 H) à potência de 100 Watts, amplitude de 60 e ciclo contínuo. O diclorometano foi evaporado à temperatura ambiente (28 °C), com suave agitação, promovida por um agitador magnético, durante 3 horas. As nanopartículas em suspensão foram centrifugadas em ultracentrífuga a 20 °C (BECKMAN COULTER AVANTI J-25) durante 40 min, com velocidade de 10000 rpm. O sobrenadante foi armazenado para análises posteriores e as nanopartículas ressuspensas em água e novamente levadas a centrifugação. Este processo de lavagem foi repetido três vezes para total remoção dos resíduos de diclorometano, do ácido aminado não encapsulado e do tensoativo. Após o processo de purificação as nanopartículas foram secas por liofilização e armazenadas em dessecador (SANTOYO *et al.*, 2002; HASAN *et al.*, 2007; RICCI & MARCHETTI, 2006).

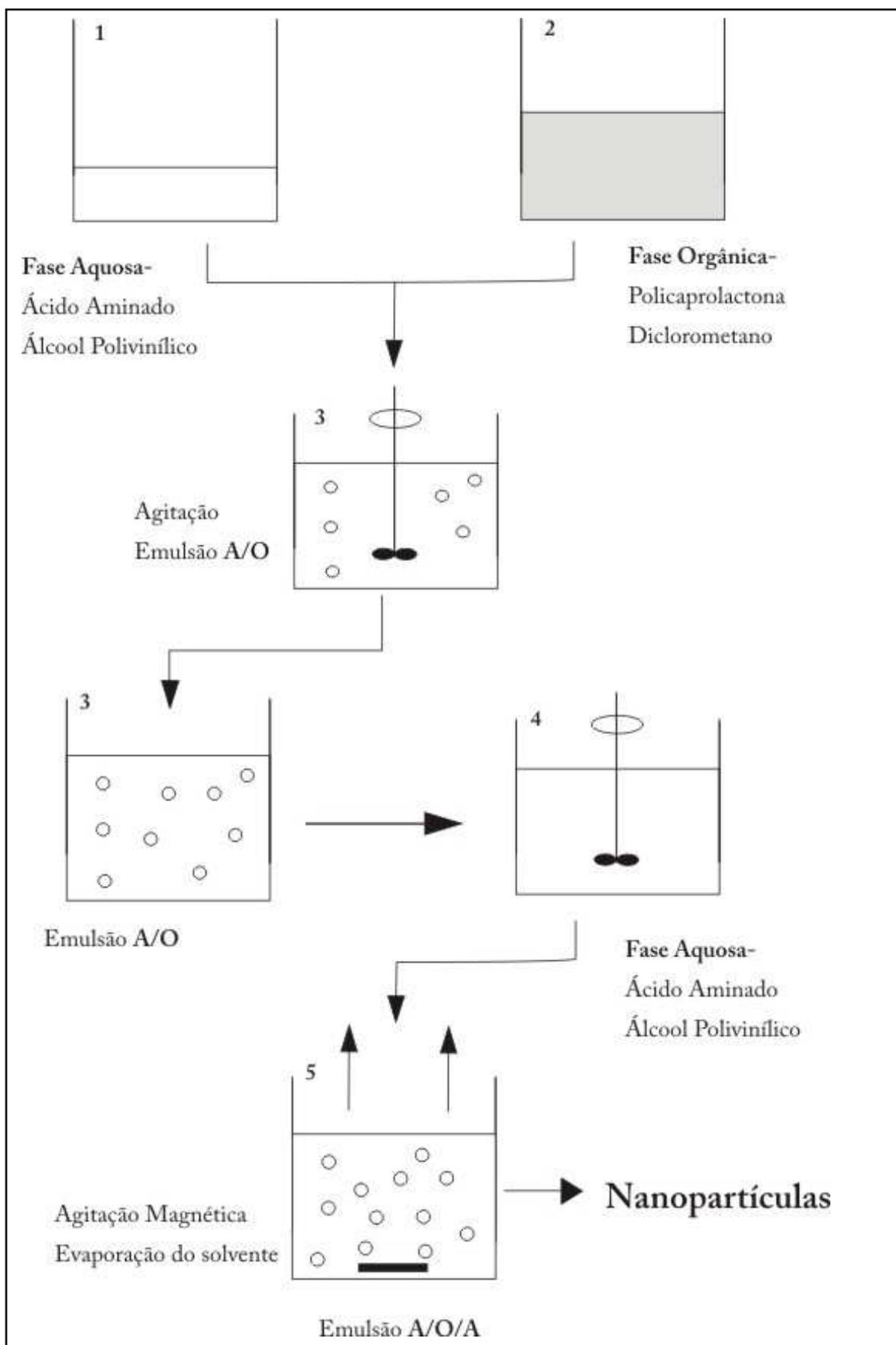


Figura 6. Fluxograma do processo de obtenção de nanopartículas pelo método DEES. A/O: emulsão água/óleo; A/O/A: dupla emulsão água/óleo/água.

4.3.16.1 Caracterização das nanopartículas através de microscopia óptica

Imediatamente após a evaporação do diclorometano, 1,0 ml da suspensão foi centrifugado em centrífuga clínica (802B – MINISTAR), a 4000 rpm por 20 min. Após centrifugação, foram retirados 5 μ l do depósito contendo as Np os quais foram ressuspensos com 5 μ l de glicerina, para diminuição do movimento browniano. Em seguida o material foi acondicionado sobre lâmina e lamínula para observação em microscopia óptica. As imagens foram focalizadas no microscópio óptico (Axioplan-Zeiss) em objetiva de 100 x, analisadas no software AnaliSIS e registradas em câmera digital (color viewXS). O programa AnaliSIS analisa a morfologia, a área e os diâmetros mínimo, médio e máximo das partículas. A caracterização foi realizada com as nanopartículas preparadas com auxílio do ultra-turrax® e sonicador. A fim de obter partículas menores, realizamos o mesmo método de preparo de nanopartículas, porém com auxílio de um sonicador (Figura 7). Esse equipamento permite a quebra das partículas grandes em tamanhos menores, sendo que este tamanho diminui com o aumento do tempo de sonicação (ASUA, 2002).

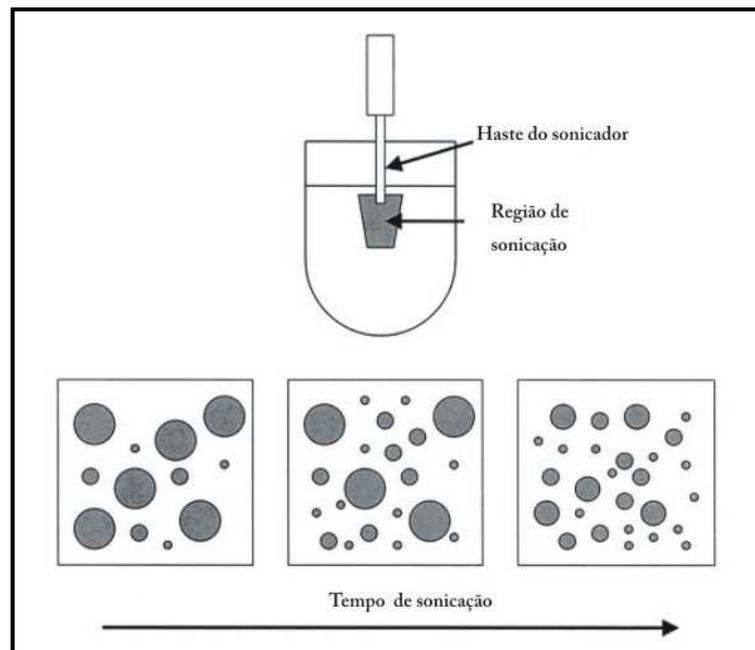


Figura 7. Esquema do processo de sonicação (ASUA, 2002)

4.3.16.2 Caracterização da morfologia das nanopartículas por MET

A morfologia das partículas foi analisada através de microscopia eletrônica de transmissão (MET). O método utilizado foi de contrastação, a saber: 10 µl da suspensão contendo 50 mg de nanopartículas em 20 ml de água destilada foram colocados sobre uma grade revestida de carbono e fixado com 10 µl de acetato de uranila 3% (p/v), durante 1 min. A grade foi seca e examinada no MET (TEWES *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 1984).

4.3.17 Análise do tamanho das partículas

O tamanho das partículas foi analisado no equipamento Zetasizer (Malvern Nano ZS) com leitor a laser de 633 nm, operado com um ângulo de 173° e temperatura de 25 °C. O equipamento é capaz de medir tamanhos que variam de 0,6 nm a 6 µm e é acoplado a um software, DTS, que permite calcular: o diâmetro médio das partículas, o gráfico de distribuição de tamanho, além do índice de polidispersividade, o qual avalia a qualidade da amostra.

As amostras de nanopartículas encapsuladas com L-tirosina, L-triptofano e não encapsuladas foram diluídas 1: 400 (p/v) em água destilada e um volume de 1 ml foi adicionado à uma cubeta de plástico. Cada uma das leituras foi feita em triplicata.

4.3.18 Análise do potencial eletrocinético das Np

As análises do potencial zeta foram realizadas através do equipamento Zetasizer (Malvern Nano ZS) e os valores obtidos calculados pelo software DTS (HASAN *et al.*, 2007). As amostras de nanopartículas contendo L-tirosina, L-triptofano e isentas de ácidos aminados foram diluídas em água purificada contendo 0,1 mM de NaCl e o potencial Zeta foi calculado

a partir dos valores de mobilidade eletroforética de acordo com a equação de Henry (Equação 2).

$$U_E = \frac{2\varepsilon \zeta f(ka)}{3 \eta} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

U_E : mobilidade eletroforética;

ζ : potencial Zeta;

ε : constante dielétrica;

η : viscosidade;

$f(ka)$: função de Henry.

Os valores de mobilidade eletroforética foram calculados a partir da média das 100 leituras realizadas para cada uma das amostras. A determinação experimental da mobilidade eletroforética baseia-se na medição da velocidade de migração num campo elétrico, a temperatura constante. O método utiliza uma cela capilar na qual estão inseridos dois eletrodos (ânodo e cátodo) em cada uma das extremidades (Figura 8). Quando uma diferença de potencial é aplicada, as partículas que se encontram em suspensão no interior da câmara movem-se e o seu deslocamento por unidade de tempo é determinado. Os fatores que influenciam no potencial Zeta são: o pH da solução; a concentração de aditivos, tais como, surfactantes, polímeros, proteínas, etc (ZETASIZER NANO USER MANUAL).

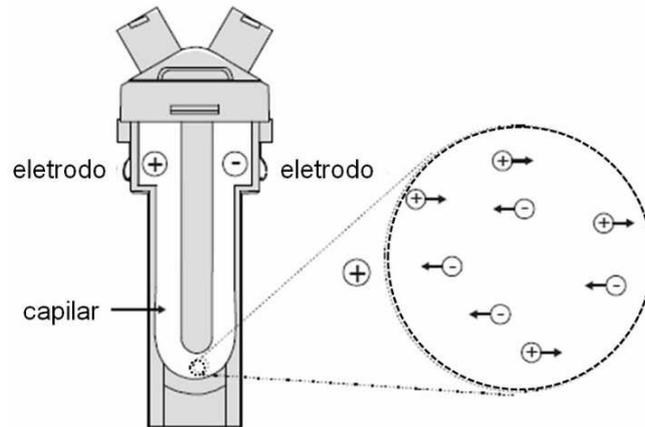


Figura 8. Cella capilar com eletrodo. Em destaque o movimento de cargas na camada estacionária.

O movimento desordenado da partícula, chamado Browniano, afeta os íons contribuindo para a formação de uma camada difusa. Os íons da superfície da partícula acrescidos daqueles da camada difusa e das cargas do líquido adjacente, dão origem a camada denominada: “dupla camada elétrica”. Esta dupla camada elétrica é dividida por um limite imaginário designado por “plano Stern” que separa os íons adsorvidos à superfície (camada Stern) dos que constituem a camada difusa (Figura 9). Quando a partícula se move, os íons dentro do limite movem-se com ela, mas alguns íons fora desse limite não se movem. Esse limite entre a camada Stern e a superfície da partícula é chamado de superfície de corte hidrodinâmico ou “slipping plane”, e dentro deste o fluido se mantém estacionário. O comportamento eletroforético de uma partícula depende, assim, do potencial na superfície de corte o qual é designado potencial eletrocinético ou potencial zeta (ζ) (Figura 9 (ZETASIZER NANO USER MANUAL)).

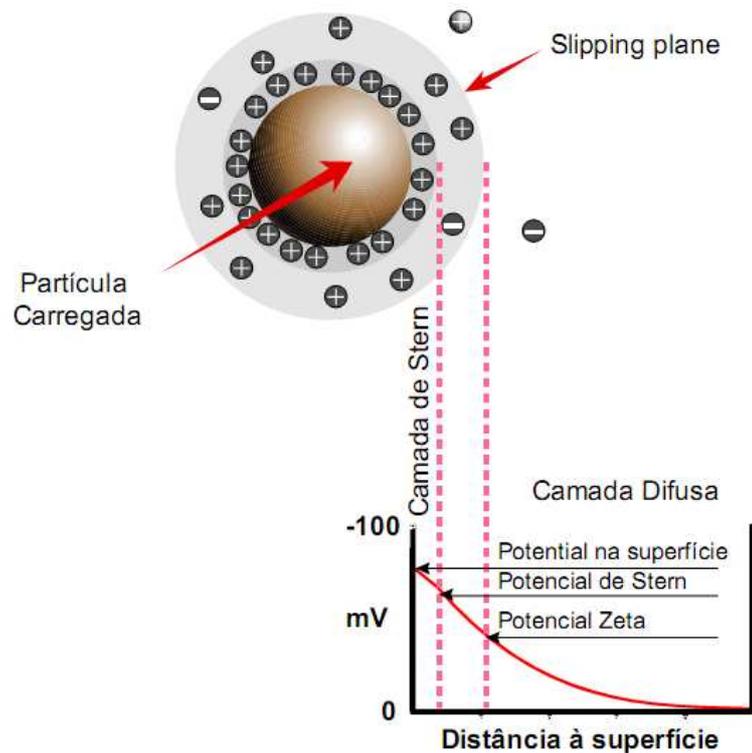


Figura 9. Variação do potencial eletrocinético com a distância à superfície de uma partícula carregada.

Slipping plane: superfície de corte hidrodinâmico

4.3.19 Quantificação do ácido aminado por espectrofotometria

Esse ensaio foi realizado com o objetivo de quantificar a concentração de ácido aminado obtido no estudo de perfil de liberação *in vitro* e também para determinar o teor de AA encapsulado após o preparo das Np de PCL. A curva analítica é o método de quantificação mais utilizado e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações da substância em estudo. Os ácidos aminados foram quantificados em espectrofotômetro (SHIMADZU UV 2401 PC), à temperatura ambiente 28°C, segundo metodologia descrita pela Farmacopéia Americana, utilizando uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico (USP, 2004). O comprimento de onda selecionado para o

L-triptofano e a L-tirosina foi de: 280 nm e 275 nm, respectivamente. A curva analítica foi obtida pela relação entre os valores de absorvância dos AA em solução em diferentes concentrações cuja relação foi definida pela equação da reta. Para a maioria das técnicas de quantificação, uma relação linear de primeira ordem é observada entre a resposta do detector (y) e a concentração da substância, podendo ser descrita pela equação da regressão linear: $y = ax + b$, onde b é a intersecção da curva analítica com o eixo y, quando $x = 0$ e a é a inclinação da reta. Também é possível calcular o coeficiente de correlação (r) o qual fornece uma estimativa da qualidade da curva obtida, uma vez que quanto mais próximo de 1 menor é a dispersão dos pontos experimentais e, conseqüentemente, menor é a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão positiva. Portanto, a curva analítica foi construída para os ácidos aminados: L-tirosina e L-triptofano, a fim de determinar a linearidade, ou seja, a capacidade do método analítico gerar resultados proporcionais à concentração das espécies em análise, dentro de uma faixa analítica especificada, na qual é possível relacionar uma variável dependente (medida da absorvância) através da variável independente (concentração).

4.3.19.1 Obtenção da curva analítica do L-triptofano

As soluções aquosas foram preparadas em balão volumétrico de 50,0 ml a partir de uma solução estoque de exatamente cerca de 4,0 mg de L-triptofano. Com auxílio de pipetas automáticas, diferentes alíquotas foram retiradas desta solução cuja concentração final de leitura no espectrofotômetro foi de: 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 ($\mu\text{g/ml}$). As análises foram feitas em triplicata ($n=3$); através destas curvas analíticas o coeficiente de correlação (r) e a equação da reta foram obtidos e utilizados para a quantificação dos ácidos aminados encapsulados em nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona.

4.3.19.2 Obtenção da curva analítica da L-tirosina

As soluções aquosas foram preparadas em balão volumétrico de 100,0 ml a partir de uma solução estoque de exatamente cerca de 2,0 mg de L-tirosina. Com auxílio de pipetas automáticas, diferentes alíquotas foram retiradas desta solução para o preparo de soluções cuja concentração final de leitura no espectrofotômetro foi de: 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 (µg/ml). As análises foram feitas em triplicata (n=3); através destas curvas analíticas o coeficiente de correlação (r) e a equação da reta foram obtidos e utilizados para a quantificação dos ácidos aminados encapsulados em nanopartículas de poli-ε-caprolactona. (RICCI, 2005).

4.3.20 Rendimento do processo e eficiência de encapsulação

A massa das partículas obtidas após o processo de liofilização foi pesada para cálculo do **rendimento do processo** (RICCI & MARCHETTI, 2006; FENG & HUANG, 2001), segundo a equação (3):

$$R (\%) = (M_S/M_F) \times 100 \text{ (Equação 3)}$$

Onde R (%) = rendimento do processo; M_S = massa de partículas que foi recuperada após o processo de secagem; M_F = massa de PCL acrescida da massa do ácido aminado na formulação.

A quantidade de ácido aminado encapsulado nas nanopartículas foi avaliada em termos de **eficiência de encapsulação** que consiste na relação entre a quantidade de AA encapsulado e a de polímero, de acordo com a equação (4):

$$(\mu\text{g de AA/ mg de PCL}) = (M_1/M_2) \text{ (Equação 4)}$$

Onde: M_1 = Massa do ácido aminado em µg encontrada nas nanopartículas e M_2 = Massa em mg de PCL utilizada na formulação.

Para cálculo de M_1 a suspensão de Np encapsulada com AA foi centrifugada por 30 min a 10.000 rpm. Logo após a centrifugação, o sobrenadante foi eliminado e 10 ml de água destilada foram adicionadas às Np, as quais foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. As Np foram ressuspensas em 30 ml de água destilada e levadas para uma placa de agitação, por sete dias, à 28 °C. Após 24 h o conteúdo foi centrifugado, o sobrenadante foi removido e filtrado em membrana de nitrato de celulose de 0,22 μm de porosidade. A solução filtrada foi lida em espectrofotômetro para avaliar a quantidade de AA que estava sendo liberado. O *pellet* de Np foi resuspenso em 30 ml de água destilada, para não saturar o meio receptor, e, em seguida, levado para a placa de agitação por mais 24 h. Esse procedimento foi repetido ao longo dos 7 dias. A absorbância foi medida em 280 nm (L-triptofano) e 275 nm (L-tirosina).

4.3.21 Estudo do perfil de liberação *in vitro*

O perfil de liberação dos ácidos aminados encapsulados em poli- ϵ -caprolactona foi avaliado através de estudo de dissolução. O modelo esquemático do dissolutor está representado na Figura 10. Uma amostra de 50 mg de nanopartículas encapsuladas contendo cerca de 5,71 mg e 1,46 mg de L-triptofano e L-tirosina, respectivamente, foram ressuspensas em 10 ml de PBS. A suspensão de nanopartículas foi levada a placa de agitação magnética (200 rpm), à 37 °C. Em intervalos de: 1, 2, 3, 24, 48, 72, 96 horas, todo o conteúdo foi retirado e centrifugado a 10.000 rpm, durante 30 min. O sobrenadante foi retirado e filtrado em membrana de nitrato de celulose (0,22 μm) para análise espectrofotométrica. O precipitado foi resuspenso em novo PBS e recolocado em agitador magnético. A quantidade do ácido aminado liberado foi determinada por espectrofotometria (HASAN *et al.*, 2007).

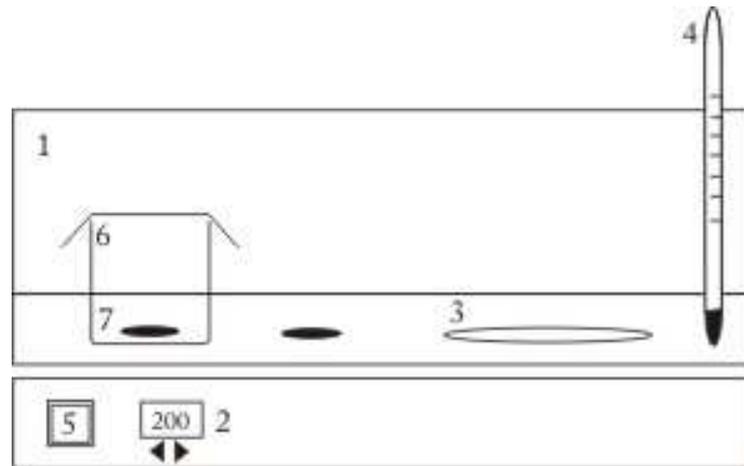


Figura 10. Esquema do dissolutor utilizado nos estudos de liberação *in vitro*. O dissolutor apresenta uma cuba de vidro contendo água para banho de aquecimento (1); uma placa de agitação magnética com botões digitais para controle da velocidade de agitação em rpm (2); resistência para aquecimento do banho (3); termômetro imerso no banho para controle da temperatura (4); botão liga e desliga (5); recipiente fechado contendo as Np em tampão PBS (6) com uma barra magnética (7) colocado no sistema para realização do ensaio de liberação *in vitro*.

4.3.22 Citotoxicidade do tratamento elétrico quando associado à nanopartículas de L-tirosina e L-triptofano

O preparo da suspensão celular foi realizado como previamente descrito na seção 4.3.11, onde as células (B16F10) na concentração de $5,0 \times 10^5$ células/ml foram distribuídas em placa de 24 poços contendo meio nutricional DMEM. Células com 24 horas de repique tiveram seu meio de cultura removido e substituído por 2,0 ml de solução salina tamponada (PBS) contendo 0,5 mg/ml das Np de L-tirosina e L-triptofano, incubadas a 37 °C, por 30 min, foram submetidas a 2mA de fluxo anódico por 6 minutos (ver seção 4.3.13).

Foram realizados os ensaios de viabilidade celular utilizando o método do MTT após 3 e 24 horas (seção 4.3.12). As Np foram adicionadas ao meio eletrolítico na concentração de 0.5 mg/ml, que corresponde a massa de AA encapsulado em Np, de cerca de 115,6 µg (L-trp) e 30 µg (L-tir). Os ácidos aminados livres foram adicionados em quantidades de cerca de 204,23 mg (L-trp) e 181,19 mg. (L-tir).

5 RESULTADOS

5.1 CITOTOXIDADE DO ESTÍMULO ELÉTRICO

A citotoxicidade do estímulo elétrico sobre a linhagem B16F10 foi avaliada pelo método do MTT, nos tempos de 2 – 10 min, imediatamente após o estímulo elétrico (5.1.1) e após 24 horas (5.1.2) de incubação em meio nutricional a 37 °C. A significância estatística dos resultados foi avaliada através do teste ANOVA.

Nas Tabelas 1-3 (Anexo A) e Figuras 11-13 estão relatados a média e o desvio padrão de no mínimo três experimentos feitos em quintuplicada, para cada situação experimental (FA; FEI; FC).

5.1.1 Avaliação da citotoxicidade imediatamente após o estímulo elétrico

Os valores médios de viabilidade da linhagem B16F10, em percentuais, no fluxo anódico (0, 2, 4, 6, 8, 10 min) com seus respectivos controles (células em PBS sem estímulo elétrico), após 3 h de incubação com o reagente MTT, estão apresentados na Tabela 1 (Anexo A) e deram origem a Figura 11.

Cada situação experimental foi comparada com o percentual médio obtido para o grupo controle (células em PBS sem estímulo elétrico) nos mesmos tempos e foram feitos 3 experimentos independentes em quintuplicada. Desta forma, verificou-se ainda que o fluxo anódico (FA) foi capaz de diminuir a viabilidade celular de maneira significativa, a partir dos 4 min de estimulação ($p < 0,01$). No tempo de 6 min foi observada uma queda de 64,6 % de viabilidade celular. Não existe diferença estatisticamente significativa no tempo de 2 min entre o estímulo anódico e o controle 2 min ($p > 0,05$). Entretanto, os tempos de 4; 6; 8 e 10 min mostraram diferença em relação ao controle, com valores de significância de $p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

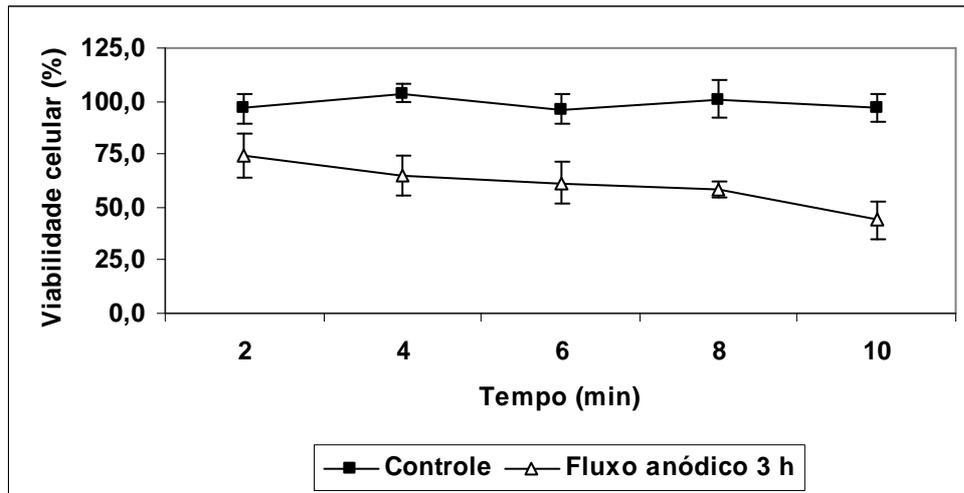


Figura 11. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10 submetida a 2 mA de fluxo anódico (Δ) em diferentes tempos e seu respectivo controle (\blacksquare). $n = 5$. O valor de 100 % na ordenada corresponde ao valor médio de viabilidade obtido para todos os controles (células não estimuladas)

No fluxo eletroiónico também foram calculados os valores médios de viabilidade celular, em percentuais, com seus respectivos controles (células em PBS sem estímulo elétrico) e estes estão apresentados na Tabela 2 em Anexo A. Para uma melhor visualização, os valores da Tabela 2 foram apresentados na Figura 12.

Os percentuais de viabilidade celular obtidos no fluxo eletroiónico não possuem diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p > 0,05$). Verificou-se que o estímulo eletroiónico não induz alterações na viabilidade celular imediatamente após o estímulo elétrico.

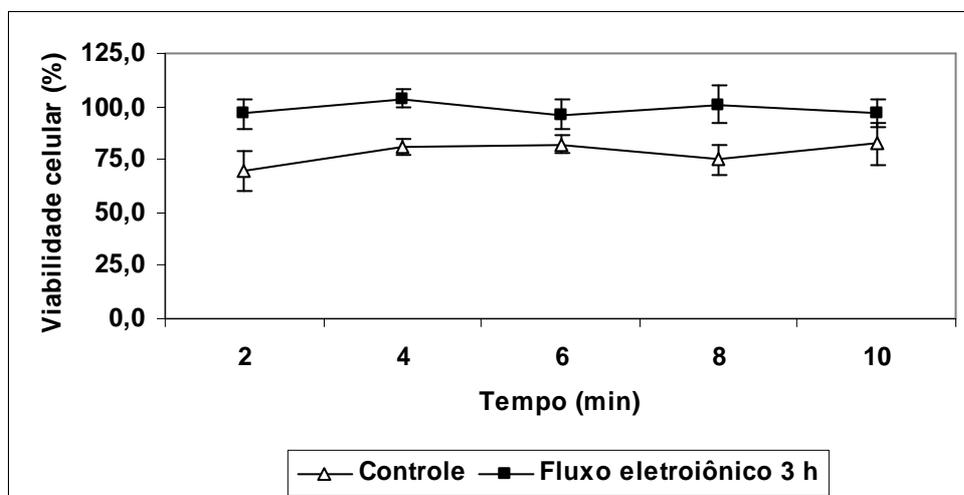


Figura 12. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10 submetida a 2mA de fluxo eletroiónico (Δ) em diferentes tempos e seu respectivo controle (\blacksquare). $n = 5$. O valor de 100 % na ordenada corresponde ao valor médio de viabilidade obtido para todos os controles (células não estimuladas)

Os valores médios de viabilidade celular, em percentuais, no fluxo catódico com seus respectivos controles (células em PBS sem estímulo elétrico), após 3 h de incubação com o reagente MTT, estão apresentados na Tabela 3 (Anexo A) e na Figura 13.

Os dados inseridos na Figura 13 demonstram que o fluxo catódico (FC) foi capaz de diminuir a viabilidade celular de maneira significativa em todas as situações experimentais ($p < 0,001$), com exceção do tempo de 2 min que não obteve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle 2 min ($p > 0,05$).

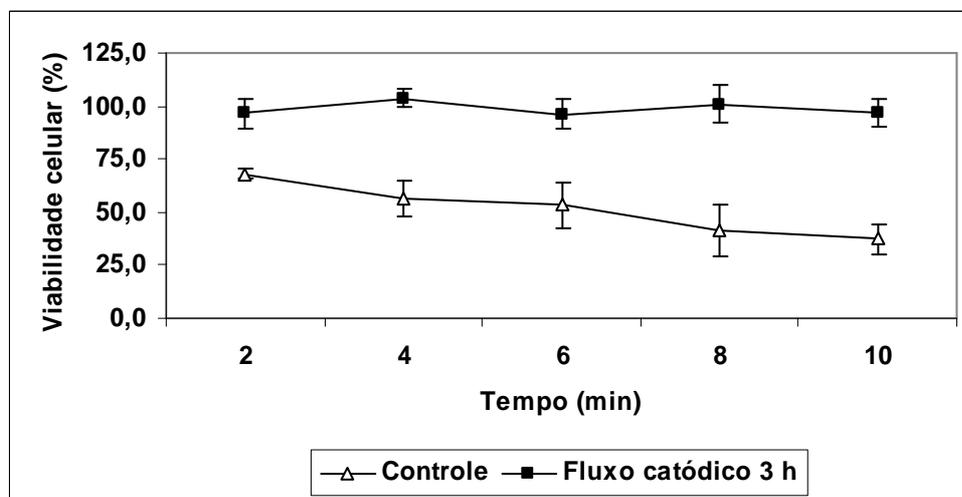


Figura 13. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10 submetida a 2 mA de fluxo catódico (Δ) em diferentes tempos e seu respectivo controle (■). $n = 5$. O valor de 100 % na ordenada corresponde ao valor médio de viabilidade obtido para todos os controles (células não estimuladas).

5.1.2 Avaliação da citotoxicidade após 24 horas do estímulo elétrico

A viabilidade celular foi avaliada após 24 horas do estímulo elétrico através do ensaio de MTT (seção 4.3.12). Nas Tabelas 1-3 (Anexo A) e nos Figuras 14 - 16 estão inseridos as médias e os desvios padrão de no mínimo três experimentos feitos em quintuplicada, para cada situação experimental (FA, FEI e FC).

A Figura 14 mostra que o fluxo anódico (FA) foi capaz de diminuir a viabilidade celular de maneira significativa nos tempos de 6, 8 e 10 min, com $p < 0,01$; $p < 0,05$; $p < 0,001$, respectivamente; desta forma, verificou-se que os danos induzidos pelo estímulo anódico

alteraram a viabilidade celular mesmo após 24 h do tratamento. Nos tempos de 2 e 4 min não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

Nesse experimento foi observado que após 24 horas de incubação a 37 °C, em meio nutricional, as células que não foram estimuladas (grupo controle) apresentaram valores de viabilidade celular maiores que aqueles obtidos após 3 horas de experimento. O meio DMEM é uma fonte nutricional importante para a proliferação celular, e por isso, as células incubadas retomam seu crescimento quando não sofrem danos causados pela estimulação elétrica, como foi visto no grupo controle. Porém, aquelas que sofreram danos causados pela estimulação elétrica não são capazes de retomar o seu crescimento normal.

Comparando os valores percentuais da viabilidade celular obtidos no fluxo anódico nos períodos de 3 h e 24 h após o tratamento, foi verificado que não houve diferença estatística entre eles ($p > 0,05$), exceto no tempo de 2 min ($p < 0,01$). Esta diferença em 2 min pode ser explicada pelo breve tempo de exposição ao estímulo elétrico, o qual permitiu uma recuperação da viabilidade celular significativa. Além disso, algumas células que possivelmente não sofreram os danos causados pela estimulação elétrica continuaram viáveis apesar da queda geral da viabilidade.

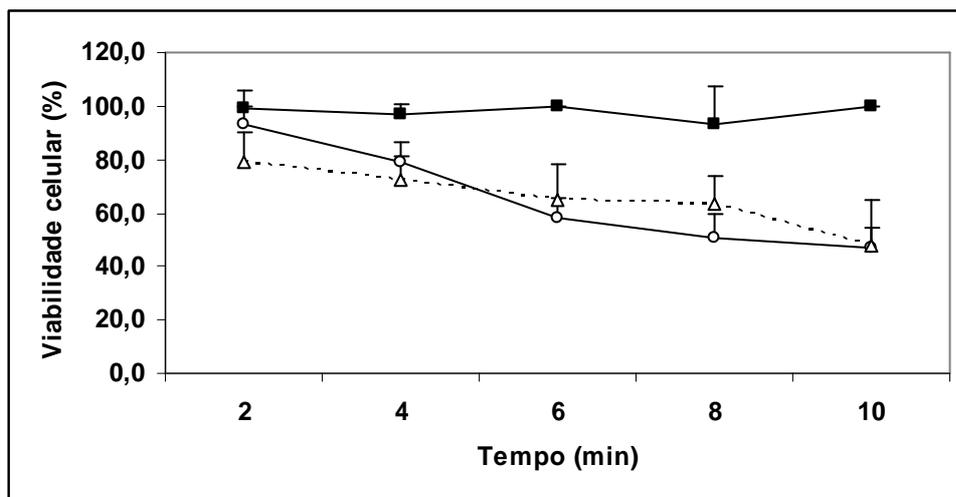


Figura 14. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10 imediatamente (Δ) e 24 h (\circ) após o estímulo anódico em diferentes tempos e seu respectivo controle 24 h (\blacksquare). $n = 5$. O valor de 100 % na ordenada corresponde ao valor médio de viabilidade obtido para todos os controles (células não estimuladas).

Na Tabela 2 (Anexo A) e na Figura 15 estão inseridos os valores médios da viabilidade celular, em percentuais, após 3 e 24 h do estímulo elétrico no fluxo eletroiónico com seus respectivos controles (células em PBS sem estímulo elétrico) nos tempos de 2, 4, 6, 8 e 10 min.

A análise estatística revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Este resultado está dentro do previsto, uma vez que no fluxo eletroiónico não há contato direto com os eletrodos, somente um fluxo de íons está presente nesta situação, o que explica um perfil semelhante aquele obtido para o grupo controle (células não estimuladas).

A análise estatística entre FEI 3h e FEI 24 h mostrou uma diferença significativa no tempo de 8 min $p < 0,05$, enquanto que nos demais tempos não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

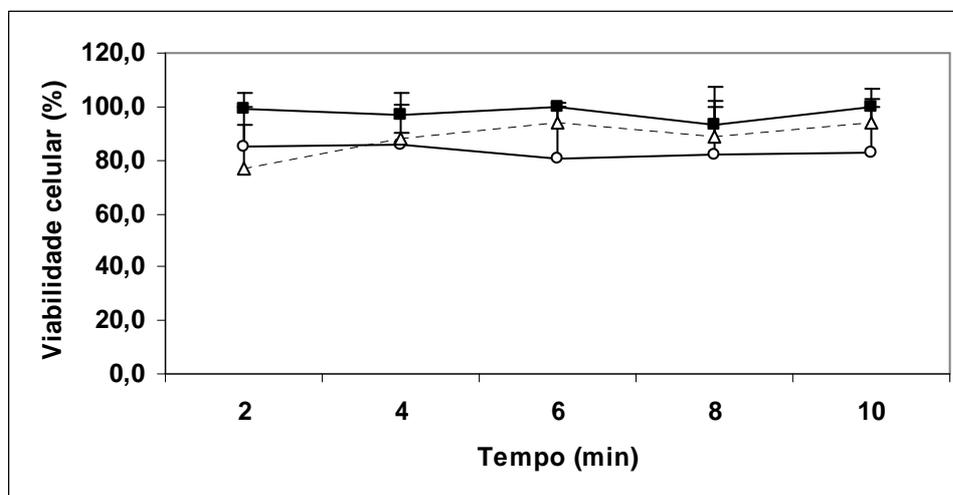


Figura 15. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10 imediatamente (Δ) e 24 h (\circ) após o estímulo eletroiónico em diferentes tempos e seu respectivo controle 24 h (\blacksquare). $n = 5$. O valor de 100 % na ordenada corresponde ao valor médio de viabilidade obtido para todos os controles (células não estimuladas).

Os dados inseridos na Figura 16 representam o percentual da viabilidade celular após estímulo catódico nos tempos de 2, 4, 6, 8 e 10 min (cada situação experimental foi comparada com o percentual médio obtidos para o grupo controle). Os valores médios da viabilidade celular estão apresentados na Tabela 3 (Anexo A).

A Figura 16 mostra que o fluxo catódico (FC) foi capaz de diminuir a viabilidade celular de maneira significativa em todas as situações experimentais ($p < 0,001$).

A análise estatística entre o FC 3 h e FC 24 h mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os vários grupos ($p > 0,05$). Observando a Figura 16 verificou-se que a viabilidade celular permaneceu com o mesmo perfil de queda, mesmo após 24 h do tratamento, indicando que não houve recuperação na viabilidade celular.

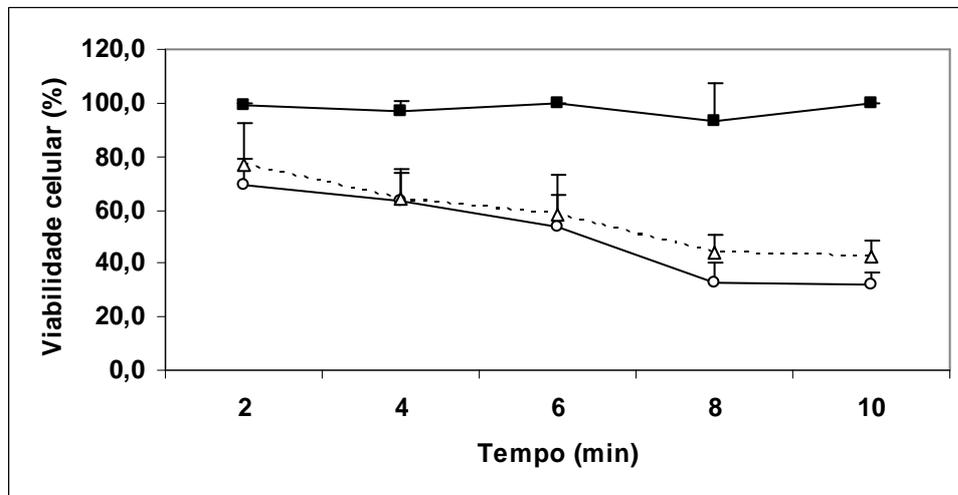


Figura 16. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10 imediatamente (Δ) e 24 h (\circ) após o estímulo catódico em diferentes tempos e seu respectivo controle 24 h (\blacksquare). $n = 5$. O valor de 100 % na ordenada corresponde ao valor médio de viabilidade obtido para todos os controles (células não estimuladas).

5.2 QUANTIFICAÇÃO DO Nº DE CÉLULAS APÓS O ESTÍMULO ANÓDICO

A fim de avaliar se o estímulo elétrico poderia alterar as taxas de proliferação da linhagem B16F10, foram realizados experimentos nos quais as células eletroestimuladas foram novamente incubadas, em meio novo, suplementado por SFB, em estufa a 37°C , para avaliação da proliferação celular, através da quantificação do número de células por azul de tripan. Estes experimentos foram avaliados somente nas células que receberam estímulo anódico nos tempos de 4 e 6 min, pois foram os tempos em que houve redução da viabilidade celular de cerca de 72,5 e 64,6, para 4 e 6 min, respectivamente (Figura 11), e além de ser a situação experimental geradora de espécies oxidantes (cloraminas). Na Figura 17 estão

representados os resultados médios de três experimentos realizados em quintuplicada. A Tabela 4 (Anexo A) representa a média \pm desvio padrão (Dp) da contagem celular feita pelo azul de tripan.

A análise estatística do número de células nos diferentes tempos (0, 24 e 48 h) mostrou diferenças significativas nos tempos de 6 min a partir de 24 horas de incubação (Figura 17), onde foi verificado uma queda expressiva do número de células que se manteve constante até 48 h de pós-tratamento ($p < 0,001$). A estimulação anódica por 4 min não induziu diferença significativa no número de células ($p > 0,05$).

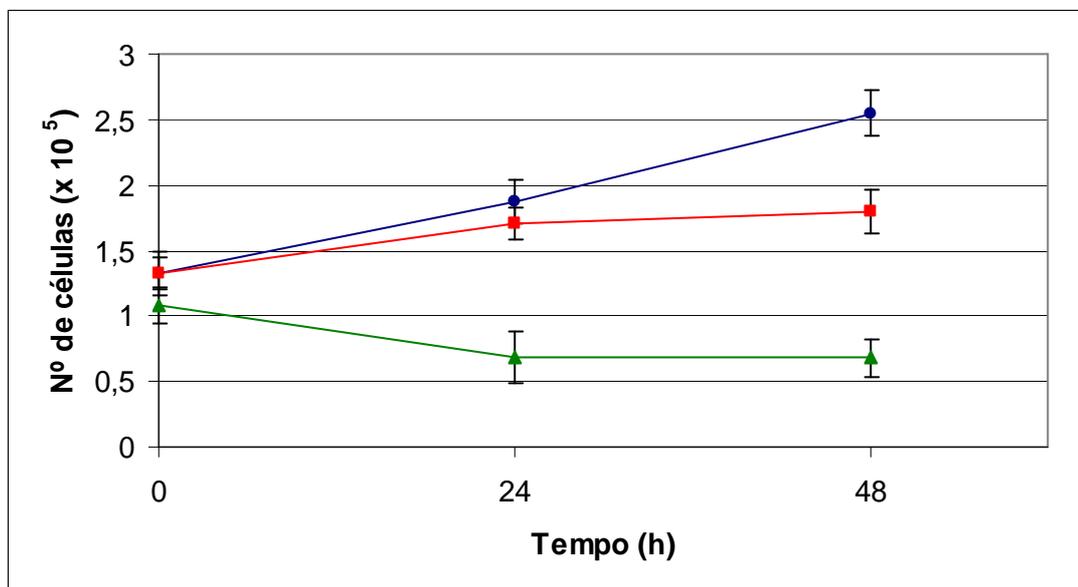


Figura 17. Número de células B16F10, quantificado pelo corante azul de tripan, após fluxo anódico de 4 min (■), 6 min (▲) e em células sem estímulo elétrico (●).

5.3 CITOTOXIDADE CELULAR QUANDO ASSOCIADA A ÁCIDOS AMINADOS LIVRES

Todos os experimentos foram realizados no FA apenas no tempo de 6 min e foram acrescentados ao meio eletrolítico, ácidos aminados, geradores de grupamento amino, na forma livre. Os sistemas foram avaliados imediatamente e após 24 horas do tratamento elétrico, como descrito na seção de métodos (seção 4.3.12). Os valores, em percentuais

médios de viabilidade celular \pm desvio padrão, estão apresentados na Tabela 5 (anexo A) e no Figura 18. Foram realizados no mínimo 3 experimentos feitos quintuplicada.

A Figura 18 mostra que houve uma diferença significativa na viabilidade celular quando os AAs foram adicionados ao meio eletrolítico e esta diferença está relacionada com o tipo de AA e a sua concentração. Assim, a glutamina inibiu a viabilidade celular de forma significativa somente na concentração de 1,5 mM ($p < 0,05$); o L-triptofano nas concentrações de 1,0 e 1,5 mM ($p < 0,05$) e a L-tirosina foi capaz de inibir nas três concentrações escolhidas com $p < 0,001$.

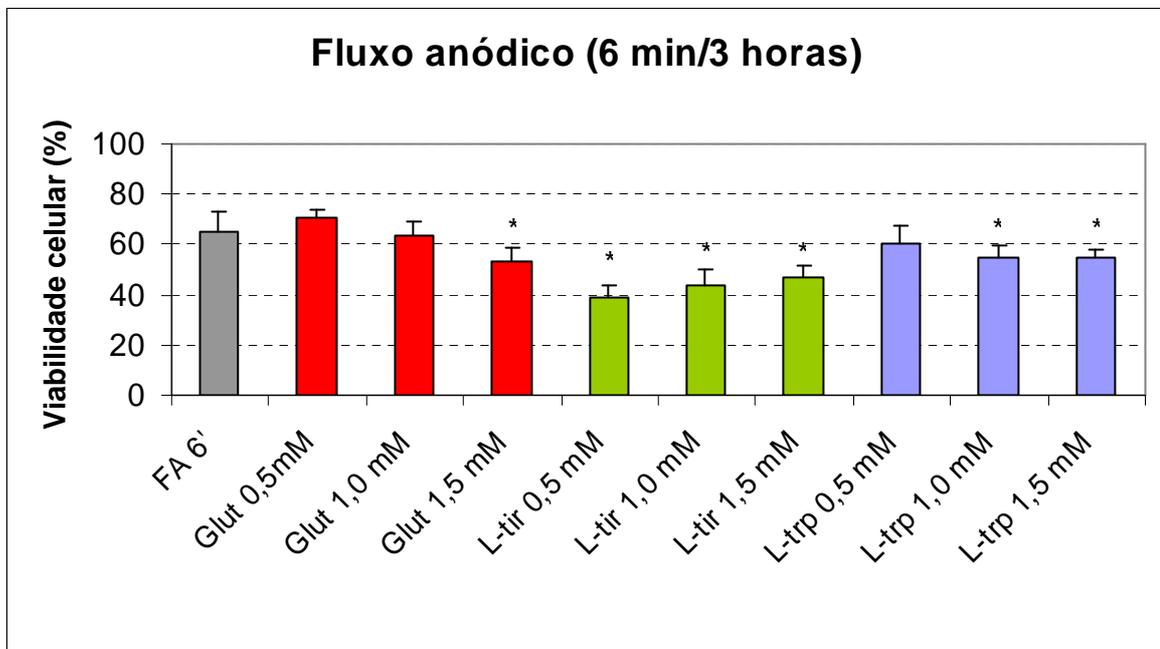


Figura 18. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10, após 3 h do tratamento no FA (■) na presença de ácidos aminados livres: Glut (■), L-tir (■) e L-trp (■), nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mM.

* Valores significativos em relação ao controle, avaliados através do método ANOVA.

A Tabela 5 (Anexo A) e a Figura 19 apresentam os percentuais médios da viabilidade celular \pm desvio padrão, após 24 horas do tratamento com fluxo anódico na presença de 3 diferentes concentrações dos ácidos aminados. As células após o tratamento foram incubadas a 37 °C em meio DMEM suplementado com 10% de SFB por 24 h.

A análise da Figura 19 mostra que houve uma diminuição significativa da viabilidade celular quando ao meio eletrolítico foram adicionados 1,5 mM de glutamina ($p < 0,001$) e L-

tirosina e L- triptofano em todas as concentrações testadas ($p < 0,001$), verificando-se que a L-tirosina apresentou uma melhor citotoxicidade quando associada à CECBI.

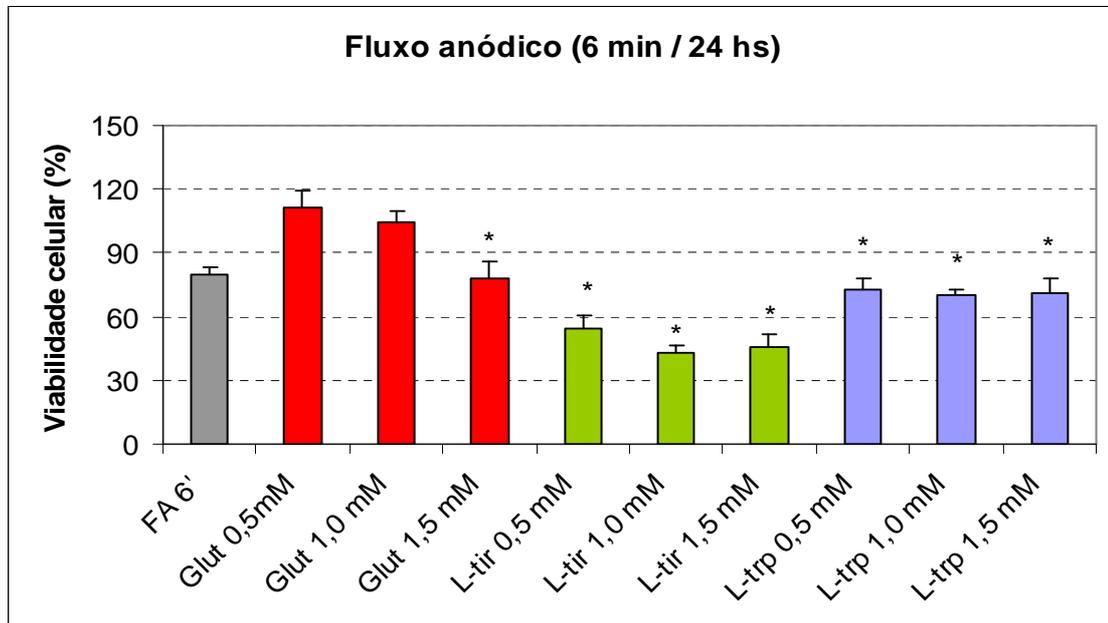


Figura 19. Percentual da viabilidade celular da linhagem B16F10, após 24 h do tratamento no FA (■) na presença de ácidos aminados livres: Glut (■), L-tir (■) e L-trp(■), nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mM.

* Valores significativos em relação ao controle, avaliados através do método ANOVA.

5.4 PREPARO DAS NP DE POLI- ϵ -CAPROLACTONA ENCAPSULADAS COM AA

O preparo das Np foi feito como descrito na seção de métodos (4.3.16) e o aspecto das diferentes fases da preparação foi esquematicamente representado na Figura 20.



Figura 20. Aspectos macroscópicos na preparação de nanopartículas (Np) de poli- ϵ -caprolactona (PCL).

- (A) Suspensão de NP de PCL contendo os ácidos aminados;
- (B) Emulsão após a evaporação do solvente diclorometano;
- (C) Sobrenadante obtido após a centrifugação;
- (D) Partículas de PCL contendo ácidos aminados liofilizados (frasco de penicilina e lâmina).

5.4.1 Caracterização das nanopartículas através de microscopia óptica

A caracterização foi feita de acordo com a seção 4.3.16.1, as Np foram analisadas de acordo com o equipamento utilizado na preparação: ultra-turrax® ou sonicador. As seções 5.4.1.1 e 5.4.1.2 apresentam o resultado destas análises.

5.4.1.1 Preparo das Np com auxílio do Ultra-turrax®

Após observação das Np em MO verificou-se que a técnica de encapsulação com auxílio do Ultra-turrax® produziu partículas de tamanho maiores que 1 μm , cuja distribuição de tamanho não foi homogênea (Figura 21).

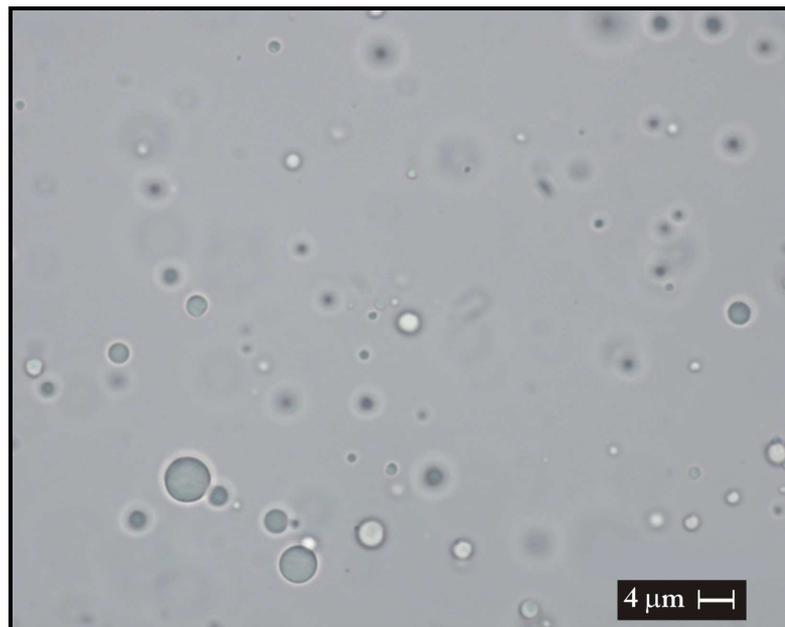


Figura 21. Micrografia das partículas de PCL encapsuladas com L-triptofano preparadas com Ultra-turrax®. Imagem observada em microscópio óptico (Axioplan-Zeiss) e registrada em câmera digital (color viewXS). Barra de aumento: 4 μm .

5.4.1.2 Preparo das Np com auxílio do sonicador

A fim de obter partículas menores, realizamos o mesmo método de preparo de nanopartículas, porém com auxílio de um sonicador. Conforme mostra a Figura 22 este processo originou partículas com diâmetro menor que 1 μm e com boa homogeneidade de tamanho. A sonicação otimizou o processo de obtenção dos sistemas nanoparticulados e isso permitiu, na seqüência, a caracterização das nanopartículas.

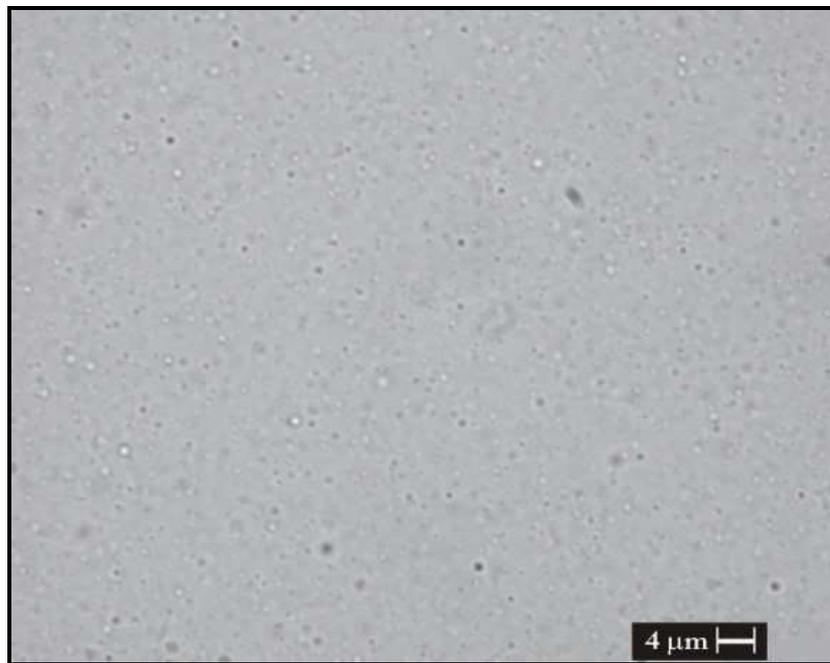


Figura 22. Micrografia das nanopartículas de PCL encapsuladas com L-triptofano e preparada com o sonicador. Imagem observada em microscópio óptico (Axioplan-Zeiss) e registrada em câmera digital (color viewXS). Barra de aumento: 4 μm .

5.4.2 Caracterização da morfologia das nanopartículas por MET

Foram preparadas, com auxílio do sonicador, Np (sem AA) e Np encapsuladas com L-triptofano e L-tirosina, conforme descrito na seção 4.3.16. As amostras de Np foram colocadas sobre porta amostra, coradas pelo método de contrastação com acetato de uranila a 3% (p/v), analisadas e fotomicrografadas em MET (Figuras 23 - 27).

A morfologia das Np de PCL isentas de AA (Figura 23) e encapsuladas (Figura 24-27) foi semelhante, sendo possível observar que as mesmas apresentaram forma elíptica, bordas regulares e superfície lisa. Além disso, apresentaram homogeneidade de tamanho indicando que o método da dupla emulsificação e evaporação do solvente, com auxílio do sonicador, foi adequado.

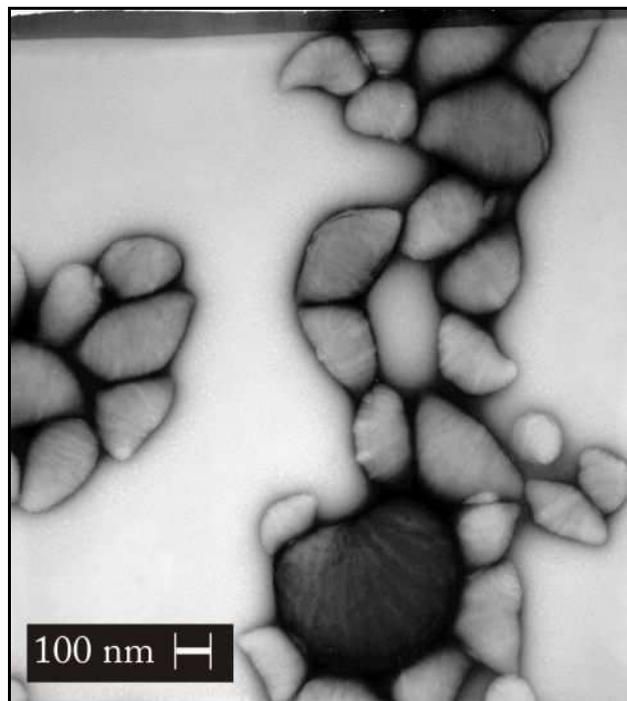


Figura 23. Micrografia eletrônica de Np de PCL sem ácidos aminados encapsulados. Barra de aumento: 100 nm.

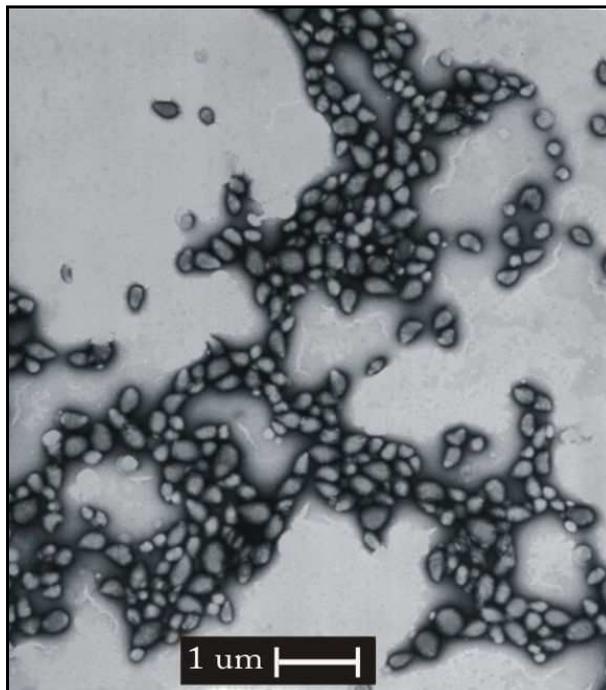


Figura 24. Micrografia eletrônica de Np de PCL contendo L-triptofano. Barra de aumento: 1 μm.

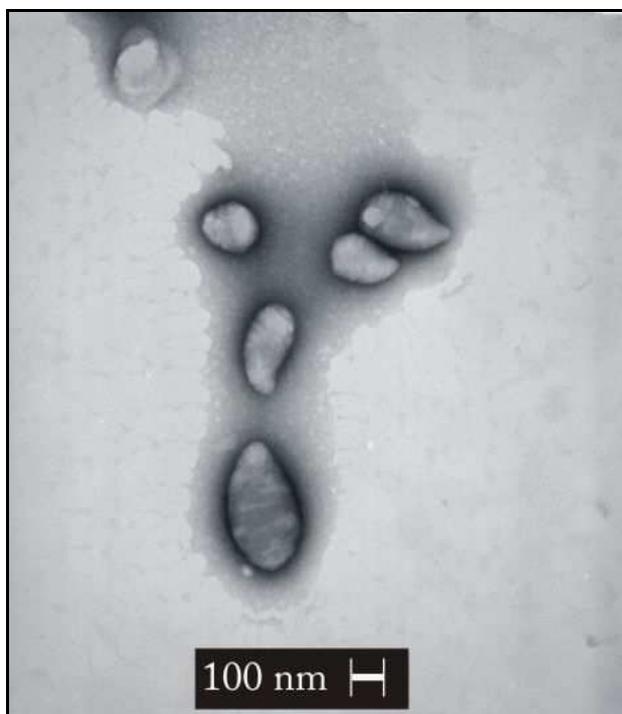


Figura 25. Micrografia eletrônica de Np de PCL contendo L-triptofano. Barra de aumento: 100 nm.

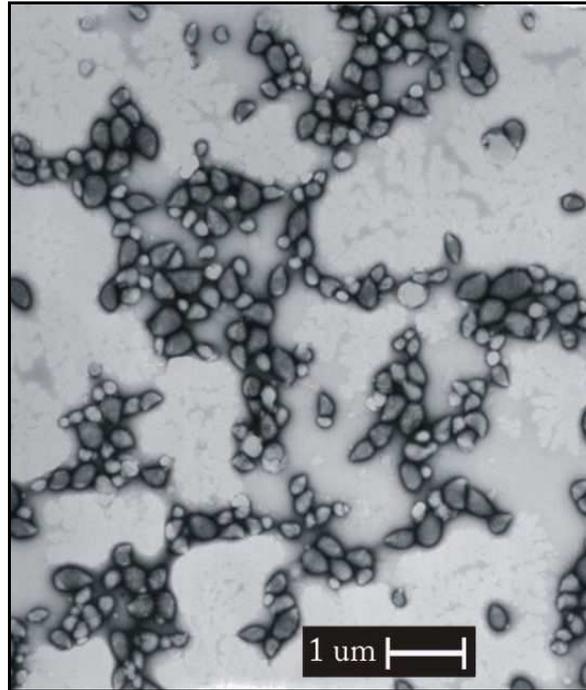


Figura 26. Micrografia eletrônica de Np de PCL contendo L-tirosina. Barra de aumento: 1 μm .

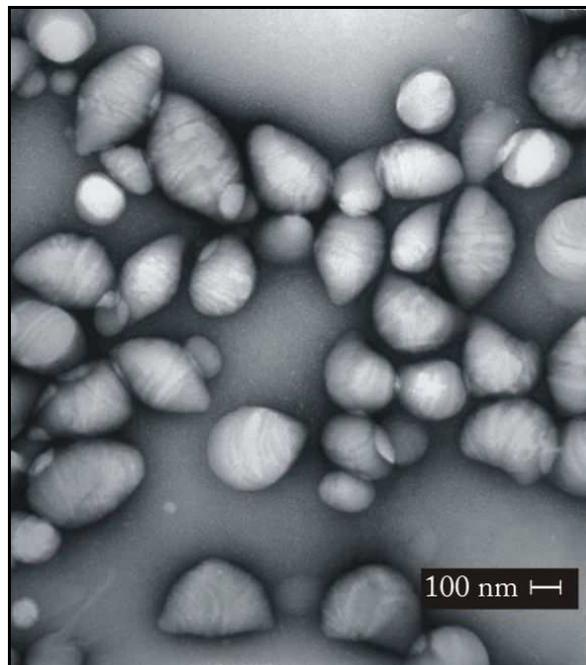


Figura 27. Micrografia eletrônica de Np de PCL contendo L-tirosina. Barra de aumento: 100 nm.

5.5 ANÁLISE DO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS

As Np foram submetidas à análise de tamanho pelo equipamento Zetasizer. Os valores apresentados na Tabela 6 representam uma média do diâmetro \pm desvio padrão de 100 análises feitas em triplicata.

Tabela 6 - Análise do diâmetro médio e do índice de polidispersividade das Np

Amostra^a	Diâmetro (nm)^b	Polidispersividade^c
Np (sem AA)	244,90 \pm 2,05	0,075 \pm 0,02
Np L-triptofano	259,90 \pm 1,22*	0,045 \pm 0,02
Np L-tirosina	269,00 \pm 4,90**	0,130 \pm 0,02

Onde:

a: Nanopartículas

b: Diâmetro das nanopartículas (média \pm Desvio Padrão). n= 3.

c: Índice de Polidispersividade (Média \pm Desvio Padrão). n= 3.

* P < 0,05

** P < 0,001

Os valores obtidos através do software DTS foram submetidos à análise estatística pelo método ANOVA. As Np (sem AA) apresentaram valores de tamanho estatisticamente menores que às Np de L-triptofano (p < 0,05) e de L-tirosina (p < 0,001). As Np de L-triptofano não apresentaram diferença de tamanho em relação às de L-tirosina (p>0,05). Um aumento substancial foi encontrado nas nanopartículas quando encapsuladas com ácidos aminados, no entanto, esse aumento não ultrapassou 10 % do diâmetro médio das Np isentas de AAs. Os baixos valores encontrados para os índices de polidispersividade indicaram que a amostra apresentou uma distribuição monomodal com ótima qualidade.

Nas figuras 28 - 30 estão apresentados a distribuição gráfica das Np, as quais se apresentaram, na sua maioria, numa escala nanométrica que variou de 140 - 530 nm.

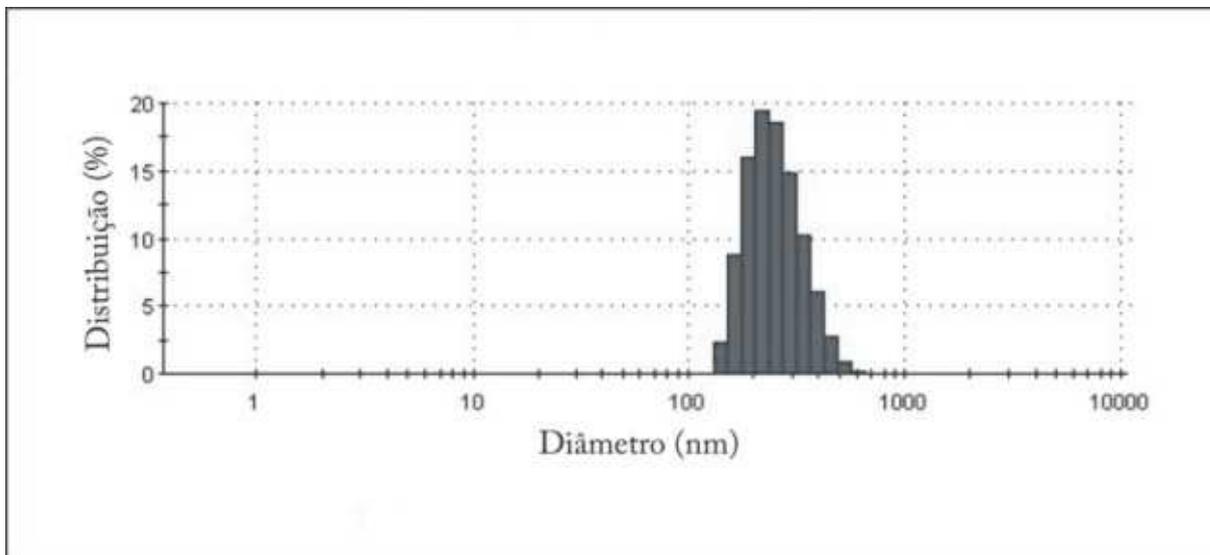


Figura 28. Distribuição de tamanho das nanopartículas de poli-ε-caprolactona (equipamento Zetasizer, n=3).

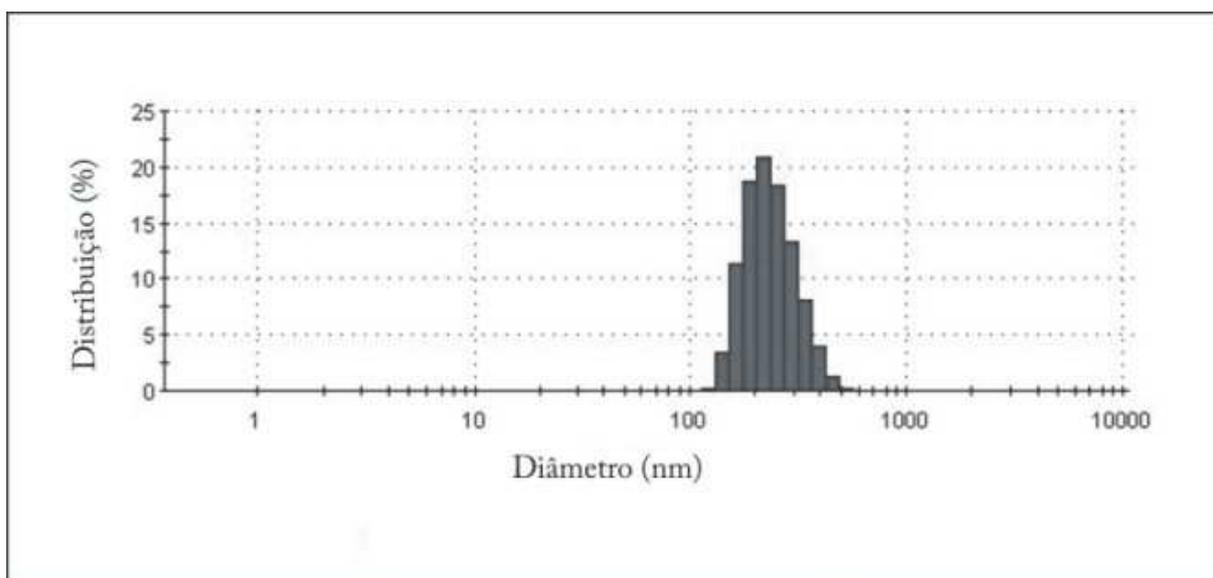


Figura 29. Distribuição de tamanho das nanopartículas de poli-ε-caprolactona encapsuladas com L-triptofano (equipamento Zetasizer, n=3).

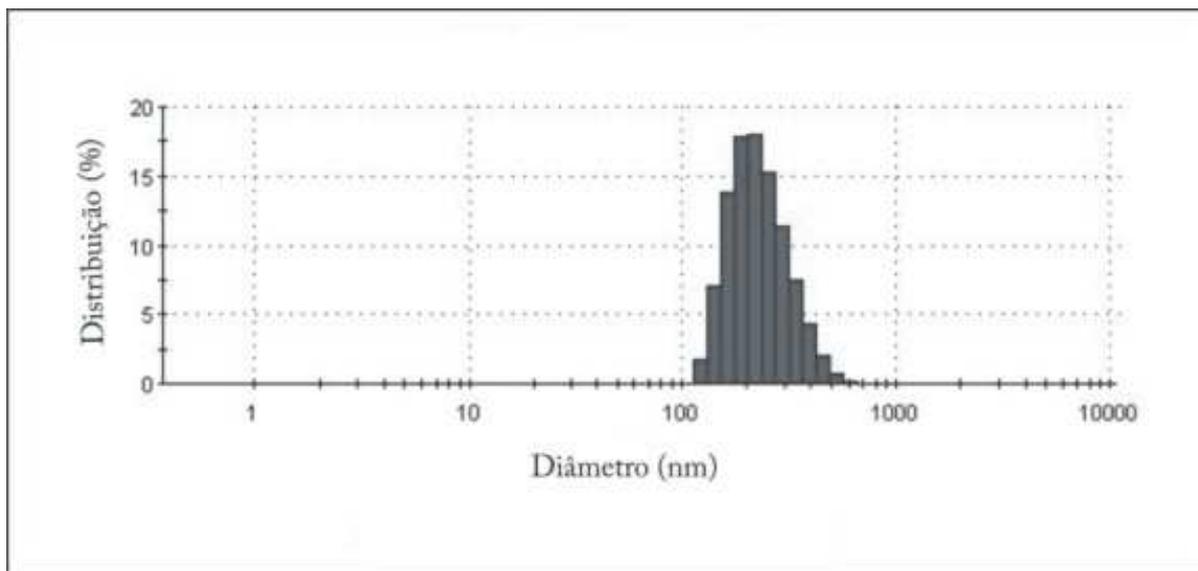


Figura 30. Distribuição de tamanho das nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona encapsuladas com L-tirosina (equipamento Zetasizer, n=3).

5.6 ANÁLISE DO POTENCIAL ELETROCINÉTICO DAS NP

As medidas do potencial eletrocinético também denominado de potencial Zeta, foram realizadas com as Np isentas de AA e Np encapsuladas com L-triptofano e L-tirosina. Foi importante investigar também o potencial Zeta após a passagem do fluxo anódico para avaliar se o estímulo elétrico poderia alterar as cargas de superfície das partículas. Essas medidas foram feitas em triplicata, em dois experimentos independentes. Os resultados do potencial Zeta, o desvio padrão e a estatística (teste ANOVA) estão inseridos na Tabela 7.

Tabela 7 – Análise do potencial eletrocinético

Amostra^a	Potencial Zeta (mV)^b	Potencial Zeta FA (mV)^c
Np (sem AA)	-1,38 ± 0,16	-1,83 ± 0,23
Np L-triptofano	-1,78 ± 0,22	-2,96 ± 0,31
Np L-tirosina	-1,76 ± 0,19	-2,10 ± 0,25

a: Nanopartículas;

b: Potencial Zeta: Média ± Desvio Padrão, n= 3.

c: Potencial Zeta após 6 min de FA: Média ± Desvio Padrão, n= 3.

Verificou-se que, após encapsulação, as Np apresentaram valores de potencial zeta mais eletronegativos ($p > 0,05$). Além disso, o fluxo anódico foi capaz de tornar as Np de L-trp ainda mais eletronegativas ($p < 0,05$) do que as de L-tir. Desta forma, o FA foi capaz de modificar o potencial eletrocinético da superfície das partículas, como detectado previamente em dois outros trabalhos do nosso grupo (HOLANDINO *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000).

5.7 QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO AMINADO POR ESPECTROFOTOMETRIA

5.7.1 Curva analítica do L-triptofano

A curva analítica foi construída no programa Excel e as medidas de absorvância obtidas no espectrofotômetro foram plotadas na Tabela 8 (em Anexo A) e no Figura 31. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) da ordem de 0,9996 indicaram uma curva linear, onde as absorvâncias e as concentrações apresentaram uma correlação de proporcionalidade. A confiabilidade dos dados obtidos e o intervalo de concentrações, dentro do limite detectável, foram utilizados para o ensaio de liberação *in vitro* e para o cálculo da eficiência de encapsulação.

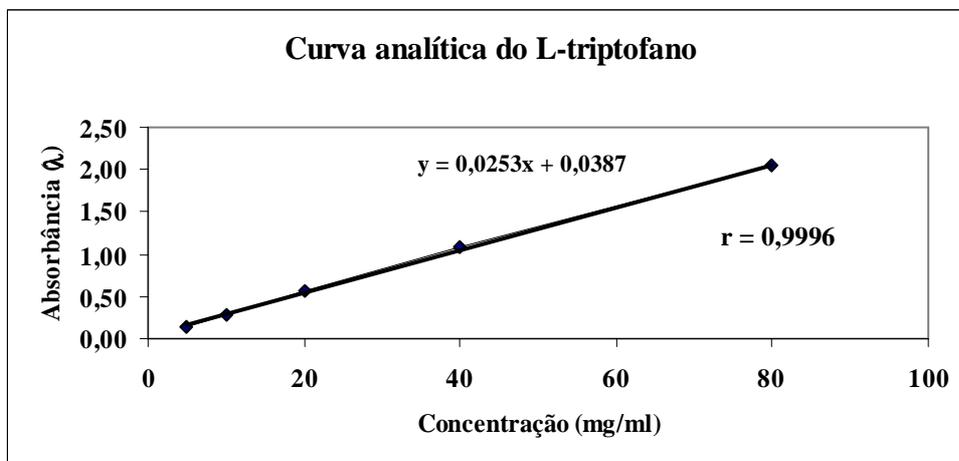


Figura 31. Curva analítica do L-triptofano em água destilada. As leituras foram feitas à temperatura ambiente (28 °C), em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm utilizando uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

5.7.2 Curva analítica da L-tirosina

A curva analítica foi construída no programa Excel e as medidas de absorbância obtidas do espectrofotômetro foram plotadas na Tabela 9, em Anexo A, e no Figura 32. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) da ordem de 0,9999 indicaram uma curva linear, onde as absorbâncias e as concentrações apresentaram uma correlação de proporcionalidade. A confiabilidade dos dados obtidos e o intervalo de concentrações, dentro do limite detectável, foram utilizados para o ensaio de liberação *in vitro* e para o cálculo da eficiência de encapsulação.

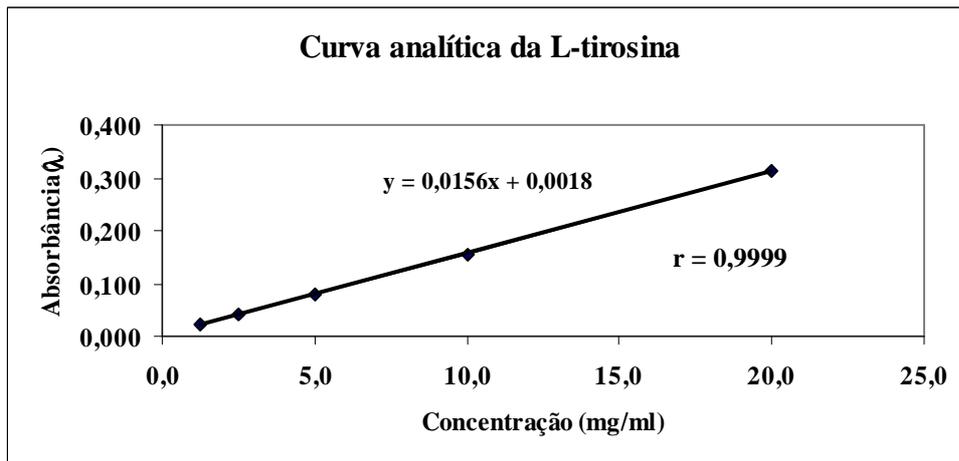


Figura 32. Curva analítica da L-tirosina em água destilada. As leituras foram feitas à temperatura ambiente (28 °C), em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm utilizando uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

5.8 RENDIMENTO DO PROCESSO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

As partículas de L-triptofano e L-tirosina liofilizadas foram utilizadas para o cálculo de rendimento do processo (R). Um total de três amostras foi pesado e a média apresentada na Tabela 10. Para o cálculo de eficiência de encapsulação (EE) as nanopartículas foram preparadas pela técnica da dupla emulsificação e evaporação do solvente, com auxílio do sonicador, conforme descrito na seção 4.3.20. A média, em porcentagem, e o desvio padrão, estão inseridos na Tabela 10.

Tabela 10 – Rendimento e Eficiência de Encapsulação (μg de AA/ mg Np)

Amostra	R (%) \pm Desvio padrão	EE \pm Desvio padrão
Nanopartículas de L-Triptofano	50 \pm 1	115,6 \pm 3,6
Nanopartículas de L-Tirosina	52 \pm 2	30 \pm 1,2

R = Rendimento.

EE = Eficiência de encapsulação

5.9 ESTUDO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Os estudos do perfil de liberação *in vitro* foram realizados a fim de avaliar a massa do ácido aminado liberado por unidade de tempo. Os estudos realizados *in vitro* constituem um controle qualitativo do sistema de liberação e fornecem informações para um posterior estudo em células, em animais e ainda para estudos clínicos. Como descrito na seção 4.3.21, cerca de 50 mg das nanopartículas foram ressuspensas em 10 ml de PBS. A média da quantidade de AA liberada, de três ensaios, independentes, estão inseridas nas Tabelas 11 e 12 no Anexo A.

O L-triptofano apresentou um efeito “burst” nas primeiras 3 horas. O efeito “burst” é caracterizado como uma liberação rápida da substância encapsulada, seguida por uma

liberação lenta. Uma quantidade superior a 80 % de L-triptofano foi liberada nas primeiras 3 horas do estudo e mais de 99 % foi liberada após 96 h do experimento.

A Tabela 11 (Anexo A) apresenta a massa de L-triptofano liberada no ensaio de dissolução. A concentração de L-triptofano foi calculada a partir da substituição das medidas de absorbância obtidas por espectrofotometria na equação da reta apresentada na seção 4.3.19.1. Os intervalos de tempo foram pré-estabelecidos na seção 4.3.19.

O perfil de liberação do L-triptofano neste ensaio está de acordo com o esperado; a liberação rápida nas primeiras horas permitiu estabelecer o tempo de incubação com as células B16F10 antes do tratamento com o fluxo anódico. Na figura abaixo estão apresentados os valores obtidos até 24 h de liberação, onde mais de 98 % da quantidade total encapsulada foi liberada.

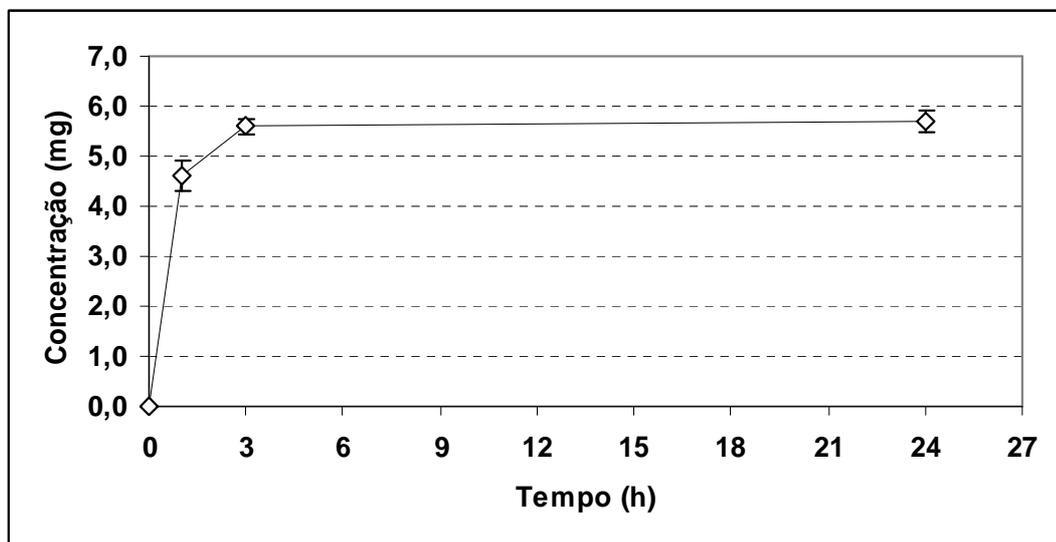


Figura 33. Perfil de liberação do L-triptofano encapsulado em nanopartículas de PCL. Média \pm Desvio Padrão, n=3.

O perfil de liberação da L-tirosina também apresentou um efeito “burst” nas primeiras 3 horas onde cerca de 80 % da L-tirosina foi liberada nas primeiras 3 horas do estudo e mais de 99 % após 96 h do estudo de liberação (dados não mostrados).

A Tabela 12 (Anexo A) apresenta a massa de L-tirosina liberada no ensaio de dissolução. A concentração de L-tirosina foi calculada, a partir da substituição das medidas de absorbância, obtidas por espectrofotometria, na equação da reta apresentada na seção 4.3.19.2. Os intervalos de tempo foram pré-estabelecidos na seção 4.3.19.

O perfil de liberação da L-tirosina neste ensaio está de acordo com o esperado; a liberação rápida nas primeiras horas permitiu estabelecer o tempo de incubação com as células B16F10 antes do tratamento com o fluxo anódico. Na figura abaixo estão apresentados os valores obtidos até 24 h de liberação, onde mais de 92 % da quantidade total encapsulada foi liberada.

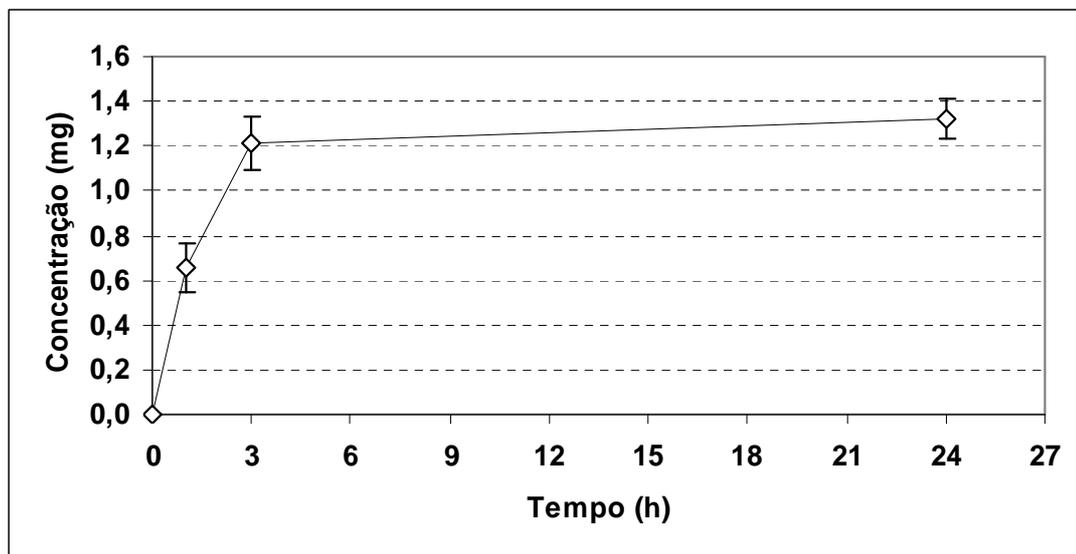


Figura 34. Perfil de liberação da L-tirosina encapsulada em nanopartículas de PCL. Média \pm Desvio Padrão, n=3.

5.10 CITOTOXIDADE DO TRATAMENTO ELÉTRICO QUANDO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE L-TIROSINA E L-TRÍPTOFANO

As células B16F10 foram tratadas com fluxo anódico, no tempo de 6 minutos, na presença de: L-tirosina; L-triptofano; Np de L-tirosina; Np de L-triptofano e Np não encapsuladas. As Np foram adicionadas ao meio eletrolítico na concentração de 0,5 mg/ml, que corresponde a massa de AA encapsulado em Np, de cerca de 115,6 µg (L-trp) e 30 µg (L-tir). Os ácidos aminados livres foram também incubados com as células B16F10 em quantidades de cerca de 204,23 mg (L-trp) e 181,19 mg (L-tir). A citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT. O percentual de viabilidade celular após 3 h e 24 h do estímulo anódico, está apresentado na tabela 13 (Anexo A) e nas figuras 35 e 36.

A análise da figura 35 indica que a associação do fluxo anódico (2 mA/ 6 min) as nanopartículas de L-trp e L-tir foi capaz de potencializar, de maneira significativa, a citotoxicidade do FA ($p < 0,001$ para Np L-tir e $p < 0,05$ para Np de L-trp).

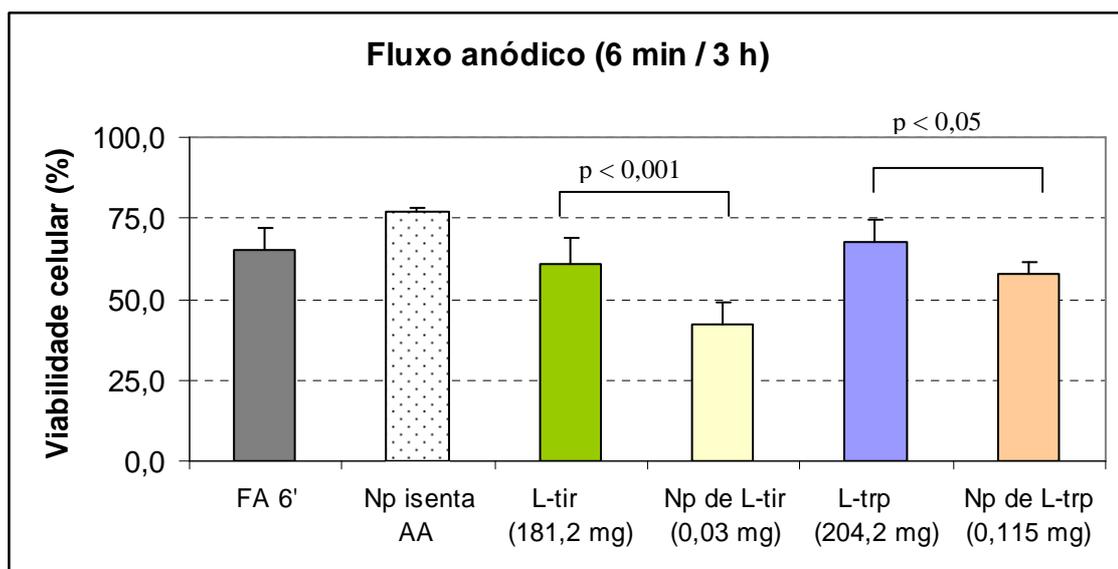


Figura 35. Percentual de viabilidade da linhagem B16F10 pré-incubada com Np de L-tir (■) e L-trp (■); L-tir (■) e L-trp (■) livre, Np isentas de AA (■) e fluxo anódico 6' (■) após 3 h do estímulo anódico. As células não estimuladas apresentaram viabilidade de 100% (dados não mostrados).

A linhagem B16F10 não foi capaz de recuperar as suas taxas normais de viabilidade mesmo após 24 h do estímulo anódico, mantendo os valores percentuais semelhantes aqueles obtidos após 3 h da eletroestimulação (Figura 35). Entretanto, as células incubadas com as Np de L-trp recuperaram as suas taxas de viabilidade após 24 h de incubação. Comportamento diferente foi detectado nas células incubadas com Np de L-tir, as quais não conseguiram aumentar de maneira significativa as suas taxas de viabilidade, quando comparadas aos outros grupos experimentais (Figura 36).

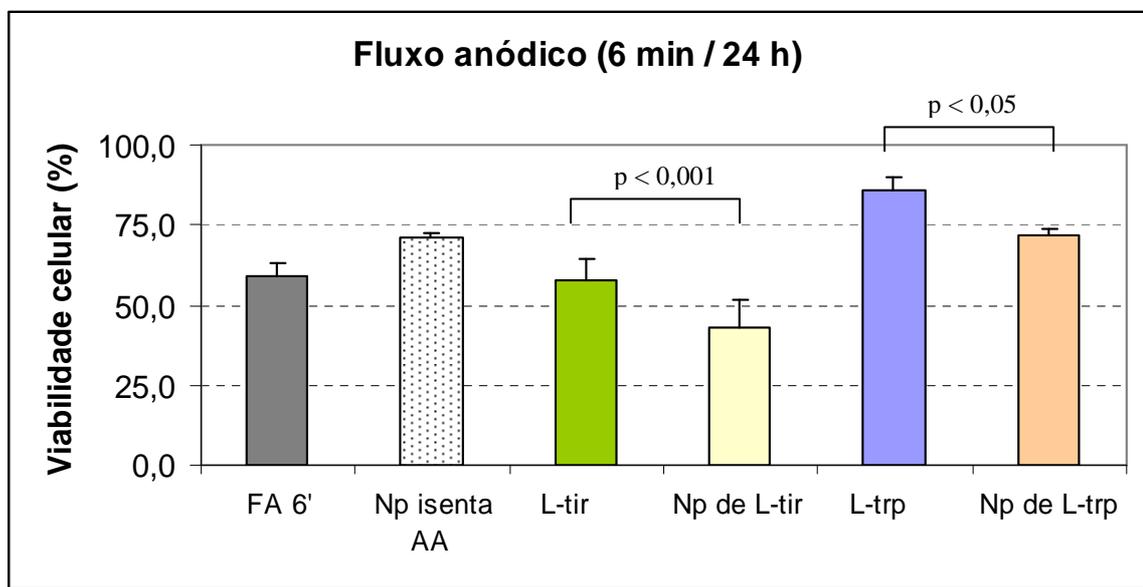


Figura 36. Percentual de viabilidade da linhagem B16F10 pré-incubada com Np de L-tir (■) e L-trp (■); L-tir (■) e L-trp (■) livre, Np isentas de AA (■) e fluxo anódico 6' (■) após 24 h do estímulo anódico. As células não estimuladas apresentaram viabilidade de 100% (dados não mostrados).

6 DISCUSSÃO

As pesquisas realizadas até o momento mostraram que a corrente elétrica contínua modifica a viabilidade celular da linhagem tumoral B16F10. Os resultados de citotoxicidade indicaram uma diminuição na viabilidade celular, principalmente quando as células receberam estímulos anódicos e catódicos. No grupo intermediário, onde ocorre a passagem apenas do fluxo eletroiónico, a alteração na viabilidade celular não foi estatisticamente significativa (Figuras 12 e 15). Resultados semelhantes foram obtidos para outras linhagens celulares, tais como: P815 (HOLANDINO *et al.*, 2000; VEIGA *et al.*, 2000), K562 e K562-Lucena 1 (HOLANDINO *et al.*, 2001) e HL-60 (VEIGA *et al.*, 2005). Tais alterações na viabilidade celular estão relacionadas aos produtos de eletrólise, tais como íons H^+ , Cl^- e HO^- gerados pelos pólos positivos e negativos.

Os danos induzidos pela estimulação elétrica são mantidos após 24 horas da eletroestimulação, uma vez que estas células não conseguem recuperar as suas taxas de viabilidade celular principalmente a partir dos 6 minutos de tratamento. Somado a isso, foi observado que o estímulo anódico, especialmente no tempo de 6 minutos, foi capaz de induzir uma queda significativa no número de células, a partir de 3 h de pós-estímulo e não permitiu que a linhagem B16F10 proliferasse com taxas semelhantes àsquelas do grupo não estimulado (Figura 17).

A adição dos ácidos aminados, sob a forma livre, não encapsulada, quando comparado aos efeitos da estimulação anódica, foi capaz de potencializar de maneira significativa os efeitos da estimulação elétrica (Figura 18). Ao contrário do que foi evidenciado por Veiga e colaboradores (2005), a estimulação da linhagem HL-60 na presença de glutamina induziu diferença estatisticamente significativa na viabilidade celular apenas para a concentração de 1,5 mM. Essa evidência pode ser atribuída a diferenças no metabolismo da célula B16F10, a

qual é caracterizada como uma linhagem resistente à múltiplas drogas e, dessa forma, sua sensibilidade ao estímulo anódico, na presença de espécies geradoras de grupo amino, parece ser menor. Entretanto, foi verificado que os danos induzidos pela estimulação anódica foram significativamente potencializados na presença dos ácidos aminados L-triptofano e L-tirosina. Esses dados corroboram aqueles descritos por Wagner e colaboradores (2002) quando estes avaliaram o potencial de ácidos aminados para a geração de cloraminas. No modelo experimental utilizado no presente trabalho chamou a atenção a maior citotoxicidade da L-tirosina. Tal aspecto pode ser atribuído a maior reatividade deste ácido aminado. Diante disso, estudos teóricos de modelagem molecular, através de cálculos de mecânica quântica, foram realizados para evidenciar detalhadamente a natureza eletrônica da L-tirosina e do L-triptofano com o intuito de justificar os resultados experimentais obtidos nesta dissertação.

Para tanto, foram avaliadas as superfícies tridimensionais dos mapas de potenciais eletrostáticos (MEPs) que revelam o tamanho molecular total e a localização dos potenciais eletrostáticos na molécula, sendo os potenciais eletrostáticos positivos representados pela coloração azul e os negativos pela coloração vermelha. Outros parâmetros utilizados foram os coeficientes do Orbital Molecular de Maior Energia Ocupado (HOMO) e do Orbital Molecular de Menor Energia Desocupado (LUMO) que desempenham um papel importante nas reações químicas e nas transferências de cargas. O coeficiente HOMO está diretamente relacionado ao potencial de ionização do composto e caracteriza a capacidade da molécula em realizar ataques nucleofílicos, enquanto o coeficiente LUMO, está diretamente relacionado à afinidade eletrônica, caracterizada pela sua susceptibilidade eletrofílica. Nos parâmetros avaliados, a molécula de L-tirosina apresentou um MEP com potencial eletrostático negativo mais pontual e menos disperso do que aquele apresentado para o aminoácido L-triptofano. Apesar de o coeficiente HOMO apresentar uma dispersão nucleofílica semelhante entre os dois AA, não mostrando resultados significantes quanto ao mecanismo de ataque para a

formação de cloramina, o coeficiente LUMO da L-tirosina mostrou um resultado de suma importância, visto que possui uma dispersão de cargas para o grupamento carboxil, em comparação ao L-triptofano, desprovido dessa característica. Desta forma, a maior reatividade da L-tirosina poderia ser justificada por esta região de caráter eletrofílico, a qual poderia favorecer uma maior formação de moléculas de cloramina (Figuras 37 e 38 – Anexo B).

De fato, como apresentado na figura 19, a L-tirosina na concentração de 1 mM, apresentou uma melhor resposta, com acentuada diminuição da viabilidade celular, após 24 h de eletroestimulação. Entretanto, sua baixa solubilidade em água, impediu a incorporação de quantidades de partículas suficientes para garantir um bom rendimento final, quando comparado ao L-triptofano. É importante salientar que o L-triptofano apresenta solubilidade em água, a 25°C, de 10 mg/ml, enquanto a solubilidade da L-tirosina nas mesmas condições é de 0,45 mg/ml. Esta propriedade físico-química nos obrigou a trabalhar com uma quantidade 10 vezes maior de L-tirosina na fase externa em comparação à massa de L-triptofano (Tabela 10). Usando o método da DEES e garantindo a saturação da fase externa da emulsão, foi possível obter nanopartículas de L-tir com um bom rendimento de processo (Tabela 10) e avaliar o efeito de espécies aminadas encapsuladas em associação ao estímulo anódico (Figuras 18 e 19).

O preparo das Np pelo método da dupla emulsificação e evaporação do solvente tem sido utilizado para encapsular substâncias hidrofílicas (BENOIT *et al.*, 1999; PEREZ *et al.*, 2000; TEWES *et al.*, 2007). O equipamento ultra-turrax® foi utilizado para auxiliar na preparação das nanopartículas, porém não obtivemos muito sucesso, visto que as partículas formadas não foram uniformes e apresentaram tamanhos da ordem de micrômetros (Figura 21). Para otimizar esse processo utilizamos o sonicador o qual permitiu a obtenção de partículas menores e mais uniformes (Figura 7). O tamanho das partículas depende de vários fatores, tais como: velocidade de agitação; viscosidade da solução do polímero da fase aquosa

interna; proporção entre a fase orgânica e a fase aquosa e concentração de PVA na fase aquosa externa (YANG *et al.*, 2001). A adição de PVA na fase aquosa interna foi necessária para aumentar a estabilidade da primeira emulsão e garantir a encapsulação do ácido aminado, estabilizando a emulsão A/O no sistema PCL-CH₂Cl₂. Yang e colaboradores (2001) demonstraram que a diminuição nas concentrações de PVA da fase aquosa interna, resulta em uma diminuição na eficiência de encapsulação, devido à formação de grandes poros na estrutura do polímero. A alta eficiência de encapsulação e a rápida liberação inicial, fenômeno conhecido como efeito “burst”, só foram obtidas em alta concentração de PVA, porém a distribuição uniforme do tamanho das Np só foi obtida com PVA a 0,5 %. O PVA é um polímero com alto peso molecular e a sua presença na fase aquosa externa aumenta a viscosidade da segunda emulsão dificultando a quebra da emulsão em gotículas menores; por outro lado, sua presença estabiliza as micelas impedindo a sua coalescência, resultando em pequenas gotículas emulsionadas. A maior concentração de PVA na fase aquosa externa tem um efeito significativo no perfil de liberação, porque sua alta concentração dificulta a difusão do fármaco para a fase externa e também garante uma distribuição mais uniforme do fármaco no interior do polímero. Quando se adiciona uma baixa concentração de PVA à fase externa, o fármaco fica distribuído também na região externa da partícula e isso contribui para uma liberação inicial rápida, seguida de uma liberação lenta e quase constante (YANG *et al.*, 2001). Em nossos experimentos verificamos que a alta concentração de PVA na fase externa dificultou o processo de liofilização das partículas; o liofilizado obtido não ficou totalmente pulverizado indicando que o PVA não pode ser totalmente removido, mesmo após sucessivas lavagens. Zambaux e colaboradores (1998) também demonstraram que o aumento de PVA (de 1 a 5 %) à fase externa resulta em um aumento residual de PVA sobre as nanopartículas, formando uma camada estável à superfície da partícula que não pode ser totalmente removida

após lavagens. Isto nos levou a estabelecer os limites de 0,5 % e de 1 % de PVA nas fases externa e interna, respectivamente.

Em nossas preparações obtivemos Np na escala de micrômetros e nanômetros, como analisadas por microscopia óptica. O microscópio óptico é um instrumento usado para ampliar, com uma série de lentes, estruturas invisíveis a olho nu. Um parâmetro significativo para a obtenção de uma boa imagem é o poder de resolução, que corresponde à distância mínima necessária existir dois pontos para que uma imagem possa ter resolução ao microscópio. Para o MO essa distância é de 0,2 μm devido ao comprimento de onda das radiações visíveis. Com efeito, a propriedade da ampliação só é possível com um aumento do poder de resolução (http://pt.wikipedia.org/wiki/Microsc%C3%B3pio_%C3%B3ptico), acesso em 30/05/2008). As imagens analisadas em objetiva de 100 x indicaram que o preparo das Np com o uso do sonicador deu origem a partículas cujo tamanho médio ficou abaixo de 1 μm (Figura 22), enquanto que aquelas preparadas com auxílio do ultra-turrax® ficaram na escala micrométrica. O sonicador permitiu a quebra de partículas grandes em tamanhos menores e assim o tamanho das partículas diminuiu com o aumento do tempo de sonicação (Figura 7) (ASUA, 2002). Conforme observado na **Figura 22**, a preparação se mostrou homogênea e na escala de tamanho desejada. O baixo poder de resolução do MO nesta escala de aumento nos levou a fazer a caracterização morfológica das Np através de microscópio eletrônico de transmissão (MET). O MET consiste de um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controla o feixe, encerrados em uma coluna evacuada com uma pressão de cerca de 10-15 mm Hg. O MET amplia estruturas pequenas invisíveis a olho nu, porque possui um comprimento de onda menor que aquele do microscópio óptico, sendo capaz de capturar estruturas nanométricas. As **Figuras de 24-27** são micrografias eletrônicas de Np encapsuladas com L-tirosina e L-triptofano, em diferentes aumentos.

Morfologicamente as Np apresentaram formas elípticas, com bordas regulares e superfície lisa, sendo os tamanhos confirmados através das análises feitas pelo Zetasizer (Tabela 6).

Para uma medida mais exata do diâmetro médio das nanopartículas foi utilizado o equipamento denominado Zetasizer® (Malvern, UK). O diâmetro hidrodinâmico médio das partículas (d_h) foi calculado a partir da intensidade da luz espalhada. O diâmetro médio das partículas isentas de ácidos aminados, foi de $244,9 \pm 2,05$ (Tabela 6), o que as caracterizou como nanopartículas (Figura 28). A encapsulação dos AA L-triptofano e L-tirosina alteraram significativamente este diâmetro médio que passou a ser de $259,9 \pm 1,22$ e $269,0 \pm 4,90$, respectivamente, indicando que houve uma alteração do diâmetro médio, sem alterações na escala nanométrica (Figuras 29 e 30). Por outro lado, entre as Np encapsuladas com AA não foram evidenciadas diferenças significativas de diâmetro médio ($p > 0,05$), mesmo que devido a questões de diferença de solubilidade entre os ácidos aminados, tenha-se colocado uma quantidade de L-triptofano cerca de 10 vezes superior a de L-tirosina. Os dados obtidos, nestas condições experimentais, foram compatíveis com aqueles descritos por outros autores que utilizaram PCL como matrix polimérica (PEREZ *et al.*, 2000; SINHA *et al.*, 2004).

O índice de polidispersividade (IP) permitiu avaliar a qualidade das amostras classificando-as como mono ou polimodal (Tabela 6). Os sistemas monodispersos ideais possuem valores de IP menores que 0,1, o que indica que a amostra apresenta uma distribuição de tamanho numa faixa muito estreita ou monomodal. Valores altos de IP, acima de 0,5, indicam que a amostra tem uma distribuição de tamanho numa faixa muito ampla ou polimodal (RICCI, 2005). Os índices de polidispersividade das suspensões de Np obtidas pelo método DEES (Tabela 6) se apresentaram próximos aos índices descritos na literatura para fármacos hidrofílicos em Np com distribuição monomodal (GRAF *et al.*, 2008). As Np (sem AA) e com AA encapsulados apresentaram índices aceitáveis com valores médios de 0,075 (Np), 0,045 (Np de Ltrp) e 0,13 (Np L-tir) (GRAF *et al.*, 2008). Assim, os índices de

polidispersividade encontrados indicaram que a suspensão de nanopartículas apresentou uma distribuição monomodal sendo esta preparação de boa qualidade.

A Tabela 7 apresenta o potencial Zeta na presença e na ausência de CECBI. Foi avaliado o potencial Zeta após o estímulo elétrico porque sabe-se que a CE modifica a distribuição de cargas da superfície celular, conforme registrado em outros trabalhos do nosso grupo (HOLANDINO *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000). Iniciou-se essa análise pelo potencial Zeta de Np isentas de AA o qual foi semelhante ao descrito por Hasan e colaboradores (2007) para PCL preparadas pela mesma técnica de DEES. Foi verificado que estas apresentaram um potencial eletrocinético negativo da ordem de $-1,38 \pm 0,16$ mV, o qual se tornou ainda mais eletronegativo quando da encapsulação dos AA (Tabela 7). Foi detectada uma significativa diferença entre as Np isentas de AA ($p < 0,01$) e aquelas contendo L-tirosina ($p < 0,05$) e L-triptofano ($p < 0,05$). O estímulo anódico modificou o potencial zeta das partículas, tornando-o ainda mais eletronegativo; entretanto, somente as Np de L-trp apresentaram valores significativamente diferentes após o estímulo anódico ($p < 0,05$).

A concentração de AA incorporados a Np foi calculada através de espectrofotometria, uma vez que as curvas analíticas produziram os coeficientes de correlação (r) de 0,9999 para L-tirosina e de 0,9996 para L-triptofano e, conseqüentemente uma relação linear para as concentrações escolhidas. Desta forma, a técnica pôde ser usada para os cálculos da eficiência de encapsulação e para os ensaios de liberação.

Devido à baixa hidrofiliabilidade dos ácidos aminados, a eficiência de encapsulação foi extremamente baixa (menor que $0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$ de Np) quando foi adicionado AA apenas à fase interna. Com vistas a garantir concentrações adequadas de ácidos aminados no meio eletrolítico e uma maior eficiência de encapsulação, a fase externa da emulsão foi saturada com AAs. Este procedimento garantiu um teor de encapsulação de $30 \pm 1,2$ e $115,6 \pm 3,6$ (μg de AA/ mg Np) para L-tirosina e L-triptofano, respectivamente (Tabela 10). A maior

eficiência de encapsulação encontrada para Np contendo L-triptofano se deve à maior hidrofilicidade deste AA frente à L-tirosina. A baixa eficiência de encapsulação obtida neste trabalho está de acordo com o descrito na literatura para fármacos hidrofílicos e está relacionada a uma rápida difusão da molécula, pequena e hidrofílica, da fase aquosa interna para a fase aquosa externa, durante o processo de emulsificação (HANS & LOWMAN, 2002; BENOIT *et al.*, 1999).

A partir das curvas analíticas do L-triptofano e da L-tirosina (figuras 31 e 32) os valores de absorvância obtidos nos ensaios de liberação foram substituídos na equação da reta, permitindo calcular a concentração do ácido aminado encapsulado. O perfil de liberação de substâncias encapsuladas em nanopartículas depende da natureza da droga e do polímero utilizado (SOPPIMATH *et al.*, 2001). O PCL é um polímero semi-cristalino que permite facilmente a entrada de água dentro da matriz polimérica; isso facilita a liberação de substâncias hidrofílicas por difusão através dos poros que são criados durante a evaporação do solvente quando da preparação das Np (PEREZ *et al.*, 2000). Uma liberação imediata foi observada na primeira hora do ensaio de liberação de Np contendo L-triptofano (Figura 33) e de até três horas para as Np contendo L-tirosina (Figura 34), seguido por uma liberação sustentada, até o término do ensaio. Essa liberação rápida inicial é chamada de efeito “burst”, sendo este causado pela liberação do fármaco adsorvido à superfície da partícula ou localizado nas camadas mais superficiais. A liberação sustentada ocorre porque a erosão da matriz polimérica é lenta e responsável pela formação de poros e canais por onde a água entra e o fármaco sai por difusão (SOPPIMATH *et al.*, 2001). A liberação rápida também está relacionada ao pequeno diâmetro das nanopartículas, o que possibilita uma grande superfície de troca. Também foi demonstrado que a lenta precipitação das partículas depois da evaporação do solvente leva a formação de mais poros na superfície (HASAN *et al.*, 2007). O perfil de liberação de ambos os ácidos aminados está de acordo com a literatura e a

hidrofilicidade que estes compostos possuem os fazem difundir naturalmente através da fase aquosa (PEREZ *et al.*, 2000; HASAN *et al.*, 2007). Em nossos experimentos as Np encapsuladas com L-triptofano tiveram um “burst” mais rápido que as de L-tirosina, o que provavelmente está relacionado à baixa hidrofilicidade da L-tirosina quando comparada a do L-triptofano. Os estudos de liberação *in vitro* foram importantes para estabelecer o tempo de pré-incubação das Np com as células B16F10, que foi de 30 min, seguido do tratamento elétrico que totalizou cerca de 55 minutos de experimento. Os estudos realizados *in vitro* constituem um controle qualitativo do sistema de liberação e fornecem informações para um posterior estudo *in vivo* em animais e para futuros estudos clínicos (HUANG & BRAZEL, 2001; RICCI, 2005).

Após o preparo e a caracterização das Np encapsuladas com L-triptofano e L-tirosina foram realizados os ensaios da citotoxicidade em células B16F10. As figuras 35 e 36 representam a percentagem de células viáveis após 3 e 24 horas do estímulo anódico. A citotoxicidade foi testada na presença e na ausência de CECBI e também na presença e ausência de AA encapsulados em Np. As Np apresentaram baixa toxicidade e não interferiram com a viabilidade celular, conforme descrito na literatura por outros autores (CHAWLA & AMIJI, 2002). Os efeitos da CECBI em células B16F10 e em associação com os AA livres já haviam sido demonstrados nesse mesmo trabalho; no entanto, esses ensaios foram repetidos para uma melhor discussão com as Np encapsuladas com esses mesmos AA, a fim de avaliar a potencialidade desse novo nanomaterial frente à CECBI. Conforme mostrado na Tabela 13 a maior citotoxicidade foi encontrada com Np encapsuladas com L-tirosina, confirmando os dados anteriores que mostravam uma queda na viabilidade celular quando era adicionado L-tirosina livre ao meio eletrolítico (Tabela 5). Segundo alguns autores, partículas menores que 10 µm são capazes de penetrar na pele através de seus anexos, como glândulas sudoríparas e sebáceas e folículos pilosos. O acúmulo de nanopartículas encapsuladas com fármaco pode

criar um sistema reservatório dentro da pele e permitir a liberação lenta do fármaco por um longo período de tempo (NICOLI *et al.*, 2001). Amiji e Chawla (2002) demonstraram através de estudos de fluorescência, uma alta concentração de Np dentro do citoplasma e na área perinuclear de células de câncer de mama (MCF-7) após 1 hora da administração de Np de tamoxifeno. A maior citotoxicidade de Np encapsuladas versus AA livres pode ser explicada pela possibilidade de interiorização das Np pelas células por um processo denominado endocitose. Como já descrito por diversos autores, a associação da CECBI com fármacos leva a um aumento na concentração deste no interior da célula, porque o estímulo elétrico permeabiliza a membrana plasmática aumentando a penetrabilidade de substâncias exógenas (SODEN *et al.*, 2006; JANIGRO *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2007). Desta forma, a utilização de sistemas nanoparticulados permite uma maior concentração do fármaco no sítio de ação, além de aumentar a penetração intracelular e proteger a substância encapsulada de degradações (ZAMBAUX *et al.*, 1998).

O presente trabalho traz importantes avanços sobre os efeitos de correntes elétricas contínuas de baixa intensidade frente às células tumorais resistentes a múltiplas drogas. De fato, o uso de CECBI altera de maneira significativa a viabilidade e as taxas de crescimento dessas células sendo, portanto, uma alternativa a destruição de tumores semelhantes. Além disso, o uso da nanotecnologia e de polímeros biodegradáveis evidenciam um novo campo de estudo que precisa ser melhor explorado. A hipótese de geração de espécies oxidantes como as cloraminas, pelo fluxo anódico, parece ser verdadeira e pode ser potencializada quando ao meio eletrolítico adicionamos ácidos aminados. Além disso, os efeitos citotóxicos de CECBI em associação com AA encapsulados em sistemas nanoparticulados, os quais são permeáveis à membrana plasmática, são ainda mais significativos. Estes promissores resultados nos fornecem subsídios importantes para futuros estudos em animais de laboratórios, os quais serão importantes para os avanços da terapia antitumoral.

7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nos permitiram concluir que:

- Melanonas murinos resistentes a múltiplas drogas (células B16F10) são susceptíveis a estímulos elétricos;
- Os danos induzidos na viabilidade celular são dependentes da polaridade e do tempo de aplicação da corrente elétrica;
- A adição de AA, L-triptofano e L-tirosina potencializa os efeitos do fluxo anódico;
- O método da dupla emulsificação e evaporação do solvente foi adequado no preparo de Np de poli- ϵ -caprolactona para encapsulação de AAs;
- O método da DEES, com auxílio do sonificador, deu origem a partículas na escala nanométrica tendo estas uma boa homogeneidade de tamanho conforme análises feitas por espalhamento de luz dinâmica;
- As Np obtidas apresentaram formas elípticas, com bordas regulares e superfícies lisas;
- O potencial Zeta mostrou que as Np apresentaram cargas negativas;
- As Np obtidas pelo método de DEES apresentaram um rendimento de processo de aproximadamente 50 % e eficiência de encapsulação de $30 \pm 1,2$ e $115,6 \pm 3,6$ (μg de AA/ mg Np) para L-tirosina e L-triptofano, respectivamente;
- Os ensaios de liberação mostraram que cerca de 80 % do AA foi liberado nas 3 primeiras horas de incubação;
- O uso de sistemas nanoparticulados de poli- ϵ -caprolactona contendo L-tirosina potencializou de maneira significativa os danos celulares induzidos por CECBI.

REFERÊNCIAS

ALEXIS, F. *et al.* New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. **Urologic Oncology**, v. 26, p. 74-85, 2008.

ASUA, J. M. Miniemulsion polymerization. **Prog. Polym. Sci.**, v. 27, p. 1283-1346, 2002.

AZEVEDO, E.; SVANE, G.; NORDENSTROM, B. Radiological evidence of response to electrochemical treatment of breast cancer. **Clin. Radiol.**, v. 43, p. 84–87, 1991.

BARRY, M. A; REYNOLDS, J. E.; EASTMAN, A. Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells in associated with intracellular acidificacion. **Cancer Res.**, v.53, p. 2349-2357, 1993.

BENOIT, M.-A; BARAS, B.; GILLARD, J. Preparation and characterization of protein-loaded poly(ϵ -caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery. **Int. J. of Pharmaceutics**, v. 184, p. 73–84, 1999.

BEZZANT, J. L. *et al.* Painless cauterization of spider veins with the use of iontophoretic local anesthesia. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 19, p. 869-875, 1988.

BICEK, A. *et al.* Combined therapy of the antimetastatic compound NAMI-A and electroporation on B16F1 tumour cells in vitro. **Bioelectrochemistry**, v.71, p.113–117, 2007.

BINSTOCK, E. E. Charged nanoparticles delivery to the eye using hydrogel iontophoresis. **Journal of Controlled Release**, v.126, p. 156–161, 2008.

BIRD, N. C. *et al.* Biology of colorectal liver metastases: a review. **J. Surg. Oncol.**, v. 94, n.1, p. 68-80, 2006.

BIRBIR, M.; BIRBIR, Y. Inactivation of extremely halophilic hide-damaging bacteria via low-level direct electric current. **J. Electrotastic**, v. 64, p. 791-795, 2006.

BOGIE, K. M.; WANG, X.; TRIOLO, R. J. Long-term prevention of pressure ulcers in high-risk patients: a single case study of the use of gluteal neuromuscular electric stimulation. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v. 87, p. 585-91, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2008**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

CAPELLA, M. A. M.; CAPELLA, L. S. A light in multidrug resistance: photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. **J. Biomedical Sci.**, v. 10, p. 361-366, 2003.

CEMASAR, M. *et al.* In vivo imaging of tumor growth after electrochemotherapy with cisplatin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 348, p. 997-1002, 2006.

CHAWLA, J. S; AMIJI, M. M. Biodegradable poly(o-caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. **Int. J. Pharmaceutics**, v. 249, p. 127-138, 2002.

COLOMBO, L. *et al.* Ion transport in tumors under electrochemical treatment: in vivo, in vitro and in silico modeling. **Bioelectrochemistry**, v. 71, p. 223-232, 2007.

COSTERTON, J. W. *et al.* Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, p. 2803-2809, 1994.

DEV, S. B.; HOFMANN, G. A. Electrochemotherapy - a novel method of cancer treatment. **Cancer Treatment Reviews**, v. 20, p. 105-115, 1994.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach.** New York: John Wiley & Sons, 1997. 329p.

DINEUR, E. Note sur la sensibilité des leucocytes à l'électricité. **Bulletin Seances Soc. Belge Microscopie**, v. 18, p. 113-118, 1981.

EL-HAKIM, I. E. *et al.* Preliminary investigation into the effects of electrical stimulation on mandibular distraction osteogenesis in goats. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 33, p. 42-47, 2004.

ENGLERT, R. P.; SCHACTER E. Distinct modes of cell death induced by different reactive oxygen species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 20518-20526, 2002.

EULER, H. von *et al.* Cell proliferation and apoptosis in rat mammary cancer after electrochemical treatment (EChT). **Bioelectrochemistry**, v. 62, p. 57-65, 2004.

FAN, Q.; SIRKAR, K. K.; MICHNIAK, B. Iontophoretic transdermal drug delivery system using a conducting polymeric membrane. **J. Membrane Sci.**, v. 321, n. 2, p. 240-249, 2007.

FAROKHZAD, OMID C. *et al.* Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo, **PNAS**, v. 103, p. 6315-6320, 2006.

FENG, S.; HUANG, G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. **J. Control. Rel.**, v. 71 p. 53-69, 2001.

FONSECA, M. E. F. A combined staining technique developed for virus particle observation in the electron microscope. **Rev. Bras. Biol.**, v. 44, n.1, p.37-40, 1984.

GANGAROSA, L. P. *et al.* Iontophoretic treatment of herpetic whitlow. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v. 70, p. 336-340, 1989.

GOODMAN and Gilman : the pharmacological basis of therapeutics. 8. ed. New York: Pergamon Press, 1991. 1811p.

GRAF, A. *et al.* Microemulsions containing lecithin and sugar-based surfactants: nanoparticle templates for delivery of proteins and peptides. **Int. J. of Pharmaceutics**, v. 350, p.351–360, 2008.

GOTHELF, A; MIR, L.; GEHL, J. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, p. 371–387, 2003.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State & Material Science**, v. 6, p. 319-327, 2002.

HASAN, A.S. *et al.* Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. **Int. J. Pharmaceutics**, v. 344. p. 53-61, 2007.

HENLEY-COHN, J.; HAUSFELD, J. N. Iontophoretic treatment of oral herpes. **Laryngoscope**, v. 94, p.118-121, 1984.

HOLANDINO, C. Q. **Alterações em células tumorais induzidas por corrente elétrica contínua de baixa intensidade: um estudo *in vitro***. 2000. 95f. Tese. (Doutorado em Ciências)- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

HOLANDINO, C. *et al.* Cell surface alterations induced by methylene blue and direct electric current in *Escherichia coli*. **Indian J. Biochemistry Biophysics**, v. 35, p. 284-290, 1998.

_____ *et al.* Damage induction by direct electric current in tumoural target cells. **Indian J. Experimental Biology**, v. 38, p. 554-607, 2000.

_____ *et al.* Direct current decreases cell viability but not P-glycoprotein expression and function in human multidrug resistant leukaemic cell. **Bioelectromagnetics**, v. 22, p. 470-478, 2001.

HOWARD, J. P. *et al.* Effects of alternating current iontophoresis on drug delivery. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v. 76, p.463-466, 1995.

HUANG, X.; BRAZEL C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix – controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 121-136, 2001.

JAIN, R. *et al.* Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices deferent preparative approaches. **Drug. Dev. Ind. Pharm.**, v. 24, n. 8, p. 703-727, 1998.

JANIGRO, D. *et al.* Alternating current electrical stimulation enhanced chemotherapy: a novel strategy to bypass multidrug resistance in tumor cells. **BMC Cancer**, v. 6, n. 72, 2006.

JAROSIESKI, M. J.; GILBERT, R. A.; HELLER, R. In vivo antitumor effects of electrochemotherapy in a hepatoma model. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1334, p.15–18, 1997.

KANG, J-H *et al.* Effective delivery of DNA into tumor cells and tissues by electroporation of polymer–DNA complex. **Cancer Letters**, v. 265, p. 281–288, 2008.

KASTING, G. B.; BOWMAN, L. A. DC electrical properties of frozen, excised human skin. **Pharmaceutical Res.**, v. 7, n. 2, p. 134-143, 1990.

KHOURY, A. E. *et al.* Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. **Am. Soc. Artif. Int. Org. J.**, v. 38, p. 174-178, 1992.

KIM, S. I. *et al.* Biphasic electric current stimulates proliferation and induces VEGF production in osteoblasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, p. 907–916, 2006.

KIRPOTIN, D. B. *et al.* Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. **Cancer Res.**, v. 66, n. 13, p. 6732-40, 2006.

KREUTER, J. *et al.* Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 369–375, 2004.

LÁZAR-MOLNAR, E. *et al.* Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. **Cytokine**, v. 12, n. 6, p. 547-554, 2000.

LEKAS, M. D. Iontophoresis treatment. **Otolaryngol Head Neck Surg.**, v. 87, p. 292-298, 1979.

LI, Y. *et al.* Electrical treatment of poultry chiller solution to destroy campylobacter jejuni. **J. Food Prot.**, v. 58, p. 1330–1334, 1995.

MAKINO, K. *et al.* Effects of plasma proteins on degradation properties of poly(L-lactic) microcapsules. **Pharm. Res.**, v. 4, p. 62-65, 1987.

MALONEY, M. *et al.* Iontophoretic administration of lidocaine anesthesia in office practice. **J Dermatol Surg Oncol**. v. 18, p. 937-940, 1992.

MARTY, M. *et al.* Electrochemotherapy – an easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. **European Journal of Cancer Supplements**. v. 4, n. 11, p. 3 – 13, 2006.

MENDONÇA, A. C.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 129, p. 183-190, 2003.

MIKLAVCIC, D. *et al.* Tumor treatment by direct electric current: tumor perfusion changes. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 43, p. 253-256, 1997.

MIKLAVCIC *et al.* The Importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues. **Biophysical Journal**, v. 74, p. 2152–2158, 1998.

MIKLAVCIC, D. *et al.* Electrochemotherapy with cisplatin: clinical experience in malignant melanoma patients. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 863-867, 2000.

MINKOWITZ, H. S. Fentanyl iontophoretic transdermal system: a review. **Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management**, v. 11, p. 3-8, 2007.

MIR, L. M. *et al.* Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. **Br. J. Cancer**, v. 77, n.12, p. 2336-2342, 1998.

_____ *et al.* Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial. **C. R. Acad. Sci. III**, v. 313, p. 613-618, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n.1-2, p.55-63, 1983.

NICOLI, S. *et al.* Design of triptorelin loaded nanospheres for transdermal iontophoretic administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 214, p.31–35, 2001.

NILSSON, E. Electrochemical treatment of tumours. **Bioelectrochemistry**, v. 51, p. 1–11, 2000.

NORDENSTRÖM, B. E. W. Biologically closed electric circuits: activation of vascular interstitial closed electric circuits for treatment of inoperable cancers. **J. Bioelectr.**, v. 3, p.137–153, 1984.

_____. **Biologically closed electrical circuits:** clinical, experimental and theoretical evidence for an additional circulatory system. Stockholm: Nordic Medical Publications, 1983.

_____. Electrochemical treatment of cancer. Part I: Variable response to anodic and cathodic fields. **Am. J. Clin. Oncol.**, v. 12, p. 530–536, 1989.

_____; EKBORG, S.; BEVING, H. Electrochemical treatment of cancer. Part II: Effect of electrophoretic influence on adriamycin. **Am. J. Clin. Oncol.**, v. 13, p. 75–88, 1990.

_____. Preliminary clinical trials of electrophoretic ionization in the treatment of malignant tumors. **IRCS Med. Sci.**, v. 6, p. 537, 1978

_____. Survey of mechanisms in electrochemical treatment (ECT) of cancer. **Eur. J. Surg. Suppl.**, v. 574, p. 93-109, 1994.

NUCCITELLI, R. *et al.* Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, p.351–360, 2006.

OKINO M; MOHRI H. Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on *in vivo* growing tumors. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 78, n. 12, p.1319-21, 1987.

PATEL, R. S. *et al.* Binstock *In vitro* and *in vivo* evaluation of the transdermal iontophoretic delivery of sumatriptan succinate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, p. 296–301, 2007.

PEREZ, O. A.; ZELL, D. Immunological strategies to fight skin cancer. **Skin Therapy Lett.**, v.11, n. 5, p. 1-7, 2006.

PETERS, E. J. *et al.* Electric stimulation as an adjunct to heal diabetic foot ulcers: a randomized clinical trial. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v. 82, p. 721-725, 2001.

PETRULIO, C. A. *et al.* The tumour microenvironment and implications for cancer immunotherapy. **Expert Opin Biol. Ther.**, v. 6, n.7, p.671-84, 2006.

PICCOLINO, M. Luigi Galvani's path to animal electricity. **C. R. Biologies**, v. 329, p. 303–318, 2006.

PITT, C. G. *et al.* Aliphatic polyester. 2. The degradation of poly(D-L-lactide), poly(ϵ -caprolactona) their copolymers *in vivo*. **Biomaterials**, v. 2, p. 215-220, 1981.

PRIGNANO, F. Immunophenotypical markers, ultrastructure and chemosensitivity profile of metastatic melanoma cells. **Cancer Letters**, v.186, p.183–192, 2002.

QUINTANAR-GUERRERO, D. *et al.* Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable nanoparticle from performed polymers. **Drug. Dev. Ind. Pharm.**, v. 24, p. 1113-1128, 1998.

RAMIREZ, L. H. *et al.* Electrochemotherapy on liver tumours in rabbits. **Br. J. Cancer**, v. 77, n. 12, p. 2104-2111, 1998.

RAPPERPORT, A. S. *et al.* Iontophoresis: a method of antibiotic administration in the burn patient. **Plast Reconstr. Surg.**, v. 36, p. 547-552,1965.

REICH, J. D.; TARJAN, P. T. Electrical stimulation of skin. **Intern. J. Dermatol.**, v. 29, n. 6, p. 395-400, 1990.

RICCI, E. J. **Nanopartículas de PLGA contendo zinco (II) ftalocianina para uso na terapia fotodinâmica do câncer**. 2005. 115f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

RICCI, E. J.; MARCHETTI, J. M. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, p.187-195, 2006.

RIGANO, W. *et al.* Antibiotic iontophoresis in the management of burned ears. **J. Burn. Care Rehabil.**, v. 13, p. 407-409, 1992.

ROSA, D. S. *et al.* Evaluation of PHB, PHB-V and PCL biodegradation in composted soil. **Polímeros**, v. 12, n. 4, p. 311-317. 2002.

SANTOYO, S. *et al.* Optimization of topical cidofovir penetration using microparticle. **Intern. J. Pharmaceutics**, v. 242, p. 107-113, 2002.

SAMUELSSON, L.; JÖNSSON, L. Electrolytic destruction of lung tissue. **Acta Radiol. Diagnosis**, v. 21, n. 6, p. 711-714, 1980.

SCHAEFER, N. *et al.* Efficacy of direct electrical current therapy and laser-induced interstitial thermotherapy in local treatment of hepatic colorectal metastases: an experimental model in the rat. **J. Surg. Res.**, v. 146, n. 2, p. 230-240, 2008.

SERSA, G. *et al.* Electrochemotherapy in treatment of tumours. **EJSO**, v. 34, p. 232-240, 2008.

SINHA, V. R. *et al.* Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1-23, 2004.

SODEN, D. M. Successful application of targeted electrochemotherapy using novel flexible electrodes and low dose bleomycin to solid tumours. **Cancer Letters**, v. 232, p. 300-310, 2006.

SOPPIMATH, K. S. *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticle as delivery devices. **J. Control. Rel.**, v. 70, p. 1-20, 2001.

TELLÓ, M. *et al.* Electrochemical therapy to treat cancer (in vivo treatment). In: ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE IEEE EMBS, 29., 2007, Lyon, France. **Proceedings...** Lyon, France: EMBS, 2007.

_____. *et al.* **Uso da corrente elétrica no tratamento do câncer**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2004. 229 p.

TEWES, F. *et al.* Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, p. 488-492, 2007.

THOMA, K.; SCHLUTERMANN, B. Biodegradierbare polymer all retardierungsprinzip fur arzneistoffe. **Pharmazie**, v. 46, p. 821-830, 1991.

TOKUDA, H.; NAKANISHI, K. Application of direct current to protect bioreactor against contamination. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 18, n. 2, p. 185–212, 1995.

TOKUMOTO, S.; HIGO, N.; SUGIBAYASHI, K. Effect of electroporation and pH on the iontophoretic transdermal delivery of human insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 326, p. 13–19, 2006.

UBRICH, N. *et al.* Preparation and characterization of propranolol hydrochloride nanoparticles: a comparative study. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 291– 300, 2004.

UNITED STATES PHARMACOPEIA . **The official compendia of standards**. Washington: The United States Pharmacopeial Convention, 2004.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. Sistema de Informação e Bibliotecas. **Manual para elaboração e normalização de trabalhos de conclusão de curso**. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <http://www.sibi.ufrj.br/manual_teses.pdf>. Acesso em: maio 2008.

VEIGA, V. F. *et al.* Damages in tumor mastocytes membrane caused by low level direct electric currents - cytochemistry analysis. **Acta Microscópica**, v. 4, n. Suppl A, p. 141-141, 1995.

VEIGA, V. F. *et al.* Cellular damage and altered carbohydrate expression in P815 tumor cells induced by direct electric current: an in vitro analysis. **Bioelectromagnetics**, v. 21, n. 8, p. 597-607, 2000.

VEIGA V. F. *et al.* Exposure of human leukemic cells to direct electric current: generation of toxic compounds inducing cell death by different mechanisms. **Cell Biochem Biophys**, v. 42, n.1, p. 61-74, 2005.

VENIER-JULIENNE, M. C.; Benoit, J. P. Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticle as drug carriers. **Pharm. Acta Helv.**, v. 71, p. 121-128, 1996.

VENKITANARAYANAN, K. S. *et al.* Inactivation of E. coli O157:H7 and listeria monocytogenes on plastic kitchen cutting boards by electrolyzed oxidizing solution. **J. Food. Prot.**, v. 62, p. 857– 860, 1999.

VERWON, M. Untersuchungen uber die polare erregung der lebendigen substantz durch den konstanten strom. **Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.**, v. 62, p. 415-450, 1896.

VIJH, A. K. Electrochemical treatment (ECT) of cancerous tumours: necrosis involving hydrogen cavitation, chlorine bleaching, pH changes, electroosmosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 663 – 665, 2004.

ZAMBAUX, M.F *et al.* Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. **Journal of Controlled Release**. v. 50, p. 31–40, 1998.

ZETASIZER nano user manual. Malvern: Malvern Instruments, 2004. (Man 0317, n. 3.1, 2007. Disponível em: <[www.malvern.co.uk/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000253/\\$file/Zetasizer%20Nano%20User%20manual%20\(Man0317-3.1\)%20-%20\(CD-download-colour+cover\).pdf](http://www.malvern.co.uk/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000253/$file/Zetasizer%20Nano%20User%20manual%20(Man0317-3.1)%20-%20(CD-download-colour+cover).pdf)>. Acesso em: 20 jun. 2008.

WAGNER, B. A. *et al.* Hydrogen peroxide-induced apoptosis of HL-60 human leukemia cells is mediated by the oxidants hypochlorous acid and chloramines. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 401, p. 223-234, 2002.

WAGNER-SOUZA, K. *et al.* Ciclosporina A e seus análogos como reversores da resistência a múltiplas fármacos em células tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 2, p. 103-112, 2003.

WARTENBERG, M. *et al.* Direct current electrical fields induce apoptosis in oral mucosa cancer cells by NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. **Bioelectromagnetics**, v. 29, n. 1, p. 47-54, 2007.

WIKIPEDIA. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Microsc%C3%B3pio_%C3%B3ptico>. Acesso em: 30 maio 2008.

WONG, H. L. *et al.* Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 491–504, 2007.

YANG, W. *et al.* Inhaled nanoparticles- a current review. **Inter. J. Pharmaceutics**, v. 356, p. 239-247, 2008.

YE, I.; YANG, H.; KIM, H.-K.; LI, Y. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in recirculated brine for chilling thermally processed bacon using an electrochemical treatment system, **J. Food Sci.**, v. 66, p. 729–733, 2001.

ANEXO A - TABELAS

Tabela 1 – Percentuais médios de viabilidade de B16F10 após 3 h e 24 h de eletroestimulação no fluxo anódico e sem estímulo (controle).

Tempo (min)	Fluxo anódico (%)		Controle (%)	
	3 h	24 h	3 h	24 h
2'	74,1 ± 10,5	93,0 ± 12,7	96,6 ± 7,2	99,4 ± 0,8
4'	64,9 ± 9,1	79,4 ± 7,3	103,7 ± 4,5	96,8 ± 3,7
6'	61,4 ± 9,6	58,2 ± 7,1	96,2 ± 7,0	100 ± 0,0
8'	52,8 ± 3,5	50,8 ± 8,7	100,0 ± 8,7	92,8 ± 14,4
10'	43,9 ± 8,6	46,7 ± 18,1	96,9 ± 6,2	100 ± 0,0

N=5; ±: desvio padrão.

Tabela 2 – Percentuais médios de viabilidade de B16F10 após 3 h e 24 h de eletroestimulação no fluxo eletroiónico e sem estímulo (controle).

Tempo (min)	Fluxo eletroiónico (%)		Controle (%)	
	3 h	24 h	3 h	24 h
2'	69,6 ± 9,5	85,1 ± 11,8	96,6 ± 7,2	99,4 ± 0,8
4'	80,9 ± 3,4	85,4 ± 15,4	103,7 ± 4,5	96,8 ± 3,7
6'	82,2 ± 4,7	80,2 ± 12,8	96,2 ± 7,0	100 ± 0,0
8'	75,0 ± 7,1	82,2 ± 18,4	100,0 ± 8,7	92,8 ± 14,4
10'	82,4 ± 10,1	83,1 ± 13,4	96,9 ± 6,2	100 ± 0,0

N=5; ±: desvio padrão.

Tabela 3 – Percentuais médios de viabilidade de B16F10 após 3 h e 24 h de eletroestimulação no fluxo catódico e sem estímulo (controle).

Tempo (min)	Fluxo catódico (%)		Controle (%)	
	3 h	24 h	3 h	24 h
2'	68,1 ± 2,6	69,1 ± 9,8	96,6 ± 7,2	99,4 ± 0,8
4'	56,5 ± 8,2	63,4 ± 11,9	103,7 ± 4,5	96,8 ± 3,7
6'	53,3 ± 10,6	53,6 ± 11,8	96,2 ± 7,0	100 ± 0,0
8'	41,3 ± 12,3	32,5 ± 7,8	100,0 ± 8,7	92,8 ± 14,4
10'	37,4 ± 7,1	31,9 ± 4,5	96,9 ± 6,2	100 ± 0,0

N=5; ±: desvio padrão.

Tabela 4- Média do nº de células ($\times 10^5$ cél/ml) quantificado por azul de tripan.

	Após Tratamento (Tempo 0 h)	Após Tratamento (Tempo 24h)	Após Tratamento (Tempo 48h)
Controle	1,33 ± 0,17	1,87 ± 0,18	2,55 ± 0,28
Fluxo Anódico 4'	1,33 ± 0,12	1,71 ± 0,17	1,80 ± 0,15
Fluxo Anódico 6'	1,08 ± 0,20	0,69 ± 0,14	0,68 ± 0,12

N=3; ±: desvio padrão

Tabela 5 – Percentual médio de viabilidade de B16F10 após 3 h e 24 h de eletroestimulação.

Ácidos Aminados (mM)	Viabilidade 3 h (%)	Viabilidade 24 h (%)
Controle 6'	92,0 ± 8,1	80 ± 3,6
Glutamina 0,5	96,8 ± 3,7	111,6 ± 7,7
Glutamina 1,0	87,5 ± 5,0	104,3 ± 5,0
Glutamina 1,5	72,9 ± 5,7	78,0 ± 7,6
Tirosina 0,5	53,9 ± 4,1	54,5 ± 6,4
Tirosina 1,0	60,3 ± 6,4	42,7 ± 3,4
Tirosina 1,5	63,9 ± 4,8	45,7 ± 6,2
Triptofano 0,5	82,6 ± 7,5	73,1 ± 5,3
Triptofano 1,0	74,7 ± 5,0	70,5 ± 2,4
Triptofano 1,5	75,4 ± 3,3	71,4 ± 6,3

N=3; ±: desvio padrão.

Tabela 6 - Diâmetro médio e índice de polidispersividade das Np.

Amostra ^a	Diâmetro (nm) ^b	Polidispersividade ^c
Np (sem AA)	244,90 ± 2,05	0,075 ± 0,02
Np L-triptofano	259,90 ± 1,22	0,045 ± 0,02
Np L-tirosina	269,00 ± 4,90	0,130 ± 0,02

N=3; ±: desvio padrão; ^a = Nanopartículas; ^b = diâmetro médio e ^c = índice de polidispersividade.

Tabela 7 – Potencial Zeta das Np.

Amostra ^a	Potencial Zeta (mV) ^a	Potencial Zeta FA (mV) ^b
Np (sem AA)	-1,38 ± 0,16	-1,83 ± 0,23
Np L-triptofano	-1,78 ± 0,22	-2,96 ± 0,31**
Np L-tirosina	-1,76 ± 0,19	-2,10 ± 0,25

N=3; ±: desvio padrão.

Tabela 8 - Curva analítica do L-triptofano.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	5,0	10,0	20,0	40,0	80,0
Absorbância (λ)	0,143	0,284	0,561	1,080	2,045

N=3

Tabela 9 - Curva analítica da L-tirosina.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	1,25	2,5	5,0	10,0	20,0
Absorbância (λ)	0,022	0,041	0,080	0,155	0,314

N=3

Tabela 10 - Rendimento e Eficiência de Encapsulação (μg de AA/ mg Np) do processo.

Amostra	R. (%) \pm Desvio padrão	EE \pm Desvio padrão
Nanopartículas de L-Triptofano	50 \pm 1	115,6 \pm 3,6
Nanopartículas de L-Tirosina	52 \pm 2	30 \pm 1,2

N=3; R = Rendimento em percentual; EE = Eficiência de encapsulação.

Tabela 11 - Perfil de liberação das nanopartículas contendo L-triptofano.

Tempo (h)	L-Triptofano (mg/50 mg PCL)
0,0	0,0 \pm 0,0
1,0	4,61 \pm 0,40
3,0	5,58 \pm 0,15
24,0	5,68 \pm 0,22
48,0	5,69 \pm 0,25
72,0	5,70 \pm 0,10
96,0	5,71 \pm 0,10

N=3; \pm : desvio padrão.

Tabela 12 - Perfil de liberação das nanopartículas contendo L-tirosina.

Tempo (h)	L-Tirosina (mg/50 mg de PCL)
0,0	0,0 ± 0,0
1,0	0,66 ± 0,20
3,0	1,21 ± 0,20
24	1,32 ± 0,20
48	1,38 ± 0,15
72	1,40 ± 0,25
96	1,42 ± 0,20

N=3; ±: desvio padrão.

Tabela 13 – Percentual médio de viabilidade de B16F10 após 3 h e 24 h do estímulo anódico em associação com as Np de L-triptofano e L-tirosina.

Tratamento	Viabilidade 3 h (%)	Viabilidade 24 h (%)
Controle Np (sem CE)*	100 ± 2,2	98 ± 4,4
Controle (sem CE)*	96 ± 5,9	100 ± 8,8
Np + FA (6')	77 ± 8,2	71 ± 1,5
Fluxo anódico	65 ± 7,1	59 ± 5,6
L-Tirosina	61 ± 8,5	58 ± 10,2
Np L-Tirosina	42 ± 10,4	43 ± 10,6
L-Triptofano	68 ± 3,6	86 ± 3,7
Np L-Triptofano	58 ± 3,7	72 ± 1,5

N=3; ±: desvio padrão; FA (Fluxo anódico); CE (Corrente elétrica); Np (Nanopartículas de PCL). * Dados não inseridos na Figura 18 e 19.

ANEXO B – MEP

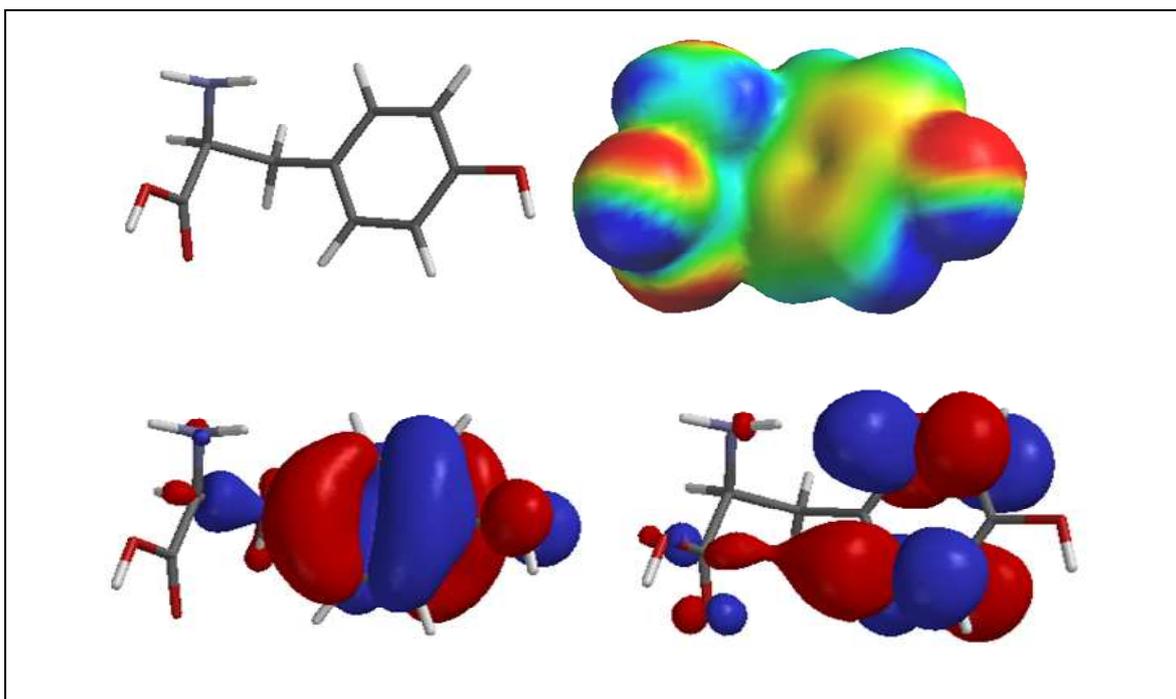


Figura 37. Estrutura química da L-tirosina submetida ao programa SPARTAN 06 para obtenção do Mapa de Potencial Elétrico (MEP) sobre uma superfície de 0.002 e/ua^3 gerados numa faixa de energia entre -25 a +30 Kcal/mol e Coeficiente HOMO e LUMO. Após análise conformacional, as conformações mais estáveis foram submetidas ao estudo de *singlepoint* pelo método *ab initio* no nível 6,31G*, com o intuito de gerar cargas parciais nas moléculas.

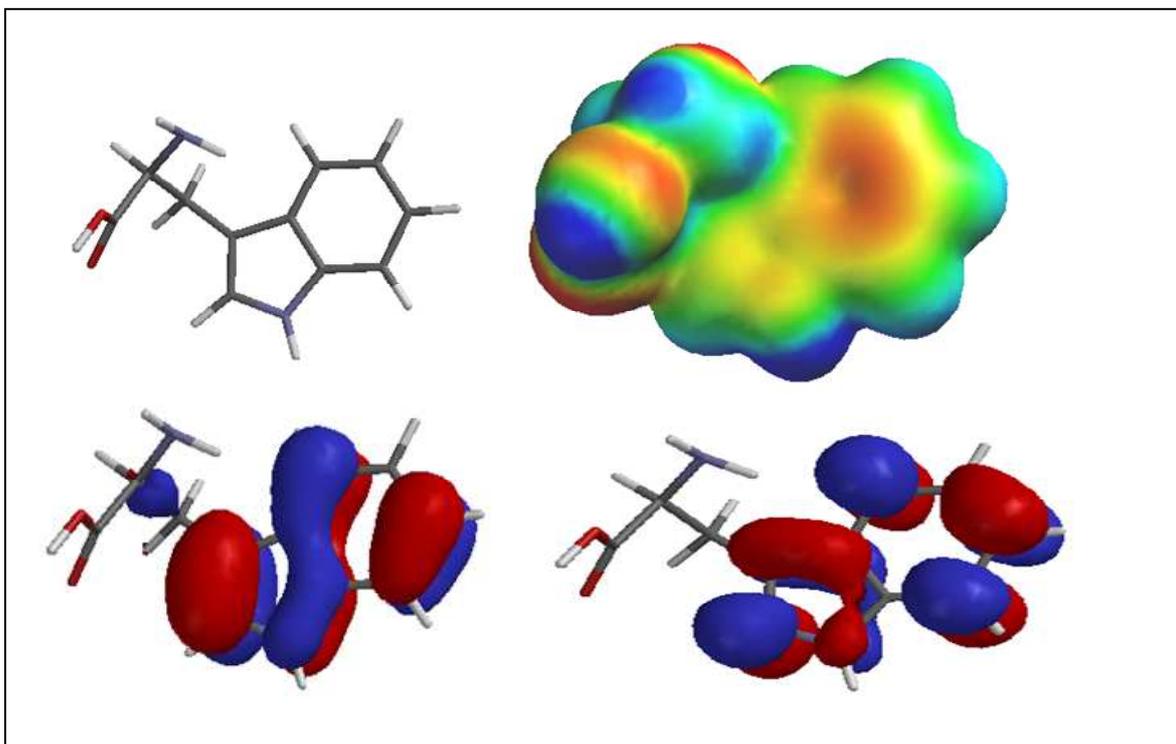


Figura 38. Estrutura química do L-triptofano submetida ao programa SPARTAN 06 para obtenção do Mapa de Potencial Elétrico (MEP) sobre uma superfície de 0.002 e/ua^3 gerados numa faixa de energia entre -25 a +30 Kcal/mol e coeficiente HOMO e LUMO. Após análise conformacional, as conformações mais estáveis foram submetidas ao estudo de *singlepoint* pelo método *ab initio* no nível 6,31G*, com o intuito de gerar cargas parciais nas moléculas.