UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo de sistemas nanocarreadores para o ácido
5-aminolevulínico com aplicação na terapia fotodinâmica**

Natália Neto Pereira Cerize

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo de sistemas nanocarreadores para o ácido
5-aminolevulínico com aplicação na terapia fotodinâmica**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientada: Natália Neto Pereira Cerize

Orientador: Prof. Dr. Antônio Cláudio
Tedesco

***Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 03/maio/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP*.**

Ribeirão Preto
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Natália Neto Pereira Cerize

Título do trabalho: Estudo de sistemas nanocarreadores para o ácido 5-aminolevulínico com aplicação na terapia fotodinâmica.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Claudio
Tedesco

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

**Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram
para o meu crescimento intelectual e moral.**

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que contribuíram neste trabalho, sendo através da presença, do contato, da ajuda no dia-a-dia, principalmente do apoio emocional, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

Agradeço aos meus pais e aos meus irmãos por acreditarem em mim e sempre apoiarem meu trabalho.

Agradeço ao meu esposo e ao meu filho pela confiança, pela força, pelo apoio, pelo carinho, por todos os momentos em que não estive presente. Vocês são um capítulo da minha tese.

Agradeço ao Prof. Dr. Tedesco por suas orientações, pelo apoio, incentivo e oportunidade desta conquista.

Agradeço a Dra. Maria Inês Ré pela co-orientação, contribuições científica e intelectual, além da oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a Jaqueline, pelo acolhimento em sua casa em Ribeirão Preto no começo do trabalho, Suênia, com todo ânimo, alegria e amizade, ao Adriano, pelo apoio no laboratório, discussões teóricas e científicas e pelo companheirismo, Fernanda, Mariana e Karen, por cada dia de trabalho no laboratório e pela dedicação e disposição em contribuir para o trabalho, Maria Helena, pela presença e apoio constantes, Silas e Wagner, pela oportunidade de utilizar os recursos do IPT, Daniela Maranhão e Wallace, pelas colaborações nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, Karla pelo material cedido e interesse em apoiar.

Agradeço ao CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro, e agradeço também ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, pelo financiamento de parte do projeto de pesquisa, por colocar à disposição a área experimental e o laboratório.

E, principalmente, agradeço à Deus, por mais uma oportunidade de crescimento e aprendizado.

Epígrafe

*“Para ser grande, sê inteiro:
Nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és, no mínimo que fazes.
Assim, em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*
(Fernando Pessoa)

RESUMO

CERIZE, N. N. P. **Estudo de sistemas nanocarreadores para o ácido 5-aminolevulínico com aplicação na terapia fotodinâmica**. 2012. 173f. Tese (Doutorado direto). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) é empregado como pró-fármaco, precursor de um agente fotossensibilizador na terapia fotodinâmica (TFD). Após a aplicação de 5-ALA topicamente, a incidência de luz visível de comprimento de onda apropriado induz a formação de uma substância altamente fluorescente e fotodinamicamente ativa, a Ptoporfirina IX (PpIX). Todavia, devido a sua característica hidrofílica o 5-ALA apresenta reduzida penetração na epiderme e derme, limitando sua aplicação tópica. O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de sistemas de veiculação nanoestruturados para o 5-ALA, visando maior penetração na pele e aumento da eficácia fotodinâmica. Além do 5-ALA, foram testados outros fármacos hidrofílicos, incluindo um anti-inflamatório, uma vitamina e um anti-microbiano, para validação do sistema de liberação controlada e ação sítio-específica. Foi realizado um estudo de desenvolvimento de formulação e processo para obtenção dos nanocarreadores placebo e posterior incorporação dos fármacos, além da caracterização completa dos sistemas obtidos, resultando no depósito de uma patente dos novos sistemas: Nanocarreadores Poliméricos Coloidais. Como principais resultados deste trabalho destaca-se a obtenção de sistemas em escala nanométrica, com alta eficiência de encapsulação e perfil de liberação controlado, além dos nanocarreadores proporcionarem o aumento da permeação cutânea e ação sítio específica dos fármacos, seja na célula cancerígena ou mesmo na lesão causada por microorganismos. A relevância deste trabalho baseou-se na necessidade de um tratamento prático, altamente seletivo e moderno, que seja otimizado mediante a administração do pró-fármaco 5-ALA em sistemas de liberação apropriados, pois a barreira epidérmica do tecido canceroso constitui ainda uma limitação para a TFD tópica.

Palavras-chave: liberação controlada, nanotecnologia, nanocarreadores, ácido 5-aminolevulínico, terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

CERIZE, N. N. P. **Study of nanocarriers systems to 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy use.** 2012. 173p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The 5-aminolevulinic acid (ALA) is a pro-drug, precursor of a photossensitizer agent employed in the photodynamic therapy (PDT). The topical application of ALA combined with the visible light irradiation in an appropriate wavelength, promote the yielding of a highly fluorescent and photodynamically active agent, the protoporphyrin IX (PpIX). However, due to its hydrophilic properties 5-ALA has reduced penetration of the epidermis and dermis, limiting its topical application. This work presents the development of a nanostructured drug delivery system for ALA aiming to increase the skin permeation and the photodynamic efficacy. Beyond 5-ALA, other hydrophilic drugs were tested, including an anti-inflammatory, a vitamin and an anti-microbial drug to validate the controlled release and site-specific action. A study was performed to develop the composition and the process of preparation of the unload-nanocarriers and subsequent incorporation of drugs, besides a complete characterization of the nanocarriers, resulting in a patent application of the new systems: Colloidal Polymeric Nanocarriers. As the main results of this study can be highlighted the achievement of nanometer-scale system with high efficiency of encapsulation and controlled release profile, in addition to providing increased permeation and site-specific action of drugs, whether in the cancer cell or even in the lesion caused by microorganisms. The relevancy of this work is based on the necessity of a practical, sophisticated and selective treatment through the administration of the prodrug ALA using a suitable drug delivery system, because the epidermal barrier of the cancerous tissue is still a main limitation for topical PDT.

Keywords: controlled release, nanotechnology, nanocarriers, 5-aminolevulinic acid, photodynamic therapy.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Estrutura molecular do 5-ALA.....	24
<i>Figura 2.</i> Reação de dimerização do 5-ALA.....	26
<i>Figura 3.</i> Diferentes estados de protonação do 5-ALA e seus tautômeros.....	28
<i>Figura 4.</i> Diagrama simplificado da estrutura da pele e vias de penetração/permeação de fármacos. Adaptado de AULTON, 2005.....	32
<i>Figura 5.</i> Porcentagem de publicações relacionando nanoparticles or nanocarriers e topical delivery nos últimos 10 anos. Dados obtidos em www.isiwebknowledge.com acesso em 20/03/2012.....	34
<i>Figura 6.</i> Fluxograma descritivo dos pontos críticos no desenvolvimento da formulação...	44
<i>Figura 7.</i> Estruturas moleculares dos polímeros: (a) Quitosana, (b) PVP, (c) Amido.....	48
<i>Figura 8.</i> Representação esquemática do Protocolo de Fabricação dos NPCs.....	50
<i>Figura 9.</i> Representação esquemática do Protocolo de Fabricação dos NPCs contendo ativo.....	54
<i>Figura 10.</i> Ilustração esquemática da reação de formação do composto fluorescente a partir da derivatização do 5-ALA.....	58
<i>Figura 11.</i> Representação esquemática do mecanismo de estabilização do emulsificante de silicone.....	72
<i>Figura 12.</i> Gráfico comparativo do teor de água versus tamanho de partícula para as amostras NPC-10 e NPC-13.....	74
<i>Figura 13.</i> Etapa de extração de água no processo obtenção da amostra NPC-7, nos tempos 3,0h (A) e logo após 3,0h (B).....	75
<i>Figura 14.</i> Amostras dos NPCs de quitosana (A), NPC de PVP (B) e NPC de amido (C) nos tempos 3 e 5 horas de extração de água.....	75
<i>Figura 15.</i> Monitoramento da viscosidade dos NPCs.....	77
<i>Figura 16.</i> Viscosidade do NPC-17 com diferentes tempos de extração de água com 0 e 30 dias de estabilidade e imagem lateral com alteração de escala.....	78
<i>Figura 17.</i> Perfil de retroespalhamento de luz da amostra NPC-1 obtido após preparo, durante o período de 7 dias de estabilidade.....	79
<i>Figura 18.</i> Monitoramento da variação do tamanho de partícula da amostra NPC-1 de 0h a 7 dias.	80

<i>Figura 19.</i> Comparação da cinética de estabilidade de NPC-8, NPC-10 e NPC-13 nos tempos 3 e 5 horas de processo de extração de água.....	81
<i>Figura 20.</i> Avaliação do diâmetro da amostra NPC-10 em função do tempo de extração de água do sistema.....	86
<i>Figura 21.</i> Curvas DSC dos NPC-7 (com 0; 3 e 5h de vácuo) e do polímero PVP obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na razão de aquecimento 10°C/min.....	87
<i>Figura 22.</i> Micrografias de FEG-SEM dos NPC-8, NPC-10 e NPC-13.....	90
<i>Figura 23.</i> Estrutura molecular da Cianocobalamina.....	95
<i>Figura 24.</i> Amostras dos NPCs D3h e D5h: NPC-12; E3h e E5h: NPC-15; F3h e F5h: NPC-14.	96
<i>Figura 25.</i> Comparação de cinética de estabilidade dos NPC-11, NPC-12, NPC-14 e NPC-15.	98
<i>Figura 26:</i> Micrografias de FEG-SEM dos NPC-11.....	99
<i>Figura 27.</i> Micrografias de FEG-SEM dos NPC-14.....	102
<i>Figura 28.</i> A: Matriz lipídica cristalina perfeita com capacidade de encapsulação limitada. B: Matriz lipídica cristalina com algumas imperfeições, podendo induzir aumento da capacidade de encapsulação (Adaptado: Muller et al., 2002).....	104
<i>Figura 29.</i> Ilustração esquemática da hipótese de encapsulação dos ativos modelo no NPC. A: Matriz polimérica contendo SS. B: Matriz contendo cianocobalamina.....	105
<i>Figura 30.</i> Espectros de FTIR dos NPCs e das respectivas matérias-primas.....	107
<i>Figura 31.</i> Perfil de liberação de Cianocobalamina e Salicilato de sódio dos NPC-14 e NPC-15 respectivamente.....	110
<i>Figura 32.</i> Curvas TG e DTA do 5-ALA obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na razão de aquecimento 10°C/min.....	114
<i>Figura 33.</i> Tratamento de dados das curvas DSC do 5-ALA obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio nas razões de aquecimento 1, 10, 20 e 80°C/min.....	114
<i>Figura 34.</i> Gráfico do teor de água versus tamanho de partícula NPC-ALA 1.....	117
<i>Figura 35.</i> Micrografias de FEG-SEM do 5-ALA puro, NPC-ALA 1 e NPC-ALA 2.....	118
<i>Figura 36.</i> Região de linearidade do método de quantificação do 5-ALA.....	123
<i>Figura 37.</i> Perfil de liberação in vitro do NPC-ALA 1.....	127
<i>Figura 38.</i> Gráfico da quantidade de 5-ALA acumulada versus tempo.....	128
<i>Figura 39.</i> Gráfico da porcentagem de 5-ALA permeada versus tempo.....	129

<i>Figura 40.</i> Retenção cutânea nas camadas da pele.....	130
<i>Figura 41.</i> Ilustração esquemática do mecanismo de permeação dos NPCs.....	131
<i>Figura 42.</i> Ilustração esquemática da oclusão prmovida pelas nanoestruturas.....	132
<i>Figura 43.</i> Ilustração esquemática do aumento da área superficial e adesividade do material nanométrico. (Adaptado de Muller, et al. 2011).....	133
<i>Figura 44.</i> Quantificação da viabilidade das células de melanoma B-16 após período de incubação de 4 horas, a 37°C, com o NPC-ALA em diferentes concentrações.....	134
<i>Figura 45a.</i> Quantificação da viabilidade das células de melanoma B-16 após período de incubação de 4 horas, a 37°C, com o NPC-ALA nas concentrações de 0,01 a 0,05mg/mL.	135
<i>Figura 45b.</i> Quantificação da viabilidade das células de melanoma B-16 após período de incubação de 4 horas, a 37°C, com o NPC-ALA nas concentrações de 0,01 a 0,05mg/mL.	135
<i>Figura 46.</i> Quantificação da viabilidade das células de melanoma B-16 após período de incubação de 4 horas, a 37°C, com o NPC-placebo e NPC-ALA nas concentrações de 0,01 a 0,06mg/mL.....	136
<i>Figura 47.</i> Produção de PpIX nas células de melanoma B-16 em função da concentração de 5-ALA encapsulado no NPC-ALA, após período de incubação de 4 horas, a 37°C. Comprimento de onda de excitação de 416nm e de emissão de 636nm.....	137
<i>Figura 48.</i> Ilustração esquemática dos desafios do desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica.....	138
<i>Figura 49.</i> Perfil de estabilidade física dos nanocarreadores contendo 5-ALA.....	139
<i>Figura 50.</i> Perfil de degradação do 5-ALA nanoencapsulado.....	141
<i>Figura 51.</i> Micrografias de FEG-SEM NPC-31 contendo anfotericina B.....	144
<i>Figura 52.</i> Perfil de liberação in vitro de anfotericina B dos nanocarreadores.....	145
<i>Figura 53: Tratamento de leishmaniose cutânea murina pela via sub-cutânea ou tópica:</i> Camundongos BALB/c foram infectados com 2×10^6 promastigotas de <i>L.amazonensis</i> GFP na orelha. Após 27 dias de infecção, os animais foram aleatoriamente separados em grupos de 4. O grupo tratado com NPC/Anfo B recebeu duas doses da formulação via sub-cutânea com dose 4 ug de Anfotericina B em 10ul. O grupo tratado com Anfotericina B livre e Anfotericina B Lipossomal, recebeu duas doses semanais de 4ug do fármaco. Os controles receberam duas administrações de 10ul de PBS ou NPC. No tratamento tópico, o grupo tratado com NPC/Anfo B recebeu duas doses diárias da formulação com doses de 8ug de Anfotericina B em 20ul de formulação. Como controle, acrescentamos Anfotericina B livre à formulação de NPC vazia na mesma concentração do fármaco que foi encapsulado, o grupo recebeu duas doses diárias dessa formulação (NPC branca + Anfotericina B). O crescimento lesão (espessura da orelha infectada menos espessura antes da infecção) foi acompanhado durante o experimento com o auxílio de paquímetro. Média $\pm$ SD (n=4), ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (Com autorização dos colaboradores da UFRJ).....	147

Figura 54. Avaliação da carga parasitária na lesão de animais: As cargas de parasita no lisado da lesão foram medidas no dia 52 de infecção após administração sub-cutânea (total de 8 doses) e tópico (total de 20 doses) . O número de parasitas na lesão (A) e no linfonodo auricular (B) foi determinado pelo método de diluição limitante (LDA), a carga parasitária em (C) foi medida em unidades de fluorescência específica (FU). * $p < 0,01$ e ▼ $p < 0,001$ em relação ao grupo PBS. Média $\pm$ DP (n = 4) (Com autorização dos colaboradores da UFRJ)..... 148

Figura 55. Análise da toxicidade: O soro dos a animais foi coletado no dia 52 de infecção para a análise colorimétrica de ALT - alanina aminotransferase, AST - aspartato transaminase e creatinina, como parâmetro de toxicidade para o fígado, coração e rins, respectivamente. Como controle positivo, animais receberam uma dose de tetracloro carbono (CCl_4) 1% em óleo de amendoim intraperitonealmente. ** $p < 0,05$ e ▼ $p < 0,001$ em relação ao grupo PBS. Média $\pm$ DP (n = 4). (Com autorização dos colaboradores da UFRJ)..... 150

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1</i> – Estudo de Processo de Fabricação dos NPCs.....	69
<i>Tabela 2</i> – Teor de água obtido por titulação Karl Fisher.....	73
<i>Tabela 3</i> – Dados de tamanho médio de partícula dos NPC.....	85
<i>Tabela 4</i> – Comparação das propriedades dos modelos hidrofílicos SS e cianocobalamina com o 5-ALA.....	94
<i>Tabela 5</i> - Descrição dos NPCs contendo ativo modelo e dados de teor de água, diâmetro médio e polidispersão.....	97
<i>Tabela 6</i> - Eficiência de Encapsulação (EE) dos NPCs.....	106
<i>Tabela 7</i> - Parâmetros de integração das curvas de DSC do 5-ALA.....	115
<i>Tabela 8</i> - Descrição dos NPC-ALA.....	117
<i>Tabela 9</i> - Estabilidade da eficiência de encapsulação do NPC-ALA.....	125
<i>Tabela 10</i> - Dados da permeação cutânea do 5-ALA e NPC-ALA.....	128
<i>Tabela 11</i> - Dados de degradação do 5-ALA puro e nanoencapsulado.....	140
<i>Tabela 12</i> - Descrição dos NPC-Anfo B.....	143
<i>Tabela 13</i> - Descrição das amostras do teste in vivo com NPC contendo Anfotericina B.....	146

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ALA	Ácido 5-aminolevulínico
ATCC	American Type Culture Collection
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
cPs	Counts per second
DLS	Dynamic light scattering (Espalhamento de luz dinâmico)
DSC	Differential scanning calorimetry (Calorimetria exploratória diferencial)
DTA	Differential thermal analysis (Análise térmica diferencial)
EE	Eficiência de encapsulação
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention effect</i> (Efeito de retenção e da permeabilidade aumentada)
FEG-SEM	Field emissum gun – scanning electronic microscopy (Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo)
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IL	Intralesional
IP	Índice de polidispersidade
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
FEG-SEM	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
nm	Nanômetros
NPC	Nanocarreador Polimérico Coloidal
NPCs	Nanocarreadores Poliméricos Coloidais
PCS	Espectroscopia de correlação de fótons
PpIX	Protoporfirina IX
PVP	Polivinilpirrolidona
SS	Salicilato de Sódio
TFD	Terapia Fotodinâmica

TFD-ALA Terapia Fotodinâmica associada ao ácido 5-aminolevulínico

TG Termogravimetria

UFRJ Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas e siglas	xiv
 1. INTRODUÇÃO	 19
1.1 Enunciado do problema	19
1.2 Estado da Arte	21
1.2.1 Terapia Fotodinâmica	21
1.2.2 O ácido 5-aminolevulínico (5-ALA)	24
1.2.3 Sistemas nanocarreadores de aplicação tópica	28
1.2.3.1 Aplicação tópica	29
1.2.3.2 Pele e mecanismos de penetração e permeação	31
1.2.3.3 Sistemas nanoestruturados de aplicação tópica e nanoencapsulação	33
1.3.4 Análise da Literatura e Proposta para Solução do Problema	37
1.4 Proposta de Formulação	43
 2. OBJETIVOS	 45
2.1 Objetivos específicos	45
 3. 3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	 46
3.1 Reagentes	46
3.2 Equipamentos e Materiais	46
3.3 Metodologia	48
3.3.1 Preparo dos Nanocarreadores Poliméricos Coloidais (NPCs) placebo	48
PARTE I	
3.3.2 Teor de Água	50
3.3.3 Índice de Refração	50
3.3.4 Tamanho de partícula	51
3.3.5 Viscosidade	51
3.3.6 Turbidimetria dinâmica	51
3.3.7 Morfologia dos NPCs placebo	52
3.3.7.1 Microscopia ótica	52

3.3.7.2 <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	52
3.3.8 <i>Caracterização térmica</i>	53
3.3.8.1 <i>TG e DTA</i>	53
3.3.8.2 <i>DSC</i>	53
PARTE II	
3.3.9 <i>Incorporação de ativo modelo nos NPCs</i>	54
3.3.10 <i>Eficiência de encapsulação de ativo modelo</i>	54
3.3.11 <i>Caracterização dos NPCs contendo ativo</i>	55
3.3.11.1 <i>Perfil de Liberação dos NPCs contendo ativo</i>	55
3.3.11.2 <i>Caracterização por Espectroscopia de Absorção no Infra-Vermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	56
PARTE III	
3.3.12 <i>Incorporação de 5-ALA nos NPCs</i>	57
3.3.13 <i>Quantificação de 5-ALA e eficiência de encapsulação</i>	57
3.3.14 <i>Estabilidade química do NPC-ALA</i>	59
3.3.15 <i>Perfil de Liberação dos NPCs contendo 5-ALA</i>	59
3.3.16 <i>Estudo de permeação cutânea dos NPCs contendo 5-ALA</i>	59
3.3.17 <i>Estudos biológicos in vitro – cultura celular</i>	61
3.3.17.1 <i>Crescimento e manutenção da cultura de células da linhagem neoplásica de melanoma de camundongo (B16- F10)</i>	61
3.3.17.2 <i>Controle da integridade da membrana celular</i>	61
3.3.18 <i>Estudos de citotoxicidade</i>	62
3.3.18.1 <i>Determinação da citotoxicidade dos NPC-ALA</i>	63
3.3.18.2 <i>Quantificação da produção endógena de PpIX em células B-16</i>	63
3.3.18.3 <i>Estudo de fototoxicidade das NC 5-ALA</i>	63
PARTE IV	
3.3.19 <i>Outras aplicações: Incorporação de Anfotericina B e caracterização</i>	64
3.3.20 <i>Estudos biológicos in vivo</i>	65
3.3.20.1 <i>Infecção de camundongos com Leishmania amazonensis-GFP</i>	65
3.3.20.2 <i>Eficácia das formulações na leishmaniose cutânea</i>	65
3.3.20.3 <i>Avaliação da carga parasitária in vivo por fluorimetria.</i>	66
3.3.20.4 <i>Avaliação da carga parasitária in vivo por análise da diluição limitante (LDA).</i>	66
3.3.20.5 <i>Avaliação da toxicologia hepática, cardíaca e renal</i>	66
3.3.20.6 <i>Análise estatística</i>	67

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
PARTE I	
4.1 Desenvolvimento do Protocolo de Fabricação dos NPCs	68
4.2 Estudo de Processo e Abordagem do Mecanismo de Estabilização dos NPCs	68
4.3 Influência do Conteúdo de Água na Estabilidade Coloidal	73
4.4 Comportamento reológico	76
4.5 Turbidimetria dinâmica (turbiscan)	78
4.6 Desenvolvimento de Metodologia de Tamanho Médio de Partícula dos NPCs	81
4.7 Perfil térmico dos NPCs	86
4.8 Morfologia dos NPCs	87
4.8.1 Microscopia ótica	87
4.8.2 Microscopia eletrônica de varredura	88
PARTE II	
4.9 Incorporação de ativo modelo nos NPCs e Caracterização dos Sistemas	94
4.10 Estabilidade Coloidal dos NPCs contendo ativos	97
4.11 Caracterização Morfológica dos NPCs contendo ativo	98
4.12 Eficiência de encapsulação – Extração e quantificação de ativo	105
4.13 Perfil de liberação in vitro	109
PARTE III	
4.14 Caracterização térmica do 5-ALA	112
4.15 Incorporação do 5-ALA e caracterização	116
4.16 Eficiência de encapsulação e Estabilidade química NPC-ALA	123
4.17 Liberação in vitro do NPC-ALA	125
4.18 Estudo de permeação cutânea e ação sítio específica	127
4.19 Citotoxicidade e eficácia fotodinâmica dos nanocarreadores contendo 5-ALA	133
4.20 Avaliação da produção de PpIX pelos NPC 5-ALA	135
4.21 Estabilidade física e química dos NPC-ALA	138
PARTE IV	
4.22 Outras aplicações: Anfotericina B	142
5. CONCLUSÃO FINAL.....	153
6. REFERENCIAS.....	155
7. ANEXOS.....	167
8. APÊNDICES.....	169
9. PUBLICAÇÕES E PATENTES.....	174

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enunciado do Problema

A terapia fotodinâmica (TFD) é um novo e promissor processo para o tratamento de lesões cutâneas malignas e não malignas realizado em duas etapas que requerem a administração de um fármaco fotossensibilizador (FS), ou seu precursor, seguida da exposição à luz para o tratamento de uma determinada patologia, no caso câncer.

Através da utilização combinada da Terapia Fotodinâmica com a Nanotecnologia pode-se modificar passos críticos na ação da TFD como o design e veiculação do FS, localização e intensidade da reação fotodinâmica, dosimetria e mecanismos de ação, permitindo avanços clínicos e científicos (ALLISON et al., 2008). O impacto da nanociência e nanotecnologia no campo da liberação controlada de drogas é de abrangência multifatorial, propiciando o desenvolvimento de métodos de produção e caracterização de agentes bioativos e permitindo evoluir de maneira promissora desde a etapa laboratorial até a aplicação clínica (YOUAN, 2008).

O emprego de sistemas de liberação controlada de fármacos também tem resultado em avanços significativos na eficácia e seletividade da TFD, já que assim, o FS pode ser liberado em concentrações adequadas no tecido-alvo (MACHADO, 2000). Atualmente existe um grande interesse na liberação seletiva de fármacos e, sistemas carreadores têm sido bastante estudados com objetivo de melhorar a seletividade e eficiência das formulações (MONACO, 2004), principalmente na escala nanométrica.

No desenvolvimento racional de um sistema de liberação/veículo adequado (que atenda os critérios de qualidade, eficácia e segurança) é importante conhecer as propriedades físico-químicas do ativo, as formas polimórficas, a compatibilidade com outros componentes da formulação durante processamento e armazenamento, estabilidade do sistema, assim como a via de aplicação (oral, tópica, parenteral) e a forma de liberação (liberação imediata, controlada, sustentada) (ADAIR et al., 2010; GIRON, 1998). Neste contexto, o estudo de pré-formulação é essencial visto que abrange a idealização da formulação, identificação das características do ativo e dos excipientes, a verificação da estabilidade em condições de stress (condições extremas de pH e temperatura) e estudo de compatibilidade.

A produção endógena de protoporfirina IX (CURNOW e PYE, 2007) após a administração de ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) tem levado a muitas aplicações em terapia fotodinâmica (TFD). No entanto, a eficácia da combinação ALA-TFD nunca foi otimizada para os tumores mais espessos e ou mais profundos, bem como a melhor forma de veiculação

do pró-fármaco 5-ALA e consequente obtenção de resposta terapêutica otimizada ainda são desafios encontrados na TFD (CASAS et al., 2009).

Sistemas de liberação cutânea e transdérmica como lipossomas, cristais-líquidos e associações de promotores de permeação (LOPEZ et al., 2004; OSIECKA et al., 2010; PIERRE et al., 2009) , patchs transdérmicos bioadesivos (McCARRON et al., 2006), nanopartículas de quitosana (YANG et al., 2009), dendrímeros (CASAS et al., 2009), microemulsões (ARAUJO et al., 2010), nanoemulsões (MAISCH et al., 2010) dentre outros sistemas têm sido estudados visando o aumento da biodisponibilidade do 5-ALA no alvo biológico.

O desenvolvimento de um sistema de veiculação nanoestruturado para o 5-ALA visando estabilizar o ativo em uma formulação de uso tópico, melhorar a permeação cutânea e aumentar a eficácia fotodinâmica foi o foco deste trabalho. Pretendeu-se, através de uma revisão de trabalhos anteriormente realizados utilizando o 5-ALA como pró-fármaco, identificar o estado atual da arte e a partir dele elaborar uma nova proposta de formulação e processo de produção de um nanocarreador.

Considerando as limitações encontradas na aplicação tópica do 5-ALA, além da escassa literatura referente a carreadores para moléculas hidrofílicas, foi elaborado um projeto de desenvolvimento de um sistema nanocarreador para o pró-fármaco abrangendo as etapas de pré-formulação, formulação e processo, estabilidade e caracterização, e testes pré-clínicos, estabelecendo atividades e prazos referentes a cada tarefa.

Finalmente, este trabalho teve como principal objetivo contribuir para o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados à base polímeros e biopolímeros para veiculação de ativos hidrofílicos de interesse farmacêutico e/ou com aplicação na terapia fotodinâmica do câncer. O estudo realizado avaliou os parâmetros envolvidos no processo de fabricação destes sistemas, efeito de variáveis de formulação e das características dos nanocarreadores produzidos envolvendo tamanho médio de partícula e índice de polidispersidade, estabilidade física e química e capacidade de encapsular ativos de com propriedades hidrofílicas.

1.2 Estado da Arte

1.2.1 Terapia Fotodinâmica

A utilização de um agente de fotossensibilização aplicado em combinação com luz para tratar doenças foi não intencionalmente descoberta quando observou-se a morte de uma cultura de paramécios que tinham sido incubados em um corante fluorescente, e estes foram expostos à luz. Jodlbauer, Jesionick e Von Tappeiner observaram que o corante (acridina) era um agente de fotossensibilização. Eles explicaram e definiram o termo reação fotodinâmica e pelo início dos anos 1900 trouzeram a terapia fotodinâmica (TFD) para a clínica com resultados excelentes em tumores cutâneos. Muitos fotossensibilizadores foram investigados e nas décadas de 1950 e 1960, fotossensibilizadores baseados em porfirinas obtiveram sucesso clínico intermitente (ALLISON E SIBATA, 2010).

Apenas em 1978, Dougherty e colaboradores apresentaram um novo FS chamado derivado de hematoporfirina purificada (Hematoporphyrin Purified Derivative - HPD), que mostrou-se efetivo no tratamento de enfermidades cutâneas, através do uso de luz vermelha como fonte de luz (GOLD, 2006; DOUGHERTY et al., 1978). Todavia, em função da fototoxicidade estendida por meses pela HPD, em 1990 foi introduzido o primeiro derivado de porfirina tópico, conhecido como ácido aminolevulínico (5-ALA), que é um precursor endógeno de um agente fotossensibilizador, a protoporfirina IX (KENNEDY et al., 1990).

A TFD do câncer é baseada na administração de um fotossensibilizador (FS) e subsequente irradiação com luz visível de comprimento de onda apropriado, induzindo o dano e/ou morte do tecido tratado. Uma substância FS é um composto químico que, após ser exposto a uma luz de comprimento de onda específico, é excitado para um estado mais energético, gerando radicais livres e oxigênio simples ($O^{\cdot}$). Essas espécies reativas são capazes de induzir a inviabilização de células, danos vasculares e morte celular (TEDESCO et al., 2003; BONNETT e BERENBAUM, 1989).

A interação de luz monocromática e composto FS induz uma série de processos fotofísicos e fotoquímicos em níveis quânticos, decorrentes da interação da radiação eletromagnética com a matéria, que resulta na fotossensibilização molecular (PRIMO, 2010). Após a absorção de um fóton de luz, o FS passa a ocupar um estado eletrônico singlete excitado mais energético (S_n), podendo retornar ao seu estado fundamental (S_0) via processo de relaxação física conhecido como conversão interna ou através de processos radioativos de emissão de fluorescência (SHARMAN et al., 1999; PRIMO, 2010).

Uma alta população do estado singlete excitado dos fármacos FS pode dar origem ao estado triplete excitado (inversão da orientação vetorial do spin eletrônico). A ação

foto dinâmica é dependente do processo de cruzamento inter-sistemas, responsável pela formação do estado triplete excitado a partir do estado singlete excitado.

Os fármacos fotossensíveis mais eficientes devem possuir um alto rendimento quântico de conversão para o estado triplete excitado, e consequentemente tempos de vida na ordem de microssegundos. A partir do estado triplete excitado o fármaco fotossensível pode retornar diretamente ao estado fundamental pelo processo de conversão interna ou através da emissão de fosforescência (LAKOWICZ, 1999; PRIMO, 2010), podendo desencadear interações fotoquímicas elucidadas basicamente por dois mecanismos distintos.

O **mecanismo Tipo I** envolve a abstração de um átomo de hidrogênio ou reações de transferência de elétrons entre o fármaco fotossensível no estado triplete excitado e diferentes macromoléculas biológicas, levando à formação de radicais livres e/ou íons radicais. Poucos materiais biológicos apresentam facilidade de fotoredução, sendo que as espécies reduzidas podem transferir um elétron ao oxigênio molecular presente no meio (em configuração triplete), formando espécies reativas de oxigênio como peróxidos de hidrogênio, ânion superóxidos, etc. este mecanismo de fotossensibilização é conhecido como tipo I, sendo esquematizado a seguir.

Mecanismo de fotossensibilização do Tipo I – Reações redox com biomoléculas

Sendo F = fármaco fotossensível e S = substrato biológico

Outro mecanismo possível de fotossensibilização é a transferência de energia para o oxigênio molecular a partir da configuração eletrônica triplete do fármaco, induzindo a formação do oxigênio singlete (1O_2) conforme o mecanismo do tipo II. O oxigênio singlete é uma espécie altamente reativa que interage de forma a oxidar vários substratos biológicos, pois reage rápida e indiscriminadamente com os mais variados alvos eletrofílicos, como lipídeos insaturados, proteínas, ácidos, dentre outros. O mecanismo do tipo II de fotossensibilização está esquematizado a seguir.

Mecanismo de fotossensibilização do Tipo II – Mediado pela produção de $^1\text{O}_2$

Sendo F = fármaco fotossensível e S = substrato biológico

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) gerado pela reação tipo II é um intermediário chave em muitos processos oxidativos fotoinduzidos em sistemas químicos ou biológicos, sendo considerado a principal espécie produzida pelos processos fotodinâmicos (PRIMO, 2010).

A protoporfirina IX (PpIX) é um potente fotossensibilizador natural, empregado na TFD. A produção endógena de gerada através da via biossintética do grupo heme após a administração do pró-fármaco ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) tem levado a muitas aplicações em TFD (CURNOW e PYE, 2007), em especial para o tratamento do carcinoma basocelular cutâneo (CASAS et al., 2009). As vantagens clínicas desta abordagem incluem a escolha de administração tópica ou sistêmica de 5-ALA, e de curta duração de fotossensibilidade cutânea, juntamente com fotossensibilização epitelial seletiva tornando-a adequada para o tratamento de tumores precoces.

O 5-ALA também tem um grande potencial como agente de fotodiagnóstico ou fotodeteção na prática clínica. A utilização das propriedades espectroscópicas da PpIX como a emissão de fluorescência produzida a partir da biossíntese de 5-ALA vem sendo explorada atualmente para o tratamento de lesões pré-malignas de leucoplasia oral (WASKOWSKA et al., 2012); terapia para coloangiocarcinoma (CHUNG-WOOK et al., 2012); tratamento de câncer baso e espinho celular e doenças de Bowen (DE ROSA, 2002; TEDESCO et al., 2003) diagnóstico de câncer de bexiga, lesões intra-epiteliais do colo uterino e câncer de pulmão e cirurgia guiada por fluorescência para ressecção de gliomas malignos (STUMMER et al., 2006). Neste último caso, o 5-ALA é administrado sistemicamente usando uma dose oral de 20mg/kg, que é bem tolerada pelos pacientes (CASAS et al., 2009).

A administração tópica de ALA associada à irradiação de luz azul também está sendo utilizada pelos médicos como Diagnóstico Fotodinâmico de lesões pré-malignas e malignas, devido à capacidade do tecido lesionado metabolizar o ALA em PpIX mais rapidamente que o tecido normal. Desta forma, ao expor a pele à luz azul, a área lesionada apresenta-se mais fluorescente que a área adjacente sadia (MANIVASAGER et al., 2006; VAIDYANATHAN et al., 2006).

A eficácia da combinação da terapia fotodinâmica e ácido 5-aminolevulínico (TFD-ALA), no entanto, tem sido limitada pela natureza hidrofílica da molécula, o que reduz a penetração através dos tumores, e também por apresentar reduzida permeação nas camadas da pele nos casos de aplicação tópica. Várias modificações químicas têm sido feitas em ambas as terminações N- e C- (nitrogênio e carbono, respectivamente) da estrutura da molécula (que pode ser observada na *Figura 1*) para aumentar o caráter hidrofóbico da molécula e induzir maior produção de protoporfirina IX (PpIX). Outra abordagem para a melhoria da TFD-ALA é a combinação de 5-ALA com outros agentes, incluindo agentes quimioterápicos e quelantes de ferro para inibir a conversão da PpIX a heme catalisada pela ferroquelatase (CURNOW e PYE, 2007).

Figura 1: Estrutura molecular do 5-ALA.

1.2.2 O ácido 5-aminolevulínico (5-ALA)

O 5-ALA é um precursor de porfirinas endógenas na via de biossíntese do heme e vem sendo estudado para aplicação tópica, como um pró-fármaco associado à TFD (VENA, 2005; LOPEZ et al., 2004; KENNEDY et al., 1990).

O 5-ALA tem sido considerado um pró-fármaco em potencial para o uso em TFD tópica, pois estimula a formação *in situ* de protoporfirina IX (PpIX), que é um FS responsável pela ação fotodinâmica de regressão do tumor no tratamento de lesões cutâneas (LOPEZ et al., 2004; SOUZA et al., 2009; WOLF e KERL, 1995).

Em condições normais, a produção do 5-ALA, a partir da conversão da glicina e succinil CoA, é controlada pela ação da enzima 5-ALA-sintase e a biossíntese do heme é regulada de tal forma que nunca ocorre acúmulo de concentrações fotossensibilizantes de PpIX (KENNEDY et al., 1990). Porém, estudos da biossíntese do heme revelaram que quando ocorre um acúmulo natural de heme livre (Fe^{2+} não complexado), a enzima 5-ALA-sintase deixa de sintetizar o 5-ALA, o que resulta num mecanismo de “feedback” negativo, onde a presença do heme livre inibe sua síntese. Desta forma, pode se dizer que a síntese do heme é

principalmente regulada pela inibição da enzima 5-ALA-sintase, um processo conhecido como “feedback” negativo (CAIRNDUFF et al., 1994).

Todavia, foi demonstrado que a administração tópica de um excesso de 5-ALA inibe a ação da enzima ferroquelatase resultando, novamente, em um mecanismo de “feedback” negativo, uma vez que esta enzima deixa de complexar o Fe^{2+} na PpIX para formar o heme. Consequentemente, o 5-ALA atravessa a epiderme anormal e supera o mecanismo de inibição por feedback, sendo metabolizado dentro da mitocôndria e resultando em um acúmulo de porfirinas endógenas, principalmente a PpIX, que se concentra no tecido canceroso. Como a conversão de PpIX em heme é relativamente lenta, as células do tecido canceroso acumulam PpIX em concentrações fotossensibilizantes (DIVARIS et al., 1990; WOLF e KERL, 1995).

Vários estudos têm demonstrado que a taxa de síntese de porfirinas derivadas do 5-ALA, principalmente a PpIX, é maior nas células neoplásicas quando comparadas as células normais, devido tanto à alta atividade metabólica, quanto a baixa atividade da enzima ferroquelatase nestas células neoplásicas (HEYERDAHL et al., 1997; REBEIZ et al., 1992; WU et al., 2003). Sugere-se que a razão para esta baixa atividade seja o uso da via glicolítica preferivelmente à fosforilação oxidativa no metabolismo energético destas células neoplásicas (VAN DEN BOOGERT et al., 2000). Portanto, pode-se dizer que as enzimas 5-ALA-sintase e ferroquelatase são espécies limitantes da velocidade da reação para a formação do 5-ALA e heme, respectivamente. Como consequência, o tratamento de câncer tem recebido atenção especial com relação ao uso do 5-ALA como precursor na biossíntese de PpIX e, consequentemente, na TFD.

O 5-ALA e seus ésteres têm vantagens sobre os outros fármacos fotossensíveis exógenos, porque o transiente do FS formado na pele leva de 24 a 48h para degradar (KALISZEWSKI et al., 2007).

Sistemas de veiculação de fármacos usados atualmente contendo 5-ALA são extremamente ácidos (pH 3,0) devido à incorporação do fármaco na forma de sal (cloridrato de ácido 5-aminolevulínico), o que afeta controversamente a síntese de PpIX, como descrito por Bech e colaboradores. Em um dos trabalhos o autor relatou que a maior produção de PpIX ocorre no pH 7,5 (BECH et al., 1997). Observou-se também que soluções aquosas do fármaco tamponadas no pH fisiológico são instáveis (NOVO et al., 1996). A estabilidade do 5-ALA em solução foi estudada por espectroscopia de absorção, seguidas de mudança da absorbância causada pela formação de uma mistura de produtos de condensação (ELFSSON et al., 1999). Sob condições fisiológicas o fármaco sofre dimerização (uma reação de condensação cíclica, conforme descrito na *Figura 2*) formando produtos de degradação como o 2,5-(beta-

carboxietil) dihidropirazina (DHPY) e o ácido pirazina 2,4-dipropanóico (PY), resultando em perda de atividade (KALISZEWSKI et al., 2007).

Figura 2: Reação de dimerização do 5-ALA.

Elfsson *et al.* (ELFSSON et al., 1999) estudaram a estabilidade do 5-ALA em diferentes condições de pH, temperatura e concentração. A quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), detecção UV em 263nm, utilizando o ácido octanosulfônico como par iônico e pré-tratamento para eliminar os interferentes de degradação. Observou-se que nenhuma degradação ocorre em solução aquosa pH 2,35, a 50°C, por 37 dias. No entanto, nas mesmas condições fisiológicas com pH 7,53 ocorre degradação de 50%, em 3h (ELFSSON et al., 1999). A taxa de degradação aumenta 1,5 vezes a cada 10°C aumentados, para pH 7,53. Em condições fisiológicas, 4 a 7% do 5-ALA podem existir na forma de dihidropirazina e a fração molar do produto de degradação depende da concentração de 5-ALA em solução (NOVO et al., 1996).

Um pré-requisito para que a dimerização ocorra é a não protonação do grupamento amino, capaz de reagir com o grupo cetona da molécula de 5-ALA vizinha. Em pH 2,35, o pró-fármaco 5-ALA é estável porque o grupo amino está protonado. A temperatura também influencia a estabilidade do fármaco em solução. Contudo, quanto mais a reação avança,

maior é a concentração de prótons no meio e o pH diminui. Assim, as soluções vão ficando ácidas e tornam-se amarelas com a degradação (NOVO et al., 1996). Pode-se prever (através da Lei de Arrhenius) que uma solução aquosa a 1% de 5-ALA, pH 7,53, tem t_{90} (tempo que o composto leva para degradar 10% do valor inicial) de 1,9h a 20°C. Nas mesmas condições uma solução contendo 10% de 5-ALA, pH 7,53, tem t_{90} de 10 minutos. Logo, é importante manter a concentração mais baixa possível quando em pH fisiológico, ou o pH mais ácido possível para retardar a degradação.

Um estudo de produção de PpIX com aplicação de diferentes soluções de 5-ALA e metil-aminolevulinato mostrou que soluções tamponadas com pH 4,0, estocadas por 120h a 4° e 37°C não se tornam amarelas e produzem PpIX normalmente, enquanto que soluções com pH 5,5 perdem 10% da atividade de produção de PpIX quando estocadas a 4°C e 40% se estocadas a 37°C. Soluções com pH 7,4 perderam 90% da atividade quando estocadas por 30h a 37°C, tornando-se amarelas em poucos minutos (KALISZEWSKI et al., 2007). A estocagem das soluções por 6 dias em pH 7,4 a 37°C induziu a perda total de atividade, enquanto que em pH 4,0 não houve alteração significativa em comparação às soluções frescas (KALISZEWSKI et al., 2007). Outro estudo sobre estabilidade do pró-fármaco em solução mostrou que a osmolaridade de uma solução a 1% de 5-ALA, pH 4,0, com a adição de 0,9% de NaCl, foi mantida e a estabilidade do fármaco manteve-se inalterada por 5 dias (DE BLOIS et al., 2002).

Erdtman *et al.* demonstraram por simulação em modelos computacionais que o 5-ALA sofre reação de tautomerização e pode ser encontrado em 7 diferentes formas, conforme representadas na *Figura 3*. O estudo destes autores mostrou que a afinidade do 5-ALA por prótons é maior em fase lipídica do que em fase aquosa e que o átomo de oxigênio carboxílico pode ser mais facilmente protonado do que o de nitrogênio. No caso do 5-ALA neutro ou na forma zwitteriônica, estes são mais facilmente protonados em água (ERDTMAN e ERIKSSON, 2008). Sendo assim, a solubilização do fármaco em fase lipídica (ou com características menos polares que a água, por exemplo, os compostos glicólicos) supostamente reduziria a degradação via dimerização, conforme descrito anteriormente, visto que a afinidade por prótons é maior nesta fase.

Figura 3: Diferentes estados de protonação do 5-ALA e seus tautômeros.

1.2.3 Sistemas nanocarreadores de aplicação tópica

O desenvolvimento de um sistema de veiculação de fármacos nanoestruturado (chamado “*nanodelivery*”) para liberação controlada sítio específica tem o potencial de melhorar de forma incremental o tratamento de doenças. A maioria dos compostos terapêuticos de primeira linha são drogas com certa toxicidade que agem de forma inespecífica, provocando muitas vezes efeitos indesejados, limitações de dose, e em alguns casos efeitos colaterais debilitantes (ADAIR et al., 2010; ALLISON et al., 2008). A administração do fármaco precisa e segura sobre seu sítio de ação e no tempo certo de modo a promover uma liberação controlada e garantir o máximo de efeito terapêutico permanece ainda como um desafio no *design* e desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos. O conceito de liberação sítio específica de drogas advém da própria idéia de minimizar a relação risco-benefício (ALEXIS et al., 2008; MISHRA et al., 2010).

A capacidade de utilizar a nanotecnologia como ferramenta para alterar as características de um fármaco aumentando sua solubilidade, diminuindo a degradação durante a circulação e concentrando a droga no local desejado promete aumentar a eficácia do tratamento enquanto diminui os efeitos colaterais indesejados. As vantagens desta abordagem têm estimulado muito o financiamento e a pesquisa voltados para o desenvolvimento de vários sistemas nanoparticulados de veiculação de fármacos (ADAIR et al., 2010).

Nos últimos anos muitos estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de micro e nanossistemas, mas poucos se concretizaram no que concerne à definição do material ideal e na facilidade de transferência de tecnologia em função da área de aplicação (GUERY, J., 2006). O desafio é primeiramente controlar a reprodutibilidade da produção destes sistemas através de processos padrão (já empregados nas indústrias atualmente), controlar as propriedades físico-químicas como estabilidade, além de empregar materiais comercialmente disponíveis e biocompatíveis.

A tarefa de desenvolver um “nanodelivery” bem sucedido para aplicações tópicas é especialmente complicada. O primeiro desafio consiste na barreira altamente complexa no caso da pele, alvo para os estudos de neoplasias cutâneas. A necessidade de manter, ou ao menos restaurar a barreira da pele após a aplicação de uma droga, evitando infecções e contaminações, agrava ainda mais esta tarefa (CEVC, 2004).

Com intuito de aprofundar os conhecimentos nos sistemas nanoestruturados e na aplicação tópica, segue uma breve revisão dos principais conceitos e princípios relacionados à fisiologia da pele e mecanismos de interação de substâncias com a pele, e à nanotecnologia e sistemas nanoestruturados para encapsulação de fármacos.

1.2.3.1 Aplicação tópica

Sabe-se que a via de administração bem como o padrão de distribuição do fármaco no organismo podem interferir de maneira direta sobre a duração e extensão da ação terapêutica. Ao se considerar a administração de um fármaco, é fácil prever que a situação ideal seria administrá-lo diretamente no local em que sua ação é desejável. Essa estratégia não somente aumenta a eficácia farmacológica, mas também diminui a dose do fármaco necessária para a obtenção do efeito desejado e tende a atenuar sua toxicidade (DE LUCIA e OLIVEIRA-FILHO, 2004).

No caso das patologias cutâneas, principalmente aquelas de caráter mais superficial, a administração do fármaco próximo ao local de ação é tarefa fácil já que o local de ação é bem acessível (DE LUCIA e OLIVEIRA-FILHO, 2004). Além disso, a via tópica também é uma boa alternativa para administração de fármacos "a distância", ou seja de forma sistêmica, porque apresenta vantagens, tais como:

- Ser uma via de fácil acesso;
- Evitar a metabolização de primeira passagem, pois nos casos de administração sistêmica, o fármaco é absorvido na corrente sanguínea sem passagem pelo fígado;

- A absorção pode ser bem controlada já que não existe a interferência das variáveis que ocorrem, por exemplo, na absorção pelo trato gastrointestinal quando um fármaco é administrado via oral;
- Podem ser empregados fármacos com janela terapêutica estreita (pequena diferença entre as concentrações que gera o efeito terapêutico e a que gera o efeito tóxico), sendo que se evita o risco de superdosagem, o que é um limitante em outras vias, como a intravenosa;

Redução de efeitos colaterais, como por exemplo, irritação gástrica, um dos principais efeitos adversos relatados para maioria dos fármacos;

- Emprego de fármacos com meia-vida biológica muito curta;
- O tratamento pode ser facilmente suspenso a qualquer momento, por interrupção da administração;
- Evita-se o tratamento doloroso, como no caso da via intramuscular;
- Maior aceitação e adesão do paciente à terapia (DE LUCIA e OLIVEIRA-FILHO, 2004).

No entanto, a aplicação pela via tópica implica na existência de processos de penetração, permeação, absorção e distribuição pelo organismo ou em parte dele. A absorção de uma substância pela pele, que permea até as camadas mais profundas, entrando inclusive na corrente sanguínea, é denominada absorção percutânea (ANSEL; POPOVICH e ALLEN, 2000; DE LUCIA e OLIVEIRA-FILHO, 2004).

De modo geral, a absorção percutânea de um princípio ativo liberado de um sistema transdérmico ou de preparações dermatológicas depende das propriedades físicas e químicas do fármaco, assim como de seu comportamento quando colocado em um veículo farmacêutico, e também da afecção da pele (ANSEL; POPOVICH e ALLEN, 2000).

Atualmente, sabe-se que, embora um veículo possa não penetrar muito na pele nem transportar o fármaco através dela, ele pode facilitar a absorção do fármaco influenciando na velocidade e grau de penetração. Assim, o aumento no interesse em se utilizar a pele como local de aplicação de fármacos para agirem "à distância" e, portanto, alcançar a via sistêmica, fez com que se aumentasse a procura de substâncias e tecnologias que pudessem ser combinadas com fármacos diversos para promoção da absorção via percutânea com maior eficácia (ANSEL; POPOVICH e ALLEN, 2000; DE LUCIA e OLIVEIRA-FILHO, 2004).

A nanoencapsulação é uma das ferramentas que vêm sendo pesquisadas para encontrar alternativas para a aplicação tópica já que através dela pode-se controlar o tamanho das partículas e a carga superficial dos sistemas carreadores de fármacos, modificar parâmetros como a concentração do fármaco, o coeficiente de partição, o coeficiente de difusão, entre outros fatores que são importantes na absorção percutânea.

1.2.3.2 Pele e mecanismos de penetração e permeação

A pele é o órgão de revestimento externo do corpo que tem por principais funções a proteção dos tecidos subjacentes e a regulação da temperatura somática contendo ainda terminações nervosas sensitivas. É composta por duas principais camadas, epiderme e derme, sendo a hipoderme (camada que se situa logo abaixo da derme faz parte do tecido conjuntivo frouxo) (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Os mecanismos de penetração e permeação cutâneas são importantes porque a pele é uma estrutura que se organiza de maneira anatômica e quimicamente especial a fim de desenvolver sua função barreira, isso limita que fármacos ou ativos cosméticos atravessem-na prontamente (ANSEL; POPOVICH e ALLEN, 2000; AULTON, 2005; CEVC e VIERL U, 2010).

Sendo assim, para que seja possível veicular um ativo até seu sítio de ação permeando as camadas da pele devem-se considerar a existência dos mecanismos de penetração e permeação que regem a liberação transdérmica de ativos. Neste contexto, é importante conhecer a fisiologia e anatomia da pele (suas camadas, constituintes, anexos e apêndices e principais funções), e então deve-se considerar que o ativo pode ter três vias potenciais de entrada no tecido (ilustradas na *Figura 4*):

- (i) via intercelular: o fármaco difunde-se ao redor dos corneócitos, permanecendo constantemente dentro da matriz lipídica;
- (ii) via transcelular: o fármaco passa diretamente através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular intermediária;
- (iii) via apêndices: rota paralela, na qual os fármacos podem ser absorvidos pelo folículo piloso, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas.

Figura 4. Diagrama simplificado da estrutura da pele e vias de penetração/permeação de fármacos. Adaptado de (AULTON, 2005).

Cada uma dessas vias sofre influência de fatores diversos no processo de penetração/permeação de ativos através da pele, como o sebo e o material de superfície, os apêndices, a integridade da pele, a idade da pele, dentre outros.

Partículas coloidais, como os lipossomas e pequenos cristais, são úteis para vetorização pelos folículos pilosos. Em geral, partículas maiores que 10 μm permanecem na superfície da pele, entre 3 e 10 μm concentram-se nos folículos pilosos, e, quando menores que 3 μm , elas penetram nos folículos e no estrato córneo igualmente (AULTON, 2005).

Assim, para eletrólitos e moléculas grandes com baixo coeficiente de difusão, como esteróides polares e antibióticos, e algumas partículas coloidais, os apêndices podem funcionar como a principal via de entrada.

A função barreira da epiderme deve-se principalmente ao estrato córneo constituído de corneócitos, formados por queratina hidratada, embebidos em uma mistura lipoproteica complexa de ceramidas, ácido graxos, colesterol e ésteres de colesterol. A maioria das moléculas que penetram e/ou permeam na pele utiliza essa microrrota intercelular sem utilizar qualquer processo de transporte ativo já que o estrato córneo é um tecido morto (AULTON, 2005).

Nas camadas viáveis da epiderme, outro fator que pode influenciar na penetração do fármaco em estudo, é possibilidade de ocorrer uma metabolização por parte das enzimas

presentes neste local, as quais podem inativar o fármaco ou ativá-lo, no caso de um pró-fármaco.

A camada papilar dérmica contém muitos capilares e o tempo médio de resistência de um fármaco nesta camada pode ser muito pequeno antes que seja absorvido efetivamente. Em geral, as camadas dérmicas mais profundas não influenciam a absorção percutânea. Porém, a derme pode ligar um hormônio como a testosterona, diminuindo a sua absorção sistêmica (AULTON, 2005).

Observando todos esses aspectos pode-se inferir que a fração de ativo que permeia a pele via uma rota específica depende de uma série de fatores que se correlacionam quando uma formulação farmacêutica ou cosmética é aplicada na pele. Sabe-se que a natureza físico-química do fármaco (tamanho, solubilidade e coeficiente de partição), tempo de exposição, sítio de ação e condições da pele, formulação e componentes do veículo modificam temporariamente as propriedades do estrato córneo, facilitando ou retardando a absorção.

Portanto, a modificação dessas variáveis geralmente implica em um grande efeito no fluxo do fármaco. Quando se utiliza um sistema nanoestruturado em uma formulação, pode-se influenciar, concomitantemente, os cinco fatores supracitados, modificando-se assim completamente o perfil de permeação do fármaco veiculado.

1.2.3.3 Sistemas nanoestruturados de aplicação tópica e nanoencapsulação

A nanotecnologia está relacionada às estruturas, propriedades e processos que envolvem materiais com dimensões na escala nanométrica, ou seja, 1 milhão de vezes menor que 1 milímetro (MANSOORI, 2005; OLIVEIRA, 2008).

Pode-se observar na *Figura 5*, construída a partir de dados obtidos em março de 2012 em uma busca no banco de dados ISI Web of Knowledge utilizando os termos *nanoparticles* ou *nanocarriers* e *topical delivery*, que nos últimos 10 anos o número de publicações relacionando nanopartículas com liberação tópica teve um crescimento apreciável.

Isso ocorre, pelo fato de que as nanopartículas podem melhorar aspectos físico-químicos de ativos que não possuem propriedades físico-químicas favoráveis para penetrar/permeiar efetivamente na pele por isso muitas pesquisas focaram-se na busca desses sistemas para aplicação dérmica, como alternativa para a otimização de formulações cosméticas e resolução de problemas como a dificuldade no controle da liberação e determinação da quantidade exata de fármaco que atinge cada camada da pele das formulações tópicas (MULLER et al., 2002a).

Figura 5. Porcentagem de publicações relacionando *nanoparticles or nanocarriers* e *topical delivery* nos últimos 10 anos. Dados obtidos em www.isiwebofknowledge.com acesso em 20/03/2012.

Diferentes estratégias vêm sendo desenvolvidas ao longo dos anos para aumentar a permeação de substâncias através da pele (CEVC e VIERL U, 2010; LOPEZ et al., 2004; MAISCH et al., 2010; MULLER et al., 2002b; OSIECKA et al., 2010; PIERRE et al., 2009; VENA, 2005). Historicamente, em 1960 desenvolveu-se, a tecnologia de microencapsulação, a qual abriu as portas para o desenvolvimento do nanoencapsulação e, conseqüentemente, para a criação dos sistemas carreadores nanoestruturados (RÉ, 2000).

A nanoencapsulação permite a otimização do coeficiente de partição associado a uma forma e/ou tamanho da nanopartícula mais adequados para que o ativo encapsulado em uma nanopartícula atinja a camada da pele onde se deseja a ação. Segundo a lei de Fick, para moléculas onde o pH favorece a ionização, para que se alcance o máximo de fluxo entre a formulação e a pele, a formulação deve estar saturada de ativo. O fato é que nem para todos os ativos consegue-se produzir uma formulação saturada com aspecto aceitável, além de em alguns casos não ser viável trabalhar com um sistema saturado (em função de toxicidade, custo, etc).

Neste contexto, a nanoencapsulação permite obtenção de um sistema com características que atendam a lei de Fick, trabalhando-se com as características hidro ou lipofílicas do carreador e polaridade do sistema e do ativo, e conseqüentemente solubilidade e constante de ionização que favoreçam a permeação sem que a formulação esteja necessariamente saturada.

Os sistemas nanocarreadores também podem influenciar no fator coeficiente de difusão, pois um ativo pode interagir e torna-se imobilizado dentro do estrato córneo sem que tenha atingido o sítio de ação. Assim, se ele estiver encapsulado evita-se a interação com estruturas

indesejáveis. Da mesma maneira, pode-se construir uma nanopartícula carreadora que tenha afinidade e responda a estímulos específicos do sítio de ação, liberando o ativo no local desejado. Para isso, pode-se, por exemplo, modificar as nanopartículas durante o processo de produção com grupamentos químicos específicos que respondam especificamente aos receptores do sítio de ação. Além disso, deve-se trabalhar também considerando fatores como: pH, temperatura e concentração de solutos do sítio, aos quais a nanopartícula será sensível e responderá liberando o ativo.

Considerando o aspecto de aplicação de ativos hidrofílicos, os sistemas nanocarreadores são também uma alternativa interessante já que a principal via de permeação das substâncias é entre as camadas lipídicas lamelares intercelulares por onde permeiam apenas substâncias com certo grau de lipofilicidade. Portanto, no caso de ativos que possuem restrições para aplicação tópica devido à alta hidrofiliabilidade, seria interessante a encapsulação em um sistema nanoestruturado que modifique o balanço hidro-lipofílico, conferindo lipofilicidade suficiente para permeação percutânea para viabilizar o seu uso via tópica.

Exemplos de formulações encontradas na literatura que foram desenvolvidas com intuito de se obter uma permeação ideal do ativo são destacados aqui. No trabalho de Joshi e Patravale (JOSHI e PATRAVALE, 2008) realizou-se uma comparação entre dois sistemas contendo celecoxib, antiinflamatório inibidor seletivo da COX-2, um dos sistemas consistia de uma nanopartícula lipídica e o outro era um gel micelar. O estudo visava avaliar o melhor sistema para uma liberação prolongada do celecoxib e concluiu-se que a formulação contendo um sistema nanolipídico exibiu uma liberação rápida, com início rápido da atividade farmacodinâmica, e posteriormente, liberação prolongada (quando comparado com gel micelar).

Müller et al. (MULLER et al., 2007) relata um estudo de que mostra o aumento do fluxo de permeação de coenzima Q-10 quando encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados. O trabalho de Jennings (JENNINGS et al., 2000) mostra que uma suspensão aquosa de nanopartículas lipídicas contendo 0,5% de retinol manteve 60% do ativo intacto após 3 meses armazenado a 40°C, em contrapartida, em uma emulsão óleo/água armazenada sob as mesmas condições manteve apenas 40% do ativo intacto.

Estes exemplos corroboram a possibilidade de desenvolver sistemas nanocarreadores para melhorar a biodisponibilidade, estabilidade e controle de liberação dos ativos de interesse terapêutico na aplicação tópica. Além disso, os sistemas nanoestruturados podem melhorar as propriedades da formulação de forma a agregar características desejáveis para aplicação dérmica como por exemplo, as propriedades de oclusão estudadas por Dingler, relatadas no

estudo de Muller et al. (MULLER et al., 2007; LACERDA, S. P., 2009), propriedade de hidratação da pele, relatada por Wissing et al. (WISSING e MULLER, 2003), em um estudo com nanopartículas lipídicas sólidas.

Neste contexto, o desenvolvimento de carreadores nanoestruturados de uso tópico, almejando aumentar a estabilidade e melhorar a biodisponibilidade é um desafio da ciência dos colóides que cobre um grande número de aplicações abrangendo desde a veiculação sítio-específica de drogas, a permeação de compostos hidrofílicos até à internalização celular de partículas. Além disso, estes sistemas podem aumentar a estabilidade de vários agentes terapêuticos tais como peptídeos, oligonucleotídeos dentre outros (WU et al., 2001b; MISHRA et al., 2010; ARRUEBO et al., 2007).

Contudo, o sucesso em formular um nanocarreador sítio-específico não consiste somente em atingir o alvo, mas também em veicular a droga em sua forma molecular, mantendo sua atividade farmacológica e permitindo sua interação com o receptor. Fatores como perda de droga do carreador por liberação ou degradação, redução da absorção no alvo, ou redução da atividade termodinâmica do ativo por sequestro de proteínas, não podem ser negligenciados. Caso contrário, os sistemas podem falhar não atingindo o sítio de ação com quantidades suficientes e taxa de liberação e difusão da droga abaixo da concentração ótima, não promovendo o efeito terapêutico requerido (RUENRAROENGSAK et al., 2010).

Os nanocarreadores, devido à sua elevada área superficial, apresentam melhorias na farmacocinética e biodistribuição dos agentes terapêuticos e assim, minimizam a sua toxicidade por acumulação preferencial no sítio de ação. Podem melhorar a solubilidade dos compostos hidrofóbicos e tornando-os adequados para administração parenteral. Além disso, aumentam a estabilidade de vários agentes terapêuticos, como peptídeos, oligonucleotídeos, dentre outros (MISHRA et al., 2010), melhoram a biodisponibilidade do fármaco no sítio de ação e facilitam a internalização celular (TORCHILIN, 2009).

Por outro lado, como uma das vantagens fundamentais dos nanocarreadores é seu tamanho, qualquer circunstância que altere seu *design* inicial de diâmetro poderá causar complicações relativas à especificidade e probabilidade de diminuição da capacidade em alcançar o alvo (RUENRAROENGSAK et al., 2010).

A pele é refratária à maioria das moléculas, especialmente àquelas hidrofílicas, apesar da existência das vias de transporte trans-barreira. Nanocolóides e seus componentes podem modificar a atividade termodinâmica das drogas na superfície da pele, alterando seu perfil de penetração (CEVC e VIERL U, 2010). Várias estratégias têm sido desenvolvidas para otimizar a permeação de ativos na pele, dentre elas o uso de sistemas nanoestruturados de

aplicação tópica. Os nanocarreadores aplicados epicutaneamente podem modular a difusão transdérmica, alterando a atividade da substância e/ou a partição e a difusão da mesma, influenciando a farmacocinética e a biodistribuição através da pele (CEVC e VIERL U, 2010).

1.3.4 Análise da Literatura e Proposta para Solução do Problema

Visando o desenvolvimento de uma proposta inovadora para a veiculação do 5-ALA, em um sistema nanoestruturado de liberação controlada e ação sítio específica, foram propostas algumas possibilidades de formulação, de acordo com as limitações do 5-ALA e considerando os sistemas nanoestruturados anteriormente descritos na literatura. A pesquisa de material científico abrangeu trabalhos patenteados, artigos nacionais e internacionais e trabalhos de mestrado e doutorado, considerando as nanoestruturas existentes e trabalhos que empregam o 5-ALA em sistemas de veiculação.

Nanopartículas Lipídicas Sólidas e Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são sistemas formados por lipídeos sólidos e/ou uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos, preparados através de técnicas como ultra-som, homogenizadores de alta pressão, emulsificação e evaporação do solvente e microemulsificação. Estes sistemas são compostos por excipientes bem tolerados pela pele (matérias-primas usualmente utilizadas em formulações farmacêuticas e cosméticas), promissores para uso tópico (MEHNERT e MADER, 2001).

O processo de aplicação NLS e CLN é muito interessante no que se refere à melhoria da permeação e eficácia terapêutica. Para ativos lipofílicos, os mesmos se apresentam como uma proposta ideal de encapsulação, todavia, limitações com relação à matriz lipídica e à fase externa aquosa (pela qual o 5-ALA tem maior afinidade) dificilmente podem ser contornadas no caso de ativos com alta hidrofiliabilidade. Mesmo assim, a possibilidade de ligação do 5-ALA na superfície de uma partícula, ainda que esta tenha o núcleo lipofílico, mas uma monocamada de revestimento hidrofílica, seria uma estratégia para promover a estabilização, melhorando a permeação e também promovendo uma liberação direcionada na pele. Um trabalho empregando esta abordagem foi relatado em uma patente recente de uso tópico de 5-ALA (SCHMID; BURMEISTER, 2003).

Dupla emulsão cristalizável

As duplas emulsões cristalizáveis constituem um novo sistema de micro reservatórios cineticamente estáveis, concebidos a partir do conceito de dupla emulsão convencional (composta de uma fase interna aquosa, emulsificada em uma fase oleosa e novamente emulsificada em outra fase aquosa), sendo que neste caso a membrana que separa as duas fases aquosas é formada por um componente lipídico sólido à temperatura ambiente. A natureza físico-química do constituinte sólido influencia o tempo de destruição e a capacidade de encapsulação do sistema (GUERY, J., 2006).

Uma proposta inovadora seria desenvolver uma dupla emulsão cristalizável (YANG et al., 2009), que se baseia no princípio de que a fase interna da primeira emulsão (aquosa) irá conter o pró-fármaco e será emulsificada em uma fase externa oleosa, de caráter lipídico e cristalizável a temperatura ambiente. Esta primeira emulsão será dispersa em uma segunda fase aquosa, caracterizando a dupla emulsão (GUERY, J., 2006). Sendo o lipídio sólido à temperatura ambiente, ele formará uma matriz estável contendo a fase interna aquosa líquida e o pró-fármaco, que deverá ser liberado na pele após interação com a matriz lipídica intercelular.

A principal limitação deste processo está no uso de aquecimento para obtenção da dupla emulsão. Além disso, os óleos cristalizáveis possuem um comportamento complexo e após o resfriamento podem se agregar de maneira rápida e irreversível. A agregação pode ser induzida pelo cisalhamento, pela natureza parcialmente sólida do óleo e conexão da interface de um glóbulo com um cristal de um glóbulo vizinho, pela propriedade de superfície, pelos tensoativos utilizados. A energia hidrodinâmica fornecida pelo cisalhamento pode reduzir a barreira repulsiva entre os glóbulos e acelerar o fenômeno de instabilidade (GUERY, J., 2006).

Nanoemulsões

Nanoemulsões são sistemas transparentes ou translúcidos que têm de 50 – 200nm, cineticamente estáveis. No entanto, a estabilidade a longo prazo (sem flocculação ou coalescência aparente) faz das nanoemulsões um sistema diferenciado, com certa estabilidade termodinâmica (TADROS et al., 2004). A alta estabilidade coloidal das nanoemulsões pode ser entendida considerando a estabilização estérica (usando emulsificantes não-iônicos e poliméricos), além de ser afetada pela espessura da camada de emulsificante e pelo raio da gota. Além disso, o tamanho de gota em escala nano causa uma grande redução da força da gravidade e neste caso o movimento browniano sobrepõe esta força, impedindo a cremação

ou sedimentação durante o armazenamento. O tamanho reduzido também previne os processos de floculação e coalescência, desde que as gotas sejam não-deformáveis e inibam as variações da superfície. A espessura do filme de surfactante (relativo ao raio da gota) previne qualquer diluição ou ruptura dos líquidos entre as fases (TADROS et al., 2004).

Estes sistemas são muito atrativos para veiculação de produtos tópicos visto que a grande área superficial permite rápida penetração de ativos, devido ao tamanho reduzido, as nanoemulsões podem promover melhoria da permeação de ativos na pele, podem ser preparadas utilizando menores concentrações de emulsificante que as microemulsões, a transparência e fluidez promovem uma sensação de aplicação agradável (TADROS et al., 2004). Nanoemulsões contendo plasmídeo de DNA (WU et al., 2001a), ceramidas (YILMAZ e BORCHERT, 2005), óleo de citronela (SAKULKU et al., 2009), cânfora, mentol e metil salicilato (MOU et al., 2008), foram relatadas para aplicação tópica.

Emulsões de silicone contendo polidimetilsiloxano (SOMASUNDARAN et al., 2006), têm sido amplamente utilizadas na indústria cosmética, como agente anti-espumante, na liberação controlada de fármacos, lubrificantes, bases fluidas, no entanto muito poucos resultados são publicados na literatura aberta.

O desenvolvimento de uma nanoemulsão de silicone é uma proposta inovadora e ainda não foi relatado na literatura. As mesmas ferramentas utilizadas para entender o mecanismo de estabilização das emulsões hidrocarbônicas e de silicone e das nanoemulsões convencionais podem ajudar no entendimento do comportamento e desenvolvimento destes sistemas.

Silicones e sua estrutura molecular

Silicones constituem uma classe de polímeros híbridos orgânicos/inorgânicos que consistem de átomos de silício alternados com de oxigênio e grupamentos metila (SOMASUNDARAN et al., 2006). A estrutura básica consiste no polidimetilsiloxano e difere consideravelmente das estruturas orgânicas devido às fracas forças atrativas intermoleculares. São caracterizados estruturalmente pelas seguintes propriedades:

- a) os ângulos das ligações Si – O – Si (silício – oxigênio – silício) são maiores que os das ligações C – O – C (carbono – oxigênio – carbono);
- b) o comprimento da ligação Si – O é maior que o das ligações C – C e C – O;
- c) há uma grande liberdade rotacional da ligação Si – O quando comparada à da ligação C – C;

d) há liberdade de rotação dos grupos metila que podem se orientar na direção da interface, que também resulta em redução de volume ou volume em “livre” na cadeia polimérica (BRANDRUP e IMMERGUT, 1989).

Através de substituições de grupos orgânicos ou por cross-linking na cadeia polimérica é possível obter materiais com propriedades específicas. Há muitos novos compostos de silicones que combinam porções hidrofílica (solúvel em água), siloxana (solúvel em siloxano) e hidrocarbônica (solúvel em óleo) na mesma molécula (SOMASUNDARAN et al., 2006). Historicamente são utilizados em sistemas não-aquosos como agente de liberação de moldes e espumas poliuretânicas. Recentemente há um considerável interesse em utilizar os silicones como agente “super” espalhante de sistemas aquosos em superfícies hidrofóbicas, visto que apresenta excelente performance na redução da tensão superficial (SOMASUNDARAN et al., 2006). Neste contexto, os silicones são uma alternativa interessante para a veiculação de um ativo hidrofílico na superfície lipofílica da pele (que correspondente ao estrato córneo).

Os silicones não são afetados por alterações na temperatura, assim como também não sofrem variação da viscosidade e propriedades de cisalhamento com a temperatura. São materiais com estabilidade térmica e resistência oxidativa, possuem baixa tensão superficial e baixa aderência às superfícies. Possuem rigidez dielétrica alta, podendo ser utilizados em aplicações elétricas, além de serem fisiologicamente inertes (O'LENICK, 2000). A estrutura polimérica dos silicones confere flexibilidade e boas propriedades de fluxo, mesmo a baixas temperaturas.

Emulsões de Silicone

Devido ao fato de os silicones serem insolúveis em ambos meios aquoso e hidrocarbônico, o método mais comum de manipulá-los é na forma de emulsões. Dada à cadeia do siloxano ser incompatível com a água, a escolha do emulsificante e do equipamento usado no preparo das emulsões é de extrema importância (O'LENICK, 2000). O emulsificante deve reduzir a tensão interfacial e estabilizar o sistema (podendo ser definido de acordo com o balanço lipofílico-hidrofílico), e as emulsões podem ser preparadas utilizando homogenizador de alta pressão ou moinho coloidal. A escolha do equipamento depende da viscosidade do silicone, da sua quantidade na formulação e do tamanho de gota desejado.

A definição de um sistema emulsificante pode ser feita com base nos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos das moléculas, representados na escala do balanço lipofílico-hidrofílico (HLB). No caso dos silicones este método é um desafio, visto que os compostos

têm características variadas além da presença de uma terceira categoria: grupos silofílicos. Assim, foi proposto O'Lenick (O'LENICK, 2000) um sistema HLB de três dimensões (HLB-3D) que considera as contribuições de cada porção solúvel da molécula: em óleo, água e silicone, de acordo com seus pesos moleculares. Há uma relação entre a estrutura molecular e o valor do HLB, baseada no conceito de energia livre linear (O'LENICK, 2000).

Somasundaran e colaboradores ilustraram diferenças do uso de um emulsificante de silicone ou hidrocarbônico na estabilização de emulsões binárias (contendo duas fases). Basicamente, os emulsificantes hidrocarbônicos podem ser utilizados para estabilização de emulsões de silicone, devendo-se atentar para a concentração de eletrólitos e o tipo de eletrólito utilizado (NaCl, MgCl, brometo de tetrabutilamônio, dentre outros), pois estes têm diferentes efeitos na temperatura de inversão de fases. A presença de grupos de hidrofílicos ou de cadeias alquílicas longas nestes emulsificantes também contribui para a inversão de fases. No caso dos emulsificantes de silicone não-iônicos, possuem grande flexibilidade do esqueleto molecular capazes de se orientar na interface com alta adsorção, promovendo uma estabilização efetiva. A adsorção depende da característica dos grupamentos do emulsificante, que podem ser hidro ou lipossolúveis, de acordo com as modificações estruturais. Já os emulsificantes de silicone iônicos, se comportam como polieletrólitos e podem modificar o comportamento reológico das formulações. Estudos mostraram que aqueles modificados anionicamente estabilizam emulsões de água em silicones cíclicos, com uma proporção de aproximadamente 80% de fase interna aquosa (SOMASUNDARAN et al., 2006).

Nanoemulsão Inversa (água em óleo)

Ainda avaliando a possibilidade de se utilizar uma nanoemulsão na veiculação tópica de ativos hidrofílicos, foi verificada a possibilidade de se trabalhar com uma nanoemulsão inversa. A proposta de produzir uma nanoemulsão inversa (água em óleo) se baseia na perspectiva de que o pró-fármaco ficará na fase interna, havendo a possibilidade de controlar o pH desta fase para melhorar a estabilidade, reduzindo assim a degradação. Além disso, a nanoemulsão facilitará a penetração do 5-ALA na pele. Relatos da literatura mostraram que macromoléculas carregadas em emulsões inversas são possivelmente transportadas via transfolicular ou que a via transepidermal é atingida através de perturbações na permeabilidade do estrato córneo provocadas pelos surfactantes (WU et al., 2001b). Neste trabalho, Wu e colaboradores demonstraram que emulsões com o valor de BHL (balanço hidrófilo-lipófilo) compatível com o sebo normal (produzido pelas glândulas sebáceas da

pele) podem ter o transporte de moléculas hidrofílicas facilitado devido a um processo de co-transporte, mediado principalmente via transfolicular (WU et al., 2001b).

As limitações deste processo estão relacionadas com a etapa de mistura de fases e emulsificação, que normalmente é realizada em altas temperaturas, visto que a degradação do ativo em solução é acelerada nestas condições.

Nanoemulsão anidra

Outra estratégia de veiculação considerada inovadora dentre os sistemas citados é o desenvolvimento de uma nanoemulsão anidra. Trata-se de um sistema nanoestruturado, que limitaria o processo de dimerização (e conseqüente degradação) do 5-ALA através da utilização de um solvente não aquoso para sua solubilização. Tais sistemas, que podem substituir as emulsões convencionais em que a presença de água deve ser evitada, têm sido usados para a preparação de nanopartículas e como modelos para a formação de microestruturas de silicato (SUITTHIMEATHEGORN et al., 2005).

Um fenômeno interessante nos sistemas não-aquosos é a formação do par iônico que formam estruturas com características físicas diferentes dos íons. O par iônico facilita a permeação do ativo ionizado através de membranas hidrofóbicas, baseado na hipótese de que estes ativos podem obter uma neutralidade elétrica e certa lipofilicidade via formação de par iônico. Os pares iônicos formados nos sistemas não aquosos podem permear através de membranas pelos mecanismos de poros e de partição, o que ilustra a possibilidade de facilitação da permeação de ativos ionizáveis por membranas hidrofóbicas (LEE et al., 1988).

Nanopartículas poliméricas

O desenvolvimento de nanopartículas com revestimento polimérico também seria uma alternativa interessante para encapsular o 5-ALA visando estabilidade e melhoria da permeação na pele e da biodisponibilidade. Neste caso, uma das propostas é a encapsulação utilizando um polímero hidrofílico como agente de revestimento ou formador de matriz, através do processo de emulsificação e difusão de solvente.

Entretanto, em uma formulação em que as nanopartículas permaneçam suspensas, é importante garantir que o pró-fármaco não migre para o meio dispersante, o que poderia implicar na sua liberação na própria formulação. A seleção do processo de obtenção das nanopartículas poliméricas deve assegurar a viabilidade do 5-ALA, no que diz respeito ao uso de aquecimento e solventes.

1.4 Proposta de Formulação

Desenvolver um sistema nanoestruturado para veiculação tópica de ativos, visando melhoria da estabilidade e aumento da biodisponibilidade, é um desafio da ciência dos colóides que abrange a veiculação de fármacos com ação sítio-específica e sua liberação controlada e a permeação cutânea de diferentes compostos hidrofílicos. Face a estes desafios muitos sistemas têm sido considerados nos últimos anos, mas nenhum que seja suficientemente potente e estável para a aplicação aqui prevista.

As nanopartículas lipídicas têm a vantagem de ter uma matriz sólida, que armazena o componente ativo podendo modular sua liberação. O estado sólido destes materiais dá-lhes uma reduzida permeabilidade às espécies que contêm. Além disso, as partículas sólidas à base de lipídios reduzem qualquer limitação devido a problemas de toxicidade. Estes materiais são certamente eficazes para a encapsulação de moléculas hidrofóbicas, mas são limitados para garantir a vetorização das espécies hidrofílicas ou para qualquer aplicação que exija compartimento interno aquoso. As duplas emulsões cristalizáveis também seriam sistemas muito viáveis para a veiculação do 5-ALA, tendo como limitação a questão do aquecimento durante o preparo, assim como as nanopartículas poliméricas.

As nanoemulsões têm emergido como o candidato ideal para a aplicação em questão. Mas, devido características do fármaco fotossensível, há necessidade do desenvolvimento de uma emulsão inversa ou mesmo anidra, que evite sua degradação. Além disso, nenhuma aplicação industrial utilizando esta tecnologia foi devidamente desenvolvida.

Neste contexto, propôs-se a utilização de silicones como fase externa da emulsão e de um agente com características polares para solubilização do ativo. Os silicones possuem características diferentes das cadeias de carbono (devido a diferenças no tamanho da ligação silício-oxigênio, barreira rotacional e energia de ligação), apresentando por isso, aumento da liberdade de movimento, forças intermoleculares baixas, propriedades de permeabilidade e hidrofobicidade, inércia e estabilidade.

A proposta deste estudo foi, portanto, ***a concepção de um novo sistema cineticamente estável e eficiente quanto à nanoestrutura, que possa utilizar os benefícios dos sistemas descritos, contornando suas limitações.*** Este novo nanocarreador consiste em estruturas formadas por polímeros emulsificados em um meio não aquoso, na presença de um tensoativo que possui atração pelas duas fases (meio dispersante e agente encapsulante). Propôs-se a utilização de um polímero hidrofílico, dissolvido em fase aquosa e emulsificado em uma fase de silicone, contendo o tensoativo. A proposta une dois conceitos que abrangem a geração de

uma nanoemulsão inversa e a estrutura de nanopartículas poliméricas, além de considerar as limitações associadas ao pró-fármaco em estudo (conforme ilustrado na Figura 6).

Dentre todas as possibilidades avaliadas anteriormente, esperava-se que este sistema tivesse uma vantagem na veiculação do 5-ALA, visto que ficará encapsulado nos nanocarreadores, melhorando sua permeação e sendo a fase externa do sistema não aquosa, evitando a degradação. Após a aplicação tópica, e absorção pelas camadas celulares mais basais (devido ao reduzido tamanho), facilitada pela boa espalhabilidade do silicone, propõe-se um mecanismo de intumescimento dos carreadores com liberação consecutiva do ativo encapsulado, devido à presença de água na pele.

O novo sistema desenvolvido neste trabalho foi denominado *nanocarreadores poliméricos coloidais* (NPCs) e recentemente patenteado (CERIZE N.N.P.; OLIVEIRA, A.M.; RE, M.I.; TEDESCO, A.C., 2010) para aplicações diversas, não apenas em TFD.

Figura 6: Fluxograma descritivo dos pontos críticos no desenvolvimento da formulação.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho foi o desenvolvimento de um sistema nanoestruturado de liberação controlada e veiculação sítio específica para o ácido 5-aminolevulínico, com aplicação na terapia fotodinâmica do câncer visando estabilizar o ativo em uma formulação, melhorar a permeação cutânea e aumentar sua eficácia fotodinâmica.

2.1 *Objetivos específicos:*

Para a realização do estudo em questão o trabalho foi segmentado em etapas com os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Desenvolver um sistema nanocarreador placebo, estável, com potencial de encapsulação de moléculas hidrofílicas, empregando polímeros biocompatíveis;
- ✓ Estudar os componentes da formulação e os parâmetros do processo de formação do nanocarreador;
- ✓ Caracterizar o sistema nanocarreador com relação às propriedades físicas e químicas, incluindo a avaliação da estabilidade física e química;
- ✓ Nanoencapsular moléculas modelo no nanocarreador obtido, incluindo um fármaco anti-inflamatório (salicilato de sódio), uma vitamina (cianocobalamina) e um agente antimicrobiano empregado no tratamento da Leishmaniose (anfotericina B), para elucidação do comportamento da nanoestrutura, estudar o processo de encapsulação e validar a eficácia do sistema na veiculação de ativos hidrofílicos;
- ✓ Nanoencapsular 5-ALA e caracterizar quanto às propriedades físicas, químicas e físico-químicas, incluindo estabilidade física e química;
- ✓ Estudar a performance do nanocarreador contendo 5-ALA com relação à eficiência de encapsulação, perfil de liberação, permeação cutânea, para avaliação das propriedades de liberação controlada e ação sítio específica do ativo veiculado nos sistemas nanoestruturados;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos nanocarreadores contendo 5-ALA em cultura celular (tipo melanoma B16);
- ✓ Avaliar a eficácia fotodinâmica do ativo quando incorporado nos sistemas nanocarreadores com relação à produção de PpIX em cultura celular (tipo melanoma B16).
- ✓ Avaliar a aplicação *in vivo* dos nanocarreadores contendo anfotericina B.

3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

3.1 Reagentes

Acetilcetona, Marca: Sigma-Aldrich, Lote: S90636-499, Acetylketone ReagentPlus®, >=99%

Ácido 5-aminolevulínico – Marca: Dye Pharmaceuticals, ALA> 98%

Ácido Acético Glacial – Carlo Erba (CAS: 64-19-7; Cod: 401415; Lote: 22600; Teor: 99,8%).

Água purificada

Amido modificado – CORN Products Brasil (Snow-Flake G2310)

Cianocobalamina – Fornecido por LTF-Vallée (Lote: M-00923/2004; CAS: 68-19-9);

Cloreto de Sódio PA – ANIDROL (Lote: 15826, Teor: 99,0%)

Cloreto de Sódio, Quimesp Química, (Lote: 07135);

Dimeticone – Dow Corning® 200 Fluid 100 Cst, fornecido por Daltomare (Lote: 05758934);

Formaldeído (solução), Marca: Sigma-Aldrich, Lote: S89507-299, ACS reagente, 37wt.% em H₂O

Hexano – JTBaker (Lote: Y18B11; Pureza: 99,6%; CAS: 9309-03)

Índio – (padrão) Mettler Toledo

n-Hexadecano (CAS: 544-76-3)

Polivinilpirrolidona - Kollidon 30, BASF (Lote: 93-6398; Prod: 066831)

Propilenoglicol; Marca: Synth, Lote: 30446

Quitosana - *Chitosan low molecular weight* – Aldrich (Lote: 10124AB; CAS: 9012-76-4;

Viscosidade 20000CPs);

Salicilato de Sódio – Merck (Lote: 1169607; CAS: 54-21-7; 160.11g/mol; Pureza: 99,5%);

SF1540: Polyether-Functionalized Siloxane; INCI Name: Cyclopentasiloxane (e) PEG/PPG-20/15 Dimethicone. GE silicones (Lote: 42175);

3.2 Equipamentos e Materiais

Agitador mecânico – impelidores tipo “cowels” e naval;

Balança analítica Mettler Toledo;

Banho de ultra-som – Cristófoli Equipamentos de Biossegurança Ltda., modelo Spencer;

DSC 822°, Mettler Toledo;

Equipamentos de Proteção Individual;

Espectrofluorímetro, marca Ocean Optics, fonte LED azul;

Espectrofotômetro UV, modelo Cintra 10, GBC;

Fita adesiva transparente Durex® da 3M;

Homogenizador de Alta Pressão, modelo APV 2000, APV.

Karl Fisher DL38, Mettler Toledo;

Malvern Zetasizer Nano ZS[®];

Malvern Zetasizer[®] 2000, Malvern Instruments Corp;

Membrana GS em éster de celulose, 0,22µm de poro, 47mm de diâmetro, branca, lisa GSWP04700, Lote: BOEA76402, Fabricação: maio/2010, Validade: 3 anos;

Microscópio Eletrônico de Varredura com Emissão de Elétrons por Efeito de Campo (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy* – FEG-SEM), marca FEI, modelo Quanta 3D;

Microscópio Eletrônico de Varredura, Equipamento JEOL JSM 5200;

Microscópio ótico NIKON Eclipse E400, acoplado a Câmera Power Shot A400 Canon;

Millex com membrana LCR PTFE modificada para filtração de solventes orgânicos e aquosos; 0,45 µm; Lote: NR:B4PN50955;

Pinça, tesoura e bisturi para dissecação.

Reator com controle de temperatura e pressão;

Refratômetro *Schmidt + Haensch*[®], modelo DUR-HT;

Seringas de plástico e seringa de vidro;

Sistema com 6 células vertical de difusão MICROETTE[®] - HANSON RESEARCH Co.;

TGA/sDTA 851[°], Mettler Toledo;

Turbiscan[®] Lab, modelo MA 2000, França;

Ultraturrax[®] Heidolph DIAX 900;

Vidraria (balões volumétricos, béqueres, provetas, vials);

Viscosímetro Brookfield, modelo DV III Ultra;

Viscotek 802 DLS – Omnisize 3.0 software;

3.3 Metodologia

PARTE I

3.3.1 Preparo dos Nanocarreadores Poliméricos Coloidais (NPCs) placebo

Na preparação dos NPCs, foram avaliados diferentes polímeros como matriz encapsulante hidrofílica, dentre eles amido, polivinilpirrolidona (PVP) e quitosana. As estruturas químicas dos polímeros são apresentadas na *Figura 7*. Como fase externa da emulsão inicial foi empregado silicone de cadeia linear, com adição de um emulsificante de silicone não-iônico.

Figura 7: Estruturas moleculares dos polímeros: (a) Quitosana, (b) PVP, (c) Amido

O protocolo de fabricação dos NPCs envolveu três etapas de preparação: pré-emulsificação, nanoemulsificação e extração de fase interna, conforme esquematizado na

Figura 8. Na primeira etapa foi formada a pré-emulsão entre as fases interna e externa. A fase interna é composta de polímero: solução aquosa contendo NaCl (1,0% m/m) nas proporções 15:85 (para amido e PVP) e 2:98 (para quitosana), enquanto a fase externa contém dimeticone e emulsificante (3,0% m/m). Nos processos empregando quitosana, utilizou-se 1,0% m/v de ácido acético na fase interna, para solubilização do polímero.

Conforme elucidado na *Figura 8*, segue a descrição de cada etapa do protocolo de fabricação dos NPCs:

Etapa 1. Formação da pré-emulsão através da dispersão da fase interna na fase externa, sob agitação mecânica, com impelidor do tipo hélice “cowles” e após completa adição, utilização de agitador de alto grau de cisalhamento (Ultraturrax® Heidolph DIAX 900) a uma velocidade de 15000 a 26000 rpm em uma faixa de tempo de 2 a 10 min;

Etapa 2. Homogeneização da pré-emulsão formada na Etapa 1 em um homogenizador de alta pressão da marca APV modelo APV-2000, em condições controladas de pressão de homogeneização (bar). Nesta etapa o homogenizador bombeia o líquido com pressão alta (da ordem de 1000 bar), através de uma abertura estreita (na faixa de alguns microns). O fluido é acelerado através de uma distância muito curta com velocidade muito alta (acima de 1000 km/h). Um alto grau de cisalhamento e forças de cavitação rompem as gotículas na faixa de sub-microns (MEHNERT e MADER, 2001).

Etapa 3. A emulsão resultante é colocada em reator à vácuo, com temperatura superior a 45°C e agitação moderada, conectado a um condensador para extração da fase aquosa interna e formação dos NPCs.

O processo foi monitorado através da remoção de pequenas alíquotas após as etapas 1 e 2 e durante a etapa 3, após intervalos pré-determinados de tempo de extração.

Anteriormente à definição do protocolo de fabricação dos NPCs, conforme supracitado, foram realizados alguns ensaios para definição da formulação final, envolvendo dois tipos diferentes de emulsificantes, modificação nas concentrações do emulsificante e do polímero, além de ensaios para avaliação dos parâmetros de processo, abrangendo número de ciclos de homogeneização, redução de uma etapa de processamento (etapa 2) e avaliação do tempo de extração de fase interna.

Figura 8: Representação esquemática do Protocolo de Fabricação dos NPCs.

Caracterização dos nanocarreadores poliméricos coloidais

3.3.2 Teor de Água

A titulação por método de Karl Fisher é uma das técnicas mais importantes para a determinação de água em amostras diversas, baseado na oxidação do dióxido de enxofre pelo iodo em presença de água. A reação ocorre quando a água reage com o reagente Karl Fisher (composto por iodo dissolvido em piridina e metanol anidro) em duas etapas reacionais, no qual uma molécula de iodo desaparece para cada molécula de água presente (As reações encontram-se no Anexo I – REAÇÃO DE KARL FISHER). A determinação do ponto final da reação pode ser visual, isto é, quando for percebido um pequeno excesso de titulante. A viragem ocorre de amarelo para uma coloração parda.

A determinação de água das formulações foi realizada utilizando o equipamento Karl Fisher DL38 Mettler Toledo. As massas de amostras pesadas variaram de 0,1 a 0,5g e o teor de umidade foi fornecido automaticamente pelo equipamento.

3.3.3 Índice de Refração

A medida do índice de refração foi obtida através do refratômetro *Schmidt + Haensch*[®], modelo DUR-HT. O equipamento foi calibrado utilizando água destilada, a 25°C. As amostras foram injetadas na câmara de leitura utilizando uma seringa de 5mL, a temperatura do banho foi ajustada para 25°C e as medidas do índice de refração foram registradas automaticamente pelo equipamento.

3.3.4 Tamanho de partícula

A determinação de tamanho de partícula foi estudada empregando a técnica de “*Photon Correlation Spectroscopy – PCS*”. O desenvolvimento do método foi realizado após testar diferentes equipamentos: Viscotek 802 DLS – Omnisize 3.0 software, Malvern Zetasizer Nano ZS[®], Malvern Zetasizer[®]2000 e Delsa Nano Beckmann Coulter C. Foram estudados também quatro diferentes meios de dispersão para as amostras: óleo mineral, dimeticone, n-hexadecano e hexano. As análises consideraram os valores de viscosidade e índice de refração para cada um dos meios, conforme dados fornecidos pelos fabricantes de cada reagente. Estes parâmetros são utilizados no cálculo matemático que possibilita a conversão do valor de espalhamento de luz em diâmetro médio de partícula, e devem ser informados quando o meio dispersante não é a água.

As diluições foram padronizadas após a verificação da concentração adequada de leitura em cada um dos equipamentos. O preparo de cada amostra foi realizado em triplicata, sendo que as medidas de diâmetro médio foram obtidas a partir da média de seis ou dez leituras (dependendo o equipamento).

3.3.5 Viscosidade

A medida da viscosidade é uma ferramenta valiosa para o controle de qualidade dos ingredientes e do produto final. Ela também permite monitorar mudanças no produto durante o armazenamento e propicia dicas valiosas em relação às mudanças na microestrutura do sistema (LIPPACHER et al., 2004).

A viscosidade dos NPCs foi determinada em um Viscosímetro Brookfield modelo DV-III ULTRA, usando um *spindle* 01, acoplado a um banho termostático mantido em temperatura de 25° C. A agitação empregada variou de 6 a 12 rpm em função do torque obtido. Foram realizadas medidas pontuais da viscosidade e em alguns casos o valor da viscosidade foi acompanhada ao longo do tempo (0 a 30 dias).

3.3.6 Turbidimetria dinâmica

O monitoramento da instabilidade física foi realizado em um analisador óptico Turbiscan® Modelo MA 2000, cujo princípio de funcionamento baseia-se na incidência de uma luz com comprimento de onda fixo, de 850 nm, sobre um tubo de vidro cilíndrico contendo a amostra (solução, emulsão ou dispersão), fazendo-se uma varredura a cada 40 µm, verticalmente, no sentido ascendente e descendente, desde a parte inferior até a parte superior do tubo cilíndrico. O feixe de luz emitido pode ser transmitido ou retroespalhado, dependendo

da interação da luz com o meio. Em se tratando de um sistema dinâmico, tem-se que o perfil das curvas obtidas varia tanto em função do tempo quanto em função da altura, e os perfis obtidos são registrados ao longo da trajetória da luz.

A avaliação da estabilidade das nanoemulsões foi feita durante um período de 7 dias a cada 1 hora de intervalo (para as amostras do lote 1) e por 24 horas a cada 30 minutos (para amostras do lote 3 e 4), à temperatura de 25°C. A estabilidade ou instabilidade da amostra foi determinada pelos perfis de varredura obtidos em função do tempo. Se os perfis de retroespalhamento da luz na amostra nos diferentes tempos se sobrepõem, o produto é estável; em caso contrário, o produto é instável. Posteriormente foram obtidas as curvas de cinética de estabilidade física plotando os valores de *backscattering* de uma região do tubo de amostra pelo tempo.

3.3.7 Morfologia dos NPCs placebo

3.3.7.1 Microscopia ótica

Um monitoramento parcial das etapas do protocolo de fabricação foi realizado através da visualização das alíquotas retiradas durante o processamento por microscopia ótica. Foram feitas imagens em microscópio ótico, nos aumentos de 200 e 400x, para as 3 etapas do processo: após pré-emulsificação, após homogeneização de alta pressão e após extração de fase interna.

3.3.7.2 Microscopia eletrônica de varredura

O desenvolvimento da metodologia de caracterização morfológica foi realizado empregando a técnica de microscopia eletrônica de varredura – MEV (marca JEOL, modelo JSM 5200) e microscopia eletrônica de varredura com emissão de elétrons por efeito de campo (em inglês *FEG-SEM*, modelo Quanta 3D, FEI).

Foi realizado um estudo para investigação da melhor condição de visualização dos NPCs através de MEV. Nos primeiros ensaios, as amostras foram depositadas sobre uma fita de cobre colada em uma lâmina de vidro. Procedeu-se a secagem do material à vácuo por 24 horas. A amostra foi então recoberta com ouro, através de metalização por 2 minutos. Foram feitas as microscopias utilizando o MEV convencional, empregando uma tensão de 10,0kV e aumentos (magnitude) de 50, 250, 1500 e 5000x.

Posteriormente, foi testado o mesmo procedimento de preparo, desta vez empregando o FEG-SEM para obtenção das imagens. Nos ensaios posteriores o material foi lavado com

30,0mL de hexano e filtrado em membrana de 0,22 μ m de diâmetro de poro. As membranas foram secas em dessecador à vácuo por 48 horas e então coladas à fita de cobre para metalização com ouro.

3.3.8 Caracterização térmica

3.3.8.1 TG e DTA

As curvas termogravimétricas dos materiais foram obtidas através da termobalança TGA/sDTA 851° da Mettler Toledo. As condições experimentais empregadas foram: razões de aquecimento de 10°C/min, da temperatura ambiente até 1000 °C; atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 80 mL/min; cadinho de alumina e massas de amostra entre 5,0 e 10,0mg. Para a mesma corrida de TG também foram obtidas as curvas DTA das amostras (visto que o equipamento realiza os métodos TG e DTA acoplados).

3.3.8.2 DSC

As curvas DSC do pró-fármaco foram obtidas através da célula DSC 822° da Mettler Toledo, sob as seguintes condições experimentais: atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 80mL/min; razão de aquecimento de 1, 10, 20 e 80°C/min, no intervalo de temperatura de 0 a 300 °C; cápsula de alumínio parcialmente fechada e massa de amostra entre 3,5 e 6,5mg. As curvas das formulações contendo os NPCs e dos agentes encapsulantes, utilizaram massa de amostra de aproximadamente 10,00 mg, atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 80mL/min; razão de aquecimento de 10°C/min, no intervalo de temperatura de 25 a 300 °C. A célula DSC foi calibrada antes dos ensaios no eixo de temperatura utilizando padrão de índio metálico ($T_{\text{fusão}} = 156,6$ °C) com pureza de 99,99%. Para a quantidade de calor empregou-se o $\Delta H_{\text{fusão}}$ do índio (28,7 Jg⁻¹).

PARTE II

3.3.9 Incorporação de ativo modelo nos NPCs

A fim de avaliar o potencial de aplicação dos NPCs como sistema de liberação de fármacos, dois ativos hidrofílicos foram escolhidos como modelos para estudar o comportamento de encapsulação: salicilato de sódio (SS) e cianocobalamina (um dos componentes do complexo de vitaminas B12).

O protocolo de fabricação dos NPCs contendo os ativos manteve-se conforme descrito anteriormente no item “3.3.1. *Preparo dos nanocarreadores poliméricos coloidais (NPCs)*”. Os ativos modelo foram dissolvidos na fase interna na proporção massa de ativo: polímero (1:8) no caso da cianocobalamina e (2:7) no caso do salicilato de sódio e procedeu-se com as etapas 1, 2 e 3 do protocolo de fabricação, conforme pode ser visualizado na *Figura 9*. As formulações foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, teor de água, viscosidade e morfologia seguindo as metodologias previamente descritas para os NPCs-placebo (sem ativo). E também com relação ao perfil de liberação *in vitro* e eficiência de encapsulação.

Figura 9: Representação esquemática do Protocolo de Fabricação dos NPCs contendo ativo.

3.3.10 Eficiência de encapsulação de ativo modelo

Para o doseamento do teor de ativo encapsulado foi desenvolvida uma metodologia de extração do ativo dos nanocarreadores e posterior quantificação do ativo encapsulado. Para tal, uma determinada massa de formulação (aproximadamente 0,5g) foi exatamente pesada e

dispersa em 10,0mL de hexano. A dispersão foi filtrada em membrana de 0,22µm de diâmetro de poro e lavada com 20,0mL de hexano. A membrana foi seca e mergulhada em um frasco no qual foram adicionados 10,0mL de água. A quantificação do teor de ativo encapsulado nos NPCs foi realizada através de espectrofotometria no UV, nos comprimentos de onda 232nm para cianocobalamina e 301nm para o salicilato de sódio (definidos após a realização de um espectro de varredura de 200 a 900nm e seleção dos comprimentos de onda de maior absorção).

As concentrações de salicilato de sódio e cianocobalamina encapsulados foram determinadas a partir da equação da reta obtida pelas curvas de calibração dos respectivos ativos, sendo todas as leituras realizadas em triplicata. O mesmo método foi utilizado para as formulações “placebo” (sem salicilato de sódio ou cianocobalamina), para verificação e eliminação de possíveis interferentes. As metodologias de quantificação foram baseadas também nos métodos farmacopéicos para determinação do teor dos dois ativos modelo (USP-33, 2010).

A eficiência de encapsulação (EE) de salicilato de sódio e de cianocobalamina nos NPCs foi calculada considerando a massa de ativo adicionada no preparo da formulação ($m_{teórica}$) e a massa experimental calculada ($m_{experimental}$) através da concentração obtida após quantificação no UV, conforme a fórmula:

$$EE = [m_{experimental} \times 100] / m_{teórica}$$

3.3.11 Caracterização dos NPCs contendo ativo

3.3.11.1 Perfil de Liberação dos NPCs contendo ativo

O perfil de liberação dos NPCs foi monitorado em um período de 48 horas, através da medida da absorção no UV, conforme metodologia empregada na quantificação. Uma massa de aproximadamente 1,50g de formulação foi aplicada em uma membrana de papel e imersa em erlenmeyers fechados, nos quais foram adicionados 100,0mL de água. O sistema foi mantido sob leve agitação, a 37°C. Foram coletadas alíquotas de 3,0mL em intervalos de tempo pré-determinados e as concentrações monitoradas por absorção no UV. A porcentagem de ativo liberada foi plotada em função do tempo (em horas), com os respectivos desvios-padrão. O ensaio de liberação foi realizado em triplicata e as leituras das medidas de absorção em quintuplicata.

3.3.11.2 Caracterização por Espectroscopia de Absorção no Infra-Vermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A identificação qualitativa dos NPCs contendo ativo e das matérias-primas empregadas na fabricação dos mesmos foi realizada utilizando a técnica de FTIR conforme diretrizes da norma ASTM E1252-98 (Reap. 2007) “Standard Practice for General Techniques for Obtaining Infrared Spectra for Qualitative Analysis”.

Os espectros de FTIR, com varredura entre 4000 cm^{-1} e 700 cm^{-1} , foram obtidos no modo de reflexão total atenuada em um espectrofotômetro da marca Thermo Scientific, Nicolet, modelo 6700 FT-IR.

PARTE III

3.3.12 Incorporação de 5-ALA nos NPCs

O protocolo de fabricação dos NPCs contendo o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) reproduziu aquele descrito para o sistema contendo os ativos modelo. O 5-ALA foi dissolvido na fase interna aquosa na proporção massa de ativo: polímero (1:8) e procedeu-se com as etapas 1, 2 e 3 do protocolo de fabricação (conforme descrito na *Figura 9*). Também foi avaliada uma segunda condição de formulação empregando a massa de ativo: polímero (0,5: 8,5).

As formulações foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, teor de água, viscosidade e morfologia seguindo as metodologias previamente descritas para os NPCs-placebo (sem ativo). E neste caso, sendo o foco principal do trabalho, os nanocarreadores contendo 5-ALA (NPC-ALA) foram avaliados com relação ao perfil de liberação *in vitro*, eficiência de encapsulação, estabilidade física e química, taxa de permeação cutânea *in vitro*, eficácia fotodinâmica e citotoxicidade.

3.3.13 Quantificação de 5-ALA e eficiência de encapsulação

A extração do 5-ALA dos NPC-ALA procedeu conforme método empregado nas formulações contendo ativo modelo (através de dispersão em hexano e filtração em membrana 0,22µm de diâmetro de poro).

Para a quantificação do 5-ALA foi empregada metodologia anteriormente descrita e validada (VENA, 2005; OISHI et al., 1996; KAJIWARA et al., 1993). O pró-fármaco foi extraído dos nanocarreadores e submetido à reação de derivatização empregando formaldeído e acetilcetona, para geração de um composto fluorescente, que foi quantificado por espectroscopia de fluorescência. Sendo a estequiometria da reação 1:1 (5-ALA: composto fluorescente), a concentração do composto fluorescente medida refere-se à concentração de 5-ALA no meio.

A metodologia é baseada no princípio de que compostos amínicos reagem com acetilcetona e formaldeído formando um composto fluorescente identificado como 2,6-diacetil-1,5-dimetil-7-(2-carboxietil)-3H-pirrolizina, conforme apresentado na *Figura 10* (VENA, 2005; OISHI et al., 1996; KAJIWARA et al., 1993).

A solução de acetilcetona foi preparada misturando-se 15,0mL de acetilcetona, 10,0mL de etanol e 75,0mL de água destilada, sob agitação ao abrigo de luz. A solução de

formaldeído 10% (v/v) foi preparada pela diluição do mesmo para concentração indicada, sendo que esta solução tem estabilidade não superior a 4 semanas.

A reação de derivatização foi realizada em tubos âmbar, através da mistura de 3,5mL de solução de acetilcetona; 0,5mL de solução de formaldeído e 0,05mL de solução contendo 5-ALA. A mistura final foi agitada em agitador de tubos por 5 segundos e aquecida em banho seco a $100,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. Os frascos foram resfriados na temperatura ambiente, ao abrigo de luz. Após 3 horas de resfriamento foi realizada a leitura de fluorescência empregando as intensidades de 466nm no comprimento de onda de emissão e 378nm no comprimento de onda de excitação. Para cada dia de experimento foi realizada uma curva de calibração para padronização das condições experimentais.

Adicionalmente, foi realizada uma co-validação da metodologia de quantificação de 5-ALA por espectrofluorimetria, obtendo-se os parâmetros de linearidade, limite de detecção, precisão intermediária, robustez e especificidade.

Figura 10: Ilustração esquemática da reação de formação do composto fluorescente a partir da derivatização do 5-ALA

Todos os ensaios de quantificação de 5-ALA, incluindo eficiência de encapsulação, estabilidade química, perfil de liberação *in vitro* e permeação cutânea *in vitro* foram realizados em sextuplicata. O mesmo método foi utilizado para a formulação “placebo” (sem ativo), para verificação e eliminação de possíveis interferentes.

A eficiência de encapsulação (EE) de 5-ALA nos NPC-ALA foi calculada considerando a massa de ativo adicionada no preparo da formulação ($m_{\text{teórica}}$) e a massa experimental calculada ($m_{\text{experimental}}$) através da concentração obtida após quantificação por espectroscopia de fluorescência, conforme a fórmula a seguir:

$$\text{EE} = [m_{\text{experimental}} \times 100] / m_{\text{teórica}}$$

3.3.14 Estabilidade química do NPC-ALA

O acompanhamento da estabilidade química do 5-ALA encapsulado nos NPCs foi realizado do tempo 0 horas (desde o dia inicial da formulação dos nanocarreadores) até 24 meses. Foi realizada extração e quantificação do pró-fármaco conforme metodologia descrita na *Eficiência de encapsulação de 5-ALA* e os teores foram monitorados nos prazos de 0, 7, 30, 60, 75, 180, 365, 635 dias, na temperatura de 25,0°C, sendo o material armazenado em frascos âmbar.

3.3.15 Perfil de Liberação dos NPCs contendo 5-ALA

A cinética de liberação do 5-ALA dos NPCs foi monitorada em um período de 5 horas, através da quantificação pela reação de derivatização e medida da fluorescência (conforme descrito no item 3.3.13 *Quantificação de 5-ALA e eficiência de encapsulação*). Uma massa de aproximadamente 2,00g de formulação foi aplicada em uma membrana e imersa em erlenmeyers fechados, nos quais foram adicionados 100,0mL de tampão fosfato pH 5,0. O sistema foi mantido sob agitação de 60rpm, a 37°C. Foram coletadas alíquotas de 0,05mL em intervalos de tempo pré-determinados e as concentrações monitoradas pelo método de quantificação supracitado. A porcentagem de ativo liberada foi plotada em função do tempo (em horas), com os respectivos desvios-padrão. O ensaio de liberação foi realizado em sextuplicata.

3.3.16 Estudo de permeação cutânea dos NPCs contendo 5-ALA

A taxa de permeação cutânea do 5-ALA encapsulado nos NPCs foi avaliada através do estudo em célula vertical de difusão (CVD), Microette Plus-Hanson Research[®], empregando membrana animal (pele de orelha de porco) como membrana permeante. O estudo abrangeu as etapas de:

- (i) preparo da membrana animal (pele de orelha de porco);
- (ii) acompanhamento da cinética de permeação em CVD;
- (iii) avaliação da retenção cutânea no estrato córneo;
- (iv) avaliação da retenção cutânea na (epiderme + derme).

Preparo das Membranas Permeantes

As membranas naturais utilizadas neste estudo foram obtidas pela dissecação de peles de orelhas de porcos, jovens e recém-abatidos, não escaldados. Inicialmente as orelhas foram lavadas em água purificada sendo o excesso de água retirado com papel absorvente. Após a

seleção das peles íntegras (livres de lesões, arranhões ou manchas) os pêlos foram cortados com tesoura. Em seguida com auxílio de pinça anatômica e bisturi, procedeu-se a dissecação extraíndo-se a parte externa da pele (estrato córneo, epiderme e derme), e descartando a hipoderme (tecidos subcutâneos gordurosos presentes abaixo da derme). Após limpeza inicial foi realizada dermatomização das peles, obtendo membranas de aproximadamente 800µm.

As amostras de peles dissecadas foram cortadas em tamanhos padronizados e adequadas à utilização na área de permeação (área de exposição de 1,54cm²), e então acondicionadas em filme plástico e papel alumínio, e mantidas em congelador até o momento do uso.

Na data de realização do ensaio, as peles foram retiradas do congelador e descongeladas à temperatura ambiente, imersas rapidamente em água destilada, e posteriormente cada fragmento de pele colocado em uma CVD, com o estrato córneo voltado para o compartimento doador e a derme voltada para o compartimento receptor, o qual foi preenchido com a solução receptora, tendo-se o cuidado de evitar a formação de bolhas.

Estudo de permeação cutânea

No estudo de permeação cutânea foi empregada uma solução do pró-fármaco puro em propilenoglicol (1mg/mL) como controle (VENA, 2005; STELUTI, 2006), em comparação com a formulação de NPC-ALA que estava sendo estudada. Como solução receptora foi empregado tampão fosfato pH5,5, conforme referenciado em Stelutti, 2006 e Vena, 2005.

O ensaio foi conduzido à temperatura de 37°C ± 0,5°C e 300rpm, com tomadas de amostra 1g de formulação (dose finita (KIELHORN et al., 2005), espalhadas uniformemente sobre a membrana permeante colocada sobre a área disponível para a permeação (2,34cm²) nas células de difusão, sendo então o sistema de agitação acionado. O experimento foi conduzido em condições de aplicação não empregando sistema de oclusão.

Amostras de 1mL da solução receptora foram coletadas nos intervalos de tempo de 0, 0,5; 1, 2, 3, 4, 5 ,6 e 7, sendo repostado igual volume de nova solução receptora, mantendo-se desta maneira o volume constante no compartimento receptor.

As amostras coletadas foram analisadas por espectrofluorimetria nas condições analíticas já especificadas em no item 3.3.13 *Quantificação de 5-ALA e eficiência de encapsulação* a partir da curva de calibração do 5-ALA na solução receptora.

Retenção no estrato córneo - tape stripping

Após o experimento de permeação cutânea *in vitro* (24h) as peles foram retiradas das CVD, as áreas expostas isoladas e as camadas do estrato córneo removidas através de fitas

adesivas (aproximadamente 20 batidas), procedimento chamado *tape stripping*. As fitas foram dissolvidas em metanol e submetidas a sonicação para garantir a completa extração do pró-fármaco acumulado. A concentração de pró-fármaco retida no estrato córneo foi quantificada por espectroscopia de fluorescência.

Estudos de retenção cutânea in vitro na (epiderme sem estrato córneo + derme)

Após a retirada do estrato córneo, a área de exposição foi recortada e triturada, e os fragmentos obtidos misturados com metanol e submetidos a sonicação para liberação do 5-ALA retido. A concentração de pró-fármaco retida na (epiderme + derme) foi então quantificada por espectroscopia de fluorescência.

3.3.17 Estudos biológicos in vitro – cultura celular

3.3.17.1 Crescimento e manutenção da cultura de células da linhagem neoplásica de melanoma de camundongo (B16- F10)

As matrizes de células B16-F10 ($0,5 \times 10^6$ células/mL) estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas a 37°C e adicionadas a um frasco de cultura estéril de 75 cm² (Corning) contendo 10,0 mL do meio completo (RPMI 1640). O frasco de cultura foi colocado em uma incubadora a 37°C com 5,0 % de CO₂ durante 48 horas. Após este período, realizou-se a primeira repicagem de células.

As células crescem aderidas às garrafas de cultura celular, portanto no processo de repicagem inicialmente o meio de cultura foi descartado e a garrafa de cultura foi lavada com PBS, foram então utilizados 5,0 mL de uma solução de tripsina durante 3 minutos para soltar as células. Em seguida, 6,0 mL de meio de cultura foram adicionados à garrafa para neutralizar a ação da tripsina. O conteúdo da garrafa de cultura foi vertido em um tubo de 15,0 mL P15 para ser centrifugado a 25°C em velocidade de 1200 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso e homogeneizado em meio completo, e distribuídas em frascos de cultura celular novos de 75 cm². A troca de meio destas células foi realizada sempre que necessário.

3.3.17.2 Controle da integridade da membrana celular

Este procedimento é fundamental para os estudos subsequentes os quais tem como fator determinante o número de células em suspensão.

Após centrifugação, ressuspendeu-se o pellet celular com o meio de cultura completo, aliquotou-se 100 µL da suspensão homogênea de células, fez-se uma diluição 1:1 com uma solução de Azul de Tripán 0,4%. Este corante é específico para se testar a integridade de membrana celular, cujo mecanismo de interação é baseado na carga residual negativa do corante que atua diretamente, por afinidade iônica, na região citoplasmática intracelular de membranas alteradas, como descrito por Freshney em 1987 (FRESHNEY et al., 1986).

Outro método para avaliar a atividade celular, é o método que se baseia no uso do corante (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium), conhecido como teste do MTT. Este ensaio é apropriado para se determinar espectrofotometricamente o número total de células como função da atividade mitocondrial intacta, ou seja, células vivas.

Inicialmente, as células B16-F10 foram removidas da incubadora, sendo levadas à capela de fluxo laminar e distribuídas nas placas de poços múltiplos (96 poços). A estas células foram adicionados 80 µL da solução de MTT (5 mg/ml em Hank's) em 420 µL de RPMI sem fenol e sem soro fetal bovino. As células foram incubadas por 4h em uma incubadora a 37°C com 5,0 % de CO₂. Após este período retirou-se a solução de MTT e adicionou-se 500 µL de isopropanol para completa solubilização do formazan formado.

O teste foi finalizado através de medidas espectrofotométricas basal, da absorbância no comprimento de onda de 560 nm, descontando-se a absorbância de fundo a 690 nm (FRESHNEY et al., 1986). Estas medidas foram determinadas utilizando-se um leitor espectrofotométrico para protocolos de ELISA, modelo Safira2 da TEKAN.

3.3.18 Estudos de citotoxicidade

Uma suspensão de $0,5 \times 10^6$ células/mL da linhagem B16-F10 foi preparada inicialmente. As células foram então incubadas em placas de petri de 24 poços, com meio completo. Após as células atingirem confluência (de 24 a 48 horas), o meio foi retirado e as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS). Logo em seguida a retirada do tampão foram adicionadas as soluções em estudo para serem testadas em um meio específico contendo 3% de soro fetal bovino no volume final de 8 mL. Depois de 4 horas de incubação das células, as soluções foram retiradas, lavadas novamente com PBS e foi adicionado o

respectivo meio de cultura completo. Depois de 24 horas o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 80µL da solução de MTT 5 mg/mL. As células foram incubadas por mais 4 horas e 420µL de isopropanol foram acrescentados para completa solubilização do formazan.

3.3.18.1 Determinação da citotoxicidade dos NPC-ALA

A viabilidade celular dos NPC-ALA foi realizada pelo método de MTT, conforme descrito no item anterior. O tratamento foi realizado utilizando nanocarreadores placebo (NCv), e também variando a concentração das NPC-ALA de 0,01 a 0,06 mg de ALA/mL de meio. O objetivo deste estudo foi avaliar a quantidade máxima de NPC-ALA que não seria tóxica para as células.

3.3.18.2 Quantificação da produção endógena de PpIX em células B-16

Foram realizados estudos fluorimétricos para a quantificação da PpIX produzida. As células foram incubadas com as NPC-ALA com concentrações de 0,01 a 0,05 mg/mL por um período de 4 horas, sendo posteriormente lavadas com PBS e removidas com tripsina. Em seguida, estas foram centrifugadas a uma velocidade de 1200 rpm por 5 minutos, ressuspensas em uma solução de metanol e água 9:1, agitadas em vortex por alguns segundos e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e a produção de PpIX foi quantificada através das medidas de fluorescência desta solução. O comprimento de onda de excitação utilizado foi 400 nm e a emissão foi monitorada em 630 nm, na temperatura de 37°C. A quantidade de PpIX produzida foi determinada correlacionando as intensidades de emissão de fluorescência à equação da reta determinada pela curva analítica obtida previamente.

3.3.18.3 Estudo de fototoxicidade das NPC 5-ALA

Estes estudos foram realizados utilizando células B16-F10. As células foram incubadas com NPC-ALA (0,05 mg/mL). Para aplicação da luz foi adicionado o meio de cultura RPMI 1640 sem fenol, irradiando na potência máxima de 300 mW com dose de luz de 3 J/cm² utilizando como fonte luminosa o sistema diodo-laser Eagle modelo Heron. Após o tratamento, o método de MTT foi realizado para avaliar a resposta celular.

PARTE VI

3.3.19 Outras aplicações: Incorporação de Anfotericina B e caracterização

Após desenvolvimento do protocolo de fabricação dos NPCs e das metodologias de caracterização, o sistema nanocarreador foi avaliado para outras aplicações, distintas daquela inicialmente prevista. Foram realizados alguns experimentos com o fármaco anfotericina B, de aplicação no tratamento da Leishmaniose, visando validar a eficiência dos NPCs em encapsular diferentes ativos, e complementar a elucidação do comportamento do sistema na liberação controlada de ativos.

Este estudo foi realizado em colaboração com o Laboratório de Imunofarmacologia, do Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Os ensaios foram realizados pelo aluno de doutorado Wallace (sob coordenação da Dra. Bartira Rossi Bergmann).

O protocolo de fabricação dos NPCs contendo o anfotericina B (Anfo B) reproduziu aquele descrito para o sistema contendo os ativos modelo (conforme descrito na *Figura 9*), sendo que neste caso a proporção mássica ativo: polímero foi de (0,5 : 8,5), em função da solubilidade do composto. A formulação foi caracterizada quanto ao tamanho de partícula, teor de água, viscosidade e morfologia seguindo as metodologias previamente descritas para os NPCs-placebo (sem ativo).

Neste caso também foram avaliadas a eficiência de encapsulação, o perfil de liberação *in vitro*. Para a eficiência de encapsulação empregou-se o método de extração descrito para os NPC contendo ativo modelo, e a quantificação conforme método farmacopeico (USP-33, 2010). O teor de anfotericina B foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), empregando coluna C18 (marca Shimadzu), temperatura do forno de 30°C, fluxo de fase móvel de 1mL/min, detecção empregando detector DAD, no comprimento de onda de 416nm. O volume de injeção foi de 10µL e a fase móvel composta de ácido fosfórico (0,001% m/m): Acetonitrila (60: 40). A curva de calibração foi construída para as concentrações de 25; 50; 100; 150 e 500 µg/mL.

A cinética de liberação *in vitro* do NPC contendo anfotericina B foi monitorada em um período de 5 horas, através da quantificação por HPLC conforme descrito anteriormente. Uma massa de aproximadamente 2,00g de formulação foi aplicada em uma membrana e imersa em erlenmeyers fechados, nos quais foram adicionados 150,0mL de água contendo 0,5% de polissorbato 80. O sistema foi mantido sob agitação de 60rpm, a 37°C. Foram coletadas

alíquotas de 100 µL em intervalos de tempo pré-determinados e as concentrações monitoradas por HPLC. A porcentagem de ativo liberada foi plotada em função do tempo (em horas), com os respectivos desvios-padrão. O ensaio de liberação foi realizado em triplicata.

As formulações de NPC contendo anfotericina B foram estudadas quanto à redução da lesão de leishmaniose cutânea murina, à carga parasitária da lesão e quanto à toxicidade renal, hepática e cardíaca, em colaboração com o Laboratório de Imunofarmacologia, da UFRJ. As metodologias, os resultados obtidos e aqui apresentados são de comum acordo entre as partes colaboradoras.

3.3.20 Estudos biológicos *in vivo*

3.3.20.1 Infecção de camundongos com *Leishmania amazonensis*-GFP

Os camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 2×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* GFP na fase estacionária, pré-lavadas 3x com PBS para retirada do soro, em um volume final de 10 µL. Os animais foram mantidos juntos e os grupos foram aleatoriamente separados no início do tratamento. O curso da infecção foi acompanhado pelo tamanho da lesão medido com paquímetro pela diferença entre a espessura da orelha infectada e a não infectada.

3.3.20.2 Eficácia das formulações na leishmaniose cutânea

Camundongos BALB/c infectados na orelha com promastigotas de *L. amazonensis* GFP na fase estacionária e no dia 27 de infecção, os animais foram aleatoriamente separados em grupos. O grupo tratado com NPC-Anfo B recebeu duas doses da formulação via subcutânea com dose 4µg de Anfotericina B em 10µl. O grupo tratado com Anfotericina B livre e Anfotericina B Lipossomal, recebeu duas doses semanais de 4µg do fármaco. Os controles receberam duas administrações de 10µl de PBS ou NPC-placebo. No tratamento tópico, o grupo tratado com NPC-Anfo B recebeu duas doses diárias da formulação com doses de 8µg de Anfotericina B em 20µl de formulação. Como controle, acrescentamos Anfotericina B livre à formulação de NPC vazia na mesma concentração do fármaco que foi encapsulado, o grupo recebeu duas doses diárias dessa formulação (NPC + Anfotericina B).

O curso da infecção foi acompanhado pelo tamanho da lesão medido com paquímetro. Ao final do experimento, as orelhas dos camundongos foram maceradas em PBS e transferidas para placa negra, onde a carga parasitária foi verificada por unidades arbitrárias de fluorescência em fluorímetro de placa (excitação 485nm, emissão 528nm) (FLx800, Bio-Tek Instruments, Inc) ou por análise de diluição limitante (LDA).

3.3.20.3 Avaliação da carga parasitária in vivo por fluorimetria.

Ao final de cada tratamento in vivo a carga parasitária foi avaliada por fluorimetria conforme descrito anteriormente (DE BOECK et al., 2006). Ao final dos experimentos, os animais foram sacrificados e a orelha infectada foi cortada, desinfetada em álcool 70% e macerada em peneira de inox com 1mL de PBS e transferida para um tubo eppendorf. Após 10 minutos de decantação, 200µL do sobrenadante foram transferidos para microplaca negra, para a leitura da intensidade de fluorescência utilizando fluorímetro de placa Bio-Tek Powerwave XS no comprimento de onda de excitação de 435nm e emissão de 538nm. A leitura da orelha não infectada foi usada como valor de autofluorescência e descontada dos valores das patas infectadas, sendo expressos em unidades de fluorescência (UF).

3.3.20.4 Avaliação da carga parasitária in vivo por análise da diluição limitante (LDA).

Ao final dos experimentos in vivo, os animais foram sacrificados e as orelhas foram retiradas, desinfetadas em álcool 70% e maceradas em meio M199 (1 mL/orelha), como descrito em 3.3. A carga parasitária dos linfonodos drenantes da lesão também foi avaliada por este método. Foi feita uma pré-diluição do macerado a 1:500 e a partir desta, foram feitas 16 diluições seriadas a 1:4, em meio M199 com 10% de HIFCS, em triplicatas, em placas de 96 poços. As placas foram incubadas em estufa a 26°C e após 10 dias observadas ao microscópio óptico, quanto ao crescimento de promastigotas. O número original de amastigotas/orelha foi calculado tomando como referência a última diluição em que se verificou o crescimento de promastigotas.

3.3.20.5 Avaliação da toxicologia hepática, cardíaca e renal.

Ao final dos tratamentos, os animais foram sacrificados, o sangue foi coletado por punção retro-orbital e o soro separado para a dosagem das transaminases alanino amino transferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e de creatinina como indicativo de toxicologia hepática, cardíaca, e renal, respectivamente, utilizando kits comerciais (TORRES-SANTOS et al., 2003). Os controles positivos receberam por via intraperitoneal 200µL de tetracloreto de carbono (CCl₄) a 1% em óleo de amendoim 3 dias antes da coleta do soro. Os controles negativos foram animais não-infectados e não-tratados.

3.3.20.6 Análise estatística.

Os resultados foram analisados pelo método t de Student nos experimentos com dois grupos. Em experimentos com três ou mais grupos, foi utilizado o One-way Anova com pós-teste Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I

4.1 Desenvolvimento do Protocolo de Fabricação dos NPCs

A estratégia de veiculação do 5-ALA em um nanocarreador polimérico coloidal (NPC) se apóia no princípio de que a utilização de um meio dispersante não aquoso inibe a protonação do grupamento amino, inibindo, conseqüentemente, o processo de dimerização do qual resulta a formação dos produtos de degradação e a perda de atividade terapêutica (KALISZEWSKI et al., 2007).

Sendo assim, com o objetivo de obter um sistema anidro ou com teor de água reduzido, foi proposto o preparo de uma nanoemulsão inversa, utilizando silicone como fase contínua (externa) e como fase dispersa (interna), uma solução aquosa contendo um agente encapsulante, sendo a água posteriormente removida. Inicialmente foram obtidas formulações “placebo”, para estudar o comportamento do sistema de veiculação no que concerne ao mecanismo de formação dos carreadores, tamanho de partícula, morfologia e estabilidade física. Posteriormente, foi avaliado o potencial de aplicação dos sistemas desenvolvidos através da incorporação de ativos modelo de caráter hidrofílico, visando estudar o comportamento de encapsulação.

O protocolo de fabricação desenvolvido para os nanocarreadores poliméricos coloidais foi composto de três etapas. A primeira etapa inclui a pré-emulsificação da fase interna aquosa contendo o polímero na fase externa de silicone, empregando homogeneização por turrax. Na segunda etapa a pré-emulsão sofre redução de tamanho (processo descrito como nanoemulsificação no esquema da *Figura 9*) através de homogeneização de alta pressão. Durante a terceira etapa, a fase interna é parcialmente extraída, através de condições controladas de temperatura e pressão, induzindo a formação dos NPCs.

Neste estudo foram empregados 3 diferentes polímeros de caráter hidrofílico, anteriormente descritos para aplicações farmacêuticas e com potencial de aplicação tópica (SENYIGIT et al., 2010; SANTANDER-ORTEGA et al., 2010; LARESE et al., 2009).

4.2 Estudo de Processo e Abordagem do Mecanismo de Estabilização dos NPCs

Para o estudo do processo de formação dos NPCs foram preparados seis lotes de formulações, conforme descrito na *Tabela 1*. Avaliou-se a influência das modificações na composição das formulações e da extração de água da fase dispersa nas características físicas das emulsões obtidas.

Tabela 1: Estudo de Processo de Fabricação dos NPCs.

<i>Amostra</i>	<i>Composição (Polímero)</i>	<i>Lote/Proposta</i>	<i>Característica física</i>
NPC-1	Amido	<u>1° LOTE DE NPC.</u> Evaporação de água por aproximadamente 3h.	As formulações permaneceram estáveis. (Teor de água no intervalo de 4,5 – 6,5%)
NPC-2	Quitosana		
NPC-3	PVP		
NPC-4	PVP (Adição: Emulsificante não-iônico)	<u>2° LOTE DE NPC</u> Acrescentando 0,5% de emulsificante não-iônico na fase aquosa.	Todas as formulações separaram fase no dia posterior à manipulação.
NPC-5	Quitosana (Adição: Emulsificante não-iônico)		
NPC-6	Amido (Adição: Emulsificante não-iônico)		
NPC-7	PVP	<u>3° LOTE DE NPC</u> Utilizando mesma composição do 1° lote. 2 coletas: extração de água por aproximadamente 3h e 5h.	As amostras com 3h de extração permaneceram estáveis, não formando halo. (Teor de água no intervalo de 4,5 – 6,5%). As formulações com 5h de processo separaram fase no dia posterior à manipulação. (Teor de água no intervalo de 0,08 – 0,10%).
NPC-8	Amido		
NPC-9	Quitosana		
NPC-10	PVP	<u>4° LOTE DE NPC</u> Avaliação da influência do tempo de extração da água.	As formulações com 3h de extração permaneceram estáveis.
NPC-13	Quitosana		
NPC-27	Amido	<u>5° LOTE DE NPC</u> Aumento da concentração de emulsificante.	Avaliação do efeito do emulsificante na estabilização das formulações com menor teor de água.
NPC-28	Amido	<u>6° LOTE DE NPC</u> Ausência de emulsificante	Avaliação do efeito do amido na estabilização. Separação de fases completa após 1 dia.

No primeiro lote de formulações observou-se que a emulsão formada após a etapa de pré-emulsificação apresenta caráter leitoso, com fase dispersa visível no microscópio ótico. Entretanto, nas fases finais do processo (após as etapas de nanoemulsificação e extração de água) as amostras não puderam ser visualizadas por microscopia ótica, visto seu tamanho reduzido.

As formulações do primeiro lote foram submetidas à extração de água (etapa de extração de água) por aproximadamente 3 horas. Observou-se que as amostras NPC-1 e NPC-3 apresentaram caráter translúcido e homogêneo, enquanto que a amostra NPC-2 permaneceu leitosa. A caracterização deste lote com relação ao diâmetro médio de partícula confirmou a obtenção de um sistema em escala manométrica, com valores médios na faixa de 200nm e

ainda com baixo índice de polidispersão. Todas as amostras apresentaram baixa viscosidade, na faixa de 100CPs, o que caracteriza sistemas de boa fluidez. Estas formulações permaneceram estáveis por mais de 6 meses, sendo novamente avaliadas com relação ao tamanho médio de partícula e estabilidade coloidal.

De acordo com a literatura, misturas de emulsificantes formam emulsões mais estáveis do que tensoativos isolados, visto que pode ocorrer a formação de um complexo na interface das fases que resulta em uma película estabilizadora rígida (FLORENCE e ATTWOOD, 2003). Para avaliar a possível influência do emulsificante no sistema estudado foi preparado um 2º lote de formulações (NPC-4, NPC-5 e NPC-6), em que se adicionou 0,5% de emulsificante não iônico hidrofílico (Polissorbato 80). A alteração da composição resultou em separação completa de fases no dia posterior à manipulação. Estes resultados levaram a uma investigação mais aprofundada do sistema emulsificante e do mecanismo de estabilização da emulsão. Propôs-se inicialmente que o efeito da separação de fases pode ter ocorrido visto que Polissorbato 80 dissolvido na fase aquosa não possui atração pela fase externa de silicone. Novo lote foi então manipulado, mantendo apenas o emulsificante de silicone formado por um siloxano funcionalizado com cadeias de polieter.

Nessa etapa do estudo foi manipulado um 3º lote de formulações, que manteve a composição inicial (Lote 1) e avaliou o tempo de extração da fase interna, prolongando-o (de 3h para 5h de vácuo). Os resultados permitiram concluir que o sistema mostrou-se estável apenas quando uma determinada quantidade de água foi mantida. Nas amostras em que a etapa de vácuo foi prolongada (por 5 horas), ocorreu separação no dia posterior à manipulação. Para os processos nos quais se fez apenas 3 horas de processo de extração (com um teor de água final no intervalo de 4,5 a 6,5%), os NPCs se mantiveram estáveis, sem separação de fases.

A manipulação de um 4º lote com coletas nos intervalos 15, 30 e 45 minutos, 1; 2; 3; 4 e 5 horas de processo mostrou que há um ponto ótimo de extração de água no qual o sistema atinge a escala nanométrica e a estabilidade é mantida. Nos tempos inferiores a este ponto, ocorre a formação do halo de separação na superfície da formulação (característico de excesso de fase contínua), enquanto que nos tempos superiores ao ponto ótimo, ocorre precipitação e separação completa de fases. **Estes resultados indicam que a estabilidade física do sistema pode ser modulada pela quantidade de água na fase interna.**

A manipulação do 5º lote teve o intuito de avaliar se o aumento da concentração de emulsificante de silicone tinha influência na estabilidade das formulações com menor teor de água. Contudo, os resultados foram semelhantes àqueles obtidos com a concentração inicial

do emulsificante de silicone não-iônico, evidenciando que existe uma concentração ótima do agente que confere estabilidade, não sendo necessária adição de maiores quantidades.

Posteriormente foi manipulado mais um lote (6°) para avaliação da estabilidade da formulação na ausência de emulsificante de silicone, e possível efeito do amido (matriz encapsulante) na estabilização da fase interna, em função da modificação na estrutura química desse polímero que confere uma propriedade de solubilidade à frio e características emulsificantes (CornProducts International, 2008). ***Novamente, os resultados evidenciaram que apenas o polímero não consegue promover uma estabilidade física para o sistema, sendo o emulsificante de silicone não iônico é indispensável para manter as nanoestruturas em suspensão.***

Uma abordagem para explicar o mecanismo de estabilidade destas formulações pode ser atribuída à presença do emulsificante de silicone. Estes emulsificantes possuem alta flexibilidade do esqueleto de silicone com longas cadeias, capazes de atingir uma orientação ótima na interface da emulsão em tempo relativamente curto (SOMASUNDARAN et al., 2006).

Neste trabalho foi utilizado um emulsificante de silicone não-iônico polimérico, composto por siloxanos funcionalizados com cadeias de polieter (PE). Segundo Somasundaran *et al.* (2006), os emulsificantes poliméricos multifuncionais podem se posicionar na interface dos líquidos através de vários segmentos. A energia de adsorção é igual à soma da interação de todos os segmentos e pode ser consideravelmente maior que a energia individual de emulsificantes monoméricos (SOMASUNDARAN et al., 2006). Os emulsificantes multifuncionais poliméricos podem adsorver muito fortemente à interface devido aos vários segmentos de ancoragem e à energia somada de cada um deles, sendo a adsorção menos reversível. Tal efeito permite gerar emulsões estáveis mesmo em pequenas concentrações de emulsificante. Estes emulsificantes multifuncionais promovem estabilização estérica das emulsões, adsorvem fortemente à interface água/silicone. O filme formado tem uma pronunciada elasticidade, a qual é a base da estabilidade destas emulsões. Para emulsificantes de baixo peso molecular, ocorre a ancoragem em um único ponto na interface, formando um filme fino, tendendo a desorver e migrar facilmente, separando fases.

A *Figura 11* ilustra de maneira esquemática o mecanismo de estabilização do emulsificante utilizado neste trabalho, que corrobora com a literatura descrita por Somasundaran e colaboradores (SOMASUNDARAN et al., 2006). A estrutura molecular deste componente permite uma orientação ótima na interface água/silicone, formando uma barreira que provê estabilidade e reduz a repulsão entre as fases.

Figura 11: Representação esquemática do mecanismo de estabilização do emulsificante de silicone.

Outra abordagem importante concerne à classificação do emulsificante utilizado neste trabalho: siloxano funcionalizado não-iônico. Constitui um dos tipos de emulsificantes mais tradicionais utilizados nas emulsões de silicone, normalmente modificados através da introdução de grupos polioxietileno (PO) ou polioxipropileno (PP) devido à boa solubilidade destes grupamentos em água e fácil síntese em vários pesos moleculares (SOMASUNDARAN et al., 2006). O emulsificante empregado aqui também é um siloxano funcionalizado com cadeias hidrofílicas de PO, como os citados anteriormente. São ideais para sistemas água/óleo, água/silicone e micelas reversas, usados na indústria de cosméticos como antiperspirantes, cremes para pele e proteção solar (HILL, 2002). Constam na literatura trabalhos em que a obtenção de diagrama de fases de silicones cíclicos e lineares misturados com água e emulsificante não-iônico de silicone determinam regiões que incluem a formação de cristal-líquido, solução micelar, microemulsão e sistemas coloidais estáveis (LI et al., 1999; HILL, 2002). Sistemas contendo emulsificantes não-iônicos polietoxilados (hidrocarbônicos) geralmente produzem microemulsões (sistemas termodinamicamente estáveis) sem a presença de co-emulsificantes, devido às espécies variadas geradas na reação de etoxilação (SALAGER et al., 2004). A presença de vários tipos de poliéteres ajuda na estabilização.

Tendo em vista a composição do emulsificante aqui empregado, podemos propor também um mecanismo de estabilização baseado em diferentes pontos de interação das porções hidrofílicas e silofílicas. De acordo com os trabalhos descritos, um mecanismo proposto para a estabilidade dos NPCs se apóia na formação de um sistema polimérico coloidal, no qual o emulsificante atua de maneira ótima, interagindo com a fase interna da gota (polímero + água) mantendo-a suspensa no silicone, quando há uma quantidade intermediária de água. À medida que a água é retirada, inicia-se a solidificação do agente

encapsulante, formando nanopartículas sólidas, com densidade superior à do meio. Neste momento, o emulsificante provavelmente não tem mais atração pelas partículas (devido à ausência de água) e não consegue ancorar na superfície polimérica, desestabilizando o sistema e favorecendo a precipitação.

4.3 Influência do Conteúdo de Água na Estabilidade Coloidal

Conforme previamente apresentado no item anterior, foram conduzidos experimentos com coletas de alíquotas em intervalos de tempos pré-determinados para o monitoramento do teor de água e investigação de sua influência na estabilidade do sistema.

A determinação deste parâmetro foi realizada pelo método de titulação Karl Fisher. A *Tabela 2* mostra os resultados da titulação Karl Fisher obtidos para os lotes 1, 3 e 4 nos diferentes tempos de extração. Observa-se que o teor de água das formulações submetidas a 3 horas de extração permaneceu na faixa de 4,5 a 6,5%, enquanto aquelas submetidas a 5 horas de processo apresentaram valores inferiores a 1,00%.

Tabela 2: Teor de água obtido por titulação Karl Fisher.

<i>Amostra</i>	<i>Polímero</i>	<i>Tempo de extração</i>	<i>Teor de Água (%)</i>
NPC-1	Amido	3h	$5,70 \pm 0,150$
NPC-2	Quitosana	3h	$6,36 \pm 0,230$
NPC-3	PVP	3h	$4,91 \pm 0,100$
NPC-7	PVP	3h	$5,8 \pm 0,018$
		5h	$0,625 \pm 0,312$
NPC-8	Amido	3h	$4,76 \pm 0,350$
		5h	$0,087 \pm 0,087$
NPC-10	PVP	3h	$5,513 \pm 0,106$
		5h	$0,338 \pm 0,004$
NPC-13	Quitosana	3h	$5,965 \pm 0,427$
		5h	$0,189 \pm 0,039$
NPC-40	Amido	3h	$6,125 \pm 0,150$
		5h	$0,536 \pm 0,223$

*Não foram obtidos os dados de teor de água para os NPC-9.

Conforme descrito previamente, a quantidade de água no sistema pode ter efeitos profundos na estabilidade física. Durante o processo de extração da fase aquosa, ocorre a

solidificação do polímero, formando partículas sólidas, e desfavorecendo a ação do emulsificante. Propõe-se que nesta etapa o emulsificante não permaneça mais “enterrado” na fase interna (água + polímero) fazendo interações hidrofílicas, ficando apenas adsorvida na superfície das partículas sólidas. Consequentemente, partículas sólidas decantam devido à diferença de densidade com o meio dispersante.

O 4º lote de estudo permitiu avaliar o tamanho de partícula em função do teor de água, através do monitoramento destes parâmetros durante o processo. Os resultados mostraram que controlando a etapa de extração de água da fase interna é possível modular o tamanho de partícula dos nanocarreadores formados, atingindo um patamar de diâmetro nanométrico. A *Figura 12* apresenta a variação do tamanho de partícula em função do perfil de extração do conteúdo de água. Isto demonstra que para obtenção de sistemas nanoestruturados é necessário obter uma quantidade determinada de água, a partir da qual não mais ocorre variação significativa de tamanho, porém pode interferir na estabilidade física como mostrado anteriormente.

Figura 12: Gráfico comparativo do teor de água versus tamanho de partícula para as amostras NPC-10 e NPC-13.

Outro resultado interessante foi que, durante o processo de extração de água, em um determinado intervalo de tempo (que ocorre com aproximadamente com 3 horas de processo de extração), as amostras contendo os polímeros amido e PVP tornam-se transparentes, conforme pode ser observado na *Figura 13*. Na imagem obtida para as formulações contendo

os três tipos de polímeros (*Figura 14*), observa-se em A_{3h} o NPC formado por quitosana (NPC-13) após 3 horas de processo de extração, com característica leitosa, sendo que os NPCs de PVP (NPC-10 – B_{3h}) e amido (NPC-8 – C_{3h}) apresentam o perfil de transparência. Logo após este período, as formulações tornam-se leitosas novamente. Para as formulações após 5 horas de extração de água, observa-se aspecto leitoso, com exceção da quitosana na qual já é possível verificar a separação de fases (A_{5h}).

Figura 13: Etapa de extração de água no processo obtenção da amostra NPC-7, nos tempos 3,0h (A) e logo após 3,0h (B).

Figura14: Amostras dos NPCs de quitosana (A), NPC de PVP (B) e NPC de amido (C) nos tempos 3 e 5 horas de extração de água.

Discute-se a hipótese de que, no momento em que os índices de refração relativos das fases contínua e dispersa se tornam próximos, ocorre a alteração das propriedades óticas do

sistema e a formulação fica transparente (CHANTRAPORNCHAI et al., 2001). Durante o processo de redução do teor de água, a formulação que inicialmente é leitosa ou opaca e apresenta alta turbidez, adquire um aspecto incolor, de forma que não ocorre espalhamento de luz da fase dispersa.

Com o intuito de avaliar a hipótese proposta, foi realizada a medida do índice de refração das fases contínua e dispersa, mimetizando a condição obtida no intervalo de 3 horas de vácuo. Através do teor de água obtido por titulação Karl Fisher, foi calculada a concentração da fase interna, no momento em que a formulação se torna transparente. Os índices de refração da fase dispersa e da fase contínua (contendo a concentração de polímero calculada) foram medidos. Os resultados obtidos foram de 1,401 a 25°C para fase dispersa, e 1,402 a 25°C para fase contínua, o que atesta a alteração das propriedades óticas do sistema.

4.4 Comportamento reológico

Um importante critério que governa a qualidade e a estabilidade de sistemas emulsificados são suas propriedades físicas. Mudanças nas propriedades reológicas representam sinais precoces de possíveis instabilidades nas formulações (MOULAI MOSTEFA et al., 2006). Os principais fatores que influenciam a viscosidade de uma emulsão são:

a) Fase interna (dispersa):

Volume parcial, viscosidade, tamanho e distribuição de gotas e natureza química;

b) Fase contínua:

Viscosidade, constituição química e concentração, solubilidades nas fases contínua e interna, propriedades físicas da película interfacial e efeitos eletroviscosos (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

Devido ao fato de a maioria das emulsões serem sistemas polidispersos, um importante parâmetro para a manutenção da viscosidade é o tamanho de gotícula e particularmente, sua distribuição granulométrica. Com o decorrer do tempo, o tamanho médio da fase dispersa tende a aumentar, causando queda na viscosidade (FLORENCE e ATTWOOD, 2003). Neste sentido, o monitoramento da viscosidade do sistema pode ser uma ferramenta indicativa de instabilidade física.

A *Figura 15* mostra os valores de viscosidade dos sistemas que permaneceram estáveis, por um período de até 30 dias. Observa-se que não ocorrem alterações significativas dos valores obtidos para cada amostra, dentro do período analisado.

Figura 15: Monitoramento da viscosidade dos NPCs, na temperatura de 25,0°C, logo após a fabricação.

Complementando também o estudo de processo, foi preparado um lote (NPC-17), para monitoramento da viscosidade durante a etapa de extração de água (etapa 3 do protocolo de fabricação dos nanocarreadores), empregando amido como matriz encapsulante. Observa-se que no tempo 0 hora, a viscosidade do sistema é bem elevada (3500cPs) e posteriormente sofre uma redução ao longo do tempo, estabilizando com aproximadamente 3 horas de processo de extração (como pode ser observado na *Figura 16*, com escala modificada na imagem lateral). Após 30 dias, armazenadas à temperatura ambiente, verifica-se que não ocorre uma variação significativa nos valores de viscosidade, sendo que a amostra com 0 hora de extração de água separou fases completamente não sendo possível ressuspender e medir a viscosidade.

Figura 16: Viscosidade do NPC-17 com diferentes tempos de extração de água com 0 e 30 dias de estabilidade, a 25,0°C, e imagem lateral com alteração de escala.

4.5 Turbidimetria dinâmica (turbiscan)

As amostras NPC-1, NPC-2 e NPC-3 foram analisadas por turbidimetria dinâmica, logo após o preparo, por um período de 7 dias, para avaliação da estabilidade física. Um acompanhamento da cinética deste processo foi feito através da análise em equipamento Turbiscan Lab[®] (conforme metodologia descrita no item 3.3.6).

Para entendimento dos resultados obtidos, uma breve descrição de como devem ser interpretados os perfis dos gráficos de turbidimetria dinâmica é dada a seguir:

- Eixo das ordenadas: representa a porcentagem residual de luz retroespalhada / transmitida.
- Eixo das abscissas: corresponde a altura do tubo contendo a amostra, sendo que a base do tubo está à esquerda e o topo do tubo está à direita.
- Os números listados à esquerda do gráfico se referem aos tempos de análise, sendo que, o tempo descrito em vermelho é referente à última leitura.

Este gráfico permite a verificação comparativa entre os perfis de variação de retroespalhamento da luz em diferentes tempos para a amostra. A estabilidade ou instabilidade da amostra é determinada pelos perfis de varredura obtidos de tempos em tempos. Se os perfis de retroespalhamento da luz na amostra nos diferentes tempos se sobrepõem, o produto é estável, caso contrário, o produto é instável e pode-se calcular a cinética de migração da fase dispersa da amostra.

Figura 17: Perfil de retroespalhamento de luz da amostra NPC-1 obtido após preparo, na temperatura de 25,0°C, durante o período de 7 dias de estabilidade.

A ocorrência de fenômenos de desestabilização (ex: agregação, floculação) e separação de fases (ex.: segregação, sedimentação e flotação) modifica o modo de interação do feixe de luz com o meio, ocasionando aumento ou redução da intensidade de transmissão e do retroespalhamento devido à variação e diferença do tamanho de partícula / migração das partículas. Neste caso, nota-se a ocorrência de fenômenos desta natureza com a amostra NPC-1: aumento do retroespalhamento no fundo da amostra e redução no topo (Figura 17), denotando uma discreta sedimentação com o decorrer do tempo. É importante lembrar que a velocidade de separação é maior quanto maior for o diâmetro de partículas, quanto maior for a diferença de densidade entre as duas fases e quanto menor for a viscosidade da fase externa. Visualmente observa-se a formação de um halo mais claro na superfície da formulação que pode, todavia, ser facilmente redisperso com leve agitação manual. Discute-se a ocorrência de um mecanismo de “separação” por densidade, que, no entanto, não implica em processos de aglomeração, coalescência ou sedimentação.

Fenômenos de instabilidade também podem ser causados (além da diferença de densidade entre as fases) pela instabilidade do diâmetro de partículas e sua distribuição, pois a cinética do movimento browniano depende diâmetro de partícula, o que pode facilitar agregação da fase interna e conseqüente separação de fases (FLORENCE e ATTWOOD, 2003). Algumas características físico-químicas são fundamentais para a estabilidade dos sistemas, como o tamanho de partículas. Este é um parâmetro importante utilizado no controle de qualidade (MULLER-GOYMANN, 2004).

Através de uma ferramenta do equipamento Turbiscan Lab[®] que permite monitorar a variação de tamanho de partícula durante a análise, foi realizada uma avaliação preliminar da alteração do diâmetro no decorrer do tempo. Para isto, são utilizados dados de densidade da amostra e índices de refração das fases interna e externa. A Figura 18 apresenta o gráfico da variação do tamanho de partícula dos tempos 0h até 7 dias de análise. Ressalta-se que o

equipamento fornece um valor aproximado de diâmetro, calculado pelo princípio de retroespalhamento de luz e dependente dos parâmetros fornecidos.

Observa-se que o tamanho de partícula permaneceu estável, durante o período de análise, confirmando a possibilidade de não agregação ou coalescência. As formulações NPC-2 e NPC-3 apresentaram perfis semelhantes à NPC-1, com redução discreta do retroespalhamento no topo do frasco.

Figura 18: Monitoramento da variação do tamanho de partícula da amostra NPC-1 de 0h a 7 dias, a 25,0°C.

Adicionalmente, com o objetivo de comprovar a estabilidade física do sistema, as amostras NPC-8, NPC-10 e NPC-13 (com 3 e 5 horas de processo de extração) foram submetidas à análise por turbidimetria, 6 meses após a data de preparo. Ressuspendeu-se as amostras que apresentaram separação de fases (aquelas com teor de água reduzido) através de agitação manual, logo antes de iniciar a medida de retroespalhamento. A comparação da cinética de estabilidade, que é dada pela variação do backscattering ao longo do tubo em função do tempo, é apresentada na *Figura 19*. Também são apresentados os valores de “Turbiscan Stability Index” que correspondem a uma constante de estabilidade relativa para cada amostra, sendo que quanto mais próximo de zero, mais estável é considerado o sistema.

Observa-se que as amostras com teor intermediário de água (3 horas de extração) sofrem uma variação muito reduzida do backscattering ao longo do tempo, apresentando variações menores que 5.00% e as constantes de estabilidade para as diferentes formulações (compostas pelos 3 polímeros estudados) são muito próximas e indicam alta estabilidade (valores menores que 1,0).

No caso das formulações com teor reduzido de água (5 horas de processo de extração), a variação de backscattering atinge valores maiores que 20.00% e a constante de estabilidade já é bem maior (em torno de 9,5), confirmando a instabilidade do sistema. Todavia, nota-se a facilidade de ressuspensão destas amostras aplicando apenas leve agitação manual. E também,

pela comparação dos perfis de turbidimetria, pode-se propor que não ocorrem processos de coalescência ou aglomeração, mas apenas uma sedimentação das partículas do meio.

Figura 19: Comparação da cinética de estabilidade de NPC-8, NPC-10 e NPC-13 nos tempos 3 e 5 horas de processo de extração de água.

4.6 Desenvolvimento de Metodologia de Tamanho Médio de Partícula dos NPCs

A técnica empregada para análise de tamanho foi a espectroscopia de correlação de fótons (PCS), que utiliza o princípio do espalhamento de luz para calcular o raio da partícula.

O espalhamento de luz por uma partícula em solução ocorre se esta partícula tiver uma polarizabilidade diferente da do meio dispersante. Nesse caso, o momento dipolar induzido pelo campo elétrico da radiação incidente irá espalhar luz em todas as direções. A intensidade da luz espalhada será relacionada com a direção de polarização da luz incidente, do ângulo de espalhamento e de parâmetros da solução (LUCAS; SOARES e MONTEIRO, 2001).

Quando a luz espalhada por um sistema possui frequência idêntica a da luz incidente, trata-se de espalhamento de luz elástico (descrito experimentalmente como *espalhamento de luz estático – static light scattering – SDS*). Embora as partículas estejam em movimento térmico durante a medida, a luz espalhada é coletada durante um período de tempo muito mais longo que a escala de tempo do movimento destas partículas. A luz espalhada é uma média sobre o número de partículas no volume de espalhamento e a medida equivale ao

estado estático. Nos casos em que ocorre uma pequena diferença da frequência da luz espalhada em relação à frequência da luz incidente, o espalhamento de luz denomina-se dinâmico (*dynamic light scattering* – DLS) (LUCAS; SOARES e MONTEIRO, 2001).

No caso dos equipamentos DLS, o vetor de espalhamento (q) pode ser modificado pela mudança do ângulo de observação. Através da manipulação do valor de q , é possível acompanhar desde a luz espalhada por conjuntos de partículas ou agregados, até a luz espalhada pelos segmentos internos de uma molécula (RODEMBUSCH, 2001).

Nesta etapa do trabalho, em que se definiu a técnica de medida do tamanho de partícula da fase interna das formulações, foram testados três equipamentos: Viscotek 802 DLS – Omnisize 3.0 software, Malvern Zetasizer Nano ZS[®] e Malvern Zetasizer[®]. Foram estudados também 4 diferentes meios de dispersão para as amostras: óleo mineral, dimeticone, n-hexadecano e hexano. As análises consideraram os valores de viscosidade e de índice de refração para cada um dos meios dispersantes, conforme os dados fornecidos pelos fabricantes. As diluições foram padronizadas após a verificação da concentração adequada de leitura em cada um dos equipamentos (dados em Kcps). Um breve resumo do trabalho de investigação experimental realizado segue descrito a seguir:

Inicialmente, a medida de tamanho médio de partícula foi realizada no equipamento Malvern Zetasizer[®], que opera com ângulo de incidência de radiação fixo (90°). Segue uma breve descrição das condições de análise:

- Primeiramente, foi avaliado valor de Kcps* (taxa de contagem média de partículas) de cada formulação pura, sem dispersante. Este parâmetro é um indicativo da concentração de partículas no meio, que fornece uma indicação sobre a melhor diluição. Apenas a amostra NPC-3 apresentou valor coerente para realização da leitura de tamanho, devido a sua característica de transparência. No entanto, as medidas não foram reprodutíveis, e os valores variaram de cerca de 600 a 1200nm.
- A dispersão das formulações em dimeticone (o mesmo utilizado como fase externa da emulsão) também não permitiu a medida adequada do tamanho. Foi realizada uma dispersão de 0,5mL da formulação em 3mL de dimeticone, até obtenção de uma suspensão visualmente homogênea. Os parâmetros utilizados na medida foram índice de refração (a 25,0°C) do dimeticone: 1,402 e viscosidade: 100CPs. Ocorreu instabilidade entre as 3 leituras consecutivas do equipamento, e mesmo com agitação mecânica moderada, por aproximadamente 5 minutos, a formulação tornou-se bem mais dispersa (com aspecto mais translúcido), mas a leitura também não foi reprodutível.

- Posteriormente foi testado o óleo mineral como meio dispersante. A tentativa de dispersar as nanoemulsões neste meio mostrou que ocorre a formação de uma terceira fase, visto a insolubilidade do silicone no óleo. Foi possível observar microgotas no microscópio após a dispersão.
- Conforme indicado pelo fornecedor do silicone, foi testado também n-hexadecano como meio dispersante (índice de refração: 1,434 e viscosidade: 40CPs). No entanto, assim como o óleo mineral as formulações não se dispersaram de maneira homogênea formando uma terceira fase e impossibilitando a leitura.
- Também foi avaliada a possibilidade de utilizar uma solução de 0,5% de emulsificante de silicone para dispersão das formulações. Obtiveram-se valores médios de 22,6nm para NPC-2, mas tamanhos muito distintos para as outras formulações (42,8nm mínimo e 1267,3nm máximo para NPC-1 e 600,8nm mínimo e 1291,0nm máximo para NPC-3). Contudo, a solução de silicone e emulsificante não é translúcida (como requerido pela técnica), não sendo um meio dispersante adequado. Ela causa um aumento do Kcps, e consecutivo aumento do *background* (interferência de fundo), que não pode ser subtraído e interfere na análise. É importante lembrar que todas as leituras no Zetasizer® utilizaram os valores de viscosidade e índice de refração dos meios dispersantes (conforme especificações dos fornecedores das matérias-primas). As análises por esta técnica, empregando tais meios dispersantes não foram, portanto, conclusivas.

Em uma segunda etapa, foi realizada a análise em um equipamento Viscotek 802 DLS, na empresa PolyAnalytik, incubada no CIETEC, localizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). O instrumento possui uma ferramenta de ajuste automático do feixe de radiação, conforme a característica da amostra. É feita uma atenuação do laser de acordo com o espalhamento de luz promovido pelas partículas do meio. Neste caso a leitura também é realizada em ângulo fixo de 90°, assim como o Malvern Zetasizer®. Os parâmetros de diluição foram ajustados para valores entre 500 e 1000 KCounts (valor correspondente ao Kcps citado anteriormente). As medidas também foram realizadas em dimeticone. Novamente não se obteve reprodutibilidade das medidas, ainda que os valores registrados estivessem sempre em escala nanométrica.

Em continuação à tentativa de desenvolvimento da metodologia de tamanho de partícula, foi testado o equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS®, que opera com os ângulos de medida de 90° e 173°. Conforme a literatura (RODEMBUSCH, 2001), a mudança do

ângulo de observação permite manipular o valor de q , obtendo assim uma faixa maior de investigação do raio hidrodinâmico.

Por conseguinte, as amostras foram diluídas em dimeticone (na concentração de 10 μ L em 2mL), apresentando um aspecto homogêneo. Os dados de índice de refração e viscosidade do meio dispersante foram informados no equipamento. Os resultados obtidos foram reprodutíveis, contudo o relatório de qualidade emitido pelo equipamento após cada leitura sempre citava uma falha na especificação dos resultados, reportando que a amostra não seguia os critérios de qualidade exigidos possivelmente devido à presença de partículas grandes, ou sedimentação, ou eventos de fluorescência ou absorbância da amostra.

Em uma etapa posterior, durante o desenvolvimento da metodologia de caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura, identificou-se um meio dispersante adequado para a leitura do tamanho de partícula: hexano (índice de refração: 1,375 e viscosidade: 0,308CPs). Foram realizadas medidas empregando o equipamento Malvern Zetasizer[®] e finalmente, a metodologia de determinação de diâmetro de partícula foi estabelecida através da diluição de 0,5mL de formulação em 5mL de hexano. As leituras foram realizadas em triplicata e os valores se reproduziram, fornecendo resultados coerentes.

O mesmo procedimento foi reproduzido no equipamento Delsa Nano C, da marca Beckman Coulter, que opera pelo mesmo princípio do Malvern Zetasizer[®] empregando espalhamento dinâmico de luz, o qual foi utilizado na caracterização de todas as amostras posteriormente obtidas.

A caracterização das amostras com relação ao diâmetro de partícula confirmou a obtenção de um sistema em escala nanométrica (dados reportados na *Tabela 3*). As medidas foram repetidas 6 meses após a obtenção das formulações e não foi possível observar grandes variações no diâmetro médio das amostras, confirmando a estabilidade do sistema neste período.

Tabela 3: Dados de tamanho médio de partícula dos NPC-placebo dispersos em hexano obtidos por DLS, a 25,0°C.

<i>Amostra</i>	<i>Tempo de extração</i>	<i>Leitura 0 horas</i>		<i>Leitura 6 meses</i>	
		Diâmetro (nm)	PI	Diâmetro (nm)	PI
NPC-1	3h	200	0,068	496*	0,247
NPC-2	3h	169	0,309	645,5*	0,283
NPC-3	3h	167	0,149	266	0,783
NPC-7	3h	167	0,154	406	0,148
NPC-8	3h	442	1,000	349	0,047
	5h	168	0,113	127,7	0,183
NPC-9	3h	110	0,985	616,4	0,017
NPC-10	3h	157	0,438	160	0,316
	5h	176	0,023	181	0,110
NPC-13	3h	510	0,053	NA	NA
	5h	505	0,114	NA	NA
NPC-17	3h	158,4	0,389	NA	NA
	5h	168,2	0,388	NA	NA
NPC-40	3h	375,7	0,076	NA	NA
	5h	282,1	0,070	NA	NA

*Medidas realizadas em equipamentos diferentes.

Na manipulação do 4º lote (NPC-10), coletaram-se várias amostras em diferentes intervalos do processo de evaporação da fase interna. A medida do diâmetro de partículas destas formulações foi obtida por DLS e os valores foram plotados em função do tempo de extração da água (*Figura 20*), confirmando uma redução do diâmetro médio de partícula à medida que a água é retirada do sistema. Este valor praticamente se estabilizou após 1 hora de processo de extração. Os valores de polidispersidade mostraram-se abaixo de 1,0, o que indica sistemas com distribuição de tamanho de partícula homogêneo, sendo evidenciado índice de polidispersidade superior apenas no caso da formulação de quitosana.

Figura 20: Avaliação do diâmetro da amostra NPC-10 em função do tempo de extração de água do sistema.

4.7 Perfil Térmico dos NPCs

A fusão caracteriza-se por ser um fenômeno físico, o qual pode ser detectado através das curvas DSC ou DTA, apresentando-se como um evento endotérmico (CLAS et al., 1999; WENDLANDT, 1986). Para a caracterização dos NPCs e verificação da presença de componentes sólidos, foi realizada a análise por DSC da amostra NPC-7 que utiliza o polímero PVP como agente encapsulante (com os tempos 0; 3 e 5h de extração de água). Também foi obtida a curva DSC do polímero puro (PVP) para conhecimento do ponto de fusão do material.

Através das curvas DSC mostradas na *Figura 21* pode-se observar que o PVP tem um pico de fusão largo, com temperatura máxima em aproximadamente 110°C. Nas amostras com 0 e 3 horas de extração de água não foram verificados eventos endotérmicos, o que indica provavelmente, a ausência de componentes sólidos. Em comparação, na formulação com 5h de vácuo ocorre um evento de fusão, com pico máximo de temperatura em aproximadamente 110°C, que coincide com a fusão da matéria-prima (PVP), evidenciando a presença de material sólido. Tal análise pode ser um indício de que, com o teor reduzido de água, ocorre a formação das nanopartículas sólidas, que favorece a precipitação. Em contraste, supõe-se que, com uma quantidade intermediária de água (SCALABRINO, 2005), o polímero está em solução formando um sistema coloidal. De acordo com a literatura, o PVP tem alta solubilidade em água e em solventes orgânicos, com habilidade de formação de complexos, ocupando uma posição especial entre os colóides sintéticos (BASF, 2007).

Figura 21: Curvas DSC dos NPC-7 (com 0; 3 e 5h de vácuo) e do polímero PVP obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na razão de aquecimento 10°C/min.

4.8 Morfologia dos NPCs placebo

4.8.1 Microscopia ótica

Os NPCs foram observados por microscopia ótica (conforme pode ser observado no APÊNDICE I – Microscopia ótica). São apresentadas fotos comparativas das etapas de pré-emulsificação (etapa 1), após homogeneização de alta pressão (etapa 2) e após extração da fase interna (etapa 3). As fotomicrografias mostraram a eficiência da homogeneização de alta pressão na redução do tamanho de gotas da fase dispersa. Contudo a microscopia ótica não tem resolução adequada para caracterização de sistemas nanoestruturados, limitando a utilização desta ferramenta apenas às etapas iniciais de preparação dos NPCs, como possibilidade de avaliar a homogeneidade inicial da pré-emulsão.

4.8.2 Microscopia eletrônica de varredura

O desenvolvimento da metodologia de caracterização morfológica foi realizado empregando a técnica de microscopia eletrônica de varredura – MEV e MEV com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (em inglês *FEG-SEM*, modelo Quanta 3D, FEI).

Foi realizado um estudo para investigação da melhor condição de visualização dos NPCs através de MEV. Nos primeiros ensaios, as amostras foram depositadas sobre uma fita de cobre colada em uma lâmina de vidro. Procedeu-se a secagem do material à vácuo por 24 horas. As amostras foram então recobertas com ouro, através de metalização por 2 minutos. Foram realizadas tentativas de obtenção de imagens utilizando o MEV convencional, empregando uma tensão de 10,0kV e aumentos de até 5000x. Contudo, conforme pode ser visualizado nas micrografias do "APÊNDICE II– Microscopia eletrônica de varredura" não se obteve êxito na análise. Não foi possível identificar nenhum nanocarreador (ou mesmo qualquer outro tipo estrutura). Possivelmente, a resolução obtida por este microscópio não era suficiente para visualizar os nanocarreadores. As imagens não ficaram resolvidas o suficiente de modo que fosse possível identificar qualquer nanoestrutura.

Posteriormente, foi testado o mesmo procedimento de preparo das amostras, desta vez empregando o FEG-SEM para obtenção das imagens. Este microscópio possui alta resolução, trabalha nos modos baixo e alto vácuo (utilizando uma bomba de ultra vácuo com pressões negativas de até 1×10^{-7} Pa), em voltagens de 200V a 30kV, aumentos de magnitude de 30 a 1.280.000 vezes. A resolução do feixe de elétrons em alto vácuo é de 1.2nm a 30kV e 1.5nm a 30kV em baixo vácuo. Sendo assim, houve a expectativa de visualização das amostras neste equipamento, devido à sua alta resolução.

Seguiu-se o procedimento de deposição de ouro na superfície da fita de cobre contendo as amostras e posterior inserção na câmara do microscópio. Outro benefício importante deste equipamento é a extensão da área que pode ser analisada, permitindo obter imagens de um amplo campo – aproximadamente 10mm de largura do campo horizontal (área extensa quando se trata de microscopia eletrônica). As primeiras análises foram conduzidas em baixo vácuo, mas não foi possível visualizar as estruturas. Então, trabalhou-se em alto vácuo, com voltagem de 20kV. Foi possível identificar a presença de possíveis partículas que, no entanto, estavam recobertas por uma fina película. As micrografias encontram-se no Anexo I (*Imagens A, B e C*). Uma possível justificativa baseia-se na hipótese de que o silicone forma um filme contínuo na superfície das nanopartículas. Assim, quando é realizada a

metalização com o ouro, este reveste a superfície da amostra formando uma película e impedindo a visualização da superfície das estruturas.

A partir da confirmação visual da presença das partículas no meio e da impossibilidade de visualização devido à presença do silicone, foi testado o procedimento de lavagem e recuperação em membrana PVDF de 0,22 μ m de diâmetro de poro. A metodologia consistiu na suspensão de uma massa reduzida de formulação (aproximadamente 50mg) em hexano (30mL), filtração à vácuo empregando tais membranas, lavagem com o mesmo solvente e posterior secagem das membranas 48 horas, em dessecador à vácuo. Esta membrana foi anexada na fita de cobre e posteriormente recoberta com ouro. Finalmente, foi possível obter as imagens, identificar a morfologia das nanoestruturas obtidas, avaliar as características de superfície, de distribuição granulométrica e propor otimizações em função do polímero utilizado.

As micrografias obtidas para os NPCs-placebo dos 3 tipos de polímero encontram-se na *Figura 22*. Observa-se na *Imagem A* uma “placa de partículas” ocluindo os poros da membrana, a qual foi utilizada na recuperação do material após lavagem com solvente. A *Imagem B* mostra uma “torta” de partículas formadas na superfície da membrana e também as partículas menores que passaram pelos poros na etapa inicial de filtração (antes da formação da torta). E então, a *Imagem C* mostra os nanocarreadores poliméricos coloidais, formados de amido neste caso, como nanoestruturas esféricas, de superfície regular e lisa, com distribuição de tamanho relativamente pequena e confirmando a escala nanométrica.

Nas *Imagens D, E e F* da *Figura 22*, que correspondem aos carreadores formados por quitosana, também se pode identificar a presença destas estruturas, em escala nanométrica, de formato arredondado e superfície ligeiramente regular. Contudo, observa-se que as partículas estão aglomeradas, formando grandes blocos na superfície da membrana.

Imagem A: NPC-8

[Sistema placebo, polímero: amido]

(Aumento: 5.000x)

Imagem B: NPC-8

[Sistema placebo, polímero: amido]

(Aumento: 20.000x)

Imagem C: NPC-8

[Sistema placebo, polímero: amido]

(Aumento: 50.000x)

Figura 22: Micrografias de FEG-SEM dos NPC-8, NPC-10 e NPC-13.

Imagem D: NPC-13
[Sistema placebo, polímero: quitosana]
(Aumento: 50.000x)

Imagem E: NPC-13
[Sistema placebo, polímero: quitosana]
(Aumento: 100.000x)

Imagem F: NPC-13
[Sistema placebo, polímero: quitosana]
(Aumento: 200.000x)

Figura 22: Micrografias de FEG-SEM dos NPC-8, NPC-10 e NPC-13 (continuação).

Imagem G: NPC-10
[Sistema placebo, polímero: PVP]
(Aumento: 6.500x)

Imagem H: NPC-10
[Sistema placebo, polímero: PVP]
(Aumento: 12.000x)

Imagem I: NPC-10 [Sistema placebo,
polímero: PVP]
(Aumento: 12.000x)

Figura 22: Micrografias de FEG-SEM dos NPC-8, NPC-10 e NPC-13 (continuação).

Assim como nas *Imagens G, H e I*, que apresentam os NPCs formados por PVP, também foi possível observar núcleos esféricos, aparentemente coalescidos e fundidos uns aos outros com prolongamentos do próprio material polimérico.

Uma proposta para justificar estas morfologias encontradas para os NPCs formados de PVP e quitosana baseou-se na sugestão de que os polímeros interagiam de alguma maneira com o solvente empregado, dissolvendo-se parcialmente e fornecendo o aspecto de coalescência para as nanoestruturas. Tal hipótese foi verificada através da suspensão e tentativa de solubilização dos 3 polímeros (amido, quitosana e PVP) em hexano. Determinada massa de polímero foi pesada e adicionou-se hexano. Posteriormente o solvente foi evaporado e o material seco em dessecador por 48 horas. Observou-se que não ocorria solubilização de nenhum dos materiais no solvente, no entanto, a quitosana e o PVP não recuperaram a aparência inicial, sendo que o PVP apresentou aspecto mais amorfo. No caso do PVP, o material interage com o hexano, modificando a conformação da cadeia polimérica, possivelmente pelo mecanismo de entumescimento e alterando a morfologia das partículas.

Sendo assim, nas etapas futuras do trabalho serão empregados novos solventes para testar a interação com o polímero, na tentativa de visualização dos NPCs de quitosana e de PVP sem nenhum interferente.

É importante ressaltar que, em todas as micrografias obtidas foram utilizadas amostras com 5 horas de processo de extração de água, o que permitiu a visualização dos nanocarreadores em estado sólido.

PARTE II

4.9 Incorporação de ativo modelo nos NPCs e Caracterização dos Sistemas

Após o desenvolvimento e caracterização do sistema nanocarreador placebo (sem ativo), foi realizada uma nova etapa do processo: a incorporação de ativos modelo hidrofílicos. A fim de avaliar o potencial de aplicação destes NPCs como sistema de liberação controlada de drogas e também como sistema carreador de veiculação tópica, dois ativos foram escolhidos como modelos para estudar o comportamento de encapsulação: salicilato de sódio (SS) e Cianocobalamina (um dos componentes do complexo de vitaminas B12).

A incorporação destes compostos hidrofílicos permitiu um melhor entendimento dos mecanismos de formação dos NPCs, uma avaliação inicial da estabilidade do sistema na presença do ativo, a medida da eficiência de encapsulação da matriz polimérica e o perfil de liberação obtido empregando os carreadores suspensos em silicone.

O composto SS foi escolhido devido à similaridade das propriedades físico-químicas com o pró-fármaco fotossensível a ser veiculado nos nanocarreadores, o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA). Na *Tabela 4* são destacadas algumas destas propriedades (PUBCHEM, 2009). O SS é um sal sódico do ácido salicílico e também um metabólito do ácido acetilsalicílico (conhecido como aspirina) que tem sido utilizado como analgésico e antipirético, da classe dos anti-inflamatórios não esteroidais, que também age induzindo apoptose e necrose em células cancerígenas (RAE et al., 2007), e atuando a nível molecular como antagonista nos receptores neuronais de glicina (LU et al., 2009).

Tabela 4: Comparação das propriedades dos modelos hidrofílicos SS e cianocobalamina com o 5-ALA.

<i>Parâmetro</i>	<i>5-ALA</i>	<i>SS</i>	<i>Cianocobalamina</i>
Peso Molecular (g/mol)	167,59	160,11	1358,40
Solubilidade em água (g/L)	50	125	12,5
Ponto de Fusão (°C)	156 a 158	213	> 300

No caso da cianocobalamina, trata-se de um modelo hidrofílico, de peso molecular elevado e estrutura química complexa, contendo um macrociclo tetrapirrólico (formado por 4 anéis pirrólicos – estruturalmente semelhante a compostos fotossensíveis empregados na terapia fotodinâmica) e um átomo de cobalto complexado, que é um elemento bioquimicamente raro. Sua estrutura química está representada na *Figura 23*. Está envolvida no metabolismo das células do organismo, afetando especialmente a síntese de DNA e regulação, mas também a síntese de ácidos graxos e produção de energia. É um composto

solúvel em água com um papel fundamental no funcionamento normal do cérebro e sistema nervoso, e também na formação de sangue (SCALABRINO, 2005).

Figura 23: Estrutura molecular da Cianocobalamina.

O protocolo de fabricação dos NPCs contendo os ativos modelo manteve-se conforme descrito anteriormente no item “3.3.1 *Preparo dos Nanocarreadores Poliméricos Coloidais (NPCs) placebo*”. Os ativos modelo foram dissolvidos na fase interna na proporção em massa de ativo: polímero (1:8) no caso da cianocobalamina e (2:7) no caso do salicilato de sódio e procedeu-se com as etapas 1, 2 e 3 do protocolo de fabricação. As formulações foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, teor de água, viscosidade e morfologia seguindo as metodologias previamente descritas para os NPCs-placebo (sem ativo). A *Tabela 4* descreve algumas das propriedades do SS e da cianocobalamina em comparação com o 5-ALA.

Conforme pode ser visualizado nas micrografias da *Figura 24*, os NPCs de amido apresentaram características mais homogêneas, maior índice de estabilidade física e facilidade na manipulação, sendo inicialmente escolhidos para a incorporação dos ativos modelo. E também apresentou reprodutibilidade nas metodologias de tamanho de partícula e morfologia. Além disso, o amido é um biopolímero já empregado em aplicações farmacêuticas

(SCALABRINO, 2005; LUO et al., 2012; WU et al., 2012; AHMAD et al., 2012; DANDEKAR et al., 2012; RODRIGUES e EMEJE, 2012), é biocompatível, de custo mais acessível que os outros dois polímeros avaliados. As formulações obtidas com os ativos e respectivos polímeros empregados, assim como os resultados de caracterização de tamanho médio de partícula e teor de água encontram-se descritas na *Tabela 5*.

Os NPCs contendo os modelos hidrofílicos apresentaram o mesmo comportamento dos NPCs-placebo, sendo que as amostras com 3h de processo de extração também mostraram um aspecto fluido e homogêneo, e teor de água entre 4,5 e 6,5% (*Tabela 5*). No caso das amostras NPC-38 (3h) e NPC-39 (3h) observa-se um resultado diferente de teor de água (ainda que o tamanho esteja na escala nanométrica), diferença que pode ser atribuída à mudança do sistema operacional. O reator utilizado até então foi danificado e as novas formulações foram produzidas em um novo reator, com geometria e tamanho de impelidor diferentes. Com isso, observou-se uma alteração na pressão produzida durante o processo de extração de água, o que pode ter implicado em teores de água reduzidos.

Outra observação importante é que os NPCs contendo ativo modelo também mostraram característica translúcida para tal teor de água, conforme apresentado na *Figura 24*, reproduzindo o aspecto obtido para as formulações placebo. Especialmente a amostra NPC-14, contendo cianocobalamina, mostrou um aspecto de translucidez, ainda que avermelhada (cor conferida pela presença do ativo) comparada à amostra de 5 horas de processo de extração, que tinha aparência opaca.

Figura 24: Amostras dos NPCs D_{3h} e D_{5h}: NPC-12; E_{3h} e E_{5h}: NPC-15; F_{3h} e F_{5h}: NPC-14.

Confirmando ainda a manutenção das propriedades do sistema placebo, as amostras com 5h de extração de água apresentaram separação de fases, ocorrendo precipitação da fase

dispersa sólida. No entanto, observou-se uma separação mais moderada, comparando com os sistemas placebo, o que será evidenciado na caracterização por turbidimetria. De forma análoga aos NPCs sem ativo, propõe-se que, a separação pode ser em função do baixo teor de água, no qual o polímero se solidifica formando partículas com as quais o emulsificante não consegue interagir, e então ocorre a precipitação da fase dispersa.

Os dados de diâmetro médio (*Tabela 5*) confirmam a escala nanométrica dos NPCs com ativo incorporado, e estão na mesma faixa de tamanho das amostras dos lotes de 1 a 6, evidenciando que a presença do fármaco não alterou as características de tamanho dos nanocarreadores.

Tabela 5: Descrição dos NPCs contendo ativo modelo e dados de teor de água, diâmetro médio e polidispersidade.

<i>Amostra*</i>	<i>Polímero</i>	<i>Ativo modelo</i>	<i>Viscosidade (CPs)</i>	<i>Tempo de extração</i>	<i>Teor de Água (%)</i>	<i>Diâmetro (nm)</i>	<i>IP**</i>
NPC-11	Amido	SS	150,7	3h	5,694 ± 0,148	143,0	0,085
				5h	0,165 ± 0,01	116,0	0,052
NPC-12	PVP	SS	104,7	3h	5,940 ± 0,376	126,1	0,328
				5h	0,291 ± 0,028	202,0	0,541
NPC-14	Amido	Cianocobalamina	102,5	3h	6,153 ± 0,034	288,1	0,089
				5h	0,258 ± 0,055	316,6	0,133
NPC-15	Amido	SS	140,5	3h	6,264 ± 0,650	348,7	0,073
				5h	0,208 ± 0,01	172,7	0,128
NPC-24	Amido	Cianocobalamina	NA	3h	4,154 ± 0,940	395,43	0,084
				5h	0,677 ± 0,178	408,88	0,047
NPC-38	Amido	SS	114	3h	3,974	442,0	0,084
				5h	0,205	417,9	0,107
NPC-39	Amido	Cianocobalamina	135	3h	1,338	472,2	0,138
				5h	0,409	317,1	0,131

**As amostras apresentadas na tabela referem-se à replicatas de ensaio.*

***IP: Índice de Polidispersão*

4.10 Estabilidade Coloidal dos NPCs contendo ativos

A estabilidade coloidal das formulações contendo ativo também foi avaliada por turbidimetria dinâmica. As amostras NPC- 11, NPC-12, NPC-14 e NPC-15 (com 3 horas de processo de extração) foram submetidas a análise por 24 horas, a cada 30 minutos. Através comparação da cinética de estabilidade (*Figura 25*) observou-se que a variação do backscattering é muito reduzida, produzindo valores inferiores a 1.00%, demonstrando um perfil de grande estabilidade. Neste tratamento de dados são considerados os valores de retroespalhamento obtidos de maneira global ao longo do tudo (de aproximadamente 1 a

32mm), em função do período analisado. As curvas apresentadas na *Figura 25* são uma comparação os perfis de estabilidade de cada amostra, sendo que quanto mais se aproximam do nível inferior (valores próximos a zero no delta BST – eixo Y), menos instáveis são as amostras.

Figura 25. Comparação de cinética de estabilidade dos NPC-11, NPC-12, NPC-14 e NPC-15.

4.11 Caracterização Morfológica dos NPCs contendo ativo

O mesmo procedimento desenvolvido para os NPCs placebo foi empregado para a caracterização morfológica dos NPCs contendo ativos (descritos na *Tabela 5*). As fotomicrografias do NPC contendo salicilato de sódio obtidas encontram-se na *Figura 26*. As imagens A e B mostram o perfil cristalino do salicilato de sódio, o fármaco puro, antes do processo de nanoencapsulação. Posteriormente, observa-se nas imagens C, D, E e F os NPCs constituídos de amido, contendo salicilato de sódio (SS) como ativo modelo (NPC-11) evidenciando uma superfície irregular, com várias protuberâncias na superfície das partículas, como se fossem grânulos de ativo. Esta morfologia demonstra que o ativo está provavelmente encapsulado, distribuído na matriz polimérica, com localização preferencial na porção mais externa da matriz. Propõe-se a hipótese de que durante a retirada da fase interna através do processo de extração à vácuo, o SS que tem alta solubilidade na água, migre para a superfície das partículas e fique mais retido na camada mais externa, se solidificando com o teor de água final (menor que 1,0%) e formando os pequenos grânulos visualizados.

**Imagem A: Salicilato de sódio:
fármaco puro
(Aumento: 100x)**

**Imagem B: Salicilato de sódio:
fármaco puro
(Aumento: 3500x)**

**Imagem C: NPC-11
[NPC contendo SS, polímero: amido]
(Aumento: 12.000x)**

Figura 26: Micrografias de FEG-SEM do SS e NPC-11.

Imagem D: NPC-11
[NPC contendo SS, polímero: amido]
(Aumento: 35.000x)

Imagem E: NPC-11
[NPC contendo SS, polímero: amido]
(Aumento: 50.000x)

Imagem F: NPC-11
[NPC contendo SS, polímero: amido]
(Aumento: 100.000x)

Figura 26: Micrografias de FEG-SEM do SS e NPC-11 (continuação).

Na *Figura 27*, observa-se o cristal de cianocobalamina (fármaco puro), material com forma cristalina bem definida, também antes do processo de nanoencapsulação (*Imagens A, B e C*). As *Imagens D, E e F* correspondem ao NPC-14, composto por amido contendo cianocobalamina, no qual não foi observado a mesma morfologia que na presença do SS. A superfície das partículas apresentou-se regular e esférica, assim como dos NPCs placebo constituídos de amido. Aqui, supõe-se que devido ao tamanho da molécula da cianocobalamina (1358,40g/mol) comparada à do SS (160,11g/mol) a migração do ativo para a porção exterior da matriz é dificultada, não ocorrendo a formação dos grânulos. Além disso, cabe lembrar que as proporções ativo:polímero empregadas para os dois ativos são diferentes, sendo que no caso do SS, a concentração do ativo foi maior (22,22% em relação ao polímero), o que também poderia justificar as diferenças morfológicas das partículas. No caso da cianocobalamina, foi utilizada concentração de 10% de ativo em relação ao polímero sugerindo a necessidade de investigação se a causa da presença dos grânulos na superfície se deve à concentração de ativo empregada na formulação.

Outra justificativa para estas diferenças morfológicas se baseia ainda na estrutura química das moléculas modelo, atentando para o tipo de cristal formado quando a água é retirada. É possível que a cianocobalamina, por se tratar de uma molécula orgânica, de peso molecular elevado, realize mais interações com a matriz polimérica também orgânica, enquanto que o SS, por ser um sal cristalino pode ser parcialmente “expulso” da matriz do polímero, mostrando algum tipo de incompatibilidade entre eles. Tal efeito tem sido comumente relatado na literatura para as nanopartículas lipídicas sólidas de primeira geração, que sofrem o rearranjo cristalino da matriz lipídica conduzindo à forma mais estável. Este aumento da organização da estrutura lipídica resulta em uma redução das regiões desorganizadas e em uma conseqüente expulsão das moléculas ativas até então encapsuladas na partícula (PIETKIEWICZ et al., 2006).

**Imagem A: Cianocobalamina:
fármaco puro
(Aumento: 500x)**

**Imagem B: Cianocobalamina:
fármaco puro
(Aumento: 1500x)**

**Imagem C: Cianocobalamina:
fármaco puro
(Aumento: 10.000x)**

Figura 27: Micrografias de FEG-SEM da Cianocobalamina e NPC-14.

Figura 27: Micrografias de FEG-SEM da Cianocobalamina e NPC-14 (continuação).

Uma das alternativas propostas para estes sistemas foi a introdução de um lipídeo líquido (óleo) na composição da matriz, gerando partículas lipídicas com imperfeições na estrutura cristalina, causadas pela presença do óleo, como mostra a *Figura 28* (MULLER et al., 2002b), na qual a natureza lipídica da matriz é também fonte de problemas de instabilidade devido à etapa de cristalização e problemas associados ao polimorfismo dos lipídeos. O polimorfismo cristalino é certamente um dos principais parâmetros que afetam a estabilidade coloidal destes sistemas e sua capacidade de encapsulação.

Figura 28: A: Matriz lipídica cristalina perfeita com capacidade de encapsulação limitada. B: Matriz lipídica cristalina com algumas imperfeições, podendo induzir aumento da capacidade de encapsulação (Adaptado: Muller et al., 2002).

O polimorfismo observado nas partículas lipídicas sólidas influencia a capacidade de encapsulação destes sistemas. Ao longo de um processo de produção, as moléculas ativas são dissolvidas ou dispersas na fase lipídica fundida. Após o resfriamento e, portanto, devido à recristalização sob forma pouco estável e ordenada dos lipídios, as moléculas ativas vão preferencialmente se localizar nas zonas amorfas, ou seja, nas regiões menos organizadas da matriz cristalina (JENNING et al., 2000; MULLER et al., 2002b).

Em trabalho anterior (LACERDA, S. P., 2009; LACERDA et al., 2011) foi possível verificar a influência da composição da matriz encapsulante na eficiência de encapsulação, no perfil de liberação e na estabilidade da formulação. Ficam assim sugeridas as possíveis hipóteses para justificar as diferenças morfológicas de cada um dos sistemas, esquematizada na *Figura 29*, embasadas no estudo dos mecanismos que regem a formação de sistemas nanoestruturados de natureza diversa, e também em outras oportunidades de trabalho com nanocarreadores lipídicos e poliméricos.

Figura 29: Ilustração esquemática da hipótese de encapsulação dos ativos modelo no NPC. **A:** Matriz polimérica contendo SS. **B:** Matriz contendo cianocobalamina.

É importante ressaltar que neste trabalho foi avaliada uma mesma matriz polimérica, no caso, o amido, interagindo com 2 ativos (SS e cianocobalamina) distintos, enquanto no caso dos carreadores lipídicos nanoestruturados (LACERDA et al., 2011; MULLER et al., 2002b), são avaliadas composições lipídicas diferentes, que implicam em diferentes matrizes encapsulantes interagindo com um mesmo ativo. Sendo assim, o polímero empregado nos NPCs possui um comportamento de organização estrutural durante o processo de extração de água que induz a diferentes interações em função do ativo que está sendo nanoencapsulado.

4.12 Eficiência de encapsulação – Extração e quantificação de ativo

Neste contexto de avaliação da interação do ativo com a matriz polimérica e resultado obtido com a caracterização morfológica, foi realizada a extração do ativo incorporado na matriz e posterior quantificação.

Através do processo de extração descrito no item “3.3.10 Eficiência de encapsulação de ativo modelo”, foi obtida a concentração de cada um dos modelos hidrofílicos empregados nos NPCs, comparando a massa teórica e a experimental obtida após o procedimento de extração para o cálculo da eficiência de encapsulação. Cabe ressaltar que, anteriormente foram testados alguns procedimentos de extração sem sucesso. Foi testada a adição de quatro tipos solventes: metanol, etanol, água e acetonitrila para a extração do ativo da fase interna da

formulação. Em todos os métodos empregou-se o uso do ultra-som e forte agitação, etapa de centrifugação para separação da fase aquosa e posterior leitura de absorbância.

Destaca-se a importância da metodologia de extração do ativo, visto que é um indicativo da eficiência de encapsulação da matriz também do desempenho do processo na formação dos nanocarreadores, implicando diretamente no sistema de veiculação. O procedimento empregado deve prover uma recuperação eficaz do composto encapsulado, para que este possa ser posteriormente quantificado. A determinação da quantidade de fármaco associada a sistemas nanoestruturados é especialmente complexa devido ao tamanho reduzido destes, que dificulta a separação da fração de fármaco encapsulado.

Verificou-se que a melhor metodologia para a extração do ativo encapsulado foi utilizando hexano para remoção do silicone da superfície dos nanocarreadores, filtração a vácuo, e posterior ressuspensão da membrana de filtração em água. Os resultados obtidos para eficiência de encapsulação encontram-se na *Tabela 6*.

Tabela 6: Eficiência de Encapsulação (EE) dos NPCs.

<i>Amostra</i>	<i>Polímero</i>	<i>Ativo modelo</i>	<i>EE (%)</i>
NPC-12	PVP	SS	84,60
NPC-14	Amido	Cianocobalamina	88,68
NPC-15	Amido	SS	93,70

Estes valores podem ser considerados uma alta eficiência de encapsulação visto que são próximos a 100,0% e sugerem que os nanocarreadores poliméricos coloidais são sistemas eficientes para a incorporação dos ativos hidrofílicos e um potencial veículo para incorporação do 5-ALA (e também outras moléculas solúveis em água). Além disso, uma investigação mais aprofundada com relação à forma de associação do ativo com o nanocarreador, ao tipo de interações que este pode estabelecer com o polímero e à liberação do ativo para o meio pode fornecer informações relativas aos fenômenos físico-químicos envolvidos, e ampliar as perspectivas de emprego clínico destes sistemas, não apenas como forma farmacêutica de uso tópico, mas também com intuito de estender suas possibilidades de administração.

Com intuito de corroborar as interações entre o ativo e a matriz polimérica, confirmando o processo de encapsulação, foi realizado um ensaio de espectrometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das formulações e suas respectivas matérias-primas. Os resultados obtidos estão apresentados na *Figura 30*.

A Imagem A da *Figura 30* corresponde à sobreposição dos espectros das matérias-primas: amido (polímero empregado como matriz encapsulante), emulsificante de silicone não iônico (representado por SF1540, nome comercial) e dimeticone (silicone empregado como fase externa da formulação), evidenciando o perfil de absorção no infravermelho pelas matérias-primas que compõem a formulação. Na Imagem B observa-se a sobreposição das formulações NPC-38, NPC-39 e NPC-40 que correspondem aos nanocarreadores contendo SS, cianocobalamina e sem ativo (placebo), respectivamente.

Através desta sobreposição verifica-se que não há diferença nos sinais correspondentes às 3 amostras, demonstrando que o NPC contendo ativo tem o mesmo perfil de absorção no infravermelho do NPC-placebo. Nas Imagens C e D observa-se a sobreposição dos espectros dos NPCs, do amido e dos ativos puros (matéria-prima), mostrando novamente que não há bandas nos NPCs referentes ao SS nem à cianocobalamina.

Estes resultados sugerem que o ativo está encapsulado na matriz polimérica, não exibindo bandas de absorção relativas ao ativo puro, corroborando a hipótese de nanoencapsulação nos carreadores poliméricos coloidais.

Imagem A: sobreposição do espectro FTIR do amido, do emulsificante de silicone não iônico e do dimeticone.

Figura 30: Espectros de FTIR dos NPCs e das respectivas matérias-primas, obtidos em pastilhas de KBr.

Imagem B: sobreposição do espectro FTIR das amostras de NPC-38 (matriz: amido; ativo: SS), NPC-39 (matriz: amido; ativo: cianocobalamina) e NPC-40 (matriz: amido; placebo).

Imagem C: sobreposição do espectro FTIR da amostra de NPC-38 (matriz: amido; ativo: SS), do amido e do SS (matéria-prima).

Figura 30: Espectros de FTIR dos NPCs e das respectivas matérias-primas, obtidos em pastilhas de KBr.
(Continuação).

Imagem D: sobreposição do espectro FTIR da amostra de NPC-39 (matriz: amido; ativo: cianocobalamina), do amido e dacianocobalamina (matéria-prima).

Figura 30: Espectros de FTIR dos NPCs e das respectivas matérias-primas, obtidos em pastilhas de KBr.
(Continuação).

4.13 Perfil de liberação *in vitro*

Nesta etapa da caracterização foi avaliada a cinética de liberação *in vitro*, visando estudar o comportamento da formulação em meio aquoso, a liberação do ativo da matriz polimérica e o tempo de liberação.

Os resultados obtidos para o perfil de liberação da cianocobalamina do NPC-14 e do salicilato de sódio do NPC-15 estão apresentados na *Figura 31*. Observa-se que os NPCs contendo salicilato de sódio apresentaram um perfil de liberação mais rápido, atingindo concentrações de aproximadamente 70,0% de ativo liberado, comparado àqueles contendo cianocobalamina. Além disso, o perfil de liberação mostrou-se sustentado até atingir concentrações próximas a 100% de ativo liberado. No caso do NPC contendo cianocobalamina a porcentagem liberada foi muito menor, sendo que com aproximadamente 1 hora de experimento apenas 20,0% havia sido liberado. Contudo o perfil também se manteve

sustentado como pode ser observado, liberando concentrações de até 35,95% no período de 72 horas (dados não incluídos no gráfico).

Figura 31: Perfil de liberação de Cianocobalamina e Salicilato de sódio dos NPC-14 e NPC-15 respectivamente, realizado em meio aquoso, 37,0°C e leitura de absorbância no UV.

Estas diferenças no perfil de liberação podem ser atribuídas a alguns fatores aqui abordados. Primeiramente, o SS é muito mais solúvel em água do que a cianocobalamina (ver dados na *Tabela 4*), o que permitiria a solubilização no meio de maneira muito mais eficiente. E também, a cianocobalamina é uma molécula aproximadamente 10 vezes maior que o SS (considerando os valores de massa molecular), o que possibilita um número maior de interações químicas com o polímero como pontes de hidrogênio na presença da água, ficando assim mais retida na matriz do nanocarreador, além de promover também interações físicas. Outro fator importante, além da solubilidade do ativo e da massa molecular que possibilita as interações com a matriz, é o fato do SS estar localizado preferencialmente na superfície da nanoestrutura (conforme foi observado por microscopia eletrônica, apresentado anteriormente na *Figura 29*), promovendo uma liberação rápida, que posteriormente é sustentada no decorrer do tempo.

Considerando o comportamento dos ativos modelo e extrapolando a aplicação dos nanocarreadores para posterior incorporação do ácido 5-aminolevulínico, o SS representaria o perfil de liberação mais próximo a ser atingido neste caso, visto que o 5-ALA também é uma molécula pequena, de alta solubilidade em água. Espera-se assim que o sistema seja promissor

para as aplicações na terapia fotodinâmica, em que o pró-fármaco deve ser rapidamente liberado e metabolizado pelas células para conversão no composto fotossensível. No caso do SS (que reproduz um perfil esperado para o 5-ALA), uma porcentagem de aproximadamente 70,0% do ativo é liberada com 1 hora de aplicação, indicando que após a administração de uma formulação contendo o ALA incorporado nos NPCs, logo o pró-fármaco será absorvido e metabolizado, para posterior aplicação de luz.

PARTE III

Alinhado com o objetivo principal deste trabalho e como condição *sine qua non* para validação da eficiência dos sistemas nanocarreadores na liberação controlada e sítio específica de ativos, foi realizada a encapsulação do pró-fármaco alvo, o ácido 5-aminolevulínico nos NPCs, e posteriormente uma caracterização mais refinada do sistema NPC-ALA, incluindo a avaliação da estabilidade da molécula encapsulada e verificação das propriedades de aplicação relacionadas à ação fotodinâmica.

Inicialmente foi realizado um estudo de caracterização térmica do 5-ALA, visando obter informações sobre a estabilidade térmica e o perfil de degradação do ativo que pudessem ser empregadas no desenvolvimento do nanocarreador de veiculação tópica. Posteriormente, o 5-ALA foi incorporado/encapsulado nos sistemas nanocarreadores, os quais foram caracterizados quanto ao tamanho médio de partícula, índice de polidispersão, teor de água, morfologia e eficiência de encapsulação.

Nas etapas seguintes foram realizados os testes iniciais de aplicação e desempenho do produto, sendo avaliada a estabilidade física e química, o perfil de liberação *in vitro*, as taxas de permeação e retenção cutâneas, a citotoxicidade e a produção de PpIX por células a partir dos NPCs contendo ALA, como indicativo da eficácia fotodinâmica.

4.14 Caracterização térmica do 5-ALA

“A análise térmica abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância (e/ou seus produtos de reação) é medida como função da temperatura, enquanto esta é submetida a um programa controlado de temperatura” (IONASHIRO, 2005). Dentre as técnicas empregadas, as mais difundidas são a termogravimetria, a análise térmica diferencial e a calorimetria exploratória diferencial.

Termogravimetria (TG) é a técnica na qual a massa de uma substância é medida em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura. No registro é a curva TG ou termogravimétrica, o peso é colocado em ordenadas, com valores decrescentes de cima para baixo e o tempo (t) ou a temperatura (T) em abcissas, com valores crescentes da direita para a esquerda. As curvas de variação de massa em função da temperatura permitem obter conclusões sobre a estabilidade térmica das amostras, sobre a composição e estabilidade dos compostos intermediários e sobre a composição do resíduo (IONASHIRO, 2005).

A análise térmica diferencial (DTA) fornece a medição contínua das temperaturas da amostra e de um material de referência termicamente inerte, à medida que ambos vão sendo aquecidos ou resfriados em um forno. Estas medições de temperatura são diferenciais, pois se registra a diferença entre a temperatura da referência (T_r), e a da amostra (T_a), ou seja ($T_r - T_a = \Delta T$), em função da temperatura ou do tempo, dado que o aquecimento ou resfriamento são sempre feitos em ritmo linear ($dT/dt = \text{Constante}$).

Calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material referência, em função da temperatura enquanto a substância e o material referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura.

Através destas técnicas, pode-se acompanhar os efeitos de calor associados com alterações físicas ou químicas da amostra, tais como transições de fase (fusão, ebulição, sublimação, congelamento, inversões de estruturas cristalinas) ou reações de desidratação, dissociação, decomposição, óxido-redução, etc. capazes de causar variações de calor. Em geral, transições de fase, desidratações, reduções e certas reações de decomposição produzem efeitos endotérmicos, enquanto que cristalizações, oxidações, algumas reações de decomposição produzem efeitos exotérmicos (IONASHIRO, 2005).

A curva termogravimétrica do 5-ALA (curva TG da *Figura 32*) mostrou que a decomposição do composto ocorre em dois estágios. A primeira etapa de decomposição se inicia em 160,0°C (conforme prolongamento da reta pontilhada marcada no gráfico), evidenciando uma perda de massa da ordem de 60,0% e a segunda etapa se inicia em aproximadamente 400°C (indicada no gráfico da mesma forma que a anterior). Em suma, os limites de estabilidade do material podem ser considerados próximos à temperatura de 160°C, na qual se inicia a perda de massa.

No caso da curva DTA (*Figura 32*), observa-se um evento endotérmico que se inicia logo antes da primeira etapa de degradação. Tal evento corresponde à fusão do composto, conforme mostra a curva DSC (*Figura 33*). A temperatura de pico de fusão obtida por DTA coincide com o início da primeira etapa de decomposição, sendo que os picos de ambos os eventos apresentam-se sobrepostos, como pode ser observado na *Figura 33*.

Utilizando a taxa de aquecimento 10°C/min, pode-se observar que a degradação inicia-se antes do término da fusão, visto que após o pico da fusão não ocorre retorno para a linha de base. Na tentativa de separar os eventos (fusão e degradação), foram feitos experimentos em diferentes taxas de aquecimento: 1, 10, 20 e 80°C/min. Observou-se que quanto menor a taxa de aquecimento, mais congruentes foram os eventos, sendo que para 1°C/min o pico de fusão

está completamente sobreposto com a degradação, enquanto que em 80°C/min, pode-se confirmar a somatória dos dois eventos (degradação e fusão), que se mostram ligeiramente separados nesta condição.

Figura 32: Curvas TG e DTA do 5-ALA obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio na razão de aquecimento 10°C/min.

Figura 33: Tratamento de dados das curvas DSC do 5-ALA obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio nas razões de aquecimento 1, 10, 20 e 80°C/min.

Este efeito de separação dos eventos congruentes pode ocorrer devido ao aumento da taxa de aquecimento, que favorece os eventos termodinâmicos, em detrimento dos eventos cinéticos. Sendo assim, com taxas de aquecimento maiores, aumenta-se o fornecimento de energia (num determinado intervalo de tempo) e o pico de fusão tende a ocorrer separadamente do início da degradação. neste caso a degradação é preferencialmente um evento cinético que tende a ser retardado em taxas de aquecimento maiores. Considerando tal efeito, a entalpia de fusão (apresentada na *Tabela 7*) tende a diminuir com o aumento da taxa de aquecimento devido ao “desacoplamento” dos picos que permite que a entalpia calculada seja, cada vez mais próxima, da entalpia de fusão, e não dos dois eventos somados. Por outro lado, com taxas de aquecimento menores, os eventos ocorrem concomitantemente, não sendo possível visualizar a fusão do material.

Tabela 7: Parâmetros de integração das curvas de DSC do 5-ALA (fármaco puro).

<i>Taxa de aquecimento (°C/min)</i>	<i>T onset (°C)</i>	<i>T peak (°C)</i>	<i>ΔH (J/g)</i>
1	148,37	148,95	199,06
10	156,10	157,63	169,36
20	159,46	160,87	148,32
80	159,68	163,66	143,31

De acordo com Aires (citado em (IONASHIRO, 2005)), a razão de aquecimento exerce grande efeito sobre as reações que envolvem perdas de massa (a degradação, no caso). À medida que vai se aumentando a razão de aquecimento, podem ocorrer deslocamentos dos picos de até 75°C. Estes grandes deslocamentos das temperaturas dos picos podem ser explicados pela presença dos gases provenientes da razão de decomposição.

Neste contexto, a caracterização térmica do pró-fármaco contribuiu fornecendo informações a respeito dos processos de degradação e fusão do composto. As curvas TG, DTA e DSC do 5-ALA mostraram que seu limite de estabilidade é o evento de fusão, a partir do qual se inicia o primeiro estágio da decomposição, um evento irreversível. Tal comportamento inviabiliza a manipulação do pró-fármaco em estado fundido, por exemplo. Além disso, constatou-se que a degradação do 5-ALA é preferencialmente favorecida por eventos cinéticos, e não termodinâmicos como na maioria das moléculas, ainda que não tenha

sido possível através das análises efetuadas calcular a entalpia de fusão do composto puro desvinculada do processo de degradação.

4.15 Incorporação do 5-ALA e caracterização

Nesta etapa do trabalho foi realizada a nanoencapsulação do ativo alvo, o 5-ALA, após investigação da formulação e do processo de fabricação dos nanocarreadores placebo, exploração do sistema com ativos modelo e caracterização do comportamento da nanoestrutura na encapsulação de ativos hidrofílicos.

A incorporação do 5-ALA nos nanocarreadores poliméricos coloidais foi feita seguindo o protocolo de fabricação previamente desenvolvido (item 3.3.10). O processo de nanoencapsulação foi conduzido empregando amido como matriz encapsulante e duas diferentes concentrações de ativo, sendo elas uma proporção mássica de (1:8) ativo: polímero, reproduzindo o processo com Salicilato de sódio; formulação chamada de **NPC-ALA 1**; e **NPC-ALA 2**, na razão (0,5: 8,5) ativo: polímero. Os ensaios foram realizados com coletas de alíquotas da formulação em intervalos de tempos pré-determinados para o monitoramento do tamanho médio de partícula e teor de água.

Considerando as temperaturas nas quais o processo é realizado e o perfil de degradação térmica do pró-fármaco; e também as concentrações finais de água na formulação, observa-se que o sistema nanocarreador proposto aqui é promissor para a estabilização do 5-ALA. A proposta inovadora de uma nanoestrutura polimérica suspensa em silicone foi concebida principalmente considerando as limitações do pró-fármaco em questão, com relação à instabilidade química e degradação em meio aquoso em pH fisiológico, além da restrita permeação nas camadas da pele em função de ser uma molécula muito hidrofílica e ionizada, conforme revisão da literatura (item 1.3.2).

As amostras de NPC-ALA foram caracterizadas quanto ao tamanho médio de partícula pela técnica de DLS, e os resultados obtidos demonstraram sistemas em escala nanométrica com baixo índice de polidispersão, representando uma distribuição de tamanho homogênea.

A etapa de extração da fase interna aquosa também apresentou semelhança com aquela obtida nos sistemas placebo e com ativos modelo, indicando que determinado teor de água é necessário para obtenção do sistema em escala nanométrica (como pode ser observado na *Figura 34* – dados obtidos para o sistema NPC-ALA 1). A partir de 2 horas de processo de extração de água na fase interna foram observados diâmetros de partícula inferiores a 1µm, corroborando a hipótese que controlando a etapa de extração de água da fase interna é

possível modular o tamanho de partícula dos nanocarreadores, atingindo um patamar de diâmetro em escala nanométrica.

Figura 34: Gráfico do teor de água versus tamanho de partícula NPC-ALA 1

A Tabela 8 apresenta os resultados de tempo de extração de água, relacionados ao teor de água, tamanho de partícula e índice de polidispersão. Observa-se que a formulação NPC-ALA 1 possui 0,279% de água com 3 horas de processo de extração, o que pode ser explicado pelo volume de material produzido (foi manipulado um lote com 50% do volume de formulação produzido nos outros casos). Tal modificação aumentou a eficiência do sistema na redução da pressão, e consequentemente acelerou o perfil de extração de água.

Todavia, no caso do NPC-ALA 2 foram manipulados 200,0mL (volume anteriormente produzido para os outros lotes), mas a bomba à vácuo utilizada estava com potência reduzida, implicando em uma queda de eficiência na extração de água e resultados de teores acima de 6,5% com 3 horas de processo de extração (conforme pode ser observado na Tabela 8).

Tabela 8: Dados de formulação e processo, teor de água, diâmetro e IP dos NPC-ALA.

Amostra	[ALA: Amido]	Tempo de extração	Teor de Água (%)	Diâmetro (nm)	IP*
NPC-ALA 1	1: 8	3h	0,279 ± 0,106	331,5	0,0468
		5h	0,165 ± 0,01	335,2	0,0668
NPC-ALA 2	0,5: 8,5	3h	7,471 ± 0,565	1571,9	0,196
		5h	0,375 ± 0,094	421,0	0,134

*IP: Índice de Polidispersão

A morfologia do cristal de 5-ALA puro e dos nanocarreadores contendo 5-ALA foi analisada por FEG-SEM. As imagens obtidas estão ilustradas na *Figura 35*. Observa-se que o material puro tem aspecto cristalino, com morfologia bem definida, com hábito cristalino prismático, que pode ser visualizado nas imagens A, B, C e D.

No caso dos nanocarreadores contendo 5-ALA encapsulado (imagens de *E* a *M*), a morfologia apresentou-se regular, com partículas de forma esférica e nanométrica, contendo material sólido na superfície das partículas. Conforme esperado, reproduzindo comportamento semelhante ao dos nanocarreadores contendo salicilato de sódio, possivelmente o 5-ALA que é muito hidrofílico e tem mais atração pela água (que o agente encapsulante - amido) sofre um processo de difusão durante a etapa de extração da fase interna migrando para a superfície da partícula, onde ocorre sua cristalização ou solidificação. Observa-se nas partículas um material esbranquiçado, de aspecto sólido agregado na superfície dos nanocarreadores (Imagens J a M). O mesmo aspecto foi observado nas duas formulações contendo concentrações distintas de 5-ALA (**NPC-ALA 1** e **NPC-ALA 2**), ainda que as imagens do NPC-ALA 1 não apresentem uma boa resolução.

Figura 35: Micrografias de FEG-SEM do 5-ALA puro, NPC-ALA 1 e NPC-ALA 2.

Imagem B:
5-ALA: fármaco puro
(Aumento: 1.500x)

Imagem C:
5-ALA: fármaco puro
(Aumento: 2.000x)

Imagem D:
5-ALA: fármaco puro
(Aumento: 5.000x)

Figura 35: Micrografias de FEG-SEM do 5-ALA puro, NPC-ALA 1 e NPC-ALA 2 (Continuação).

Imagem E: NPC-ALA 1
[NPC contendo 5-ALA,
polímero: amido]
(Aumento: 20.000x)

Imagem F: NPC-ALA 1
[NPC contendo 5-ALA,
polímero: amido]
(Aumento: 50.000x)

Imagem G: NPC-ALA 1
[NPC contendo 5-ALA,
polímero: amido]
(Aumento: ~80.000x)

Figura 35: Micrografias de FEG-SEM do 5-ALA puro, NPC-ALA 1 e NPC-ALA 2 (Continuação).

Imagem H: NPC-ALA 2
[NPC contendo 5-ALA,
polímero: amido]
(Aumento: 5.000x)

Imagem I: NPC-ALA 2
[NPC contendo 5-ALA,
polímero: amido]
(Aumento: 5.000x)

Imagem J: NPC-ALA 2
[NPC contendo 5-ALA,
polímero: amido]
(Aumento: ~15.000x)

Figura 35: Micrografias de FEG-SEM do 5-ALA puro, NPC-ALA 1 e NPC-ALA 2 (Continuação).

Imagem K: NPC-ALA 2
[NPC contendo 5-ALA,
polímero: amido]
(Aumento: 20.000x)

Imagem L: NPC-ALA 2
[NPC contendo 5-ALA,
polímero: amido]
(Aumento: 35.000x)

Imagem M: NPC-ALA 2
[NPC contendo 5-ALA,
polímero: amido]
(Aumento: 50.000x)

Figura 35: Micrografias de FEG-SEM do 5-ALA puro, NPC-ALA 1 e NPC-ALA 2 (Continuação).

4.16 Eficiência de encapsulação e Estabilidade química NPC-ALA

A medida da eficiência de encapsulação (EE) foi realizada empregando método de extração desenvolvido para os ativos modelo (salicilato de sódio e cianocobalamina), e metodologia de quantificação descrita por Vena (2005), empregando reação de derivatização, formação de um intermediário fluorescente e doseamento deste por espectroscopia de fluorescência. Foram estudados alguns parâmetros de co-validação da metodologia de quantificação do 5-ALA envolvendo a derivatização e medida da fluorescência.

Os resultados obtidos na co-validação mostraram a sensibilidade e especificidade do método para aplicação na quantificação de 5-ALA para os ensaios de eficiência de encapsulação, liberação *in vitro* e permeação cutânea. Todavia evidenciaram suas limitações, com relação à robustez e precisão.

A linearidade do método foi avaliada pela análise da fluorescência em diferentes concentrações (incluindo concentrações nos extremos de saturação e diluição). As intensidades de fluorescência obtidas para o derivado intermediário fluorescente podem ser observadas na *Figura 36* e correlacionadas com as respectivas concentrações, identificando a região de linearidade do método.

Figura 36: Região de linearidade do método de quantificação do 5-ALA, em que A, B e C são as replicatas das concentrações da curva.

A partir desta análise identificou-se a região linear da correlação intensidade de fluorescência versus concentração, que ocorre na faixa de 10 a 600 µg/mL. O limite de detecção também foi calculado e o valor obtido foi de 1 µg/mL.

Para avaliação da precisão intermediária foram analisadas amostras da mesma concentração de derivado de 5-ALA em 3 dias diferentes. Os resultados obtidos apresentaram uma média de intensidade de fluorescência de $1996,9 \pm 156,76$, para a concentração de 0,50 mg/mL, e um desvio padrão relativo de 7,85 mostrando que o método tem baixa precisão. De acordo com a RE899 da ANVISA, o valor máximo aceitável do desvio padrão relativo deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (ANVISA, 2003).

Com relação à robustez, que consiste na capacidade do resultado de não ser muito alterado por pequena modificação nos parâmetros (ANVISA, 2003), observou-se que os tempos de agitação (5 segundos) e aquecimento da reação de derivatização (10 minutos) influenciam drasticamente no comportamento do composto fluorescente formado, sendo necessário mantê-los padronizados para reduzir as variações de medida da fluorescência, demonstrando uma baixa robustez do método.

O parâmetro especificidade é relativo à capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos (preferivelmente em relação ao material de referência conhecido) em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o fármaco, mas compostos estruturalmente semelhantes (ANVISA, 2003).

Foi realizado teste com a formulação NPC sem fármaco (placebo NPC-17), contendo apenas o polímero e verificou-se que não há interferência na quantificação do derivado de 5-ALA (intermediário fluorescente), confirmando a especificidade do método.

Os experimentos de EE foram realizados logo após o preparo dos sistemas nanocarreadores contendo 5-ALA. A extração foi realizada através da lavagem do silicone com hexano e filtração dos nanocarreadores em membrana 0,22 µm. Toda a massa de pró-fármaco incorporada na formulação foi recuperada em solução aquosa e consecutivamente submetida a reação de derivatização, e leitura da fluorescência.

Os valores obtidos demonstraram que uma alta concentração do 5-ALA mantém-se incorporada nos sistemas nanocarreadores, não sendo observadas diferenças significativas com relação às concentrações de ativo empregadas (**NPC-ALA 1** e **NPC-ALA 2**) e reproduzindo a eficiência de encapsulação obtida para os ativos modelo. Os valores obtidos para a eficiência de encapsulação no dia zero (0) são maiores que 80% e encontram-se na *Tabela 9*. Estes resultados são importantes uma vez que a incorporação de uma terceira molécula valida o comportamento do sistema quanto à alta taxa de eficiência de encapsulação.

Verifica-se que os desvios padrão da análise de eficiência de encapsulação variam bastante, e em alguns casos são da ordem de grandeza de 10%, sendo considerados estatisticamente valores altos (considerando o valor da média). Esta variação pode ser atribuída, principalmente, à metodologia de extração e quantificação do 5-ALA devido ao acúmulo de erros do processo de extração das membranas, reação de derivatização, além do fato das partículas possuírem um índice de polidispersidade que pode influenciar na quantidade de nanocarreadores que são adicionados durante o procedimento.

Tabela 9: Estabilidade da eficiência de encapsulação do NPC-ALA.

Amostra	0 dia	7 dias	6 meses	1 ano	1ano/ 9meses	NA
NPC-ALA 1	84,98 ± 0,25%	87,11 ± 3,03%	86,05 ± 7,92%	79,73 ± 10,54%	74,15 ± 3,41%	NA
Amostra	0 dia	7 dias	30 dias	60 dias	75 dias	6 meses
NPC-ALA 2	90,12 ± 10,39%	90,15 ± 12,02%	81,54 ± 11,96%	79,54 ± 9,31%	82,77 ± 13,9%	73,34 ± 1,61%

4.17 Liberação *in vitro* do NPC-ALA

O exame de um sistema de liberação transdérmico pode evidenciar a complexidade dos fenômenos físicos que estão envolvidos na projeção, no uso e na ação de sistemas de liberação. Estes podem ser listados como a adsorção, a estabilidade de suspensões, o transporte molecular através de membranas poliméricas, a adesão, a interação de drogas com polímeros, as propriedades físico-químicas da pele, e as características difusionais da droga na pele, incluindo o cruzamento da membrana capilar para o sangue (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

A liberação do ativo da matriz polimérica é uma etapa importante na eficácia do sistema de veiculação de fármacos. O estudo do perfil de liberação *in vitro* permite avaliar o

comportamento do sistema com relação à liberação do fármaco de dentro da matriz encapsulante, para o meio aquoso.

No sistema em questão, observou-se uma tendência da liberação do ativo para o meio, indicando um perfil de liberação sustentado, com valores de aproximadamente 60% de 5-ALA liberado em 1 hora de experimento (conforme apresentado na *Figura 37*), reproduzindo a cinética de liberação do salicilato de sódio, conforme expectativa sugerida anteriormente.

Observa-se também que os desvios padrão dos valores obtidos são altos assim como para o ensaio de eficiência de encapsulação do 5-ALA. Estes desvios poderiam, neste caso, ser associados a diferentes fatores, destacando-se a grande variação obtida no método de derivatização e medida da fluorescência, que acumula erros consecutivos desde a reação de formação do intermediário fluorescente, até a quantificação final por espectroscopia de fluorescência. Ainda que a técnica seja extremamente sensível (apresentando limites inferiores de detecção de 1,0µg/mL), os processos de diluição, mistura, aquecimento e resfriamento da solução a ser excitada implicam em uma somatória de erros que se refletem no valor final, proporcionando um alto valor de desvio padrão.

Além disso, cabe neste tópico ressaltar as limitações relacionadas à execução deste ensaio, que envolve a liberação do ativo de dentro da matriz polimérica e posteriormente da formulação de silicone. Um parâmetro que influencia a liberação do composto está relacionado à molhabilidade do silicone, que contribui também para o desvio padrão das replicatas. A formulação foi idealizada para ser topicamente espalhada e permitir que os nanocarreadores poliméricos suspensos no silicone sejam facilmente dispersos na superfície da pele. No caso do estudo *in vitro*, este parâmetro não é considerado, podendo representar um obstáculo para a matriz polimérica liberar o ativo, devido à baixa molhabilidade do silicone.

Além disso, geralmente os estudos de cinética de liberação de partículas podem ter um desvio padrão alto que pode ser influenciado pela polidispersidade das partículas, somado à eficiência de encapsulação (que é um fator intrínseco da massa de partículas pesada), e também considerando a dificuldade de identificar um método para avaliação da liberação do ativo em função de ser um sistema em silicone, que não poderia ser filtrado, visando reproduzir fielmente as condições de aplicação da formulação. Apesar destes desafios e limitações dos métodos adotados para demonstrar o perfil de liberação do 5-ALA dos nanocarreadores poliméricos coloidais, foi possível inferir e comprovar que o ativo em questão consegue difundir do nanocarreador e da formulação e ser liberado para o meio, sendo que valores de até 80% do ativo contido na nanoestrutura é liberado. Observa-se

também uma tendência de liberação rápida do pró-fármaco, semelhante aos nanocarreadores contendo salicilato de sódio, o que é interessante para uma aplicação na terapia fotodinâmica, em que o 5-ALA deverá ser rapidamente liberado, absorvido e metabolizado para posterior aplicação da luz.

Figura 37: Perfil de liberação *in vitro* do NPC-ALA 1, obtidos em meio aquoso, a 37,0°C. A linha verde pontilhada representa uma linha de tendência dos dados obtidos para o perfil de liberação.

4.18 Estudo de permeação cutânea e ação sítio específica

O estudo de permeação cutânea foi realizado empregando membrana animal (pele de orelha de porco) adequadamente preparada, para avaliar as camadas da pele que o nanocarreador permeia, em qual camada o ativo é liberado e em que camada fica retido. Empregou-se como controle uma solução de 5-ALA em propilenoglicol 0,85% (m/m) que corresponde a 8,5mg/mL) (VENA, 2005; STELUTI, 2006) comparada com o 5-ALA encapsulado nos nanocarreadores (na concentração de 0,27% m/m).

Pode-se observar na Figura 38, que apresenta os valores de quantidade acumulada de 5-ALA que atingiu a solução aceptora por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$) versus tempo (min), que o pró-fármaco incorporado no nanocarreador apresentou um perfil de permeação cutânea aparentemente similar ao veículo controle, sendo que os valores de *lag time* são muito parecidos. Entretanto, verifica-se que os nanocarreadores proporcionaram um aumento de

7,32% do fluxo de permeação, ou seja, um aumento da velocidade de difusão do fármaco através da pele em função do tempo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$) com relação à solução controle.

Tabela 10: Dados da permeação cutânea do 5-ALA e NPC-ALA.

<i>Amostra</i>	<i>Lag time (min)</i>	<i>Fluxo, J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$)</i>	<i>Aumento do fluxo</i>
<i>5-ALA controle</i>	107,13	1,4094	NA
<i>NPC-ALA 2</i>	107,20	1,5126	7,32%

Figura 38: Gráfico da quantidade de 5-ALA acumulada versus tempo.

Além disso, comparando as quantidades iniciais adicionadas no compartimento doador, observa-se que os nanocarreadores disponibilizaram a concentração de 5-ALA de forma mais eficaz que o fármaco puro, o que pode ser observado através da porcentagem de 5-ALA permeada (*Figura 39 e Tabela 10*). De acordo com estes resultados, é possível inferir que os sistemas nanocarreadores permitem empregar uma concentração menor de ativo no veículo de aplicação, quando comparado ao 5-ALA livre, atingindo o mesmo fluxo de permeação. A nanoestrutura permite maximizar o processo de permeação não requerendo formulações com alta concentração de pró-fármaco.

Figura 39: Gráfico da porcentagem de 5-ALA permeada versus tempo.

Dentre os resultados obtidos no estudo de permeação cutânea, o que merece maior destaque é a retenção cutânea nas camadas da pele, pois por meio deste estudo foi possível demonstrar a capacidade dos nanocarreadores liberar o ativo de interesse em camadas específicas da pele evidenciando uma propriedade diferenciada de ação sítio específica dos nanocarreadores quando comparados ao pró-fármaco puro.

As quantidades de 5-ALA retido na pele, tanto no estrato córneo, quanto na (epiderme+derme) foram verificadas ao término de cada experimento de permeação, seguindo o protocolo de quantificação descrito no item 3.3.14. Na *Figura 40* estão representados os perfis de retenção cutânea *in vitro* do 5-ALA nas camadas da pele, tanto para o controle (solução de 5-ALA em propilenoglicol) no tempo total de 24 horas, quanto para os nanocarreadores contendo o pró-fármaco.

Conforme pode ser observado, os resultados mostraram que o pró-fármaco em solução de propilenoglicol (descrito no gráfico como 5-ALA controle) acumula-se principalmente no estrato córneo, não permeando em quantidades expressivas as camadas da pele. Em contrapartida, o 5-ALA veiculado nos nanocarreadores fica retido principalmente na região da (epiderme+derme), não sendo encontradas concentrações significativas no estrato córneo, e também verificadas quantidades reduzidas na solução receptora.

Figura 40: Retenção cutânea nas camadas da pele.

Propõe-se que esta diferença ocorra devido ao mecanismo de permeação dos nanocarreadores e conseqüente liberação do 5-ALA para o meio nas camadas celulares mais basais. É provável que os nanocarreadores atravessem o estrato córneo, promovendo a liberação do 5-ALA na região da (epiderme + derme). Desta forma, verifica-se que o NPC altera a cinética de eliminação do 5-ALA na circulação sistêmica, reduzindo a concentração de ativo que sofre depuração (*uptake*).

A Figura 41 é uma ilustração esquemática proposta para o mecanismo de ação dos nanocarreadores sugerindo um modelo de permeação cutânea. A imagem mostra um lado em que o ativo puro (no caso deste estudo, solubilizado em propilenoglicol) é aplicado na superfície da pele e fica retido principalmente no estrato córneo (lateral esquerda do desenho) e no outro lado (lateral direita do desenho) o 5-ALA encapsulado nos NPCs, permeando o estrato córneo e sendo retido preferencialmente na epiderme+derme, promovendo uma liberação controlada nestas camadas. Cabe aqui evidenciar a sítio especificidade conferida pela nanoestrutura, que libera o 5-ALA na região desejada na qual o composto puro não consegue permear com eficácia.

Além disso, os nanocarreadores conferem uma proteção anti-metabólica do encapsulado, que não ocorre no caso do veículo convencional em que a maior fração do ativo fica retida no estrato córneo, e a porção que permea as camadas da pele é eliminada na corrente sanguínea entrando em contato com a circulação sistêmica.

Figura 41: Ilustração esquemática do mecanismo de permeação dos NPCs.

Outro fator importante que pode contribuir para o aumento da taxa de permeação cutânea quando o ativo é veiculado nos nanocarreadores é o aumento da oclusão da pele evitando assim a perda transepidérmica de água. A pele hidratada, recoberta com as estruturas nanométricas tem a perda de água transepidermal reduzida, o que facilita a permeação cutânea, assim como o mecanismo de entumescimento dos nanocarreadores e liberação do 5-ALA. Este mecanismo está ilustrado na *Figura 42*.

Figura 42: Ilustração esquemática da oclusão promovida pelas nanoestruturas.

Além disso, a baixa tensão superficial do silicone aumenta a cobertura e oclusão da pele e possibilita o aumento da biodisponibilidade da droga. A estrutura do disiloxano permite a formação de um filme fino que seca rapidamente, formando esta barreira de oclusão.

Relatos da literatura mostraram que macromoléculas carregadas em emulsões inversas são possivelmente transportadas via transfolicular ou que a via transepidermal é atingida através de perturbações na permeabilidade do estrato córneo provocadas pelos surfactantes (WU et al., 2001b). Wu e colaboradores demonstraram que emulsões com o valor de BHL compatível com o sebo normal (produzido pelas glândulas sebáceas da pele) podem ter o transporte de moléculas hidrofílicas facilitado devido a um processo de co-transporte, mediado principalmente via transfolicular (WU et al., 2001b).

De forma análoga, outro fator que também pode contribuir para permeação mais eficaz do 5-ALA encapsulado e liberação controlada na epiderme+derme é o fato de utilizar uma emulsão inversa (água em óleo), em escala nanométrica, na qual o ativo ficará na fase interna, em contato com pequeno volume de água, melhorando sua estabilidade e reduzindo assim a degradação. A nanoemulsão facilita a penetração do ativo na pele.

A propriedade de ser um sistema nanométrico confere um aumento significativo da área superficial, implicando em uma característica de adesividade do sistema e uma exposição

significativamente aumentada com relação ao meio em que é liberado. Muller et al, 2011 demonstra através de cálculos que enquanto um microcristal de aproximadamente 10 μ m faz 1 (um) ponto de contato, o equivalente em nanocristais (aproximadamente 125.000 nanocristais de 200nm) fazem 125.000 pontos de contato (*Figura 43*) (MULLER et al., 2011).

Figura 43: Ilustração esquemática do aumento da área superficial e adesividade do material nanométrico. (Adaptado de Muller, et al. 2011)

4.19 Citotoxicidade e eficácia fotodinâmica dos nanocarreadores contendo 5-ALA

Visando conhecer a toxicidade dos nanocarreadores para aplicação tópica, e avaliar a eficácia fotodinâmica do sistema nanoestruturado em veicular o 5-ALA para sua biodisponibilização e posterior conversão do pró-fármaco em protoporfirina IX, foram realizados testes pré-clínicos, empregando células de melanoma B16-F10, originadas de linhagem neoplásica de camundongos C57BL/6JD/D adquirida pela American Type Culture Collection (ATCC).

Foram realizados três testes para avaliação da citotoxicidade dos nanocarreadores (contendo 5-ALA), sendo que o primeiro teste envolvia a avaliação da toxicidade em diferentes concentrações dos nanocarreadores. O controle correspondeu a uma solução 3% de soro fetal bovino em meio de cultura. Essa condição é utilizada para garantir que os efeitos dos fármacos analisados não sejam prejudicados pelo soro.

Os resultados demonstraram que as concentrações que apresentaram uma diferença estatística significativa de citotoxicidade com relação ao controle foram: 0,1 e 0,2mg/mL (sendo que esta diferença se caracteriza pela morte celular de 20% ou mais). Este experimento permitiu determinar a faixa de concentração dos NPCs a ser utilizada nos estudos posteriores (*Figura 44*).

O segundo teste realizado abrangeu a avaliação da toxicidade dos NPCs contendo 5-ALA na faixa de 0,01 a 0,05mg/mL (*Figura 45*). Os resultados obtidos evidenciaram que nesta faixa de concentração os NPCs não apresentaram toxicidade significativa.

Figura 44: Quantificação da viabilidade das células de melanoma B-16 após período de incubação de 4 horas, a 37°C, com o NPC-ALA em diferentes concentrações.

Para verificação de possíveis interferentes e confirmação dos resultados de citotoxicidade dos nanocarreadores, o ensaio foi novamente realizado, avaliando agora a toxicidade dos NPCs placebo (sem ativo encapsulado, representado por NCv na figura) e ainda reproduzindo a toxicidade dos NPCs em diferentes concentrações. O placebo também não apresentou toxicidade significativa com relação ao controle (*Figura 45b*).

Figura 45a: Quantificação da viabilidade das células de melanoma B-16 após período de incubação de 4 horas, a 37°C, com o NPC-ALA nas concentrações de 0,01 a 0,05mg/mL.

Figura 45b: Quantificação da viabilidade das células de melanoma B-16 após período de incubação de 4 horas, a 37°C, com o NPC-placebo e NPC-ALA nas concentrações de 0,01 a 0,06mg/mL.

4.20 Avaliação da produção de PpIX pelos NPC-ALA

Foram realizados estudos *in vitro* em cultura de células de melanoma B16, com o intuito de analisar a produção de PpIX, quando o 5-ALA é administrado exogenamente. O procedimento para os estudos de produção de PpIX nas células B16 foi realizado conforme descrito na seção experimental 3.3.19.

Neste experimento foi avaliada a produção de fotosensibilizador propriamente dito, a protoporfirina IX (PpIX) a partir do precursor, o ácido 5-aminolevulinico (5-ALA) administrado exogenamente. Os nanocarreadores contendo 5-ALA foram adicionados nas

células e após 4h de incubação as células foram desgrudadas da placa de cultura e a PpIX extraída com uma solução de MeOH 90%. Através do espectro de emissão da PpIX produzida nas células da solução, o valor foi relacionado à curva de calibração anteriormente obtida e foi calculada a concentração de PpIX produzida a partir do 5-ALA liberado dos nanocarreadores. A *Figura 46* apresenta a concentração de PpIX em ng/mL para cada concentração de nanocarreador contendo 5-ALA.

Figura 46: Produção de PpIX nas células de melanoma B-16 em função da concentração de 5-ALA encapsulado no NPC-ALA, após período de incubação de 4 horas, a 37°C. Comprimento de onda de excitação de 416nm e de emissão de 636nm.

O tempo de incubação de 4 horas foi escolhido considerado ideal para este tipo de célula, baseando-se em relatos da literatura que mostram que um tempo de incubação de 2 a 6 horas é considerado ideal para alcançar altas concentrações de PpIX (ELEOUE et al., 2000a; ELEOUE et al., 2000b).

Foi realizado também o ensaio de fototoxicidade, no qual após incubar as células com 5-ALA puro, NPC-placebo e NPC-ALA, as células foram irradiadas com laser na potência de 300 mW com dose de luz de $3\text{J}/\text{cm}^2$. Após o tratamento, foi avaliada a resposta celular com relação à fototoxicidade. Os resultados obtidos estão apresentados na *Figura 47*, mostraram que o NPC-placebo (representado por NCv) não causou morte celular, enquanto que o 5-ALA puro e o NPC-ALA causaram a morte celular, evidenciando a absorção do 5-ALA (tanto o controle quanto o encapsulado), conversão em PpIX e ação fotodinâmica após a aplicação de luz.

Uma observação importante deste experimento é que a concentração utilizada nos nanocarreadores foi bem menor que a concentração empregada na solução controle (e também menor que aquela concentração empregada nas formulações comerciais). E mesmo assim

mostrou efeito de produção de PpIX, indicando a otimização do uso e melhoria de farmacocinética/ biodisponibilidade, no que concerne à absorção e distribuição (dose adequada no sítio de ação).

Figura 47: Viabilidade celular após período de incubação de 4 horas e posterior irradiação com laser na potência de 300 mW com dose de luz de $3\text{J}/\text{cm}^2$.

De acordo com estudos de Thienot (2010), os sistemas nanocarreadores têm sítio-especificidade baseada em uma rota simples: age pelo efeito de retenção e da permeabilidade aumentada (EPR) dos tecidos neoplásicos. O EPR é baseado em 2 principais fatores: primeiro, a capilaridade do endotélio nos tecidos malignos é mais desordenada e por isso mais permeável a macromoléculas que no endotélio normal. Isto permite o extravasamento de nanoestruturas poliméricas no interstício do tumor. Segundo, a falta de drenagem linfática na região do tumor resulta em acúmulo da droga no local (THIENOT et al., 2010). Estes resultados sugerem que no caso dos nanocarreadores aqui descritos, pode ocorrer o EPR e facilitação da liberação de 5-ALA na região neoplásica, promovendo uma ação sítio específica.

Visto que a eficácia da TFD-ALA tópica depende da habilidade do precursor de penetrar no local da lesão na pele e induzir a produção endógena de PpIX, propõe-se que os NPC contendo ALA, com sua propriedade de liberação controlada, com perfil de permeação nas camadas da pele pode promover uma ação sítio específica na região do tumor, aumentando a eficácia fotodinâmica, sendo considerados sistemas promissores para a TFD.

4.21 Estabilidade física e química dos NPC-ALA

Considerando que o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica demanda três principais condições, sendo elas eficácia, segurança e qualidade; a caracterização da estabilidade, tanto física como química da formulação, no que concerne principalmente ao teor de ativo é indispensável, sendo um indicativo de manutenção da eficácia terapêutica e da qualidade do produto desenvolvido (*Figura 48*). Além disso, uma vez que o ativo aqui estudado apresenta limitações com relação à estabilidade química, requerendo uma condição específica de formulação demonstrada pela preparação extemporânea hoje disponível no mercado (Levulan®), a possibilidade do desenvolvimento de um novo produto, que não requer manipulação no momento do uso e que possui estabilidade prolongada torna-se uma perspectiva promissora.

Figura 48: Ilustração esquemática dos desafios do desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica.

Um das técnicas empregadas na avaliação da estabilidade do sistema foi o monitoramento do tamanho médio de partícula, fornecendo informação relativa à dispersão das partículas no meio e possível aglomeração ou agregação. A *Figura 49* mostra os valores médios de tamanho de partícula obtidos para as formulações contendo 5-ALA.

Para acompanhamento da estabilidade foi padronizado o intervalo de 7000 a 10000 Cps (*counts per second*) para a leitura do tamanho de partícula em todos os ensaios, visando trabalhar sempre nas mesmas concentrações para que os dados tivessem maior confiabilidade.

Observou-se que as formulações mantêm a estabilidade física no tempo, com relação ao tamanho de partícula, não evidenciando aglomeração ou mesmo coalescência. Uma

pequena diferença verificada foi referente à redução do tamanho médio de partículas em algumas medidas. Duas hipóteses podem justificar esta redução, uma possível perda de água no tempo, implicando em redução pouco pronunciada do tamanho médio, ou mesmo separação parcial das partículas maiores, disponibilizando a porção de menor diâmetro para leitura de tamanho.

Figura 49: Perfil de estabilidade física dos nanocarreadores contendo 5-ALA, avaliada pelo método de tamanho de partícula, para as amostras armazenadas a 25,0°C, em frascos âmbar.

Ainda no mesmo contexto, a maioria das drogas está sujeita a alguma forma de decomposição química, particularmente em formulações líquidas. Uma das consequências da degradação é que preparações medicamentosas envelhecidas não apresentam mais a potência desejada. Elas podem também existir manipulação físicas de decomposição – como decomposição, descoloração, fotodegradação, ou mais seriamente, porém não muito frequente conter produtos de decomposição prejudiciais (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

Como ferramenta de monitoramento da estabilidade química do 5-ALA, a eficiência de encapsulação foi avaliada ao longo do tempo, a fim de quantificar a decomposição do composto encapsulado nos nanocarreadores. Os valores obtidos para as duas formulações de concentrações distintas (NPC-ALA 1 e NPC-ALA 2) foram plotados em função do tempo e comparados com o perfil de degradação do 5-ALA livre em solução aquosa, na mesma concentração do encapsulado. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 50.

Observa-se que a velocidade de degradação do fármaco puro é muito maior quando comparada com o fármaco nanoencapsulado, evidenciando valores de apenas 23,36% de 5-ALA em solução aquosa, após 24 horas de armazenamento, sob condições de proteção da luz. No caso do 5-ALA encapsulado, verifica-se que valores da ordem de 70% do fármaco ainda são preservados após 6 meses (no caso da formulação NPC-ALA 2) e por 1 ano e 9 meses no caso da formulação NPC-ALA 1.

Com relação à diferença entre o perfil de degradação das duas formulações, observa-se que para a formulação NPC-ALA 1 na proporção mássica de (1:8) ativo: polímero a taxa de degradação apresenta valores de 73,34% de 5-ALA em 6 meses, enquanto que no caso da formulação NPC-ALA 2 na razão (0,5: 8,5) ativo: polímero a decomposição ocorre com valores de até 74,15% no período de 21 meses. Estima-se (através da equação da reta traçada para cada amostra) que a degradação total do 5-ALA em cada uma das formulações (NPC-ALA 1 e NPC-ALA 2) ocorreria em 4506,5 e 1003 dias respectivamente (conforme dados da *Tabela 11*).

Discute-se a possibilidade desta diferença ser influenciada pela concentração empregada em cada um dos experimentos, sendo no primeiro caso (NPC-ALA 1) empregada uma maior concentração de pró-fármaco na formulação, o que possibilita maior quantidade de material na superfície da partícula (ou mesmo não encapsulado), implicando em uma taxa de degradação ligeiramente mais acelerada. Enquanto que para a formulação com menor concentração de 5-ALA (NPC-ALA 2), a decomposição é retardada.

Ressalta-se que o perfil de degradação foi calculado para as mesmas concentrações de 5-ALA puro e 5-ALA encapsulado, visto que a concentração pode influenciar a taxa de degradação, como citado em (ELFSSON et al., 1999) e (NOVO et al., 1996). Sugere-se que os nanocarreadores poliméricos coloidais permitem a estabilização química do composto, evitando sua dimerização e consequente degradação.

Tabela 11: Dados de degradação do 5-ALA puro e nanoencapsulado nos NPCs, obtidos pelo método de eficiência de encapsulação e quantificação do teor de fármaco no tempo.

<i>Amostra</i>	<i>Concentração de 5-ALA</i>	<i>Tempo de degradação</i>
5-ALA puro	100%	21,75 horas
NPC-ALA 1	5,56% *	4506,5 dias
NPC-ALA 2	11,11% *	1003,0 dias

* Valores considerando a porcentagem de 5-ALA em relação ao polímero (matriz encapsulante)

Figura 50: Perfil de degradação do 5-ALA puro e nanoencapsulados nos NPCs, armazenados a 25,0°C, ao abrigo de luz.

Uma proposta de mecanismo de estabilização da molécula quando incorporada nos nanocarreadores considera que, o 5-ALA encapsulado, em um meio com concentração aquosa reduzida, interagindo com a matriz polimérica, tem sua degradação significativamente retardada, principalmente em função da redução da mobilidade das moléculas neste nanoambiente e consequente redução do número de colisões intermoleculares.

Outro resultado que corrobora a proposta de mecanismo de estabilização do fármaco nos nanocarreadores é o estudo de caracterização térmica anteriormente apresentado, que evidencia que a degradação do composto é principalmente determinada por eventos cinéticos (como a mobilidade das moléculas no meio) não sendo favorecida por eventos termodinâmicos.

Observa-se comparando com outros sistemas anteriormente relatados na literatura como cristais líquidos, lipossomas, formulações contendo promotores de permeação (VENA, 2005; SCHMID; BURMEISTER, 2003; PIERRE, 2004; STELUTI, 2006), que o nanocarreador aumenta a estabilidade do fármaco por um período prolongado, avaliado aqui por até 21 meses, reduzindo a degradação por dimerização. Nota-se que este sistema foi muito promissor na estabilização do composto possibilitando o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica com prazo de validade mais próximos daqueles praticadas para as formulações convencionais.

PARTE VI

4.22 Outras aplicações: Anfotericina B

Durante a execução do trabalho visando obter uma nova formulação contendo um sistema nanocarreador de aplicação tópica, para liberação controlada de fármacos e ação sítio específica, vislumbrou-se a oportunidade da nanoencapsulação de outros ativos, para aplicações diversas e distintas daquela inicialmente prevista (terapia fotodinâmica), o que configurou o sistema desenvolvido como uma plataforma tecnológica.

Em uma oportunidade de parceria com um grupo de trabalho que conduz ensaios *in vivo* relacionados ao estudo de doenças negligenciadas, dentre elas a Leishmaniose, surgiu a idéia de incorporar um fármaco já empregado no tratamento da Leishmaniose, mas que possui limitações relativas à biodisponibilidade e segurança clínica (referentes à toxicidade renal, hepática e cardíaca) (GOODMAN & GILMAN, 2003), possibilitando avaliar a performance do sistema nanocarreador em veicular outro fármaco.

Considerando que no Brasil, o tratamento de primeira escolha para leishmaniose recomendado pelo Ministério da Saúde é o antimonial pentavalente, mas que não existe evidência científica em relação à sua eficácia, se ignora o impacto do desenvolvimento de resistência do parasita com falta de resposta clínica, e que o longo período de tratamento (20-40 dias), com administração por via intravenosa ou intramuscular, potencial de toxicidade e necessidade de monitoramento clínico e laboratorial são os principais fatores que dificultam a aderência ao tratamento (PONTES, 2010), ressalta-se a necessidade de alternativas terapêuticas.

A Leishmaniose é uma doença associada à pobreza, que se apresenta de diferentes formas, sendo as duas mais comuns: visceral (fatal se não tratada) e cutânea (com cura espontânea ou lesões crônicas na pele). O tratamento envolve vários inconvenientes tais como dificuldade de administração, duração do tratamento, toxicidade, custo e crescente resistência dos parasitas aos medicamentos (PONTES, 2010).

Neste contexto, foram realizados alguns experimentos com o fármaco anfotericina B, para aplicação no tratamento da Leishmaniose, permitindo também validar a eficiência dos NPCs em encapsular diferentes ativos, e complementar a elucidação do comportamento do sistema na liberação controlada de fármacos e ação sítio específica.

O protocolo de fabricação dos NPCs contendo o anfotericina B (Anfo B) reproduziu aquele descrito para o sistema contendo os ativos modelo (conforme descrito na *Figura 9*),

sendo que neste caso a proporção mássica ativo: polímero foi de (0,5 : 8,5) conferir, em função da solubilidade do composto. A formulação foi caracterizada quanto ao tamanho de partícula, teor de água e morfologia seguindo as metodologias previamente desenvolvidas para os NPCs.

Tabela 12: Descrição dos NPC-Anfo B.

<i>Amostra</i>	<i>Ativo: polímero</i>	<i>Viscosidade</i>	<i>Tempo de extração</i>	<i>Teor de Água (%)</i>	<i>Diâmetro (nm)</i>	<i>IP*</i>	<i>EE (%)</i>
NPC-16	Anfotericina B: amido	NA	3h	6,977	582,8	0,198	NA
			5h	0,659	116,0	0,328	
NPC-31	Anfotericina B: amido	268,4	3h	4,058 ± 0,278	655,2	0,273	95,717 ± 4,89
		164,0	5h	0,865 ± 0,692	391,7	0,111	

*IP: Índice de Polidispersão

Os lotes obtidos apresentaram um aspecto fluido, com viscosidade na faixa de 150cPs. Os valores de teor de água foram similares aos encontrados para as formulações de NPCs anteriores, permanecendo abaixo de 1,0% para 5 horas de extração de água. O tamanho de partícula também se apresentou na escala nanométrica, com baixo índice de polidispersidade e a morfologia esférica, com a superfície regular, sem rugosidades, confirmando a escala nanométrica.

A Figura 51 apresenta micrografias de SEM-FEG do sistema nanocarreador contendo anfotericina B (Imagens A, B e C), evidenciando sua estrutura esférica e regular das partículas, com aumento de até 100.000 vezes, que comprovam as nanoestruturas.

Imagem A:
[NPC-31
[NPC contendo anfotericina
B, polímero: amido]
(Aumento: 15.000x)

Imagem B:
[NPC-31
[NPC contendo anfotericina
B, polímero: amido]
(Aumento: 35.000x)

Imagem C:
[NPC-31
[NPC contendo anfotericina
B, polímero: amido]
(Aumento: 100.000x)

Figura 51: Micrografias de FEG-SEM NPC-31 contendo anfotericina B.

A liberação *in vitro* da anfotericina B dos nanocarreadores foi avaliada conforme pode ser observado na *Figura 52*, e os resultados demonstraram que em 100 minutos de ensaio aproximadamente 100% do fármaco já havia sido liberado, evidenciando um perfil de liberação rápido.

Figura 52: Perfil de liberação *in vitro* de anfotericina B dos nanocarreadores, em meio aquoso, a 37,0°C.

As formulações dos nanocarreadores contendo anfotericina B (NPC-Anfo B) foram também caracterizadas quanto à toxicidade renal, hepática e cardíaca, quanto à redução da lesão de leishmaniose cutânea murina e quanto à carga parasitária da lesão, em parceria com o Laboratório de Imunofarmacologia, do Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

Foi realizado o tratamento da leishmaniose cutânea murina pelas vias sub-cutânea e tópica, empregando ensaio *in vivo* em animais. Os ensaios *in vivo* foram conduzidos empregando camundongos BALB/c. Os animais foram infectados com 2×10^6 promastigotas da espécie *Leishmania (L) amazonensis* (cepa WHOM/BR/75/Josefa) transfectada com o gene da proteína fluorescente verde (green fluorescent protein - GFP) (ALMEIDA et al., 2000). Após 27 dias de infecção, os camundongos foram aleatoriamente separados em grupos de 4.

As formulações testadas, via de administração, número de doses e as doses empregadas estão descritas na *Tabela 13*. Como controle positivo, foi acrescentada

determinada massa de anfotericina B livre à formulação de NPC placebo, na mesma concentração do fármaco que foi encapsulado (NPC placebo + Anfotericina B). O crescimento da lesão (espessura da orelha infectada menos espessura antes da infecção) foi acompanhado durante o experimento com o auxílio de paquímetro. Os resultados de tratamento da leishmaniose cutânea murina estão apresentados na *Figura 53*.

Observa-se que o NPC-16 (NPC com anfotericina B nanoencapsulada) aplicado topicamente apresentou resultado mais eficaz na redução da lesão parasitária que o fármaco puro, quando administrado via sub-cutânea. Todavia, as aplicações do controle (NPC placebo + anfotericina B), tanto intra lesional, quanto tópica foram menos efetivas que o fármaco puro na redução da lesão.

Tabela 13: Descrição das amostras do teste *in vivo* com NPC contendo anfotericina B.

<i>Amostra</i>	<i>Administração</i>	<i>Número de doses x Dose</i>	<i>Código na imagem</i>
Tampão fosfato	Sub-cutânea	2 doses x 10µl	PBS
NPC placebo + anfotericina B	Sub-cutânea	2 doses x 10µl	NPA (IL)
NPC-16	Sub-cutânea	2 doses semanais x 4µg em 10µl.	NPA / Anfo B (IL)
Anfotericina B	Sub-cutânea	2 doses semanais x 4µg	Anfo B (IL)
Anfotericina B Lipossomal	Sub-cutânea	2 doses semanais x 4µg	Anfo B Lipossomal (IL)
NPC placebo + anfotericina B	Tópica	2 doses diárias x 8µg em 20µl.	NPA branca + Anfo B (Tópico)
NPC-16	Tópica	2 doses diárias x 8µg em 20µl.	NPA / Anfo B (Tópico)

Todos os animais receberam a mesma dose de fármaco, ainda que administradas em períodos diferentes.

Posteriormente, foi realizado o ensaio de quantificação das cargas parasitárias na lesão e no linfonodo auricular, para o mesmo grupo de animais (n = 4), medidas após 52 dias de infecção após a administração de um total de 8 doses sub-cutâneas e de 20 doses tópica. Os resultados estão apresentados na *Figura 54*, sendo o quadro A referente ao número de parasitas na lesão e o quadro B referente ao número de parasitas no linfonodo auricular (ambos determinados pelo método de diluição limitante). No quadro C a carga parasitária apresentada foi obtida por fluorescência específica.

Figura 53: Tratamento de leishmaniose cutânea murina pela via sub-cutânea ou tópica: Camundongos BALB/c foram infectados com 2×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* GFP na orelha. Após 27 dias de infecção, os animais foram aleatoriamente separados em grupos de 4. O grupo tratado com NPC/Anfo B recebeu duas doses da formulação via sub-cutânea com dose 4 ug de Anfotericina B em 10ul. O grupo tratado com Anfotericina B livre e Anfotericina B Lipossomal, recebeu duas doses semanais de 4ug do fármaco. Os controles receberam duas administrações de 10ul de PBS ou NPC. No tratamento tópico, o grupo tratado com NPC/Anfo B recebeu duas doses diárias da formulação com doses de 8ug de Anfotericina B em 20ul de formulação. Como controle, acrescentamos Anfotericina B livre à formulação de NPC vazia na mesma concentração do fármaco que foi encapsulado, o grupo recebeu duas doses diárias dessa formulação (NPC branca + Anfotericina B). O crescimento lesão (espessura da orelha infectada menos espessura antes da infecção) foi acompanhado durante o experimento com o auxílio de paquímetro. Média $\pm$ SD (n=4), ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (Com autorização dos colaboradores da UFRJ).

Observa-se que o NPC-16 (NPC com anfotericina B nanoencapsulada) aplicado topicamente diminui a carga parasitária da lesão (*Figura 54*), atingindo valores próximos àqueles obtidos para o fármaco puro administrado via sub-cutânea (Anfo B (IL)). No linfonodo auricular não foi observada nenhuma carga de parasita quando tratada com NPC-16, e pelo método da fluorescência os valores corroboraram o método de diluição, no qual NPC-16 também reduz a carga parasitária.

Figura 54: Avaliação da carga parasitária na lesão de animais: As cargas de parasita no lisado da lesão foram medidas no dia 52 de infecção após administração sub-cutânea (total de 8 doses) e tópica (total de 20 doses). O número de parasitas na lesão (A) e no linfonodo auricular (B) foi determinado pelo método de diluição limitante (LDA), a carga parasitária em (C) foi medida em unidades de fluorescência específica (FU).

* $p < 0,01$ e ▼ $p < 0,001$ em relação ao grupo PBS. Média $\pm$ DP ($n = 4$) (Com autorização dos colaboradores da UFRJ).

Figura 55: Análise da toxicidade: O soro dos animais foi coletado no dia 52 de infecção para a análise colorimétrica de ALT - alanina aminotransferase, AST - aspartato transaminase e creatinina, como parâmetro de toxicidade para o fígado, coração e rins, respectivamente. Como controle positivo, animais receberam uma dose de tetracloreto de carbono (CCl₄) 1% em óleo de amendoim intraperitonealmente. ** $p < 0,05$ e ▼ $p < 0,001$ em relação ao grupo PBS. Média $\pm$ DP ($n = 4$). (Com autorização dos colaboradores da UFRJ).

Foi realizada também a análise de toxicidade das formulações estudadas (descritas na *Tabela 13*), por análise colorimétrica de alanina aminotransferase (ALT), de aspartato transaminase (AST) e creatinina como parâmetro de toxicidade para o fígado, coração e rins, respectivamente. Como controle positivo os animais receberam uma dose de tetracloreto de carbono (CCl₄) a 1% em óleo de amendoim, intraperitonealmente.

Os resultados mostraram que os NPC-16 (NPC com anfotericina B nanoencapsulada) não apresentam toxicidade significativa para os parâmetros avaliados, correspondentes à nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade (*Figura 55*).

Finalmente, os resultados do estudo *in vivo* demonstraram que os nanocarreadores contendo anfotericina B, quando aplicados via tópica, conseguem veicular o fármaco até a lesão, carreando o ativo através das camadas da pele, o que implica em melhoria da biodisponibilidade. O fármaco é liberado na lesão (confirmando a propriedade de **liberação sítio-específica** dos nanocarreadores), sendo que os carreadores placebo têm efeito reduzido. Além disso, a depuração do fármaco administrado via tópica também é reduzida, evidenciando ausência de toxicidade renal, inferior mesmo ao fármaco puro administrado via sub-cutânea.

Outra constatação importante do estudo *in vivo* foi que após o tratamento (e aplicação das doses), a lesão continua reduzindo, demonstrando um efeito prolongado de ação do fármaco encapsulado.

Todavia, a aplicação sub-cutânea dos nanocarreadores não mostrou resultado promissor, sendo que não houve redução de lesão. Uma hipótese para este efeito seria a redução da resposta imune do animal em função da modificação das propriedades do meio lesional, pela presença do silicone. Uma proposta de etapa futura seria investigar o microambiente da lesão (pH, presença de água, migração de co-fatores celulares e indicadores imunológicos) e possíveis fatores que poderiam ser potencializados com o depósito de silicone sub-cutâneo, favorecendo o aumento da lesão. Por exemplo, a dificuldade de acesso dos macrófagos para combate da lesão, ou mesmo redução de oxigênio no meio poderiam contribuir para acelerar a necrose local.

É interessante ressaltar que a via de administração intra lesional demanda mais cuidados, envolvendo um profissional da área da saúde, um local específico para aplicação da medicação, além de desconforto para o paciente e dificuldade de adesão à terapia. Estes fatores são relevantes visto que o desenvolvimento de um tratamento alternativo, ainda que tenha a mesma eficácia terapêutica do tratamento atual, mas que traga benefícios com relação via de administração e principalmente adesão do paciente, já representa um avanço importante.

5. CONCLUSÃO FINAL

A proposta de formulação de sistemas nanocarreadores embasada nos conceitos de nanoemulsão inversa e de nanopartículas poliméricas permitiu o desenvolvimento de uma formulação polimérica nanoestruturada para veiculação de moléculas hidrofílicas suspensa em silicone, passível de controle de tamanho de partícula em escala nanométrica e de modulação da estabilidade coloidal através de parâmetros de processo.

A obtenção deste sistema, descrito como novos *nanocarreadores poliméricos coloidais (NPCs)* foi possível através da utilização de um processo combinando etapas de nanoemulsificação por homogeneização de alta pressão e extração parcial do conteúdo de água da fase interna, sendo esta última etapa considerada um fator determinante na estabilidade da formulação, que permitiu modular as características do sistema.

Após o desenvolvimento do sistema nanocarreador placebo (sem ativo), foram testadas moléculas modelo (um anti-inflamatório e uma vitamina), resultando em formulações com características adequadas para a veiculação de moléculas hidrofílicas, reproduzindo as propriedades físicas do sistema placebo no que condiz com a viscosidade, tamanho médio de partícula, estabilidade e morfologia, apresentando ainda alta eficiência de encapsulação e perfil de liberação sustentado. O comportamento dos sistemas contendo os modelos hidrofílicos permitiu entender melhor o mecanismo de formação dos NPCs, a forma de interação do ativo com a matriz polimérica e identificar as diferenças físicas (principalmente morfologia) e químicas (eficiência de encapsulação e perfil de liberação) para os dois modelos testados.

Cabe ressaltar que foi interessante trabalhar com moléculas modelo que permitiram elucidar o comportamento dos nanocarreadores e explorar suas limitações, antes de incorporar a molécula alvo, que tem um custo elevado. Esta estratégia permitiu agilizar o trabalho no sentido econômico e científico, com relação ao volume de informações estudadas.

Posteriormente, o ativo de interesse, de aplicação na terapia fotodinâmica do câncer foi encapsulado nos nanocarreadores, que se demonstraram promissores para veiculação do ácido 5-aminolevulínico topicamente, estabilizando quimicamente o ativo em um meio com quantidade reduzida de água. Considerando a limitação do 5-ALA com relação à degradação química (por dimerização em meio aquoso), o NPC mostra-se como uma alternativa promissora e viável para uma formulação comercial.

Além disso, o NPC-ALA permitiu modificar a permeação do pró-fármaco na pele, liberando-o nas camadas mais basais e conferindo melhoria na biodisponibilidade. Sendo assim, os resultados evidenciaram um sistema de ação sítio específica e liberação controlada.

De forma particular, ressalta-se também a importância das parcerias e colaborações com diferentes grupos de pesquisa no desenvolvimento de novas aplicações, que permitem ampliar o leque terapêutico para um sistema, viabilizando-o como uma plataforma tecnológica. Neste estudo confirmou-se a potencialidade dos NPCs como veículo para o pró-fármaco precursor de PpIX, além de ampliar as perspectivas de emprego clínico dos sistemas nanoestruturados para a aplicação tópica de moléculas hidrofílicas.

No estado atual de desenvolvimento, considera-se que estes novos nanocarreadores poliméricos coloidais contendo 5-ALA são um sistema de aplicação tópica potencial para aplicação na terapia fotodinâmica do câncer, sendo necessárias próximas etapas relacionadas à avaliação clínica da formulação, e um estudo de escalonamento para produção de lotes piloto e industrial.

6. REFERÊNCIAS

- ADAIR, J. H.; PARETTE, M. P.; ALTINOGLU, E. I.; KESTER, M. Nanoparticulate Alternatives for Drug Delivery, *Acs Nano*, v. 4, p. 4967-4970, Sept.2010.
- AHMAD, M. Z.; AKHTER, S.; AHMAD, I.; SINGH, A.; ANWAR, M.; SHAMIM, M.; AHMAD, F. J. In vitro and in vivo evaluation of Assam Bora rice starch-based bioadhesive microsphere as a drug carrier for colon targeting, *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 9, p. 141-149, Feb.2012.
- ALEXIS, F.; RHEE, J. W.; 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, Jan.2008.
- ALLISON, R. R.; MOTA, H. C.; BAGNATO, V. S.; SIBATA, C. H. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy - State of the art review, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 5, p. 19-28, Mar.2008.
- ALMEIDA, A. P.; DA SILVA, S. A. G.; SOUZA, M. L. M.; LIMA, L. M. T. R.; ROSSI-BERGMANN, B.; DE MORAES, V. L. G.; COSTA, S. S. Isolation and chemical analysis of a fatty acid fraction of Kalanchoe pinnata with a potent lymphocyte suppressive activity, *Planta Medica*, v. 66, p. 134-137, Mar.2000.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos 6ed ed. São Paulo: PREMIER, 2000, p. 1-568.
- ANVISA. RE899 - *Guia de Validação de Metodologia Analítica*. no. RE_899, (2003),
- ARAUJO, L. M. P. D.; THOMAZINE, J. A.; LOPEZ, R. F. V. Development of microemulsions to topically deliver 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 75, p. 48-55, May2010.
- ARRUEBO, M.; FERNANDEZ-PACHECO, R.; IBARRA, M. R.; SANTAMARIA, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery, *Nano Today*, v. 2, p. 22-32, June2007.
- AULTON, M. E. Liberação transdérmica de fármacos. In: Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2ed ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Capítulo 33, p. 505-536.
- BASF Soluble polyvinylpyrrolidone (Povidone Ph.Eur, USP, JP) for the pharmaceutical industry. Supplier of raw-material, 2007.

BECH, O.; BERG, K.; MOAN, J. The pH dependency of protoporphyrin IX formation in cells incubated with 5-aminolevulinic acid, *Cancer Letters*, v. 113, p. 25-29, Feb.1997.

BONNETT, R.; BERENBAUM, M. Porphyrins As Photosensitizers, *Ciba Foundation Symposia*, v. 146, p. 40-59, 1989.

BRANDRUP, J.; IMMERGUT, H. Polymer Handbook 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 1989.

CAIRNDUFF, F.; STRINGER, M. R.; HUDSON, E. J.; ASH, D. V.; BROWN, S. B. Superficial Photodynamic Therapy with Topical 5-Aminolevulinic Acid for Superficial Primary and Secondary Skin-Cancer, *British Journal of Cancer*, v. 69, p. 605-608, Mar.1994.

CASAS, A.; BATTAH, S.; DI VENOSA, G.; DOBBIN, P.; RODRIGUEZ, L.; FUKUDA, H.; BATLLE, A.; MACROBERT, A. J. Sustained and efficient porphyrin generation in vivo using dendrimer conjugates of 5-ALA for photodynamic therapy, *Journal of Controlled Release*, v. 135, p. 136-143, Apr.2009.

CERIZE N.N.P.; OLIVEIRA, A.M.; RE, M.I.; TEDESCO, A.C.. Nanocarreadores Coloidais para Ativos Hidrofílicos e Processo de Produção. BR PII001959-6. 16 Jun 2010.

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 675-711, Mar.2004.

CEVC, G.; VIERL U Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal, *Journal of Controlled Release*, v. 141, p. 277-299, Feb.2010.

CHANTRAPORNCHAI, W.; CLYDESDALE, F. M.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of relative refractive index on optical properties of emulsions, *Food Research International*, v. 34, p. 827-835, 2001.

CHUNG-WOOK CHUNG; CY HYUN KIM; KYUNG HA CHOI; JIN-JU YOO; DO HYUNG KIM; YOUNG-IL JEONG; DAE HWAN KANG Effect of surfactant on 5-aminolevulinic acid uptake and PpIX generation in human cholangiocarcinoma cell, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 80, p. 453-458, Feb.2012.

CLAS, S. D.; DALTON, C. R.; HANCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 2, p. 311-320, Aug.1999.

CornProducts International. *Snow-Flake G@2310*. 19 Aug 2008.

CURNOW, A.; PYE, A. Biochemical manipulation via iron chelation to enhance porphyrin production from porphyrin precursors, *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*, v. 26, p. 89-103, 2007.

DANDEKAR, P.; JAIN, R.; STAUNER, T.; LORETZ, B.; KOCH, M.; WENZ, G.; LEHR, C. M. A Hydrophobic Starch Polymer for Nanoparticle-Mediated Delivery of Docetaxel, *Macromolecular Bioscience*, v. 12, p. 184-194, Feb.2012.

DE BLOIS, A. W.; GROULS, R. J. E.; ACKERMAN, E. W.; WIJDEVEN, W. J. A. Development of a stable solution of 5-aminolaevulinic acid for intracutaneous injection in photodynamic therapy, *Lasers in Medical Science*, v. 17, p. 208-215, 2002.

DE BOECK, K.; WILSCHANSKI, M.; CASTELLANI, C.; TAYLOR, C.; CUPPENS, H.; DODGE, J.; SINAASAPPEL, M. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms, *Thorax*, v. 61, p. 627-635, July2006.

DE LUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M. Farmacologia integrada 2ed ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004, p. 1-678.

DE ROSA, F. S. Influência de promotor de absorção cutânea e derivados do ácido 5-aminolevulínico na Terapia Fotodinâmica do câncer de pele. 2002. 188 f. Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo,2002.

DIVARIS, D. X. G.; KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H. Phototoxic Damage to Sebaceous Glands and Hair-Follicles of Mice After Systemic Administration of 5-Aminolevulinic Acid Correlates with Localized Protoporphyrin-Ix Fluorescence, *American Journal of Pathology*, v. 136, p. 891-897, Apr.1990.

DOUGHERTY, T. J.; KAUFMAN, J. E.; GOLDFARB, A.; WEISHAUPT, K. R.; BOYLE, D.; MITTLEMAN, A. Photoradiation Therapy for Treatment of Malignant-Tumors, *Cancer Research*, v. 38, p. 2628-2635, 1978.

ELEOUE, S.; ROUSSET, N.; CARRE, J.; BOURRE, L.; VONARX, V.; LAJAT, Y.; VAN HENEGOUWEN, G. M. J. B.; PATRICE, T. In vitro fluorescence, toxicity and phototoxicity induced by delta-aminolevulinic acid (ALA) or ALA-esters, *Photochemistry and Photobiology*, v. 71, p. 447-454, Apr.2000a.

ELEOUE, S.; ROUSSET, N.; CARRE, J.; VONARX, V.; VILATTE, C.; LOUET, C.; LAJAT, Y.; PATRICE, T. Heterogeneity of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in human glioma cells and leukemic lymphocytes, *Neurological Research*, v. 22, p. 361-368, June2000b.

ELFSSON, B.; WALLIN, I.; EKSBERG, S.; RUDAEUS, K.; ROS, A. M.; EHRSSON, H. Stability of 5-aminolevulinic acid in aqueous solution, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 7, p. 87-91, Jan.1999.

ERDTMAN, E.; ERIKSSON, L. A. Theoretical study of 5-aminolevulinic acid tautomerization: A novel self-catalyzed mechanism
1, *Journal of Physical Chemistry A*, v. 112, p. 4367-4374, May2008.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. Principios fisico-químicos em Farmácia 3 ed. São Paulo: 2003, p. 1-736.

FRESHNEY, R. I.; MACKIE, A. E.; HUNT, G. Glucocorticoids, Cytostasis, and the Cell-Surface, *European Journal of Cell Biology*, v. 42, p. 72, 1986.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals - Part 2, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 1, p. 262-268, Sept.1998.

GOLD, M. H. Aminolevulinic acid photodynamic therapy: medical evidence for its expanded use, *Expert Review of Medical Devices*, v. 3, p. 357-371, May2006.

GOODMAN & GILMAN, A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003, p. 1-1647.

GUERY, J. Emulsions Doubles Cristallisables: Stabilité, Encapsulation et Relargage. 2006. 177 f. Doctorat - UNIVERSITE PARIS VI - Ecole doctorale de Physique et Chimie des Matériaux, 2006.

HEYERDAHL, H.; WANG, I.; LIU, D. L.; BERG, R.; ANDERSSONENGELS, S.; PENG, Q.; MOAN, J.; SVANBERG, S.; SVANBERG, K. Pharmacokinetic studies on 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in tumours and normal tissues
1, *Cancer Letters*, v. 112, p. 225-231, Jan.1997.

HILL, R. M. Silicone surfactants - new developments, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 7, p. 255-261, Nov.2002.

IONASHIRO, M. Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial 1 ed. São Paulo: Giz Editora, 2005, p. 1-80.

JENNING, V.; SCHAFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use drug release properties, *Journal of Controlled Release*, v. 66, p. 115-126, May2000.

JOSHI, M.; PATRAVALE, V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 346, p. 124-132, Jan.2008.

KAJIWARA, M.; HARA, K. I.; TAKATORI, K.; MATSUMOTO, K. Revised Structure of A Delta-Aminolevulinic-Acid Derivative, *Clinical Chemistry*, v. 39, p. 1867-1871, Sept.1993.

KALISZEWSKI, M.; KWASNY, M.; JUZENIENE, A.; JUZENAS, P.; GRACZYK, A.; MA, L. W.; IANI, V.; MIKOLAJEWSKA, P.; MOAN, J. Biological activity of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester after storage under different conditions, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 87, p. 67-72, May2007.

KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H.; PROSS, D. C. Photodynamic Therapy with Endogenous Protoporphyrin .9. Basic Principles and Present Clinical-Experience, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 6, p. 143-148, June1990.

KIELHORN, J., MELCHING-KOLLMUß,S., MANGELSDORF,I. Dermal Absorption. In:2005,p. 1-128.

LACERDA, S. P. Carreador Lipídico Nanoestruturado à Base de Cera de Carnaúba: Desenvolvimento, Caracterização e uso na encapsulação de benzofenona-3. 2009. 188 f. Mestrado - Universidade Federal de Pernambuco,Recife,2009.

LACERDA, S. P.; CERIZE, N. N. P.; RE, M. I. Preparation and characterization of carnauba wax nanostructured lipid carriers containing benzophenone-3, *International Journal of Cosmetic Science*, v. 33, p. 312-321, Aug.2011.

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy 2 ed. Baltimore, Maryland: Klumer Academic, 1999, p. 1-362.

LARESE, F. F.; D'AGOSTIN, F.; CROSER, M.; ADAMI, G.; RENZI, N.; BOVENZI, M.; MAINA, G. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin, *Toxicology*, v. 255, p. 33-37, Jan.2009.

LEE, S.; KURIHARA-BERGSTROM, T.; KIM, S. Nonaqueous drug permeation through synthetic membranes., *Journal of Controlled Release*, v. 5, p. 253-262, 1988.

LI, X.; WASHENBERGER, R. M.; SCRIVEN, L. E.; DAVIS, H. T.; HILL, R. M. Phase behavior and microstructure of water/trisiloxane E-12 polyoxyethylene surfactant/silicone oil systems, *Langmuir*, v. 15, p. 2267-2277, Mar.1999.

LIPPACHER, A.; MULLER, R. H.; MADER, K. Liquid and semisolid SLN (TM) dispersions for topical application: rheological characterization, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 561-567, Nov.2004.

LOPEZ, R. F. V.; LANGE, N.; GUY, R.; BENTLEY, M. V. L. B. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 77-94, Jan.2004.

LU, Y. G.; TANG, Z. Q.; YE, Z. Y.; WANG, H. T.; HUANG, Y. N.; ZHOU, K. Q.; ZHANG, M.; XU, T. L.; CHEN, L. Salicylate, an aspirin metabolite, specifically inhibits the current mediated by glycine receptors containing alpha 1-subunits
1, *British Journal of Pharmacology*, v. 157, p. 1514-1522, Aug.2009.

LUCAS, E.; SOARES, B.; MONTEIRO, E. Caracterização de polímeros - Determinação de peso molecular e análise térmica 1 ed. Rio de Janeiro: 2001, p. 1-366.

LUO, Q.; WANG, P. X.; MIAO, Y. Q.; HE, H. B.; TANG, X. A novel 5-fluorouracil prodrug using hydroxyethyl starch as a macromolecular carrier for sustained release, *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 2642-2647, Mar.2012.

MACHADO, A. E. D. Photodynamic therapy: Principles, potential of application and perspectives, *Quimica Nova*, v. 23, p. 237-243, Mar.2000.

MAISCH, T.; SANTARELLI, F.; SCHREML, S.; BABILAS, P.; SZEIMIES, R. M. Fluorescence induction of protoporphyrin IX by a new 5-aminolevulinic acid nanoemulsion used for photodynamic therapy in a full-thickness ex vivo skin model
1, *Experimental Dermatology*, v. 19, p. E302-E305, Aug.2010.

MANIVASAGER, V.; YEE, K. K. L.; HENG, P. W. S.; SOO, K. C.; OLIVO, M. A study comparing endogenous protoporphyrin IX induced by 5-ALA and ALA-methyl ester with exogenous PpIX and PpIX dimethyl ester in photodynamic diagnosis of human nasopharyngeal carcinoma xenografts, *International Journal of Oncology*, v. 29, p. 997-1002, Oct.2006.

MANSOORI, G. A. Principles of Nanotechnology: Molecular-based Study of Condensed Matter in Small Systems Singapore: World Scientific Publishing Co.Pte.Ltd., 2005, p. 1-339.

MCCARRON, P. A.; DONNELLY, R. R.; ZAWISLAK, A.; WOOLFSON, A. D. Design and evaluation of a water-soluble bioadhesive patch formulation for cutaneous delivery of 5-aminolevulinic acid to superficial neoplastic lesions, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 27, p. 268-279, Feb.2006.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles - Production, characterization and applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 47, p. 165-196, Apr.2001.

MISHRA, B.; BHAVESH, B. P.; SANJAY, T. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* May2010.

MONACO, J. P. Desenvolvimento de sistemas bio e mucoadesivos de uso intrabucal: Avaliação *in vitro* da liberação de nimesulida. 2004. 143 f. Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP,2004.

MOU, D. S.; CHEN, H. B.; DU, D. R.; MAO, C. W.; WAN, H. L.; XU, H. B.; YANG, X. L. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 353, p. 270-276, Apr.2008.

MOULAI MOSTEFA, N.; SADOK, A. H.; SABRI, N.; HADJI, A. Determination of optimal cream formulation from long-term stability investigation using a surface response modelling., *International Journal of Cosmetic Science*, v. 28, p. 211-218, June2006.

MULLER, R. H.; GOHLA, S.; KECK, C. M. State of the art of nanocrystals - Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 78, p. 1-9, May2011.

MULLER, R. H.; PETERSEN, R. D.; HORNMOSSE, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 522-530, July2007.

MULLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 242, p. 121-128, Aug.2002a.

MULLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. S131-S155, Nov.2002b.

MULLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 343-356, Sept.2004.

NOVO, M.; HUTTMANN, G.; DIDDENS, H. Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumours, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 34, p. 143-148, July1996.

OISHI, H. N. H.; NOMIYAMA, H.; NOMIYAMA, K.; TOMOKUNI, K. Fluorometric HPLC determination of 5-aminolevulinic acid (ALA) in the plasma and urine of lead workers: biological indicators of lead exposure, *Journal of Analyses Toxicologic*, v. 20, p. 106-110, 1996.

OLIVEIRA, A. M. Obtenção de Nanopartículas Sensíveis a Temperatura e pH a partir de Copolímeros em Bloco do Tipo Core-Shell utilizando Copolímeros em Bloco Constituídos de Poli(Hidroxibutirato-Co-Hidroxivalerato) e se Poli(N-Isopropilacrilamida-Co-Ácido Acrílico) Sintetizado Via Raft, visando Aplicação em Encapsulação e Liberação Controlada de Ativos. 2008. 269 f. Doutorado - Escola de engenharia de Lorena - USP,2008.

OSIECKA, B.; JURCZYSZYN, K.; SYMONOWICZ, K.; BRONOWICZ, A.; OSTASIEWICZ, P.; CZAPINSKA, E.; HOTOWY, K.; KRZYTEK-KORPACKA, M.; GEBAROWSKA, E.; IZYKOWSKA, I.; DZIEGIEL, P.; TERLECKI, G.; ZIOLKOWSKI, P. In vitro and in vivo matrix metalloproteinase expression after photodynamic therapy with a liposomal formulation of aminolevulinic acid and its methyl ester, *Cellular & Molecular Biology Letters*, v. 15, p. 630-650, Dec.2010.

O'LENICK, A. Silicone emulsions and surfactants, *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 3, p. 387-393, July2000.

PIERRE, M. B. R. Otimização da Liberação Cutânea do Ácido 5-Aminolevulínico na Terapia Fotodinâmica do Câncer de Pele: Avaliação in vitro e in vivo da Influência de Promotores da Absorção Cutânea. 2004. 132 f. Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP,2004.

PIERRE, M. B. R.; OPEZ, R. F. V.; ENTLEY, M. V. L. B. Influence of ceramide 2 on in vitro skin permeation and retention of 5-ALA and its ester derivatives, for Photodynamic Therapy, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, v. 45, p. 109-116, 2009.

PIETKIEWICZ, J.; SZNITOWSKA, M.; PLACZEK, M. The expulsion of lipophilic drugs from the cores of solid lipid microspheres in diluted suspensions and in concentrates, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 310, p. 64-71, Mar.2006.

PONTES, F. Doenças negligenciadas: ainda matam 1 milhão por ano no mundo, *Revista Inovação FINEP* 2010.

PRIMO, F. L. Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo *in vitro* de pele humana empregando-se laser de baixa potência e cloro alumínio ftalocianina em nanoemulsão. 2010. 169 f. Doctorate - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo,2010.

PubChem Free database of chemical structures of small organic molecules and information on their biological activities. PubChem Compound PubChem Substance 10-1-2009

RAE, C.; LANGA, S.; TUCKER, S. J.; MACEWAN, D. J. Elevated NF-kappa B responses and FLIP levels in leukemic but not normal lymphocytes: reduction by salicylate allows TNF-induced apoptosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, p. 12790-12795, July 2007.

RÉ, M. I. Microencapsulação em busca de produtos inteligentes, *Ciência Hoje*, v. 27, p. 24-29, 2000.

REBEIZ, N.; REBEIZ, C. C.; ARKINS, S.; KELLEY, K. W.; REBEIZ, C. A. Photodestruction of Tumor-Cells by Induction of Endogenous Accumulation of Protoporphyrin-Ix - Enhancement by 1,10-Phenanthroline, *Photochemistry and Photobiology*, v. 55, p. 431-435, Mar. 1992.

RODEMBUSCH, FS. Espalhamento de luz estático e dinâmico em polímeros do tipo metacrilato, fluorescentes por transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado (TPIEE). 2001. Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 2001.

RODRIGUES, A.; EMEJE, M. Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery, *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 987-994, Jan. 2012.

RUENRAROENGSAK, P.; COOK, J. M.; FLORENCE, A. T. Nanosystem drug targeting: Facing up to complex realities, *Journal of Controlled Release*, v. 141, p. 265-276, Feb. 2010.

SAKULKU, U.; NUCHUCHUA, O.; UAWONGYART, N.; PUTTIPIPAKHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A.; RUKTANONCHAI, U. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 372, p. 105-111, May 2009.

SALAGER, J. L.; FORGIARINI, A.; MARQUEZ, L.; PENA, A.; PIZZINO, A.; RODRIGUEZ, M. P.; GONZALEZ, M. Using emulsion inversion in industrial processes, *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 108-09, p. 259-272, May 2004.

SANTANDER-ORTEGA, M. J.; STAUNER, T.; LORETZ, B.; ORTEGA-VINUESA, J. L.; BASTOS-GONZALEZ, D.; WENZ, G.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C. M. Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery, *Journal of Controlled Release*, v. 141, p. 85-92, Jan. 2010.

SCALABRINO, G. Cobalamin (vitamin B-12) in subacute combined degeneration and beyond: Traditional interpretations and novel theories (vol 192, pg 463, 2005), *Experimental Neurology*, v. 194, p. 561, Aug.2005.

Schmid H.;G.Burmeister. Nano-emulsion of 5-aminolevulinic acid. WO00/28971 . 6 May 2003.

SENYIGIT, T.; SONVICO, F.; BARBIERI, S.; ÖZER, O.; SANTI, P.; COLOMBO, P. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin, *Journal of Controlled Release*, v. 142, p. 368-373, Mar.2010.

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, Nov.1999.

SOMASUNDARAN, P.; MEHTA, S. C.; PUROHIT, P. Silicone emulsions, *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 128, p. 103-109, Dec.2006.

SOUZA, C. S.; FELICIO, L. B. A.; FERREIRA, J.; KURACHI, C.; BENTLEY, M. V. B.; TEDESCO, A. C.; BAGNATO, V. S. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode laser single session for non-melanoma skin cancer 1, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 6, p. 207-213, Sept.2009.

STELUTI, R. Sistemas líquido-cristalinos de monoleína/água para a liberação tópica do ácido 5-aminolevulínico na terapia fotodinâmica do câncer de pele. 2006. 113 f. Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP,2006.

STUMMER, W.; PICHLMEIER, U.; MEINEL, T.; WIESTLER, O. D.; ZANELLA, F.; HANS-JURGEN, R. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial, *Lancet Oncology*, v. 7, p. 392-401, May2006.

SUITTHIMEATHEGORN, O.; JAITLEY, V.; FLORENCE, A. T. Novel anhydrous emulsions: Formulation as controlled release vehicles, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 298, p. 367-371, July2005.

TADROS, T.; IZQUIERDO, R.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions, *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 108-09, p. 303-318, May2004.

TEDESCO, A. C.; ROTTA, J. C. G.; LUNARDI, C. N. Synthesis, photophysical and photochemical aspects of phthalocyanines for photodynamic therapy, *Current Organic Chemistry*, v. 7, p. 187-196, Jan.2003.

THIENOT, E.; GERMAIN, M.; PIEJOS, K.; SIMON, V.; DARMON, A.; MARILL, J.; BORGHI, E.; LEVY, L.; HOCHÉPIED, J. F.; POTTIER, A. One pot synthesis of new hybrid versatile nanocarrier exhibiting efficient stability in biological environment for use in photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 100, p. 1-9, July2010.

TORCHILIN, V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 71, p. 431-444, Mar.2009.

TORRES-SANTOS, E. C.; DA SILVA, S. A. G.; COSTA, S. S.; SANTOS, A. P. P. T.; ALMEIDA, A. P.; ROSSI-BERGMANN, B. Toxicological analysis and effectiveness of oral *Kalanchoe pinnata* on a human case of cutaneous leishmaniasis, *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 801-803, Aug.2003.

USP-33. *United States Pharmacopeia*. United States: 2010.

VAIDYANATHAN, V.; WIGGS, R.; STOHL, J.; BAXI, M. ALA-induced fluorescence in the canine oral cavity, *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 24, p. 383-388, June2006.

VAN DEN BOOGERT, J.; VAN STAVEREN, H. J.; DE BRUIN, R. W. F.; DE ROOIJ, F. W. M.; EDIXHOVEN-BOSDIJK, A.; SIERSEMA, P. D.; VAN HILLEGERSBERG, R. Fractionated illumination in oesophageal ALA-PDT: effect on ferrochelatase activity, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 56, p. 53-60, June2000.

VENA, F. C. B. Estudo da Potencialidade dos derivados do 5-ALA na terapia fotodinâmica do câncer de pele: gel de monoleína como sistema de liberação e fármacos. 2005. 169 f. Doutorado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP,2005.

VON TAPPEINER, H. Information on light effect (fluorescent) substances, *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, v. 30, p. 579-580, 1904.

WASKOWSKA, J.; KOSZOWSKI, R.; RACZKOWSKA-SIOSTRZONEK, A.; STEMPLEWSKA, K. Verrucous carcinoma of the tongue - a rare case study, *Central European Journal of Medicine*, v. 7, p. 145-148, Apr.2012.

WENDLANDT, W. Thermal analysis 3 ed. New York: 1986, p. 1-814.

WISSING, S. A.; MULLER, R. H. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity - in vivo study, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 56, p. 67-72, July2003.

WOLF, P.; KERL, H. Photodynamic Therapy with 5-Aminolevulinic Acid - A Promising Concept for the Treatment of Cutaneous Tumors
2, *Dermatology*, v. 190, p. 183-185, 1995.

WU, C.; WANG, J.; HU, Y. C.; ZHI, Z. Z.; JIANG, T. Y.; ZHANG, J. H.; WANG, S. L. Development of a novel starch-derived porous silica monolith for enhancing the dissolution rate of poorly water soluble drug, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, v. 32, p. 201-206, Mar.2012.

WU, H. L.; RAMACHANDRAN, C.; BIELINSKA, A. U.; KINGZETT, K.; SUN, R.; WEINER, N. D.; ROESSLER, B. J. Topical transfection using plasmid DNA in a water-in-oil nanoemulsion, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 221, p. 23-34, June2001a.

WU, H. L.; RAMACHANDRAN, C.; WEINER, N. D.; ROESSLER, B. J. Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 220, p. 63-75, June2001b.

WU, S. M.; REN, Q. G.; ZHOU, M. O.; PENG, Q.; CHEN, J. Y. Protoporphyrin IX production and its photodynamic effects on glioma cells, neuroblastoma cells and normal cerebellar granule cells in vitro with 5-aminolevulinic acid and its hexylester, *Cancer Letters*, v. 200, p. 123-131, Oct.2003.

YANG, S. J.; SHIEH, M. J.; LIN, F. H.; LOU, P. J.; PENG, C. L.; WEI, M. F.; YAO, C. J.; LAI, P. S.; YOUNG, T. H. Colorectal cancer cell detection by 5-aminolaevulinic acid-loaded chitosan nano-particles, *Cancer Letters*, v. 273, p. 210-220, Jan.2009.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H. H. Design of a phytosphingosine-containing, positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 60, p. 91-98, May2005.

YOUAN, B. B. C. Impact of nanoscience and nanotechnology on controlled drug delivery, *Nanomedicine*, v. 3, p. 401-406, Aug.2008.

ANEXOS

ANEXO I – REAÇÃO DE KARL FISHER

A titulação por método de Karl Fisher é uma das técnicas mais importantes para a determinação de água em amostras diversas, baseado na oxidação do dióxido de enxofre (SO₂) pelo iodo (I₂) em presença de água (H₂O). A reação ocorre quando a água reage com o reagente Karl Fisher (composto por iodo dissolvido em piridina e metanol anidro) em duas etapas reacionais, no qual uma molécula de iodo desaparece para cada molécula de água presente. A determinação do ponto final da reação pode ser visual, isto é, quando for percebido um pequeno excesso de titulante. A viragem ocorre de amarelo para uma coloração parda.

APÊNDICES

APÊNDICE I – Microscopia ótica

Os NPCs foram observados por microscopia ótica durante as etapas do protocolo de fabricação, como mostra a *Figura I* a seguir. Fotos comparativas das etapas após pré-emulsificação (turrax), após homogeneização de alta pressão (HAP), após 3h de vácuo e 15 dias após o preparo dos NPC-3 podem ser visualizadas nos quadrantes A, B, C e D respectivamente. E dos NPC-1 e NPC-2, nos quadrante E e F.

As fotomicrografias mostraram a eficiência da homogeneização de alta pressão na redução do tamanho de gotas da fase dispersa. Contudo a microscopia ótica não tem resolução adequada para caracterização de sistemas nanoestruturados, limitando a utilização desta ferramenta apenas às etapas iniciais de preparação dos NPCs, como possibilidade de avaliar a homogeneidade inicial da pré-emulsão.

Figura I: Microscopia ótica dos NPCs do 1º lote.

APÊNDICE II – Microscopia eletrônica de varredura

Este apêndice refere-se as fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura – MEV (marca JEOL, modelo JSM 5200) Imagens A, B e C.

Imagem A

Imagem B

Imagem C

APÊNDICE III – Espectro de Fluorescência

Espectro de Fluorescência do composto formado a partir da reação de derivatização 5-ALA empregando formaldeído e acetilcetona.

9. PUBLICAÇÕES E PATENTES

1. Natalia N. P. Cerize; Adriano M. Oliveira; Maria Inês Ré; Antônio C. Tedesco. Colloidal Nanocarriers based on Starch for Drug Delivery of Aminolevulinic Acid: Preparation, Characterization and *In Vitro* Skin Permeation. International Conference and Exhibition on Nanotechnology & Nanomedicine, March 12-14, 2012 at Omaha, USA.
2. Wallace P. Lima; Camila, A.B. Falcão; Natalia N. P. Cerize; Maria Inês Ré; Bartira R. Bergmann. Single-dose treatment of cutaneous leishmaniasis using PLGA microparticles loaded with Amphotericin B or Glucantime. *XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia*; 19-21 de setembro de 2011. Foz do Iguaçu – PR.
3. Natália Neto Pereira Cerize, Adriano Marim de Oliveira, Maria Inês Ré, Antônio Cláudio Tedesco. New Colloidal Nanocarriers based on starch for drug delivery of Hydrophilic Drugs: Preparation, Characterization and Stability. *2nd Conference Innovation in Drug Delivery: From preformulation to development through innovative evaluation process*; 3-6 October 2010, Aix-en-Provence, France.
4. Wallace P. Lima; Camila, A.B. Falcão; Natalia N. P. Cerize; Maria Inês Ré; Bartira R. Bergmann. Use of PLGA Microparticles for single-dose treatment of cutaneous leishmaniasis. *2nd Conference Innovation in Drug Delivery: From preformulation to development through innovative evaluation process*; 3-6 October 2010, Aix-en-Provence, France.
5. Natália Neto Pereira Cerize, Adriano Marim de Oliveira, Maria Inês Ré, Antônio Cláudio Tedesco. *Depósito de patente*: Nanocarreadores coloidais para ativo hidrofílicos e processo de produção. *Nº protocolo*: 018100021575; BR PI1001959-6. *Data de depósito*: 15/jun/2010.