

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARIANA DA VOLTA SOARES

Desenvolvimento e Avaliação de Nanopartículas de
Poli- ϵ -caprolactona contendo Zinco(II)ftalocianina para
Uso na Terapia Fotodinâmica do Câncer

RIO DE JANEIRO

2009

Mariana da Volta Soares

Desenvolvimento e Avaliação de Nanopartículas de Poli- ϵ -caprolactona contendo
Zinco(II)ftalocianina para Uso na Terapia Fotodinâmica 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.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Ricci Júnior

Rio de Janeiro

2009

S676d

Soares, Mariana da Volta.

Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona contendo zinco (II) ftalocianina para uso na terapia fotodinâmica do câncer / Mariana da Volta Soares; orientador Eduardo Ricci Júnior. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2009.

140f. : il. col. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRJ / Faculdade de Farmácia, 2009.

Inclui bibliografia.

1.Terapia fotodinâmica. 2. Zinco (II) ftalocianina. 3. Poli- ϵ -caprolactona. 4. Nanopartículas. I. Ricci Júnior, Eduardo. II.Título.

CDD 616.994

Mariana da Volta Soares

Desenvolvimento e Avaliação de Nanopartículas de Poli-ε-caprolactona contendo
Zinco(II)ftalocianina para Uso na Terapia Fotodinâmica 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:

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

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

Prof^a. Dr^a. Priscilla Vanessa Finotelli
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Vladi Olga Consiglieri
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP

Ao meu avô Lídio,
por seu carinho e atenção,
por ter me apoiado nesta escolha e
pela saudade que cresce a cada dia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre!

À minha mãe, Maysa, por estar sempre ao meu lado, por não medir esforços para me ver sorrindo, por me incentivar a cada decisão tomada, por me encorajar a seguir em frente mesmo quando nada parece ter sentido, por entender que eu ainda tenho muito o que aprender, por me ensinar que nem tudo é como eu gostaria que fosse (um dia, eu aprendo!) e por ter me mostrado, enfim, que isso tudo é amor! Mãe, impossível agradecer. Esse trabalho é pra você!

Ao meu pai, José Carlos, pelo seu amor, por todas as palavras de incentivo, por sempre tentar me entender, mesmo quando isso parece impossível, e pelo orgulho que sente de mim!

Ao meu irmão, Felipe, por silenciosamente torcer por mim e por ter me ajudado via *webcam*, internacionalmente(!), na formatação da dissertação e das figuras sem perder a paciência! E à Paula e sua família, por torcerem por mim e cuidarem tão bem do Felipe na Argentina!

Ao Paulo, por ser meu “ponto fora da curva”, pelo amor incondicional, por cuidar de mim sem nunca pedir nada em troca e por ter dividido comigo os momentos mais difíceis e os mais alegres e felizes nesses últimos dois anos. Paulo, ainda bem que você existe! Eu te amo e ponto final. E aos seus avós, Alzira e Genessi, pelo querer bem a cada telefonema ou visita.

À família “da Volta”, pelo carinho, pelo cuidado, pela admiração e pelo apoio constantes! À minha avó Marilza, pelos papos no telefone e pelo interesse em saber exatamente o que eu estou fazendo (!); à minha madrinha, Marise, e ao (tio!!!) Marcello pelos lanches divertidos e gostosos de final de semana; ao Pedro, por ter orgulho de mim!

À família “Soares”, pelo carinho e pela torcida, mesmo que, às vezes, distante! À minha avó Isabel, por rezar por mim; ao meu padrinho, Júlio, pelo seu jeito único de fazer graça mesmo quando o assunto é sério; à tia Márcia, pela atenção e pelo incentivo; e às minhas primas, Michelle e Melina, pela amizade e por dividirem comigo momentos inesquecíveis!

A todos os meus amigos queridos do colégio, da faculdade, da vida!!!

Karina, obrigada pela amizade “mais mais”! Fernanda e Lindão, obrigada por cuidarem da Pequena de vocês! Livia, Natália, Fernanda Cruz e Nathália, muito obrigada por me apoiarem sempre! Mariana e Priscila, obrigada por me incentivarem e por entenderem a minha ausência! Daniel, obrigada pelo carinho e por me ligar sempre cobrando um Outback!

Ao Prof. Dr. Eduardo Ricci Júnior, pela oportunidade e pela confiança, dedicação e compreensão ao longo desses últimos dois anos, sem as quais não teria sido possível a realização desse trabalho.

À Prof^a. Rita, pelo carinho, pela amizade, pelo apoio, pela torcida, pelos ensinamentos técnicos durante os anos de monitoria na manipulação, pelas conversas sinceras cheias de lágrimas e sorrisos nos engarrafamentos da Linha Amarela e, é claro, pelo pedido feito a Santo Antônio!

A todos os funcionários da Farmácia Universitária, pelo carinho, pelo aprendizado, pela oportunidade de crescer profissionalmente! Em especial, agradeço à Cléo, à Gláucia e à Naira, pelo cuidado, pelos desabafos nas horas de desespero, pelas conversas sérias e, principalmente, pelas não tão sérias assim!

À Prof^a. Dr^a. Elisabete dos Santos e a todos do Laboratório de Desenvolvimento Galênico pelo convívio, pelo apoio e pelo suporte técnico necessário para a realização deste trabalho.

Aos colegas de mestrado, por viverem comigo as mesmas dúvidas, as mesmas preocupações, os mesmos problemas, mas também as alegrias e os sucessos em cada objetivo alcançado!

Ao Eduardo Rodrigues, por todos os momentos que passamos juntos no setor de manipulação, pela amizade, pelas implicâncias e pelo carinho! Duduzinho (!), obrigada por me ouvir todas as vezes que eu estava estressada (sempre, né?!)

Ao Luiz Cláudio (não chamei de Lula, viu?!), pela companhia divertida na volta pra casa e durante as análises de potencial zeta; à Mariana Sato, pela companhia na viagem para o simpósio de Ribeirão Preto, que rendeu muita conversa e risadas; e à Bárbara, pela surpresa do carinho e da admiração recíprocos!

À Mainara Rangel, a aluna de iniciação científica mais dedicada que eu já conheci! Mai, obrigada por ter participado ativamente desse projeto e espero que eu tenha contribuído um pouquinho para o seu crescimento acadêmico.

À Prof^ª. Dr^ª. Priscilla Finotelli, pelas contribuições feitas como membro da banca de acompanhamento e, principalmente, pelo carinho e pelo interesse em ajudar na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral, por ter aceitado fazer parte da banca de acompanhamento e pelas contribuições cedidas durante o trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Maurício Trambaioli, pelos ensinamentos de fluorimetria e por ter disponibilizado o espectrofluorímetro para as minhas análises quase que diárias.

Ao Sr. Celso, do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, pela prontidão na liofilização das amostras.

Ao Prof. Alexandre Rossi e toda à sua equipe do Laboratório de Biomateriais do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, pela colaboração nas análises de determinação de tamanho e de potencial zeta das nanopartículas.

À Prof^ª. Dr^ª. Carla Holandino, pela colaboração nos estudos com cultura de células, pela tutoria na disciplina de Farmacotécnica II, que foi, com certeza, a melhor experiência, e pela alegria e bom humor, que eram, para mim, um grande incentivo!

À Gleyce Moreno, pela enooooorme paciência e dedicação durante as análises em cultura de células. Muito obrigada mesmo!!! E às demais alunas do Laboratório Multidisciplinar, por terem me acolhido com tanto carinho.

Ao Venício Féo da Veiga, do Instituto de Microbiologia da UFRJ, pelo auxílio fundamental nas análises de microscopia eletrônica.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRJ, pela atenção, pela dedicação e pelo respeito.

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

À CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudo para a realização deste trabalho.

À Farmácia Universitária e à FAPERJ pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

SOARES, Mariana da Volta. Desenvolvimento e Avaliação de Nanopartículas de Poli-ε-caprolactona contendo Zinco(II)ftalocianina para Uso na Terapia Fotodinâmica do Câncer. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos têm sido reconhecidos como veículos promissores para a administração endovenosa de fotossensibilizantes da Terapia Fotodinâmica (TFD) do câncer. Zinco(II)ftalocianina (ZnPc) é um fotossensibilizante de segunda geração com caráter hidrofóbico e necessita ser incorporado em um sistema de liberação adequado para ser injetado sistemicamente. Nanopartículas (Nps) poliméricas têm sido utilizadas para superar os problemas de insolubilidade de fármacos e melhorar a sua biodisponibilidade e direcionamento para o tumor. Poli-ε-caprolactona (PCL) é um polímero sintético muito utilizado no preparo de Nps porque é biodegradável e biocompatível. O objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento, a caracterização e a avaliação da fototoxicidade de nanopartículas de poli-ε-caprolactona contendo zinco(II)ftalocianina para uso na TFD do câncer. As Nps foram preparadas pelo Método de Difusão do Solvente (MDS) e pelo Método de Emulsão e Evaporação do Solvente (MEES). O rendimento do processo foi melhor no MDS ($73,8 \pm 0,9\%$) do que no MEES ($44,1 \pm 2,1\%$) e a eficiência de encapsulação foi satisfatória para o MDS ($68,6 \pm 3,7\%$) e para o MEES ($59,1 \pm 2,9\%$). A caracterização dos sistemas de liberação desenvolvidos mostrou que as partículas apresentaram forma esférica e superfície regular, tamanho nanométrico e distribuição monomodal com valores de diâmetro médio de $332,8 \pm 7,7$ nm e $231,7 \pm 13,9$ nm ($p < 0,05$) para o MDS e MEES, respectivamente. Os valores de potencial zeta calculados foram de $-25,03 \pm 2,79$ mV e $-4,85 \pm 1,54$ mV ($p < 0,05$) para o MDS e para o MEES, respectivamente. A ZnPc extraída das Nps não teve suas propriedades espectroscópicas alteradas após a encapsulação, já que houve a manutenção das bandas de absorção no UV-visível e de

emissão de fluorescência. As análises de calorimetria e de difração de raios X sugeriram uma provável interação entre a ZnPc dispersa na forma amorfa e a matriz polimérica de PCL das nanopartículas após a nanoencapsulação. A liberação da ZnPc das Nps obtidas pelo MDS foi rápida com aproximadamente 17% liberada em 12 h e a liberação da ZnPc das Nps obtidas pelo MEES foi sustentada e lenta, com aproximadamente apenas 10% da ZnPc liberada em 48 h. No ensaio de fototoxicidade, houve uma redução significativa de 97% ($p < 0,05$) da viabilidade das células A549 (câncer de pulmão) após a incubação com Nps contendo ZnPc obtidas pelo MEES e irradiação de luz ($\lambda = 660 \text{ nm}$) na dose de 100 J/cm^2 . As Nps contendo ZnPc obtidas pelo MDS reduziram a viabilidade celular em 19,9% ($p < 0,05$) nas mesmas condições. A maior ação fototóxica observada com as Nps obtidas pelo MEES deve-se, provavelmente, à sua internalização em maior quantidade, que teria sido favorecida pelo tamanho pequeno e pelo potencial zeta próximo da neutralidade. A análise da morfologia da linhagem celular A549 sugeriu que a morte celular ocorreu por necrose e apoptose após a ação fotodinâmica da ZnPc liberada das Nps de PCL preparadas pelo MEES. Assim, as Nps de PCL obtidas pelo MEES são sistemas de liberação promissores para encapsular ZnPc para uso na TFD do câncer.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Nanopartículas, Zinco(II)ftalocianina, Poli- ϵ -caprolactona

ABSTRACT

SOARES, Mariana da Volta. Desenvolvimento e Avaliação de Nanopartículas de Poli-ε-caprolactona contendo Zinco(II)ftalocianina para Uso na Terapia Fotodinâmica do Câncer. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Nanostructured drug delivery systems have been recognized as promising vehicles for the endovenous administration of photosensitizers for cancer photodynamic therapy. Zinc(II)phtalocyanine (ZnPc) is a second generation photosensitizer with hydrophobic character and needs to be incorporated in a suitable delivery system to be injected systemically. Polymeric nanoparticles (Nps) have been used to overcome drugs insolubility problems and improve its bioavailability and target. Poly-ε-caprolactone (PCL) is a synthetic polymer much utilized in the preparation of Nps because it is biodegradable and biocompatible. The objective of this study was the development, the characterization and phototoxicity evaluation of poly-ε-caprolactone nanoparticles loading zinc(II)phtalocyanine for use in cancer photodynamic therapy. Nps were prepared by solvent displacement method (MDS) and emulsion and solvent evaporation method (MEES). The process yield was better in MDS ($73,8 \pm 0,9\%$) than in MEES ($44,1 \pm 2,1\%$) and the encapsulation efficiency was satisfactory for MDS ($68,6 \pm 3,7\%$) and for MEES ($59,1 \pm 2,9\%$). The characterization of the delivery systems developed showed that the particles have spherical shape and regular surface, nanometric size and monomodal distribution with mean diameters values of $332,8 \pm 7,7$ nm and $231,7 \pm 13,9$ nm for MDS and MEES, respectively. The calculated zeta potential values were $-25,03 \pm 2,79$ mV and $-4,85 \pm 1,54$ mV for MDS and for MEES, respectively. The ZnPc extracted from Nps did not have their spectroscopic properties altered after encapsulation, since UV-vis absorbance and fluorescence emission bands were maintained. Calorimetric and X-ray diffraction analysis suggested a probable interaction between ZnPc dispersed in an amorphous form and the PCL polymeric matrix of Nps after encapsulation.

The release of ZnPc from Nps obtained by MDS was fast with nearly 17% of ZnPc released after 12 h and the release of ZnPc from Nps obtained by MEES was sustained and slow with approximately only 10% of the ZnPc released after 48 h. Phototoxicity assay showed a significantly decrease of 97% ($p < 0,05$) of A549 cells (lung cancer) viability after incubation with ZnPc loaded nanoparticles prepared by MEES and irradiation ($\lambda = 660$ nm) with a light dose of 100 J/cm^2 . ZnPc loaded Nps prepared by MDS decreased 19,9% ($p < 0,05$) of cells viability in the same conditions. The highest phototoxic action observed with Nps prepared by MEES is probably due to your greater internalization, which would have been favored by the small size and zeta potential near neutrality. The A549 cell line morphological analysis has suggested that cellular death has occurred by necrosis and apoptosis after photodynamic action of ZnPc released from Nps prepared by MEES. Therefore, PCL Nps obtained by MEES are promising delivery systems to encapsulate ZnPc for cancer photodynamic therapy use.

Keywords: Photodynamic Therapy, Nanoparticles, Zinc(II)phtalocyanine, Poly- ϵ -caprolactone

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Desenvolvimento do tumor.	27
Figura 2.	Linha do tempo da história da terapia fotodinâmica.	30
Figura 3.	TFD no Hospital do Câncer Amaral Carvalho, Jaú, São Paulo.	31
Figura 4.	Principais etapas da terapia fotodinâmica.	32
Figura 5.	Mecanismos da terapia fotodinâmica.	34
Figura 6.	Mecanismos de ação da TFD nos tumores.	36
Figura 7.	Estrutura molecular da zinco (II) ftalocianina (ZnPc).	41
Figura 8.	Diferentes tipos de nanopartículas.	45
Figura 9.	“Efeito aumentado de permeação e retenção”: nanopartículas poliméricas acumulam-se preferencialmente em tumores sólidos.	47
Figura 10.	Estrutura do polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL).	50
Figura 11.	Esquema do processo de obtenção das nanopartículas pelo MDS.	56
Figura 12.	Esquema do processo de obtenção das nanopartículas pelo MEES.	58
Figura 13.	Esquema do perfil de liberação <i>in vitro</i> .	68
Figura 14.	Aparelho de irradiação de luz ($\lambda = 660$ nm) utilizado no ensaio de fototoxicidade das nanopartículas em cultura de células (Photon Laser I, DMC).	72
Figura 15.	Espectros de absorção (a) e de emissão de fluorescência (b) da ZnPc na concentração de $1\mu\text{g/ml}$ em acetona e em TFS-SDS.	84
Figura 16.	Curvas padrão de ZnPc em acetona e os respectivos espectros de emissão de fluorescência das concentrações utilizadas em $\mu\text{g/ml}$.	86
Figura 17.	Curvas padrão de ZnPc em TFS-SDS e os respectivos espectros de emissão de fluorescência das concentrações utilizadas em $\mu\text{g/ml}$.	87
Figura 18.	Fotomicrografias obtidas por MET: nanopartículas vazias (a, b) e nanopartículas com ZnPc (c, d) preparadas por MDS.	96
Figura 19.	Fotomicrografias obtidas por MET: nanopartículas vazias (a, b) e nanopartículas com ZnPc (c, d) preparadas por MEES.	97

Figura 20.	Espectros de absorção no UV-visível da ZnPc padrão e da ZnPc extraída das nanopartículas obtidas pelo MDS e pelo MEES na concentração de 1 µg/ml em acetona.	103
Figura 21.	Espectros de emissão de fluorescência da ZnPc padrão e da ZnPc extraída das nanopartículas obtidas pelo MDS e pelo MEES na concentração de 0,3 µg/ml em acetona.	103
Figura 22.	Difratogramas de Raios X das nanopartículas obtidas por MDS (a) e por MEES (b).	106
Figura 23.	Termogramas das nanopartículas obtidas por MDS (a) e por MEES (b).	108
Figura 24.	Perfil de liberação da ZnPc encapsulada em nanopartículas de PCL obtidas pelo MDS (a) e pelo MEES (b).	111
Figura 25.	Cinética de liberação da ZnPc encapsulada em nanopartículas preparadas pelo MDS (a) e pelo MEES (b), segundo o modelo de Higuchi.	116
Figura 26.	Estudos de toxicidade (ausência de luz) e de fototoxicidade (irradiação de luz – 100 J/cm ²) em cultura de células A549 das nanopartículas de PCL preparadas pelo MDS (a) e pelo MEES (b).	118
Figura 27.	Microscopias de luz de células A549 do grupo controle (a), incubadas com nanopartículas contendo ZnPc obtidas pelo MEES na ausência de luz (b) e após irradiação de luz (100J/cm ²) (c).	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação dos fotossensibilizantes.	38
Tabela 2.	Tipos de câncer e fármacos aprovados (2003).	39
Tabela 3.	Etapas do processo de centrifugação da suspensão de nanopartículas obtida por MDS.	56
Tabela 4.	Nanopartículas preparadas pelo MDS: variações nas condições de preparo.	76
Tabela 5.	Amostras de nanopartículas obtidas pelo MDS após definição das condições de preparo.	78
Tabela 6.	Nanopartículas preparadas pelo MEES: variações nas condições de preparo.	79
Tabela 7.	Resumo das condições de preparo de nanopartículas pelo MDS e pelo MEES.	81
Tabela 8.	Precisão e exatidão intra-dia e inter-dias do método analítico de quantificação da ZnPc encapsulada utilizando meio orgânico (acetona).	89
Tabela 9.	Precisão e exatidão intra-dia e inter-dias do método analítico de quantificação da ZnPc liberada utilizando meio aquoso (TFS-SDS).	89
Tabela 10.	Rendimento, eficiência de encapsulação e conteúdo de ZnPc de nanopartículas de PCL contendo ZnPc obtidas por MDS e MEES.	90
Tabela 11.	Tamanho das nanopartículas obtidas pelo MDS e pelo MEES.	94
Tabela 12.	Potencial zeta das nanopartículas obtidas pelo MDS e pelo MEES.	99
Tabela 13.	Estudo da cinética de liberação da ZnPc a partir das nanopartículas obtidas pelo MDS e pelo MEES.	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	Ácido aminolevunílico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DCM	Diclorometano
DMEM	Meio Dulbecco's Modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EE	Eficiência de Encapsulação
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
HEPES	Ácido N-2[4-Hidroxietil piperazina] N-2 etano sulfônico
IP	Índice de Polidispersividade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOG	Logaritmo
MDS	Método de Difusão do Solvente
MEES	Método de Emulsão e Evaporação do Solvente
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Nps	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCL	Poli-ε-caprolactona
PEG	Polietilenoglicol

PGA	Ácido poliglicólico
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Ácido polilático
PLGA	Ácido poli-(D,L láctico-co-glicólico)
PVA	Álcool polivinílico
qsp	Quantidade suficiente para
R	Rendimento
r	Coefficiente de correlação linear
R ²	Coefficiente de determinação
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFS	Tampão fosfato salino
TFS-SDS	Tampão fosfato salino contendo 2% de dodecil sulfato de sódio
UV	Ultravioleta
vis	Visível
ZnPc	Zinco(II)ftalocianina

LISTA DE FÓRMULAS E SÍMBOLOS

α	Partícula alfa
β	Partícula beta
S_0	Fotossensibilizante no estado fundamental
S_1	Fotossensibilizante no estado excitado singlete de menor energia
T_1	Fotossensibilizante no estado excitado triplete de menor energia
T_n	Fotossensibilizante no estado excitado triplete de maior energia
$h\nu$	Absorção de luz
k_f	Constante de decaimento por fluorescência
k_s, k_t	Constante de decaimento não radioativo
k_p	Constante de decaimento por fosforescência
cis	Cruzamento intersistema
$R^\bullet, X^\bullet, R^+$	Radicais livres
1O_2	Oxigênio no estado excitado singlete
3O_2	Oxigênio molecular no estado fundamental ou oxigênio triplete
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$O_2^{\bullet-}$	Ânion radical superóxido
HO^\bullet	Radical hidroxila
μs	Microsssegundo
μm	Micrômetro
nm	Nanômetro
J/cm^2	Joule por centímetro quadrado
Zn	Zinco
Al	Alumínio

AlPHCl	Cloroalúminioftalocianina
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
°C	Grau Celsius
mg	Miligrama
ml	Militro
µg	Micrograma
h	Hora
g	Gravidade
%	Porcentagem
λ _{EX}	Comprimento de onda de excitação
λ _{EM}	Comprimento de onda de emissão
cm	Centímetro
µl	Microlitro
%(p/v)	Porcentagem peso (g)/volume (ml)
CuKα	Radiação de cobre com comprimento de onda Kα
Å	Ângstron
kV	Kilovolt
mA	Miliampere
°	Grau
θ	Theta
In	Índio
KCl	Cloreto de Potássio
N	Normalidade

CO_2	Gás carbônico
% (v/v)	Porcentagem volume / volume
mV	Milivolt
Q_t	Quantidade de fármaco liberado no tempo t
Q_0	Quantidade inicial do fármaco na solução
K_0	Constante cinética
K_t	Constante de liberação de primeira ordem
K_H	Constante de liberação de Higuchi

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 CÂNCER	26
2.1.1 Tratamento Clássico do Câncer	28
2.2 TERAPIA FOTODINÂMICA	29
2.2.1 Histórico	30
2.2.2 Mecanismo de Ação	32
2.2.2.1 Mecanismos Fotofísico e Fotoquímico	33
2.2.3 Resposta Biológica	35
2.2.4 Fotossensibilizantes	37
2.2.4.1 As ftalocianinas	40
2.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NANOESTRUTURADOS	43
2.3.1 Nanopartículas	44
2.3.1.1 Preparo e Caracterização de Nanopartículas	48
2.3.2 Poli-ε-caprolactona	49
3 OBJETIVOS	51
3.1 OBJETIVO GERAL	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 MATERIAL	52
4.1.1 Solventes, Reagentes, Matérias-primas e Meio de Cultura	52
4.1.2 Equipamentos	53
4.2 MÉTODOS	55
4.2.1 Preparo das Nanopartículas	55
4.2.1.1 Método de Difusão do Solvente (MDS)	55

4.2.1.2 Método de Emulsão e Evaporação do Solvente (MEES)	57
4.2.2 Cálculo do Rendimento do Processo	58
4.2.3 Metodologia de Quantificação de ZnPc por Emissão de Fluorescência	59
4.2.3.1 Preparo das soluções padrão	59
4.2.3.2 Determinação dos espectros de absorção no UV-vis e de emissão de fluorescência	60
4.2.3.3 Obtenção das curvas analíticas de ZnPc	60
4.2.3.4 Validação dos métodos analíticos	61
4.2.4 Determinação da Eficiência de Encapsulação	62
4.2.5 Caracterização das Nanopartículas	63
4.2.5.1 Determinação do tamanho	63
4.2.5.2 Estudo da morfologia	64
4.2.5.3 Determinação do potencial zeta	64
4.2.6 Caracterização Espectroscópica da ZnPc Encapsulada	65
4.2.6.1 Determinação dos espectros de absorção no UV-vis	65
4.2.6.2 Determinação dos espectros de emissão de fluorescência	66
4.2.7 Avaliação da Interação Fármaco-Polímero	66
4.2.7.1 Difração de Raios X	67
4.2.7.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	67
4.2.8 Perfil de Liberação <i>In vitro</i>	68
4.2.9 Avaliação da Toxicidade e da Fototoxicidade das Nanopartículas em Cultura de Células	69
4.2.9.1 Preparo do meio de cultura DMEM	69
4.2.9.2 Preparo do azul de tripan	69
4.2.9.3 Crescimento e manutenção de cultura celular	69
4.2.9.4 Preparo das células para os testes de toxicidade e fototoxicidade	71
4.2.9.5 Ensaios de toxicidade e fototoxicidade	71
4.2.9.6 Viabilidade celular pelo método MTT	73

4.2.9.6.1 Preparo do MTT	73
4.2.9.6.2 Determinação da viabilidade celular	74
4.2.10 Avaliação Morfológica da Linhagem Celular A549	74
4.2.10.1 Preparo da solução de Bouin	75
4.2.10.2 Fixação e coloração das lamínulas	75
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
5.1 MÉTODOS DE ENCAPSULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	76
5.1.1 Método de Difusão do Solvente (MDS)	76
5.1.2 Método de Emulsão e Evaporação do Solvente (MEES)	79
5.1.3 Concentração, Purificação e Liofilização	81
5.2 METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE ZnPc POR EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA	83
5.2.1 Determinação dos espectros de absorção no UV-vis e de emissão de fluorescência	83
5.2.2 Obtenção das curvas analíticas de ZnPc	86
5.2.2.1 Curva analítica da ZnPc em acetona	86
5.2.2.2 Curva analítica da ZnPc em TFS-SDS	87
5.2.3 Validação dos métodos analíticos	88
5.3 RENDIMENTO DO PROCESSO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	90
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	93
5.4.1 Tamanho das Nanopartículas	93
5.4.2 Morfologia das Nanopartículas	96
5.4.3 Potencial Zeta das Nanopartículas	99
5.5 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DA ZnPc EXTRAÍDA DAS NANOPARTÍCULAS	102
5.6 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO FÁRMACO-POLÍMERO	105
5.6.1 Difração de Raios X	105
5.6.2 Calorimetria Diferencial de Varredura	108

5.7 PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	110
5.8 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DA FOTOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS EM CULTURA DE CÉLULAS	117
5.9 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA LINHAGEM CELULAR A549	125
6 CONCLUSÃO	128
7 PERSPECTIVAS	130
REFERÊNCIAS	131

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo e a pesquisa com ênfase no desenvolvimento de tratamentos mais seletivos para esta doença tem sido considerada muito relevante (SHARMAN, ALLEN & VAN LIER, 1999).

A terapia fotodinâmica (TFD) e o emprego de sistemas nanoestruturados como veículos para a liberação dos agentes fotossensibilizantes dessa terapia tornaram-se abordagens promissoras para um tratamento mais seletivo do câncer (BECHET *et al.*, 2008).

Atualmente, a TFD é uma modalidade de tratamento bem estabelecida (BECHET *et al.*, 2008). O mecanismo envolvido nesta terapia é a ativação de um fotossensibilizante por luz visível na presença de oxigênio molecular, o que resulta em um efeito citotóxico (SIBATA *et al.*, 2000). A seletividade deste tratamento está relacionada com o fato de os componentes da terapia serem tóxicos apenas quando combinados, de forma que somente as células que forem expostas ao fotossensibilizante e à luz, simultaneamente, serão danificadas (SHARMAN, ALLEN & VAN LIER, 1999).

As ftalocianinas são os fotossensibilizantes de segunda geração mais promissores para a utilização na TFD (NUNES, SGUILLA & TEDESCO, 2004). A zinco(II)ftalocianina (ZnPc) é uma ftalocianina que apresenta propriedades favoráveis para ser utilizada nesta terapia. No entanto, a ZnPc é extremamente hidrofóbica e necessita ser incorporada em um sistema de liberação adequado para a administração endovenosa *in vivo* (SONCIN *et al.*, 1995).

Sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos, conhecidos também como nanocarreadores, têm sido reconhecidos como potenciais veículos de fotossensibilizantes para uso na TFD (BECHET *et al.*, 2008; CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008). As nanopartículas poliméricas são sistemas nanoestruturados que têm se destacado como veículos ideais para serem utilizados na TFD, entre outros motivos, devido ao seu tamanho nanométrico, que possibilita a administração endovenosa dos fotossensibilizantes, e à capacidade de carregar

substâncias hidrofóbicas, como é o caso da maioria dos fotossensibilizantes (CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008).

As nanopartículas são sistemas poliméricos e podem ser preparadas a partir de polímeros naturais ou sintéticos. A poli- ϵ -caprolactona (PCL) é um polímero sintético, biodegradável, biocompatível e barato, e tem sido utilizada na encapsulação de diversos tipos de fármacos (SINHA *et al.*, 2004).

Existem diversos métodos de preparo de nanopartículas bem descritos na literatura e, de acordo com as características físico-químicas do fármaco a ser encapsulado, pode-se escolher o método mais adequado (REIS *et al.*, 2006). Os métodos mais utilizados para a encapsulação de fármacos hidrofóbicos são o método de difusão do solvente (MDS) ou nanoprecipitação e o método de emulsão e evaporação do solvente (MEES).

Após o preparo das nanopartículas, é importante a caracterização desse sistema. As características de um sistema nanoestruturado consideradas mais importantes são o tamanho, o potencial zeta e a eficiência de encapsulação (HANS & LOWMAN, 2002), mas estudos de liberação *in vitro*, avaliação da toxicidade em cultura de células e avaliação da interação entre fármaco e polímero são relevantes para um maior conhecimento do sistema polimérico desenvolvido.

A combinação de um fotossensibilizante e um sistema de liberação adequados pode melhorar a eficácia do tratamento da TFD (SONCIN *et al.*, 1995). As nanopartículas, por exemplo, são capazes de carrear fotossensibilizantes hidrofóbicos pelos vasos sanguíneos e possibilitam o seu acúmulo no tumor (PARK *et al.*, 2008), melhorando a seletividade da terapia.

Portanto, a utilização de nanopartículas biodegradáveis é promissora para o futuro da TFD (BECHET *et al.*, 2008) e o desenvolvimento de um sistema de liberação, como as nanopartículas de PCL, para a incorporação da ZnPc, seria uma solução simples e viável para a administração endovenosa da ZnPc e posterior liberação deste fotossensibilizante para uso na TFD.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo e configura-se como um grande problema de saúde pública. As maiores taxas de incidência de câncer são encontradas nos países desenvolvidos (Estados Unidos, Itália, Austrália, Alemanha, Canadá e França). Nos países em desenvolvimento, as taxas mais elevadas encontram-se nos países africanos e no leste asiático (Instituto Nacional de Câncer).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer foi responsável por 7,9 milhões de mortes em 2007 e estima-se que ocorrerão 12 milhões de óbitos por câncer em 2030. Os maiores índices de óbito ocorreram nos casos de câncer de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama. O câncer de pulmão é o mais comum de todos os tumores malignos e permanece como uma doença altamente letal. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer estima 27 mil novos casos de câncer de pulmão em 2009.

O câncer, também denominado neoplasia maligna e tumor maligno, é uma doença caracterizada pela multiplicação e propagação descontroladas de formas anormais das próprias células corporais (RANG *et al.*, 2004). A formação de um tumor se inicia com uma única célula neoplásica rodeada de células normais. Essa célula neoplásica se multiplicará numa taxa mais rápida do que as células normais e, uma vez formada a massa tumoral, o tecido sadio não será mais capaz de competir pelos nutrientes provenientes da corrente sanguínea. Assim, as células tumorais irão deslocar as células normais até atingirem o tamanho máximo limitado pela difusão de nutrientes. As células do tumor continuarão se dividindo, mas as células periféricas terão melhor acesso aos nutrientes e as células no interior do tumor irão formar um núcleo necrótico. Quando a taxa de proliferação se igualar à taxa de morte celular, o tumor estará no seu tamanho máximo até que novos vasos sanguíneos se formem para fornecer nutrientes necessários para a

expansão do tumor (BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2004). Esse processo está ilustrado na Figura 1.

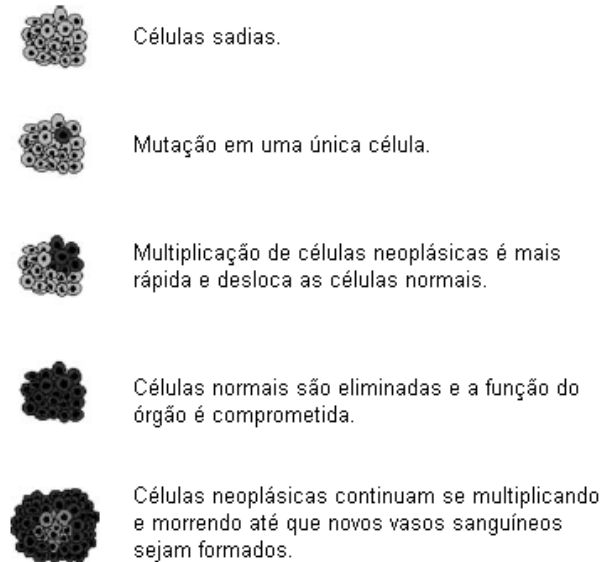


Figura 1. Desenvolvimento do tumor (Adaptado de BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2004).

A transformação de uma célula normal em uma célula neoplásica resulta da interação entre os fatores genéticos do indivíduo e fatores externos, que podem ser divididos em físicos, químicos ou biológicos. Entre eles, estão a exposição excessiva à radiação solar e às radiações ionizantes; o tabagismo e o consumo excessivo de álcool; as infecções virais e bacteriana. Além disso, as falhas do sistema imunológico, a idade avançada e o estresse são fatores que também podem estar relacionados com o desenvolvimento do câncer (OMS).

As células malignas diferem das células normais pelas suas propriedades de proliferação descontrolada, perda da diferenciação celular e da função, poder de invasão e capacidade de realizar metástases (RANG *et al.*, 2004). As mutações genéticas que levam ao desenvolvimento da neoplasia ocorrem principalmente nos proto-oncogenes e nos genes supressores de tumor. Em células normais, os proto-oncogenes atuam em diferentes níveis da proliferação celular, mas podem promover o crescimento tumoral quando mutados. Da mesma forma, uma mutação nos genes supressores de tumores como pRb e p53 resulta na disfunção das proteínas que

normalmente inibem a progressão do ciclo celular, facilitando o crescimento celular anormal (VERMEULEN, BOCKSTAELE & BERNEMAN, 2003).

2.1.1 Tratamento Clássico do Câncer

O tratamento clássico do câncer envolve diversas terapias como a quimioterapia, a cirurgia e a radioterapia. Os objetivos da quimioterapia e da radioterapia são impedir a proliferação celular e promover a destruição das células tumorais, que são mais susceptíveis à morte por possuírem uma maior velocidade de crescimento do que as células saudáveis (BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2004). A cirurgia, por sua vez, é utilizada para a retirada mecânica de tecidos neoplásicos localizados.

A quimioterapia é um tratamento a base de fármacos citotóxicos e sua eficácia é limitada pela alta toxicidade e baixa seletividade para as células tumorais desses agentes antineoplásicos (JAIN & JAIN, 2008) e, ainda, pela dificuldade de se atingir a concentração terapêutica necessária do fármaco no sítio do tumor pelo período de tempo desejado sem que o fármaco cause efeitos adversos em outros órgãos (CHAWLA & AMIJI, 2002). A radioterapia, por sua vez, induz a morte celular por ação de radiações ionizantes, que podem ser eletromagnética, raios X ou gama, e particulada, partículas α e β , prótons e nêutrons. A radiação elimina o tecido neoplásico, mas também atinge os tecidos normais causando reação inflamatória local.

Essas terapias tradicionais envolvem propriedades citotóxicas indiscriminadas e, portanto, resultam em efeitos adversos causados pela perda da função das células normais (SHARMAN, ALLEN & VAN LIER, 1999). Os principais efeitos adversos relacionados à quimioterapia são: perda do apetite, vômitos, úlceras, dores abdominais, diarreia e queda de cabelo.

O desenvolvimento de novos tratamentos que apresentem maior seletividade para o tecido neoplásico é muito importante para a melhoria da terapia do câncer (SHARMAN, ALLEN & VAN LIER, 1999). Pesquisas clínicas mostraram que pacientes estão abertos a novas opções

terapêuticas e o principal objetivo dessas novas terapias é aumentar o tempo e a qualidade de vida dos pacientes com câncer. Em todos os casos, a eficácia do tratamento está diretamente relacionada com a habilidade do tratamento de alcançar e eliminar as células neoplásicas afetando o mínimo possível as células saudáveis (BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2004).

2.2 TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica relativamente nova para o tratamento de doenças neoplásicas e não-neoplásicas (SIBATA *et al.*, 2000). Ela tem sido considerada promissora para o tratamento do câncer desde a década de 1980, o que pode ser atribuído ao seu conceito básico: trata-se de um método de tratamento clínico em que as células e os tecidos neoplásicos são destruídos por uma combinação de luz e fotossensibilizante na presença de oxigênio molecular tecidual (SCHUITMAKER *et al.*, 1996; CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008).

A TFD apresenta algumas vantagens quando comparada com as terapias convencionais utilizadas para o tratamento do câncer:

- especificidade pelo tumor, permitindo o tratamento de tumores específicos e localizados, o que não ocorre na quimioterapia;
- regeneração do tecido normal após o tratamento, diferentemente da cirurgia;
- repetição da terapia, sem efeito tóxico cumulativo, o que ocorre na radioterapia;
- relação custo-benefício favorável;
- altas taxas de cura;
- indução de imunização, evitando os efeitos imunossupressores;
- é uma terapia ambulatorial, diferentemente da radioterapia e da quimioterapia, que podem durar semanas ou meses, e da cirurgia, que pode requerer hospitalização prolongada (MILLER *et al.*, 2007; CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008).

2.2.1 Histórico

O uso da luz como terapia na medicina teve sua origem nas antigas civilizações da Grécia, Egito e Índia, que utilizavam a luz para tratar diversas doenças, incluindo psoríase e vitiligo. A fototerapia desapareceu por muitos anos e só foi redescoberta pela civilização ocidental no início do século XX por Niels Finsen, Oscar Raab e Herman von Tappeiner (DANIELL & HILL, 1991; STABLES & ASH, 1995; DOLMANS, FUKUMURA & JAIN, 2003).

A aplicação terapêutica da TFD em pacientes com câncer ocorreu muito tempo depois. Em 1976, Kelly *et al.* iniciaram os primeiros estudos clínicos em pacientes com câncer de bexiga, que foram tratados com hematoporfirina, após Dougherty *et al.* descobrirem a habilidade desse fotossensibilizante de localizar o tumor e as suas propriedades fototóxicas nas células tumorais. Esta descoberta levou ao desenvolvimento da TFD, uma ferramenta promissora para o tratamento moderno do câncer (DOLMANS, FUKUMURA & JAIN, 2003; TRIESSCHEIJN *et al.*, 2006). Na Figura 2, estão descritos os principais eventos do desenvolvimento da TFD.

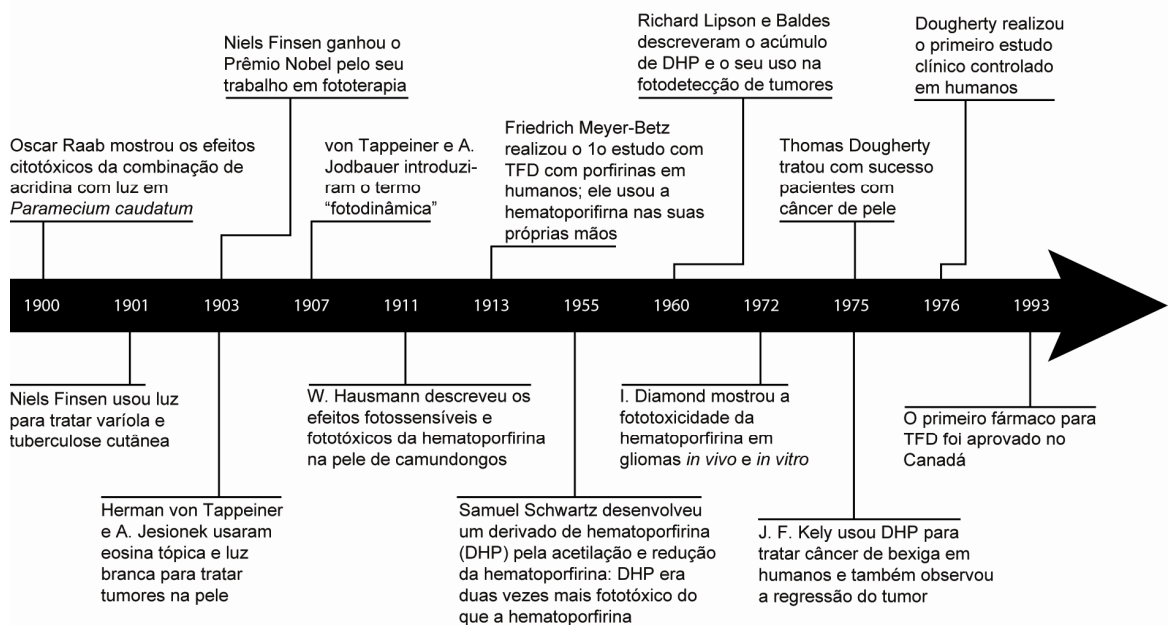


Figura 2. Linha do tempo da história da terapia fotodinâmica (Adaptado de DOLMANS, FUKUMURA & JAIN, 2003).

Atualmente, a TFD tem se mostrado eficaz no tratamento de diversos tipos de neoplasias, como de bexiga, pulmão, cabeça e pescoço, esôfago e nos casos de esôfago de Barrett. Além disso, a TFD vem sendo considerada o tratamento ideal para o câncer de pele (SCHUITMAKER *et al.*, 1996; TRIESSCHEIJN *et al.*, 2006; CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008).

Outras indicações da TFD são, por exemplo, para tratamentos nos olhos (degeneração macular), na pele (queratose actínica, psoríase), em inflamações localizadas (artrite reumatóide), e em infecções localizadas (periodontite) (CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008).

No Brasil, estão sendo realizadas pesquisas experimentais e estudos clínicos de TFD. A experiência clínica da TFD em São Paulo envolve a colaboração do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, do Hospital Amaral Carvalho em Jaú, e da Escola de Medicina da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (Figura 3).

Os fotossensibilizantes usados são o Photogem[®] (derivado da hematoporfirina da Rússia), para os casos de injeção sistêmica, e o ácido aminolevulínico (ALA), para as aplicações tópicas. Diversos tipos de câncer são tratados, entre eles, câncer da cavidade oral, carcinoma de nasofaringe, câncer de pele e de mama e câncer de esôfago e de bexiga (BAGNATO *et al.*, 2005).



Figura 3. TFD no Hospital do Câncer Amaral Carvalho, Jaú, São Paulo (Adaptado de BAGNATO *et al.*, 2005).

2.2.2 Mecanismo de Ação

A TFD envolve dois componentes individualmente não-tóxicos que ao serem combinados induzem efeitos no tecido de uma maneira oxigênio-dependente; ou seja, a combinação da luz visível com um fotossensibilizante, na presença de oxigênio molecular, produz agentes citotóxicos letais que podem inativar as células tumorais (SHARMAN, ALLEN & VAN LIER, 1999; DOLMANS, FUKUMURA & JAIN, 2003).

O tratamento consiste na administração do fotossensibilizante e, após um intervalo de tempo suficiente para o seu acúmulo no tecido tumoral, irradia-se o tumor para a formação do fotossensibilizante no estado excitado (BECHET *et al.*, 2008). O fotossensibilizante pode ser administrado por diversas vias, como por exemplo, injeção endovenosa ou aplicação tópica na pele (DOLMANS, FUKUMURA & JAIN, 2003). A luz visível é aplicada em um comprimento de onda específico, que coincide com o comprimento de onda de absorção máxima do fotossensibilizante (CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008), o qual é ativado e transfere energia da luz para o oxigênio molecular, gerando espécies reativas do oxigênio que destroem as células tumorais (Figura 4).

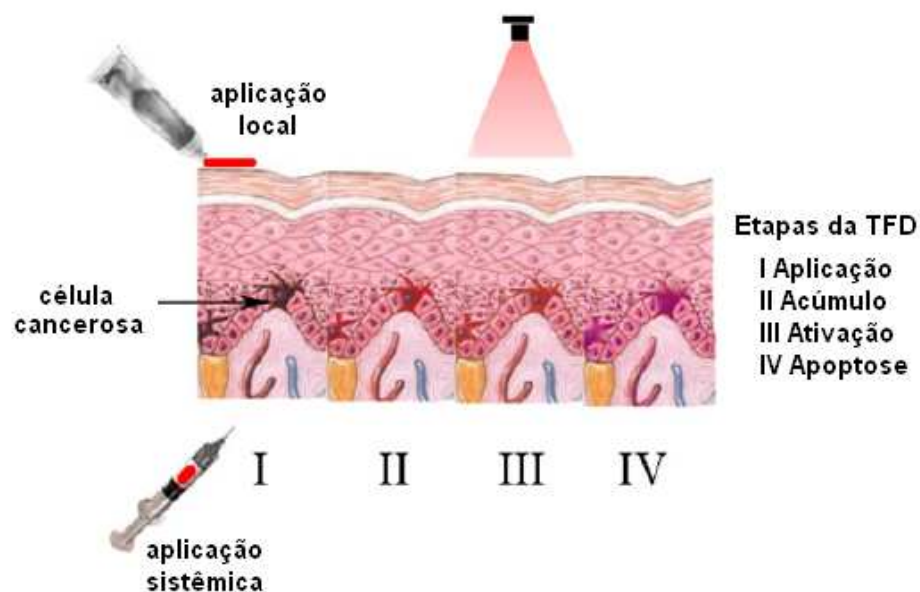


Figura 4. Principais etapas da terapia fotodinâmica (Adaptado de CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008).

Essas reações ocorrem no local imediato em que o fotossensibilizante absorve luz e, portanto, as respostas biológicas ao fotossensibilizante são ativadas apenas nas áreas particulares do tecido que foi exposto à luz (DOLMANS, FUKUMURA & JAIN, 2003). Isso confere maior seletividade ao tecido neoplásico, uma vez que apenas essas células que são expostas ao fotossensibilizante, à luz e ao oxigênio serão também expostas ao efeito citotóxico. A seletividade da TFD é produzida tanto pelo direcionamento preferencial do fotossensibilizante para o tecido tumoral como pela habilidade de se ativar o fotossensibilizante apenas no tecido tumoral pela restrição da iluminação para aquela região específica. Dessa forma, a TFD permite a destruição seletiva dos tumores enquanto mantém intacto o tecido normal (SHARMAN, ALLEN & VAN LIER, 1999).

2.2.2.1 Mecanismos Fotofísico e Fotoquímico

O processo fotodinâmico inicia-se quando o fotossensibilizante absorve um fóton e sofre decaimentos simultâneos ou sequenciais que resultam em reações de transferência de energia intramolecular. As principais classes de reações são a foto-oxidação por radicais (Tipo I), a foto-oxidação por oxigênio singlete (Tipo II) e a fotorreação sem envolvimento do oxigênio (Tipo III) (SIBATA *et al.*, 2000).

Diversos autores revisaram e descreveram os mecanismos envolvidos na terapia fotodinâmica (SHARMAN, ALLEN & VAN LIER, 1999; SIBATA *et al.*, 2000; DOLMANS, FUKUMURA & JAIN, 2003; CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008). As principais reações estão representadas na Figura 5 e descritas a seguir.

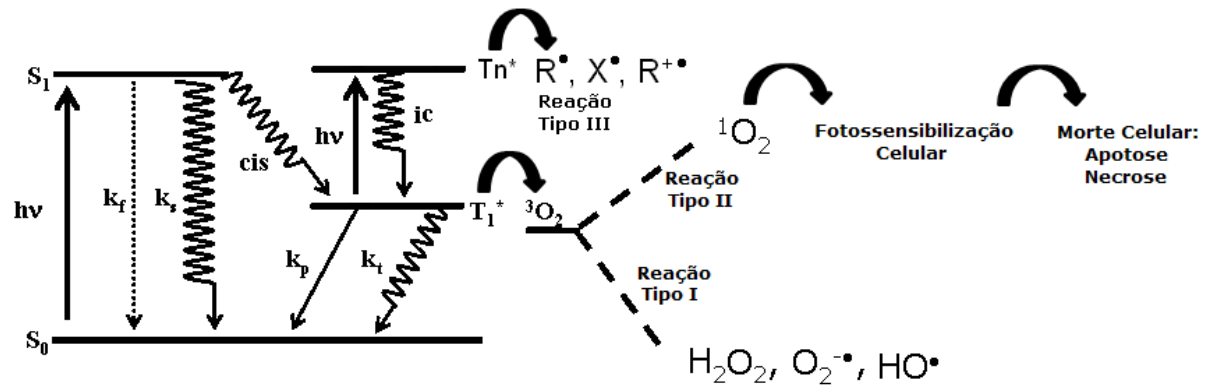


Figura 5. Mecanismos da terapia fotodinâmica.

$h\nu$ – absorção de luz

S_0 – estado singlete fundamental

S_1 – estado singlete excitado

T_n – segundo estado triplete excitado

T_1 – primeiro estado triplete excitado

K_f – constante de velocidade de fluorescência

K_p – constante de velocidade de fosforescência

ic – conversão intersistema

cis – cruzamento intersistema

k_s e k_t – constantes de decaimento não radioativo

R^\bullet , X^\bullet , $R^{+\bullet}$ – produtos de reação química (radicais livres)

H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, HO^\bullet – espécies reativas de oxigênio

1O_2 – oxigênio no estado excitado singlete

3O_2 – oxigênio no estado fundamental (estado triplete)

Após a absorção de um fóton de luz, o fotossensibilizante no estado fundamental (S_0) é ativado para um estado singlete excitado (S_1). Moléculas nesse estado decaem rapidamente de volta ao estado fundamental (S_0) com a emissão de luz (fluorescência) (K_f) ou calor (K_s), ou podem ir ao estado triplete por cruzamento intersistema (cis).

O fotossensibilizante no estado triplete excitado (T_1) pode decair para o estado fundamental por fosforescência (K_p) ou reagir de três formas:

Reação de Tipo I: o fotossensibilizante no estado triplete excitado (T_1) reage diretamente com o substrato (3O_2) e transfere o átomo de hidrogênio ou elétrons para gerar radicais livres (R^\bullet , X^\bullet , $R^{+\bullet}$). Essas espécies de radicais livres são geralmente altamente reativas e podem rapidamente interagir com o oxigênio molecular para gerar espécies reativas do oxigênio, como ânions superóxidos ou radicais hidroxila, causando dano biológico irreparável.

Reação de Tipo II: o fotossensibilizante no estado triplete excitado (T_1) transfere energia diretamente para o oxigênio molecular (3O_2) para formar oxigênio singlete (1O_2). O oxigênio

singleto é extremamente reativo e pode interagir com um largo número de substratos biológicos, induzindo dano oxidativo e morte celular.

Reação de Tipo III: o fotossensibilizante no estado tripleto (T_1) excitado absorve luz e gera radicais livres.

É geralmente aceito que os mecanismos de tipo II predominam durante a TFD e que o oxigênio singleto é o principal agente citotóxico responsável pelos efeitos biológicos que ocorrem. O oxigênio singleto é altamente reativo, mas apresenta um tempo de vida curto, menor do que $3,5 \mu\text{s}$, e pode se difundir apenas por $0,01$ a $0,02 \mu\text{m}$ durante esse período (HATZ, LAMBERT & OGILBY, 2007). Dessa forma, a extensão do dano é limitada ao local de concentração do fotossensibilizante, que, portanto, deve estar localizado perto do alvo no momento da iluminação (TRIESSCHEIJN *et al.*, 2006; CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008).

2.2.3 Resposta Biológica

A TFD induz a produção de agentes citotóxicos que rapidamente destroem as células neoplásicas; esta resposta é afetada *in vivo* pela complexidade dos sistemas biológicos. Diversos alvos celulares podem ser afetados durante a TFD, incluindo mitocôndria, lisossomos, membranas plasmáticas, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e núcleo. A morte celular pode ocorrer por necrose ou apoptose (SHARMAN, ALLEN & VAN LIER, 1999; BUYTAERT, DEWAELE & AGOSTINIS, 2007).

A eficácia da TFD no tratamento do câncer, ou seja, a extensão do fotodano e da citotoxicidade, é multifatorial e depende do tipo de fotossensibilizante, da concentração do fármaco e da sua localização intra- e extracelular, da dose de luz exposta, do tempo entre a administração do fármaco e a exposição à luz e da disponibilidade de oxigênio (DOLMANS, FUKUMURA & JAIN, 2003; TRIESSCHEIJN *et al.*, 2006).

Esses fatores podem modular três processos independentes, mas possivelmente relacionados, que contribuem para a eficiência da destruição do tumor pela TFD: morte celular tumoral direta por necrose ou apoptose; destruição da vasculatura no tumor e ativação da resposta imune contra as células tumorais remanescentes (DOLMANS, FUKUMURA & JAIN, 2003; CASTANO, DEMIDOVA & HAMBLIN, 2005b; CASTANO, MROZ & HAMBLIN, 2006; TRIESSCHEIJN *et al.*, 2006; BUYTAERT, DEWAELE & AGOSTINIS, 2007).

Na Figura 6, estão apresentados esses mecanismos. Inicialmente, a combinação de fotossensibilizante e luz gera as espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), responsáveis pela morte celular direta das células tumorais, que pode ocorrer por necrose ou apoptose. Esse comportamento é diferente da maioria dos agentes citotóxicos convencionais, que normalmente causam apenas a morte celular apoptótica (CASTANO, MROZ & HAMBLIN, 2006). O colapso da microvasculatura também é observado logo após a TFD. A destruição da vasculatura associada ao tumor faz com que haja a privação local de oxigênio e nutrientes, resultando em hipóxia severa e persistente, que culmina com o infarto do tumor. Além disso, a TFD é capaz de ativar a resposta imune contra as células tumorais. Essa resposta envolve a atividade antitumoral das células inflamatórias induzidas pela TFD e a geração de uma resposta imunológica antitumoral prolongada (CASTANO, DEMIDOVA & HAMBLIN, 2005b).

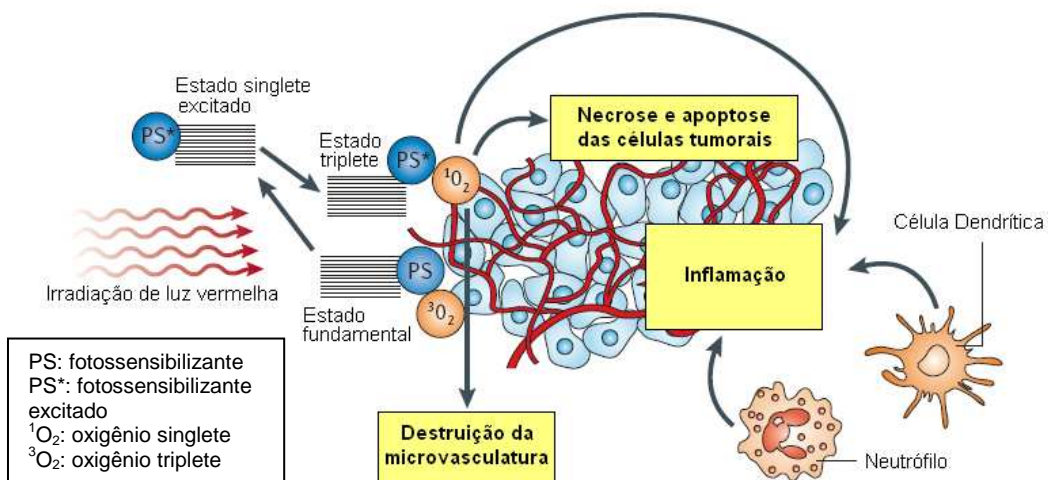


Figura 6. Mecanismos de ação da TFD nos tumores (Adaptado de CASTANO, MROZ & HAMBLIN, 2006).

A importância relativa de cada um desses processos para a resposta geral do tumor ainda está por ser definida. No entanto, já é estabelecido que a combinação desses componentes é necessária para a cura do tumor (DOLMANS, FUKUMURA & JAIN, 2003; CASTANO, DEMIDOVA & HAMBLIN, 2005b).

2.2.4 Fotossensibilizantes

Fotossensibilizantes são compostos que absorvem energia da luz em comprimentos de onda específicos e utilizam esta energia para induzir reações em outras moléculas que não absorvem energia (SIBATA *et al.*, 2000).

A principal característica de qualquer fotossensibilizante é a sua habilidade de se acumular preferencialmente em tecido tumoral e gerar agentes citotóxicos para induzir o efeito biológico desejado (SHARMAN, ALLEN & VAN LIER, 1999). No entanto, existem diversas propriedades que um fotossensibilizante ideal deve apresentar, as quais podem ser divididas em:

- *físico-químicas*: alta pureza química, ou seja, ausência de toxicidade e de formação de subprodutos tóxicos; alto coeficiente de extinção molar no visível; baixa tendência à agregação no meio aquoso;
- *fotofísicas*: longo tempo de meia-vida no estado triplete; alto rendimento de geração de oxigênio singlete e espécies reativas de oxigênio e/ou transferência de elétron para moléculas de substrato;
- *farmacológicas*: direcionamento seletivo e eficiente para o tecido tumoral; eliminação rápida do organismo e baixa toxicidade sistêmica;
- *fototerapêuticas*: destruição preferencial e eficiente de células tumorais; ausência de efeitos adversos, devido ao mínimo acúmulo na pele, evitando a fotossensibilidade cutânea; mínima toxicidade no escuro e citotoxicidade apenas na presença de luz; ausência de potencial mutagênico ou carcinogênico (JORI, 1996; SHARMAN, ALLEN & VAN LIER, 1999; ALLISON *et al.*, 2004).

Os fotossensibilizantes podem ser classificados em famílias, de acordo com a sua estrutura química, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos fotossensibilizantes.

Famílias de Fotossensibilizantes	
Derivados da Porfirina:	Derivados da hematoporfirina, derivados da benzoporfirina, texafirinas
Derivados da Clorofila:	Clorinas, pupurinas, bacterioclorinas
Corantes:	Ftalocianinas, naftalocianinas

As porfirinas são conhecidas como a primeira geração de fotossensibilizantes e é baseada na hematoporfirina e nos seus derivados; após a purificação e manipulação, os derivados de hematoporfirina são transformados em produtos comerciais chamados de Photofrin[®], Photosan[®], Photocan[®] (ALLISON *et al.*, 2004).

O Photofrin[®] foi o primeiro fotossensibilizante aprovado para uso na TFD do câncer (Canadá, 1993). Atualmente, já foi aprovado por várias agências de saúde e é utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer em muitos países. No entanto, apresenta algumas limitações, como a baixa absorção no comprimento de onda máximo de 630 nm e, com isso, há a necessidade de doses altas de luz; a baixa seletividade pelas células neoplásicas; e a sensibilização da pele do paciente por 4 a 12 semanas (TRIESSCHEIJN *et al.*, 2006).

Embora essas desvantagens não tenham interrompido o uso do Photofrin[®], a pesquisa para a obtenção e utilização de novos fotossensibilizantes na TFD continua sendo de grande importância (SHARMAN, ALLEN & VAN LIER, 1999). Os problemas encontrados com a família das porfirinas levaram ao desenvolvimento da segunda geração de moléculas fotossensibilizantes, como os derivados da porfirina, as clorinas, as ftalocianinas e as naftalocianinas. Esses compostos apresentam a vantagem de serem puros, geradores efetivos de oxigênio singlete e apresentarem alta absorção na faixa de 650 a 800 nm, que é a faixa de comprimento de onda em que há máxima transmitância de luz pelos tecidos e, portanto, a mais

utilizada no tratamento de tumores. Além disso, apresentam alta seletividade para tecidos tumorais e rápida eliminação do organismo, o que minimiza os efeitos adversos (SCHUITMAKER *et al.*, 1996; KONAN, GURNY & ALLÉMAN, 2002; CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008).

O Photosense[®] é um fotossensibilizante de segunda geração aprovado para uso na TFD na Rússia e na Índia. Trata-se de uma mistura de derivados da alumínio-ftalocianina sulfonada com atividade promissora no tratamento de diversos tipos de câncer (SHARMAN, ALLEN & VAN LIER, 1999; ALLISON *et al.*, 2004).

Os principais fotossensibilizantes já aprovados para o uso na TFD estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Tipos de câncer e fármacos aprovados (2003) (Adaptado de DOLMANS, FUKUMURA & JAIN, 2003).

Doença	Fármaco	Países
Queratose actínica	Levulan [®] , Metvix [®]	União Européia
Esôfago de Barrett	Photofrin [®]	União Européia, EUA
Displasia cervical	Photofrin [®]	Japão
Carcinoma de célula basal	Metvix [®]	União Européia
Câncer cervical	Photofrin [®]	Japão
Câncer endobronquial	Photofrin [®]	Canadá, Dinamarca, Finlândia, França, Irlanda, Japão, Reino Unido, EUA
Câncer esofágico	Photofrin [®]	Canadá, Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Irlanda, Japão, Reino Unido, EUA
Câncer gástrico	Photofrin [®]	Japão
Câncer de cabeça e de pescoço	Foscan [®]	União Européia
Câncer de bexiga	Photofrin [®]	Canadá
Câncer de pele, mama, pulmão e gastrointestinal	Photosense [®]	Rússia e Índia

2.2.4.1 As ftalocianinas

Entre os fotossensibilizantes de segunda geração mais promissores, estão as ftalocianinas (NUNES, SGUILLA & TEDESCO, 2004). As ftalocianinas apresentam propriedades como alta seletividade para os tecidos tumorais, alta eficiência citotóxica devido à fotogeração de oxigênio singlete (SIBATA *et al.*, 2004) e alto coeficiente de absorção na faixa de 650 a 850 nm em energias em torno de 100 J/cm^2 , com ótima penetração da luz no tecido (ALLISON *et al.*, 2004; NUNES, SGUILLA & TEDESCO, 2004), resultando em elevada resposta fototerápica.

A estrutura molecular das ftalocianinas é semelhante a das porfirinas: apresenta um macrociclo tetrapirrólico com átomos de nitrogênio ligando as subunidades pirrólicas no lugar das pontes de metileno presentes nas porfirinas. A periferia do macrociclo é estendida por anéis benzênicos que aumentam a absorção em comprimentos de onda na região do vermelho do espectro visível, de modo que a sua absorção máxima ocorre em comprimentos de onda maiores do que o das porfirinas (SHARMAN, ALLEN & VAN LIER, 1999).

O estudo das ftalocianinas como agentes fotossensibilizantes para a TFD tem sido favorecido devido às suas propriedades fotofísicas, químicas e espectrais, além de propriedades como a solubilidade, que pode ser alterada pela adição de substituintes no macrociclo (SHARMAN, ALLEN & VAN LIER, 1999; YSLAS, DURANTINI & RIVAROLA, 2007).

As propriedades fotofísicas das ftalocianinas são extremamente dependentes do íon metálico central (NUNES, SGUILLA & TEDESCO, 2004). A complexação das ftalocianinas com metais como o alumínio, o zinco e o silício, que são inseridos no anel central do macrociclo, parece melhorar a atividade desses fotossensibilizantes (SCHUITMAKER *et al.*, 1996). As ftalocianinas complexadas com metal que apresentam as propriedades fotofísicas mais favoráveis para a aplicação na TFD, são os complexos de Zn(II) e Al(III): zinco (II) ftalocianina (ZnPc) e cloroalúminioftalocianina (AlPcCl) (NUNES, SGUILLA & TEDESCO, 2004).

A ZnPc (Figura 7) é fácil de ser obtida, apresenta estabilidade física e química, produz oxigênio singlete com alto rendimento, que confere elevada citotoxicidade à molécula, e apresenta alta absorção na faixa de comprimento de onda correspondente à região do espectro eletromagnético que representa a janela ótima para a transmitância de luz pelos tecidos (SAVOLAINEN *et al.*, 2008), tornando-a um fotossensibilizante promissor com forte atividade fotoquímica e fotodinâmica para aplicação na TFD do câncer.



Figura 7. Estrutura molecular da zinco (II) ftalocianina (ZnPc).

No entanto, assim como a maioria dos fotossensibilizantes de segunda geração, a ZnPc é hidrofóbica, altamente insolúvel em água e em solventes fisiologicamente compatíveis. A lipofilicidade dos fotossensibilizantes torna difícil o desenvolvimento de formulações em solventes compatíveis, especialmente para a administração endovenosa e, por isso, o principal problema da TFD está relacionado com a liberação desses fotossensibilizantes lipofílicos nas células tumorais (ZEISSER-LABOUÈBE *et al.*, 2006). Assim, para ser administrada por meio de uma injeção sistêmica *in vivo*, a ZnPc precisa ser incorporada em um sistema de liberação adequado (SONCIN *et al.*, 1995).

Diversos sistemas para a encapsulação da ZnPc já foram propostos, como as emulsões oleosas, as vesículas de LDL, os lipossomos, os anticorpos monoclonais com ZnPc complexada,

as micelas poliméricas e as micropartículas poliméricas (KONAN, GURNY & ALLÉMAN, 2002). Entretanto, esses sistemas apresentam desvantagens, como baixa estabilidade e eficiência de encapsulação no caso dos lipossomos (SOPPIMATH *et al.*, 2001), possibilidade de reações de hipersensibilidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade quando se utiliza emulsões oleosas como Cremophor EL (óleo de rícino polioxetilado) (FENG & HUANG, 2001) e possibilidade de obstruir pequenos capilares no caso de administração endovenosa de micropartículas (HANS & LOWMAN, 2002).

Um sistema de liberação que tem sido muito pesquisado atualmente são as nanopartículas poliméricas, cujas principais vantagens são a alta eficiência de encapsulação, a possibilidade de se controlar a liberação do fármaco e a variedade de materiais e métodos disponíveis para o seu preparo (KONAN, GURNY & ALLÉMAN, 2002). A ZnPc já foi encapsulada em nanopartículas de ácido poli-(D,L láctico-co-glicólico) (PLGA) (RICCI JÚNIOR & MARCHETTI, 2006a, 2006b), mas ainda não foram desenvolvidas nanopartículas de PCL contendo a ZnPc.

O desenvolvimento de sistemas de liberação de fotossensibilizante adequados é crítico para o aumento da aplicação e da aceitabilidade da TFD, já que os sistemas de liberação parecem ter papel importante na modulação da eficiência e da seletividade pelo tumor dos fotossensibilizantes (ZEISSER-LABOUÈBE *et al.*, 2006). Dessa forma, a eficácia do tratamento da TFD pode ser aperfeiçoado pela combinação de um fotossensibilizante e um sistema de liberação adequados (SONCIN *et al.*, 1995). Uma alternativa simples, inteligente e viável para a incorporação da ZnPc em sistemas de liberação hidrofóbicos é a sua encapsulação em nanopartículas. O uso de diferentes polímeros e condições de preparo pode contribuir para a obtenção de um sistema de liberação ideal e mais apropriado para uma futura aplicação clínica.

2.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NANOESTRUTURADOS

Nos últimos anos, alguns estudos mostraram que uma abordagem eficaz para otimizar a ação farmacológica dos fármacos é associar a molécula ativa com um sistema de liberação nanoestruturado (PIÑON-SEGUNDO *et al.*, 2005). A nanotecnologia tem sido aplicada no desenvolvimento desses novos sistemas de liberação, que muitas vezes são veículos de fármacos para aplicações no tratamento do câncer. Entre esses veículos, estão as nanopartículas poliméricas, os dendrímeros, os lipossomos, as nanopartículas magnéticas, as nanopartículas baseadas em ácidos nucleicos e as nanopartículas virais (ALEXIS *et al.*, 2008).

Esses novos sistemas de liberação têm o potencial de aperfeiçoar o índice terapêutico de diversos fármacos já disponíveis aumentando a sua eficácia, diminuindo a sua toxicidade e atingindo níveis terapêuticos estacionários por um período prolongado. Além disso, os nanocarreadores podem aumentar a solubilidade e a estabilidade do fármaco, permitindo o desenvolvimento de novas entidades químicas potencialmente efetivas que não haviam ultrapassado as fases pré-clínica e clínica por causa de suas propriedades farmacocinética e bioquímica. Finalmente, esses sistemas também podem facilitar o desenvolvimento de sistemas de liberação multifuncionais com aplicações terapêutica e diagnóstica simultâneas (ALEXIS *et al.*, 2008).

Para a TFD, o sistema de liberação do fármaco é o principal desafio. Como a maioria dos fotossensibilizantes é caracterizada pela alta lipofilia, diversas estratégias de encapsulação têm sido estudadas para proteger esse componente hidrofóbico do meio aquoso (CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008). O sistema de liberação ideal deve permitir o acúmulo seletivo de fotossensibilizante no tecido tumoral e a liberação de concentrações terapêuticas do fotossensibilizante ao sítio alvo com baixo ou nenhum acúmulo nas células normais. O carreador também deve incorporar o fotossensibilizante sem que ocorra perda ou alteração da sua atividade, permitindo a sua administração na forma monomérica e reduzindo a

agregação que é possível de ocorrer devido à hidrofobicidade do fotossensibilizante. Além disso, devido aos tratamentos com doses repetidas, o sistema também deve ser biodegradável e não apresentar imunogenicidade (KONAN, GURNY & ALLÉMAN, 2002; CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008).

2.3.1 Nanopartículas

Nanopartículas poliméricas podem ser definidas como sistemas coloidais ou como carreadores sólidos de fármacos, que apresentam diâmetro inferior a 1 μm e são preparados a partir de polímeros naturais ou sintéticos (BRIGGER, DUBERNET & COUVREUR, 2002; REIS *et al.*, 2006).

Recentemente, as nanopartículas poliméricas biodegradáveis se tornaram uma importante área de pesquisa por serem um potencial sistema de liberação de fármacos, devido à sua aplicação na liberação controlada de fármacos, sejam hidrofílicos ou hidrofóbicos, à sua habilidade de atingir órgãos ou tecidos específicos e, além disso, por atuarem como carreadores de DNA, vacinas, proteínas e peptídeos (SOPPIMATH *et al.*, 2001; HANS & LOWMAN, 2002).

De acordo com o processo utilizado na preparação das nanopartículas, obtém-se nanoesferas ou nanocápsulas (Figura 8). As nanoesferas são sistemas cuja estrutura é a matriz polimérica onde o fármaco está disperso homogeneamente, podendo estar adsorvido na superfície ou encapsulado na nanopartícula. Já as nanocápsulas são sistemas reservatórios em que o fármaco pode estar adsorvido na superfície da partícula ou confinado numa cavidade aquosa ou oleosa, que é envolvida por uma parede polimérica externa que forma a cápsula (SOPPIMATH *et al.*, 2001; BRIGGER, DUBERNET & COUVREUR, 2002; NAGARWAL *et al.*, 2009).

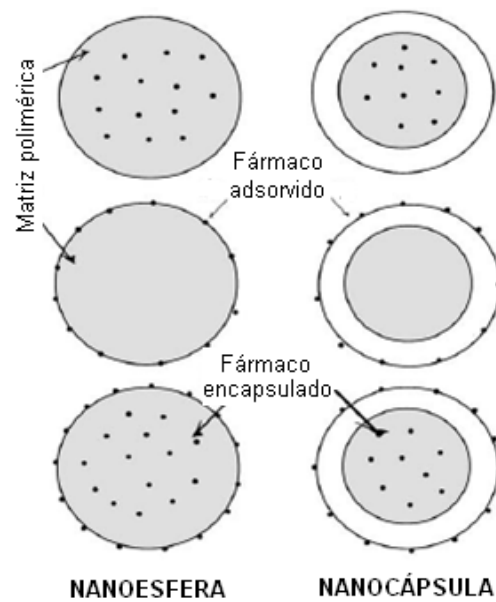


Figura 8. Diferentes tipos de nanopartículas (Adaptado de NAGARWAL *et al.*, 2009).

A nanoencapsulação tornou-se uma estratégia adequada para aumentar a biocompatibilidade e a dispersão de compostos lipofílicos insolúveis em água, já que fornece sistemas com o interior lipofílico, para permitir a solubilização dos compostos, e com uma camada superficial hidrofílica, que garante a sua dispersão em meio aquoso (DEDA *et al.*, 2009).

Além disso, as nanopartículas variam em tamanho numa escala compreendida entre 10 e 1000 nm (SOPPIMATH *et al.*, 2001) e, por isso, apresentam uma importante vantagem sobre as micropartículas, que são maiores que 1000 nm e, por isso, não podem ser administradas por via endovenosa. Os menores vasos capilares apresentam diâmetro de 5 a 6 μm e o tamanho das partículas a serem distribuídas na circulação sanguínea deve ser significativamente menor para garantir que as mesmas não causem embolia (HANS & LOWMAN, 2002). Portanto, as nanopartículas, graças ao seu tamanho nanométrico, podem ser administradas por qualquer via e, principalmente, podem ser injetadas na corrente sanguínea sem risco de obstruir os pequenos capilares.

Após administração endovenosa, as nanopartículas são rapidamente retiradas da circulação sistêmica por células do sistema fagocitário mononuclear e acumulam-se,

principalmente, no baço e no fígado (SOPPIMATH *et al.*, 2001; HANS & LOWMAN, 2002; CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008). Para aumentar o tempo das nanopartículas na circulação sanguínea e, conseqüentemente, o seu acúmulo no local de ação do fármaco, por exemplo, em um tumor, as nanopartículas podem sofrer modificações na superfície, como a adição de polietilenoglicol (PEG) (HANS & LOWMAN, 2002).

No entanto, recentes estudos mostraram que fármacos conjugados com polímeros e nanopartículas apresentam circulação prolongada nos vasos sanguíneos tumorais e se acumulam passivamente nos tumores, sugerindo a existência de um mecanismo passivo de retenção e a potencialidade desses sistemas nanoestruturados em tratamentos para o câncer (PARK *et al.*, 2008).

A vasculatura normal é caracterizada por vasos intactos e contínuos. Por outro lado, os vasos sanguíneos tumorais são geralmente caracterizados por anormalidades como alta proporção de células endoteliais proliferativas e formação anormal da membrana, devido à rápida vascularização necessária para prover oxigênio e nutrientes para o tumor que cresce rapidamente. A estrutura dos vasos sanguíneos de um tumor, composta por fenestras e lacunas, associada à ausência de um sistema linfático intacto, torna os vasos sanguíneos neste local permeáveis a macromoléculas e nanopartículas. Dessa forma, as nanopartículas tendem a se acumular nos tecidos tumorais passivamente. Este fenômeno de atingir o alvo (tumor) passivamente foi chamado de efeito aumentado de permeação e retenção e está apresentado na Figura 9 (ALEXIS *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2008).

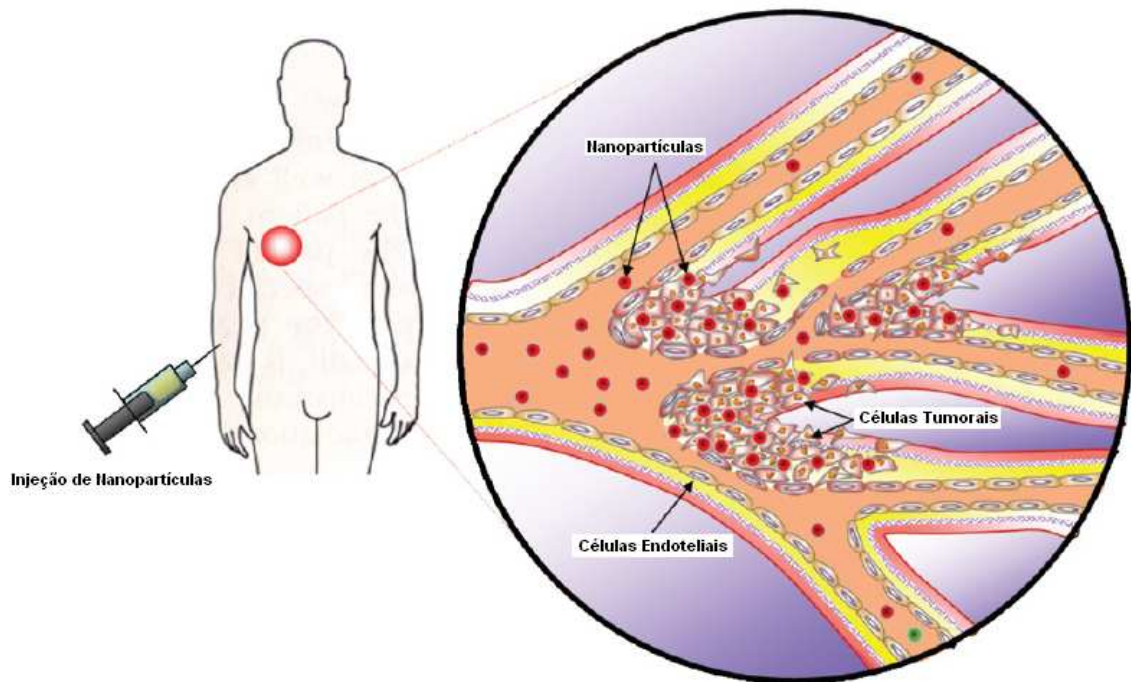


Figura 9. Efeito aumentado de permeação e retenção: nanopartículas poliméricas acumulam-se preferencialmente em tumores sólidos (Adaptado de PARK *et al.*, 2008).

O acúmulo passivo das nanopartículas nos tecidos tumorais é uma vantagem do uso desses sistemas, já que há o aumento da concentração de fármaco no alvo e a consequente diminuição da toxicidade às células normais, responsável pelos efeitos adversos comuns aos tratamentos com quimioterápicos (ZHANG *et al.*, 2004; ALEXIS *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2008).

Na TFD, a encapsulação de fotossensibilizantes, como a ZnPc, em nanopartículas resulta em um sistema com hidrofiliabilidade e tamanho adequados para atingir o tumor pelo mecanismo de permeação e retenção (CHATTERJEE, FONG & ZHANG, 2008). Além disso, ao atuarem como veículos de fármacos capazes de atingir as células ou tecidos neoplásicos, as nanopartículas podem garantir a estabilidade do fármaco, que fica protegido de uma possível inativação prematura durante o seu transporte até o local desejado (BRIGGER, DUBERNET & COUVREUR, 2002).

2.3.1.1 Preparo e Caracterização de Nanopartículas

Existem diversos métodos de preparo de nanopartículas descritos na literatura e, dependendo das características físico-químicas do fármaco e do polímero, é possível escolher o melhor método de preparação e o melhor polímero para obter uma encapsulação eficiente do fármaco (REIS *et al.*, 2006). Os métodos mais comuns são o método de emulsão e evaporação do solvente, polimerização do monômero, nanoprecipitação e salting-out (GOVENDER *et al.*, 1999).

Os métodos mais apropriados para a encapsulação de fármacos hidrofóbicos, como a ZnPc, são o método de difusão do solvente (MDS) e o método de emulsão e evaporação do solvente (MEES) (REIS *et al.*, 2006).

O MDS, desenvolvido por Fessi *et al.* (1989) (*apud* GOVENDER *et al.*, 1999), representa uma técnica simples e reprodutível, que vem sendo utilizada por diversos grupos de pesquisa (GOVENDER *et al.*, 1999). O MDS é um bom método para o preparo de nanopartículas em escala industrial. Nesse método, também chamado de nanoprecipitação, o polímero é dissolvido em um solvente miscível em água e essa fase é adicionada a uma solução aquosa contendo um tensoativo sob agitação magnética (REIS *et al.*, 2006). A deposição do polímero na interface entre a água e o solvente orgânico, causada pela rápida difusão do solvente, resulta na formação instantânea da suspensão coloidal (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998 *apud* REIS *et al.*, 2006).

Assim como o MDS, o preparo de nanopartículas pelo MEES é simples. O processo envolve duas etapas: inicialmente, o polímero é dissolvido em um solvente orgânico imiscível em água, como o diclorometano; o fármaco é dissolvido nesta solução e ocorre a emulsificação desta mistura em uma fase aquosa contendo um tensoativo, como o álcool polivinílico (PVA), para se obter uma emulsão óleo em água; durante a segunda etapa, o solvente é evaporado, induzindo a

precipitação do polímero como nanoesferas, onde o fármaco está disperso (SOPPIMATH *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2006).

Após o preparo, o estudo de caracterização das nanopartículas é uma importante etapa do desenvolvimento desses nanocarreadores, uma vez que as características de composição polimérica das nanopartículas, como hidrofobicidade, carga superficial e perfil de biodegradação, das substâncias adjuvantes, e do fármaco associado, como peso molecular, carga e localização nas nanoesferas por adsorção ou incorporação, têm grande influência nos processos de absorção do fármaco, biodistribuição e eliminação (REIS *et al.*, 2006). As principais características que devem ser avaliadas são o tamanho e a carga superficial (potencial zeta) das nanopartículas, a eficiência de encapsulação e o perfil de liberação do fármaco encapsulado (HANS & LOWMAN, 2002).

2.3.2 Poli-e-caprolactona

Atualmente, o uso de polímeros biodegradáveis para a liberação controlada de agentes terapêuticos já é bem estabelecido (BIRNBAUM *et al.*, 2000). As nanopartículas podem ser preparadas a partir de polímeros biodegradáveis naturais ou sintéticos.

As propriedades importantes que um polímero biodegradável deve apresentar são: não causar reação inflamatória ou resposta tóxica quando aplicada no organismo, apresentar tempo de vida relativamente longo, possuir tempo de degradação em acordo com o processo em que está sendo utilizado, ter permeabilidade adequada para o uso e gerar produtos de degradação que não sejam tóxicos e que sejam biotransformados e eliminados do organismo (NAIR & LAURENCIN, 2007).

Os polímeros sintéticos têm sido mais utilizados nessa área, uma vez que os polímeros naturais apresentam variação na pureza e normalmente requerem reações de ligação cruzada que podem desnaturar os fármacos encapsulados (HANS & LOWMAN, 2002). Os polímeros sintéticos mais utilizados são os poliésteres alifáticos, como o ácido poliglicólico (PGA), o ácido

polilático (PLA) e o ácido poli-(D,L láctico-co-glicólico) (PLGA). O sucesso desses polímeros em aplicações farmacêuticas levou ao estudo da poli-ε-caprolactona (PCL) (SINHA *et al.*, 2004), que é um poliéster alifático semicristalino de grande interesse (NAIR & LAURENCIN, 2007).

A PCL (Figura10) é um polímero sintético, biodegradável e biocompatível, ou seja, é degradado em monômeros individuais que são biotransformados e removidos do organismo por vias metabólicas normais *in vivo*, e é toxicologicamente seguro (CHAWLA & AMIJI, 2002; ALEXIS *et al.*, 2008). A degradação da PCL é lenta (NAIR & LAURENCIN, 2007). O polímero sofre degradação hidrolítica devido à presença de ligações hidroliticamente lábeis como as do éster alifático.

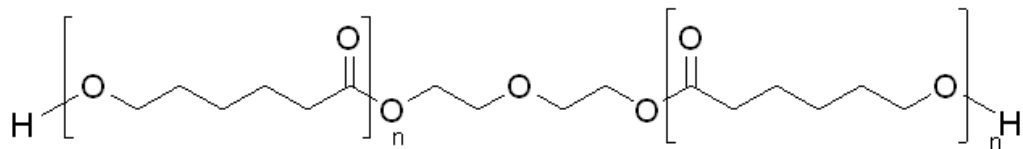


Figura 10. Estrutura do polímero poli-ε-caprolactona (PCL).

A PCL difere dos demais polímeros sintéticos por apresentar uma degradação mais lenta (SINHA *et al.*, 2004) e por ser mais hidrofóbica do que o PLGA (ESPUELAS *et al.*, 1997), por exemplo. Além disso, tem a vantagem de apresentar um custo mais baixo do que os demais poliésteres alifáticos.

Devido à sua degradação lenta e ausência de toxicidade, a PCL tem sido investigada para uso em sistemas de liberação de fármacos e vacinas (NAIR & LAURENCIN, 2007). A PCL também tem sido utilizada na preparação de nanopartículas de diversos fármacos lipofílicos, como isradipina (VERGER *et al.*, 1998), primidona (FERRANTI *et al.*, 1999), griseofulvina (ZILI, SFAR & FESSI, 2005), espirolactona (BLOUZA *et al.*, 2006), entre outros.

Assim, a encapsulação de ZnPc em nanopartículas de PCL é uma solução interessante para a administração endovenosa da ZnPc, com possibilidade de acúmulo do sistema no tecido tumoral por direcionamento passivo e posterior liberação do fármaco para uso na TFD do câncer.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do projeto é o desenvolvimento, a caracterização e o estudo de fototoxicidade em cultura de células neoplásicas de nanopartículas de poli-ε-caprolactona contendo zinco(II)ftalocianina para uso na terapia fotodinâmica do câncer.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Preparação das nanopartículas de PCL contendo ZnPc pelo MDS e MEES e cálculo do rendimento do processo.

3.2.2 Caracterização das nanopartículas: determinação do tamanho por espalhamento de luz e do potencial zeta por mobilidade eletroforética e estudo da morfologia por microscopia eletrônica de transmissão.

3.2.3 Padronização da metodologia analítica para a quantificação de ZnPc por emissão de fluorescência.

3.2.4 Determinação da eficiência de encapsulação da ZnPc nas nanopartículas.

3.2.5 Caracterização espectroscópica da ZnPc encapsulada e livre.

3.2.6 Avaliação da interação fármaco-polímero.

3.2.7 Estudo do perfil de liberação *in vitro*.

3.2.8 Estudos de toxicidade e fototoxicidade das nanopartículas contendo o fotossensibilizante em cultura de células neoplásicas (câncer de pulmão).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Solventes, Reagentes, Matérias-Primas e Meio de Cultura

Antibióticos (Estreptomicina/Penicilina) – GIBCO

Acetona - VETEC

Água Destilada

Água Purificada (MilliQ) – MILLIPORE

Álcool Polivinílico 87-89% hidrolisado (PVA) – SIGMA-ALDRICH

Azul de Tripán – VETEC

Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3) – GIBCO

Cloreto de Sódio (NaCl) – VETEC

Diclorometano (DCM) – VETEC

Dimetilsulfóxido (DMSO) – SIGMA-ALDRICH

Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) – VETEC

EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) – SIGMA-ALDRICH

Fosfato de Sódio Dibásico – FARMOS

Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4) – HENRIFARMA

Giemsa – MERCK

Glutamina – GIBCO

HEPES (ácido N-2 [4-Hidroxietil piperazina] N-2 etano sulfônico) – SIGMA-ALDRICH

Hidróxido de Sódio (NaOH) – GIBCO

Lutrol[®] micro 68 (Poloxamer 188) – BASF

Meio Dulbeco's Modificado (DMEM) – GIBCO

Metil-2-pirrolidona – VETEC

MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) – SIGMA

Permout – Fisher Scientific Company

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

Soro Fetal Bovino (SFB) – GIBCO

Tampão Fosfato Salino (TFS)

Xilol - MERCK

Zinco(II)ftalocianina (ZnPc) – SIGMA-ALDRICH

4.1.2 Equipamentos

Agitador magnético – Mag-Multi, Marte

Agitador mecânico – Ultra-Turrax[®] (T18), IKA

Analizador de Potencial Zeta – Zeta Plus, Brookhaven Instruments

Analizador de Tamanho de Partículas – 90Plus/BI-MAS, Brookhaven Instruments

Balança Eletrônica – FA2104N, Bioprecisa

Balança Eletrônica – BG2000, Gehaka

Banho de Ultrassom – T14, Thorton

Calorímetro de Varredura Diferencial – DSC 50, Shimadzu

Capela de Fluxo Laminar – ULFS 12, VECO

Centrífuga Refrigerada – CT-6000R, Cientec

Difratômetro de Raios X – PHILIPS

Espectrofluorímetro – F-6300, JASCO

Espectrofotômetro – V-630, JASCO

Estufa de Cultura – 002CB, FANEM

Laser – Photon Laser I, DMC

Leitora Automática de Microplacas de 96 poços (ELISA) – ThermoPlate

Liofilizador – Labconco

Microscópio Eletrônico de Transmissão – Morgagni (268), FEI

Microscópio Óptico – DMLS, Leica

Pipetas automáticas – Pipetman, P200, P1000, P5000, Gilson

pHmetro – modelo 2000, VWR Scientific

Placa de Aquecimento/Agitação - Corning

Processador Ultrassônico – UP100H, Hielscher

Rotaevaporador – Rotavapor[®] (R114), BÜCHI

Ultracentrífuga – Avanti[®] (J 25), Beckman Coulter[®]

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo das Nanopartículas

As nanopartículas de PCL contendo ZnPc foram preparadas por dois métodos distintos já amplamente descritos na literatura.

4.2.1.1 Método de Difusão do Solvente (MDS)

As nanopartículas obtidas pelo método de difusão do solvente (MDS) foram preparadas adaptando-se as etapas dos processos realizados por Verger *et al.* (1998), Chawla & Amiji (2002), Zili, Sfar & Fessi (2005) e Blouza *et al.* (2006).

Uma quantidade conhecida do polímero (PCL) foi dissolvida em acetona, sob aquecimento em banho-maria à 45°C, por 30 minutos. O fotossensibilizante (ZnPc) foi dissolvido em metil-2-pirrolidona, obtendo-se uma solução a 1 mg/ml. Essa solução de ZnPc foi adicionada à dispersão do polímero em uma concentração correspondente à 300 µg de ZnPc, obtendo-se a fase orgânica. A fase orgânica foi vertida com o auxílio de um funil de vidro em uma fase aquosa contendo Lutrol® (tensoativo) sob agitação magnética moderada e constante com o auxílio de uma placa de agitação, à temperatura ambiente. As nanopartículas foram formadas instantaneamente.

A acetona foi removida por evaporação à 40°C sob baixa pressão em rotaevaporador, por aproximadamente 2 h. A separação e purificação das nanopartículas foram realizadas por centrifugação. O processo de centrifugação foi feito de forma gradativa, ou seja, a suspensão foi submetida a diversas etapas de centrifugação, recolhendo-se os precipitados de nanopartículas e centrifugando o sobrenadante resultante, conforme condições apresentadas na Tabela 3. Os pellets de nanopartículas de todo o processo de centrifugação foram ressuspensos em água

destilada e submetidos a duas etapas de centrifugação a 5.000 x g por 10 minutos para a purificação. O processo de purificação foi efetuado com o objetivo de remover os possíveis resíduos de tensoativo, de solvente orgânico e de fotossensibilizante não encapsulado.

Tabela 3. Etapas do processo de centrifugação da suspensão de nanopartículas obtida por MDS.

Etapas	Velocidade (g)	Tempo (minutos)
1 ^a	2.500	5
2 ^a	5.000	10
3 ^a	5.000	10
4 ^a	10.000	10
5 ^a	10.000	10
6 ^a (Purificação)	5.000	10
7 ^a (Purificação)	5.000	10

Após os processos de separação e purificação, a suspensão de nanopartículas foi congelada e posteriormente seca por liofilização e armazenada ao abrigo de luz e à temperatura ambiente. O processo está esquematizado na Figura 11.

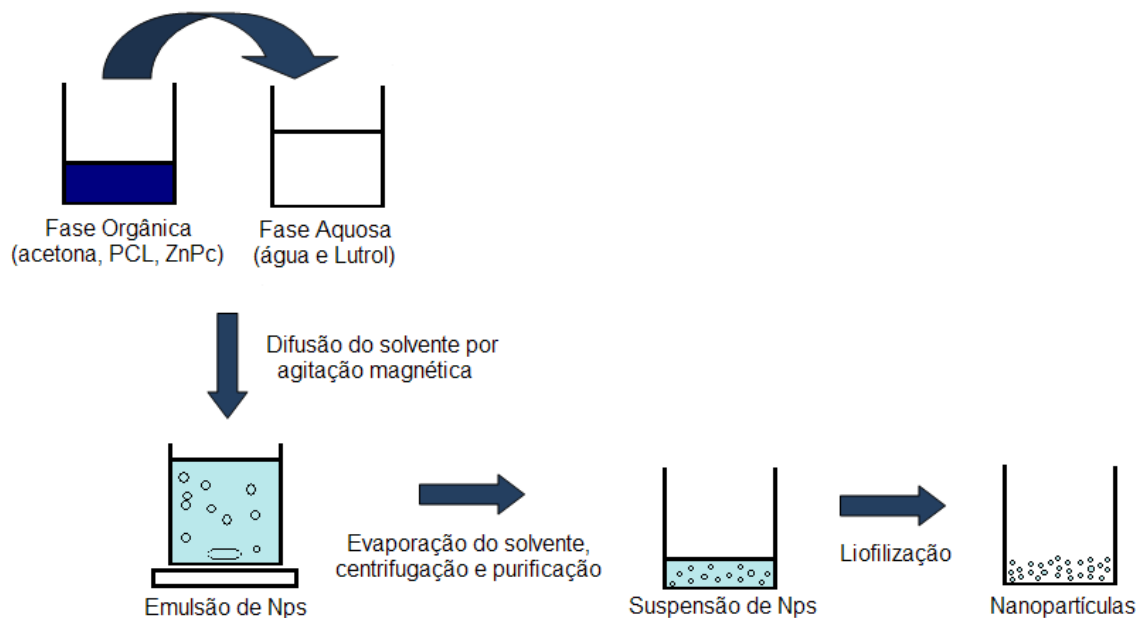


Figura 11. Esquema do processo de obtenção das nanopartículas pelo MDS.

Foram preparadas diversas amostras de nanopartículas com diferentes quantidades de polímero (50, 100, 150 ou 200 mg), acetona (10, 15 ou 25 ml), fase aquosa (50, 100 ou 200 ml) e tensoativo (0,5; 1; 1,5 ou 3% p/v) com o objetivo de escolher condições adequadas para o preparo de nanopartículas com tamanho ideal para administração endovenosa.

O preparo das amostras de nanopartículas sem o fotossensibilizante foi feito seguindo o mesmo procedimento, excluindo-se apenas a etapa em que o fotossensibilizante foi adicionado à fase orgânica.

4.2.1.2 Método de Emulsão e Evaporação do Solvente (MEES)

As nanopartículas foram preparadas pelo método de emulsão e evaporação do solvente (MEES) de acordo com os métodos propostos por Venier-Julienne & Benoit (1996), Soppimath *et al.* (2001), Feng & Huang (2001) e Ricci Júnior & Marchetti (2006a, 2006b).

Uma quantidade conhecida de PCL (100 mg) foi dissolvida em diclorometano (DCM) (7 ou 8 ml). O fotossensibilizante, dissolvido em uma solução de metil-2-pirrolidona a 1 mg/ml, foi adicionado na concentração de 300 µg de ZnPc à essa fase orgânica, que foi gotejada em 50 ml de uma solução aquosa de álcool polivinílico (PVA) (1,5 ou 3% p/v) sob forte agitação por meio de um processador ultrassônico. A fase aquosa foi mantida em banho de gelo e a emulsão foi agitada por 5 minutos.

O diclorometano foi evaporado sob baixa pressão, à temperatura ambiente, em um rotaevaporador, por aproximadamente 2 h. A separação e a purificação das nanopartículas foram realizadas por centrifugação. O processo de centrifugação foi feito em três etapas: a suspensão foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e centrifugado a 15.000 x g por 30 minutos, seguido de uma nova etapa de centrifugação do sobrenadante resultante nas mesmas condições. Os pellets de nanopartículas foram ressuspensos em água destilada e submetidos à centrifugação a 15.000 x g por 30 minutos para a purificação das nanopartículas.

Este processo de purificação foi realizado para a remoção dos possíveis resíduos de diclorometano, de álcool polivinílico e de fotossensibilizante não encapsulado.

As nanopartículas foram congeladas e posteriormente secas por liofilização e armazenadas ao abrigo de luz e à temperatura ambiente. O processo está esquematizado na Figura 12.

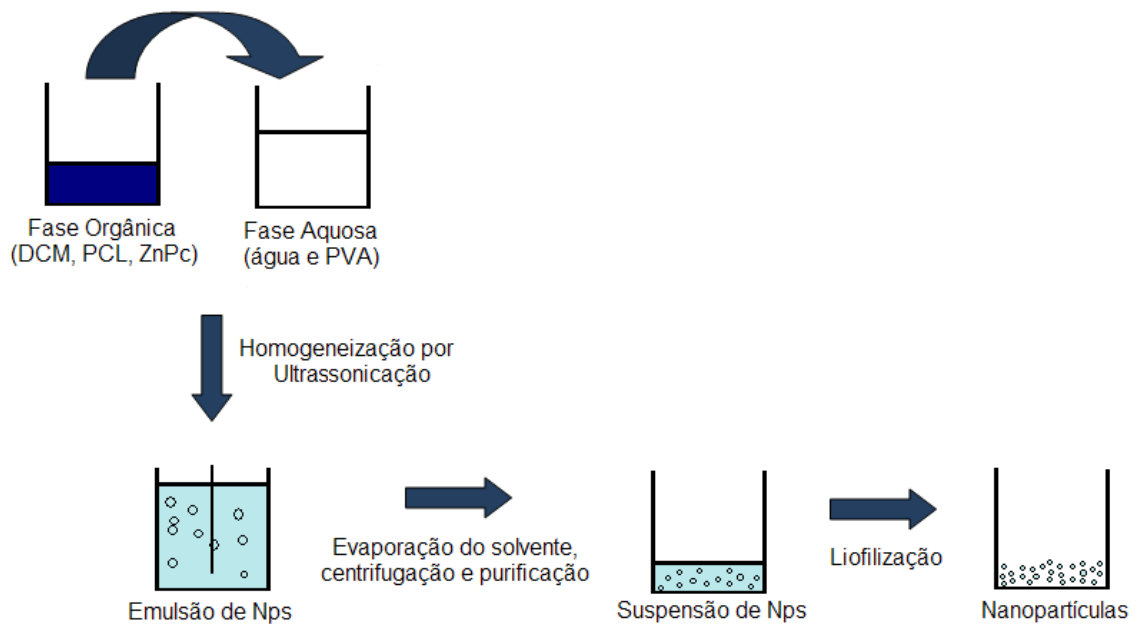


Figura 12. Esquema do processo de obtenção das nanopartículas pelo MEES.

O mesmo procedimento foi utilizado no preparo das nanopartículas sem o fotossensibilizante, excluindo-se apenas a etapa em que o fotossensibilizante foi adicionado à fase orgânica.

4.2.2 Cálculo do Rendimento do Processo

As nanopartículas secas foram pesadas para cálculo do rendimento do processo utilizando-se a equação:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa de partículas recuperada após a liofilização}}{\text{massa de PCL somada à massa de ZnPc da formulação}} \times 100.$$

4.2.3 Metodologia de Quantificação de ZnPc por Emissão de Fluorescência

A emissão de fluorescência é um método analítico utilizado com sucesso na quantificação de fármacos que possuem a propriedade de absorção e emissão de fluorescência. A técnica consiste na análise do espectro de absorção no UV-visível (UV-vis) de uma solução do fármaco para a fixação do comprimento de onda de excitação (λ_{EX}) seguida da análise do espectro de emissão de fluorescência para a fixação do comprimento de onda de emissão (λ_{EM}) (RICCI JÚNIOR & MARCHETTI, 2006a, 2006b).

A metodologia analítica para a quantificação de ZnPc por emissão de fluorescência é importante para a determinação da eficiência de encapsulação e para os estudos de liberação da ZnPc. O método desenvolvido por Ricci Júnior & Marchetti (2006a, 2006b) baseado na quantificação de ZnPc em meio aquoso de tampão fosfato salino, pH 7,4, contendo 2% de dodecil sulfato de sódio (TFS-SDS) foi utilizado para as análises durante o estudo do perfil de liberação da ZnPc das nanopartículas. No entanto, para a quantificação da ZnPc encapsulada nas nanopartículas e conseqüente determinação da eficiência de encapsulação da ZnPc, o método foi empregado utilizando-se a acetona como solvente, uma vez que a mesma havia sido usada para o rompimento das nanopartículas de PCL e para a extração do fotossensibilizante.

4.2.3.1 Preparo das soluções padrão

Uma quantidade conhecida de ZnPc (2 mg) foi dissolvida em metil-2-pirrolidona (20 ml) obtendo-se uma solução estoque na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$.

- *Quantificação da ZnPc encapsulada:* as soluções padrão de trabalho da curva analítica são diluições da solução estoque em acetona nas concentrações de 0,05, 0,07, 0,10, 0,30 e 0,50 $\mu\text{g/ml}$.

- *Quantificação da ZnPc liberada:* as soluções padrão de trabalho da curva analítica são diluições da solução estoque em TFS-SDS nas concentrações de 0,01, 0,03, 0,07, 0,10, 0,30 e 0,50 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.3.2 Determinação dos espectros de absorção no UV-vis e de emissão de fluorescência

Na determinação do comprimento de onda de excitação da ZnPc, efetuou-se uma varredura em espectrofotômetro (V-630, JASCO) na faixa de 400 a 800 nm (solução de 1 µg/ml de ZnPc em acetona e em TFS-SDS). O espectro de absorção obtido auxiliou na fixação do comprimento de onda de excitação do fotossensibilizante (λ_{EX}).

O comprimento de onda de emissão (λ_{EM}) foi determinado em espectrofluorímetro (F-6300, JASCO) fixando-se o comprimento de onda de excitação e efetuando-se uma varredura da ZnPc de 350 a 750 nm (solução de 1 µg/ml ZnPc em acetona em TFS-SDS). O espectro auxiliou na determinação da faixa de emissão de fluorescência.

Esses experimentos foram efetuados utilizando-se cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os experimentos foram realizados na temperatura de 25°C.

4.2.3.3 Obtenção das curvas analíticas da ZnPc

As soluções foram excitadas utilizando-se um comprimento de onda de excitação (λ_{EX}) de 602 nm (acetona) e 608 nm (TFS-SDS), e os espectros de emissão de fluorescência foram registrados de 630 a 730 nm por um espectrofluorímetro, utilizando-se uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os experimentos foram realizados na temperatura de 25°C.

A curva analítica foi obtida relacionando-se os valores da concentração da ZnPc (µg/ml), no eixo das abscissas (x), com os valores de emissão de fluorescência obtidos para cada concentração, no eixo das ordenadas (y).

4.2.3.4 Validação dos métodos analíticos

De acordo com a ANVISA, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

Os métodos analíticos para a quantificação da ZnPc encapsulada e liberada por emissão de fluorescência foram validados pela determinação da linearidade, da precisão e da exatidão intra-dia e inter-dias.

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). A linearidade foi obtida pela análise de diferentes concentrações e posterior determinação do coeficiente de correlação linear (r).

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra e pode ser expressa pelo coeficiente de variação ou pelo desvio padrão relativo das medidas (CAUSON, 1997; BRASIL, 2003). Neste trabalho, a precisão foi expressa como o desvio padrão relativo (DPR) das medidas, de acordo com a equação:

$$\text{DPR (\%)} = (\text{desvio padrão} / \text{média}) \times 100.$$

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003); é a medida do erro sistemático (CAUSON, 1997). Portanto, a exatidão corresponde à diferença entre o valor obtido e o valor teórico e pode ser representada pelo resultado da divisão da concentração média experimental pela concentração teórica vezes cem (BRASIL, 2003) ou pelo cálculo do erro sistemático (CAUSON, 1997).

Neste trabalho, a exatidão foi calculada pela expressão:

$$\text{Erro sistemático (\%)} = [(\text{valor obtido} - \text{valor real}) / \text{valor real}] \times 100.$$

A curva analítica e triplicatas de três concentrações foram preparadas em dois dias diferentes e foram determinadas a precisão e a exatidão intra-dia e inter-dias.

4.2.4 Determinação da Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação relaciona a quantidade de fármaco encapsulado com o total de fármaco que havia sido adicionado durante o processo. Para a determinação da eficiência de encapsulação, o fármaco precisa ser extraído das nanopartículas.

Na extração do fármaco, uma quantidade conhecida de nanopartículas contendo ZnPc (5 mg) foi rompida com 5 ml de acetona pré-aquecida à 45°C. A solução foi homogeneizada em um sonificador por 10 minutos e centrifugada a 15.000 x g por 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 ml da solução de ZnPc foi diluída em balão volumétrico de 10 ml com acetona.

A solução foi excitada a 602 nm e o espectro de emissão de fluorescência foi registrado de 630 a 730 nm por espectrofluorimetria utilizando-se uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico. O experimento foi realizado a 25°C.

A quantificação da ZnPc foi efetuada utilizando-se o método anteriormente descrito. A concentração de ZnPc (μg) foi calculada a partir da intensidade de emissão de fluorescência obtida da amostra e da curva analítica.

A eficiência de encapsulação foi calculada pela equação:

$$\text{Eficiência de Encapsulação (\%)} = \frac{\text{massa de ZnPc obtida nas nanopartículas} \times 100}{\text{massa de ZnPc colocada na formulação}}$$

Além da eficiência de encapsulação, alguns autores também determinam o conteúdo de fármaco nas nanopartículas, que é a relação da quantidade de fármaco encapsulado com o rendimento de nanopartículas obtido no processo (JEONG *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009).

Para o cálculo do conteúdo de ZnPc, foram utilizados os valores das médias do rendimento e da eficiência de encapsulação anteriormente determinados. O conteúdo de ZnPc nas nanopartículas foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Conteúdo de ZnPc } (\mu\text{g/mg}) = \frac{\text{massa de ZnPc obtida nas nanopartículas}}{\text{massa de rendimento de nanopartículas.}}$$

4.2.5 Caracterização das Nanopartículas

As nanopartículas foram caracterizadas pela análise de tamanho, determinação do potencial zeta e morfologia. A análise do tamanho é feita para se verificar se as nanopartículas apresentam tamanho nanométrico, e a análise morfológica possibilita a observação da forma das partículas. Esses parâmetros são importantes na caracterização de um sistema cujo objetivo é a administração endovenosa. O potencial zeta, por sua vez, é um fator importante na avaliação da estabilidade das amostras e na interação com as células.

4.2.5.1 Determinação do tamanho

O diâmetro médio e o índice de polidispersividade das nanopartículas vazias e com ZnPc obtidas pelo MDS e pelo MEES (n=5) foram determinados por um equipamento de espalhamento de luz a laser (90Plus/BI-MAS, Brookhaven Instruments).

As amostras, suspensões de nanopartículas, foram diluídas em água purificada na concentração de 1:10 e analisadas em uma cela de quartzo de 1cm de caminho ótico, à

temperatura ambiente (28°C). As amostras foram analisadas em três corridas com duração de 2 minutos cada.

4.2.5.2 Estudo da morfologia

A morfologia das nanopartículas vazias e com ZnPc obtidas pelos dois métodos de preparo foi determinada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para tanto, foi utilizada a suspensão de nanopartículas, obtida após as etapas de centrifugação e purificação do preparo, diluída em água purificada (1:50).

O método utilizado na análise foi o de contrastação, em que 5 µl da amostra foram colocados sobre uma grade revestida de carbono e, após 1 minuto, foram adicionados 5 µl de uma solução de acetato de uranila 3% (p/v) para fixação e contraste da amostra. Depois de mais 1 minuto, o excesso foi retirado com o auxílio de um papel de filtro, a grade foi seca e examinada no microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268, FEI).

4.2.5.3 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das amostras de nanopartículas vazias e com ZnPc obtidas pelo MDS e pelo MEES (n=5) foi medido utilizando-se um equipamento capaz de medir a mobilidade eletroforética das amostras (Zeta Plus, Brookhaven Instruments). O pH das soluções aquosas de nanopartículas havia sido previamente medido utilizando-se um pHmetro.

Para a análise, as suspensões de nanopartículas foram diluídas em água purificada (1:10) e 1,6 ml da amostra foi colocada em uma cubeta, onde foi introduzida uma célula eletroforética. Todas as amostras foram analisadas com cinco leituras, de onde foram calculados a média e o desvio padrão. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (28°C).

4.2.6 Caracterização Espectroscópica da ZnPc Encapsulada

O estudo das propriedades espectroscópicas da ZnPc encapsulada é realizado para verificar se o fotossensibilizante se manteve estável após o processo de encapsulação.

O fotossensibilizante encapsulado e posteriormente extraído das nanopartículas deve apresentar as mesmas propriedades espectroscópicas do fotossensibilizante padrão livre em solução. A comparação das propriedades espectroscópicas da ZnPc extraída e do padrão de ZnPc livre em solução pode mostrar se o fotossensibilizante sofreu alguma alteração na sua estrutura molecular ou se houve degradação do mesmo durante o processo de encapsulação em nanopartículas.

As propriedades fotofísicas estudadas foram a absorção no UV-vis e a emissão de fluorescência.

4.2.6.1 Determinação dos espectros de absorção no UV-vis

Foram analisadas as amostras de solução padrão de ZnPc em acetona (1 µg/ml) e a solução de ZnPc extraída das partículas. Para a extração de ZnPc, 5 mg de nanopartículas preparadas por ambos os métodos foram rompidas com acetona previamente aquecida e centrifugadas a 15.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi diluído em acetona para se obter uma solução com concentração de ZnPc correspondente a aproximadamente 1 µg/ml.

Os espectros de absorção das amostras foram registrados de 350 a 800 nm por um espectrofômetro, utilizando-se uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os experimentos foram realizados à temperatura de 25°C (SIBATA *et al.*, 2004; RICCI JÚNIOR & MARCHETTI, 2006a, 2006b).

4.2.6.2 Determinação dos espectros de emissão de fluorescência

As amostras analisadas foram a solução padrão de ZnPc preparada na concentração de 0,3 µg/ml em acetona e a solução de ZnPc extraída das nanopartículas. Para a extração de ZnPc, 5 mg de nanopartículas preparadas por ambos os métodos foram rompidas com acetona previamente aquecida, centrifugadas a 15.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante diluído em acetona para a obtenção de uma solução com concentração de ZnPc correspondente a aproximadamente 0,3 µg/ml.

Para a obtenção dos espectros de emissão de fluorescência, as amostras foram excitadas utilizando-se um comprimento de onda de excitação de 602 nm e os espectros foram registrados de 630 a 730 nm por um espectrofluorímetro, utilizando-se célula de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os experimentos foram realizados à temperatura de 25°C (SIBATA *et al.*, 2004; RICCI JÚNIOR & MARCHETTI, 2006a, 2006b).

4.2.7 Avaliação da Interação Fármaco-Polímero

As técnicas de Difração de Raios X e de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) são normalmente combinadas com o objetivo de fornecer informações sobre as características estruturais do fármaco e do polímero utilizados no processo de nanoencapsulação, avaliar a possibilidade de interações entre o fármaco e a matriz polimérica (ESPUELAS *et al.*, 1997; VERGER *et al.*, 1998) e se conhecer o comportamento térmico dos componentes e a dispersão do ativo (SIPOS *et al.*, 2008).

4.2.7.1 Difração de Raios X

Na determinação da cristalinidade das amostras, foram analisados os padrões de difração de raios X da ZnPc livre, das nanopartículas de PCL vazias, da mistura física de ZnPc com nanopartículas de PCL vazias e, ainda, das nanopartículas de PCL contendo ZnPc preparadas pelo método de difusão do solvente (MDS) e pelo método de emulsão e evaporação do solvente (MEES).

A difratometria foi realizada utilizando-se um difratômetro de raios X (Philips) com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,542 \text{ \AA}$), tensão de 40 kV, corrente de 30 mA e ângulos de difração (2θ) variando de 5 a 50° . Os experimentos foram realizados na temperatura ambiente (28°C).

4.2.7.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As amostras de ZnPc livre, de nanopartículas de PCL vazias, da mistura física de ZnPc com nanopartículas de PCL vazias e de nanopartículas de PCL contendo ZnPc preparadas pelo MDS e pelo MEES foram analisadas por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

As análises foram feitas em um equipamento de DSC (DSC 50, Shimadzu). A calibração foi feita com padrão de Índio (In). As amostras (5 mg) foram colocadas em painéis de alumínio fechadas sob atmosfera de nitrogênio. O aquecimento das amostras foi realizado na faixa de temperatura de 30 a 200°C utilizando-se uma razão de aquecimento de 10°C por minuto.

4.2.8 Perfil de Liberação *In Vitro*

O estudo do perfil de liberação foi realizado de acordo com as condições experimentais descritas por Feng & Huang (2001), Chawla & Amiji (2002) e Ricci Júnior & Marchetti (2006a, 2006b).

Para a realização das análises de liberação da ZnPc, foi utilizado um banho termostatizado com temperatura controlada a 37°C, onde foram imersos bécheres contendo o meio receptor e o sistema de liberação estudado sob agitação magnética. Foram utilizados 30 ml de tampão fosfato salino, pH 7,4, contendo 2% de dodecil sulfato de sódio (TFS-SDS) como meio receptor e amostras de 5 mg de nanopartículas liofilizadas foram adicionadas à essa solução receptora. O sistema foi mantido sob proteção da luz.

Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, alíquotas de 3 ml foram retiradas e centrifugadas a 15.000 x g por 10 minutos. O precipitado de nanopartículas foi ressuspensão em 3 ml de meio receptor e transferido para o bécher para a continuação do teste de liberação. O sobrenadante foi analisado pelo método de emissão de fluorescência anteriormente padronizado para a quantificação de ZnPc liberada (Figura 13). As concentrações obtidas foram utilizadas para a elaboração do gráfico do perfil de liberação *in vitro* da ZnPc das nanopartículas. O experimento foi realizado em triplicata para cada método de encapsulação (MDS e MEES).

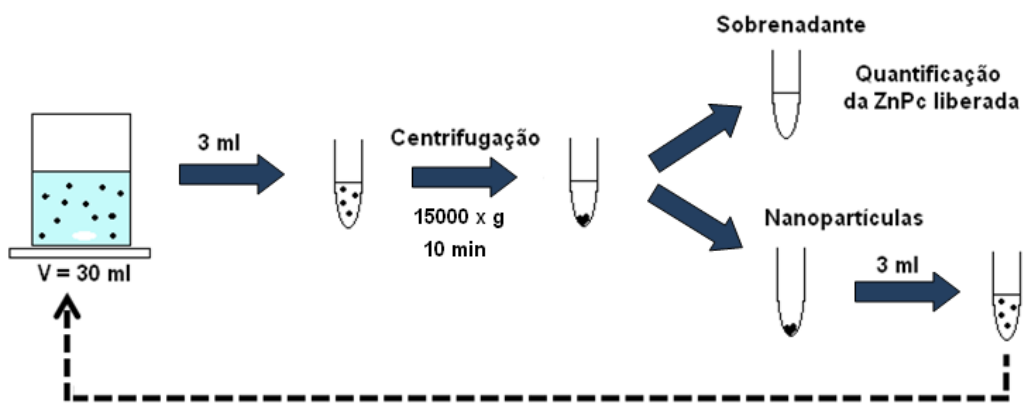


Figura 13. Esquema do perfil de liberação *in vitro*.

4.2.9 Avaliação da Toxicidade e da Fototoxicidade das Nanopartículas em Cultura de Células

4.2.9.1 Preparo do meio de cultura DMEM

O preparo de 900 ml de meio de cultura DMEM foi feito pesando-se 3,0 g de HEPES, 0,2 g de NaHCO₃, 0,3 g de glutamina e dissolvendo-os em qsp 900 ml de água purificada. O pH do meio, quando necessário, foi ajustado para 7,4 com NaOH 1 N. Na capela de fluxo laminar, a solução final foi filtrada em membrana de celulose de 0,22 µm e distribuída em recipientes de vidro fechados. Um frasco contendo o meio recém-preparado foi mantido em estufa a 37°C por, no mínimo, 48 h, para teste de esterilidade.

4.2.9.2 Preparo do azul de tripan

A solução estoque de azul de tripan foi preparada adicionando-se 400 mg do corante azul de tripan em 90 ml de água purificada contendo 810 mg de NaCl e 60 mg de KH₂PO₄. O volume da solução foi completado para qsp 100 ml e a solução foi aquecida até completa solubilização dos constituintes. O pH foi ajustado para 7,2 com auxílio de uma solução de NaOH 1 N. Esta solução estoque foi diluída à concentração de 0,2% com água purificada e mantida em geladeira.

4.2.9.3 Crescimento e manutenção de cultura celular

A linhagem de células escolhida para a realização dos ensaios de toxicidade e fototoxicidade foi a A549 (células de carcinoma de pulmão humano) (LIEBER *et al.*, 1976). O estoque de células é feito congelando-se as culturas em nitrogênio líquido com 95% de soro fetal bovino e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Para a utilização das células, a linhagem foi descongelada até atingir a temperatura de 37°C e acondicionada em frasco de cultura de 25 ml contendo 7 ml de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. A este meio foram acrescentados 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. O frasco de cultura foi mantido em estufa à temperatura de 37°C com 5% de CO₂ durante 48 h antes de se realizar o primeiro repique.

O cultivo e a manutenção das células em crescimento foram feitos com repiques das células três vezes por semana. O repique envolveu as seguintes etapas: a retirada do meio DMEM do frasco, a lavagem do frasco com tampão fosfato salino (TFS) e a adição de 1 ml de solução de TFS contendo HEPES (10 mM) e EDTA (0,2 mM) para que as células, que são do tipo aderente, soltassem da parede do frasco. A suspensão de células foi centrifugada para a remoção da solução utilizada, ressuspensa e homogeneizada em 2 ml de DMEM. Uma alíquota de 25 µl foi retirada para a contagem do número de células e, após isto, nova alíquota foi retirada da suspensão para ser acondicionada novamente na garrafa de cultura em uma concentração de 2×10^4 células/ml.

A contagem do número de células foi feita pelo teste de exclusão do azul de tripan utilizando-se uma câmara de Neubauer. Em um tubo de ensaio, foram colocados 25 µl da suspensão de células e 25 µl da solução de azul de tripan a 0,4%. Uma gota dessa suspensão foi colocada na câmara e as células foram contadas em cada um dos quatro quadrantes da câmara.

O azul de tripan apresenta alto peso molecular e permeia apenas as células com membrana plasmática danificada, de modo que, na observação pelo microscópio óptico, as células íntegras, ditas viáveis, apresentam-se translúcidas, e as células com rupturas na membrana celular e, portanto, inviáveis, apresentam-se coradas.

O número de células foi obtido a partir da equação:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/ml} = \frac{(\text{total de células presente nos 4 quadrantes}) \times 2 \times 10^4}{4},$$

onde:

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

2 – fator de diluição;

10^4 – fator de conversão da câmara de Neubauer.

4.2.9.4 Preparo das células para os testes de toxicidade e fototoxicidade

Após a quantificação, as células foram distribuídas na concentração de 1×10^5 células/ml em placa de 96 poços contendo meio nutricional DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino e de 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Após o armazenamento da placa em estufa por 24 horas para a adesão das células, os ensaios de toxicidade e de fototoxicidade foram realizados.

4.2.9.5 Ensaios de toxicidade e fototoxicidade

A avaliação de toxicidade e de fototoxicidade das nanopartículas em cultura de células foi realizada com base em estudos já descritos na literatura (RICCI JÚNIOR & MARCHETTI, 2006a, 2006b; YSLAS, DURANTINI & RIVAROLA, 2007).

O ensaio de toxicidade, realizado na ausência de luz, teve o objetivo de avaliar o efeito da presença do sistema de liberação proposto na cultura de células. E no ensaio de fototoxicidade,

por sua vez, foi avaliado o efeito da luz na cultura celular na presença do fármaco liberado das nanopartículas.

Em ambos os ensaios, a quantidade de nanopartículas utilizada foi correspondente à concentração de 0,5 µg/ml de ZnPc liberada. As partículas foram incubadas juntamente com aproximadamente 10^5 células/ml (2×10^4 células por poço de 200 µl) em meio DMEM. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C, o meio foi removido, as células foram lavadas com TFS e acrescidas de novo meio DMEM. As células submetidas ao ensaio de toxicidade na ausência de luz foram novamente mantidas na estufa a 37°C, por 24 horas. As células correspondentes ao ensaio de fototoxicidade foram submetidas à irradiação com luz vermelha ($\lambda = 660$ nm) na dose de 100 J/cm² (Photon Laser I, DMC) (Figura 14) e, posteriormente, mantidas em estufa a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a viabilidade celular pelo teste do MTT.

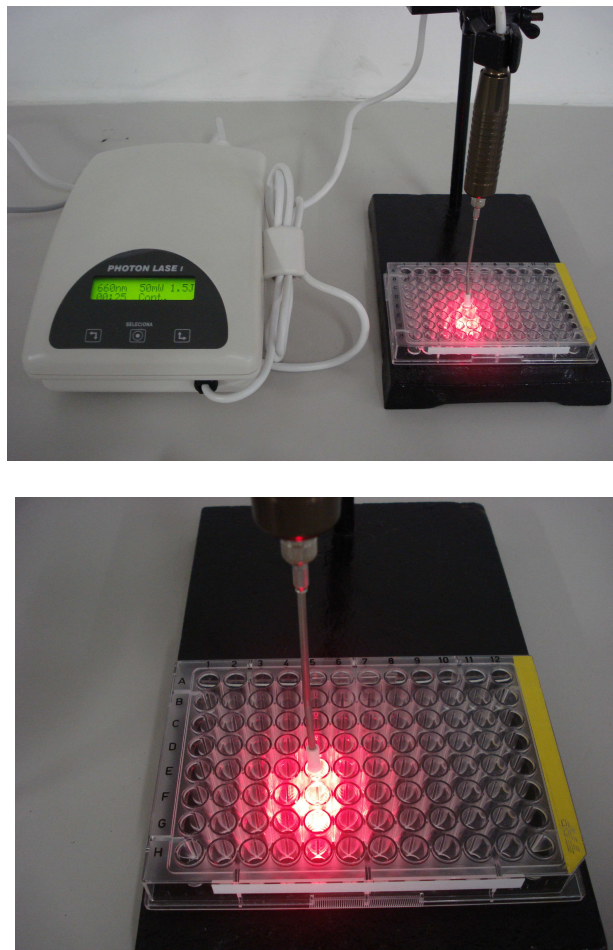


Figura 14. Aparelho de irradiação de luz ($\lambda = 660$ nm) utilizado no ensaio de fototoxicidade das nanopartículas em cultura de células (Photon Laser I, DMC).

A avaliação da toxicidade e da fototoxicidade foram realizadas com as nanopartículas contendo ZnPc preparadas pelos dois métodos propostos, com as nanopartículas sem o fármaco (inertes) também obtidas pelos dois métodos e com um controle, composto apenas de células no meio de cultura. Foram realizados quatro ensaios independentes feitos em sextuplicata para cada situação.

4.2.9.6 Viabilidade celular pelo método MTT

O método MTT é um método rápido e preciso que pode ser utilizado para medir a citotoxicidade, a proliferação e a atividade das células. Trata-se de um ensaio colorimétrico, cujo componente principal é o sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). O MTT é reduzido pela enzima desidrogenase mitocondrial presente nas células viáveis formando cristais de formazan de cor púrpura. A absorção do formazan dissolvido na região do visível correlaciona-se com o número de células viáveis. Assim, 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). Os compostos citotóxicos são capazes de danificar ou destruir as células, o que diminui a redução do MTT à formazan (ULUKAYA *et al.*, 2008).

4.2.9.6.1 Preparo do MTT

A solução de MTT foi preparada diluindo-se 50 mg de MTT em 10 ml de TFS (5 mg/ml). A solução foi armazenada ao abrigo da luz e sob refrigeração.

4.2.9.6.2 Determinação da viabilidade celular

Para a determinação da viabilidade, as células foram incubadas com 200 µl de meio DMEM e 20 µl de solução de MTT (5 mg/ml em TFS) por 3 horas em estufa a 37°C, na ausência de luz. Em seguida, a placa foi centrifugada por 3 minutos, o meio contendo o MTT foi retirado, e os cristais de formazan ressuspensos em 200 µl de DMSO para solubilização.

A absorbância foi medida em uma leitora de placas do tipo ELISA (THERMOPLATE) nos comprimentos de onda de 540 nm e 630 nm e comparada com aquela obtida com as células sem tratamento (controle) por meio de análise estatística (ANOVA).

4.2.10 Avaliação Morfológica da Linhagem Celular A549

A avaliação da morfologia das células A549 foi feita em microscópio de luz após coloração pelo método May-Grunwald-Giemsa (VEIGA *et al.*, 2005). Inicialmente, as células foram incubadas na concentração de 1×10^5 células/ml em placa de 24 poços, na presença de lamínula, tendo como meio nutricional DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%, para a obtenção de uma monocamada confluyente de células. As alterações morfológicas foram avaliadas nas células que foram submetidas à ação fotodinâmica da ZnPc liberada das nanopartículas e, também, numa população que foi incubada com as nanopartículas contendo o fotossensibilizante, na ausência de luz. Ambas as situações foram comparadas ao grupo de células que não foi submetido a qualquer tratamento (grupo controle). Todas as situações experimentais foram incubadas em estufa a 37°C, por 24 horas, e após este tempo, as células referentes ao estudo de fototoxicidade foram irradiadas com luz ($\lambda = 660$ nm) na dose de 100 J/cm². Terminada a irradiação, as células foram novamente incubadas em estufa (37°C por 3 horas) e em seguida foram submetidas ao processo de fixação e coloração. Os estudos morfológicos foram

feitos em microscópio de luz (Microscópio Óptico DMILS, Leica). Para essa análise morfológica preliminar, foi feito um experimento em duplicata.

4.2.10.1 Preparo da solução de Bouin

A solução de Bouin foi preparada misturando-se, inicialmente, 75% de uma solução de ácido pícrico saturado com 25% de formalina. Em seguida, foi realizada a mistura de 1 parte de ácido acético glacial em 20 partes da solução preparada anteriormente. A solução final foi utilizada para a coloração por Giemsa.

4.2.10.2 Fixação e coloração das lamínulas

A fixação foi feita com solução de Bouin por 5 minutos, seguida de lavagens em álcool 70% (v/v) e água destilada para a retirada da solução fixadora. As lamínulas foram coradas com aproximadamente 1 ml de solução de Giemsa (1:10 em água destilada) por 2 horas. Posteriormente, foi feita a etapa de remoção do corante e desidratação das lamínulas. Com o auxílio de uma pinça, as lamínulas foram rapidamente colocadas e retiradas de bécheres contendo solventes na seguinte sequência: 4 gotas de ácido acético glacial em 10 ml de água destilada; acetona 100%; acetona 70% e xilol 30%; acetona 50% e xilol 50%; acetona 30% e xilol 70% e xilol 100%. As lamínulas foram secas e o sistema lâmina-lamínula foi montado com o auxílio de permount.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MÉTODOS DE ENCAPSULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

5.1.1 Método de Difusão do Solvente (MDS)

O primeiro método utilizado para o preparo das nanopartículas de PCL contendo ZnPc foi o método de difusão do solvente (MDS).

Inicialmente, foram feitas diversas variações nas quantidades de polímero, acetona, tensoativo e fase aquosa utilizados (Tabela 4).

Tabela 4. Nanopartículas preparadas pelo MDS: variações nas condições de preparo.

Amostra	PCL (mg)	Acetona (ml)	ZnPc (mg)	Lutrol® (%)	Água (ml)	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersividade
1	100	15	0,3	1,5	50	362,4 ± 2,3	0,124 ± 0,041
2	100	15	0,3	1,5	100	443,1 ± 8,4	0,104 ± 0,075
3	100	15	0,3	1,5	200	472,3 ± 2,6	0,181 ± 0,046
4	50	15	0,3	1,5	50	329,8 ± 2,2	0,075 ± 0,035
5	150	15	0,3	1,5	50	445,3 ± 13,7	0,134 ± 0,002
6	200	15	0,3	1,5	50	493,6 ± 32,5	0,100 ± 0,079
7	100	15	0,3	0,5	50	391,2 ± 7,1	0,040 ± 0,033
8	100	15	0,3	1	50	343,5 ± 6,2	0,144 ± 0,009
9	100	15	0,3	3	50	376,2 ± 1,9	0,098 ± 0,037
10	100	10	0,3	1,5	50	483,0 ± 6,2	0,092 ± 0,051
11	100	25	0,3	1,5	50	335,4 ± 5,9	0,086 ± 0,066

PCL: poli-ε-caprolactona; ZnPc: zinco(II)ftalocianina.

Os valores apresentados são Média ± Desvio Padrão de três análises de uma mesma amostra.

O preparo dessas diferentes amostras teve o objetivo de avaliar previamente a influência dos diversos parâmetros no tamanho das partículas formadas e escolher condições adequadas para o preparo de amostras com nanopartículas que apresentem uma faixa de tamanho adequada para a administração por via endovenosa.

De acordo com a Tabela 4, pode-se observar que a variação do volume de água da fase aquosa para a preparação das nanopartículas influenciou no tamanho das mesmas. O tamanho das nanopartículas diminuiu quando o volume de água utilizado também foi reduzido. Esse resultado está de acordo com o descrito por Blouza *et al.* (2006), que também avaliaram a influência de variações nos parâmetros de preparo e observaram o aumento do tamanho de nanopartículas carregadas com espironolactona de 320 ± 12 para 536 ± 14 nm quando houve o aumento do volume de água de 50 para 100 ml.

O aumento da quantidade de polímero também resultou no aumento do diâmetro médio das nanopartículas, embora o tamanho das nanopartículas da amostra de 50 mg de PCL ($329,8 \pm 2,2$ nm) tenha ficado na mesma faixa de tamanho das nanopartículas da amostra de 100 mg de PCL ($362,4 \pm 2,3$ nm).

No caso do tensoativo, todas as concentrações utilizadas resultaram em partículas com diâmetros médio inferiores a 400 nm. Esse mesmo resultado não foi observado para os outros componentes. O menor tamanho de partícula foi obtido com 1% de Lutrol[®] ($343,5 \pm 6,2$ nm), de modo que o aumento ou a diminuição dessa concentração resultou em aumento do diâmetro médio das nanopartículas obtidas.

Por fim, observou-se a diminuição do tamanho das nanopartículas com o aumento do volume de acetona utilizado; o tamanho variou de $483,0 \pm 6,2$ nm para $335,4 \pm 5,9$ nm empregando-se 10 ml e 25 ml de acetona, respectivamente.

As amostras 1, 4, 8 e 11 (Tabela 4), que apresentaram os menores diâmetros, foram liofilizadas e tiveram o rendimento do processo calculado: 76,8%, 68,3%, 72,7% e 71,9%, respectivamente. Independentemente das variações realizadas no preparo das nanopartículas, o

rendimento obtido foi parecido em todas as amostras, o que nos permitiu escolher os melhores parâmetros para o ajuste do tamanho das partículas sem comprometimento do rendimento do processo.

Diante desses resultados, foram preparadas amostras de nanopartículas com e sem ZnPc encapsulada com as condições definidas para o preparo, utilizando-se 100 mg de PCL, 25 ml de acetona, 1% de tensoativo e 50 ml de água destilada (Tabela 5).

Tabela 5. Amostras de nanopartículas obtidas pelo MDS após definição das condições de preparo.

Amostra	PCL (mg)	Acetona (ml)	ZnPc (mg)	Lutrol® (%)	Água (ml)	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersividade
A	100	25	0,3	1	50	339,6 ± 2,0	0,131 ± 0,064
B	100	25	----	1	50	334,8 ± 2,8	0,069 ± 0,028

PCL: poli-ε-caprolactona; ZnPc: zinco(II)ftalocianina; IP: Índice de Polidispersividade. Os valores apresentados são Média ± Desvio Padrão de três análises de uma mesma amostra.

A amostra A (Tabela 5) apresentou partículas de diâmetro médio próximo aos obtidos nas amostras preparadas anteriormente (amostras 1, 4, 8 e 11, Tabela 4) e rendimento de 76,4%, o que contribuiu para definir as condições de preparo das nanopartículas por esse método.

As nanopartículas vazias, preparadas sem o fotossensibilizante, comprovaram que a presença do fotossensibilizante não alterou o tamanho das nanopartículas de PCL preparadas pelo MDS, garantindo a viabilidade do método para o preparo de nanopartículas contendo ZnPc.

O MDS é considerado um método apropriado para a encapsulação de substâncias lipossolúveis e apresenta alta eficiência de encapsulação (REIS *et al.*, 2006). Durante o preparo das nanopartículas pelo MDS, os fármacos lipofílicos não sofrem difusão para a fase externa aquosa como os fármacos hidrofílicos, aumentando a eficiência de encapsulação e tornando esse método aplicável basicamente para fármacos lipofílicos (BARICHELO *et al.*, 1999). Portanto, a

escolha do método de difusão do solvente para a encapsulação de zinco(II)ftalocianina, que é uma substância lipofílica, foi adequada.

5.1.2 Método de Emulsão e Evaporação do Solvente (MEES)

O método de emulsão e evaporação do solvente (MEES) também foi utilizado para o preparo de nanopartículas de PCL contendo ZnPc.

Nesse método, a etapa de formação da emulsão foi feita com homogeneização em alta velocidade e, portanto, necessitou-se de um agitador mecânico. Inicialmente, as amostras foram preparadas em condições iguais com homogeneização com dois tipos de agitadores mecânicos: o Ultraturrax[®] e o processador ultrassônico. As condições utilizadas e os diâmetros médio obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Nanopartículas preparadas pelo MEES: variações nas condições de preparo.

Amostra	PCL (mg)	DCM (ml)	ZnPc (mg)	PVA (%)	Água (ml)	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersividade
1 (Ultraturrax [®])	100	7	0,3	3	50	642,5 ± 9,3	0,255 ± 0,016
2 (Sonicador)	100	7	0,3	3	50	408,7 ± 13,5	0,080 ± 0,034
3 (Sonicador)	100	8	0,3	1,5	50	228,1 ± 1,4	0,050 ± 0,014
4 (Sonicador)	100	8	----	1,5	50	223,1 ± 1,2	0,085 ± 0,039

PCL: poli-ε-caprolactona; DCM: diclorometano; ZnPc: zinco(II)ftalocianina; PVA: álcool polivinílico. Os valores apresentados são Média ± Desvio Padrão de três análises de uma mesma amostra.

As primeiras partículas obtidas (amostras 1 e 2) apresentaram valores de diâmetro médio elevados, maiores do que os obtidos pelo método anterior (Tabela 6). A utilização do

Ultraturrax[®] parece estar relacionada com a obtenção de nanopartículas de tamanho maior e optou-se por utilizar apenas o ultrassonicador para a preparação das partículas pelo MEES.

De acordo com Hans & Lowman (2002), a quantidade de tensoativo é um parâmetro que pode afetar as propriedades das nanopartículas e o ajuste da sua concentração pode ser uma forma de controlar o tamanho das mesmas. Assim, foi preparada a amostra 3 do MEES com duas modificações: pequeno aumento da quantidade de solvente orgânico e redução da quantidade de tensoativo, o que resultou na diminuição do tamanho das partículas de $408,7 \pm 13,5$ para $228,1 \pm 1,4$ nm (Tabela 6), definindo-se com isso as condições de preparo de nanopartículas com ZnPc pelo MEES.

Também foram preparadas nanopartículas sem a encapsulação do fotossensibilizante, que comprovaram que a presença do fotossensibilizante não alterou o tamanho das nanopartículas de PCL preparadas pelo MEES (Tabela 6), garantindo também a viabilidade desse método para o preparo de nanopartículas contendo ZnPc.

Assim como o MDS, o MEES é um método simples e adequado para a encapsulação de fármacos lipossolúveis, além de apresentar boa eficiência de encapsulação (REIS *et al.*, 2006). No entanto, a dificuldade de realizar o *scaling-up*, ou seja, adaptar o método para a produção em escala industrial, é uma desvantagem desse método. O MEES envolve uma homogeneização em alta velocidade ou sonicação e, portanto, é um bom procedimento para produção de nanopartículas em escala laboratorial, mas para produção em larga escala, métodos alternativos que envolvam emulsificação com baixa energia, como o MDS, são considerados mais adequados (SOPPIMATH *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2006).

Na tabela a seguir, estão resumidas as condições estabelecidas para o preparo dos dois métodos escolhidos.

Tabela 7. Resumo das condições de preparo de nanopartículas pelo MDS e pelo MEES.

	PCL (mg)	Acetona (ml)	ZnPc (mg)	Lutrol [®] (%)	Água (ml)
MDS	100	25	0,3	1	50
	PCL (mg)	DCM (ml)	ZnPc (mg)	PVA (%)	Água (ml)
MEES	100	8	0,3	1,5	50

MDS: Método de Difusão do Solvente; MEES: Método de Emulsão e Evaporação do Solvente; PCL: poli- ϵ -caprolactona; ZnPc: zinco(II)ftalocianina; DCM: diclorometano; PVA: álcool polivinílico

5.1.3 Concentração, Purificação e Liofilização das Amostras

Todas as amostras preparadas, tanto pelo MDS quanto pelo MEES, foram centrifugadas, congeladas e liofilizadas.

A etapa de centrifugação é importante para concentrar e purificar as amostras. No entanto, nessa etapa formam-se agregados indesejáveis de nanopartículas. A aglomeração ocorre porque a centrifugação aproxima as nanopartículas, que tendem a se aderir umas às outras. Nas amostras preparadas pelo MDS, a centrifugação foi realizada gradativamente e com curtos períodos de centrifugação (Tabela 3), com o objetivo de minimizar o efeito de aglomeração, mas ainda se observaram alguns grumos que se mantiveram após a liofilização das amostras.

Yenice *et al.* (2008) prepararam nanopartículas de PCL contendo ciclosporina A e também fizeram a purificação por centrifugação de forma gradativa. E Garay-Jimenez *et al.* (2008) observaram que longos períodos de centrifugação ou aumento significativo da velocidade de centrifugação eram desnecessários e não representavam uma melhor separação das partículas.

As amostras obtidas pelo MEES, por sua vez, não sofreram aglomeração como as amostras preparadas pelo MDS durante o processo de centrifugação.

Após a centrifugação, as amostras foram congeladas e liofilizadas. A liofilização é um dos métodos mais comuns para estabilizar e facilitar o uso de sistemas coloidais, como os

nanoparticulados, os quais sofreriam alterações em um curto espaço de tempo caso fossem armazenados em suspensão (SAEZ *et al.*, 2000).

O armazenamento das nanopartículas em suspensão por períodos longos é, de fato, o principal obstáculo que limita o uso dessas nanopartículas devido à instabilidade física (agregação, fusão de partículas) e/ou instabilidade química (hidrólise do polímero, liberação do fármaco das partículas e reação química do fármaco durante armazenamento), que são frequentemente observadas nesses casos (CHACÓN *et al.*, 1999).

Portanto, para garantir uma melhor estabilidade das nanopartículas, emprega-se a liofilização, que é um processo industrial que consiste na remoção de água de uma amostra congelada por sublimação e desorção sob vácuo (ABDELWAHED *et al.*, 2006). A liofilização é o processo mais comum para se converter soluções ou suspensões em sólidos com estabilidade suficiente para distribuição e armazenamento na área farmacêutica (FRANKS, 1998).

Após a liofilização, as amostras obtidas pelo MDS apresentaram-se na forma de pó fino e com alguns aglomerados provenientes da purificação por centrifugação. As amostras liofilizadas de nanopartículas obtidas pelo MEES apresentaram aspecto de algodão.

5.2 METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE ZnPc POR EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA

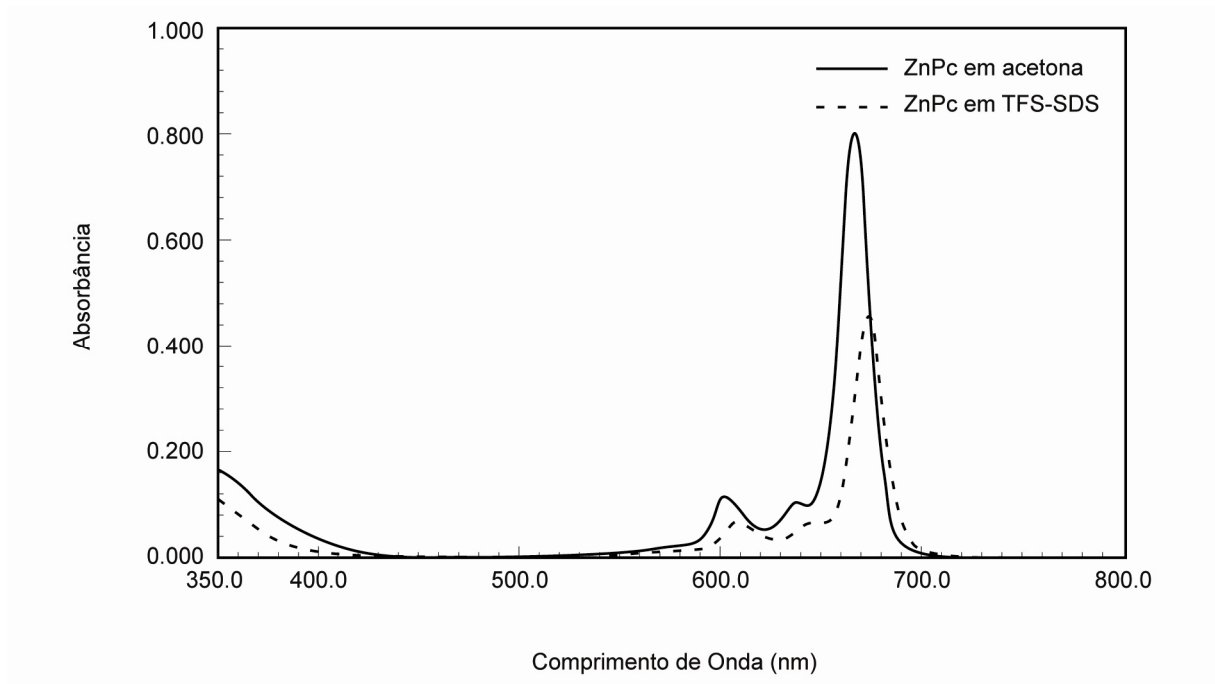
5.2.1 Determinação dos espectros de absorção no UV-vis e de emissão de fluorescência

Os espectros de absorção no UV-Vis da ZnPc em acetona e em TFS-SDS foram registrados na faixa de 400 a 800 nm e estão apresentados na Figura 15. A ZnPc apresentou uma absorbância forte na região do vermelho em ambos os meios. A absorção máxima do cromóforo ocorreu no comprimento de onda de 665 nm em acetona e de 672 nm em TFS-SDS.

Os espectros de emissão de fluorescência da ZnPc em acetona e em TFS-SDS foram registrados na faixa de 630 a 730 nm e também estão apresentados na Figura 15. A emissão de fluorescência máxima foi observada no comprimento de onda de 667 nm em acetona e de 676 nm em TFS-SDS.

O comprimento de onda onde ocorre absorção máxima no UV-vis é usualmente utilizado como comprimento de onda de excitação nas análises de fluorimetria. No entanto, foi observado que os comprimentos de onda onde ocorreu a absorção máxima do cromóforo (665 nm em acetona e 672 nm em TFS-SDS) foram muito próximos dos valores de comprimento de onda onde ocorreu a máxima emissão de fluorescência (667 nm em acetona e 676 nm em TFS-SDS). Portanto, para que não houvesse alterações nas medidas espectroscópicas durante a análise quantitativa da ZnPc, utilizou-se os comprimentos de onda de 602 nm (em acetona) e 608 nm (em TFS-SDS) como comprimentos de onda de excitação para a obtenção dos espectros de emissão de fluorescência.

a)



b)

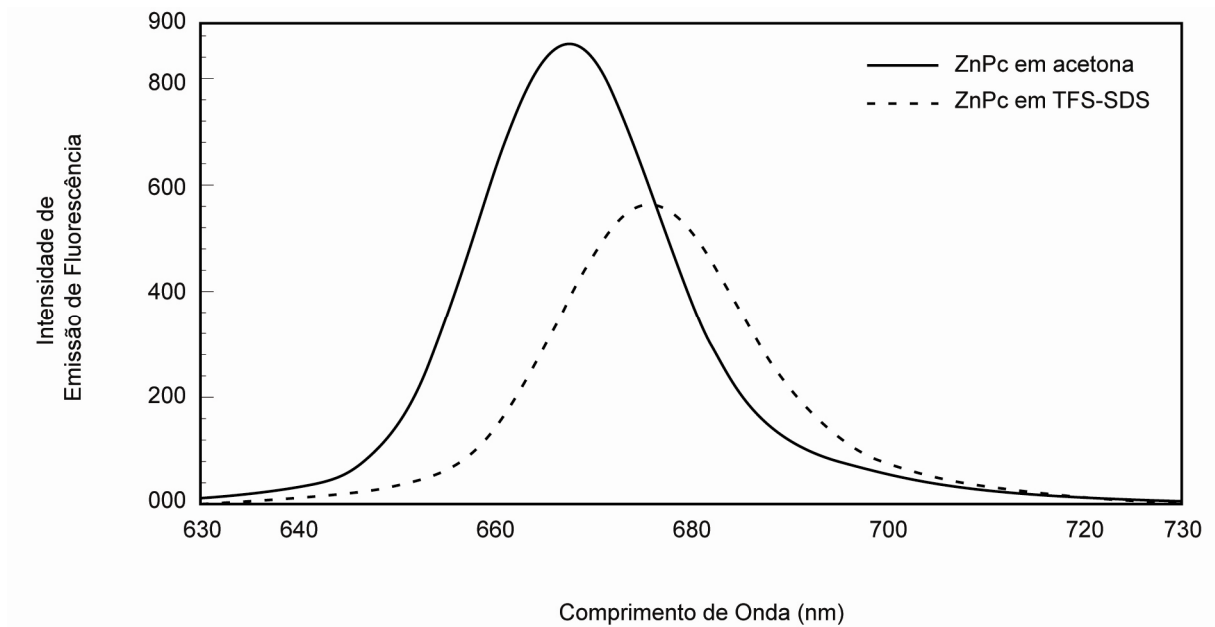


Figura 15. Espectros de absorção no UV-vis (a) e de emissão de fluorescência (b) da ZnPc na concentração de $1\mu\text{g/ml}$ em acetona e em TFS-SDS.

Os espectros de absorção no UV-vis e de emissão de fluorescência da ZnPc em acetona e em TFS-SDS apresentaram o mesmo perfil dos espectros obtidos por Sibata *et al.* (2004) e Ricci Júnior & Marchetti (2006a, 2006b), que determinaram os espectros de absorção no UV-vis e de emissão de fluorescência da ZnPc em etanol.

Ball *et al.* (1998) analisaram os espectros de emissão de fluorescência de ZnPc em tampão e em metanol (25 µg/ml) e observaram que a ZnPc, em soluções aquosas, apresenta um espectro de emissão de fluorescência típico de agregação, que é caracterizado por dois picos na região de 600 – 700 nm, aproximadamente em 630 e 680 nm. Em solvente orgânico, no entanto, há um aumento da absorção em 680 nm, o desaparecimento do pico de 630 nm e o surgimento do pico próximo a 610 nm, que são modificações que indicam a monomerização da ZnPc.

A similaridade do perfil dos espectros de absorção e de emissão de fluorescência da ZnPc em TFS-SDS com o perfil dos espectros da ZnPc em acetona é uma indicação de que não houve agregação da ZnPc e de que o SDS pode ser considerado um tensoativo adequado para a dispersão da ZnPc em meio aquoso. A ZnPc é uma substância hidrofóbica e o SDS auxilia na dispersão da ZnPc ao formar micelas, que ficam dispersas na solução tampão; a ZnPc, hidrofóbica, tende a se localizar dentro dessas micelas, o que pode justificar a diminuição da absorbância e da intensidade da emissão de fluorescência da ZnPc e o deslocamento do pico para a região do vermelho.

A acetona e o meio aquoso contendo SDS, portanto, mostraram-se adequados para as análises quantitativas da ZnPc.

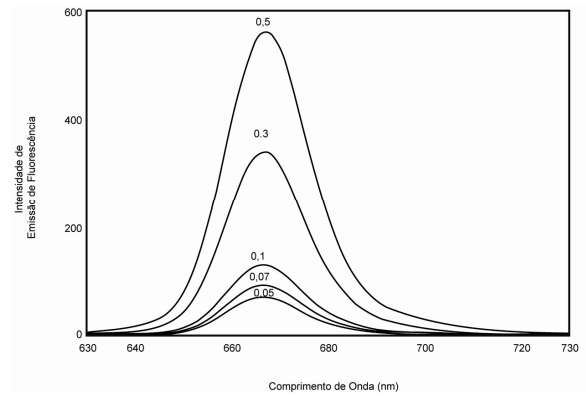
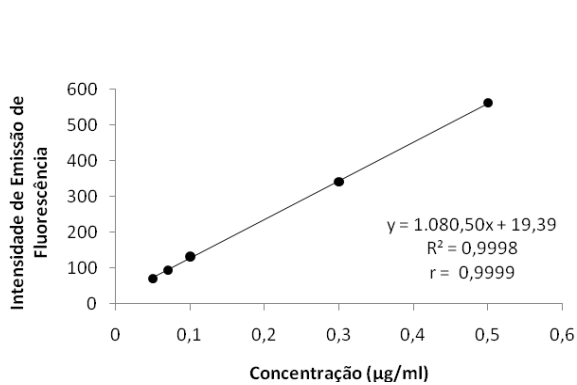
Durante a determinação dos espectros de emissão de fluorescência da ZnPc nos meios utilizados, foi realizada a análise de interferentes, na qual não foi observada a interferência dos constituintes das nanopartículas, como o polímero (PCL), o álcool polivinílico (PVA) e o Lutrol[®], na emissão de fluorescência da ZnPc.

5.2.2 Obtenção das curvas analíticas de ZnPc

5.2.2.1 Curva analítica da ZnPc em acetona

As curvas analíticas da ZnPc em acetona obtidas em dois dias e os espectros de emissão de fluorescência dos dados utilizados na elaboração da curva estão apresentados na Figura 16.

1º dia



2º dia

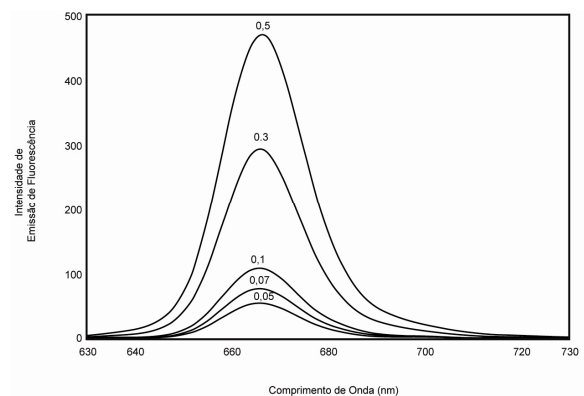
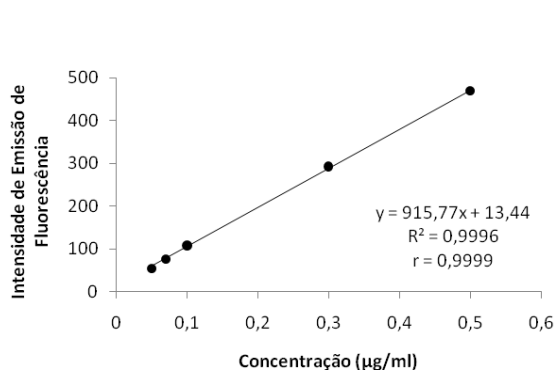
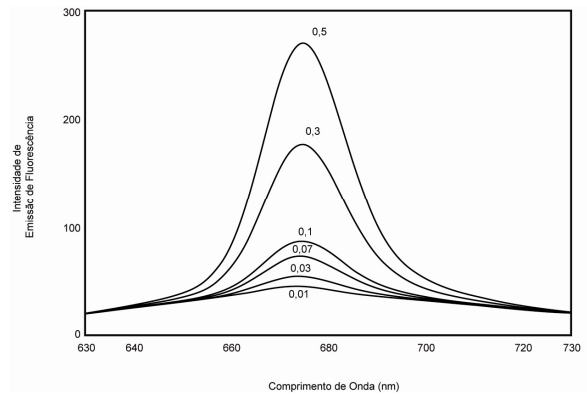
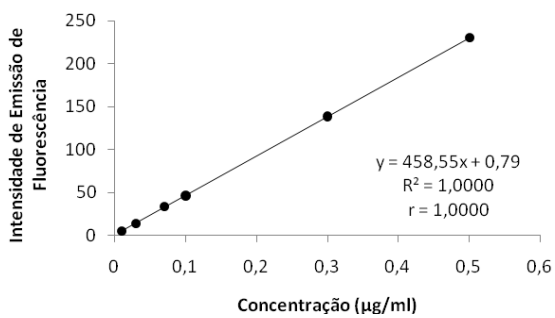


Figura 16. Curvas padrão de ZnPc em acetona e os respectivos espectros de emissão de fluorescência das concentrações utilizadas em $\mu\text{g/ml}$.

5.2.2.2 Curva analítica da ZnPc em TFS-SDS

As curvas analíticas da ZnPc em TFS-SDS obtidas em dois dias e os espectros de emissão de fluorescência dos dados utilizados na elaboração da curva estão apresentados na Figura 17.

1º dia



2º dia

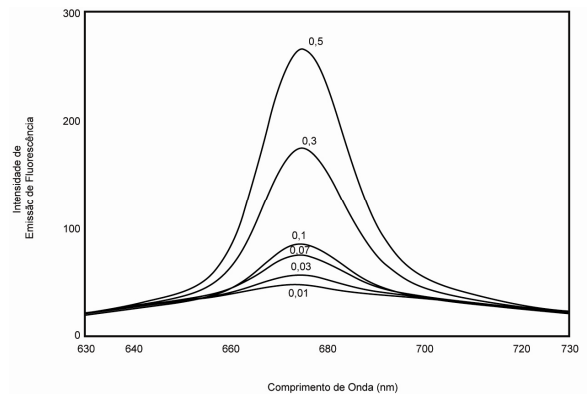
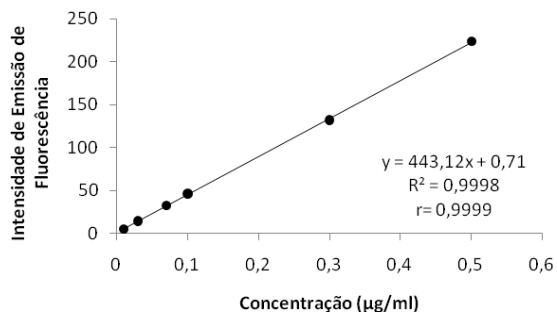


Figura 17. Curvas padrão de ZnPc em TFS-SDS e os respectivos espectros de emissão de fluorescência das concentrações utilizadas em $\mu\text{g/ml}$.

5.2.3 Validação dos métodos analíticos

A linearidade foi determinada utilizando-se as curvas padrão apresentadas anteriormente nas Figuras 16 e 17, em que as intensidades de emissão de fluorescência correlacionam-se linearmente com as concentrações de ZnPc nos intervalos utilizados.

Pela análise dos resultados, observou-se correlação linear adequada em ambos os métodos, pois os coeficientes de correlação obtidos apresentaram valores superiores a 0,999, que estão acima do critério mínimo ($r = 0,99$) preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2003) e são considerados como uma evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003).

Os resultados de precisão e exatidão intra- e inter-dias dos métodos analíticos para quantificação da ZnPc encapsulada e da ZnPc liberada estão apresentados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente. A precisão e a exatidão dos dois métodos apresentam valores satisfatórios, com variação menor do que 5% para a precisão, como recomenda a ANVISA (BRASIL, 2003), e com variação menor do que 15% para a precisão e a exatidão, conforme recomendado por Causon (1997).

Dessa forma, pode-se considerar a emissão de fluorescência para a quantificação de ZnPc em meio aquoso (TFS-SDS) e em acetona um método preciso e exato.

Tabela 8. Precisão e exatidão intra-dia e inter-dias do método analítico de quantificação da ZnPc encapsulada utilizando meio orgânico (acetona).

		Concentração	Concentração	Precisão	Exatidão
		Teórica	Obtida	(%)	(%)
		($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)		
Intra-Dia	Dia 1		$0,047 \pm 0,002$	3,7	6,7
	Dia 2	0,05	$0,046 \pm 0,001$	2,8	8,7
Inter-Dia			$0,046 \pm 0,0005$	1,1	7,3
Intra-Dia	Dia 1		$0,106 \pm 0,001$	1,2	6,1
	Dia 2	0,1	$0,108 \pm 0,004$	3,8	8,4
Inter-Dia			$0,107 \pm 0,002$	1,5	7,2
Intra-Dia	Dia 1		$0,500 \pm 0,002$	0,4	0,1
	Dia 2	0,5	$0,491 \pm 0,009$	1,7	1,9
Inter-Dia			$0,495 \pm 0,006$	1,3	1,0

Tabela 9. Precisão e exatidão intra-dia e inter-dias do método analítico de quantificação da ZnPc liberada utilizando meio aquoso (TFS-SDS).

		Concentração	Concentração	Precisão	Exatidão
		Teórica	Obtida	(%)	(%)
		($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)		
Intra-Dia	Dia 1		$0,010 \pm 0,0004$	3,6	1,0
	Dia 2	0,01	$0,010 \pm 0,0002$	2,1	3,8
Inter-Dia			$0,010 \pm 0,0002$	2,0	2,4
Intra-Dia	Dia 1		$0,071 \pm 0,002$	2,3	1,4
	Dia 2	0,07	$0,070 \pm 0,0004$	0,6	0,5
Inter-Dia			$0,071 \pm 0,0004$	0,6	0,9
Intra-Dia	Dia 1		$0,498 \pm 0,004$	0,7	0,5
	Dia 2	0,5	$0,500 \pm 0,003$	0,6	0,04
Inter-Dia			$0,499 \pm 0,002$	0,3	0,3

5.3 RENDIMENTO DO PROCESSO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Os resultados do cálculo do rendimento do processo, da determinação da eficiência de encapsulação e do conteúdo de ZnPc das nanopartículas preparadas pelo MDS e pelo MEES estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Rendimento, eficiência de encapsulação e conteúdo de ZnPc de nanopartículas de PCL contendo ZnPc obtidas por MDS e MEES.

Método	Rendimento ^a (%)	Eficiência de Encapsulação ^b (%)	Conteúdo de ZnPc (µg/mg)
MDS	73,8 ± 0,9	68,6 ± 3,7	2,8
MEES	44,1 ± 2,1	59,1 ± 2,9	4,0

MDS: Método de Difusão do Solvente; MEES: Método de Emulsão e Evaporação do Solvente; ZnPc: zinco(II)ftalocianina.

a = Média ± Desvio Padrão, n = 5 determinações.

b = Média ± Desvio Padrão, n = 3 determinações.

Na preparação de nanopartículas de PCL contendo ZnPc obtidas pelo MDS, o rendimento do processo foi de $73,8 \pm 0,9\%$, ou seja, para cada 100 mg de polímero utilizado, obteve-se uma massa de partículas seca correspondente à $73,8 \pm 0,9$ mg, e a eficiência de encapsulação obtida por esse método foi de $68,6 \pm 3,7\%$. O rendimento do processo de preparo de nanopartículas de PCL contendo ZnPc por MEES, por outro lado, foi de $44,2 \pm 2,1\%$ e a eficiência de encapsulação foi de $59,1 \pm 2,9\%$.

Os dois métodos empregados podem ser considerados adequados para o preparo de nanopartículas contendo ZnPc, já que apresentaram rendimento e eficiência de encapsulação satisfatórios. O rendimento é um parâmetro importante relacionado ao processo de preparo das partículas. Neste caso, pode-se considerar o MDS um método mais eficiente, já que o rendimento foi maior do que o obtido no MEES, indicando que a perda de nanopartículas durante o processo foi menor no MDS. A eficiência de encapsulação foi calculada para se obter a

quantidade de fármaco recuperada nas nanopartículas e o resultado obtido foi de aproximadamente 60% do fármaco recuperado nos dois casos.

No entanto, o conteúdo de ZnPc (em μg) por cada mg de nanopartículas foi maior nas amostras obtidas pelo MEES do que pelo MDS (Tabela 10). O conteúdo de fármaco é calculado correlacionando-se a quantidade de fármaco recuperado (eficiência de encapsulação) com a quantidade de nanopartículas obtidas (rendimento). Foi observado que não houve uma relação de proporção entre o rendimento e a eficiência de encapsulação, já que a quantidade de fotossensibilizante no MEES (eficiência de encapsulação) foi próxima de 60% mesmo com o rendimento abaixo de 50% (Tabela 10), ou seja, com uma quantidade menor de massa de nanopartículas recuperadas, o MEES apresentou um maior conteúdo de ZnPc encapsulada.

Esse mesmo resultado já foi relatado por outros autores. Zhang *et al.* (2004) prepararam amostras de nanopartículas de diversos copolímeros contendo um derivado da camptotecina e, embora tenham obtido rendimentos próximos a 85% em todas as amostras, não observaram uma relação linear entre o rendimento e o conteúdo de fármaco encapsulado. Hu *et al.* (2003), por sua vez, prepararam nanopartículas contendo nimodipina e também não observaram diferenças regulares entre os valores de conteúdo de fármaco encapsulado, rendimento e eficiência de encapsulação. Por exemplo, a amostra com maior rendimento (84,2%) apresentou conteúdo de fármaco encapsulado próximo ao do obtido na amostra com menor rendimento (48,0%): 6,2% e 6,0%, respectivamente (HU *et al.*, 2003). Ricci Júnior e Marchetti (2006a, 2006b) obtiveram resultado similar ao prepararem nanopartículas de PLGA contendo ZnPc pelo MDS e pelo MEES. As nanopartículas de PLGA contendo ZnPc que haviam sido preparadas pelo MDS apresentaram rendimento de 60% e eficiência de encapsulação de 80%, enquanto que as amostras que haviam sido preparadas pelo MEES apresentaram rendimento de 80% e eficiência de encapsulação de 70%, mostrando que não há uma relação direta entre o rendimento e a eficiência de encapsulação das amostras.

Neste trabalho, o rendimento inferior do MEES parece estar relacionado com o tamanho das nanopartículas. O MEES forneceu partículas com diâmetro médio em torno de 200 nm e, talvez, a centrifugação, método utilizado para a concentração das amostras, não esteja sendo adequada para a uma recuperação ideal dessas nanopartículas muito pequenas. Dessa forma, a etapa de concentração das amostras de nanopartículas pode ser uma etapa relevante para a obtenção de sistemas nanoparticulados com melhores rendimento e eficiência de encapsulação. A busca de métodos mais eficientes do que a centrifugação para a recuperação das nanopartículas seria uma área de pesquisa promissora.

Existem outros fatores que podem afetar o conteúdo de fármaco encapsulado e a eficiência de encapsulação das nanopartículas: a afinidade do fármaco pelo polímero utilizado, o volume da superfície hidrofóbica, a solubilidade do fármaco na água e a interação fármaco-fármaco (ZHANG *et al.*, 2004). No caso das nanopartículas contendo ZnPc, é provável que as taxas satisfatórias de eficiência de encapsulação obtidas estejam muito relacionadas com a baixa solubilidade do fármaco em água, que minimiza a perda de fármaco por difusão para a fase aquosa durante o preparo.

A avaliação desses parâmetros durante o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados é importante porque um sistema nanoparticulado com bom rendimento e alta eficiência de encapsulação reduzirá a quantidade de nanopartículas necessária para a administração da concentração do fármaco que seja suficiente para atingir o efeito desejado e, também, diminuirá a perda de fármaco durante o preparo das partículas (GOVENDER *et al.*, 1999).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As amostras de nanopartículas preparadas tanto pelo MDS quanto pelo MEES foram caracterizadas quanto ao tamanho, ao potencial zeta e à morfologia.

5.4.1 Tamanho das Nanopartículas

A importância da determinação do tamanho das nanopartículas está relacionada, principalmente, com a possibilidade de utilização das mesmas para a administração endovenosa do fotossensibilizante.

Nesse estudo, a caracterização do tamanho das nanopartículas também foi relevante na etapa de padronização do método de preparo das nanopartículas de PCL com ZnPc.

A determinação do tamanho das nanopartículas foi realizada pela técnica do espalhamento de luz, que utiliza a flutuação da intensidade da luz espalhada por partículas em suspensão sob movimento Browniano no tempo para se obter a distribuição hidrodinâmica do tamanho (XU, 2008). A partir desse princípio, as partículas maiores movimentam-se mais lentamente e, conseqüentemente, a intensidade da luz flutua lentamente, enquanto que partículas menores movimentam-se mais rapidamente, resultando na flutuação mais rápida da intensidade da luz. O equipamento é responsável pela correlação desses dois parâmetros para o cálculo do diâmetro médio das partículas.

O diâmetro médio e o índice de polidispersividade das amostras de nanopartículas estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Tamanho das nanopartículas obtidas pelo MDS e pelo MEES.

Método	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersividade
MDS com ZnPc	332,8 ± 7,7	0,125 ± 0,041
MDS vazia	314,2 ± 14,4	0,086 ± 0,011
MEES com ZnPc	225,9 ± 4,1	0,096 ± 0,042
MEES vazia	231,7 ± 13,9	0,117 ± 0,066

MDS: Método de Difusão do Solvente; MEES: Método de Emulsão e Evaporação do Solvente; ZnPc: zinco(II)ftalocianina.

Média ± Desvio Padrão, n = 5 determinações.

As amostras de nanopartículas obtidas após a definição das condições de preparo apresentaram tamanho nanométrico e, portanto, podem ser administradas endovenosamente. No entanto, foram obtidos tamanhos diferentes de acordo com o método empregado; as nanopartículas contendo ZnPc obtidas pelo MDS e pelo MEES apresentaram diâmetro médio de $332,8 \pm 7,7$ nm e $225,9 \pm 4,1$ nm, respectivamente, e as nanopartículas vazias apresentaram diâmetro médio de $314,2 \pm 14,4$ nm quando preparadas pelo MDS e de $231,7 \pm 13,9$ nm quando preparadas pelo MEES.

Os valores de diâmetro médio obtidos para todas as amostras foram submetidos à análise estatística pelo método ANOVA. As nanopartículas vazias e com ZnPc obtidas pelo mesmo método não apresentaram diferença significativa de tamanho ($p > 0,05$), o que indica que a encapsulação do fármaco não alterou o tamanho das partículas usualmente obtidos por cada método empregado. Por outro lado, o tamanho das nanopartículas, contendo ou não a ZnPc, obtidas pelo MDS, diferiu significativamente do tamanho das nanopartículas, contendo ou não a ZnPc, obtidas pelo MEES ($p < 0,001$). Este resultado está de acordo com o descrito por Schaffazick *et al.* (2003), que relatou que o tamanho das partículas depende do método de encapsulação e das condições empregadas. O MDS, embora tenha fornecido um melhor

rendimento do processo e maior eficiência de encapsulação da ZnPc nas nanopartículas do que o MEES, resultou na obtenção de nanopartículas maiores do que as preparadas pelo MEES.

O tamanho das nanopartículas é um parâmetro importante na aplicação das mesmas para o tratamento do câncer. HOBBS *et al.* (1998) relataram que os tumores implantados em modelo animal (camundongo) apresentam vasculatura caracterizada por endotélio descontínuo com grandes fenestras de 200 a 780 nm (*apud* GAUMET *et al.*, 2008) e, por isso, nanopartículas nessa faixa de tamanho seriam capazes de passar livremente pelas fenestras, aumentando a quantidade de fármaco no local do tumor. Dessa forma, as nanopartículas de PCL contendo ZnPc obtidas apresentaram tamanho numa faixa que parece ser a ideal para a sua utilização endovenosa na TFD do câncer.

Além do diâmetro médio, a análise forneceu o índice de polidispersividade (IP) das amostras. O cálculo do IP considera o tamanho médio da partícula, o índice de refração do solvente, o ângulo de medida e a variação da distribuição (KOPPEL, 1972). Embora não exista uma correlação linear entre um valor de IP alto e uma monodispersividade verdadeira de uma amostra, em uma escala de 0 a 1, o IP menor que 0,1 pode ser associado à um sistema monodisperso, com alta homogeneidade na população de partículas, sugerindo uma distribuição de tamanho monomodal. Por outro lado, valores altos de IP sugerem uma distribuição de tamanho mais ampla ou polimodal (GAUMET *et al.*, 2008). De modo geral, os índices de polidispersividade obtidos foram menores ou próximos de 0,1 (Tabela 11), indicando que os sistemas preparados são monodispersos e apresentam distribuição de tamanho homogênea, ideal para a administração endovenosa.

5.4.2 Morfologia das Nanopartículas

A morfologia das nanopartículas foi estudada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As fotomicrografias das nanopartículas sem e com ZnPc preparadas por MDS e MEES estão apresentadas nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

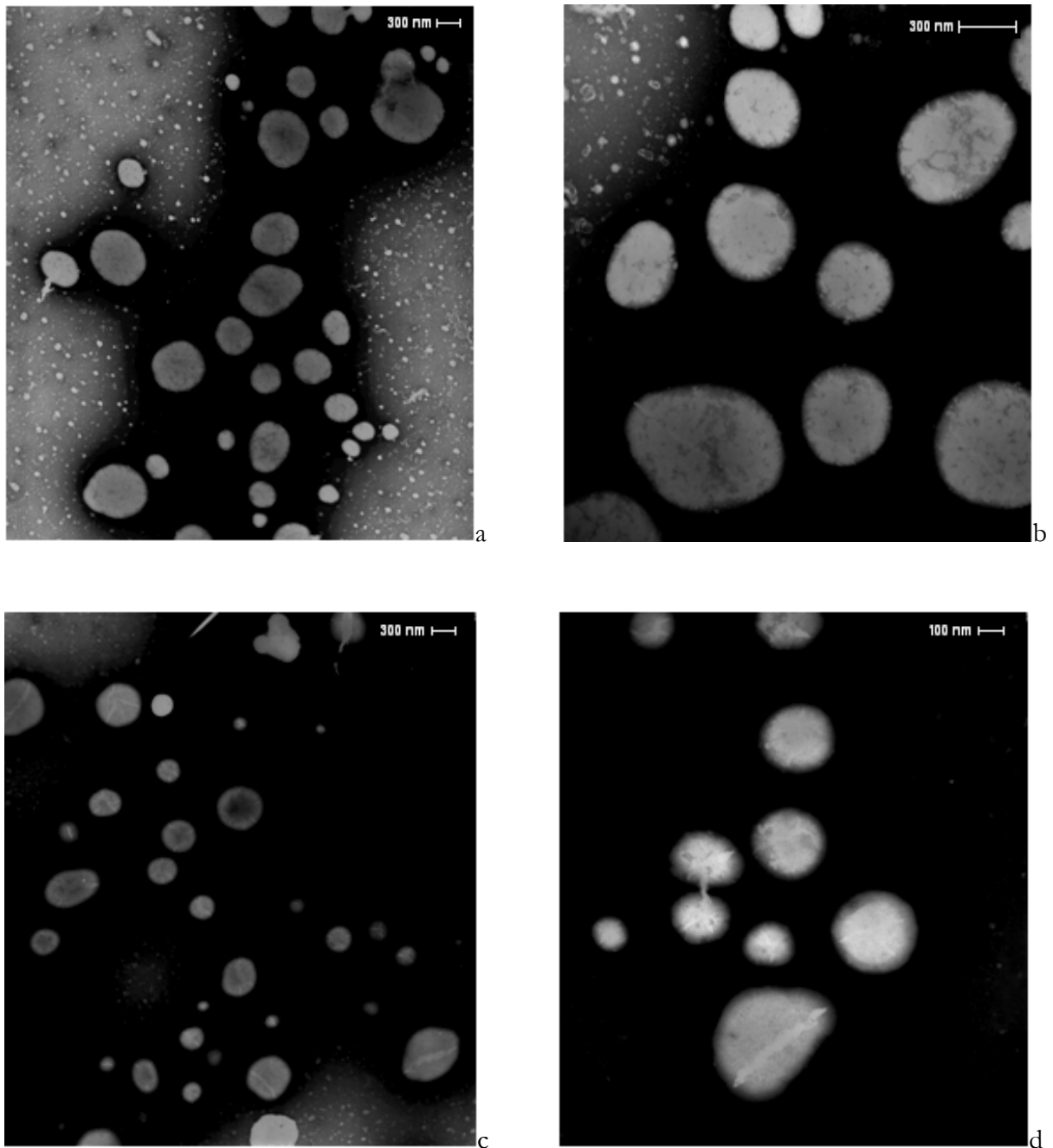


Figura 18. Fotomicrografias obtidas por MET: nanopartículas vazias (a, b) e nanopartículas com ZnPc (c, d) preparadas por MDS.

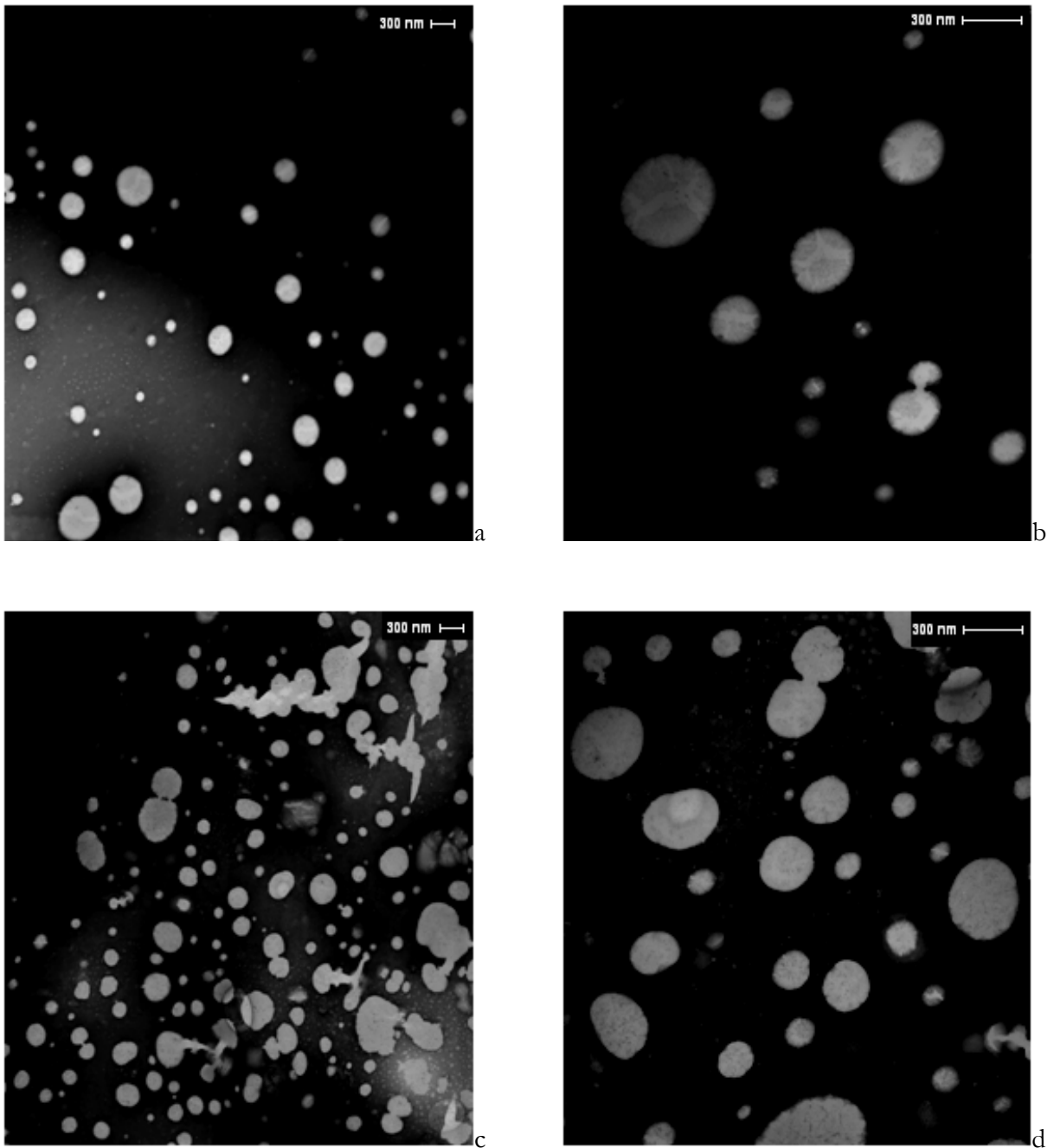


Figura 19. Fotomicrografias obtidas por MET: nanopartículas vazias (a, b) e nanopartículas com ZnPc (c, d) preparadas por MEES.

A MET tem sido muito empregada para a obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A análise morfológica por MET mostrou nanopartículas com forma esférica ou quase esférica. Não houve formação de aglomerados de nanopartículas. A obtenção de nanopartículas

com forma esférica é importante quando se deseja administrá-las endovenosamente, já que essa forma regular facilita o fluxo das partículas na corrente sanguínea.

A comparação dos resultados das análises morfológicas das amostras de nanopartículas vazias e de nanopartículas com ZnPc mostrou que a presença do fotossensibilizante não alterou a forma e a superfície das mesmas. Além disso, observou-se que as características morfológicas das partículas eram similares independentemente do método de preparo utilizado (Figuras 18 e 19).

As nanopartículas observadas na análise por MET apresentaram tamanho nanométrico. Nas Figuras 18 e 19, pode-se observar nanopartículas com tamanhos que variam na faixa de 100 a 400 nm, aproximadamente. Na análise de tamanho por espalhamento de luz, o diâmetro médio obtido para as nanopartículas preparadas pelo MDS e pelo MEES foi de aproximadamente 300 e 200 nm, respectivamente (Tabela 11). Portanto, houve uma correlação entre os tamanhos obtidos nessas duas técnicas e a MET confirmou o tamanho que havia sido obtido na análise por espalhamento de luz.

A combinação de espalhamento de luz e MET, utilizada neste trabalho, já foi empregada por diversos pesquisadores. Blouza *et al.* (2006), por exemplo, observaram o tamanho nanométrico e a forma esférica de nanopartículas de PCL contendo espirolactona por espalhamento de luz e MET e também concluíram que o tamanho observado na MET correlacionava-se com o tamanho obtido na análise por espalhamento de luz.

Diversas técnicas têm sido empregadas para a análise da morfologia e do tamanho das nanopartículas: espalhamento de luz, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de força atômica, ultracentrifugação analítica, eletroforese capilar, dentre outras (GAUMET *et al.*, 2008). No entanto, a combinação de duas técnicas tem sido muito recomendada para uma melhor caracterização das amostras (BOOTZ *et al.*, 2004).

5.4.3 Determinação do Potencial Zeta

O potencial zeta é uma importante característica das partículas poliméricas (HANS & LOWMAN, 2002) que reflete o potencial de superfície das partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Para partículas pequenas em meio líquido, não existe uma técnica satisfatória para se determinar a sua carga da superfície. A prática comum é determinar o potencial elétrico da partícula em um local diferente da superfície, na camada difusa. Essa localização, relacionada ao movimento da partícula no líquido, é chamada de superfície de cisalhamento, e o potencial medido nesse plano é chamado de potencial zeta (XU, 2008).

O comportamento eletroforético das partículas depende do potencial zeta e, portanto, a análise do potencial zeta das amostras foi medida determinando-se a mobilidade eletroforética das partículas, ou seja, a velocidade das mesmas no campo elétrico aplicado. O pH é um dos principais fatores que afetam o potencial zeta de uma amostra e, por isso, é um parâmetro considerado importante na análise.

A determinação do potencial zeta é relevante por diversos motivos, sendo os principais deles a sua relação com a estabilidade das nanopartículas e com a resposta biológica do fármaco associado (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O potencial zeta e o pH das amostras analisadas estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12. Potencial zeta das nanopartículas obtidas pelo MDS e pelo MEES.

Método	Potencial Zeta (mV)	pH
MDS com ZnPc	- 25,03 ± 2,79	6,19 ± 0,13
MDS vazia	- 22,38 ± 6,07	5,94 ± 0,24
MEES com ZnPc	- 4,85 ± 1,54	5,41 ± 0,04
MEES vazia	- 6,28 ± 0,88	5,46 ± 0,11

MDS: Método de Difusão do Solvente; MEES: Método de Emulsão e Evaporação do Solvente; ZnPc: zinco(II)ftalocianina; pH: potencial hidrogeniônico.
Média ± Desvio Padrão, n = 5 determinações.

O pH de cada suspensão de nanopartículas foi determinado após a etapa de preparo das mesmas. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12, o pH das amostras preparadas pelo MEES foi levemente mais baixo do que o das amostras preparadas pelo MDS.

Essa faixa de pH parece estar relacionada com a PCL. Verger *et al.* (1998) prepararam nanopartículas de isradipina com PCL, PLA e dois tipos de PLGA e obtiveram pH 6,3, 3,1, 4,0 e 2,8, respectivamente. Ourique *et al.* (2008) preparam nanocápsulas e nanoesferas de tretinoína com a PCL e obtiveram faixa de pH 5,9 a 6,9, próxima à obtida com as nanopartículas de PCL contendo ZnPc.

Os potenciais zeta das amostras de nanopartículas com e sem fármaco preparadas por ambos os métodos foram analisados. As nanopartículas obtidas pelo MDS apresentaram potencial zeta mais negativo do que as preparadas pelo MEES, seja com ou sem a ZnPc encapsulada.

De acordo com a análise estatística (ANOVA), houve diferença significativa entre os potenciais zeta das nanopartículas com ZnPc preparadas pelo MDS e pelo MEES ($p < 0,05$) e não houve diferença entre os resultados das amostras de nanopartículas com e sem ZnPc obtidas por um mesmo método ($p > 0,05$).

O potencial zeta negativo obtido para todas as amostras está relacionado com a poli- ϵ -caprolactona, pois polímeros poliésteres conferem potencial negativo à interface devido à presença de grupos carboxílicos (VERGER *et al.*, 1998; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O potencial zeta pode representar um índice de estabilidade das partículas. Em módulo, valores altos de potenciais zeta estão relacionados com uma boa estabilidade do sistema, pois indicam que as interações repulsivas entre as partículas são maiores, o que leva à formação de partículas mais estáveis, com diminuição da agregação (HANS & LOWMAN, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As nanopartículas preparadas pelo MDS apresentaram um valor negativo, porém alto de potencial zeta, em torno de -25 mV, indicando a estabilidade desse sistema. Este resultado está

de acordo com os valores de potencial zeta descritos na literatura para nanopartículas de polímeros poliésteres. Agnihotri & Vavia (2008) obtiveram o mesmo resultado na determinação do potencial zeta de nanopartículas poliméricas de PLGA contendo diclofenaco para administração oftálmica. E Verger *et al.* (1998) prepararam nanopartículas de PCL contendo isradipina que também apresentaram potencial zeta em torno de -25 mV.

As nanopartículas obtidas pelo MEES apresentaram potencial zeta próximo de zero. Este resultado parece estar relacionado com o tensoativo utilizado; o álcool polivinílico não apresenta carga em sua estrutura e forma uma camada sobre a superfície da partícula que cobre e modifica a sua carga superficial (LAMPRECHT *et al.*, 2001). Nanopartículas com potenciais zeta próximos de zero foram descritas por Lamprecht *et al.* (2001) e Singh *et al.* (2005).

Lamprecht *et al.* (2001) prepararam nanopartículas de PCL contendo rolipram por dois métodos distintos e variaram a quantidade e o tipo de tensoativo. As amostras preparadas com PVA apresentaram potencial zeta na faixa de -10 a 0 mV e as amostras preparadas com colato de sódio apresentaram potenciais zeta na faixa de -20 a -50 mV, dependendo do método empregado. Singh *et al.* (2005), por sua vez, utilizaram PVA no preparo de nanopartículas de PCL contendo toxóide diftérico e o potencial zeta das amostras foi de $-2,6 \pm 1,2$ mV.

A obtenção de potenciais zeta diferentes para as amostras preparadas pelo MDS e pelo MEES confirmam que, de acordo com o método escolhido e com as condições empregadas, as propriedades das nanopartículas serão diferentes e, portanto, o constante preparo de partículas com métodos e/ou condições diferentes é uma estratégia para o desenvolvimento de sistemas de liberação mais adequados ao que se propõem.

5.5 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DA ZnPc EXTRAÍDA DAS NANOPARTÍCULAS

Os estudos espectroscópicos de absorção no UV-vis e de emissão de fluorescência são realizados para se obter informações a respeito do fotossensibilizante livre e encapsulado em sistemas de liberação, como as nanopartículas.

A análise espectroscópica do fotossensibilizante livre e extraído das nanopartículas é uma forma de se observar se houve alguma alteração ou degradação durante o processo de encapsulação (SIBATA *et al.*, 2004) e, conseqüentemente, é uma análise interessante para avaliar a atividade do fotossensibilizante (BALL *et al.*, 1998), inclusive após a nanoencapsulação.

A ZnPc é o mais hidrofóbico dos derivados das ftalocianinas e quando ocorre alguma alteração na sua forma monomérica, podem ser observadas modificações espectroscópicas críticas, uma vez que estados agregados da ZnPc fornecem mudanças no perfil dos espectros de absorção e emissão de fluorescência (BALL *et al.*, 1998; SIBATA *et al.*, 2004). A observação dessas mudanças nos espectros é um indicativo de que houve comprometimento da atividade da ZnPc, já que os dímeros formados pela agregação a tornam inativa ou menos eficiente do que seus monômeros (BALL *et al.*, 1998).

As propriedades espectrais da ZnPc foram estudadas na solução padrão de ZnPc em acetona e nas amostras do fotossensibilizante extraído das nanopartículas preparadas pelo MDS e pelo MEES.

As Figuras 20 e 21 mostram, respectivamente, os espectros de absorção no UV-visível e de emissão de fluorescência obtidos da solução padrão de ZnPc e da solução de ZnPc extraída das partículas em acetona.

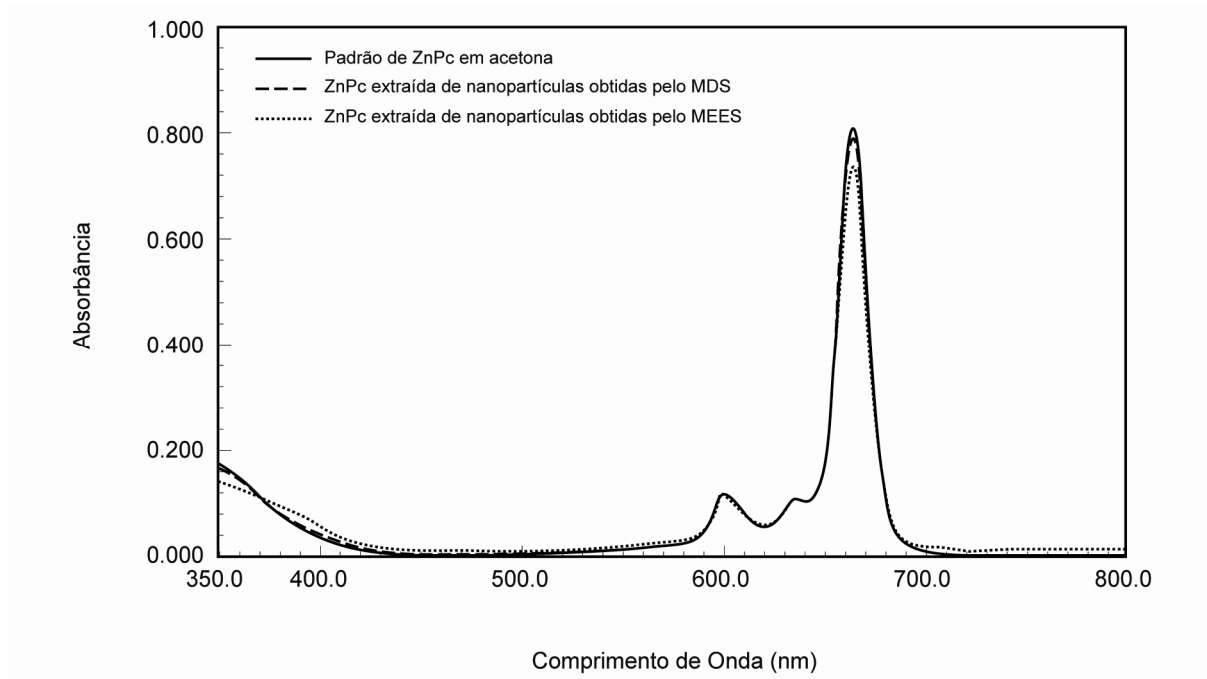


Figura 20. Espectros de absorção no UV-visível da ZnPc padrão e da ZnPc extraída das nanopartículas obtidas pelo MDS e pelo MEES na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em acetona.

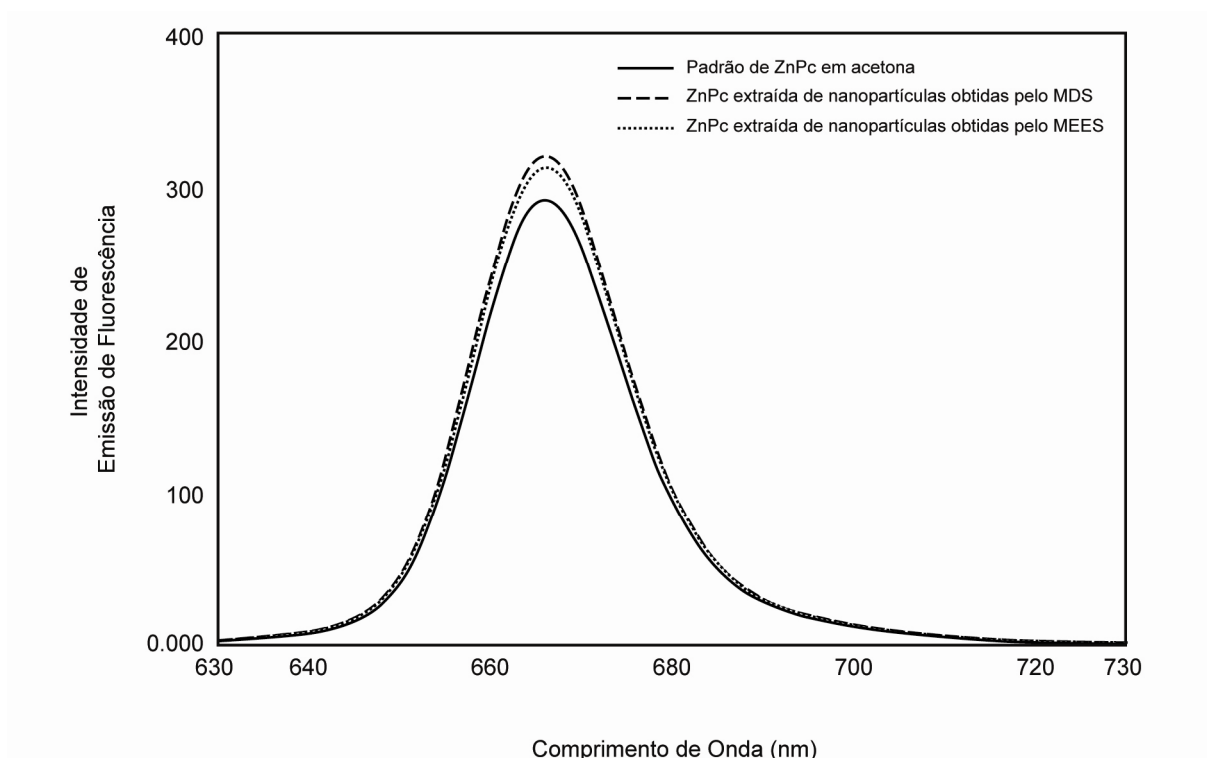


Figura 21. Espectros de emissão de fluorescência da ZnPc padrão e da ZnPc extraída das nanopartículas obtidas pelo MDS e pelo MEES na concentração de 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em acetona.

Os espectros de absorção no UV-vis e de emissão de fluorescência da ZnPc extraída das nanopartículas preparadas pelo MDS e pelo MEES foram semelhantes aos espectros da solução padrão de ZnPc em acetona, indicando que a ZnPc extraída das nanopartículas não teve suas propriedades espectrais alteradas e encontra-se na sua forma monomérica ativa.

Ricci Júnior e Marchetti (2006a, 2006b) também observaram que a ZnPc encapsulada em nanopartículas de PLGA não sofreu alteração nas suas propriedades fotofísicas após o processo de encapsulação. Dessa forma, esses resultados confirmam que os processos de encapsulação utilizados não afetam a atividade da ZnPc e que as nanopartículas são sistemas de liberação adequados para a encapsulação desse fotossensibilizante.

5.6 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO FÁRMACO-POLÍMERO

Na avaliação da cristanilidade das amostras e da interação fármaco-polímero do sistema nanoestruturado, foram realizados os estudos de difração de raios X e de DSC.

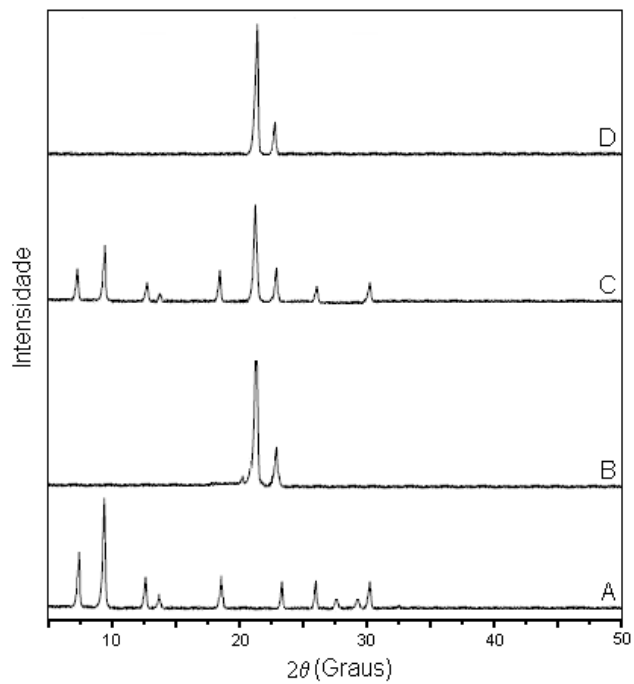
Diferentes combinações entre fármaco e polímero podem coexistir nos carreadores poliméricos, como, por exemplo, um fármaco amorfo disperso em uma matriz polimérica cristalina ou amorfa e um fármaco cristalino disperso em matriz polimérica cristalina ou amorfa (JENQUIN & MCGINITY, 1994 *apud* VERGER *et al.*, 1998). Além disso, um fármaco pode estar presente como uma solução sólida ou uma dispersão sólida em um polímero amorfo ou cristalino.

A determinação dessas características é importante não apenas por permitir o conhecimento da cristanilidade e das possíveis interações entre fármaco e polímero, mas também devido à influência das mesmas na liberação *in vitro* e *in vivo* do fármaco (VERGER *et al.*, 1998).

5.6.1 Difração de Raios X

A Figura 22 apresenta os padrões de difração de raios X das amostras de ZnPc (A), de nanopartículas de PCL vazias (B), de mistura física de ZnPc com nanopartículas de PCL vazias (C), e de nanopartículas de PCL contendo ZnPc (D) obtidas pelo MDS (a) e pelo MEES (b).

a)



b)

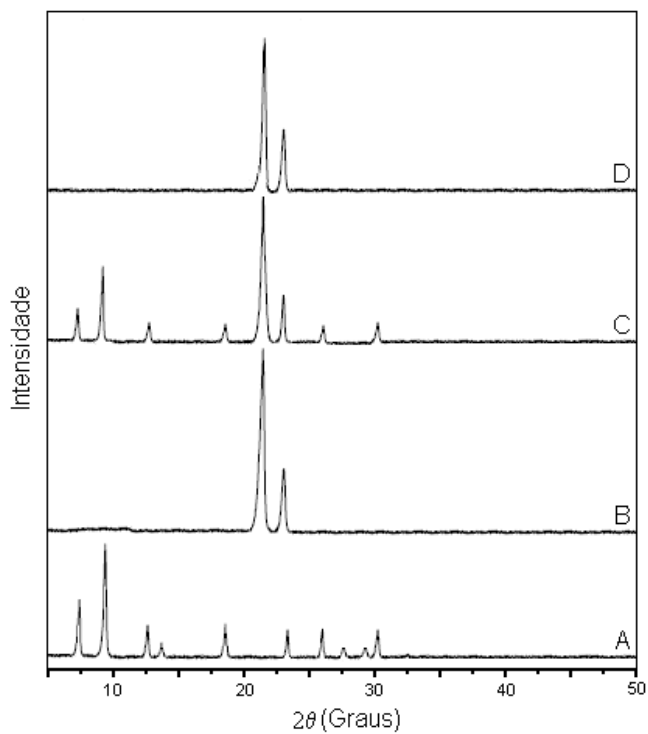


Figura 22. Difrátogramas de Raios X das nanopartículas obtidas por MDS (a) e por MEES (b). As amostras analisadas foram ZnPc livre (A), nanopartículas de PCL (B), mistura física de ZnPc e nanopartículas de PCL (C) e nanopartículas de PCL contendo ZnPc (D).

O difratograma da ZnPc livre (A, Figura 22a e 22b) mostrou picos correspondentes à estrutura cristalina do complexo metálico e o difratograma das nanopartículas de PCL vazias apresentou dois picos que estão relacionados à característica semicristalina do polímero utilizado, conforme já observado por Verger *et al.* (1998) e Pérez *et al.* (2000).

O difratograma da mistura física (C, Figura 22a e 22b) apresentou picos de difração referentes tanto à estrutura cristalina do fotossensibilizante quanto à estrutura semicristalina do polímero, ocorrendo algumas sobreposições de picos entre 20° e 25°.

As amostras de nanopartículas contendo ZnPc, por sua vez, apresentaram comportamento diferente. Nos difratogramas (D, Figura 22a e 22b), observaram-se os picos característicos da semicristalinidade da PCL, mas não foram observados picos característicos da estrutura cristalina da ZnPc. Segundo Guyot & Fawaz (1998), este resultado indica que o fármaco está dissolvido na matriz polimérica na sua forma amorfa. Por outro lado, Verger *et al.* (1998) ao analisar nanopartículas contendo isradipina relatou que devido à baixa concentração do fármaco nas nanopartículas, não se pode discriminar exatamente se existe uma dispersão molecular do fármaco ou a solução da forma sólida amorfa do fármaco no polímero, mas que, nos dois casos, o fármaco se dissolveria mais rapidamente, o que mudaria o comportamento *in vivo* do fármaco pouco solúvel. Provavelmente, essa seja a situação das nanopartículas contendo ZnPc. Embora não se possa afirmar se a ZnPc está completamente dispersa na sua forma molecular ou se encontra na sua forma amorfa no polímero, pode-se prever que a ZnPc, uma molécula com dificuldade de solubilização no meio aquoso, provavelmente se dissolverá mais rapidamente quando encapsulada nesse tipo de sistema de liberação do que na sua forma livre. Esta modificação na solubilidade da ZnPc quando incorporada em um sistema nanoestruturado caracteriza uma vantagem da utilização desse sistema, já que possibilita a dispersão desse fotossensibilizante em um meio líquido aquoso, como no caso da administração desse sistema endovenosamente na terapia fotodinâmica do câncer.

5.6.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A Figura 23 apresenta os termogramas das amostras de ZnPc (A), de nanopartículas de PCL vazias (B), de mistura física de ZnPc com nanopartículas de PCL vazias (C) e de nanopartículas de PCL contendo ZnPc (D), obtidas pelo MDS (a) e pelo MEES (b).

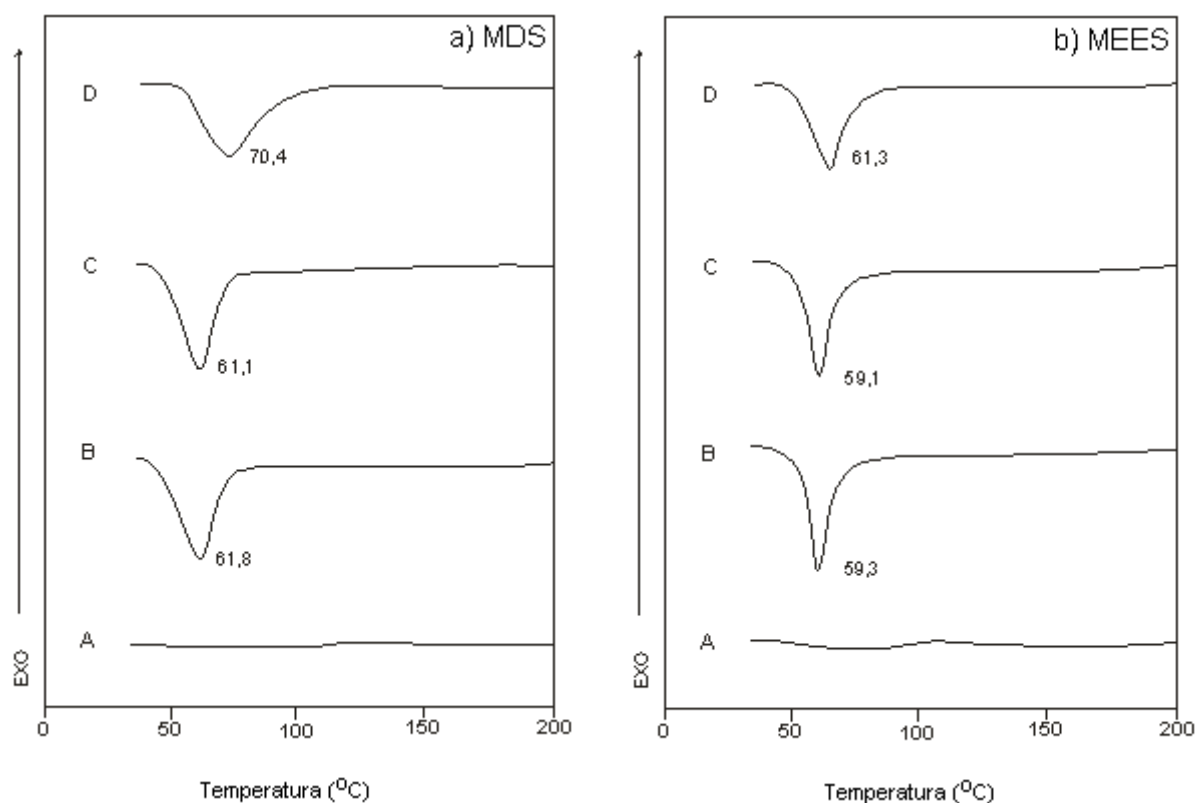


Figura 23. Termogramas das amostras obtidas por MDS (a) e por MEES (b). As amostras analisadas foram ZnPc livre (A), nanopartículas de PCL (B), mistura física de ZnPc e nanopartículas de PCL (C) e nanopartículas de PCL contendo ZnPc (D).

As amostras de ZnPc livre (A, Figura 23a e 23b) não apresentaram nenhum sinal de variação de acordo com as mudanças térmicas dentro da faixa de temperatura que foi utilizada. Já as demais amostras, que contêm o polímero em sua composição, apresentaram termogramas em que se pôde observar o pico endotérmico em torno de 60°C, correspondente à temperatura de fusão da PCL. A amostra de nanopartículas de PCL com ZnPc obtidas pelo MDS (D, Figura 23a), no entanto, apresentou um pico endotérmico em torno de 70°C.

Embora a DSC seja largamente empregada para definir os estados físicos e a possível interação do polímero e do fármaco (ESPUELAS *et al.*, 1997), nesta análise, só foi possível avaliar o comportamento térmico da PCL nas amostras. A faixa de temperatura utilizada não possibilitou a detecção dos picos endotérmicos que caracterizariam a ZnPc, já que a mesma é altamente estável e apresenta picos endotérmicos acima de 300°C (CORDEIRO & MOREIRA, 2009).

O comportamento térmico da PCL está de acordo com resultados já descritos na literatura. O pico endotérmico em torno de 60°C característico da fusão da PCL também foi observado por Espuelas *et al.* (1997), Jeong, Lee & Cho (2003) e Wan *et al.* (2009), que detectaram o pico endotérmico da PCL em 58°C, 58,2°C e 59,8°C, respectivamente.

Na amostra de nanopartículas contendo ZnPc obtida pelo MDS (D, Figura 23a), a pequena variação na temperatura de fusão e a mudança no perfil podem ser explicadas por uma provável interação da ZnPc com a PCL. Em princípio, quando dois componentes estão misturados e completamente miscíveis um no outro, apenas uma nova temperatura de fusão é observada entre as temperaturas originais no termograma de DSC da mistura (WAN *et al.*, 2009).

Na amostra de nanopartículas contendo ZnPc obtidas pelo MEES (D, Figura 23b), a temperatura de fusão não variou tanto, mas observou-se uma pequena modificação no perfil do pico, que caracteriza uma possível interação entre o fotossensibilizante e o polímero.

Este comportamento não foi observado na análise da mistura física da ZnPc livre com as nanopartículas vazias preparadas por ambos os métodos (C, Figura 23a e 23b) e isso indica que a provável interação ocorreu apenas após a formação das nanopartículas.

Após análise dos resultados, constatou-se que a técnica de DSC não foi adequada para a avaliação do comportamento térmico da ZnPc e das nanopartículas contendo esse fármaco, devido à faixa de temperatura utilizada. De qualquer forma, a análise de DSC foi importante pois, juntamente com a difração de raios X, mostrou a existência de uma interação da ZnPc, provavelmente na sua forma amorfa, com a PCL nas nanopartículas preparadas pelo MDS e pelo MEES.

5.7 PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

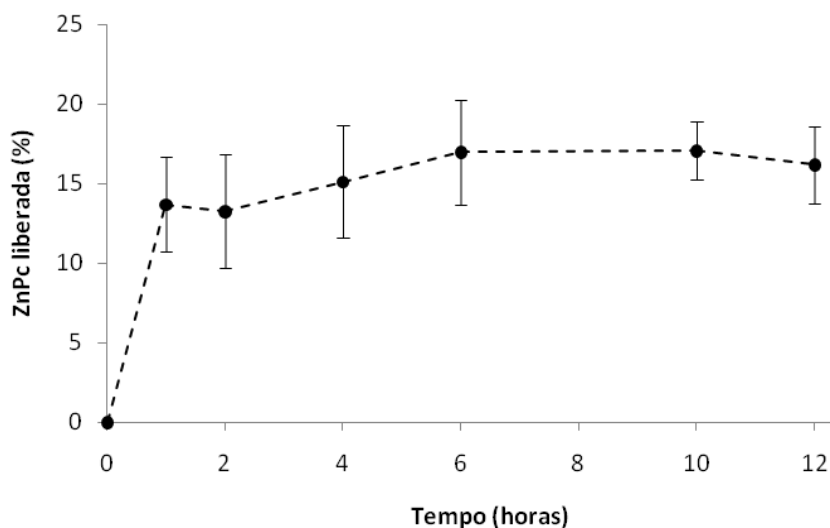
A liberação do fármaco das nanopartículas é uma etapa importante para o desenvolvimento de formulações eficazes (SOPPIMATH *et al.*, 2001). O perfil de liberação *in vitro* avalia a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo. Nesse ensaio, é importante que as condições do estudo *in vitro*, como o meio de dissolução e a temperatura, reproduzam as condições existentes *in vivo*, para que se possa estabelecer uma correlação *in vitro/in vivo* (AMIDON *et al.*, 2005). Os estudos *in vitro* ajudam a selecionar os sistemas mais adequados para um futuro estudo de liberação *in vivo*.

Para fármacos insolúveis em água, como a ZnPc, o meio de dissolução é um parâmetro relevante para a realização do estudo, já que pode ser necessário um grande volume de meio receptor. Nesses casos, a abordagem atual que parece mais apropriada é a utilização de tensoativos. A escolha do tensoativo é uma etapa importante e o dodecil sulfato de sódio (SDS), utilizado nesse estudo, é apropriado na maioria dos casos (AMIDON *et al.*, 2005). O SDS foi utilizado para aumentar a solubilidade da ZnPc no meio aquoso e também preveniu a sua adsorção nas superfícies do sistema utilizado, motivos pelos quais Chawla & Amiji (2002) também utilizaram o SDS no estudo de liberação do tamoxifeno de nanopartículas.

O estudo do perfil de liberação da ZnPc das nanopartículas obtidas pelos dois métodos empregados foi realizado para avaliar como ocorre a liberação da ZnPc das nanopartículas e se esses sistemas apresentam potencial para a veiculação da ZnPc para utilização na TFD.

Os perfis de liberação da ZnPc das nanopartículas de PCL obtidas pelo MDS e MEES estão apresentados na Figura 24.

a) MDS



b) MEES

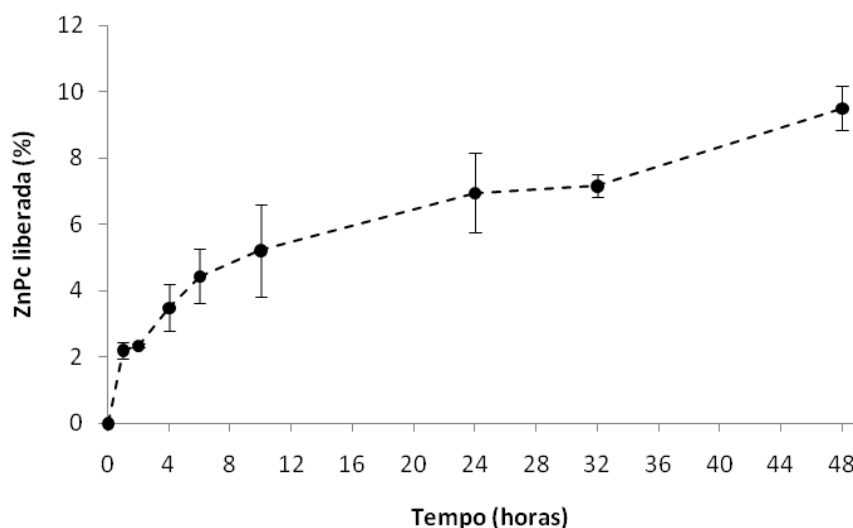


Figura 24. Perfil de liberação da ZnPc encapsulada em nanopartículas de PCL obtidas pelo MDS (a) e pelo MEES (b). Média \pm Desvio Padrão, $n=3$.

A liberação da ZnPc das nanopartículas preparadas pelo MDS foi rápida; na primeira hora de liberação, aproximadamente 15% do fotossensibilizante já havia sido liberado. Por outro lado, as nanopartículas preparadas pelo MEES liberaram a ZnPc de modo sustentado e lento; na primeira hora de liberação, foram liberados apenas 2% do fotossensibilizante encapsulado. Após 12 h, ocorreu a liberação de aproximadamente 17% do fotossensibilizante encapsulado pelo MDS e somente após 48 h foram liberados 10% da ZnPc encapsulada pelo MEES.

A liberação do fármaco das nanopartículas depende de diversos fatores, como a desorção do fármaco adsorvido na superfície da partícula, a difusão do fármaco pela matriz polimérica das nanopartículas, a erosão da matriz polimérica e os processos de erosão e difusão combinados (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Quando o fármaco está disperso na nanopartícula, a sua liberação ocorre gradativamente da matriz polimérica por difusão, e quando ele encontra-se conjugado com a matriz polimérica, a erosão ou a degradação do polímero é responsável pela sua liberação (PARK *et al.*, 2008). Além disso, durante a liberação de um fármaco, pode-se observar o “efeito burst”, que é uma liberação inicial de grande quantidade do fármaco e está associado à fração do fármaco que se encontra adsorvido na superfície da partícula (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Nos perfis apresentados, observou-se o efeito “burst” na liberação da ZnPc das nanopartículas obtidas pelo MDS (Figura 24a). Dessa forma, é provável que uma maior quantidade do fármaco esteja adsorvido na superfície das partículas preparadas por esse método. Por outro lado, a ausência do efeito “burst” no perfil de liberação da ZnPc das nanopartículas obtidas pelo MEES e a liberação mais lenta e sustentada do fármaco nesse caso podem ser indicativos de que a ZnPc estava homoganeamente dispersa na matriz polimérica da nanopartícula e de que o processo predominante na liberação seja a difusão e não a desorção do fármaco. Além disso, como a degradação da PCL no meio aquoso é bem lenta devido à hidrofobicidade e à cristalinidade da matriz polimérica (CHAWLA & AMIJI, 2002; SINHA *et al.*, 2004), a liberação da ZnPc das nanopartículas preparadas tanto pelo MDS como pelo MEES provavelmente não ocorreu por erosão do polímero.

A ocorrência de efeito “burst” parece estar relacionada com a forma como o fármaco se encontra disperso nas partículas e não com o método de encapsulação utilizado. Verger *et al.* (1998) prepararam nanopartículas de PCL contendo isradipina pelo MDS e também observaram uma liberação sustentada, com aproximadamente 50% do fármaco liberado em 24 h, mas sem efeito “burst”. Chawla & Amiji (2002), entretanto, preparam nanopartículas de PCL contendo tamoxifeno pelo MDS cujo perfil de liberação foi caracterizado por efeito “burst” inicial e

liberação total do fármaco encapsulado após 24 h de análise. Lamprecht *et al.* (2001), por sua vez, encapsularam rolipram em nanopartículas de PCL pelo MEES e obtiveram uma liberação com efeito “burst” inicial significativo, responsável pela liberação de quase todo o fármaco encapsulado nos primeiros 30 minutos da liberação, o que foi atribuído à baixa eficiência de encapsulação obtida no processo.

De qualquer forma, observou-se que o perfil de liberação é característico de cada sistema e varia de acordo com o fármaco e o polímero utilizado, e até mesmo com as condições de preparo empregadas. Neste trabalho, a utilização de dois métodos de preparo diferentes pode ser a justificativa para perfis de liberação diferentes, já que métodos diferentes formariam nanopartículas com estruturas matriciais poliméricas distintas.

Existem algumas teorias e modelos matemáticos que descrevem a cinética de liberação do fármaco de sua forma farmacêutica. Os modelos de liberação mais aplicados e que melhor descrevem o fenômeno de liberação de fármacos são, em geral, os modelos de Higuchi, de cinética de ordem zero, de Weibull e de Korsmeyer-Peppas (COSTA & LOBO, 2001).

A cinética de ordem zero é aplicada a formas farmacêuticas que não sofrem desagregação e liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo; trata-se de um método ideal de liberação de fármaco para atingir uma ação farmacológica prolongada, já que a liberação é lenta (COSTA & LOBO, 2001). Este modelo pode ser representado pela equação a seguir:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t,$$

onde:

Q_t = quantidade de fármaco liberado no tempo t ;

Q_0 = quantidade inicial do fármaco na solução;

K_0 = constante cinética.

A cinética de primeira ordem, por sua vez, é característica de formas farmacêuticas cuja liberação do fármaco é proporcional à quantidade de fármaco que permanece no seu interior, de modo que a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui com o passar do tempo (COSTA & LOBO, 2001). A equação que representa esse modelo é a seguinte:

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_t t,$$

onde:

Q_t = quantidade de fármaco liberado no tempo t ;

Q_0 = quantidade inicial do fármaco na solução;

K_t = constante de liberação de primeira ordem.

Higuchi desenvolveu alguns modelos teóricos para estudar a liberação de fármacos hidrossolúveis e pouco solúveis em matrizes semi-sólidas e sólidas e descreveu a liberação de um fármaco como um processo de difusão baseado na Lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo (COSTA & LOBO, 2001). O modelo de Higuchi é resumido pela seguinte equação:

$$Q_t = K_H + \sqrt{t},$$

onde:

Q_t = quantidade de fármaco liberado no tempo t ;

K_H = constante de liberação de Higuchi.

Os modelos de cinética de ordem zero, de Higuchi (pseudo ordem zero) e de primeira ordem foram aplicados nos perfis de liberação apresentados a fim de obter o modelo mais indicado para cada perfil realizado. A escolha do melhor modelo foi feita a partir do coeficiente

de correlação linear (r) obtido em cada análise da regressão linear. Os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Estudo da cinética de liberação da ZnPc a partir das nanopartículas obtidas pelo MDS e pelo MEES.

	<u>Ordem zero</u> % liberada x tempo (horas)	<u>Pseudo ordem zero</u> % liberada x tempo ^{1/2} (horas)	<u>Primeira ordem</u> log % liberada x tempo (horas)
MDS	R ² = 0,645 r = 0,803	R ² = 0,731 r = 0,855	R ² = 0,65 r = 0,806
MEES	R ² = 0,930 r = 0,965	R ² = 0,979 r = 0,989	R ² = 0,801 r = 0,895

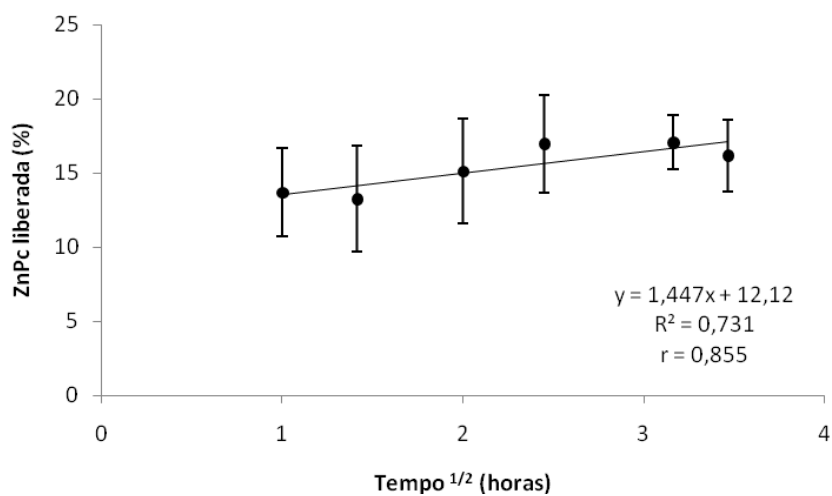
MDS: Método de Difusão do Solvente; MEES: Método de Emulsão e Evaporação do Solvente; log: logaritmo; R²: coeficiente de determinação; r: coeficiente de correlação linear.

Após a aplicação dos modelos matemáticos e a determinação dos valores de coeficiente de correlação linear (r), o modelo de pseudo ordem zero (Higuchi) foi o que apresentou os maiores coeficientes de correlação linear e, com isso, foi o modelo que melhor se ajustou aos perfis de liberação das nanopartículas preparadas tanto pelo MDS ($r = 0,855$) quanto pelo MEES ($r = 0,989$).

O modelo de Higuchi é um indicativo de que a liberação do fármaco ocorreu por um mecanismo de difusão. Embora os perfis de liberação das nanopartículas preparadas pelo MDS e pelo MEES tenham apresentado comportamentos diferentes, a cinética de liberação parece ter sido a mesma; a difusão deve ter sido o principal mecanismo responsável pela liberação da ZnPc das nanopartículas obtidas pelos dois métodos.

As cinéticas de liberação da ZnPc encapsulada nas nanopartículas obtidas pelo MDS e pelo MEES, segundo o modelo de Higuchi, estão apresentadas na Figura 25.

a) MDS



b) MEES

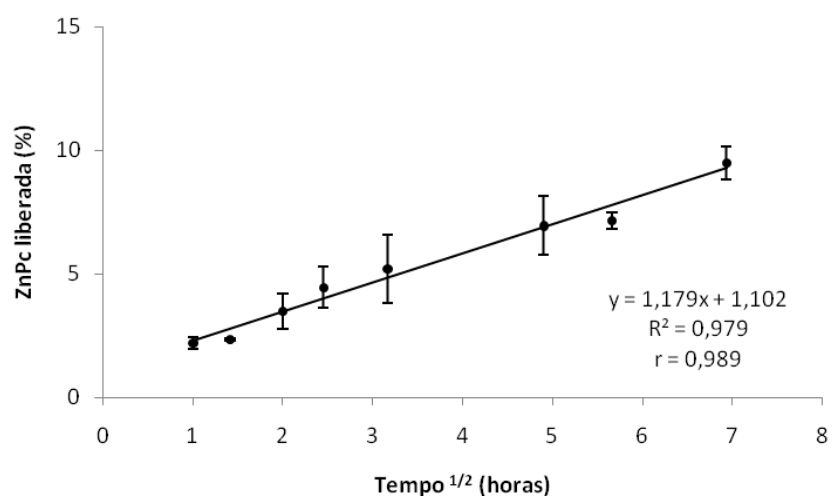


Figura 25. Cinética de liberação da ZnPc encapsulada em nanopartículas preparadas pelo MDS (a) e pelo MEES (b), segundo o modelo de Higuchi.

O estudo do perfil de liberação da ZnPc foi útil pois mostrou que a terapia fotodinâmica poderá ser aplicada no tumor após administração e acúmulo das nanopartículas no local, já que foi observado que ocorre a liberação da ZnPc dos sistemas de liberação desenvolvidos.

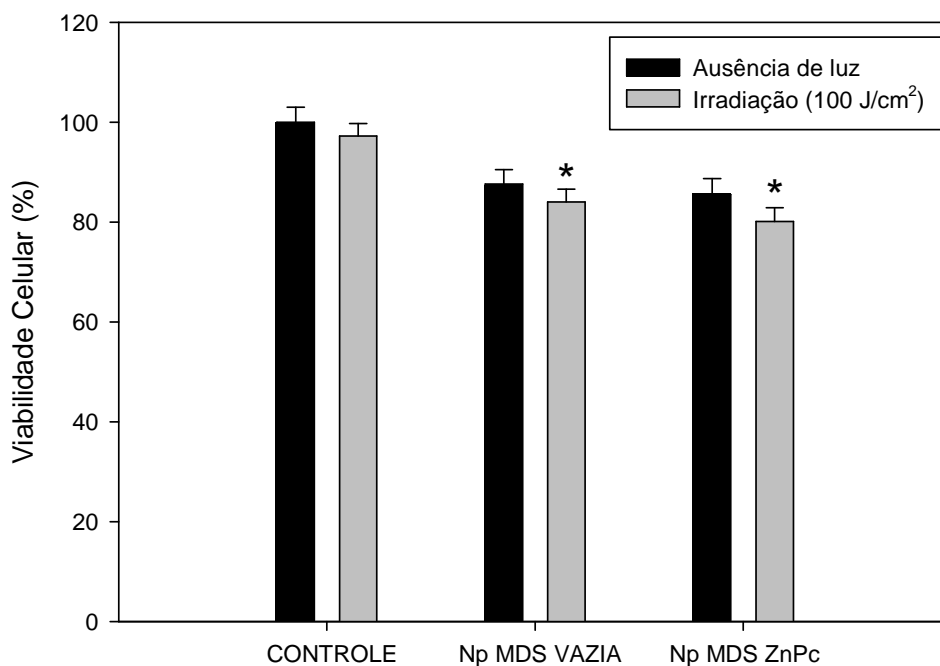
5.8 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DA FOTOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS EM CULTURA DE CÉLULAS

O ensaio de toxicidade foi realizado na ausência de luz e teve o objetivo de avaliar a toxicidade do sistema de liberação em células A549 mantidas em cultura. O ensaio de fototoxicidade, por sua vez, avaliou o efeito da luz e do fármaco (ativo apenas na presença de luz) liberado das nanopartículas na cultura celular.

A avaliação da toxicidade e da fototoxicidade dos sistemas foram realizadas pelo método MTT, que determina a viabilidade celular por meio da análise da atividade mitocondrial. A viabilidade celular (%) de todos os grupos analisados foi comparada a do grupo controle (células incubadas na ausência de luz).

Foram realizados quatro ensaios independentes feitos em sextuplicata para cada situação experimental e a significância dos resultados ($p < 0,05$) foi avaliada pelo teste ANOVA. Os estudos foram feitos com nanopartículas obtidas pelo MDS e pelo MEES e os resultados estão apresentados na Figura 26.

a) MDS



b) MEES

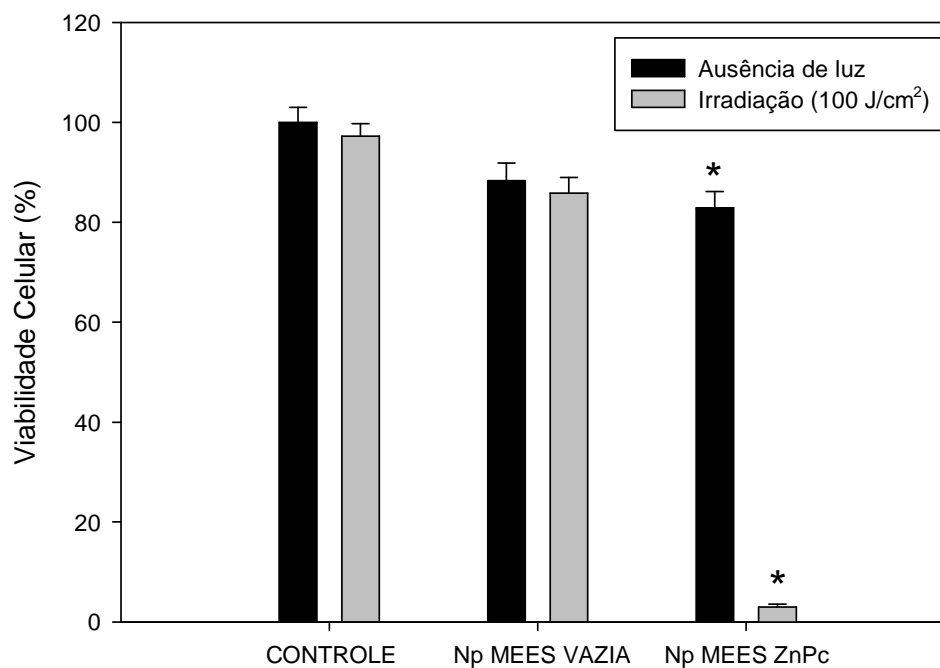


Figura 26. Estudos de toxicidade (ausência de luz) e de fototoxicidade (irradiação de luz – 100 J/cm²) em cultura de células A549 das nanopartículas (Nps) de PCL preparadas pelo MDS (a) e pelo MEES (b). Média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes feitos em sextuplicata. *Significativamente menor do que o controle na ausência de luz ($p < 0,05$ ANOVA).

No ensaio de toxicidade, as nanopartículas de PCL vazias obtidas pelo MDS e pelo MEES reduziram a viabilidade celular em apenas 12,4% e 11,7%, respectivamente. Esse efeito citotóxico não foi estatisticamente significativo em relação ao controle ($p > 0,05$), confirmando a baixa toxicidade desse sistema de liberação e a biocompatibilidade do polímero utilizado. As nanopartículas contendo ZnPc obtidas pelo MDS e pelo MEES reduziram a viabilidade celular em 14,5% ($p > 0,05$) e 17,1% ($p < 0,05$), respectivamente. O pequeno aumento na toxicidade dessas nanopartículas em relação às nanopartículas vazias ($p > 0,05$) pode ser atribuída à presença do fotossensibilizante, que apresenta baixa toxicidade na ausência de luz, mas pode causar a inativação de uma parte das células.

Esses resultados estão de acordo com resultados já descritos na literatura. Konan *et al.* (2003a) analisaram a toxicidade e a fototoxicidade de nanopartículas vazias ou contendo porfirina meso-tetra(4-hidroxifenil) encapsulada após a incubação em cultura de células EMT-6 (células tumorais mamárias de camundongos) e não observaram citotoxicidade significativa no escuro em nenhuma das condições analisadas. O mesmo resultado foi descrito por Zeisser-Labouèbe *et al.* (2006), que incubaram células NuTu-19 (câncer ovariano de ratos) com nanopartículas de PLA ou de PLGA vazias ou com hipericina. Da Silva *et al.* (2009) analisaram a atividade fotodinâmica de nanopartículas contendo um derivado porfirínico em células de tumor de próstata humano e também verificaram um pequeno aumento na citotoxicidade relacionado à baixa toxicidade que os fotossensibilizantes podem apresentar após a incubação no escuro.

A ausência de efeito citotóxico significativo após a incubação com nanopartículas de PCL vazias é consistente com a biocompatibilidade e segurança dos polímeros comumente utilizados na preparação de nanopartículas (PCL, PLA e PLGA) (KONAN *et al.*, 2003; ZEISSER-LABOUÈBE *et al.*, 2006).

No ensaio de fototoxicidade, observou-se, inicialmente, que a luz isoladamente não foi capaz de induzir efeito citotóxico sobre a cultura de células ($p > 0,05$), uma vez que a viabilidade celular foi reduzida em apenas 2,8% após a irradiação das células com dose de 100 J/cm².

Kolárová *et al.* (2003) irradiaram células de melanoma humano (G361) com luz visível e observaram que a viabilidade das células permanecia acima de 90% após irradiação de luz em doses de 0,5 à 150 J/cm². As nanopartículas de PCL vazias também apresentaram baixa toxicidade na presença de luz e não houve diferença significativa na viabilidade celular das nanopartículas de PCL vazias obtidas por ambos os métodos entre os ensaios de toxicidade e de fototoxicidade ($p > 0,05$). Por outro lado, as nanopartículas de PCL contendo ZnPc obtidas pelo MDS e pelo MEES induziram efeito citotóxico nas células A549 após a irradiação de luz. Houve uma redução significativa de 19,9% da viabilidade celular no caso das nanopartículas contendo ZnPc obtidas pelo MDS ($p < 0,05$) e de 97,0% no caso das nanopartículas contendo ZnPc obtidas pelo MEES ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados de redução da viabilidade celular obtidos para as nanopartículas vazias (16,0%) e com ZnPc (19,9%) obtidas pelo MDS ($p > 0,05$), o que indica que o pequeno efeito citotóxico obtido não pode ser necessariamente atribuído à atividade fototóxica do fotossensibilizante liberado. Tal efeito pode ser atribuído à toxicidade das nanopartículas de PCL que na presença de ZnPc e com a irradiação de luz provocou um decréscimo na viabilidade celular. Esse mesmo comportamento não foi observado no estudo de fototoxicidade das nanopartículas obtidas pelo MEES, que reduziram a viabilidade das células em 14,2% quando estas estiveram em contato com as nanopartículas vazias e em 97% quando em contato com as nanopartículas contendo ZnPc ($p < 0,05$). Diante desses resultados, é evidente que as nanopartículas contendo ZnPc obtidas pelo MEES apresentaram um efeito citotóxico significativamente maior do que as obtidas pelo MDS ($p < 0,05$), conforme verificado pelo ensaio de fototoxicidade.

Os estudos de toxicidade e de fototoxicidade foram importantes para confirmar que a toxicidade das partículas vazias e contendo a ZnPc não é significativa no escuro e que a fototoxicidade das nanopartículas vazias também é insignificante, de modo que a ZnPc liberada das nanopartículas preparadas pelo MEES para as células induziu a morte celular após a TFD.

A localização do fotossensibilizante nas células tumorais influencia, de alguma maneira, a atividade fotodinâmica (RÜCK *et al.*, 1996). O caminho pelo qual o fotossensibilizante será interiorizado pelas células tumorais será definido pelas suas características, como propriedades químicas, tamanho, carga elétrica e caráter hidrofílico-lipofílico. Além disso, a distribuição celular é determinada pelo mecanismo de internalização celular, que pode ser influenciado pela composição do meio e pelo tipo de sistemas carreadores utilizados para a liberação do fotossensibilizante nas células (RÜCK *et al.*, 1996; KONAN *et al.*, 2003b). Diversos estudos já mostraram os efeitos da utilização de sistemas carreadores, contendo fotossensibilizantes, na viabilidade de algumas linhagens celulares. Por exemplo, houve significativa redução de 90% da viabilidade de células da linhagem NHIK 3025 no estudo de fototoxicidade com ZnPc encapsulada em lipossomos (RODAL *et al.*, 1998). Outro estudo apontou uma redução de 30% na viabilidade de células neoplásicas P388-D1 decorrente da incubação das células com nanopartículas de PLGA contendo ZnPc (5 μM de ZnPc) preparadas pelo MEES e irradiação de luz ($\lambda = 675 \text{ nm}$) na dose de $30 \text{ J}/\text{cm}^2$ (RICCI JÚNIOR & MARCHETTI, 2006b). Da Silva *et al.* (2009) também mostraram que a encapsulação de um derivado porfirínico era mais eficiente do que o mesmo livre para causar a morte de células tumorais, uma vez que a nanoencapsulação ajudaria a diminuir a agregação do fotossensibilizante, favorecendo o estado monomérico, que é mais fotoativo. Então, para melhorar a eficácia da atividade fotodinâmica do fotossensibilizante, é importante entender também como esses compostos são internalizados para as células tumorais. No entanto, devido às variações nas respostas dos estudos, por causa dos diferentes fotossensibilizantes, linhagens de células e parâmetros da TFD utilizados, é extremamente difícil antecipar o comportamento de cada composto sensibilizante (KONAN *et al.*, 2003b).

As características físico-químicas dos sistemas nanoparticulados, como o tamanho e a carga superficial, são capazes de afetar a estabilidade física e de influenciar significativamente a interação das nanopartículas com o meio biológico após administração *in vivo*, assim como a taxa de liberação do fármaco encapsulado e a interação com as células (MAAßEN *et al.*, 1993 *apud*

FONSECA, SIMÕES & GASPAR, 2002). Diversos autores já relataram a influência das características físico-químicas das nanopartículas na interação com as células. A diferença significativa observada na viabilidade celular após incubação com as nanopartículas contendo ZnPc preparadas pelo MDS e pelo MEES no estudo de fototoxicidade realizado deve-se, provavelmente, às diferentes características desses dois sistemas.

O estudo de caracterização das nanopartículas mostrou que as mesmas apresentaram tamanho e potencial zeta distintos: as nanopartículas contendo ZnPc obtidas pelo MDS apresentaram diâmetro médio de $332,8 \pm 7,7$ nm e potencial zeta de $-25,03 \pm 2,79$ mV, enquanto as obtidas pelo MEES, apresentaram tamanho de $225,9 \pm 4,1$ nm e potencial zeta de $-4,85 \pm 1,54$ mV. E, de acordo com os resultados obtidos no estudo de fototoxicidade, em que as nanopartículas preparadas pelo MEES reduziram a viabilidade celular para 3%, as nanopartículas de menor tamanho e potencial zeta menos negativo apresentaram as características possivelmente mais favoráveis para a interiorização pela célula e para a posterior atividade fotodinâmica do fármaco.

A relação entre nanopartículas pequenas e a melhor internalização nas células já foi citada na literatura. Segundo Win & Feng (2005), o tamanho das partículas tem papel importante na sua adesão e interação com as células. Células tumorais, que exibem atividade endocitótica exacerbada, podem internalizar nanopartículas pequenas mais rapidamente, permitindo que o fármaco seja liberado no interior das células e que haja um aumento da concentração do fármaco no sítio de ação (KONAN-KOUAKOU *et al.*, 2005). Konan-Kouakou *et al.* (2005) observaram que nanopartículas de diâmetro de 167 nm apresentaram maior eficiência fototóxica (69%) do que as nanopartículas de 370 nm (29%), ambas contendo a mesma concentração de verteporfina. Provavelmente, a maior redução na viabilidade celular obtidas para o ensaio de fototoxicidade com as nanopartículas preparadas pelo MEES seja resultado da liberação eficaz do fármaco nas células tumorais, já que as nanopartículas menores parecem ter maior internalização intracelular do que as de tamanho maior. Por outro lado, a quantidade de nanopartículas obtidas pelo MDS

internalizadas nas células não deve ter sido a mesma das preparadas pelo MEES; o fotossensibilizante pode ter sido liberado no meio de cultura, que foi substituído por novo meio antes da irradiação e, com isso, não houve ativação significativa da ZnPc dentro das células.

A carga da superfície das nanopartículas é outro parâmetro importante no processo de internalização celular (ALBEROLA & RÄDLER, 2009) e obter informação sobre quais grupos funcionais da superfície do carreador de fármacos apresenta interação com a célula maligna é essencial para o sucesso desses sistemas (MCNAMEE, PYO & HIGASHITANI, 2006). McNamee, Pyo & Higashitani (2006) testaram o efeito da carga e da hidrofobicidade em um sistema de liberação de fármacos em relação à sua especificidade para células do tipo melanoma B16F10 e descobriram que superfícies carregadas negativamente e superfícies hidrofóbicas modificadas tiveram baixa força de adesão, enquanto que a partícula que foi modificada para ter carga positiva mostrou elevada força de adesão e maior afinidade pela célula. Win & Feng (2005) observaram que cobrir a superfície das nanopartículas com materiais bioadesivos como PVA e PEG pode aumentar a bioadesão e a absorção nas células intestinais: as nanopartículas de PLGA cobertas com PVA aumentaram a interiorização em 2,9 vezes em relação às nanopartículas de poliestireno de mesmo tamanho, indicando que o material polimérico também contribui para a eficiência da interiorização celular. Dessa forma, o potencial zeta menos negativo das nanopartículas preparadas pelo MEES parece também ter contribuído para a maior internalização dessas nanopartículas, aumentando a eficácia fototóxica desse sistema em relação às nanopartículas obtidas pelo MDS. Além disso, no preparo das nanopartículas pelo MEES, utilizou-se o PVA e, embora tenha sido feita a etapa de purificação das amostras para a sua remoção, um resíduo mínimo pode permanecer na superfície das partículas. Portanto, a presença do PVA nas nanopartículas obtidas pelo MEES também pode ter contribuído para aumentar a bioadesão dessas partículas.

O uso de sistemas de liberação de fármacos tem sido largamente proposto sem o conhecimento de sua afinidade pela superfície das células malignas (MCNAMEE, PYO &

HIGASHITANI, 2006), mas considerando-se as aplicações clínicas potenciais desses sistemas de liberação nanoestruturados para a terapia fotodinâmica, um melhor entendimento das interações biológicas e o mecanismo de TFD é de extrema importância (KONAN *et al.*, 2003a). Nesse caso, o estudo de fototoxicidade mostrou não só a eficiência fotodinâmica das nanopartículas de PCL contendo ZnPc obtidas pelo MEES, mas também a relevância das características do sistema na sua interação com as células.

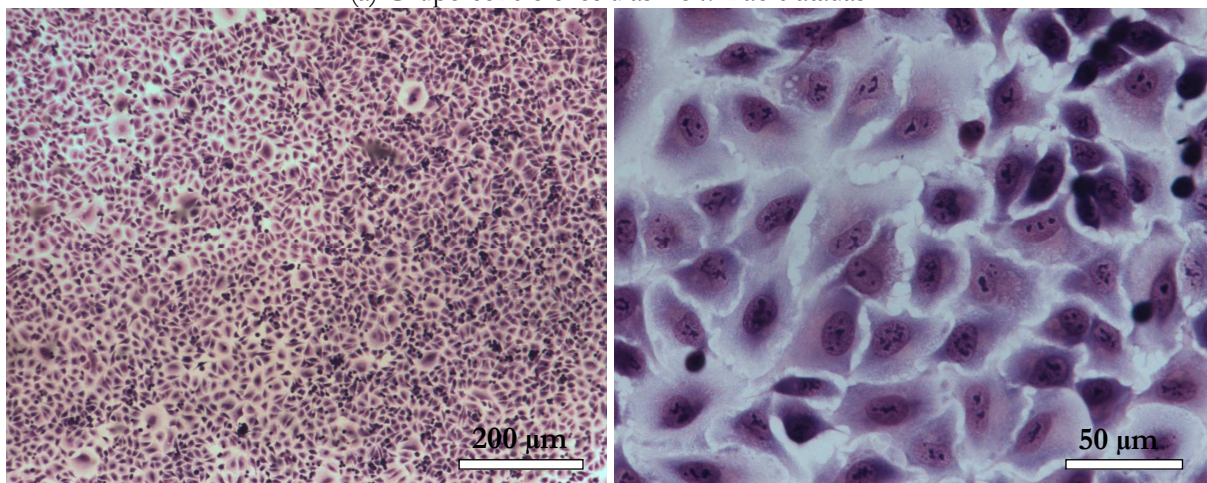
5.9 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA LINHAGEM CELULAR A549

As fotomicrografias das células estão apresentadas na Figura 27. O estudo de avaliação morfológica foi feito pela análise das morfologias de células não tratadas e de células que haviam sido incubadas com nanopartículas contendo ZnPc obtidas pelo MEES na ausência de luz e após irradiação de luz.

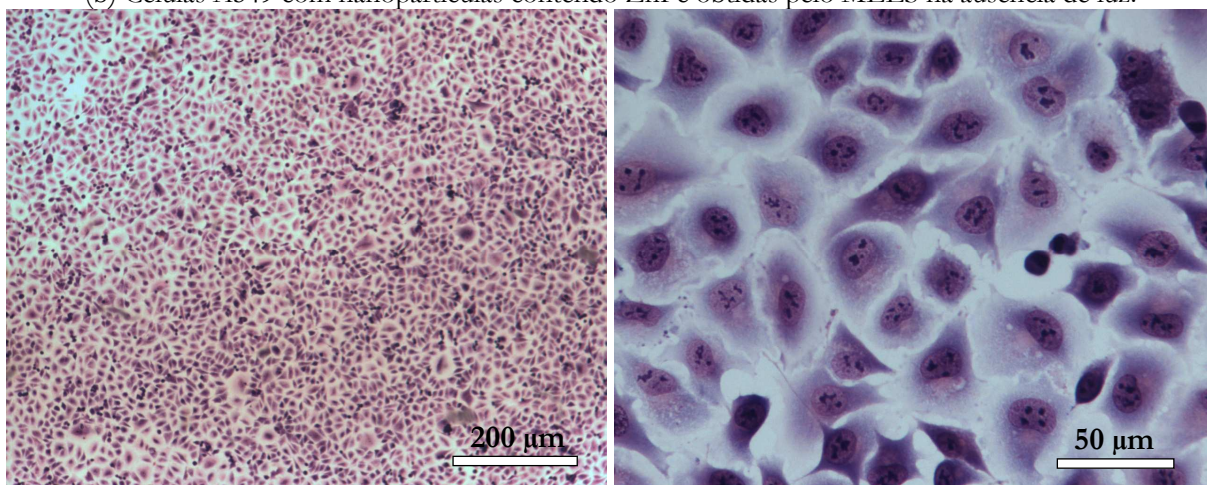
As células A549 incubadas com as nanopartículas contendo ZnPc e irradiadas com luz apresentaram modificações morfológicas significativas quando comparadas com as células controle e com as células que tiveram contato com as nanopartículas na ausência de luz. As principais alterações morfológicas induzidas pela ação fotodinâmica da ZnPc liberada das nanopartículas na linhagem A549 incluíram: condensação citoplasmática, com redução significativa do volume celular; rarefação da matriz citoplasmática, extensa lise celular e perda dos prolongamentos da membrana plasmática (Figura 27c).

No entanto, não foram observadas modificações na morfologia das células que foram incubadas com as nanopartículas na ausência de luz, indicando que a presença do sistema nanoparticulado não causou danos nas células e que o fotossensibilizante, sem a irradiação de luz, também não foi capaz de causar alterações nas células (Figura 27b).

(a) Grupo controle: células A549 não tratadas.



(b) Células A549 com nanopartículas contendo ZnPc obtidas pelo MEES na ausência de luz.



(c) Células A549 com nanopartículas contendo ZnPc obtidas pelo MEES após irradiação de luz.

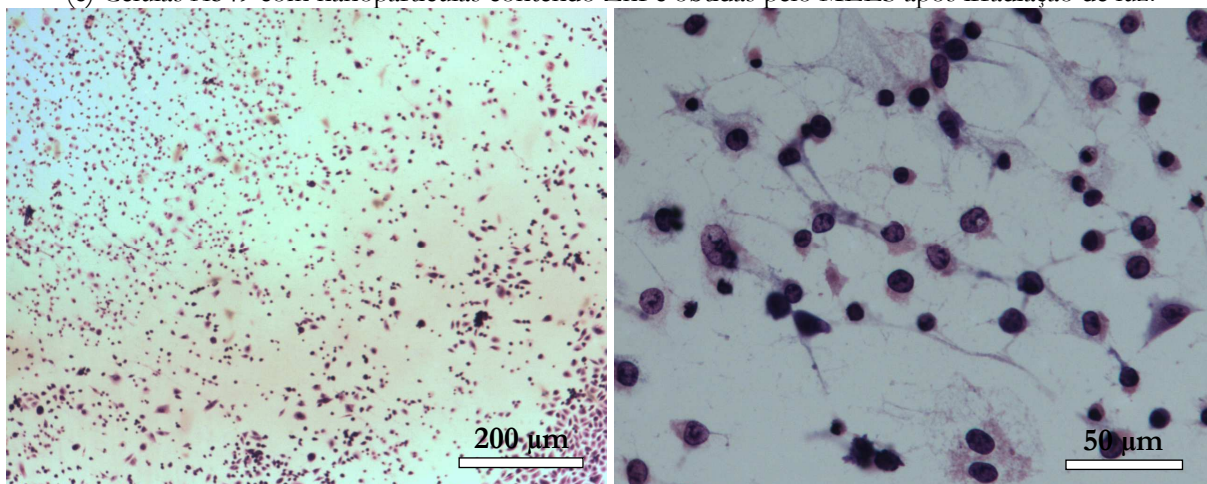


Figura 27. Microscopias de luz de células A549 do grupo controle (a), incubadas com nanopartículas contendo ZnPc obtidas pelo MEES na ausência de luz (b) e após irradiação com luz (100 J/cm^2) (c). As células foram coradas com Giemsa e observadas nos aumentos de 5X (escala: $200 \mu\text{m}$) e 40X (escala: $50 \mu\text{m}$).

A TFD pode mediar diversos eventos de sinalização nas células, mas o seu principal objetivo é induzir a morte celular. A morte direta das células tumorais após a TFD pode ocorrer por apoptose e/ou necrose (CASTANO, DEMIDOVA & HAMBLIN, 2005a). O balanço entre apoptose e necrose após a TFD *in vitro* depende de diversos parâmetros, como a dose de luz, a concentração do fotossensibilizante e a localização intracelular do mesmo, a concentração de oxigênio e o tipo de célula (CASTANO, MROZ & HAMBLIN, 2006).

A apoptose é considerada a morte celular programada e se caracteriza por alterações morfológicas, como a redução do volume celular, o aparecimento de bolhas na superfície, também denominadas de *blebs* (CASTANO, DEMIDOVA & HAMBLIN, 2005a), condensação da cromatina nuclear, dentre outras alterações. A necrose, por sua vez, é uma forma violenta e rápida de degeneração celular que afeta extensivamente as células; é caracterizada pelo aparecimento de núcleo picnótico, inchaço do citoplasma, destruição das organelas e perturbação da membrana plasmática, que culminam com a fragmentação celular e a liberação dos conteúdos intracelulares (CASTANO, DEMIDOVA & HAMBLIN, 2005a).

As alterações morfológicas identificadas na linhagem A549, portanto, sugerem que a TFD da ZnPc foi capaz de induzir morte celular tanto por necrose quanto por apoptose. Entretanto, novos experimentos precisam ser feitos para a comprovação destes dados, com uso de técnicas mais precisas, como citometria de fluxo, eletroforese de DNA em gel de agarose, entre outras.

6 CONCLUSÃO

O MDS pode ser utilizado para a encapsulação de ZnPc em nanopartículas de PCL porque apresentou alto rendimento e boa eficiência de encapsulação. O MEES pode ser utilizado para a encapsulação de ZnPc em nanopartículas de PCL porque embora tenha apresentado um rendimento baixo, apresentou boa eficiência de encapsulação.

As nanopartículas obtidas pelo MDS e pelo MEES apresentam tamanho nanométrico, forma esférica e superfície lisa e regular, que viabilizam a sua administração endovenosa. As nanopartículas obtidas pelo MDS apresentaram tamanhos maiores do que as obtidas pelo MEES.

As nanopartículas apresentaram potencial zeta negativo. O potencial zeta das nanopartículas obtidas pelo MEES foi menos negativo do que o das preparadas pelo MDS.

O método utilizado para a quantificação de ZnPc por emissão de fluorescência foi adequado e apresentou excelente linearidade, boa precisão e exatidão.

A ZnPc manteve suas propriedades de absorção no UV-vis e de emissão de fluorescência inalteradas após o processo de encapsulação em nanopartículas e, portanto, a encapsulação manteve o fotossensibilizante na forma ativa.

As análises de DSC e de difração de raios X demonstraram que possivelmente houve uma interação entre a ZnPc amorfa e a PCL semicristalina após a encapsulação nas nanopartículas.

Os estudos de liberação *in vitro* mostraram que o perfil de liberação da ZnPc foi rápido quando a encapsulação foi obtida pelo MDS e sustentado e lento quando a ZnPc foi encapsulada em nanopartículas obtidas pelo MEES.

O estudo de fototoxicidade mostrou que a ZnPc liberada das nanopartículas de PCL obtidas pelo MEES é capaz de reduzir em 97% a viabilidade de células neoplásicas da linhagem A549 após exposição à luz.

A avaliação morfológica da linhagem celular A549 após a ação fotodinâmica da ZnPc liberada das nanopartículas de PCL preparadas pelo MEES mostrou alterações morfológicas que sugerem morte celular por necrose e apoptose.

As nanopartículas de PCL contendo ZnPc obtidas pelo MEES, portanto, constituem um sistema de liberação promissor para uso na terapia fotodinâmica do câncer, pois permitem a veiculação do fotossensibilizante por via endovenosa, liberam o fármaco de modo sustentado e apresentam baixa toxicidade e alta fototoxicidade.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados do estudo de desenvolvimento, caracterização e avaliação da fototoxicidade das nanopartículas de PCL contendo ZnPc apresentados nesse trabalho motivam a continuidade desse projeto. A avaliação da estabilidade das nanopartículas e os estudos de internalização celular por microscopia confocal e de biodistribuição *in vivo* das nanopartículas contribuirão para um maior conhecimento desse sistema de liberação nanoestruturado com promissora aplicação na terapia fotodinâmica do câncer.

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. *Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, p. 1688 – 1713, 2006.
- AGNIHOTRI, S.M.; VAVIA, P.R. *Diclofenac-loaded biopolymeric nanosuspensions for ophthalmic application*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 5, p. 90 – 95, 2009.
- ALBEROLA, A.P.; RÄDLER, J.O. *The defined presentation of nanoparticles to their surface controlled uptake*. *Biomaterials*, v. 30, p. 3766 – 3770, 2009.
- ALEXIS, F.; RHEE, J.; RICHIE, J.P.; RADOVIC-MORENO, A.F.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O.C. *New frontiers in nanotechnology for cancer treatment*. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, v. 26, p. 74 – 85, 2008.
- ALLISON, R.R.; DOWNIE, G.H.; CUENCA, R.; HU, X.; CHILDS, C.J.H.; SIBATA, C.H. *Photosensitizers in clinical PDT*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 1, p. 27 – 42, 2004.
- AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. *A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability*. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 3, p. 413 – 420, 1995.
- BAGNATO, V.S.; KURACHI, C.; FERREIRA, J.; MARCASSA, L.G.; SIBATA, C.H.; ALLISON, R.R. *PDT experience in Brazil: A regional profile*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, p. 107 – 118, 2005.
- BALL, D.J.; WOOD, S.R.; VERNON, D.I.; GRIFFITHS, J.; DUBBELMAN, T.M.A.R.; BROWN, S.B. *The characterization of three substituted zinc phthalocyanines of different charge for use in photodynamic therapy. A comparative study of their aggregation and photosensitizing ability in relation to mTHPC and polyhaematoporphyrin*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 45, p. 28 – 35, 1998.
- BARICHELLO, J.M.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. *Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 25, p. 471 – 476, 1999.
- BECHET, D.; COULEAUD, P.; FROCHOT, C.; VIRIOT, M.; GUILLEMIN, F.; BARBERI-HEYOB, M. *Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents*. *Trends in Biotechnology*, v. 26, p. 612 – 621, 2008.

- BIRNBAUM, D.T.; KOSMALA, J.D.; HENTHORN, D.B.; BRANNON-PEPPAS, L. *Controlled release of β -estradiol from PLAGA microparticles: The effect of organic phase solvent on encapsulation and release*. Journal of Controlled Release, v. 65, p. 375 – 387, 2000.
- BLOUZA, I.L.; CHARCOSSET, C.; SFAR, S.; FESSI, H. *Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for pediatric use*. International Journal of Pharmaceutics, v. 325, p. 124 – 131, 2006.
- BOOTZ, A.; VOGEL, V.; SCHUBERT, D.; KREUTER, J. *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.
- BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J.O. *Nanoparticles and targeted systems for cancer therapy*. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 56, p. 1649 – 1659, 2004.
- BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br>>. Acesso em: Nov. 2008.
- BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis*. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 54, p. 631 – 651, 2002.
- BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. *Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy*. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1776, p. 86 – 107, 2007.
- CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. *Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 2, p. 1 – 23, 2005a.
- CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. *Mechanisms in photodynamic therapy: Part three – Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 2, p. 91 – 106, 2005b.
- CASTANO, A.P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M.R. *Photodynamic therapy and anti-tumor immunity*. Nature Reviews, v. 6, p. 535 – 545, 2006.
- CAUSON, R. *Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and Discussion*. Journal of Chromatography B, v. 689, p. 175 – 180, 1997.

CHACÓN, M.; MOLPECERES, L.B.; GUZMÁN, M.; ABERTURAS, M.R. *Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 8, p. 99 – 107, 1999.

CHATTERJEE, D.K.; FONG, L.S.; ZHANG, Y. *Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm*. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 60, p. 1627 – 1637, 2008.

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

CORDEIRO, M.R.; MOREIRA, W.C. *Thermal behavior of tetrapyrrole derivatives and their mixed complexes*. Thermochimica Acta, v. 486, p. 52 – 56, 2009.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. *Modeling and comparison of dissolution profiles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 13, p. 123 – 133, 2001.

DA SILVA, A.R.; INADA, N.M.; RETTORI, D.; BARATTI, M.O.; VERCESI, A.E.; JORGE, R.A. *In vitro photodynamic activity of chloro(5,10,15,20-tetraphenylporphyrinato)indium(III) loaded-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles in LNCaP prostate tumour cells*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 94, p. 101 – 112, 2009.

DANIELL, M.D.; HILL, J.S. *A History of Photodynamic Therapy*. Australian and New Zealand Journal of Surgery, v. 61, p. 340 – 348, 1991.

DEDA, D.K.; UCHOA, A.F.; CARITÁ, E.; BAPTISTA, M.S.; TOMA, H.E.; ARAKI, K. *A new micro/nanoencapsulated porphyrin formulation for PDT treatment*. International Journal of Pharmaceutics, v. 376, p. 76 – 83, 2009.

DOLMANS, D.E.J.G.J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. *Photodynamic Therapy for Cancer*. Nature Reviews Cancer, v. 3, p. 380 – 387, 2003.

ESPUELAS, M.S.; LEGRAND, P.; IRACHE, J.M.; GAMAZO, C.; ORECCHIONI, A.M.; DEVISSAGUET, J.P.; YGARTUA, P. *Poly(ε-Caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity*. International Journal of Pharmaceutics, v. 158, p. 19 – 27, 1997.

FENG, S.; HUANG, G. *Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel from nanospheres of biodegradable polymers*. Journal of Controlled Release, v. 71, p. 53 – 69, 2001.

FERRANTI, V.; MARCHAIS, H.; CHABENAT, C.; ORECCHIONI, A.M.; LAFONT, O. *Primidone-loaded poly-ε-caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profiles*. International Journal of Pharmaceutics, v. 193, p. 107 – 111, 1999.

FONSECA, C.; SIMÕES, S.; GASPAR, R. *Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity*. Journal of Controlled Release, v. 83, p. 273 – 286, 2002.

FRANKS, F. *Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 45, p. 221 – 229, 1998.

GARAY-JIMENEZ, J.C.; YOUNG, A.; GERGERES, D.; GREENHALGH, K.; TUROS, E. *Methods for purifying and detoxifying sodium dodecyl sulfate-stabilized polyacrylate nanoparticles*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, v. 4, p. 98 – 105, 2008.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. *Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 69, p. 1 – 9, 2008.

GOVENDER, T.; STOLNIK, S. GARNETT, M.C.; ILLUM, L.; DAVIS, S.S. *PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug*. Journal of Controlled Release, v. 57, p. 171 – 185, 1999.

GUYOT, M.; FAWAZ, F. *Nifedipine loaded-polymeric microspheres: preparation and physical characteristics*. International Journal of Pharmaceutics, v. 175, p. 61 – 74, 1998.

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.

HATZ, S.; LAMBERT, J.D.C.; OGILBY, P.R. *Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability*. Photochemical & Photobiological Sciences, v. 6, 1106 – 1116, 2007.

HU, Y.; JIANG, X.; DING, Y.; ZHANG, L.; YANG, C.; ZHANG, J.; CHEN, J.; YANG, Y. *Preparation and drug release behaviors of nimodipine-loaded poly(caprolactone)-poly(ethylene oxide)-polylactide amphiphilic copolymer nanoparticles*. Biomaterials, v. 24, p. 2395 – 2404, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. *Registro de Câncer de Base Populacional*. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 23 jul. 2009.

JAIN, A.; JAIN, S.K. *In vitro and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 35, p. 404 – 416, 2008.

JEONG, J.C.; LEE, J.; CHO, K. *Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres*. Journal of Controlled Release, v. 92, p. 249 – 258, 2003.

JEONG, Y.; NA, H.S.; SEO, D.H.; KIM, D.G.; LEE, H.C.; JANG, M.K.; NA, S.K.; ROH, S.H.; KIM, S.I.; NAH, J.W. *Ciprofloxacin-encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity*. International Journal of Pharmaceutics, v. 352, p. 317 – 323, 2008.

JORI, G. *Tumor photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 36, p. 87 – 93, 1996.

KOLÁROVÁ, H.; MOSINGER, J.; LENOBEL, R.; KEJLOVÁ, K.; JÍROVÁ, D.; STRNAD, M. *In vitro toxicity of supramolecular sensitizers for photodynamic therapy*. Toxicology in Vitro, v. 17, p. 775 – 778, 2003.

KONAN, Y.N.; GURNY, R.; ALLÉMAN, E. *State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 66, p. 89 – 106, 2002.

KONAN, Y.N.; BERTON, M.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. *Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 18, p. 241 – 249, 2003a.

KONAN, Y.N.; CHEVALLIER, J.; GURNY, R.; ALLÉMAN, E. *Encapsulation of p-THPP into Nanoparticles: Cellular uptake, Subcellular Localization and Effect of Serum on Photodynamic Activity*. Photochemistry and Photobiology, v. 77, p. 638 – 644, 2003b.

KONAN-KOUAKOU, Y.N.; BOCH, R.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. *In vitro and in vivo activities of verteporfin-loaded nanoparticles*. Journal of Controlled Release, v. 103, p. 83 – 91, 2005.

KOPPEL, D.E. *Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants*. The Journal of Chemical Physics, v. 57, p. 4814 – 420, 1972.

LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; YAMAMOTO, H.; SCHÄFER, U.; TAKEUCHI, H.; LEHR, C.M.; MAINCENT, P.; KAWASHIMA, Y. *Design of rolipram-loaded nanoparticles: comparison of two preparation methods*. Journal of Controlled Release, v. 71, p. 297 – 306, 2001.

LIEBER, M. *et al.* *A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells.* International Journal of Cancer, v. 17, p. 62 – 70, 1976.

MCNAMEE, C.E.; PYO, N.; HIGASHITANI, K. *Atomic Force Microscopy Study of the Specific Adhesion between a Colloid Particle and a Living Melanoma Cell: Effect of the Charge and the Hydrophobicity of the Particle Surface.* Biophysical Journal, v. 91, p. 1960 – 1969, 2006.

MILLER, J.D.; BARON, E.D.; SCULL, H.; HSIA, A.; BERLIN, J.C.; McCORMICK, T.; COLUSSI, V.; KENNEY, M.E.; COOPER, K.D.; OLEINICK, N.L. *Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: The case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies.* Toxicology and Applied Pharmacology, v. 224, p. 290 – 299, 2007.

MOSMANN, T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.* Journal of Immunological Methods, v. 65, p. 55 – 63, 1983.

NAGARWAL, R.C.; KANT, S.; SINGH, P.N.; MAITI, P.; PANDIT, J.K. *Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery.* Journal of Controlled Release, v. 36, p. 2 – 13, 2009.

NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. *Biodegradable polymers as biomaterials.* Progress in Polymer Science, v. 32, p. 762 – 798, 2007.

NUNES, S.M.T.; SGUILLA, F.S.; TEDESCO, A.C. *Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives.* Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 37, p. 273 – 284, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Câncer.* Disponível em:
<<http://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em: Nov. 2007.

OURIQUE, A.F.; POHLMAN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. *Tretinoin-loaded naocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study.* International Journal of Pharmaceutics, v. 352, p. 1 – 4, 2008.

PARK, J.H.; LEE, S.; KIM, J.; PARK, K.; KIM, K.; KWON, I.C. *Polymeric nanomedicine for cancer therapy.* Progress in Polymer Science, v. 33, p. 113 – 137, 2008.

PÉREZ, M.H.; ZINUTTI, C.; LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; ASTIER, A.; HOFFMAN, M.; BODMEIER, R.; MAINCENT, P. *The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug.* Journal of Controlled Release, v. 65, p. 429 – 438, 2000.

PIÑON-SEGUNDO, E.; GANEM-QUINTANAR, A.; ALONSO-PÉREZ, V.; QUINTANAR-GUERRERO, D. *Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment*. International Journal of Pharmaceutics, v. 294, p. 217 – 232, 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. *Quimioterapia do Câncer*. In: Farmacologia. 5a Edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, cap. 50, p. 789 – 809.

REIS, C.P.; NEUFELD, R.J.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F. *Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. v. 2, p. 8 – 21, 2006.

RICCI JÚNIOR, E.; MARCHETTI, J.M. *Preparation, characterization, photocytotoxicity assay of PLGA nanoparticles containing zinc(II)phthalocyanine for photodynamic therapy use*. Journal of Microencapsulation, v. 23, p. 523 – 538, 2006a.

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

RODAL, G.H.; RODAL, S.H.; MOAN, J.; BERG, K. *Liposome-bound Zn(II)-phthalocyanine. Mechanisms for cellular uptake and photosensitization*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 45, p. 150 – 159, 1998.

RÜCK, A.; BECK, G.; BACHOR, R.; AKGÜN, N.; GSCHWEND, M.H.; STEINER, R. *Dynamic fluorescence changes during photodynamic therapy in vivo and in vitro of hydrophilic Al(III)phthalocyanine tetrasulphonate and lipophilic Zn(II)phthalocyanine administered in liposomes*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 36, p. 127 – 133, 1996.

SAEZ, A.; GUZMÁN, M.; MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M.R. *Freeze-drying of polycaprolactone and poly(d,l-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 50, p. 379 – 387, 2000.

SAVOLAINEN, J.S.; VAN DER LINDEN, D.; DIJKHUIZEN, N.; HEREK, J.L. *Characterizing the functional dynamics of zinc phthalocyanine from femtoseconds to nanoseconds*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, v. 196, p. 99 – 105, 2008.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. *Caracterização e Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos*. Química Nova, v. 26 (5), p. 726 – 737, 2003.

SCHUTIMAKER, J.J.; BAAS, P.; VAN LEENGOED, H.L.L.M.; VAN DER MEULEN, F.W.; STAR, W.M.; VAN ZANDWIJK, N. *Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 34, p. 3 – 12, 1996.

SHABIR, G.A. *Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization*. Journal of Chromatography A, v. 987, p. 57 – 66, 2003.

SHARMAN, W.M.; ALLEN, C.M.; VAN LIER, J.E. *Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications*. Drug Discovery Today, v. 4, p. 507 – 517, 1999.

SIBATA, C.H.; COLUSSI, V.C.; OLEINICK, N.L.; KINSELLA, T.J. *Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 33, p. 869 – 880, 2000.

SIBATA, M.N.; TEDESCO, A.C.; MARCHETTI, J.M. *Photophysicals and photochemicals studies of Zinc (II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 23, p. 131 – 138, 2004.

SILVA, A.R.; INADA, N.M.; RETTORI, D.; BARATTI, M.O.; VERCESI, A.E.; JORGE, R.A. *In vitro photodynamic activity of chloro(5,10,15,20-tetraphenylporphyrinato)indim(III) loaded-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles in LNCaP prostate tumour cells*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 94, p. 101 – 112, 2009.

SINGH, J.; PANDIT, S.; BRAMWELL, V.W.; ALPAR, H.O. *Diphtheria toxoid loaded poly-(ϵ -caprolactone) nanoparticles as mucosal vaccine delivery systems*. Methods, v. 38, p. 96 – 105, 2006.

SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. *Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview*. International Journal of Pharmaceutics, v. 278, p. 1 – 23, 2004.

SIPOS, P.; SZÜCS, M.; SZABÓ, A.; ERÖS, I.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. *An assessment of the interactions between diclofenac sodium and ammonio methacrylate copolymer using thermal analysis and Raman spectroscopy*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 46, p. 288 – 294, 2008.

SONCIN, M.; POLO, L.; REDDI, E.; JORI, G.; KENNEY, M.E.; CHENG, G.; RODGERS, M.A.J. *Effect of the delivery system on the biodistribution of Ge(IV) octabutoxy-phthalocyanines in tumour-bearing mice*. Cancer Letters, v. 89, p. 101 – 106, 1995.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E.

Biodegradable polymeric nanoparticle as delivery devices. Journal of Controlled Release, v. 70, p. 1 – 20, 2001.

STABLES, G.I.; ASH, D.V. *Photodynamic therapy.* Cancer Treatment Reviews, v. 21, p. 311 – 323, 1995.

TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLENS, H.M.; STEWART, F.A. *Photodynamic Therapy in Oncology.* The Oncologist, v. 11, p. 1034 – 1044, 2006.

ULUKAYA, E.; OZDIKICIOGLU, F.; ORAL, A.Y.; DEMIRCI, M. *The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested.* Toxicology in Vitro, v. 22, p. 232 – 239, 2008.

VEIGA, V.F.; NIMRICHTER, L.; TEIXEIRA, C.A.; MORALES, M.M.; ALVIANO, C.S.; RODRIGUES, M.L.; HOLANDINO, C. *Exposure of Human Leukemic Cells to Direct Electric Current.* Cell Biochemistry and Biophysics, v. 42, p. 61 – 74, 2005.

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

VERGER, M.L.; FLUCKIGER, L.; KIM, Y.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. *Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 46, p. 137 – 143, 1998.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer.* Cell Proliferation, v. 36, p. 131 – 139, 2003.

WAN, Y.; LU, X.; DALAI, S.; ZHANG, J. *Thermophysical properties of polycaprolactone/chitosan blend membranes.* Thermochemica Acta, v. 487, p. 33 – 38, 2009.

WIN, K.Y.; FENG, S. *Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs.* Biomaterials, v. 26, p. 2713 – 2722, 2005.

XU, R. *Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement.* Particuology, v. 6, p. 112 – 115, 2008.

YENICE, I.; MOCAN, M.C.; PALASKA, E.; BOCHOT, A.; BILENSOY, E.; VURAL, I.; IRKEÇ, M.; HINCAL, A. *Hyaluronic acid coated poly-3-caprolactone nanospheres deliver high concentrations of cyclosporine A into the cornea.* Experimental Eye Research, v. 87, p. 162 – 167, 2008.

YSLAS, E.I.; DURANTINI, E.N.; RIVAROLA, V.A. *Zinc-(II) 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine: Potential photosensitizer for use in photodynamic therapy in vitro*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 4651 – 4660, 2007.

ZEISSER-LABOUÈBE, M.; LANGE, N.; GURNY, R.; DELIE, F. *Hypericin-loaded nanoparticles for the photodynamic treatment of ovarian cancer*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 326, p. 174 – 181, 2006.

ZHANG, L.; HU, Y.; JIANG, X.; YANG, C.; LU, W.; YANG, Y.H. *Camptothecin derivative-loaded poly(ϵ -caprolactone-co-lactide)-*b*-PEG-*b*-poly(ϵ -caprolactone-co-lactide) nanoparticles and their mice biodistribution in mice*. *Journal of Controlled Release*, v. 96, p. 135 – 148, 2004.

ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. *Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 294, p. 261–267, 2005.