

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

GEISIANE ROSA DA SILVA

Nanopartículas de poli (D, L-ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) para a
entrega transdérmica do ácido aminolevulínico (5-ALA)

São Carlos
2020

GEISIANE ROSA DA SILVA

Nanopartículas de poli (D, L-ácido lático-co-glicólico) (PLGA) para a entrega transdérmica do ácido aminolevulínico (5-ALA)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Biomolecular
Orientadora: Dr^a. Natalia Mayumi Inada

Versão Original

São Carlos
2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva, Geisiane Rosa da
Nanopartículas de poli (D, L-ácido láctico-co-glicólico)
(PLGA) para a entrega transdérmica do ácido
aminolevulínico (5-ALA) / Geisiane Rosa da Silva;
orientadora Natalia Mayumi Inada -- São Carlos, 2020.
225 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física
Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos,
Universidade de São Paulo, 2020.

1. Nanopartículas poliméricas. 2. Poli (ácido láctico-co-
ácido glicólico). 3. Ácido aminolevulínico. 4. Terapia
fotodinâmica. 5. Câncer de pele não-melanoma. I. Inada,
Natalia Mayumi, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Geisiane Rosa da Silva

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de Concentração: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 20/01/2021

Comissão Julgadora

Dr(a). Natalia Mayumi Inada

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Rodrigo Fernando Costa Marques

Instituição: (UNESP/Araraquara)

Dr(a). Daniel Souza Corrêa

Instituição: (EMBRAPA/São Carlos)

Dr(a). Natália Neto Pereira Cerize

Instituição: (IPT/São Paulo)

Dr(a). Tito Jose Bonagamba

Instituição: (IFSC/USP)

Aos meus pais Maria e Servilho pelos louvores e sacrifícios.

Ao meu irmão Wanderson por ter sido meu primeiro exemplo de dedicação aos estudos.

À minha sobrinha Manu por me ensinar a leveza e a sinceridade da vida.

Ao meu namorado, noivo e melhor amigo Daniel Pizetta por me ensinar o verdadeiro sentido do “Com você sempre”.

Aos meus professores por me oferecerem seus ombros para enxergar mais alto.

Para vocês meu amor, respeito e admiração. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida. Por me fazer presente no Universo, neste tempo e por ter me dado pedras e flores pelo caminho. Obrigada por seus Anjos em minha vida e pelas oportunidades que tive ao longo de todos estes anos de estudos.

Agradeço a minha orientadora Natália Inada pela acolhida inicial e por saber questionar e ouvir em equilíbrio, por acreditar e por fim, por estar comigo quando precisei. Certamente isso tudo fez a diferença não só no nosso trabalho, mas, para a vida. Ei Helena, cabe aqui meus sinceros sorrisos para você também!

Agradeço a Amanda Luizetto pela acolhida inicial em seu sonho lá em 2012, na Nanomed, passando pela iniciação científica, mestrado, doutorado, me recebendo de volta neste meu presente sonho aqui e por acreditar no meu potencial - nas minhas mãos e minhas caminhadas diárias de e ao trabalho.

À professora Yvonne Mascarenhas por ter sido minha orientadora de iniciação científica, mestrado e por ter estado comigo no início do doutorado quando eu quis mudar! Obrigada pela preocupação inicial e por me mostrar o bom caminho, sempre fazendo tudo com ética e amor.

Ao Grupo de Óptica (todos sem exceção) e ao Prof. Dr. Vanderlei Bagnato por terem me acolhido. À prof^ª Dr^a Cristina Kurachi e Dr^a Lilian Tan Moriyama, pela ajuda com discussões e no laboratório. À Dr^a Ana Paula (Paulinha), pela ajuda com o 5-ALA, com a colaboração da PDT Pharma. As equipes técnicas e administrativas pela prestatividade sempre. Obrigada em especial para Ilaíali Souza Leite (Ila) por ter me ensinando (com muita paciência) a trabalhar no Laboratório de Cultura Celular, por me acompanhar no Coral (e depois eu que só te acompanhava) pelas conversas sadias sobre trabalho e sobre a vida. Obrigada aos outros colegas do Laboratório de Células tanto do Grupo de Óptica, quanto do GNano (vocês são ótimos) e aos tantos outros colegas do Grupo (cada um é um talento único), mas, em especial a Shirlei Lara e Larissa Marila por estarem e serem presentes. Aos alunos de IC e TCC: Renato, Mariana e Vinícius (apesar do pouco tempo aprendi muito com vocês).

À empresa Nanomed pela oportunidade de desenvolvimento deste (e de outros) trabalho. Em especial para Douglas (e suas/nossas gambiarras), Jéssica e Cristiane (principalmente pelas discussões sadias e amorosas), Bárbara, Rachel (e nossa pequena Ágatha) e Thiago (meu amigo de outras vidas, por todas às vezes que ficou até tarde comigo no lab e que me guiou no mundo aparte sobre regulamentações) e para toda equipe de estagiários, técnica e administrativa que

passaram por lá, vocês fazem parte desta história e ousou dizer que foram de longe as melhores pessoas que conheci ao longo deste tempo.

A empresa Accert, em especial pela acolhida do Dr. Gezimar e de toda sua equipe. Claro que não posso nunca me esquecer de vocês, Raiza, Célia, Mel, Fer, Andreia, Rapahel (vocês fizeram a diferença por rirem e chorarem comigo), Cláudia, Nicholas (estes dois por tentarem me ajudar a entender o 5-ALA e por ficarem até mais tarde quando precisava rotaveaporar tudo) e a todos que estiveram comigo aí, vocês são gigantes!

Aos colaboradores deste projeto: Prof.^a Dr.^a Vânia Lima e suas alunas M.^a Marinalva Cardoso e M.^a Sandra Cruz dos Santos (Escola de Químicas e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) pelas medidas e discussões com as medidas de FTIR e RMN. Prof. Dr. Éder Tadeu Cavalheiro (Laboratório de Análise Térmica, Eletroanalítica e Química de Soluções, Instituto de Química de São Carlos, USP) pela colaboração com as medidas de análises térmicas. Prof. Dr. Edgar Sanches, Prof. Dr. Henrique Duarte da Fonseca Filho e M.e. Sidney Azevedo (Laboratório de Óptica de Materiais; Departamento de Física, Universidade Federal do Amazonas), pelas medidas do AFM. Dr.^a Ievgeniia Iermak (Grupo de Óptica, IFSC, USP) pelas medidas de Raman (ainda não apresentadas). Dr. Daniel Cosmo Pizetta (Centro de Imagens e Espectroscopia *in vivo* por Ressonância Magnética, IFSC, USP) pelas análises estatísticas e ao Dr. Andrey Coatrini Soares (Embrapa Instrumentação e Grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross”, IFSC, USP) pelas medidas de ângulo de contato, energia de superfície e UV-vis e para ambos meu muito obrigada pelas medidas com o IDMAP, discussões e revisões. Prof. Dr. Valtencir Zucolloto e a Dr.^a Bruna Juliana Moreira pelas medidas de NTA. Dr. Marcio de Paula (Central de Análises Químicas Instrumentais, IQSC, USP) pelas medidas e discussões científicas nas análises com o MEV. Ao Manoel Ricardo Roncon (Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análises, IFSC, USP) pelas medidas do MEV-FEG. Este trabalho não seria o mesmo sem vocês!

Aos colaboradores que me ajudaram com ideias e o mais importante atenção: Prof. Dr. Osvaldo de Oliveira Junior e Dr.^a Débora Terezia Balogh (Grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross”, IFSC, USP), Prof. Dr. Tito José Bonagamba e Dr. Elton Montrazi (Grupo de Ressonância Magnética, Espectroscopia e Magnetismo, IFSC, USP), Dr. Luiz Alberto Colnago (Embrapa Instrumentação), Dr. Paulo J. M. Cordeiro (Central de Análises Químicas Instrumentais, IQSC, USP). Obrigada por me ouvirem e pelos conselhos.

À Universidade de São Paulo e ao IFSC por me proporcionar o melhor ensino. Me orgulho pela vida toda ter sido aluna do ensino público.

À minha escola E.E. “Fúlvio Morganti” por ter sido minha base e aos professores que passaram por minha vida para me impulsionar à seguir. Vocês professores foram muitos e hoje sou uma pequena parte de todos vocês.

À minha amiga Naiara, por estar comigo desde os 6 anos de idade acompanhando minhas sagas nas escritas. Aos amigos que o IFSC me trouxe ao longo de anos, pelas conversas, discussões e até mesmo parcerias científicas mas, além disso parceria para a vida: Letícia, Andrey, Armando, Emerson, Raíssa (por vocês me ouvirem, por rirem, chorarem comigo e ainda assim estarem aqui), Heloísa (que muito e tudo me ensinou no laboratório de células também, com dedicação, força de vontade e prontidão...por seus conselhos e acima de tudo: ética), Robson, Herbert e Sandra (de tudo o apoio é o que mais importa). Vocês são os melhores e certamente fazem a diferença na minha vida!

À Neusa, Cristina, Sabrina e Luciana, da Biblioteca Prof. Bernhard Gross, do IFSC por toda ajuda e presença ao longo dos anos de graduação até hoje - não apenas com formatações, mas, com alegria e disponibilidade de nos ouvir!

Ao Coral USP de São Carlos, que tornou esta jornada mais amorosa, alegre, leve e feliz! Sem vocês eu não conseguiria.

Aos colegas da Escola de Engenharia de São Carlos, da pós-graduação em Ciências e Engenharia de Materiais, por estarem presentes lá no início de tudo.

Aos animais envolvidos diretamente nesta pesquisa em laboratório e a aqueles diretamente em minha vida (a estes sou grata pelos abraços, afagos e verdadeiro amor- TODOS eles). Muito obrigada.

Pela terapia e pela ajuda emocional nestes tempos: Bruna.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPESP sem as quais não seria possível a realização destes e outros trabalhos científicos. “O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Código de financiamento 001”.

Richard Feynman, diz
“Eu, um universo de átomos, um átomo no Universo.”

Clarice Lispector, reflete
“Nasci dura, heróica, solitária e em pé.”

Snoopy por Charles M. Schulz, conclui
“Obrigado pela dança.”

RESUMO

SILVA, G. R. **Nanopartículas de poli (D, L-ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) para a entrega transdérmica do ácido aminolevulínico (5-ALA)**. 2020. 225 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica que combina ação de um fotossensibilizador (FS) com a administração da luz local e do oxigênio molecular presente no tecido, para gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) citotóxicas que levam à morte de células tumorais. O ácido aminolevulínico (5-ALA) é o precursor metabólico do FS protoporfirina IX e é muito utilizado para o tratamento tópico e não invasivo de alguns dos cânceres de pele mais superficiais. Embora a TFD seja uma técnica eficaz, a dificuldade de permeação na pele do 5-ALA, por causa da sua característica hidrofílica, leva à diminuição da biodisponibilidade local desta molécula, contribuindo para uma redução no efeito terapêutico e por consequência do uso da técnica. Para superar estes desafios neste trabalho desenvolvemos um sistema de nanopartículas poliméricas de poli (D, L- ácido láctico-co-glicólico (PLGA) para a liberação controlada do 5-ALA para uso tópico e transdérmico. O sistema obtido por simples emulsão, se mostrou mais estável quimicamente em relação a molécula livre do 5-ALA, sendo muito promissor para os testes in vitro. Verificamos a ação da TFD em células de pele saudáveis (fibroblastos, HDFn) e tumorais (não-melanoma, A431) em diferentes doses de energia comprando a efetividade das nanopartículas e do 5-ALA livre. Após o tempo de incubação de 24 horas, comprovamos que para as avaliações da TFD (630 nm, 8 J.cm⁻²), com o equivalente de concentração de 0,5 mM e 1,0 mM de 5-ALA, que as nanopartículas apresentaram 53% de viabilidade celular para a A431, e nas mesmas condições foi verificado 76% de viabilidade para as células saudáveis. Para o 5-ALA livre as porcentagens de viabilidade celular são equivalentes a 5% e 18%, respectivamente para a A431 e HDFn. Estes resultados mostram o que as nanopartículas desenvolvidas podem melhorar a eficácia da TFD, sendo mais seletivas para as células tumorais, com efeito em baixas concentrações e apresentando menos danos oxidativos as células saudáveis de pele (fibroblastos, HDFn). Este trabalho contribui para a nanotecnologia aplicada para tratamentos tópicos, com uma metodologia simples e promissora para futuro uso clínico de moléculas hidrofílicas.

Palavras-Chave: Nanopartículas poliméricas. Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico). Ácido aminolevulínico. Terapia fotodinâmica. Câncer de pele não-melanoma.

ABSTRACT

SILVA, G. R. **Poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles (PLGA) for transdermal delivery of aminolevulinic acid (5-ALA)**. 2020. 225 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Photodynamic Therapy (PDT) is a technique that combines the action of a photoactive molecule with the administration of local light and molecular oxygen present in the tissue to generate cytotoxic reactive oxygen species (ROS) that lead to the tumor cells death. Aminolevulinic acid (5-ALA) is the metabolic precursor of the photoactive molecule protoporphyrin IX. 5-ALA is widely used for topical and non-invasive treatment of some of the most superficial skin cancers. Although PDT is an effective technique, the difficulty of permeation in the skin of 5-ALA, because of its hydrophilic characteristic, leads to a decrease in the local bioavailability of this molecule, contributing to a reduction in the therapeutic effect and as a result of the use of the technique. In this work, we developed a system of polymeric nanoparticles of poly (D, L- lactic-co-glycolic acid (PLGA) for the controlled release of 5-ALA for topical and transdermal use. The nanoparticle system obtained by simple emulsion proved to be more chemically stable concerning the free molecule of 5-ALA, being very promising for in vitro tests. The action of TFD has been studied in healthy skin cells (fibroblasts, HDFn) and tumor cells (non-melanoma, A431) in different doses of energy buying the effectiveness of nanoparticles and the free 5-ALA. After the 24-hour incubation time, we proved that for the TFD evaluations (630 nm, 8 J.cm⁻²), with the concentration equivalent of 0.5 mM and 1.0 mM of 5-ALA, that the nanoparticles showed 53% cell viability for A431, and in the same conditions 76% viability was verified for healthy cells. The cell viability percentages for free 5-ALA were equivalent to 5% and 18%, respectively for A431 and HDFn. These results show that the developed nanoparticles can improve the effectiveness of PDT, being more selective for tumor cells, with effect in low concentrations and presenting less oxidative damage to healthy skin cells (fibroblasts, HDFn). This work contributes to nanotechnology applied to topical treatments, with a simple and promising methodology for future clinical use of hydrophilic molecules.

Keywords: Polymeric nanoparticles. Poly (lactic acid-co-glycolic acid). Aminolevulinic acid. Photodynamic therapy. Non-melanoma skin cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de Jablonski mostrando os mecanismos de ação do TFT através das reações do tipo I e tipo II.....	43
Figura 2 - Estruturas químicas da (A) protoporfirina IX e (B) ácido aminolevulínico.	45
Figura 3 - Fórmulas estruturais (A) PLGA, (B) PEG e (C) PVA.....	51
Figura 4 - Diagrama das (A) vias de permeação tópica e transdérmica junto com sua diferenciação nas vias principais que são intercelulares e nas vias intercelulares que estão representadas em (B) em comparação ao esquema de permeação (C) representando, sequencialmente, a retenção de fármacos hidrofílicos, lipossomas convencionais carregados com fármaco e vesículas lipídicas conjugadas com polímeros, (D) com destaque para a permeabilidade intra e intercelular dos lipossomas conjugados aos polímeros.....	51
Figura 5 - Representação dos protocolos seguidos para o desenvolvimento dos sistemas de nanopartículas com ativo, para diferentes rotas de dupla e simples emulsão.....	57
Figura 6 - Residual polimérico (A) haste do Turrax® e (B) ímã magnético.....	63
Figura 7 - Representação para os protocolos das rotas de obtenção das nanopartículas poliméricas por (I) dupla emulsão e (II) simples emulsão das nanopartículas com ativo.....	74
Figura 8 - Esquema de formas de deposição de líquidos em um substrato sólido, definindo o ângulo de contato.	77
Figura 9 - Representação da ação das moléculas que causam a tensão superficial em uma superfície.....	77
Figura 10 - Escalonamento de 30 para 190mL, do sistema de dupla emulsão mostrando as diferenças entre (A) diâmetro, (B) potencial Zeta e (C) pH para nanopartículas com e sem ativo.	86
Figura 11 - Escalonamento de 30 para 190mL, do sistema de simples emulsão mostrando as diferenças entre (A) diâmetro, (B) potencial Zeta e (C) pH para nanopartículas com e sem ativo.	87
Figura 12 - Soluções de nanopartículas comparando as soluções obtidas por simples e dupla emulsão com PVA e PVA-PEG na fase tensoativa. (1) A-DE-PVA, (2) A-DE-PV,-ALA, (3) D-SE-PVA, (4) A-SE-PVA-ALA, (4) C-SE-PEG-PVA, (5) C- SE-PEG-PVA-ALA, (6) D- DE-PEG-PVA, (5) D-DE-PEG-PVA-ALA.....	90

Figura 13 - Medidas para (A) condutividade elétrica (σ), (B) viscosidade dinâmica (η), para os sistemas A-DE-PVA, B-SE-PEG, C-SE-PEG-PVA, D-SE-PVA, E-DE-PEG-PEV para os sistemas sem e com ativo.	91
Figura 14 - Espectroscopia no ultra-violeta e visível, para os sistemas de nanopartículas poliméricas.	93
Figura 15 - Comparação de tamanho hidrodinâmico para as amostras (A - B) A-DE-PVA, (C-D) A-DE-PVA-ALA, (E-F) C-SE-PEG-PVA, (G-H) C-SE-PEG-PVA-ALA, (I-J) D-SE-PVA (K-L)D-SE-PVA-ALA,(M-N) E-DE-PEG-PVA e (O-P) E-DE-PEG-PVA-ALA, respectivamente para as técnicas de NTA (distribuição por número) e DLS (distribuição por intensidade). Gaussinas calculadas apartir dos ajustes dos softwares do DLS e NTA.	97
Figura 16 - (A) Representação do ângulo de contato e (B) variação do ângulo de contato para os líquido-sondas água (a), diiodometano (d), etilenoglicol (e) e formamida (f) e (C) energia de superfície e as suas componentes polares e dispersivas para as amostras (1) vidro, (2) A-DE-PVA, (3) A-DE-PVA-ALA, (4) B-SE-PEG, (5) B-SE-PEG-ALA, (6) C-SE-PEG-PVA, (7) C-SE-PEG-PVA-ALA, (8) D-SE-PVA (9)D-SE-PVA-ALA,(10) E-DE-PEG-PVA e (11) E-DE-PEG-PVA-ALA.	99
Figura 17 - Análises de FTIR para as amostras (A) 5-ALA, (B)PEG400, (C) PLGA e (D) PVA.	102
Figura 18 - Análises de FTIR, para as nanopartículas com ativo e sem ativo, para os sistemas (A) A-DE-PVA e A-DE-PVA-ALA, (B) B-SE-PEG e B-SE-PEG-ALA, (C) C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA-ALA, (D) D-SE-PVA e D-SE-PVA-ALA,(E) E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA.	103
Figura 19 - Espectros de RMN (A) 5-ALA em D2O , (B) PEG em D2O, (C) PLGA em acetona e (D) PVA em D2O.	108
Figura 20 - RMN de nanopartículas obtidas por dupla emulsão (A) A-DE-PVA e (B) A-DE-PVA-ALA e simples emulsão (D) D-SE-PVA e (E) D-SE-PVA-ALA, estabilizadas com PVA.	110
Figura 21 - NMR de nanopartículas obtidas por simples emulsão (A) B-SE-PEG e (B) B-SE-PEG-ALA, mostrando a interação do 5-ALA.	112
Figura 22 - RMN de nanopartículas de simples emulsão (A) C-SE-PEG-PVA e (B) C-SE-PEG-PVA- ALA e dupla emulsão (C) E-DE- PEG-PVA e (E) E-DE-PEG-PVA-ALA, estabilizadas com PVA e PEG, mostrando a interação do 5-ALA.	114
Figura 23 - Estabilidade forçada do 5-ALA em meio aquoso, por quatro dias consecutivos, à temperatura de 4°, 25°, 40°C e ciclo (24h à 4° e 24h à 40°C).	118
Figura 24 - Teste de estabilidade forçada em função do tempo (8000 rpm) (A)	

<p>sistemas com PVA como tensoativo para dupla (A-DE-PVA e A-DE-PVA-ALA) e simples (D-SE-PVA e D-SE-PVA-ALA) emulsão, (B) sistemas com PVA e PEG como tensoativos para dupla (E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA) e simples (B-SE-PEG e B-SE-PEG-ALA) e C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA-ALA).....</p>	120
<p>Figura 25 - Os gráficos representam os valores de pH em função do tempo, para diferentes temperaturas de armazenamento. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para diferentes temperaturas de armazenamento: (A e B) 40°C; (C e D) 25°C; (E e F) 4°C; (G e H) ciclo.</p>	123
<p>Figura 26 - Os gráficos representam os valores de diâmetro hidrodinâmico em função do tempo, para diferentes temperaturas de armazenamento. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para diferentes temperaturas de armazenamento: (A e B) 40°C; (C e D) 25°C; (E e F) 4°C; (G e H) ciclo.</p>	125
<p>Figura 27 - Os gráficos representam as diferenças de PDI em função do tempo, para diferentes temperaturas de armazenamento. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para diferentes temperaturas de armazenamento: (A e B) 40°C; (C e D) 25°C; (E e F) 4°C; (G e H) ciclo.</p>	127
<p>Figura 28 - Os gráficos representam os valores de potencial Zeta em função do tempo, para diferentes temperaturas de armazenamento. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para diferentes temperaturas de armazenamento: (A e B) 40°C; (C e D) 25°C; (E e F) 4°C; (G e H) ciclo. Fonte: Própria autora.</p>	129
<p>Figura 29 - Mapas do IDMAP para as análises de potencial Zeta, para os sistemas A-DE-PVA, A-DE-PVA-ALA, B-SE-PEG, B-SE-PEG-ALA, C-SE-PEG-PVA, C-SE-PEG-PVA-ALA, D-SE-PVA, D-SE-PVA-ALA, E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA mostrando as similaridades dos sistemas por proximidade - círculo preto e maior diferenciação pelo distanciamento entre a mesma síntese com e sem 5-ALA - elipse na cor do grupo.</p>	132
<p>Figura 30 - Mapas do IDMAP para as análises de pH, para os sistemas A-DE-PVA, A-DE-PVA-ALA, B-SE-PEG, B-SE-PEG-ALA, C-SE-PEG-PVA, C-SE-PEG-PVA-ALA, D-SE-PVA, D-SE-PVA-ALA, E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA mostrando as similaridades dos sistemas por proximidade - círculo preto e maior diferenciação pelo distanciamento entre a mesma síntese com e sem 5-ALA - elipse na cor do grupo.</p>	133
<p>Figura 31 - Mapas do IDMAP para as análises de diâmetro, para os sistemas A-DE-PVA, A-DE-PVA-ALA, B-SE-PEG, B-SE-PEG-ALA, C-SE-PEG-PVA, C-SE-PEG-PVA-ALA, D-SE-PVA, D-SE-PVA-ALA, E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA mostrando as similaridades dos sistemas por proximidade - círculo preto e maior diferenciação pelo distanciamento entre a mesma síntese com e sem 5-ALA - elipse na cor</p>	

do grupo.	134
Figura 32 - Mapas do IDMAP para as análises de PDI, para os sistemas A-DE-PVA, A-DE-PVA-ALA, B-SE-PEG, B-SE-PEG-ALA, C-SE-PEG-PVA, C-SE-PEG-PVA-ALA, D-SE-PVA, D-SE-PVA-ALA, E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA mostrando as similaridades dos sistemas por proximidade - círculo preto e maior diferenciação pelo distanciamento entre a mesma síntese com e sem 5-ALA - elipse na cor do grupo.	135
Figura 33 - Derivatização da molécula de 5-ALA.	141
Figura 34 - (A) Aparato experimental para o estudo de liberação (1) Presilhas para fechar as membranas de diálises (em verde), (2) Imã para agitação da solução receptora, (3) membrana de diálise com (4) solução de nanopartículas no interior (em rosa), (5) solução receptora (tampão PBS) para a difusão do ativo. A membrana foi mantida submersa na solução receptora. (B) Montagem do experimento para um dos pontos de permeação.	144
Figura 35 - Seção transversal da Strat-M e diagrama da pele humana. O Strat-M tem o "equivalente" de todas as três camadas de pele humana e a camada superior justa é representativa do estrato córneo.	145
Figura 36 - Montagem experimental para a célula de Franz, para o estudo de permeação: (1) Compartimento que recebe a amostra para ser permeada na (2) membrana sintética, (3) banho externo com água deionizada à 37°C, (4) ímã acoplado em uma mola para agitação moderada e contínua da (4) solução receptora do ativo (tampão PBS). Na figura é possível observar ainda (A) a entrada de ar e (B) saída de ar para a regulação da pressão realizada na amostra, onde o (1) compartimento receptor da amostra é aberto para o ambiente, circulação do banho externo (D) conexão com mangueiras de silicone e seringa dosadora (insulina) para a saída e (E) conexão com mangueiras de silicone e seringa dosadora para a entrada da água deionizada, retirada e reposição da solução receptora (F) conexão com mangueiras de silicone e seringa dosadora para a entrada e (G) conexão com mangueiras de silicone e seringa dosadora para a saída, para se manter o equilíbrio da solução. (6) Vista do anel que segura a membrana com a solução de nanopartículas e (7) montagem da célula utilizada neste trabalho.	146
Figura 37 - Análise do estímulo ao pH através do (A) diâmetro em comparação ao PDI e (B) diâmetro em comparação ao potencial para o sistema C-PEG-PVA e (C) diâmetro em comparação ao PDI e (D) diâmetro em comparação ao potencial para o sistema C-PEG-PVA-ALA.	148
Figura 38 - Análises de TGA (em % massa) e a derivada primeira (A) 5-ALA, (B) PVA, (C) PEG400 e (D) PLGA.	151
Figura 39 - Análises de DSC, mostrando os eventos térmicos para as amostras de (A) 5-ALA, (B) PVA, (C) PEG400 e (D) PLGA.	152

Figura 40 - Análises de TGA (em % massa) e a derivada primeira (A) C-SE-PEG-PVA, (B) C-SE-PEG-PVA-ALA.....	154
Figura 41 - Análises de DSC, mostrando os eventos térmicos para as amostras de (A) C-SE-PEG-PVA, (B) C-SE-PEG-PVA-ALA.	155
Figura 42 - Análises por AFM para as nanopartículas (A) e (C) imagem morfológica; (B) e (D) contraste de fase e (E) e (F) topológica, respectivamente para as amostras C-PEG-PVA e C-PEG-PEV-ALA. As imagens de morfologia e contraste de fase estão na mesma escala.....	158
Figura 43 - Análise morfológica por MEV para o sistema C-PEG-PVA.	159
Figura 44 - Análise morfológica por MEV-FEG para o sistema (A), (B) e (C) C-PEG-PVA-ALA para diferentes regiões (A) e (B). A figura (C) destaca a mudança de forma de algumas partículas no decorrer das análises e a formação de agregados de poliméricos. A figura (D) mostra a formação de aglomerados para o sistema C-PEG-PVA.	162
Figura 45 - Representação da formação da nanopartícula em solução aquosa do sistema C-PEG-PVA-ALA, mostrando a formação das camadas do PVA e PEG400 (formação da corona) com o 5-ALA adsorvido em toda a superfície da nanopartícula, embasado nas caracterizações de superfície, morfologia e análises térmicas.....	163
Figura 46 - Curva de calibração de intensidade de fluorescência para a reação de derivatização do 5-ALA em PBS (pH 5,0), para o composto fluorescente C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	164
Figura 47 - Perfil de liberação controlada para as nanopartículas do sistema C-PEG-PVA-ALA até 24 horas.	166
Figura 48 - Estudo in vitro de permeação cutânea do (A) C-PEG-PVA-ALA em solução de PEG (50:50) (v:v), (B) 5-ALA livre.	168
Figura 49 - Morfologia epitelial da linhagem A-431 com baixa e alta densidade (confluência) de células.	172
Figura 50 - Morfologia da linhagem HDFn com baixa e alta densidade (confluência) de células.	173
Figura 51 - Resumo gráfico para o estudo de citotoxicidade dos materiais poliméricos: (1) Células aderidas em garrafa de cultura, (2) centrifugação, (3) etapa de incubação das células e polímeros, por 24 horas, (4) incubação dos estratos poliméricos nas placas com cultura de células e (5) teste para citotoxicidade polimérica.....	176
Figura 52 - Resumo gráfico genérico para o estudo de investigação para terapia fotodinâmica: (1) Células aderidas em garrafa de cultura, (2) centrifugação, (3) etapa de incubação das células, por 24 horas, (4) incubação do 5-ALA livre ou nanopartículas poliméricas (com ou sem ativo) placas com cultura de células por 24 horas e (5) testes para terapia	

<p>fotodinâmica (doses de luz: 0, 3, 8 e 20 J/cm²) e incubação por 24 horas, posteriormente (6) leitura de viabilidade celular por MTT.</p>	177
<p>Figura 53 - Resumo gráfico para o estudo de produção de PpIX endógena: (1) Células aderidas em garrafa de cultura, (2) centrifugação, (3) etapa de incubação das células, por 24 horas, (4) incubação da PpIX, 5-ALA livre ou nanopartículas poliméricas (com ativo) em placas com cultura de células por 24 horas e (5) centrifugação das amostras (6)lise celular com a adição detergente iônico (laurel sulfato de sódio) e recuperação do sobrenadante para (6) leitura de fluorescência.</p>	180
<p>Figura 54 - Viabilidade das linhagens de células de câncer de não-melanoma (A431) e fibrioblastos (HDFn) incubadas por 24h com os polímeros PLGA(50:50), PEG400, PVA e PLGA-PEG. A porcentagem de células vivas estão normalizadas em função das células sem incubação (0 J.cm-2). Os valores representam a média e desvio padrão (n=15, para três repetições de ocasião).</p>	182
<p>Figura 55 - Viabilidade das linhagem de pele normal fibrioblastos (HDFn) incubadas por 24h com o 5-ALA livre. A porcentagem de células vivas estão normalizadas em função das células sem incubação (0 J.cm-2). Os valores representam a média e desvio padrão (n=9, para três repetições de ocasião).</p>	184
<p>Figura 56 - Viabilidade das linhagem de pele não-melanoma (A431) incubadas por 24h com o 5-ALA livre. A porcentagem de células vivas estão normalizadas em função das células sem incubação (0 J.cm-2). Os valores representam a média e desvio padrão (n =9, para três repetições de ocasião).</p>	185
<p>Figura 57 - Terapia fotodinâmica para as linhagens de pele (A) e (B) fibrioblatos (HDFn) e (C) e (D) não-malanoma incubadas por 24h com os sistemas de nanopartículas A-DE-PVA, B-SE-PEG, C-SE-PEG-PVA, E-DE-PEG-PVA (A) e (C) sem ativo e (B) e (D) com ativo. A porcentagem de células vivas estão normalizadas em função das células sem incubação (0 J.cm-2). Os valores representam a média ± desvio padrão (n =9, para três repetições de ocasião). *Grupoos que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes (alfa=0,05), ajustado por Tukey.</p>	188
<p>Figura 58 - Terapia fotodinâmica para as linhagens de pele (A) e (B) fibrioblatos (HDFn) e (C) e (D) não-malanoma incubadas por 24h com os sistemas de nanopartículas (A) e (C) C-SE-PEG-PVA e (B) (D) C-SE-PEG-PVA. A porcentagem de células vivas estão normalizadas em função das células sem incubação (0 J.cm-2). Os valores representam a média e desvio padrão (n =9, para três repetições de ocasião).</p>	190
<p>Figura 59 - Análise estatpistica para as linhagens de pele fibrioblatos (HDFn) não-malanoma incubadas por 24h com os sistemas de nanopartículas C-SE-PEG-PVA, C-SE-PEG-PVA-ALA e 5-ALA livre para duas concentrações: 0,5 mM e 1,0 mM, para a dose resposta de 8 J.cm-2. A porcentagem de células vivas estão normalizadas em função das células</p>	

sem incubação (0 J.cm-2). Os valores representam a média ± desvio padrão (n =9, para três repetições de ocasião). *Grupos que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes (alfa=0,05), ajustado por Tukey. Diferença significativa (p <0,001); teste multivarida ANOVA).	192
Figura 60 - Curva de calibração de produção de fluorescência para PpIX em DMSO, com excitação em 400 nm e emissão em 630 nm.	194
Figura 61 - Produção de PpIX endógena depois de 24 horas de incubação em comparação com o 5-ALA livre e as nanopartículas com ativo para as células fibroblastos (HDFn) e não-melanoma (A431). Os valores representam a média ± desvio padrão (n = 6, para duas repetições de ocasião).	194
Figura 62 - Os gráficos representam as diferenças no (A) diâmetro médio, (B) PDI, (C) potencial Zeta e (D) pH em função do tempo. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para a velocidade de fase externa de 750 rpm, avaliadas nas temperaturas de 4° e 23°C, entre os dias 1 e 23. A fase tensoativa é formada pelo PVA. Os erros representam os valores do desvio padrão de análises em quintuplicata.	214
Figura 63 - Os gráficos representam as diferenças no (E) diâmetro médio, (F) PDI, (G) potencial Zeta e (H) pH em função do tempo. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para a velocidade de fase externa de 1500 rpm, avaliadas na temperatura 23°C, entre os dias 1 e 22. A fase tensoativa é formada pelo PVA. Os erros representam os valores do desvio padrão de análises em quintuplicata.	215
Figura 64 - Os gráficos representam as diferenças no (I) diâmetro médio, (J) PDI, (K) potencial Zeta e (L) pH em função do tempo. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para a velocidade de fase interna de 1500 rpm e fase externa 3000 rpm, avaliadas nas temperaturas de 4° e 23°C, entre os dias 1 e 23. A fase tensoativa é formada pelo PVA. Os erros representam os valores do desvio padrão de análises em quintuplicata.	216
Figura 65 - Os gráficos representam as diferenças no (M) diâmetro médio, (N) PDI, (O) potencial Zeta e (P) pH em função do tempo. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para a velocidade de fase de 1500 rpm e, avaliadas nas temperaturas de 4° e 23°C, entre os dias 1 e 23. A fase tensoativa é formada pela associação física PEG400-PVA e PEG. Os erros representam os valores do desvio padrão de análises em quintuplicata.	217
Figura 66 - Teste de estabilidade forçada em função do tempo (56°C) (A) sistemas com PVA como tensoativo para dupla (A-DE-PVA e A-DE-PVA-ALA) e simples (D-SE-PVA e D-SE-PVA-ALA) emulsão e para (B) sistemas com PVA e PEG como tensoativos para dupla (E-DE-PEG-PVA e E-	

DE-PEG-PVA-ALA) e simples (B-SE-PEG e B-SE-PEG-ALA) e C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA-ALA). 219

Figura 67 - Espectro de fluorescência da PpIX (A) emissão em 400 nm e excitação em 630 nm. A solução de PpIX foi analisada em DMSO na concentração de 5mg. mL-1. 225

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variações testadas para o desenvolvimento das sínteses.	56
Tabela 2 - Descrição das massas de PLGA (50:50), utilizadas na determinação da solubilidade do polímero nos solventes de escolha.	58
Tabela 3 - Classificação dos solventes orgânicos em relação a densidade (71), viscosidade (71), polaridade (64) classificação de solventes residuais (toxicidade) (66) e solubilidade do PLGA (50:50) em relação aos solventes.	61
Tabela 4 - Testes realizados para obtenção das sínteses.	64
Tabela 5 - Principais resultados para os testes iniciais de estabilidade, mostrando a influência de parâmetros de agitação, tipo de emulsão, tensoativo e a presença ou não do ativo. Todos os dados foram analisados a 23°C e são indicados os valores para as (a) sínteses sem ativo e (b) com ativo.	66
Tabela 6 - Tensão superficial dos líquidos-sonda para o cálculo de energia de superfície.	78
Tabela 7 - Sistemas analisados para os estudos de estabilidade. Os sistemas estão divididos por sínteses, indicando a composição das fases aquosas e as observações quanto as análises para este trabalho.	84
Tabela 8 - Comparação de tamanho hidrodinâmico para as amostras A-DE-PVA, A-DE-PVA-ALA, C-SE-PEG-PVA, C-SE-PEG-PVA-ALAD-SE-PVA, D-SE-PVA-ALA, E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA, respectivamente para as técnicas de NTA e DLS.	94
Tabela 9 - Comparação das atribuições analisadas por FTIR entre as nanopartículas obtidas por dupla emulsão (A-DE-PVA e A-DE-PVA-ALA) e e simples emulsão (D-SE-PVA e D-SE-PVA-ALA), para sistemas estabilizados com PVA, indicando os grupos funcionais após a adição do 5-ALA.	105
Tabela 10 - Atribuições analisadas por FTIR entre as nanopartículas obtida por simples emulsão (B-SE-PEG e B-SE-PEG-ALA), para sistema estabilizados com PEG400, indicando os grupos funcionais após a adição do 5-ALA.	105
Tabela 11 - Comparação das atribuições analisadas por FTIR entre as nanopartículas obtidas por dupla emulsão (E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA -ALA) e e simples emulsão (C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA -ALA), para sistemas estabilizados com PVA e PEG, indicando os grupos funcionais após a adição do 5-ALA.	106
Tabela 12 - Comparação das frequências por FTIR para os sistemas obtidos por	

dupla emulsão, mostrando a influência do PEG.	107
Tabela 13 - Efeito do 5-ALA nos tempos de relaxação de spin-rede de ¹ H NMR (T1) em comparação aos sistemas obtidos por simples (D-SE-PVA e D-SE-PVA-ALA) e dupla emulsão (A-DE-PVA e A-DE-PVA-ALA).	111
Tabela 14 - Efeito do 5-ALA nos tempos de relaxação de spin-rede de ¹ H NMR (T1) no sistema de simples emulsão B-SE-PEG e B-SE-PEG-ALA, estabilizados por PEG.	112
Tabela 15 - Efeito do 5-ALA nos tempos de relaxação de spin-rede de NMR (T1) em comparação aos sistemas obtidos por simples (C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA-ALA) e dupla emulsão (E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA).	115
Tabela 16 - Efeito do PEG em sistemas PVA-PLGA. Tempos de relaxação de spin-rede de ¹ H NMR (T1, s).	116
Tabela 17 - pH das soluções aquosas (20±0,01) °C, para 5-ALA, PVA, PEG400 e suas misturas físicas.	121
Tabela 18 - Concentrações dos polímeros para os testes de citotoxicidade.	176
Tabela 19 - Variação média de pH para o 5-ALA, C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA para PBS, DEMEM (alta glicose) e DEMEM.	189
Tabela 20 - Principais referências para o desenvolvimento dos sistemas.	213
Tabela 21 - Atribuições de FTIR para os principais grupos presentes no 5-ALA.	220
Tabela 22 - Atribuições de FTIR para os principais grupos presentes no PEG(400).	221
Tabela 23 - Atribuições de FTIR para os principais grupos presentes no PLGA.	221
Tabela 24 - Atribuições de FTIR para os principais grupos presentes no PVA.	222
Tabela 25 - Custo para materiais primas/insumos farmacêuticos utilizados no escalonamento laboratorial (não inclusa água Milli-Q e cotação para apenas um fornecedor no Brasil).	223
Tabela 26 - Cálculo de custo aproximado para escalonamento laboratorial (não inclusa água Milli-Q e cotação para apenas um fornecedor no Brasil), para volume final de 190mL, mostrando a diferença de preço com o cálculo do insumo 5-ALA fornecido pela Sigma-Aldrich e pela PDT Pharma.	224

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
NTA	Análise de Rastreamento de Nanopartículas
PVA	Álcool polivinílico
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
CPNM	Câncer de pele melanoma
CPM	Câncer de pele não-melanoma
5-ALA	Cloridrato de Ácido Aminolevulínico
A431	Carcinoma Epidermóide Humano
CMC	Concentração Micelar Crítica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DEMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
USP	Farmacopeia Americana (U.S. Pharmacopeia)
HDFn	Fibroblasto Dérmico neonatal Humano
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fotossensibilizador
PDI	Índice de Polidispersão
MEV	Microscopia Eletrônica de Alta Resolução
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura
AFM	Microscopia de Força Atômica
PLGA	Poli (D,L-lactídeo-co-glicólico)
PEG400	Polietileno glicol 400
PLGA-PEG-PLGA	Poli(D,L-lactídeo-co-glicólico)- <i>block</i> -polietileno glicol- <i>block</i> -poli (D,L-lactídeo-co-glicólico)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PpIX	Protoporfirina IX
RMN	Ressonância Magnética nuclear
SFB	Soro Fetal Bovino
TGA	Termogravimetria Derivada
TFD	Terapia Fotodinâmica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	37
1.1	Motivação para o desenvolvimento de nanopartículas de PLGA-ALA.....	37
1.2	Objetivos e objetivos específicos	39
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	41
2.1	Câncer de pele não-melanoma.....	41
2.2	Terapia Fotodinâmica (TFD).....	42
2.3	Ácido Aminolevulínico (ALA)	45
2.4	A pele e as rotas de permeação de fármacos	46
2.5	Nanomedicina e sistemas de liberação controlada poliméricos em TFD.....	48
3	ETAPA 1 - PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO (P&D&I)”	55
3.1	Materiais e métodos.....	55
3.1.1	Materiais	55
3.1.2	Métodos	55
3.3	Resultados e Discussão.....	60
3.3.1	Definição do solvente da fase orgânica	60
3.3.2	Avaliação da estabilidade físico-química para os sistemas	62
3.4	Conclusões parciais	68
4	ETAPA 2 - SÍNTESES E CARACTERIZAÇÕES PARA OS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	71
4.1	Materiais e Métodos	71
4.1.1	Materiais	71
4.1.2	Metodologias	71
4.1.3	Caracterizações	74
4.1.4	Análises de estabilidade dos sistemas de nanopartículas	80
4.1.5	Métodos estatísticos para a visualização dos resultados	82
4.2	Resultados e Discussão.....	83
4.2.1	Protocolos dos sistemas de nanopartículas	83
4.2.2	Caracterizações	89

4.2.3 Estabilidade físico-química dos sistemas de nanopartículas	116
4.3 Conclusões parciais.....	135
5 ETAPA 3 - ANÁLISES DE MORFOLOGIA, TÉRMICAS E ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE PERMEAÇÃO, LIBERAÇÃO E ESFICÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	137
5.1 Materiais e métodos	137
5.1.1 Materiais	137
5.1.2 Métodos.....	137
5.2 Resultados e Discussão	147
5.2.1 Sensibilidade ao pH em função da adsorção do 5-ALA na superfície das nanopartículas	147
5.2.2 Análises térmicas	150
5.2.3 Microscopias	157
5.2.4 Eficiência de encapsulação	163
5.2.5 Perfil de liberação controlada	165
5.2.6 Permeação das nanopartículas em célula de Franz (<i>animal cruelty free</i>)	167
5.3 Conclusões parciais.....	169
6 ETAPA 4 - TESTES <i>IN VITRO</i> EM CÉLULAS HDFN (FIBROBLASTOS) E A431 (CÂNCER DE PELE NÃO-MELANOMA)	171
6.1 Materiais e Métodos.....	171
6.1.1 Materiais	171
6.1.2 Métodos.....	173
6.2 Resultados e Discussão	181
6.2.1 Estudo de citotoxicidade dos materiais poliméricos (PLGA, PVA, PEG400 e PLGA-PEG)	182
6.2.2 Comparação fotocitotoxicidade do 5-ALA livre e das nanopartículas com e sem ativo	183
6.2.3 Quantificação da produção de protoporfirina IX por espectroscopia de fluorescência	193
6.3 Conclusões parciais.....	195
7 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	197
REFERÊNCIAS.....	199

APÊNDICE A - ETAPA 1 - PESQUISA DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO.....	213
APÊNDICE B - ETAPA 2 - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÕES PARA OS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS	219
APÊNDICE C - ANÁLISES COMPARATIVAS DE PREÇO DE CUSTO PARA OS SISTEMAS DE NANOPARTICULAS	223
APÊNDICE D - ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA PPIX EM DMSO	225

APRESENTAÇÃO DA TESE

Esta tese está dividida em SETE CAPÍTULOS apresentados brevemente. No CAPÍTULO 1 é descrito a motivação para o desenvolvimento e o uso de nanopartículas em terapia fotodinâmica, no tratamento de cânceres de pele, seguido dos objetivos do trabalho. O CAPÍTULO 2 apresenta a revisão bibliográfica com os tópicos principais para cada etapa desenvolvida. Em seguida cada capítulo é dividido entre materiais e métodos, resultados, discussões e conclusões parciais. O CAPÍTULO 3, aborda a Etapa 1 de pesquisa, com o desenvolvimento e inovação de sistemas de nanopartículas poliméricas. O CAPÍTULO 4 dispõe da Etapa 1, apresentando os protocolos para as metodologias e caracterizações físico-químicas em acordo com órgãos de regulamentação. O CAPÍTULO 5 define a Etapa 3 com os protocolos finais de caracterização para um sistema potencial para uso em terapia fotodinâmica. E por fim, o CAPÍTULO 6 demonstra as provas de princípio para os estudos *in vitro* para linhagens celulares de pele (HDFn e A431) embasado nas respostas anteriormente estudadas. As conclusões gerais e perspectivas futuras do trabalho são apresentadas no CAPÍTULO 7.

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Motivação para o desenvolvimento de nanopartículas de PLGA-ALA

Câncer é o nome dado a uma coleção de mais de cem doenças relacionadas, podendo ter início em tecidos epiteliais (carcinomas) ou conjuntivos (sarcomas), podendo dividir e espalhar-se, rápido e agressivamente, para qualquer região do corpo, levando à geração de tumores. Embora os avanços científicos e tecnológicos estejam acontecendo, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) estima que em 2020 haverá 18.989.634 casos de câncer em todo o mundo, chegando ao aumento de mais 64% de novos casos em 2040. (1-3)

O câncer de pele é o mais incidente dos cânceres em todo o mundo e corresponde a cerca de 30% dos casos de tumores malignos registrados no Brasil. Esse tipo de câncer é proveniente de várias linhagens celulares e temos dois tipos principais: o melanoma (CPM - Câncer de Pele do tipo Melanoma) e o não-melanoma (CPNM - Câncer de Pele do tipo Não-Melanoma). Embora o de maior mortalidade seja o tipo melanoma, o de maior incidência no país é o do tipo não-melanoma, estimando-se que em 2020 haverá 176.930 novos casos (83.770 homens e 93.160 mulheres, com perspectiva de morte de 1.958 casos totais) no país, enquanto mundialmente, as perspectivas são de 1.097.855 casos. (1,3)

Devido aos altos índices, o custo do tratamento de cânceres de pele do tipo não-melanoma é alto. De acordo com a última atualização de 2010, somente no estado de São Paulo, o Sistema Único de Saúde (SUS) gastou para todos os tratamentos do estado (que inclui radioterapia, quimioterapia e cirurgia, com associação destas ou não) cerca de 37 milhões de reais. Dentre estes dados, se destaca a importância no desenvolvimento e aprimoramento de tratamentos e de técnicas para este tipo de câncer que sejam mais economicamente viáveis, tais como a terapia fotodinâmica (*photodynamic therapy*, TFD). (1,4)

A TFD é uma técnica não invasiva e se fundamenta na associação de um fármaco fotossensibilizador seguido da aplicação de luz resultando na produção e ação do oxigênio reativo para o tratamento de várias doenças oncológicas, incluindo os cânceres de pele. Embora já consolidados, os tratamentos tópicos, através da TFD associado a pró-fármacos hidrofílicos, como o ácido aminolevulínico (5-ALA), apresentam algumas limitações, dentre elas a própria biodisponibilidade do 5-ALA nas camadas da pele, impedindo a máxima eficácia farmacológica no local de ação. Assim, procura-se melhorar o uso deste tipo de pró-fármaco através da nanotecnologia, visando o máximo custo-benefício entre as técnicas. (5-6)

Como já mencionado, há muitas estratégias na ciência e tecnologia usadas para a melhoria nas etapas de prevenção, tratamento e do diagnóstico de várias doenças. Em particular, com o avanço da nanotecnologia e, em específico, da nanomedicina, permitiu-se o desenvolvimento de plataformas para antigos e novos fármacos, utilizando-se de nanopartículas poliméricas, lipídicas e metálicas. As nanopartículas são desenvolvidas para a entrega controlada e em sítios específicos de ação (seletividade), podendo melhorar a biodistribuição e disponibilidade; a eficiência terapêutica ou simplesmente diminuir os efeitos colaterais dos fármacos nos organismos. Além disso, a nanotecnologia pode ser associada a terapias como a fototerapia, quimioterapia e a radioterapia, além de diagnósticos por imagem, como a ressonância magnética. (7)

Muitas nanopartículas poliméricas estão sendo desenvolvidas para o tratamento de câncer. Para garantir o desenvolvimento de nanomateriais poliméricos com alta especificidade e custo-benefício para se chegar ao mercado final, como produto farmacêutico de uso clínico aprovado, é necessário que as características físico-químicas relacionadas à sua estabilidade como dispersão de tamanho, carga superficial, morfologia e toxicidade sejam bem definidas. Sistemas com nanopartículas poliméricas de poli (D, L-ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), embora ainda economicamente com alto valor de mercado, apresentam aprovação clínica por órgãos como o *Food and Drug Administration* (FDA) desde meados do início dos anos 80. (8-9)

O PLGA permite um projeto de desenvolvimento em aplicações tópicas, baseado em desempenho para melhorar as características físico-químicas de muitos fármacos na penetração e retenção nas células da pele, protegendo-os de reações e interações com biomoléculas, otimizando os processos de tratamentos em relação às moléculas de fármacos livres. Este biopolímero é frequentemente associado ou conjugado a outros materiais como outros polímeros, como polietileno glicol (PEG) ou biomoléculas como ácido desoxirribonucleico (DNA), a fim de aumentar sua especificidade no tratamento. (8-10)

Na oncologia é importante, após o diagnóstico rápido, o tratamento eficaz e específico, para aumentar as chances de cura e sobrevida destes pacientes. Assim, o desenvolvimento e aplicações de alta tecnologias, podem trazer novas perspectivas para aqueles acometidos pela doença e também para a classe médica. Deste modo, este trabalho propõe a elaboração de uma nanoplataforma de PLGA-ALA para o tratamento de cânceres de pele do tipo não-melanoma com uso conjunto à terapia fotodinâmica.

1.2 Objetivos e objetivos específicos

O principal objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um novo sistema de nanopartículas de PLGA para a entrega controlada do 5-ALA, visando o aumento de sua permeabilidade e biodisponibilidade nas camadas da pele, para aumentar a eficácia da TFD. Observando o número de casos de câncer de pele do tipo não-melanoma, no Brasil e no mundo, e tendo em vista os resultados promissores do uso clínico do 5-ALA como molécula livre e suas respectivas limitações físico-químicas para o uso em aplicações tópicas para o tratamento associado com TFD, espera-se com este trabalho contribuir para a potencialização do pró-fármaco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer de pele não-melanoma

O câncer de pele é de longe o tipo mais comum de câncer e é classificado em dois tipos principais: o melanoma e não-melanoma. O tipo melanoma (MSC) surge em função de mutações genéticas nos melanócitos, células produtoras de pigmento, que podem ser encontrados tanto na pele, quando nos olhos e ouvido interno, por exemplo. O melanoma maligno é responsável por mais de 1% de todos os tumores malignos de pele, sendo o mais agressivo e com elevada taxa de mortalidade. O termo câncer de pele não- melanoma (NMSC) é relacionado a linfomas cutâneos, tumores anexiais, carcinomas de células de Merkel entre outras neoplasias cutâneas raras, mas é usado principalmente para definir carcinomas basocelulares (CBC) e carcinomas espinho celulares (CEC), pois, juntos são os que aparecerem com maior incidência. (11-14)

O CBC é o tipo mais incidente, porém o menos agressivo. Este tipo deriva das células basais da epiderme e do aparelho folicular, e é considerado de baixo grau de metastização embora tenha capacidade de invasão local e destruição tecidual. O CEC, se origina em células do epitélio pavimentoso, nos queratinócitos. O CEC é localmente agressivo e apresenta metástases para linfonodos regionais com mais frequência do que CBC, isto é prognóstico ruim visto que a sobrevivência global em dez anos foi abaixo de 20%. A causa mais comum são os efeitos cumulativos aos raios ultravioleta, embora cicatrizes, queimaduras e condições dermatológicas inflamatórias também levam ao desencadeamento do CEC. Há estudos clínicos que mostram, que infecções por vírus do papilomavírus humano (HPV) e imunodeficiência humana (HIV) podem favorecer pacientes a desenvolverem CBC e CEC. Tanto o CEC quanto o CBC se subdividem em outras linhagens.

Embora de baixa mortalidade, desde 1960 estima-se um aumento anual de 3 à 8% de incidência de câncer de pele não-melanoma em todo o mundo, e o tipo basocelular é responsável por 10% de aumento ao ano, sugerindo que a incidência deste tumor logo será igual a incidência de todos os outros tipos de cânceres combinados. Um fato histórico é que como a população alcançou uma estimativa de vida mais alta, o que explica a maior incidência de casos em pessoas com 60 anos ou mais, é possível que em menos de dez anos haverá mais da metade do aumento dos casos relatados. A exposição aos comprimentos de onda UVB, é um dos fatores que implicam em mutações genéticas levando ao câncer de pele. (12,14)

Os tratamentos mais usuais são a cirurgia a crioterapia, medicamentos tópicos, radioterapia e a terapia fotodinâmica (TFD). Tratamentos não invasivos são de primordial importância, visto que a maioria dos cânceres de pele acometem regiões que impactam a vida e bem-estar do paciente. Deste modo a TFD representa uma modalidade de tratamento que vem sendo empregada há décadas, sendo minimamente invasiva e com comprovados resultados na literatura. (14-16)

2.2 Terapia Fotodinâmica (TFD)

A terapia fotodinâmica (*photodynamic therapy*, PDT) teve “seu início” registrado em 1900, embora de uso associado historicamente desde o antigo Egito, quando Oscar Raab e seu supervisor, o Prof. Hermann von Tappeiner, observaram que culturas de *Paramecium caudatum* foram mortas depois de incubadas com laranja de acridina (um corante) e expostos à luz solar acidentalmente. Em 1903, von Tappeiner e o médico dermatologista Jesionek introduziram pela primeira vez a terapia fotodinâmica no tratamento de carcinoma basocelular utilizando o corante eosina. O termo “ação fotodinâmica” foi cunhado por Oscar Raab e desde então, esta é considerada uma modalidade alternativa e muito promissora para o tratamento de vários tipos de cânceres e também de microrganismos. (17-18)

A TFD é uma terapia baseada em fotoquímica não-térmica, na qual níveis citotóxicos de oxigênio singlete e outras espécies reativas são gerados no tecido alvo após a ativação de um agente fotoativo pela luz, usando-se um laser, diodo emissor de luz (*light emitting diod*, LEDs) ou então uma lâmpada de banda larga (600 a 900nm). Esta terapia associa três componentes que atuam simultaneamente: um agente fotossensibilizador (FS), a fonte de luz de comprimento de onda específico (que tenha potencial de ativar a ação do FS) e oxigênio molecular.

Os FS são compostos capazes de absorver a luz de um comprimento de onda específico para transformar em energia. Uma característica fundamental é sua capacidade de se acumular preferencialmente em tecido doente e, em seguida, gerar agentes citotóxicos para um induzir efeito biológico que implica na morte celular por necrose, apoptose ou autofagia, o que mostra ser uma grande vantagem visto que alguns tumores minimizam a apoptose. (5,6,17)

A molécula FS é um singleto em seu estado fundamental porque tem dois elétrons com *spins* opostos. A absorção de um fóton de luz com a energia quântica apropriada (isto é, um comprimento de onda) leva à excitação de um elétron para um orbital de alta energia (como mostrado pelo Diagrama de Jablonski, figura 1). O FS no estado excitado do singleto é muito

instável, e assim o excesso de energia é liberado como emissão de luz (fluorescência) ou produção de calor (conversão interna). Ainda o FS no estado singleto pode passar por um processo (cruzamento intersistema) para formar um estado de tripleto mais estável com *spins* paralelos. (6,18)

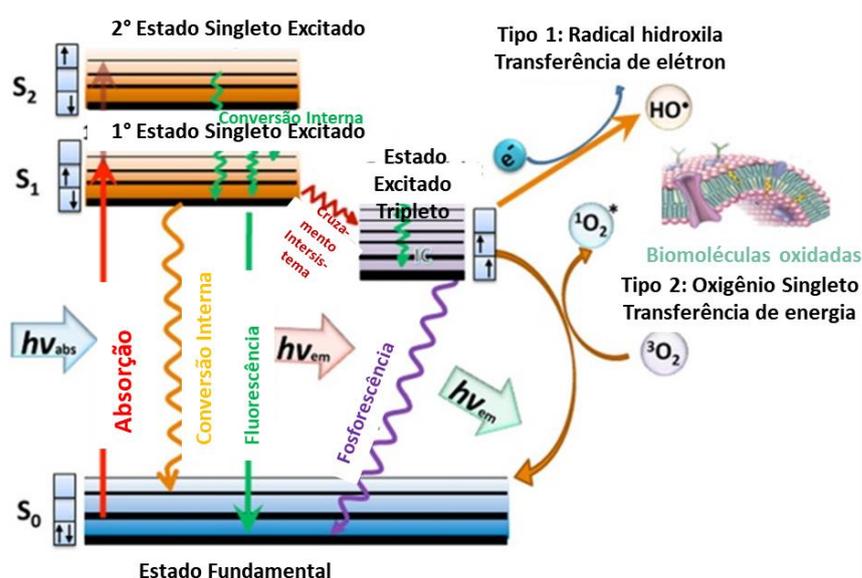


Figura 1 - Diagrama de Jablonski mostrando os mecanismos de ação do TFD através das reações do tipo I e tipo II.

Fonte: Adaptado de SILVA (18).

A interação do FS com um comprimento de onda específico pode se dar por duas vias ou reações diferentes. Nas reações do tipo I, a irradiação de luz correspondente à absorção do pico do FS e o excita, levando um elétron a ocupar um orbital de maior energia. Através de um cruzamento intersistemas, o FS excitado passa para seu estado tripleto e interage diretamente com um substrato (proteínas, lipídios, membrana citoplasmática etc) gerando radicais livres (cujo tipo depende da molécula envolvida no processo), que então reagem com oxigênio molecular resultando em reações de transferências de elétrons gerando espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS) que são citotóxicas. Logo, este processo pode envolver a aquisição ou doação de um elétron para formar o cátion radical ou ânion radical. O ânion radical pode reagir com o oxigênio para produzir o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ou a redução de um elétron de $O_2^{\cdot-}$ gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez pode sofrer outra redução de um elétron para formar os radicais hidroxila oxidantes (HO^{\cdot}).

O FS no estado tripleto pode decair de volta ao estado fundamental (emitindo um fóton fosforescente), mas este é um "processo proibido" pelas regras de seleção quântica, então o estado tripleto é muito mais estável do que o estado singleto tendo uma vida útil maior do que

comparado ao estado singlete excitado. Essa longa vida útil permite que o estado tripleto tenha tempo suficiente para transferir sua energia ao colidir com o oxigênio molecular (O_2), que é o único tripleto molecular em seu estado fundamental. Esta etapa de transferência de energia leva à formação de oxigênio singlete (1O_2) (e estado fundamental do FS), e a reação é chamada de reações tipo II. O oxigênio singlete é altamente reativo, e citotóxico e os ROS apresentam reatividade e meia-vida curta e são capazes de oxidar membranas celulares e de organelas. Este fator implica que a TFD afeta diretamente os tecidos biológicos próximos de onde as espécies reativas estão sendo geradas (aproximadamente num raio de 20 nm). A geração de ROS através das reações do tipo II é mecanicamente muito mais simples do que através do Tipo I, portanto, acredita-se que a maioria dos FS usados em tratamentos de cânceres sejam através do tipo II ao invés do mecanismo tipo I. No entanto, ambas as reações podem ocorrer simultaneamente. (6,17-19)

Segundo a Sociedade Americana do Câncer (*The American Cancer Society*), a TFD oferece uma série de vantagens em relação às terapias convencionais como radioterapia, quimioterapia e cirurgias. É uma técnica menos invasiva do que as cirurgias, com menores tempos envolvidos em sua aplicação, além de poder ser, frequentemente, realizada em ambulatorios. Diferente da radioterapia, a TFD pode ser aplicada repetida vezes no mesmo local e pode ser direcionada com mais precisão. Por necessitar apenas de uma fonte de luz e um agente FS é uma técnica economicamente mais viável. As vantagens da TFD ainda incluem ótimo resultado cosmético e campo tratamento.

Entretanto, a TFD não pode ser utilizada para tratar cânceres mais profundos, devido à limitação de penetração da luz nos tecidos e ao uso de FS que deixam os pacientes sensíveis a fotoreações por até 48 horas. A penetração da luz no tecido aumenta com o comprimento de onda, o que implica que a maioria dos FS usados em TFD para tratamentos apresentem bandas de absorbância entre 600 nm e 800 nm (como é o caso das protoporfirinas, com absorbância em 603 nm), no entanto esta janela terapêutica implica em fotossensibilidade prolongada aos pacientes. Além disso, as desvantagens do TFD incluem dor durante o tratamento, eritema, edema leve e erosões superficiais. (14,15,17,20)

A TFD tópica geralmente é bem tolerada pelos pacientes, no entanto a dor descrita como uma sensação de queimação ou dor aguda na área tratada com ALA durante a exposição à luz é o efeito colateral mais comum, e é tão intensa quanto for a área tratada e o local de aplicação, por exemplo, a face e a cabeça, o que leva a muitos pacientes, principalmente idosos, a desistirem do tratamento levando a necessidade de analgésicos ou anestésicos durante as sessões de tratamento. A literatura mostra que a combinação de lasers a outras terapias como

cirurgia, radioterapia, vitamina D, diclofenaco, 5-fluorouracil (todos para tratamentos usuais de cânceres não-melanoma) melhoram significativamente a TFD. (14-16)

2.3 Ácido Aminolevulínico (ALA)

O primeiro fotossensibilizador (FS) foi introduzido por Dougherty *et al.* que apresentou uma mistura de porfirinas solúvel em água nomeada de derivado de hematoporfirina (HpD). O HpD é o FS mais usado e conhecido em todo o mundo até hoje (atualmente conhecidos comercialmente de Photofrin® e Photogem®). No entanto, o uso de protoporfirinas leva a reconhecidas desvantagens tais como a fotossensibilidade da pele, quando aplicado topicamente, que pode durar semanas e até meses, podendo levar a reações cutâneas inflamatórias e leve fototoxicidade da pele generalizada. O ALA faz parte da segunda geração de FS junto às clorinas. Em 1990, quase 12 anos depois da apresentação do HpD, foi introduzido a molécula do ácido aminolevulínico (5-ALA) que é uma precursora endógena da protoporfirina IX figura 2 (A), e assim, desde então, muitos estudos tem-se voltado ao uso do 5-ALA figura 2 (B) em TFD. (6,21)

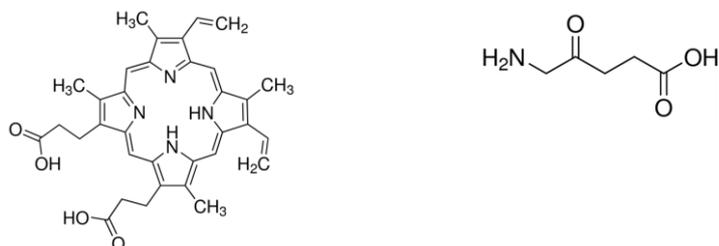


Figura 2 - Estruturas químicas da (A) protoporfirina IX e (B) ácido aminolevulínico.

Fonte: Adaptado de CERISE (21).

As porfirinas endógenas são sintetizadas na via da biossíntese da *heme* e que faz parte do grupo prostético para as proteínas *hemato*, como a hemoglobina e mioglobina, todas as quais desempenham papéis importantes nas reações de redução de oxidação e transporte de oxigênio.

O 5-ALA ou seus estéres são considerados pró-drogas que podem ser administrados intravenal, oral ou aplicados topicamente nos tecidos. Atualmente o metil aminolevulinato (MAL) e o 5-ALA são aplicados topicamente e convertidos em PpIX penetrando no estrato córneo da epiderme e sendo absorvido por células de lesões pré-Cancerígenas e glândulas sebáceas. Há produção preferencial de porfirinas fotoativas no tecido canceroso após aplicação do MAL e 5-ALA, na literatura é mostrado que há maior seletividade para o MAL devido a sua maior lipofilicidade.

A ação do 5-ALA tópico é observada após um intervalo de tempo para acúmulo e produção PpIX. Ao entrar nas mitocôndrias de células saudáveis e tumorais, acontece a transformação enzimática do ALA, via ciclo da *heme*, levando à produção de PpIX e depois da *heme*. Em alguns tumores, esse processo é perturbado e a aplicação de ALA exógeno em excesso induz ao acúmulo preferencial de PpIX que eleva o aumento da permeabilidade da queratina e a diminuição dos níveis de ferro e da atividade das enzimas ferroquelatasas nas células tumorais. A PpIX é ativada por uma fonte apropriada de luz (que pode ser no azul ou no vermelho), que deve corresponder ao pico de excitação do FS. A luz vermelha se infiltra no tecido mais profundamente e pode ser mais eficaz para lesões mais profundas. O FS libera a cadeia de reações fototóxicas, induzindo a formação de ROS e oxigênio singlete em níveis capazes de erradicar a lesão após a iluminação, levando à morte celular. A causa da morte celular ainda não é totalmente compreendida, mas a apoptose e a necrose ocorrem antes. Muitos estudos de sucesso são publicados com o uso do 5-ALA em tratamentos tópicos de cânceres de pele (5,16,22-23)

Segundo, Hunter A. G. *et al.* (2005) (24) aplicações tópicas para TFD são em média de 1,2 M. No entanto, concentrações altas pode levar a possíveis reações da molécula, onde os produtos de degradação podem reduzir significativamente as espécies reativas de oxigênio durante a TFD. Este estresse oxidativo não intencional, pode ser nocivo ao longo do tempo. O ALA é uma molécula que apresenta instabilidade química principalmente em solução aquosa e em pH fisiológico. Assim, por ser uma molécula hidrofílica, polar e por possuir baixa massa molecular, tende a não permear profundamente o extrato córneo da pele e se auto agregar em solução aquosa, originando, assim, alterações cromóforas da PpIX e diminuindo a produção de oxigênio, além de poder sofrer reações de fotobranqueamento. Além disso, em condições alcalinas o 5-ALA sofre dimerização (reação de condensação cíclica), gerando produtos de degradação como o 2,5-dicarboxietil-3,6-di-hidropirazina (DHPY), 2-6 porfobilinogênio e 2,5-dicarboxietilpirazina (PY) na presença de oxigênio.

No entanto, os benefícios do uso do 5-ALA para uso tópico e transdérmico são mais favoráveis do que desfavoráveis, e assim a tendência dos estudos científicos é minimizar o potencial de degradação, melhorando o tempo de incubação, concentração e permeabilidade, por exemplo, com estratégias de se trabalhar com pH mais baixos e até mesmo com o uso da nanotecnologia.(5,21-23,25-26)

2.4 A pele e as rotas de permeação de fármacos

A pele apresenta funções que lhe conferem grande importância para o organismo. É o maior órgão do corpo humano composta por três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme. Cada uma dessas camadas tem funções específicas como barreira de proteção imunológica e mecânica para outros tecidos, regulação da temperatura e perda de fluidos corporais. Em geral, é formada por proteínas, lipídeos e água. (27-28)

A penetração e a permeação de fármacos através da pele são influenciadas pelas propriedades estruturais do próprio órgão e das propriedades físico-químicas do fármaco de interesse. Sabe-se que a pele é uma barreira seletivamente permeável, assim, o extrato córneo, localizado nas células da epiderme, controla a permeação de componentes externos e esta afirmação faz com diferentes fármacos permeiem com diferentes fluxos de difusão (J). (27-29)

O fluxo de difusão (J) é a quantidade de fármaco permeada por unidade de área, por unidade tempo ($\mu\text{g. cm}^{-2}. \text{h}^{-1}$), a taxa é determinada pelo coeficiente de permeabilidade K_p (cm.h^{-1}) e o gradiente de concentração (ΔC) do fármaco através da pele ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), equação (1):

$$J = K_p \Delta C \quad (1)$$

Onde, K_p é uma medida combinada do coeficiente de partição (P, que representa a rapidez com que o fármaco se divide da formulação para a pele), o coeficiente de difusão (D, que mede a rapidez com que o fármaco se difunde através da pele) e o comprimento do caminho difusional (h), de acordo com a equação (2):

$$K_p = \frac{P \cdot D}{h} \quad (2)$$

Uma molécula pode permear por várias vias diferentes na pele. Na via intercelular o fármaco difunde-se pelos corneócitos e permanece na matriz lipídica; por sua vez na via transcelular a molécula passa direto dos corneócitos e da matriz lipídica transcelular e, por fim, nos apêndices da pele o fármaco é absorvido pelos folículos pilosos, glândulas sebáceas ou sudoríparas. O fluxo combinado destes caminhos determina o fluxo geral de permeação. Partículas da ordem micrometros (3 - 10) concentram-se nos folículos pilosos, menores que 3 micrometros permeiam nos folículos e extrato córneo, enquanto maiores que 10 micrometros permanecem na superfície da pele. Ativos lipofílicos tem mais facilidade de permeação do que ativos hidrofílicos, e estas características são, também, influenciadas pelo pH, tamanho, estabilidade entre outros fatores físico-químicos. (21,27,30)

Os sistemas de administração de medicamentos tópicos e transdérmicos têm mostrado vantagens significativas na prática clínica para o direcionamento do medicamento ao local de ação no corpo, reduzindo os efeitos colaterais sistêmicos. A administração de fármacos pela pele também é realizada para se obter a liberação controlada ou prolongada, além, de apresentar

vantagens em tratamentos de doenças de pele por apresentar menos efeitos colaterais, ter ação local menos invasiva e não citotóxica quando, por exemplo, comparado a medicamentos de uso intravenoso. No entanto, o estrato córneo (SC) compactado é relativamente impermeável atua como uma barreira para substâncias exógenas, o que faz com que produtos químicos hidrofílicos ou proteínas quase não podem ser entregues por sistemas transdérmicos. Este ponto, estimulou nas últimas décadas, vários estudos para aumentar as atividades transdérmicas de drogas hidrofílicas, por exemplo, através da nanotecnologia. (27-31)

2.5 Nanomedicina e sistemas de liberação controlada poliméricos em TFD

A nanomedicina é uma ciência multidisciplinar que combina o objetivo de desenvolver sistemas carreadores de fármacos com maior eficácia. Devido a ordem de tamanho nanométrica e a alta área de superfície em relação ao volume, estes nanomateriais mostram importantes diferenças nas suas propriedades bioquímicas, ópticas e eletrônicas.

Em muitos trabalhos são considerados nanopartículas materiais na dimensão entre 1 nm a 1000 nm. As nanopartículas são classificadas em nanocápsulas (uma camada de polímero, disposta ao redor de um núcleo oleoso, com o ativo dissolvido no núcleo ou adsorvido junto à parede polimérica) e nanoesferas (uma massa sólida e maciça de polímero e sem óleo na sua composição, podendo o ativo incorporado estar presente no interior ou adsorvidos às esferas). Elas são desenvolvidas em um meio específico chamado de nanoemulsão e para a formação de sistemas coloidais, estas podem ser obtidas a partir do uso de lipossomas, proteínas além de polímeros naturais ou sintéticos. Quando nanopartículas incorporam FS estas podem ser classificadas em passivas (biodegradáveis e poliméricas) não-biodegradáveis (nanopartículas de sílica, ouro, óxido de ferro, poliacrilamidas) e ativas (*quantum dots*, manganês) entre outros tipos e são desenvolvidas de acordo com aplicação e objetivo esperado. (10,32,33)

Em associação a TFD, a nanotecnologia vem para melhorar a estabilidade e permitir uma melhor seletividade dos FS nos tecidos tumorais. Ross W. Boyle e colaboradores (2008) (34) mostra que em os FS nanoencapsulados entram como uma terceira geração chamados de "*targetin photosensitizers*", onde sendo conjugado com diferentes classes de materiais (como biopolímeros, lipossomas, anticorpos, peptídeos, por exemplo) passam a possuir alvos celulares específicos otimizando a ação dos FS, além de poder melhorar a permeabilidade e por consequência o acúmulo em células alvo. (35-36)

Os primeiros estudos dentro da área de nanopartículas como carreadores de FS datam de 1991, onde uma estrutura orgânica de polialquilcianoacrilato foi conjugada ao FS

hamatoporfirina. (37) De 1990 para os dias atuais, muitos FS nanoencapsulados chegaram ao mercado como Foslip® e o Fospeg®, que carregam o Foscan® em lipossomas convencionais ou peguilados, respectivamente. O mais recente sistema aprovado (2018), pela União Europeia (EU), é um lipossoma que entrega o 5-ALA para o tratamento de carcinomas basais, chamado de AmeLuz®. (35,38-40)

Para nanopartículas poliméricas é comum o uso do polímero poli (ácido-co-ácido láctico) (PLGA). Polímeros sintéticos como o PLGA, poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA) e poli- ϵ -caprolactona (PCL) são classificados como ésteres alifáticos e possuem cadeias carbônicas hidrolisáveis. Em específico, durante a polimerização, unidades consecutivas de ácido glicólico e láctico são ligadas por ligações ésteres até produzir o PLGA, que é um poliéster alifático, amorfo e linear com temperatura de transição vítrea acima de 37°C e em ambientes biológicos, é degradado em um metabólito natural do corpo humano, apresentando, portanto, vias saudáveis de eliminação. As formas do PLGA são diferenciadas de acordo com as unidades monoméricas utilizadas, por exemplo, o PLGA 50:50 é um copolímero formado por 50% de ácido láctico e 50% ácido glicólico. (32,41-43)

O PLGA é um polímero hidrofóbico e que também possui um grupo carboxílico, que dá a cadeia polimérica, quando se dissocia em água, carga negativa. Com aprovação pelo FDA para uso em terapias humanas, o PLGA é usado em sistemas farmacológicos conhecidos, por suas propriedades físico-químicas definidas, que garantem maior reprodutibilidade do produto em cada lote do polímero, tornando-se mais seguro para o desenvolvimento de sistemas carreadores para liberação controlada de ativos, alta eficácia por suas atividades bioativa e de baixa toxicidade, embora apresente alto custo quando comparados a polímeros de origem natural como a quitosana. (43-46) Em nota, no APÊNDICE é calculado o custo de síntese em escala laboratorial, para cada sistema estudado neste trabalho.

Allison *et al.* (2004) (40) mostrou que nanopartículas amorfas de PLGA que carregavam o 5-ALA, obteve eficiência de encapsulamento de 66%, com aumento na eficácia da fototoxicidade em relação a molécula livre de ALA na mesma concentração e, portanto, apresentou relevância para estudos *in vitro* de células de carcinoma.

É comum associar o PLGA a tensoativos ou polímeros hidrofílicos por ligações covalentes ou adsorção, que se ajustem a sua superfície para modificar estas propriedades. Polímeros como o álcool polivinílico (PVA) ou polietilenoglicol (PEG), polaxâmeros, fosfolípidos e polissorbato são comumente utilizados em sínteses de nanopartículas de PLGA como revestimento das matrizes ou tensoativos.

O PVA é solúvel em água e possui uma massa molecular elevada e sendo assim, espera-se que quanto maior a concentração deste tensoativo menor seja o tamanho das nanopartículas obtidas, pois, quanto maior a concentração do tensoativo maior o número de moléculas na área superfície das gotículas emulsificadas. (47-49)

Destaca-se que O PEG é um polímero hidrofílico que favorece a formação de uma camada nas nanopartículas, e através do impedimento estérico, não permite, por exemplo, a ação destes nanomateriais com outras nanopartículas ou componentes do sangue, implicando no aumento do tempo de circulação quando estas partículas são administradas sistemicamente. Logo, tem uso promissor em diferentes tipos de nanoplateformas como partículas de ouro e poliméricas, nesta última com conjugações já conhecidas com PLGA, desde meados do início da década de 90 (50), incluindo trabalhos com nanoencapsulamento de diferentes fármacos e aplicação em terapias gênicas, para tratamento e diagnósticos de inúmeros tipos de cânceres. A associação com tensoativos não iônicos como o PVA também é conhecido e pode ser usado para melhorar a permeabilidade transdérmica. Depois dos estudos pioneiros, surgiram as primeiras formulações de nanopartículas para o uso clínico com o uso do PEG para revestimento, como por exemplo Doxil® (aprovado pelo FDA dos EUA em 1995). (51-55)

Brevemente, há dois modos bem definidos para se trabalhar com PEG em sistemas de nanopartículas. O primeiro consiste em usar blocos de copolímeros e o segundo como tensoativos. No primeiro caso, chamado de peguilação, acontece a ligação covalente com copolímeros anfifílicos, o que favorece a não dessorção das moléculas de PEG no revestimento, quando em meio biológico. No entanto, os processos de peguilação devem ser ou inclusos antes do preparo das nanopartículas ou adquiridos já adaptados a necessidade de aplicação. O segundo caso para o uso de PEG, consiste em adsorver a molécula de PEG, na superfície da nanopartícula, e embora seja menos estável que a anterior é uma estratégia que é economicamente viável e que não inclui o processo de reação química. Nos dois casos, temos nanopartículas furtivas, que podem alterar significativamente as propriedades do invólucro do polímero PLGA, como produzir um tamanho de partícula menor e neutralizar a carga superficial. (50,56-57) Para a indústria os dois processos podem ser levados em conta, para que se possa zelar por produtos finais com controle de qualidade e de produção.

Tanto o PVA quanto o PEG, estabilizam a superfície de PLGA estéricamente. Em geral polímeros hidrofílicos como o PEG ou PVA formam micelas espontaneamente e, por isso, podem substituir o uso de outros tensoativos, em sistemas de PLGA. (47-49) A figura 3 indica as fórmulas estruturais do PLGA, PVA e PEG.

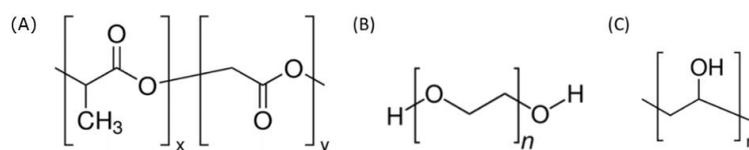


Figura 3 - Fórmulas estruturais (A) PLGA, (B) PEG e (C) PVA.

Fonte: Adaptado de SIGMA ALDRISH (71).

Finalmente, relatos na literatura destacam que os usos tópicos de nanoemulsões medicamentosas são indicados para vários tratamentos de doenças de pele por apresentar menos efeitos colaterais, ter ação local menos invasiva e não citotóxica quando, por exemplo, comparado a medicamentos de uso intravenoso. Na figura 4 mostra-se que ativos hidrofílicos (A), ficam na camada superior da pele, enquanto lipossomas conjugados com polímeros (C) apresentam maior permeabilidade do que quando comparados a apenas lipossomas nanoestruturados sem conjugação (B), reforçando o fato de que o desenvolvimento de nanopartículas podem aumentar a permeação destas na pele, mostrando as rotas de permeação tópica e transdérmica.

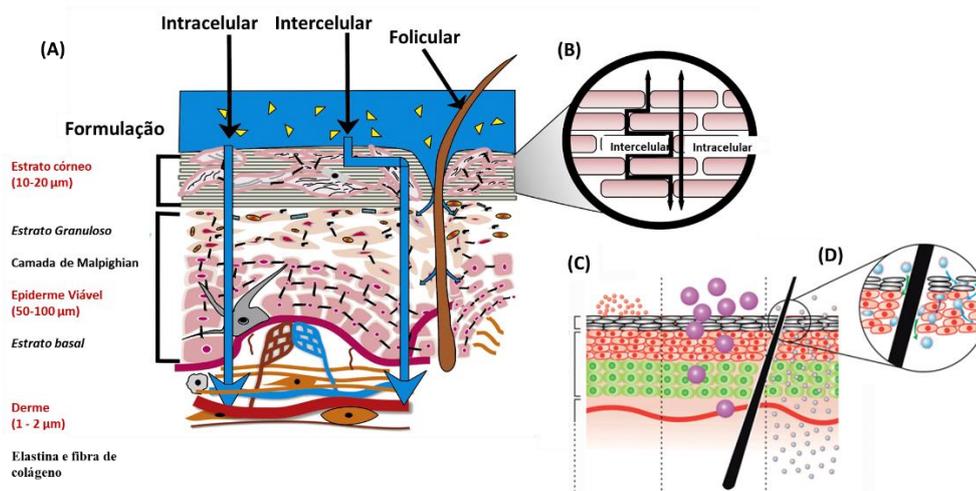


Figura 4 - Diagrama das (A) vias de permeação tópica e transdérmica junto com sua diferenciação nas vias principais que são intercelulares e nas vias intercelulares que estão representadas em (B) em comparação ao esquema de permeação (C) representando, sequencialmente, a retenção de fármacos hidrofílicos, lipossomas convencionais carregados com fármaco e vesículas lipídicas conjugadas com polímeros, (D) com destaque para a permeabilidade intra e intercelular dos lipossomas conjugados aos polímeros.

Fonte: Adaptado de ALEXANDER *et al.* (58) e WANG *et al.* (31).

Deste modo, esta tese está dividida em quatro etapas principais:

Capítulo 3 (Pesquisa, desenvolvimento e inovação): O principal objetivo desta etapa foi realizar os testes preliminares para os protocolos promissores e de inovação, para o desenvolvimento de uma nova metodologia para a obtenção de um nanossistema polimérico para o uso em terapia fotodinâmica com base em regulamentações de materiais para uso clínico e

farmacêutico, nas legislações dos órgãos regulamentadores como ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e FDA (Food and Drug Administration). Para tanto, foram testados diferentes tipos de variações quanto ao tipo de emulsão a ser testada, definições de velocidades de agitação das fases aquosas, poliméricas e para obtenção das nanopartículas, bem como definições importantes acerca do tipo de matriz polimérica, tensoativos e solventes para serem utilizados.

Capítulo 4 (Sistemas de nanopartículas potenciais): Esta etapa teve por objetivo padronizar os sistemas de nanopartículas poliméricas promissores para o uso em terapia fotodinâmica. Os sistemas descritos são sistemas que nos permitem analisar a cooperação de cada componente (tensoativo, matriz polimérica e ativo), bem como comparar a estabilidade entre sistema descrito na literatura e sistemas desenvolvidos para este trabalho. Para tanto as caracterização físico-química dos nanosistemas poliméricos através das análises de: tamanho hidrodinâmico e polidispersão (por espalhamento de luz dinâmico - DLS), carga superficial (mobilidade eletroforética), pH, viscosidade, densidade, condutividade, ângulo de contato e energia de superfície; com investigações ao longo do tempo de estabilidade em diferentes condições, e caracterizações de superfície por técnicas Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-vis), Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA), Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR), Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), com aplicação de um método de visualização para a escolha do melhor sistema estudado, foram realizados nesta etapa.

Capítulo 5 (Caracterizações finais de morfologia, decomposição térmica, eficiência de encapsulação, análises *in vitro* de liberação e permeação). Embasado nos testes anteriores e mantendo o objetivo do trabalho, este capítulo finda o protocolo de nanopartículas visando os testes finais *in vitro* para aplicação em Terapia Fotodinâmica para um sistema final, caracterizando-o quanto a formação (em complemento as análises anteriores), morfologia, através de técnicas como microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de varredura por *Field Emission Gun* (MEV-FEG), formação e análises térmicas (TGA e DSC), além das avaliações do perfil de permeação *in vitro* das nanopartículas através do método de células de Franz (com o uso de membranas sintéticas), liberação por membrana de diálise e eficiência de encapsulação, com base na derivatização do 5-ALA seguida da quantificação por espectroscopia de fluorescência.

Capítulo 6 Por fim, foi estudado a eficácia do sistema de nanopartículas para o uso em terapia fotodinâmica, a partir dos estudos com células tumorais (A-431 - carcinoma epidermóide humano) e saudáveis (HDFn -fibroblasto dérmico neonatal humano). Foram

testadas quatro doses de luz, além, de serem estudados a toxicidade dos polímeros, tensoativo e ativo envolvidos no desenvolvimento das sínteses, nanopartículas com e sem ativo e produção de protoporfirina IX por espectroscopia de fluorescência, para o 5-ALA livre e os sistemas com que carrearam o pró-fármaco.

Espera-se com este trabalho contribuir para a área de nanotecnologia aplicada em TFD, através do uso de nanopartículas de PLGA para encapsular o pró-fármaco, 5-ALA.

3 ETAPA 1 - PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO (P&D&I)”

3.1 Materiais e métodos

3.1.1 Materiais

Os reagentes para os estudos de desenvolvimento foram adquiridos como grau analítico, e a água ultra pura Milli-Q, com resistividade de 18,1 Ω , foi utilizada para o preparo de todas as soluções. Foram utilizados os seguintes reagentes: acetona, álcool etílico absoluto, diclorometano e lauril sulfato de sódio 90% (LabSynth, Diadema-SP, Brasil). Álcool polivinílico (PVA, grau de hidrólise de 80,5 - 89,5%) (Vetec Química -Sigma-Aldrich, Duque de Caixias-RJ, Brasil) e cloridrato de ácido aminolevulínico 95% (5-ALA) (PDT Pharma, Cravinhos-SP, Brasil). Cloridrato de ácido aminolevulínico 99% (5-ALA), poli (D, L-ácido láctico-co-glicólico) (50:50) (código:P2191) (Mw=30000-60000 g/mol); dextran de *Leuconostoc spp.* (Mr 450,000-650,000), Kolliphor P188, Span 20 e Tween 80 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha). Kollisolv® PEG400 (polietileno glicol 400, Mw 380-420 g/mol) (Fluka Analytical -Sigma-Aldrich, St. Gallen, Suíça).

3.1.2 Métodos

O trabalho de desenvolvimento dos sistemas de nanopartículas foi realizado nas dependências do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), da empresa Nanomed - Inovação em Nanotecnologia, em parceria científica, segundo as normas e critério de qualidade da mesma. Nesta etapa, o trabalho foi, também, supervisionado pela CEO (*Chief Executive Officer*) Dr^a Amanda Luizetto dos Santos.

Sistemas de nanopartículas

Os sistemas foram avaliados da literatura específica, seguindo de alguns critérios de classificação tais como: classificação dos reagentes e matérias primas; definição do biopolímero para as sínteses; metodologias com rotas de obtenção simples visando o futuro escalonamento industrial; metodologias para a obtenção de sistemas para o nanoencapsulamento de moléculas hidrofílicas, tamanho de partícula e carga, e análises específicas para a ajuda na escolha das melhores metodologias.

Inicialmente, as sínteses foram embasadas nas referências Shil L. *et al.* (59), Shaker M.N. *et al.* (60) e Silva G.R. (61) passando por modificações (embasadas em rotas sintéticas para nanopartículas de PLGA (42)) até se encontrar o sistema mais estável e coerente com os tamanhos e cargas propostas para fins deste estudo. No preparo dos sistemas de nanopartículas, foram avaliadas diferentes fases tensoativas (ou fase estabilizante), velocidade de agitação, temperaturas de obtenção das emulsões, métodos de obtenção de síntese (simples ou dupla emulsão) e estão resumidos na tabela 1:

Tabela 1 - Variações testadas para o desenvolvimento das sínteses.

Tipos de variação	Variável aplicada
Emulsão	Simples e dupla (seguida da evaporação do solvente orgânico)
Polímeros	PCL (de baixa massa molecular), PLGA (50:50)
Solventes orgânicos	Acetona, diclorometano, etanol
Fase aquosa	Água ultrapura, tampão fosfato salino (PBS)
Tensoativos	Álcool polivinílico (PVA), Kolliphor (polietileno glicol 400), Dextran, polissorbatos (Tween 80 e Span 80), lauril sulfato de sódio (SDS) (podendo haver associação destes)
Velocidades de agitação da fase	Gotejamento (fase interna); Alta-Homogeneização (Ultra Turrax®): 2500, 3000, 10.000 rpm (fase interna ou externa); Homogeneização (agitador magnético): 750, 1500 rmp (fase interna ou externa)
Temperatura de obtenção de síntese	0-4°C (banho de gelo) ou 25°C (temperatura ambiente)
Fase do ativo	Interna ou externa

Fonte: Elaborada pela autora.

Todas as nanoemulsões foram obtidas, inicialmente, com volume final (depois de rotaevaporado o solvente orgânico) de (30,0±0,1) mL e padronizadas para serem obtidas em béquer de 50 mL (forma baixa, para agitações magnéticas) ou 100 mL (forma alta, para agitações no Turrax®). A massa do ativo 5-ALA foi padronizada para 6 mg para todos os testes. Deste modo, as sínteses de PLGA, após os ajustes, foram produzidas de acordo com as rotas de obtenção, resumidas na figura 5. As sínteses produzidas são descritas na Etapa 2 do desenvolvimento.

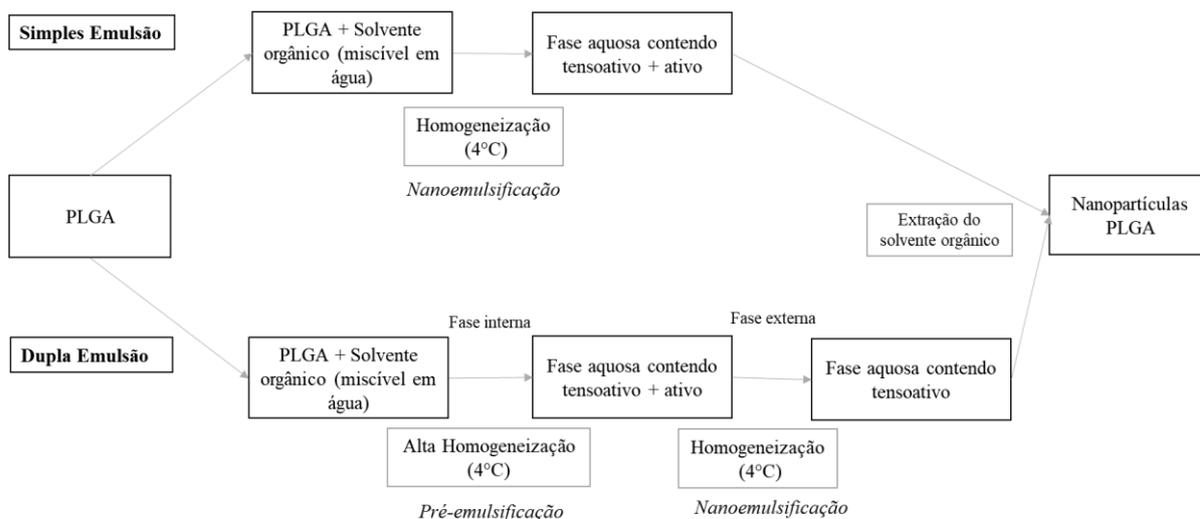


Figura 5 - Representação dos protocolos seguidos para o desenvolvimento dos sistemas de nanopartículas com ativo, para diferentes rotas de dupla e simples emulsão.

Fonte: Adaptado de KUMARI *et al.* (42).

Definição do solvente da fase orgânica

Este estudo, busca aprimorar técnicas para o uso de biopolímeros e solventes menos tóxicos, para que se obtenha sínteses com o máximo de desempenho, distribuição mais estreita de tamanho das partículas e menos toxicidade. (62) Esta fase do estudo foi delineada com base na referência de Pazzini, C.E (63).

A escolha do solvente orgânico para solubilização do polímero poli (D, L-ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (50:50) para o uso em sistemas de nanopartículas foi realizado em vários artigos da literatura específica, com busca específica de sistemas de liberação controlada do 5-ALA (59,60), visando a diferença de polaridade com a fase aquosa (64) para uma que ocorra a difusão do solvente orgânico mais rapidamente (65), e foi embasado na classificação dos solventes residuais por classe de risco, documento número 467 da Farmacopeia Americana (do inglês, *United States Pharmacopeia, USP*) (66), utilizado mundialmente, incluindo a Organização Mundial de Saúde (OMS).

Segunda a Farmacopeia Americana, os solventes podem ser classificados em três grandes classes em relação a sua toxicidade, dependentes da concentração por dia, em relação a cada solvente:

- Classe 1: Solventes residuais a serem evitados. Oferecem perigos ambientais e são carcinogênicos humanos conhecidos ou altamente suspeitos.
- Classe 2: Solventes residuais a serem limitados. São carcinógenos animais não genotóxicos ou possíveis agentes causadores de outra toxicidade irreversível

(exemplo, neurotoxicidade) e são solventes suspeitos de outras toxicidades significativas, mas reversíveis.

- Classe 3: Solventes com baixo potencial tóxico para o ser humano de menor risco para a saúde humana do que os solventes residuais das Classes 1 e 2.

Assim, observou-se as características físicas do polímero antes do teste de solubilidade (tais como, forma, maleabilidade, odor e cor), colocando-se em béqueres, previamente identificados, o volume a ser usado de cada solvente de interesse, juntamente com a massa do PLGA necessária para se manter a concentração do polímero nas sínteses, como indicado na tabela 2. Nesta etapa, vedou-se os béqueres com papel alumínio para evitar evaporação ou queda de impurezas do ambiente nas soluções, onde os mesmos foram deixados em repouso, por 30 minutos, à temperatura de 22°C. Decorrido o tempo indicado, analisamos se o *pellet*: foi dissolvido totalmente (não havia vestígios visuais do *pellet* na solução), dissolvido parcialmente (havia vestígios visuais do *pellet* na solução) ou não dissolvido (permaneceu inerte na solução). Os solventes foram classificados, segundo a sua polaridade em relação a água e a classificação de solventes residuais, segundo a U.S. *Pharmacopeia* (USP).

Tabela 2 - Descrição das massas de PLGA (50:50), utilizadas na determinação da solubilidade do polímero nos solventes de escolha.

Solvente volume: (2,0±0,1) mL	Massa PLGA (50:50) (±0,0003) g
acetona	0,0094
diclorometano	0,0081
etanol	0,0081

Fonte: Elaborada pela autora.

Avaliação de estabilidade físico-química para os sistemas

Após a síntese, as amostras foram mantidas em 4° ou 25°C, e avaliadas quanto ao potencial de sistemas físico-quimicamente estáveis. Para a avaliação da estabilidade, o raio hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta (ζ) e pH eram rotaevaporadas e posteriormente mantidas em repouso, em frascos semiabertos ao abrigo da luz, para que não houvesse a influência de solvente residual nas medidas e nem o efeito Browniano das partículas. Por um critério de Gerencia de Qualidade, as medidas subsequentes (por exemplo, 2, 7 ou 30 dias) eram avaliadas de acordo com alguns critérios, por exemplo, se houvesse a separação visual de fases, presença de corpos de fundo e mudança de coloração, as amostras eram imediatamente descartadas. Na ausência de mudanças organolépticas, a estabilidade dos nanosistemas, a avaliação das medidas físico-químicas era realizada. Nesta etapa, mudanças de até 20% em relação as medidas iniciais eram consideradas, acima dessa mudança percentual eram descartadas. A porcentagem foi determinada após o acompanhamento das medidas dos

primeiros sistemas ao atingir ao menos 15 dias de reprodutibilidade nas medidas físico-químicas. Aquelas sínteses que passassem dos critérios iniciais, foram preparadas para avaliação na Etapa 2. Assim, as amostras foram acompanhadas quanto a variação de pH, potencial Zeta e tamanho, com 1, 7, 15 e 20 dias (ou até que notado a desestabilização do sistema, de no máximo 40 dias), amostras com ao menos 15 dias de estabilidade foram realizadas em triplicatas antes de serem escalonadas para a Etapa 2.

Determinação do pH ao longo do tempo

Esta medida avalia principalmente a estabilidade dos componentes, a eficácia e segurança da formulação utilizada, além de ser uma medida direta para ser associado as medidas de potencial Zeta. (67,68) As amostras foram acompanhadas, medindo-se o pH, através de um phmetro potenciométrico digital de bancada (GEHAKA), com prévia calibração (pH 3,7 e 9), à temperatura de 4° ou 25°C, nos dias citados.

Determinação do diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão por DLS

O espalhamento de luz dinâmico (do inglês, *Dynamic Light Scattering* (DLS)) é também conhecida como Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS). Basicamente, a técnica mede o movimento browniano e relaciona este fato ao tamanho hidrodinâmico das partículas. A análise cumulativa fornece dois valores, um valor médio para o tamanho e um parâmetro de largura conhecido como Polidispersidade ou o Índice de Polidispersão (PDI). O equipamento incide um laser nas partículas de modo que se analisa as flutuações de intensidade na luz dispersa (68).

As análises de tamanho e polidispersão foram realizadas utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano ZS90. As amostras de nanopartículas sem e com ativo foram diluídas em água deionizada na proporção de (1:10), (1:100) e (1:1000) (volume de solução de nanopartículas/volume de água), sendo as leituras padronizadas para a segunda proporção citada, em água deionizada, homogeneizadas e analisadas em sequência. Para as medidas de distribuição de tamanho e índice de polidispersão (do inglês, *polydispersity index* -PDI), foi utilizada uma cubeta de acrílico, sem a presença de bolhas, devidamente tampada, utilizando-se a capa térmica disponível no equipamento, realizadas com ângulo de espalhamento de 173°, à temperatura de 25°C. O índice de refração do PLGA utilizado foi de 1,460 e absorção 0,00. (69) Os erros das medidas foram determinados pelo desvio padrão das análises em quintuplicata.

Determinação da carga superficial das partículas por mobilidade eletroforética

Em geral, partículas em solução são formadas por uma dupla camada elétrica. As partículas são circundadas por contra-íons (íons de carga oposta à da partícula) que aumentam a concentração próximo a superfície quando em contato íons na região interfacial circundante. Esta dupla camada é formada por duas partes: uma região interna, chamada de camada *Stern*, onde os íons estão fortemente ligados e uma região externa difusa, onde estão menos firmemente ligados. Quando há a diferença potencial elétrico (d.d.p.) nestas duas camadas, íons da camada *Stern* se movem juntos, enquanto os íons da camada difusa, alguns se movem juntos e outros não. O potencial elétrico neste plano de separação ou deslizamento formado entre os íons que se movem ou não juntos é chamado de potencial Zeta. O potencial Zeta é uma medida de mobilidade eletroforética de partículas em solução. A magnitude da medida do potencial Zeta é um indicativo de estabilidade de emulsões. (68)

A carga dos sistemas foi determinada utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano ZS90, com leitura em uma célula capilar DTS 1070 de acrílico com dois eletrodos e com as extremidades fechadas no momento da análise, sem a presença de bolhas e realizada à temperatura de 25°C. As amostras de nanopartículas sem e com ativo foram diluídas em água deionizada na proporção de (1:10), (1:100) e (1:1000) (volume de solução de nanopartículas/volume de água) sendo as leituras padronizadas para a segunda proporção citada, em água deionizada, homogeneizadas e analisadas em sequência. Os erros das medidas foram determinados pelo desvio padrão das análises em quintuplicata.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Definição do solvente da fase orgânica

A escolha do sistema ternário solvente orgânico/polímero/não-solvente (ou solvente que não solubiliza o polímero, neste trabalho, a água) deve ser eficaz quimicamente para que haja um bom desenvolvimento na obtenção de nanopartículas poliméricas. (70)

A caracterização organoléptica do PLGA (50:50) foi realizada, para que fosse observado a diferença do material quando colocado em solução com cada solvente em estudo. Deste modo, o PLGA foi caracterizado como *pellets* retangulares não uniformes, de coloração âmbar, com leve transparência (quando visto através da luz), de rigidez não-maleável e sem odor.

Nas condições de interesse do estudo, o álcool etílico não solubilizou o polímero, estando este depositado no fundo do béquer sem nenhum tipo de alteração visual nos *pellets*. Por outro lado, o PLGA apresentou total solubilidade em acetona e diclorometano, estando as soluções translúcidas, à temperatura ambiente e sem agitação, como reportado da literatura. (59,60) A tabela 3 indica as características físico-químicas (densidade, viscosidade e polaridade) dos solventes orgânicos e a resposta da solubilidade polimérica nestes solventes, classificando-os em relação a *U.S. Pharmacopeia 467*, onde a principal diferença entre os solventes se dá quanto a sua polaridade.

Tabela 3 - Classificação dos solventes orgânicos em relação a densidade (71), viscosidade (71), polaridade (64) classificação de solventes residuais (toxicidade) (66) e solubilidade do PLGA (50:50) em relação aos solventes.

Solvente	Densidade relativa (g.cm³)	Viscosidade (cP, 20°C)	Polaridade relativa¹	Classificação de solventes residuais	Solubilidade PLGA (50:50)
Água	1,0000	1,00	1,000	-	Não solúvel
Etanol	0,7890	1,17	0,654	Classe 2	Não Solúvel
Acetona	0,7910	0,32	0,355	Classe 3	Totalmente
Diclorometano	1,3250	0,45	0,309	Classe 1	Totalmente

Fonte: Elaborada pela autora.

Tanto a acetona quanto o diclorometano podem ser um bom solvente para o PLGA (50:50) no entanto, neste trabalho optou-se pelo uso da acetona por este ser um solvente residual de classe 3, segundo a *USP*. A interação solvente-polímero é um parâmetro que foi introduzido por Flory-Huggins (72) para se explicar o efeito do solvente orgânico no tamanho das nanopartículas formadas. A acetona é um solvente orgânico polar, miscível com a água, que forma a outra fase do sistema. Solventes polares são indicados para a formação de nanopartículas com uma faixa de diâmetros menores, pois, são capazes de promover a difusão para a fase aquosa mais rapidamente do que quando comparados a solventes com menor polaridade, como o diclorometano. A difusão lenta do solvente na fase aquosa retarda a precipitação do polímero, levando à formação de partículas maiores. Além destes fatores citados, o rendimento na produção de nanopartículas pode ser atrelado ao fato que aumentando a polaridade do solvente polimérico e diminuindo a concentração do polímero nesta fase, pode-se aumentar o rendimento das nanopartículas e também diminuir a área superficial das mesmas. Em outros trabalhos da literatura (72), por exemplo, o uso da acetona como solvente do PLGA (50:50), seguido da sua evaporação, resultou em partículas (sem ativos² encapsulados) de

¹ Os valores de polaridade relativa são normalizados a partir das medições dos espectros de absorção de cada solvente (64).

² Neste texto, ativo é sinônimo do pró-fármaco 5-ALA.

tamanhos médios de (312 ± 23) nm, dentro da faixa esperada no nosso delineamento experimental. (70,73)

Embora seja classe 3 de risco, a maior desvantagem no uso da acetona é que ela deve ser evaporada devido a sua toxicidade, mas apresenta um baixo ponto de ebulição (56°C) o que facilita a sua extração da síntese. A extração foi padronizada para todos os testes e sínteses, através do uso de um rotaevaporador, padronizando-se tempo, aquecimento do banho, rotação e pressão. Em tempo, a escolha da matriz polimérica é justificada na seção de “2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA”. (70,73)

3.3.2 Avaliação da estabilidade físico-química para os sistemas

Sabe-se que a hidrofiliidade de muitos medicamentos como o 5-ALA, é uma característica positiva da molécula por incluir uma maior absorção e biodisponibilidade, e já foi demonstrado em consideráveis pesquisas, que sistemas de liberação controlada aumentam a eficácia terapêutica, por ter potencial para um direcionamento preciso, junto a liberação sustentada. No entanto, fármacos que são altamente polares e, portanto, apresentam total solubilidade em água, podem levar a uma fraca interação de cargas com polímeros e assim, tornar o desenvolvimento de sistemas de micro ou nanopartículas um grande desafio. O segundo desafio é obter nanopartículas entre 200 nm e 600 nm de diâmetro para se obter a permeação transdérmica destas nanopartículas (44,74). Neste contexto, é válido destacar que a variação de vários parâmetros (não concomitantes, e seguindo uma rota de obtenção, figura 5), como os apresentados neste texto, acaba sendo um trabalho a parte no desenvolvimento e inovação de sistemas estáveis.

O desenvolvimento deste trabalho se embasou, inicialmente, em sistemas formados pelo método da dupla emulsão, seguida da evaporação do solvente orgânico, e depois pelo método da simples emulsão. Embora os métodos de simples e dupla emulsão seguida da evaporação do solvente sejam comuns para encapsular ativos hidrofóbicos, estes métodos podem favorecer a interação do ativo com a matriz polimérica, também influenciado pela escolha do tensoativo, propondo-se então bons sistemas para a encapsulação de ativos hidrofílicos (75). Além, disso estes métodos são mais simples de obtenção o que pode facilitar no método de escalonamento industrial futuramente, embora isto ainda deva ser investigado. No APÊNDICE encontra-se alguns dados relevantes para tamanho das nanopartículas, reportadas da literatura para as sínteses utilizadas para as rotas sintéticas deste estudo.

Em geral, as sínteses com ativo eram mais opacas que as sínteses sem ativo, apresentando-se macroscopicamente em uma única fase, no entanto a maioria das sínteses apresentava residual polimérico (notado tanto na haste do Turrax®, quanto nos ímãs para agitação magnética), figura 6. A formação do residual polimérico era observado quando a fase tensoativa era vertida na solução de polímero e acetona. Em virtude disso, a ordem de se verter as fases também foi testada, mas ainda assim havia aparente sobra polimérica, que era extraída depois do processo de rotaevaporação.

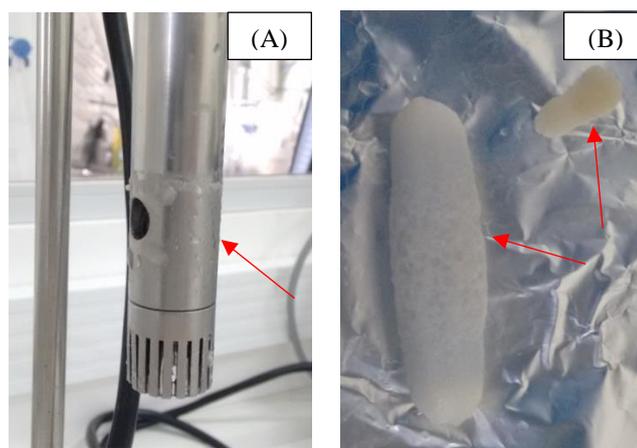


Figura 6 - Residual polimérico (A) haste do Turrax® e (B) ímã magnético.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao longo do tempo, alguns sistemas apresentavam corpo de fundo densos e brancos, indicando a desestabilização da emulsão. Os sistemas com a fase tensoativa formada apenas pelo polietilenoglicol (PEG400), eram transparentes e foi observado uma possível sobra polimérica, indicando baixo rendimento de partículas, no término da agitação dos sistemas. A tabela 4 indica os testes realizados, sem as replicatas, para as sínteses com ativo (para cada teste que formava emulsões estáveis, também, foi realizado a síntese sem ativo).

Tabela 4 - Testes realizados para obtenção das sínteses.

Nº teste	Tipo de emulsão	Tensoativo (fase interna/fase externa)	Agitação (fase interna/fase externa)	Temp. Síntese (°C)	Temp. análise (°C)	Tempo estabilidade (dias)
1	Dupla	PVA (f.e.)	750/750	4	25	n.f. ³
2	Dupla	PVA (f.e.)	0,4 mL.min ⁻¹ / 3000	25	25	5
3	Dupla	PVA (f.e.)	0,4 mL.min ⁻¹ / 3000	25	25	3
4	Dupla	PVA (f.e.)	750/2800	25	25	n.f.
5	Simples	Dextran	1500	25	25	n.f.
6	Dupla	PVA (f.e.)	750/2800	4	4/25	14
7	Dupla	PVA (f.e.)	1500/2800	4	4/25	2
8	Dupla	PVA (f.e.)	750/3000	4	4/25	23
9	Dupla	Tween80/Span 20	1500/2800	25	25	n.f.
10	Dupla	PVA (f.e.)	3000/600	4	25	n.f.
11	Simples	SDS	1500	4	4/25	20
12	Dupla	SDS	1500	4	4/25	21
13	Dupla	P188	1500	4	25	n.f.
14	Simples	P188	750/6000	4	25	n.f.
15	Dupla	PVA (f.e.)	1500/10000	4	4/25	n.f.
16	Simples	PEG400	1500	4	4/25	25
17	Simples	PEG400 e PVA	1500	4	25	25
18	Dupla	PEG400(f.i.) e PVA (f.e.)	1500/3000	4	4/25	n.f.
19	Dupla	PEG40 (f.e.) e PVA (f.i.)	1500/3000	4	4/25	23
20	Simples	PVA	1500	4	4/25	22

Fonte: Elaborada pela autora.

A primeira matriz polimérica escolhida foi o poliéster biodegradável policaprolactona (PCL) (teste 1), com solubilização em acetona e fase tensoativa PVA. Nas condições de estudo, não foi formado emulsão observando-se uma solução translúcida e com sobras corpos brancos dispersos na solução, indicando, uma possível interação entre o ativo e os polímeros. Assim, os testes subsequentes foram realizados com o PLGA (50:50) de acordo com os critérios discutidos anteriormente. Após a escolha do PLGA, realizou-se os testes para a determinação escolha do solvente orgânico descrito em “0 3.3.1 Definição do solvente da fase orgânica” e os testes embasados na literatura foram realizados apenas com a acetona como solvente orgânico.

Para os sistemas do tipo *salting-out* (testes 2 e 3), a fase que continha o tensoativo PVA era formada com tampão fosfato-salino (PBS), e a solubilização polimérica formada por uma mistura de acetona e etanol (60), não formando emulsão. Neste método, o agente considerado como *salting-out*, o tampão PBS (formado por cloreto de sódio (NaCl), fosfato de sódio (Na₂HPO₄), fosfato de sódio monobásico (Na₂HPO₄ + H₂O); (85/11/4) (massa/massa/massa)), afeta a incorporação do 5-ALA, favorecendo a precipitação das partículas recém formadas (48). Além disso, o gotejamento da fase aquosa, contendo o

³ n.f.= não formou

tensoativo (PVA), apresentou-se como um método demorado e de difícil controle já em escala laboratorial, produzindo sistemas com a desestabilização rápida (cerca de 1 à 3 dias), observada pela separação de fases ao longo de do tempo, o que pode ser justificado, também, por uma homogeneização não eficaz das fases. A partir destes testes, fez-se o ajuste para a obtenção dos outros sistemas de nanopartículas, optando-se por trabalhar com água para a incorporação do ativo e do tensoativo, e fazendo os ajustes de velocidade nas agitações magnéticas e mecânicas.

Há uma série comum de tensoativos usados para estabilizar sistemas poliméricos, como polímeros tensoativos não-iônicos (PVA, polietileno glicol 400) e anfifílico (dextran); polissorbatos não-iônicos (Tween 80, Span 20, Kolliphor 188) e detergente aniônico (dodecil sulfato de sódio, SDS). A presença de tensoativos não influenciam na formação dos nanosistemas, mas no tamanho das nanopartículas, de acordo com sua concentração e natureza química, além de preservar a estabilidade das emulsões, evitando por exemplo, a separação de fases (76,77).

Em comparação com os tensoativos não-iônicos, as micelas de SDS são relativamente difíceis de formar por causa da repulsão eletrostática entre os grupos iônicos. Enquanto a concentração micelar crítica (CMC) para tensoativos iônicos é da ordem de 1 mM, a CMC típica para a maioria dos tensoativos não-iônicos é da ordem de 0,01 mM. Isto implica que um tensoativo iônico abaixo da CMC, sofreria repulsão eletrostática, levando a formação de partículas com tamanhos maiores. Além deste fator, aumentar a concentração destes tensoativos pode levar ao aumento da viscosidade da fase aquosa e deste modo, não favorecer a difusão do solvente orgânico, o aumento do CMC com uso de diferentes tensoativos, por exemplo, de 0,25 mM (PVA) para 8 mM (SDS) podem, também, favorecer o aumento do diâmetro das partículas (72). E por fim, apesar do SDS ter estabilizado a emulsão, este é um dos tensoativos considerados mais irritantes quanto ao uso em produtos para a pele (78) e assim, a escolha final dos tensoativos, foram o PVA e PEG400, levando-se em consideração o tempo e estabilidade dos sistemas, tamanho, carga e pH.

Ainda na tabela 4, observa-se que para a síntese realizada à temperatura ambiente (teste 4) com o tensoativo PVA, não houve a formação de emulsão. A mistura separava fase, com presença de corpo de fundo sólido e branco, e uma outra totalmente translúcida. Em outros casos (testes 2 e 3), mesmo com a formação da emulsão, a estabilidade do sistema foi inferior a sete dias. A separação de fase foi associada a temperatura de manufatura dos sistemas, que pode favorecer a separação do tensoativo da fase aquosa. (72)

Para resolver este problema, através da revisão bibliográfica, foi reportado que o PVA, é amplamente utilizado para a formação de biofilmes, hidrogéis e nanocompósitos. É relatado

que as características para a formação destes dispositivos e compósitos são influenciadas diretamente por sua massa molecular, concentração, pH e temperatura. Uma das estratégias de sínteses de biofilmes, por exemplo, é realizar a mesma, à baixas temperaturas (por exemplo, -20°C) o que leva a gelificação mais eficaz do material, melhorando a carga superficial, e por consequência a qualidade do mesmo. (79) Deste modo, foram realizados os testes para se trabalhar a baixas temperaturas (0°C), no momento das sínteses das nanopartículas, como estratégia para a ionização dos sistemas). A mudança de temperatura de obtenção de síntese foi um dos parâmetros mais significativos para o trabalho.

No APÊNDICE é apresentado os gráficos para análises de diâmetro, PDI, potencial Zeta e pH dos testes 8, 16, 17, 19 e 20 apresentados. A tabela 5 apresenta os principais resultados, para os sistemas estáveis, em volume final de 30 mL, destacando a influência da agitação das fases para as duplas emulsões (com o tensoativo PVA na fase aquosa externa), a influência dos tensoativos (PVA, PEG400, PVA-PEG400) e do ativo nas nanoemulsões testadas.

Tabela 5 - Principais resultados para os testes iniciais de estabilidade, mostrando a influência de parâmetros de agitação, tipo de emulsão, tensoativo e a presença ou não do ativo. Todos os dados foram analisados a 23°C e são indicados os valores para as (a) sínteses sem ativo e (b) com ativo.

Agitação (rpm)/tensoativo	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	P.D.I. (u.a.)	Potencial Zeta (mV)	pH (u.a.) (±0,01)
750/PVA				
(a) sem ativo	290,4±1,2	0,212±0,014	-5,49±0,62	4,91
(b) com ativo	250,0±8,4	0,212±0,114	-10,6±0,28	4,07
1500/PVA				
(a) sem ativo	158,8±1,2	0,174±0,012	-9,94±4,37	5,46
(b) com ativo	502,5±9,9	0,177±0,016	-13,51±3,51	4,27
3000/PVA				
(a) sem ativo	227,4±1,5	0,080±0,020	-5,93±0,01	5,05
(b) com ativo	372,5±3,4	0,614±0,120	-5,78±2,27	4,02
1500/PEG				
(a) sem ativo	90,3±24,7	0,058±0,031	-39,1±11,0	3,60
(b) com ativo	256,3±79,7	0,096±0,023	-36,1±5,35	3,52
1500/PEG-PVA				
(a) sem ativo	148,8±1,5	0,107±0,012	-6,65±1,41	4,9
(b) com ativo	413,9±3,4	0,203±0,024	-2,77±0,24	3,7

Fonte: Elaborada pela autora.

Na tabela 5, observa-se que as nanopartículas sem ativo apresentaram diâmetro médio maior para as velocidades de 750, 3000 e 1500 rpm, enquanto que para as nanopartículas com ativo o maior diâmetro foi para 1500, 3000 e 750 rpm, respectivamente. As condições de adição da fase orgânica à aquosa, ou vice-versa, a taxa de agitação da fase aquosa e da fase orgânica, são parâmetros que influenciam na formação de soluções de nanopartículas poliméricas (59,77).

Os resultados demonstraram que as partículas formadas pelo tensoativo PVA, tiveram tamanhos entre 158 nm e 227 nm para as nanopartículas sem ativo e de 250 nm a 502 nm, para as nanopartículas com ativo. Assim, observa-se que, as velocidades de agitação entre 700 e 1500 rpm influenciam na tensão de cisalhamento e a emulsificação em 3000 rpm não ajuda a reduzir o tamanho das partículas, isto pode se dar, pelo fato da baixa concentração do ativo, o que é chamado de efeito Ouzo. (72) Nesta etapa, obteve-se melhores resultados com a agitação com vórtex (em agitação magnética) para as simples emulsões e agitação mecânica (Turrax®) para os sistemas produzido com dupla emulsão, do que quando comparados a técnica de gotejamento da fase tensoativa.

É importante destacar que os resultados para avaliação de tamanho por DLS, está avaliada em volume, com taxa maior que 60% dos valores de tamanho. As variações de tamanho foram de 68% para a agitação de 1500 rpm e 39% para 3000 rpm, em relação aos sistemas com adição do ativo indicando que 5-ALA favorece o aumento do raio hidrodinâmico das nanopartículas.

O PDI é um parâmetro indicativo que os nanosistemas podem apresentar menos susceptibilidade à desestabilização ao longo do tempo e neste trabalho todos os sistemas estejam em faixa monomodal e estreita de tamanhos. Assim, nesta primeira etapa, a agitação se mostrou determinante no processo de síntese, indicando que a homogeneização deve ser o suficiente para que ocorra uma distribuição de tamanho mais heterogênea e o que implica em maior tempo de estabilidade nos sistemas.

Segundo a teoria de carga superficial de nanopartículas, é recomendado que o potencial Zeta seja maior, em módulo, que -30 mv para garantir a estabilidade dos sistemas (80). No entanto, na avaliação dos resultados os sistemas estabilizados com PVA e PVA-PEG apresentavam potencial Zeta menor que o indicado na literatura, mas permaneceram estáveis ao longo tempo, mostrando que os tensoativos escolhidos eram eficazes.

Há uma diferença nítida nos potenciais Zeta quando comparados em relação ao PVA, PEG400 e na associação física PVA-PEG400. Isto acontece, porque o PEG possui como parte polar a função álcool (-OH) e como parte apolar um ácido graxo. Na literatura mostra-se que o PVA com grau de hidrólise de 86% (no nosso trabalho a faixa está nesta faixa entre 50,5 e 89%), representa que 14% dos grupos acetato (-OCOCH₃) não se hidrolisam em hidroxila (-OH) durante a solubilização. Os grupos acetatos (que resultam da hidrólise incompleta), se ionizam com o aumento do pH da solução, e assim o PVA fica com cargas negativas (mesmo sendo classificado como não-iônico) que pode interagir eletrostaticamente com cargas opostas dos grupos na superfície sólida das partículas formadas, influenciando no mecanismo de

adsorção e, por fim, levando à formação de uma estrutura de duplas camadas elétricas em torno das partículas, ocasionando-se a estabilização os sistemas. (81)

Por fim, observa-se que as funções químicas presentes na molécula do 5-ALA como o ácido carboxílico (com carga negativa), cetona e amina e pode influenciar diretamente na carga. Além disso com a dição do pró-fármaco, o pH das soluções fica mais ácido e o potencial Zeta aumenta. O aumento do pH leva, também, a ionização das moléculas de PVA. A mesma associação quanto aos agrupamentos químicos presentes nas moléculas dos tensoativos, ativo e matriz polimérica podem explicar as diferenças de pH entre os nanosistemas sem e com ativo. Ao longo do tempo, para os estudos de estabilidades, alterações do pH, carga e tamanho podem indicar a coalescência, cremagem, sedimentação ou floculação indicando a desestabilização dos sistemas. (65)

Assim, de acordo com os ajustes físicos e as análises iniciais físico-químicas, foi possível determinar cinco sistemas potenciais, a partir dos quais, foram escalonados (etapa 2), para se desenvolver sistemas potenciais para a liberação do 5-ALA por via transdérmica, sendo um sistema embasado na literatura (dupla emulsão, estabilizado com PVA), um sistema com PEG na fase aquosa (para comparação com os demais sistemas) e dois sistemas com caráter de inovação (associação física do PEG ao PVA, para estabilização dos sistemas, simples e dupla emulsão) para a encapsulação do ativo hidrofílico 5-ALA.

3.4 Conclusões parciais

A matriz polimérica PLGA e o solvente orgânico foram escolhidos de acordo com testes iniciais de solubilidade em solventes orgânicos polares (como a acetona), além da classificação e aprovação por órgãos regulamentadores como a ANVISA (no Brasil) e FDA e Farmacopéia Americana USP (como padrões internacionais).

Nanopartículas poliméricas obtidas pelos métodos de simples ou dupla emulsão seguida da evaporação do solvente orgânico, são métodos reportados na literatura como promissores para encapsular ativos hidrofílicos como o 5-ALA, além de serem métodos de escalonamento industrial relativamente mais simples que outros métodos propostos. Para os métodos de simples emulsão optou-se pelo uso de agitação magnética e para os sistemas de dupla emulsão, a agitação mecânica tornou-se mais eficaz para se obter sistemas estáveis ao longo do tempo. As nanopartículas com ativo foram obtidas em uma faixa de tamanho entre 200 e 500 nm, dependentes dos métodos de obtenção de síntese.

Devido à complexidade de obter sistemas estáveis para ativos hidrofílicos, acompanhamentos e ajustes físicos e químicos são necessários para se obter sistemas eficazes. Análises do raio hidrodinâmico, potencial Zeta e pH permitiram determinar os melhores sistemas para a etapa 2 deste trabalho. Deste modo, foram escolhidos os tensoativos PVA e PEG, e associação destes, para se obter os sistemas com caráter de inovação, além de ser possível correlacionar quimicamente suas contribuições para a estabilização dos sistemas. Uma das partes mais importantes deste trabalho foi conseguir a ionização do PVA para a contribuição na estabilização eletrostática, bem como as rotas de obtenção de síntese, além da determinação eficaz dos modos físicos para obtenção dos sistemas.

4 ETAPA 2 - SÍNTESES E CARACTERIZAÇÕES PARA OS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Materiais

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura deionizada (resistividade 18,2 M.Ω.cm, Gehaka, Master WFI). Os reagentes para os estudos de desenvolvimento foram adquiridos como grau analítico. Foram utilizados os seguintes reagentes: acetona, diiodometano, formamida, etileno glicol (LabSynth, Diadema-SP, Brasil); Álcool polivinílico (PVA) (Vetec Química -Sigma-Aldrich, Duque de Caixias-RJ, Brasil); Cloridrato de ácido aminolevulínico 95% (5-ALA) (TFD Pharma, Cravinhos-SP, Brasil). Cloridrato de ácido aminolevulínico 99%; (5-ALA) poli (D, L-ácido láctico-co-glicólico) (50:50) (código:P2191) (Mw=30000-60000 g/mol); (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) e Kollisolv® PEG400 (polietileno glicol 400, Mw 380-420 g/mol) (Fluka Analytical -Sigma-Aldrich, St. Gallen, Suíça).

4.1.2 Metodologias

Sínteses de nanopartículas

As sínteses de nanopartículas produzidas estão descritas para os sistemas obtidos com ativo (5-ALA), mas a mesma metodologia se aplica para os sistemas sem ativo. Todas as sínteses foram desenvolvidas utilizando-se o pró-fármaco comercial brasileiro da PDT Pharma. Estes foram padronizados para serem obtidos 190 mL (volume final, depois de roevaporado o solvente orgânico) de nanoemulsão e concentração teórica final de 5-ALA 0,4478 mg/mL (29,38% e 53,13% de 5-ALA em relação a massa do PLGA, respectivamente para os sistemas de simples e dupla emulsão), além do solvente orgânico ser extraído nas mesmas condições de temperatura e pressão. Em nota, o volume total (fases aquosas mais fase orgânica) das duplas emulsões foram de 260 mL e para as simples emulsões 308 mL. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura deionizada (resistividade 18,2 M.Ω.cm, Gehaka, Master WFI).

É importante destacar que o ajuste de cálculo para a proporção de massa dos sistemas foram embasados nas patentes nº US6.559.183 (AmeLuz®, Biofrontera Inc., USA) (82), nº

WO2011156880A1 (Nanocarreadores coloidais para ativos hidrofílicos e processo de produção, Cerize *et al*, Brasil) (83). As sínteses são descritas à seguir:

Síntese A: (1) A fase orgânica foi preparada com a massa de $(0,16000 \pm 0,00001)$ g de PLGA(50:50) e sendo o polímero solubilizado em acetona (concentração 2,318 mg/mL), em temperatura ambiente (25°C), por 15 minutos, sob agitação magnética de 750 rpm (IKA C-MAG +HS7). (2) A fase interna foi preparada com 82 mL de água deionizada e 5-ALA (concentração de 1,0366 mg/mL, representando 53,13% da massa em relação a massa do PLGA), também, por 15 minutos, sob agitação magnética de 750 rpm, medindo-se o pH e potencial Zeta ao final da agitação. (3) A fase interna foi vertida na fase orgânica (pré-emulsificação), em banho de gelo e sob agitação de 3200 rpm (Ultra Turrax® T-25 digital) por 20 minutos. (4) A fase externa foi preparada com um volume de 109 mL de água deionizada, com 1% (m/v) de PVA, sob agitação magnética, à 45°C , por 50 minutos. Posteriormente, a solução de PVA foi resfriada em banho de gelo (4°C) sob agitação magnética de 750 rpm, medindo-se o pH e potencial Zeta. (5) Depois da emulsão formada em (3), esta foi vertida na fase aquosa externa com agitação magnética de 1500 rpm por 30 minutos, na mesma temperatura (nanoemulsificação). A concentração final de 5-ALA nas soluções foi de $(0,4474 \pm 0,0002)$ mg. mL⁻¹. A concentração de ativo em relação ao volume final de nanopartículas foi padronizada para todas as sínteses. A síntese sem ativo (ALA) foi feita sob as mesmas condições. A evaporação do solvente ocorreu através do uso de um rotaevaporador (Heidolph, Hei-VAP Advantage), rotação de 120 rpm, temperatura do banho de 35°C , taxa de temperatura de evaporação 4°C e pressão de 40 mbar, padronizado para todas as sínteses produzidas.

Síntese B: (1) A fase orgânica foi formada pela massa de $(0,28500 \pm 0,00001)$ g PLGA (50:50) solubilizada na acetona (concentração 2,4 mg/mL), em temperatura ambiente (25°C), por 15 minutos, sob agitação magnética de 750 rpm. (2) A solução de Kolliphor (PEG400) 1% (m/v), foi obtida sob agitação de 750rpm, e resfriada em banho de gelo (4°C), na mesma agitação, sendo medido o pH e potencial Zeta ao final. Posteriormente, mantendo-se a proporção 29,36% de 5-ALA em relação a massa do (PLGA), o 5-ALA foi solubilizado na fase aquosa junto ao PEG400, sob agitação de 750rpm, por 15 minutos. (3) A fase aquosa foi vertida na fase orgânica em agitação de 1500rpm (agitação magnética), por 30 minutos, em banho de gelo ($0-4^{\circ}\text{C}$). (4) O solvente foi extraído após a última etapa.

Síntese C: (1) A fase orgânica foi formada pelo PLGA (50:50), solubilizado na acetona, em temperatura ambiente sob agitação de 750 rpm, por 15 minutos, nas mesmas condições descritas na **Síntese B**. (2) A fase aquosa foi preparada com 0,5% (m/v) de PVA, sob agitação magnética, à 45°C , por 50 minutos. Posteriormente, a solução de PVA foi resfriada

em banho de gelo (4°C) sob agitação magnética de 750 rpm, sendo adicionada nesta solução 0,5% (m/v) de PEG400, nas mesmas condições de agitação e temperatura, por 15 minutos, medindo-se o pH e potencial Zeta ao final. Decorrido o tempo necessário o 5-ALA foi adicionado na fase aquosa, sob as mesmas condições anteriores, e mantendo-se a proporção de 29,36% de 5-ALA em relação a massa do (PLGA), medindo-se, também, o pH e o potencial Zeta. **(3)** A fase aquosa foi vertida na fase orgânica em agitação de 1500 rpm (agitação magnética), por 30 minutos, em banho de gelo (0-4°C). **(4)** O solvente foi extraído após a última etapa.

Síntese D: **(1)** A fase orgânica foi formada pelo PLGA (50:50), solubilizado na acetona, em temperatura ambiente sob agitação de 750 rpm, por 15 minutos, nas mesmas condições descritas na **Síntese B**. **(2)** A fase externa foi preparada com um volume de 190 mL de água deionizada, com 1% (m/v) de PVA, sob agitação magnética, à 45°C, por 50 minutos. Posteriormente, a solução de PVA foi resfriada em banho de gelo (4°C) sob agitação magnética de 750 rpm, sendo o 5-ALA adicionado após a fase se resfriar, na proporção 29,36% de 5-ALA em relação a massa do (PLGA) sob as mesmas condições de agitação e temperatura, por 15 minutos. **(3)** A fase aquosa foi vertida na fase orgânica em agitação de 1500 rpm (agitação magnética), por 30 minutos, em banho de gelo (4°C). **(4)** O solvente foi extraído após a última etapa.

Síntese E: **(1)** A fase orgânica foi formada pelo PLGA (50:50) solubilizado na acetona, nas mesmas condições descritas na **Síntese A**. **(2)** A fase interna foi formada com 82 mL e PVA 0,5% (m/v), obtida sob agitação de 750 rpm à 55°C, e resfriada em banho de gelo (0-4°C). Depois, o 5-ALA foi solubilizado na fase interna, nas mesmas condições descritas na **Síntese A**, sob agitação de 750rpm, por 15 minutos, medindo-se o pH e potencial Zeta ao final. **(3)** A fase interna foi vertida na fase orgânica (pré-emulsificação), em banho de gelo e sob agitação de 3200 rpm por 20 minutos. **(4)** A fase aquosa externa foi formada por PEG 0,5% (m/v), sob agitação de 750 rpm à temperatura ambiente, por 15 minutos. **(5)** Decorrido o tempo necessário, a pré-emulsão formada, sendo vertida na fase aquosa externa em banho de gelo e sob agitação magnética de 1500 rpm, por 30 minutos, ocorrendo a nanoemulsificação. O solvente foi extraído após a última etapa.

A representação e resumo dos protocolos de obtenção das sínteses pode ser visualizado na figura 7.

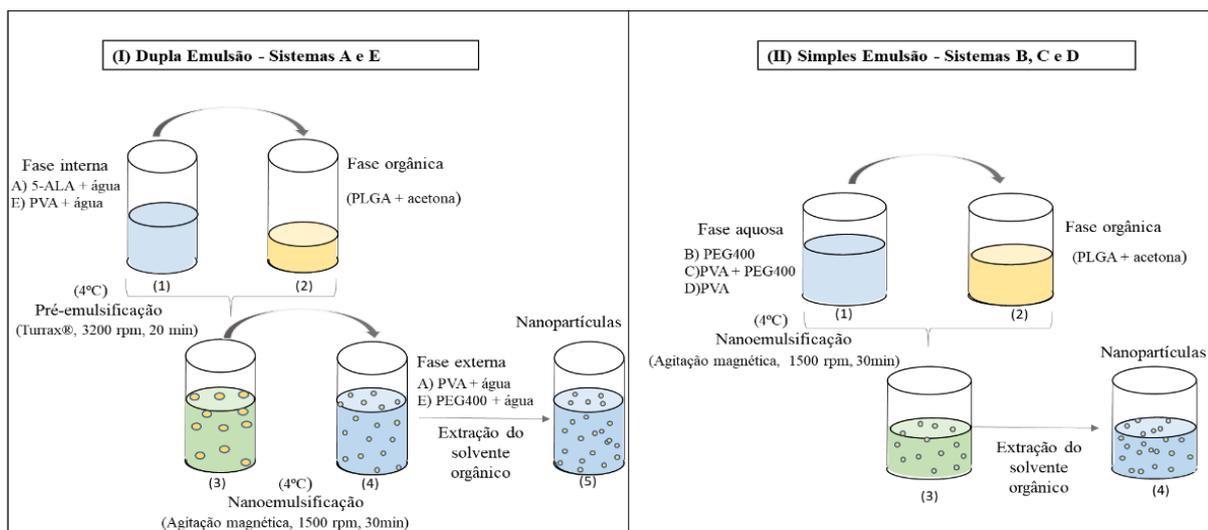


Figura 7 - Representação para os protocolos das rotas de obtenção das nanopartículas poliméricas por (I) dupla emulsão e (II) simples emulsão das nanopartículas com ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Escalonamento laboratorial

Para comparações físico-químicas, afim de indicar o melhor sistema promissor para o encapsulamento do 5-ALA, os sistemas de nanopartículas poliméricas, com ativo (NP-PLGA-ALA) e sem ativo (NP-PLGA), foram padronizados quanto volumes de fases interna e externa, massa do polímero, massa do ativo e porcentagem em (m/v) dos tensoativos e volumes finais das nanoemulsões, realizados a priori apenas para um sistema obtido por dupla emulsão (Síntese A) e um sistema obtido por simples emulsão (Síntese C).

As sínteses passaram por um processo de escalonamento, ainda em escala laboratorial de 40 mL para 190 mL, obtidos em béquer de 250 mL (forma alta para as duplas emulsões e forma baixa para as simples emulsões). O ajuste de volume foi necessário para os estudos de estabilidade seguintes. Assim, foi verificado se as proporções de massas e volumes poderiam ser mantidas em relação ao volume de 40 mL final, estudadas na “03.3.2 Avaliação da estabilidade físico-química para os sistemas”. Portanto, como não houve diferenças na ordem de tamanho, carga ou pH, todos os dados de síntese podem ser transferidos em porcentagem para as sínteses descritas na etapa 1.

4.1.3 Caracterizações

Todos os sistemas descritos anteriormente foram avaliados nos testes à seguir.

Avaliação organoléptica, condutividade elétrica, densidade relativa e viscosidade dinâmica

Todas as avaliações foram feitas para o primeiro dia de cada síntese. Através da avaliação organoléptica, as mudanças de fase (precipitação ou separação), odor e cor ao longo do tempo, foram observadas afim de se determinar quaisquer modificações e interações ao longo do tempo.

A condutividade elétrica é uma medida de passagem elétrica em determinado meio. Esta medida foi determinada através de um condutivímetro de bancada (Sensoglass), com faixa de medição de 0,001ms a 500ms, previamente calibrado, e volume de amostra de 15 mL.

A densidade é a razão entre a massa de uma substância e o volume que ela ocupa. A densidade relativa dos sistemas foi determinada de forma indireta, utilizando-se uma balança analítica e uma micropipeta de 1000 µL, onde o volume de 1 mL de cada solução foi pesado em um béquer de 5 mL em triplicata.

A viscosidade foi determinada usando um viscosímetro rotativo microprocessado (Q860M26, Quimis) que consiste na medição do torque requerido para rodar um *spindle* (fuso) imerso em um dado fluido. Para as leituras foram utilizadas 15 mL das soluções, com a leitura usando o *spindle* 1, referente a fluidos próximos a viscosidade da água.

Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-vis)

De acordo com a estrutura eletrônica de determinada molécula esta é capaz de absorver a energia no comprimento de onda do ultravioleta-visível (UV-vis) (67). Isto é possível, quando há mudanças do nível de energia eletrônico. Esta mudança ocorre quando um elétron passa para o nível de um orbital de maior energia (84). A Lei de Lambert-Beer diz que a absorção é diretamente proporcional a concentração da espécie, equação (3):

$$A = \frac{\log I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (3)$$

Onde, A = absorvância; I_0 = intensidade de luz que incide da cubeta; I = intensidade de luz que sai da cubeta; ε = absorvância da espécie; c = concentração do soluto e l = comprimento da cubeta. As propriedades ópticas das nanopartículas com e sem ativo foram analisadas pela espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-vis). As medidas de absorvância foram realizadas no Grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross (IFSC/USP) no espectrofotômetro UV-vis Hitachi U-2900, em cubeta de quartzo, com caminho óptico de 1 cm.

Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

Com objetivo de se determinar a concentração e o tamanho das nanopartículas em solução para auxiliar nos estudos *in vitro* foram realizadas Análise de Rastreamento de

Nanopartículas (NTA). O NTA é uma técnica complementar ao DLS, que usa o espalhamento de luz, baseado em um laser, e o movimento browniano para detectar individual e simultaneamente distribuições de tamanho e concentrações de partículas numa amostra em suspensão. Em resumo, um feixe de laser incide em um porta-amostra onde, as partículas no caminho desse feixe óptico, espalham a luz. Em seguida, as partículas são vistas como pequenos pontos de luz movendo-se rapidamente, com o auxílio de um microscópio com 20x de aumento e uma câmera de vídeo acoplada (30 quadros por segundo (fps)). O arquivo de vídeo capturado é processado rastreando o movimento das partículas e calculando o tamanho hidrodinâmico pela equação de Stokes-Einstein (85). A coleta de dados foi realizada em triplicata, com vídeos de 30 segundos e as amostras de nanopartículas foram diluídas em série (1:10000) (volume de solução de nanopartícula : volume de água deionizada) no equipamento NanoSight NS300 (Malvern) e os dados obtidos foram processados no Software NTA Suite. As medidas foram realizadas no Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano) (IFSC-USP).

Ângulo de contato e energia de superfície

O principal objetivo é correlacionar as informações do ângulo de contato e energia de superfície com o tipo de nanoemulsão formada, relacionando ao potencial Zeta e, condutividade e pH das partículas, avaliando a interação do PVA e do PVA-PEG nos sistemas. A molhabilidade é o primeiro parâmetro a ser analisado em sistemas coloidais. Tal medida leva em consideração a hidrofobicidade e hidrofiliidade (86,87), calculada através do ângulo de contato de uma gota séssil (88), a partir do plano tangente à superfície do sólido e o plano tangente à superfície do líquido. Ângulos de contato menores que 90° correspondem a alta molhabilidade e, portanto, são hidrofílicos, enquanto ângulos de contato maiores que 90° correspondem a baixa molhabilidade e, portanto, são hidrofóbicos, figura 8.

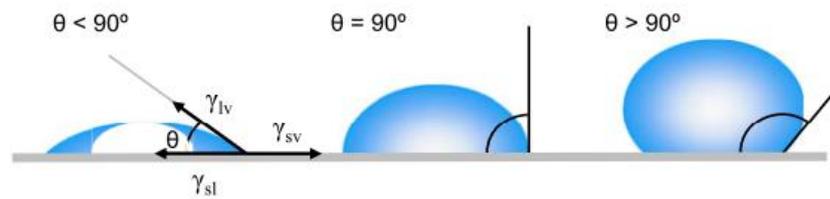


Figura 8 - Esquema de formas de deposição de líquidos em um substrato sólido, definindo o ângulo de contato.

Fonte: YUAN *et al.* (87).

Os cálculos baseados nos valores medidos do ângulo de contato produzem um parâmetro importante chamado de tensão superficial ou energia de superfície, influenciando na forma de deposição da gota, que é dependente da relação entre as forças dispersivas (aquelas que fazem a gota do líquido se espalhar facilmente) e as forças coesivas (deixando a gota em forma de esfera, portanto com uma energia mínima). Para um líquido puro, cada molécula é atraída igualmente em todas as direções pelas moléculas vizinhas, resultando em uma força líquida zero. No entanto, as moléculas expostas na superfície não têm moléculas vizinhas em todas as direções para fornecer uma força líquida equilibrada, sendo assim, atraídas para dentro pelas moléculas vizinhas, criando uma pressão interna. Como resultado, o líquido reduz voluntariamente sua área de superfície para manter a menor energia livre de superfície, figura 9. Portanto, resumidamente, a energia de superfície é regida pela lei clássica do *princípio da menor energia* (87).



Figura 9 - Representação da ação das moléculas que causam a tensão superficial em uma superfície.

Fonte: YUAN *et al.* (87).

Por fim, o ângulo de contato de uma gota séssil em uma superfície sólida ideal é relacionado diretamente pelo equilíbrio de energia na interface sólido-líquido-vapor, definido pelo equilíbrio mecânico das três tensões superficiais e foi primeiramente definida por Thomas Young em 1805 equação (4):

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos(\theta) \quad (4)$$

Onde, γ_S , γ_{SL} , γ_L representam as energias de superfície do sólido, sólido-líquido e líquido, respectivamente e θ é o ângulo de contato (87). Com este caso geral, ainda assim não é possível determinar o cálculo para energia de superfície, cuja, deve ser relacionada as componentes polares e dispersivas, passando por extensivos cálculos geométricos. Neste

contexto, será abordado, resumidamente a teoria de Owens, Wendt, Rable e Kaelble proposta em 1969 (89), onde os cálculos para a energia de superfície é proposta matematicamente pela equação (5):

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2 \left(\sqrt{\gamma_s^d \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_s^p \gamma_L^p} \right) \quad (5)$$

Onde γ_s^d e γ_L^d componente dispersiva (interações Lifshitz-Van der Waals) e, γ_s^p e γ_L^p componente não dispersiva (interações polares, ácido base de Lewis). A equação (6) é ainda rearranjada para que as parcelas polares e apolares da energia de superfície sejam obtidas a partir do coeficiente angular e linear:

$$\frac{\gamma_L \cos \theta + 1}{2\sqrt{\gamma_L^d}} = \sqrt{\gamma_s^p} \left(\frac{\sqrt{\gamma_L^p}}{\gamma_L^d} \right) + \sqrt{\gamma_s^d} \quad (6)$$

A equação (7) é combinada com a equação de Fowkes, proposta em 1964, onde a equação diz que o trabalho de adesão geométrico da gota é a média geométrica da componente dispersiva (89). Assim, finalmente, a energia de superfície é calculada em relação as componentes polares e dispersivas:

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p \quad (7)$$

Os parâmetros de tensão superficial para os cálculos de hidrofobicidade e energia de superfície estão indicados na tabela 6 (90):

Tabela 6 - Tensão superficial dos líquidos-sonda para o cálculo de energia de superfície.

Líquido-Sonda	γ_{total}	$\gamma_{dispersiva}$	γ_{polar}	$\gamma_{ácida}$	$\gamma_{básica}$
Água	72,80	21,08	51,72	25,50	25,50
Formamida	58,00	39,00	19,00	2,28	39,60
Etilenoglicol	48,00	29,00	19,00	3,00	30,10
Diiodometano	50,80	48,50	2,300	0,00	0,00

Fonte: TORRES (90).

As componentes polares e dispersivas foram determinadas através do cálculo dos ângulos de contato e energia de superfície através do método da gota séssil. Foram preparadas dez lâminas de vidro, com cinco gotas (volume por gota de $0,8 \pm 0,1 \mu\text{L}$) de cada uma das soluções de nanopartículas, que foram deixadas secar em atmosfera controlada (dessecador). Com uma microsseringa *Hamilton*, gotas de $(3 \pm 0,1) \mu\text{L}$ de líquidos sonda (água, formamida, etilenoglicol e diiodometano) foram depositadas sobre a superfície das gotas secas das nanoemulsões. Os ângulos foram calculados a partir da média de cinco gotas, fotografadas em 10 *frames* por segundo, através do *CAM 200 Software*. As medidas foram realizadas em um

goniômetro KSV, modelo CAM 200 (KSV Instruments, Finlândia) no Grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross” (IFSC-USP) em parceria científica.

Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho (IR) se baseia na capacidade de determinadas ligações, com capacidade de variação de dipolo, de absorver a energia na região do infravermelho, sendo excitadas e assim atingindo um estado de maior energia, pelo aumento dos movimentos vibracionais das moléculas. Em contraste com os poucos picos observados na região do UV-vis, na região vibracional do espectro gerado pelo FTIR, é possível caracterizar grupos funcionais e tipos de ligações das amostras, gerando um conjunto de informações sobre as estruturas químicas em análise. (84)

Os espectros FTIR dos sistemas de nanopartículas, além das análises do PLGA (50:50), PVA, PEG400 e 5-ALA foram obtidos no espectrofotômetro Shimadzu-IR Prestige-21 no modo de reflexão total atenuada horizontal (HATR). As análises foram realizadas depositando 1 mL da amostra em cristal de seleneto de zinco e obtendo interferogramas de 45 varreduras com resolução de 2 cm^{-1} . Os interferogramas foram registrados na região de frequência de 4000 a 400 cm^{-1} . Todas as análises foram realizadas na Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), em parceria científica.

Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de átomos de hidrogênio (1H-RMN)

A espectrometria por ressonância magnética nuclear de prótons (1H-RMN) é basicamente outra forma de espectrometria de absorção, semelhante ao IR ou UV. As amostras são submetidas a um alto campo magnético que faz com que os *spins* dos núcleos de H se alinhem ao campo imposto. No experimento de RMN, um pulso de radiofrequência (RF) faz com que a magnetização provida pelo conjunto de spins alinhados seja retirada do equilíbrio, permitindo que essa perturbação gere um sinal nas bobinas de recepção de RF. A frequência do sinal, o qual será tratado posteriormente com a Transformada de Fourier, está intimamente relacionada ao ambiente químico em que os núcleos de H se encontram e suas interações, permitindo assim uma caracterização estrutural da molécula em questão. (84,91) Esta análise permite uma descrição fina da estrutura além de sua quantificação.

Os dados de (1H-RMN) foram obtidos no equipamento BrukerAvance 400 (Ettlingen, GE) instrument, 400 MHz, à 23°C. O TSP (ácido trimetilsililpropanóico) foi utilizado como referência interna e as amostras (nanopartículas, 5-ALA, PVA, PEG400 e PLGA) foram diluídas em água deuterada (80:20). Os pulsos de pré-saturação foram aplicados à supressão do

pico de água (solvente). A sequência de pulso de inversão-recuperação (180° - 90°) foi usada para obter valores de tempo de relaxação (T1) de picos específicos de metileno. O tempo de aquisição foi de 4s, atraso de relaxação 10s. Foram calculados em média 32 transientes para cada atraso de tempo e foram distribuídos 16 valores de 0,001 a 10 segundos. Os valores de T1 e intensidades relativas foram calculados ajustando os dados exponenciais no software NUTS. Todas as análises foram realizadas na Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), em parceria científica.

4.1.4 Análises de estabilidade dos sistemas de nanopartículas

Os estudos de estabilidade têm por objetivo contribuir para informações relevantes ao desenvolvimento destas nanoemulsões, mostrando uma estabilidade relativa (pois, é dependente de fatores como tempo, temperatura, umidade do ar, material de acondicionamento, luz, oxigênio, componentes químicos, presença de microrganismos, vibração, entre outros) destes nanossistemas. É válido destacar que ainda hoje no Brasil, não há um guia específico de estabilidade para nanopartículas e, deste modo, estes estudos foram embasados no Guia de Estabilidade de Emulsões Cosméticas da ANVISA (67) e nas Regulamentações da Nanotecnologia do FDA (*FDA Regulation of Nanotechnology*) (92). Mudanças de até 10 e 15% em relação as medidas iniciais eram consideradas estáveis, acima dessa mudança percentual eram descartadas. A porcentagem foi determinada após o acompanhamento das medidas dos primeiros sistemas ao atingir ao menos 15 dias de reprodutibilidade nas medidas físico-químicas, em acordo com a norma RE N°1, de 29/07/2005 da ANVISA e da RDC n° 318 de 06/11/2019 de critérios de estabilidade para produtos farmacêuticos. Todos os sistemas descritos, foram avaliados nos testes que seguem.

Estabilidade forçada do 5- ácido aminolevulínico

Esta análise remete a estabilidade forçada do 5-ALA (PDT Pharma) em solução aquosa para a comparação com os sistemas com ativo. Uma solução com 50 mL de água ultrapura, na concentração de 0,4472 mg/mL de 5-ALA foi preparada. Esta solução foi dividida em quatro frascos farmacêuticos de vidro, boca larga, de volume de 40 mL e armazenadas na temperatura ambiente ($23,0\pm 2,0$)°C, geladeira ($5,0\pm 1,0$)°C, estufa ($40,0\pm 2,0$)°C e em ciclo (24 horas armazenada na geladeira e 24 horas na estufa). As medidas de pH foram realizadas por quatro dias consecutivos em triplicata.

Estabilidade forçada das nanoemulsões em função do tempo (centrifugação 3000 rpm) e temperatura 56°C)

O estudo de centrifugação avalia a estabilidade das nanoemulsões em condições extremas de vibrações, simulando o que pode acontecer, por exemplo, durante o transporte destas amostras. Deste modo, triplicatas das nanoemulsões foram centrifugadas (Ultra Centrífuga Eppendorf 5427) utilizando tubos falcon por três ciclos, de 30 minutos cada, à 24°C. Ao final de cada ciclo as nanoemulsões foram avaliadas quanto às suas características organolépticas e variação de pH. As amostras foram descartadas depois da análise.

O principal propósito do estudo de estabilidade em função da temperatura é colocar as amostras em uma temperatura fixa e elevada, de tal modo que favoreça a aceleração de reações físico-químicas e químicas que possam levar a desestabilização dos nanosistemas. Assim, uma alíquota de 15 mL foi colocada em frascos regentes de 100 mL, devidamente fechados e envoltos em papel alumínio, quando as nanoemulsões foram preparadas como princípio ativo, e levados para estufa de secagem e esterilização, por 48 horas e na temperatura fixa de $(56,0 \pm 2,0)^\circ\text{C}$, e avaliado a estabilidade destas quanto suas características organolépticas, potencial Zeta, tamanho e pH. Todas as medidas foram realizadas em quintuplicata. Ao final do estudo as amostras foram descartas.

Diferenças de estabilidade físico-químicas em relação a temperatura de armazenamento das amostras ao longo do tempo

O intuito é determinar a temperatura de armazenagem e por consequência avaliar a estabilidade relativa ao longo do tempo das nanoemulsões. Para cada estudo em diferentes temperaturas foi utilizado uma alíquota do mesmo lote das nanoemulsões. Foram armazenados 30 mL de cada nanoemulsão em frasco reagente transparente (boro silicato) de tampa azul de 100 mL, com o espaço vazio (head space) para possíveis trocas gasosas. Os frascos que armazenavam os sistemas com ativo foram ainda, envoltos com papel alumínio.

As amostras foram armazenadas $(23,0 \pm 2,0)^\circ\text{C}$, geladeira $(5,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$, estufa $(40,0 \pm 2,0)^\circ\text{C}$ e em ciclo (24 horas armazenada na geladeira e 24h na estufa). As quatro condições são analisadas durante 40 dias ininterruptos (chamado de quarentena, pelo Guia da Anvisa), através de medidas de pH e para os dias 1, 7, 15, 30 e 40 para as medidas de tamanho, índice de polidispersão e carga. O pH foi determinado assim como descrito em Avaliação de estabilidade físico-química para os sistemas e foi uma medida de estabilidade direta. Ao final deste tempo, as amostras mantidas em ciclo são descartadas, enquanto as três primeiras continuam a ser avaliadas com 60, 90, 120, 150, 180 dias (chamado de estabilidade preliminar,

pelo Guia da Anvisa) e 360, 540 e até no máximo 720 dias (chamado de teste de prateleira, pelo Guia da Anvisa). Quando era notado que as propriedades organolépticas e as propriedades físico-químicas não eram reproduzidas, as amostras eram descartadas.

Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão por Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e carga superficial das partículas (potencial Zeta - ζ) por mobilidade eletroforética ao longo do tempo

As metodologias para a determinação de tamanho, índice de polidispersão e carga superficial foram descritos em Avaliação de estabilidade físico-química para os sistemas. Estes parâmetros, foram essenciais para as medidas de estabilidade ao longo do tempo.

4.1.5 Métodos estatísticos para a visualização dos resultados

As análises estatísticas foram realizadas usando um conjunto de *software* conhecido como *Projection Explorer Sensors (PEX-Sensors)*, que implementa técnicas de visualização de informações através da redução de dimensionalidade dos dados. Neste trabalho, os dados provenientes do tamanho, potencial Zeta, índice de polidispersão e pH, foram projetados em um mapa de duas dimensões (2-D) para avaliação da similaridade ou dissimilaridade dos sistemas de nanopartículas perante às modificações físico-química, além da avaliação da eficiência do sistema de escolha na ação sobre as células de A431 e HDFn. A técnica de Mapa de Documentos Interativos (IDMAP) usa distância euclidiana $\delta(x_i, x_j)$ entre o sinal de diferentes amostras $X = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$ (por exemplo, tamanho, potencial Zeta, índice de polidispersão e pH) para projetar tais dados em um espaço de menor dimensão. Neste espaço, o posicionamento dos elementos visuais $Y = \{y_1, y_2, \dots, y_n\}$ é dado por uma função injetiva $f: X \rightarrow Y$ que minimiza o termo $|\delta(x_i, x_j) - d(f(x_i), f(x_j))| \forall x_i, x_j \in X$. A função é dada pela equação (8):

$$S_{IDMAP} = \frac{\delta(x_i, x_j) - \delta_{min}}{\delta_{max} - \delta_{min}} - d(y_i, y_j) \quad (8)$$

na qual, δ_{max} e δ_{min} são, respectivamente, as distâncias euclidianas máxima e mínima entre instâncias de dados e $d(y_i, y_j)$ representa a distância euclidiana entre as instâncias projetadas no espaço de menor dimensão. Esta técnica de projeção de dados 2-D, é uma nova proposta de avaliação para sistemas de nanopartículas. Estas etapas foram realizadas em parceria científica com o Centro de Imagens e Espectroscopia in vivo por Ressonância Magnética (IFSC-USP) (CIERMAG, IFSC-USP) e o Grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross” (IFSC-USP).

4.2 Resultados e Discussão

4.2.1 Protocolos dos sistemas de nanopartículas

Sínteses de nanopartículas

Um dos maiores desafios para a nanotecnologia aplicada na medicina, é encontrar plataformas que sejam estáveis física e quimicamente e que, ao mesmo tempo, permitam a entrega e a biodisponibilidade de fármacos em sistemas biológicos. Então, após os estudos iniciais, era importante padronizar os sistemas, para que pudéssemos chegar em uma plataforma estável e promissora alinhado ao objetivo deste trabalho. O primeiro sistema proposto “Sistema A”, tabela 7, consiste em nanopartículas de PLGA, cuja a síntese é obtida pelo método da dupla emulsão e é embasada na revisão do trabalho de Shi *et al.* (2013) (59). Segundo Shi *et al.*, as nanopartículas com ativo, tinham uma média de tamanho de 249,5 nm, obtidas com o a solubilização do PLGA em diclorometano e fase aquosa interna formada por tampão PBS. Foram apresentados os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo*, com resultados promissores para a aplicação em terapia fotodinâmica e estes resultados foi um critério inicial para a escolhas do sistema. Em função disso, propomos a síntese obtida por simples emulsão, embasados na revisão do método inicial, onde denominamos de “Síntese D”, tabela 7. A proposta inicial com esta síntese era comparar com a “Síntese A”, esperando reportar melhores resultados para a estabilidade do sistema e simplificando o método de obtenção das nanopartículas. No ANEXO 1, é possível ver a lista das referências consultadas para o desenvolvimento das sínteses. Os sistemas analisados para as etapas seguintes dos testes de estabilidade estão descritos na tabela 7.

A partir do uso do PVA como tensoativo, visamos obter um sistema que pudesse melhor favorecer as aplicações *in vivo* e *in vitro*, e assim propomos o desenho de uma partícula funcionalizada ou revestida, que ajudasse tanto na estabilização dos sistemas quanto na futura aplicação do produto. Assim, uma das estratégias mais antigas para isto, consiste em revestir ou conjugar nanopartículas com polímeros hidrofílicos, entre eles polaxâmeros e polietilenoglicóis, e assim optamos por trabalhar com o poli(etileno glicol) (PEG) de baixa massa molecular (57). Deste modo, desenvolvemos a “Síntese C” e a “Síntese E”, tabela 7, embasadas nos sistemas de simples e dupla emulsão, respectivamente, com o propósito de inovar e melhorar a permeação e estabilidade destes sistemas.

Por fim, a “Síntese B”, tabela 7, é um sistema que contém apenas o PEG como tensoativo. Sabe-se que o PEG não é um transportador de ativo eficaz, pois como o polímero tem dois grupos reativos em sua molécula, por isso, neste estudo este sistema é um comparativo para as “Síntese C” e “Síntese E”, para entendermos como cada componente da síntese interage na formação e estabilidade destes sistemas (93).

Tabela 7 - Sistemas analisados para os estudos de estabilidade. Os sistemas estão divididos por sínteses, indicando a composição das fases aquosas e as observações quanto as análises para este trabalho.

Sistema	Nome das amostras	Composição		Observação
		Fase aquosa interna	Fase aquosa externa	
(A) Dupla	A-DE-PVA	Água	PVA	<i>Literatura e revisão de método.</i> Controle da síntese E. Comparação para o sistema D.
	A-DE-PVA-ALA	ALA	PVA	
(B) Simples	B-SE-PEG	-	PEG	<i>Revisão de método.</i> Controle da síntese C e E.
	B-SE-PEG-ALA	-	PEG- ALA	
(C) Simples	C-SE-PEG-PVA	-	PVA-PEG	<i>Inovação.</i> Comparação para o sistema E.
	C-SE-PEG-PVA-ALA	-	PVA-PEG-ALA	
(D) Simples	D-SE-PVA	-	PVA	<i>Revisão de método.</i> Síntese modificada de A. Comparação para o sistema A. Controle do sistema E.
	D-SE-PVA-ALA	-	PVA-ALA	
(E) Dupla	E-SE-PEGPVA	PVA	PEG	<i>Inovação.</i> Comparação para o sistema C.
	E-SE-PEGPVA-ALA	PVA-ALA	PEG	

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir das análises descritas no capítulo 4 foi possível fazer ajustes nos sistemas propondo inovação quanto ao método de obtenção das nanopartículas poliméricas de PLGA para a encapsulação do ativo hidrofílico 5-ALA.

Escalonamento laboratorial

Devido as características físico-químicas e toxicológicas, o PLGA foi aprovado pelo FDA e pela Agência Europeia de Medicina como matriz polimérica para vários sistemas de liberação controlada para moléculas com potencial terapêutico, visando minimizar a toxicidade e melhorar a eficácia destes ativos. No entanto, na área de nanotecnologia muitos projetos perdem

ou tem dificuldades de expansão para a indústria devido a poucos estudos nas partes regulamentárias, que englobam a estabilidade destes sistemas em produção de grande escala. (94-95)

Deste modo, com o objetivo de obter soluções em maior escala de produção laboratorial para se analisar as mesmas alíquotas quanto a estabilidade temporal, foi realizado esta etapa de escalonamento. Primeiramente, foi verificado se as proporções de massas e volumes poderiam ser mantidas, avaliando o diâmetro, potencial Zeta e pH iniciais, realizado um aumento de mais de seis vezes dos volumes e massas dos reagentes utilizados, em relação aos sistemas apresentados no capítulo “Sistemas de nanopartículas”.

A figura 10 indica os resultados para o sistema A de dupla emulsão. Na figura 10 (A), se observa que houve um aumento percentual de 25,96% para as nanopartículas com ativo, enquanto as nanopartículas sem ativo diminuiram 10,37% em seu diâmetro. A figura 10 (B), mostra um aumento no potencial Zeta para as nanopartículas sem ativo e com ativo, enquanto o comportamento em relação a mudança de pH, figura 10 (C), não apresentaram aumento na basicidade das soluções, as diferenças permaneceram entre 2,57% e 6,96%, respectivamente, para as soluções com e sem ativo.

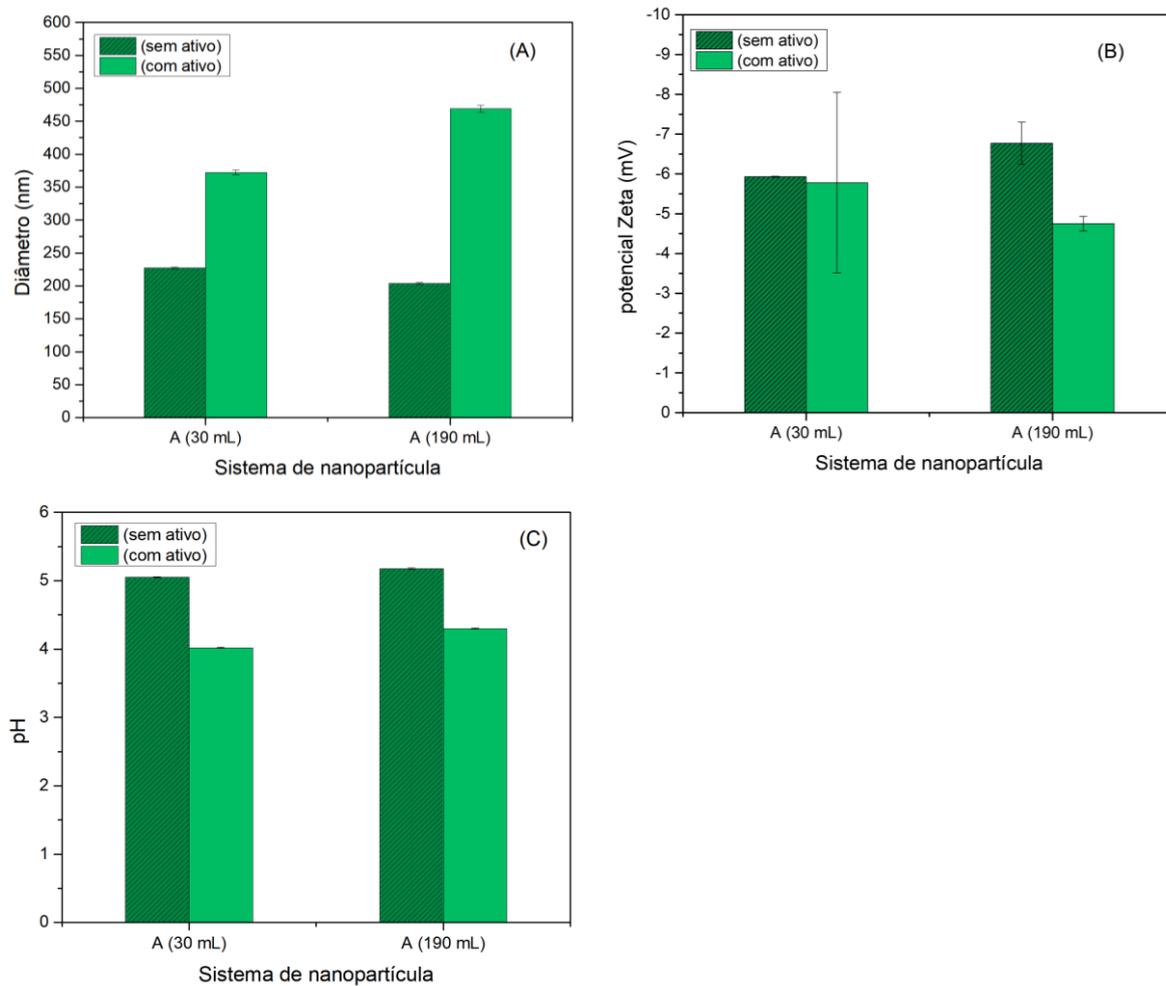


Figura 10 - Escalonamento de 30 para 190mL, do sistema de dupla emulsão mostrando as diferenças entre (A) diâmetro, (B) potencial Zeta e (C) pH para nanopartículas com e sem ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 11 indica os resultados para o sistema C de simples emulsão.

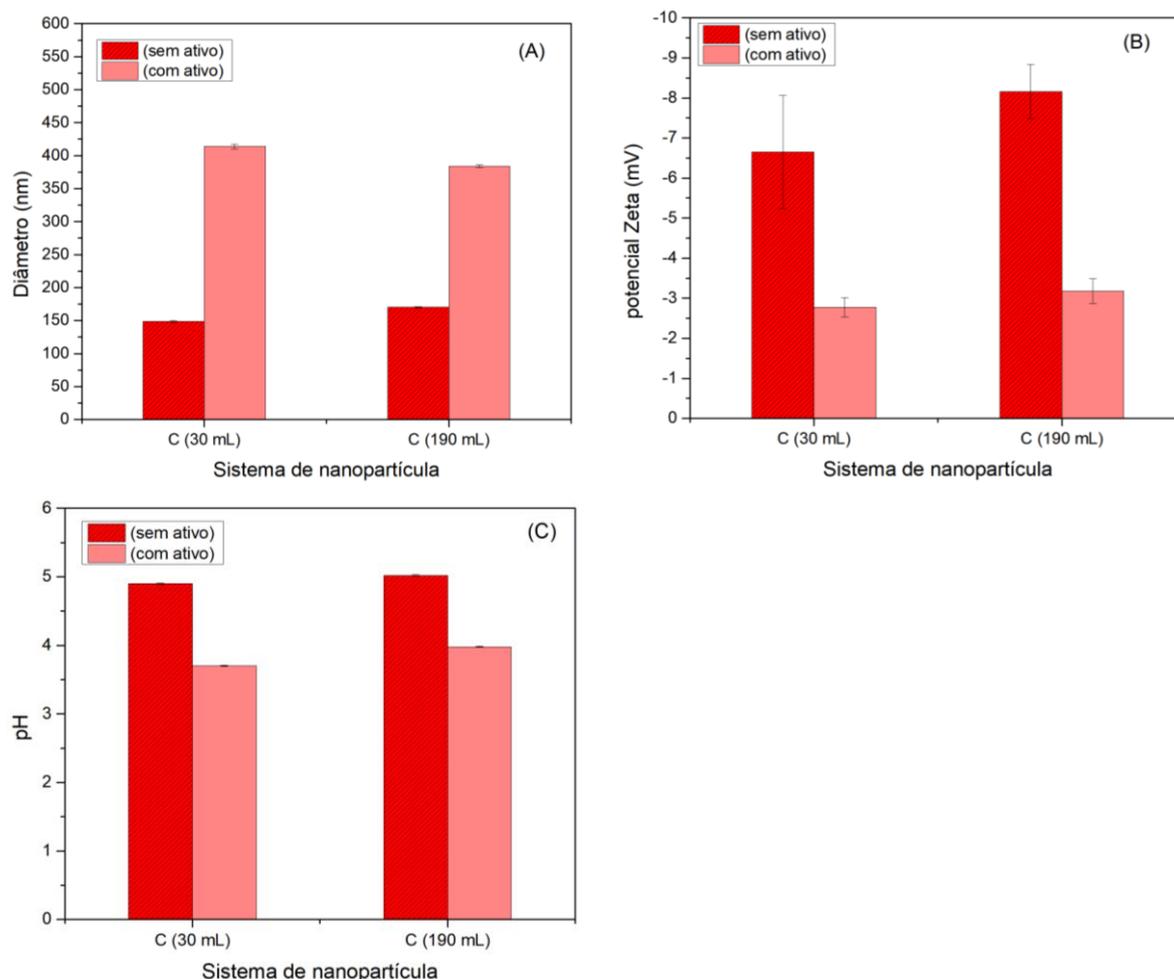


Figura 11 - Escalonamento de 30 para 190mL, do sistema de simples emulsão mostrando as diferenças entre (A) diâmetro, (B) potencial Zeta e (C) pH para nanopartículas com e sem ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 11 (A) é possível observar que houve um aumento percentual de 14,45% para as nanopartículas sem ativo, enquanto as nanopartículas com ativo diminuíram 7,17%, ocorrendo o comportamento ao contrário do discutido para a figura 10 (A). Para a carga, figura 11 (B), diminui 22,71 e 14,80%, respectivamente para as partículas sem e com ativo. O pH figura 11 (C), novamente aumenta a basicidade, com um aumento de 2,45% para o sistema sem ativo e de 7,56% para o sistema com ativo.

Nanosistemas preparados em escala laboratorial tem dificuldade para ser transladado à produção industrial devido aos instrumentos laboratoriais disponíveis que diferem quanto a necessidade para a produção em maior escala. (95) Além das escolhas dos materiais, o tipo de homogeneização é importante para se obter os sistemas monodispersos, o que se leva a ter melhor estabilidade ao longo do tempo. Um ponto para se destacar é que os métodos escolhidos para a homogeneização dos sistemas são simples, o que pode facilitar a transladar a produção

para planos pilotos maiores que 2500 mL de emulsão, visto que é disponível no mercado tanto agitadores magnéticos quanto agitadores mecânicos para grande volume de forma acessível no mercado, além, de posterior produção a larga escala acima de 10 L, com o uso de diferentes tipos de reatores. (96)

Como se observa na figura 10 e figura 11, as estabilidades iniciais, não apresentaram diferenças significativas em relação ao aumento de volume da solução. Os diâmetros das nanopartículas para os sistemas A e C, apresentam variações em função do volume de reação e em relação à presença ou não do ativo. Em geral, nanopartículas sem ativo são menores do que quando comparados a sistemas com ativo, e este comportamento se manteve ao mudar as escalas de obtenção das nanopartículas. Este já era um resultado esperado, visto que, o aumento de tamanho das nanopartículas, pode estar relacionado ao aumento da concentração do ativo, que interage com os outros componentes dos sistemas de nanopartículas. (97)

No sistema de dupla emulsão a concentração do PLGA(50:50) é de (0,01469 g.mL⁻¹) e (4,13x10⁻³ g.mL⁻¹) respectivamente, para as soluções de escala de 30 e 190mL, o que pode justificar o diâmetro diminuir em relação ao aumento de escala para as partículas sem ativo. O mesmo efeito é observado para o sistema de simples emulsão, mas, para as soluções com ativo, onde a concentração do polímero é mantida em 2,4x10⁻³ g.mL⁻¹ em ambas as escalas. (72)

O cálculo da concentração dos tensoativos são diferentes nos sistemas de simples e dupla emulsão, a porcentagem de 1% do PVA para as soluções de dupla emulsão é calculada para uma das fases aquosas, enquanto que a concentração de 0,5% do PVA e de 0,5% do PEG400 é calculado para o volume total da fase aquosa. Então, no processo de escalonamento, esperava-se que com o aumento do volume de água, aumentava-se o gradiente de concentração de polímero da fase orgânica para a fase aquosa, levando, portanto, a uma diminuição do tamanho das partículas, como pode ser observado para as partículas com ativo na solução de simples emulsão. (72)

Em relação ao valor do potencial Zeta, observa-se que há uma tendência em diminuir ao se adicionar o 5-ALA, e aumentar quando as nanopartículas não contêm o ativo. Isto acontece, pois, a carga global do sistema pode ser dependente da presença do ativo. A dependência é mostrada também, na diferença de pH entre as nanopartículas com e sem ativo, onde ao se aumentar os volumes houve aumento do pH das soluções. (97)

Por fim, esses resultados mostrou a viabilidade do método de escalonamento laboratorial, considerando as adaptações realizadas. Deste modo, os cinco sistemas de escolhas foram padronizados em volumes de reagentes e massas dos insumos farmacêuticos, para serem

comprados quanto a formação, estabilidade e proposta de aplicação final para um produto inovador na área de nanotecnologia.

4.2.2 Caracterizações

Avaliação organoléptica, condutividade elétrica, densidade relativa e viscosidade dinâmica

Ao se obter as sínteses eram observadas um resíduo polimérico, e para o sistema C esta sobra era em menor quantidade. Assim como descrito anteriormente, este resíduo era retirado depois do processo de rotaevaporação da acetona, portanto não se descarta perdas do ativo durante a solubilização. Depois de rotoevaporadas, as amostras de nanopartículas eram translúcidas, para as nanopartículas sem ativo. Para as nanopartículas com ativo as amostras ficavam mais opacas, onde as nanopartículas do Sistema C, apresentaram-se sem nenhuma transparência. Para as nanopartículas do Sistema B, tanto a solução com ativo quanto a sem ativo apresentavam-se com fases homogêneas e totalmente transparentes. Nenhum dos sistemas apresentaram qualquer tipo de odor ou separação de fases em 90 dias consecutivos, no entanto, os Sistema A e Sistema D, foram os primeiros a apresentarem corpo de fundo branco, depois de 120 dias, mas ao se homogeneizar as amostras voltavam a apresentar uma única fase. Posterior 160 dias o Sistema C também, apresentou corpo de fundo, e mantinha-se uniforme a homogeneização. A figura 12 mostra em microtubos para centrifuga e em temperatura ambiente, as sínteses desenvolvidas para esta etapa. Com exceção da síntese B, pois, ela era completamente translúcida.

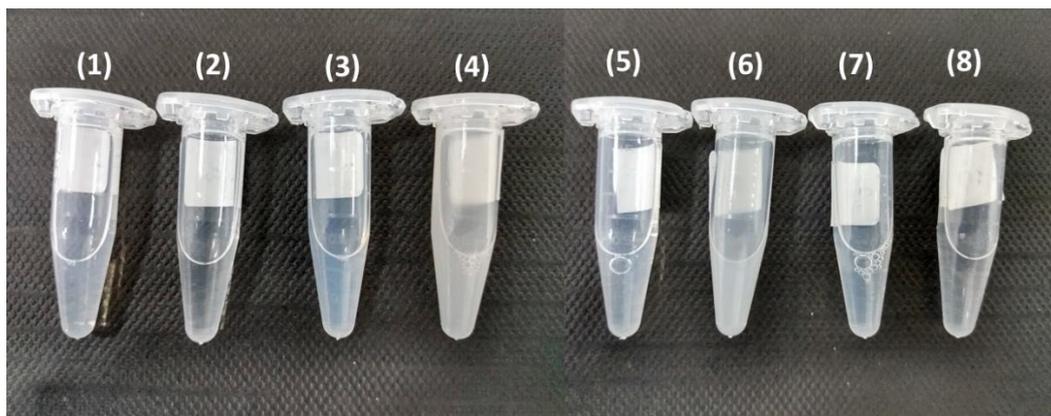


Figura 12 - Soluções de nanopartículas comparando as soluções obtidas por simples e dupla emulsão com PVA e PVA-PEG na fase tensoativa. (1) A-DE-PVA, (2) A-DE-PV,-ALA, (3) D-SE-PVA, (4) A-SE-PVA-ALA, (4) C- SE-PEG-PVA, (5) C- SE-PEG-PVA-ALA, (6) D- DE-PEG-PVA, (5) D- DE-PEG-PVA-ALA.

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 13 indica a condutividade elétrica (σ) e viscosidade dinâmica (η), dos cinco sistemas desenvolvidos, todas as medidas foram realizadas a $(20,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$. No geral, a adição de 5-ALA influenciou nas propriedades da solução, aumentando a condutividade elétrica, viscosidade e a densidade das soluções.

A densidade relativa de todos os sistemas e foi próximo ao da água ($0,9982 \text{ g.mL}^{-1}$), à 20°C , e a adição do 5-ALA aos sistemas não mostra diferença aparente. Em outros estudos para nanopartículas de PLGA para o carregamento de cisplatina há um aumento de densidade para as nanopartículas com ativos (98), além de nanopartículas em pó comerciais PLGA(50:50) (Degradex® PLGA, massa molecular 30000 g.mol^{-1} e tamanho médio de 100 nm, Sigma-Aldrich), são comercializadas com a densidade relativa de $1,3 \text{ g. mL}^{-1}$. Estes fatos mostram que a dependência da densidade relativa é dependente dos materiais envolvidos nas sínteses.

Na figura 13 (A) é possível notar que para todos sistemas com ativo a condutividade elétrica foi maior do que para os sistemas sem ativo. Além disso, a amostra B-SE-PEG apresenta maior condutividade, do que os demais sistemas, tanto na presença ou não do 5-ALA. Há uma diferença percentual entre o sistema B-SE-PEG sem ativo e A-DE-PVA sem ativo de 42,88% de aumento de condutividade. Na literatura filmes de PVA, apresentam condutividade elétrica de $2,78 \times 10^{-3} \mu\text{S.cm}^{-1}$ (99) enquanto nanopartículas de PLGA para o carregamento de cisplatina, de acordo com a variação de massa do PLGA e do ativo nas sínteses, a condutividade elétrica varia entre $3,65$ e $13,52 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (98), para soluções sem e com ativo, respectivamente, as diferenças reportadas podem estar associadas aos componentes e ao tipo de formação das nanopartículas das sínteses. O aumento da condutividade nas nanopartículas com ativo já era um fato esperado. Os cloridratos são uma forma farmacêutica muito comum para diversos tipos

de drogas, incluindo o 5-ALA. Em linhas gerais, os fármacos se originam ou de bases ou ácidos fracos, normalmente são obtidos em forma de seus sais para aumentar a sua hidrofobicidade, dissolução e absorção no alvo de aplicação e aumentando, por fim, sua eficácia terapêutica. Deste modo, acontece a ionização da molécula do 5-ALA em água (base amina), $\text{HCl} \rightarrow \text{H}^+ + \text{Cl}^-$, como já é conhecido (100).

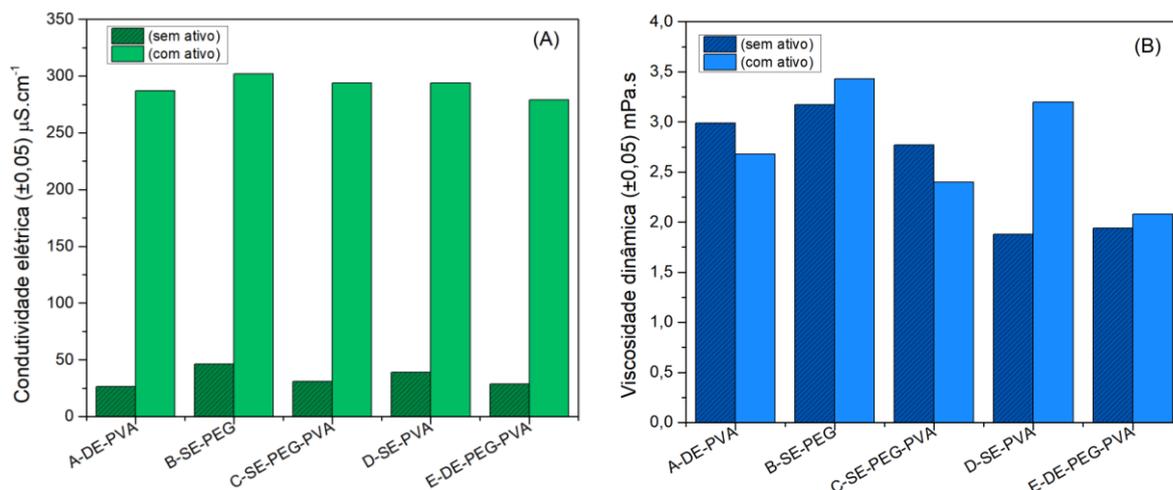


Figura 13 - Medidas para (A) condutividade elétrica (σ), (B) viscosidade dinâmica (η), para os sistemas A-DE-PVA, B-SE-PEG, C-SE-PEG-PVA, D-SE-PVA, E-DE-PEG-PEV para os sistemas sem e com ativo.

Fonte: Elaborada pela autora.

O PVA é normalmente um mau condutor elétrico, pois, ele pode interagir fisicamente com grupos hidroxila (-OH), além de favorecer a formação de complexos, no entanto, segundo a literatura, é possível melhorar a sua capacidade como condutor quando associado a outros polímeros, por exemplo. (101) Uma associação comum, é com o PEG, pois, formam misturas miscíveis, ocorrendo ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila do PVA e -C-O-C- das cadeias de PEG (102) o que pode explicar o aumento de condutividade. Este fato, para a entrega de fármacos favorece ao aumento da condutividade elétrica da pele (que é uma medida de permeabilidade). O aumento da mobilidade iônica na pele, que é limitada devida a difusão através dos lipídios, pode melhorar a entrega do 5-ALA por via transdérmica, proporcionalmente ao aumento do fluxo molecular do fármaco (esta taxa de aumento é uma medida da ruptura lipídica). (103) Há relatos em que o PEG foi capaz de aumentar o fluxo de fármacos como o clonazepam e lorazepam através da pele excisada, enquanto outros estudos, mostram que a combinação de tensoativos aniônicos e catiônicos aumentam a condutividade da pele, que por sua vez aumenta a permeabilidade de fármacos. (104) No entanto, esta proposta, não é suficiente para garantir futuramente, que as nanopartículas sejam capazes, com baixa condutividade elétrica, de ter a capacidade de resposta suficiente para melhorar

permeabilidade, e por isso, deve ser associado a outros mecanismos, como a viscosidade, pH do meio e carga de superfície, por exemplo.

A viscosidade dos sistemas de nanopartículas pode variar de acordo com o material da síntese, concentração do polímero e tipo de ativo, por exemplo. No geral, as viscosidades dinâmicas figura 13 (C), foram maiores que a da água ($1,03 \pm 0,05$ mPa.s (valor teórico de 1,005 mPa.s). A viscosidade mostra que para os sistemas B-SE-PEG, D-SE-PVA e E-DE-PEG-PEV há um aumento de viscosidade quando o 5-ALA é incorporado. Os dois primeiros sistemas citados, são os que apresentam maior viscosidade. A viscosidade dos materiais em água (20°C), de síntese são de 40-48 mPa.s para o PVA e de 105-130 mPa.s⁻¹, sendo assim estes materiais contribuem para o aumento de viscosidade observado. Outro fator, é que assim como foi mostrado e reportado a influência do 5-ALA nas análises de condutividade, a presença do cloridrato também, influencia a viscosidade dos sistemas com o aumento de íons, e em consequência tem-se o aumento do tamanho das partículas (105). Na literatura, nanopartículas de PLGA para o carregamento de cisplatina a viscosidade variou de 1,62 mPa.s à 1,87 mPa.s, a diferença de viscosidade é em função da variação de massa do PLGA e do ativo nas sínteses. (98) Estes resultados implicam em mudanças diretas na formação das partículas, dependentes do tipo de síntese e do ativo.

Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-vis)

Há duas contribuições na figura 14 para as análises no UV-vis, uma na região do UV e uma na região do visível, para os sistemas estudados. Nos sistemas B, C, D e E fica evidente que há a contribuição da banda na região de 400 nm, mostrando a interação com o ativo 5-ALA, o que não pode ser observado para o sistema A, por duas hipóteses: ou houve baixa massa do 5-ALA interagindo com as nanopartículas, como observado na diferença do espectro em 245 nm, não apresentando mudanças significativas na estrutura (adsorvido), ou o 5-ALA pode estar encapsulado no interior das partículas ou o ativo não foi encapsulado. Outra observação importante é que o PEG400 pode interagir mais na região de 400 nm, pois, o sistema com ativo, apresenta deslocamento de pico para a região de 395 nm. Da literatura, sabe-se que o PVA é um polímero que quando puro, não apresenta absorção na região de 200-800 nm mas, quando em solução aquosa, a absorbância do espectro do PVA apresenta um pico característico ente na região de 200 nm. O pico de 194 nm, pode ser atribuído aos grupos carboxílicos -C=O e -C=C, bem como pode ser observado um deslocamento deste para a região entre 197 nm que pode ser associada a presença de grupos acetatos (íon negativo) residuais. (106-108) O PEG400 contém ligação O-C-H, que também pode contribuir para as bandas na região de 200-400 nm. (109) Na

região de 220-270 nm também, pode haver contribuição do ligação $-C=O$ do PLGA(50:50), onde, neste caso, o maior comprimento de onda está relacionado a nanopartículas (110,111), a região de entre 400-500 nm, também pode sugerir interação do PLGA(50:50) com o ativo. (112) Portanto, os espectros de UV-vis mostraram que a absorbância é dependente do método de obtenção das partículas, onde pode haver absorção ou adsorção do 5-ALA nas nanopartículas, observado pelas diferenças de espectros entre as nanopartículas com e sem ativo.

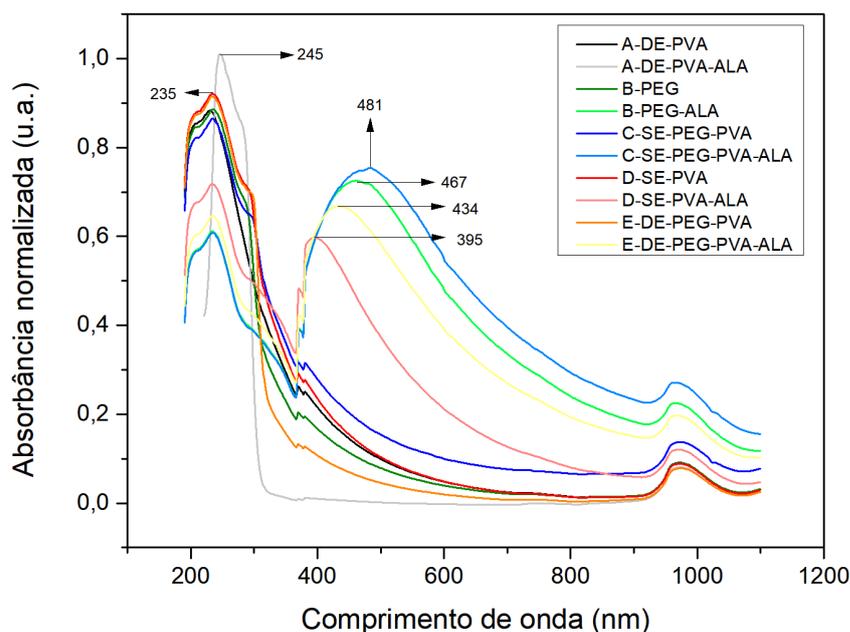


Figura 14 - Espectroscopia no ultra-violeta e visível, para os sistemas de nanopartículas poliméricas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A técnica de NTA, é usada para se obter concentrações e diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas em suspensão, e por isso, é uma técnica comparativa ao DLS. A tabela 8 representa a moda e média para os diâmetros hidrodinâmicos calculados por NTA, comparados a média dos tamanhos por DLS, e as concentrações das partículas.

Tabela 8 - Comparação de tamanho hidrodinâmico para as amostras A-DE-PVA, A-DE-PVA-ALA, C-SE-PEG-PVA, C-SE-PEG-PVA-ALAD-SE-PVA, D-SE-PVA-ALA, E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA, respectivamente para as técnicas de NTA e DLS.

Amostra	NTA Média (nm)	NTA Moda (nm)	NTA Desvio padrão (nm)	DLS Média (nm)	Concentração (partículas. mL ⁻¹)
A-DE-PVA	(225,7±0,7)	(218,3±12,8)	(33,5±1,2)	(226,4±70,2)	1,99x10 ¹² ±3,74x10 ¹⁰
A-DE-PVA-ALA	(192,7±6,5)	(195,1±7,9)	(24,7±4,7)	(195,9±61,2)	1,79 x10 ¹¹ ±1,27x10 ¹⁰
C-SE-PEG-PVA	(153,9±1,3)	(149,0±2,7)	(24,8±3,4)	(151,6±49,0)	1,53 x10 ¹⁴ ±5,62x10 ¹²
C-SE-PEG-PVA-ALA	(334,4±4,0)	(316,3±8,8)	(70,4±3,8)	(377,4±62,6)	1,85 x10 ¹³ ±7,92x10 ¹¹
D-SE-PVA	(142,6±0,9)	(137,9±1,9)	(22,5±1,3)	(181,1±51,2)	2,36 x10 ¹⁵ ±5,69x10 ¹³
D-SE-PVA-ALA	(445,7±18,5)	(341,9±28,5)	(149,9±7,4)	(702,1±118,9)	7,97 x10 ¹¹ ±6,10x10 ¹⁰
E-DE-PEG-PVA	(173,2±0,8)	(165,3±3,5)	(44,2±0,6)	(199,4±60,8)	3,50 x10 ¹⁴ ±7,4x10 ¹²
E-DE-PEG-PVA-ALA	(164,5±4,2)	(153,8±1,9)	(23,3±3,3)	(274,6±117,5)	9,23 x10 ¹¹ ±6,12x10 ¹⁰

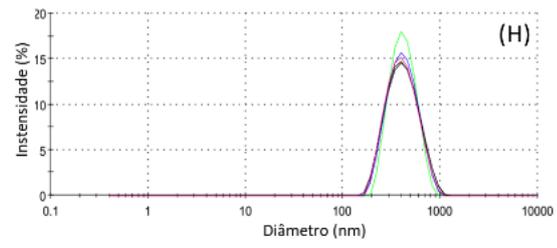
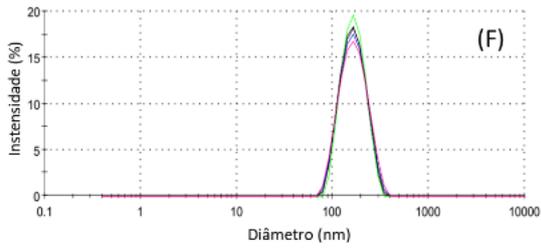
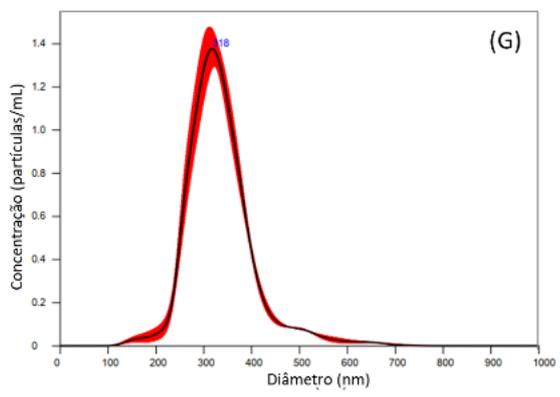
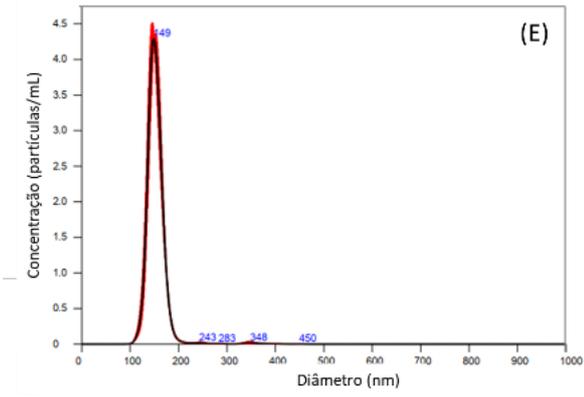
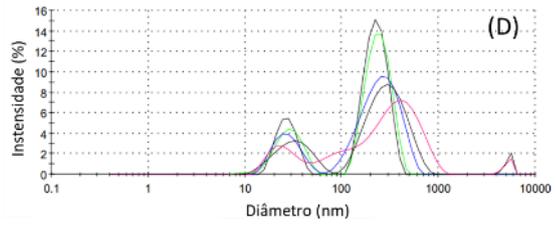
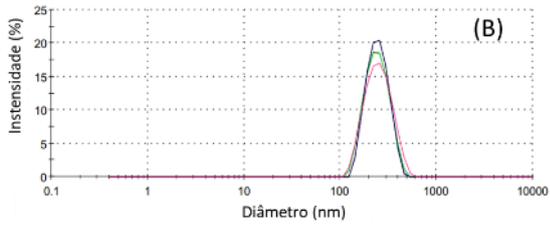
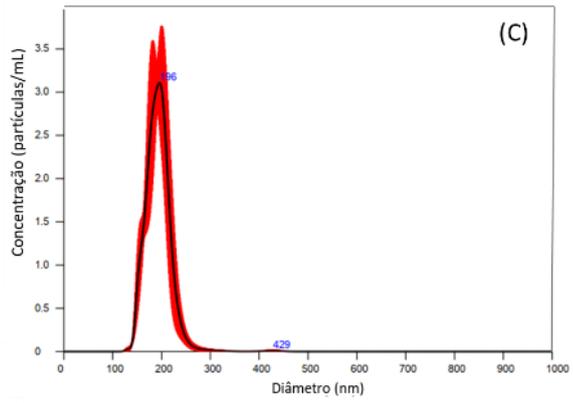
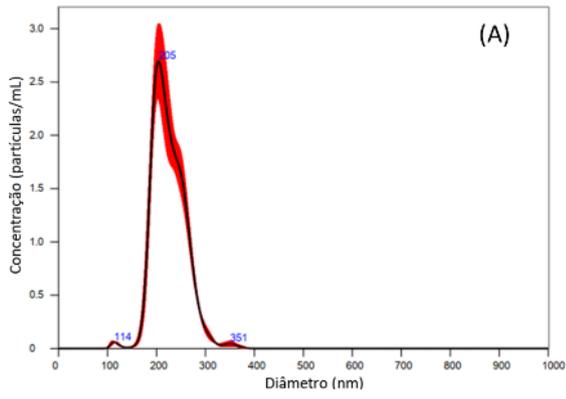
Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se na figura 15, que há diferenças nas distribuições de tamanho entre o DLS e NTA, para as amostras A-DE-PVA-ALA (C-D), D-SE-PVA-ALA (K-L) e E-DE-PEG-PVA-ALA (N-P). As análises de NTA e DLS, se baseiam no movimento Browniano das partículas. No entanto, o NTA é uma técnica que rastreia a posição de cada partícula, quadro a quadro, permitindo o cálculo do coeficiente de difusão e, portanto, o tamanho de cada partícula, determinando com maior precisão a distribuição de tamanho das amostras. Por sua vez, o DLS analisa o sinal de intensidade de luz dispersa dependente do tempo de um único detector, assim ao contrário, do NTA, o DLS não apresenta resolução suficiente para diferenciar populações com tamanhos pequenos na amostra, gerando uma visualização de uma única distribuição gaussiana mais larga, formada por partículas com pequenas diferenças de tamanho, sujeito a mudanças na forma e na posição de medição para medição, dando origem a erros relativamente grandes no resultado médio. A diferença de diluição (10³ e 10², respectivamente, para o NTA e DLS), é um fator importante, visto que o DLS depende de propriedades instrumentais e da própria amostra (como ser translúcida) para a leitura mais apropriadas das partículas. A vantagem é que o DLS conta com um atenuador que é capaz de ajustar as faixas de concentrações das amostras, o que não acontece com o NTA. O NTA requer para leitura concentrações de partículas bem menores do que a concentração analisada por DLS, no entanto, mesmo sem diluir ou concentrando as amostras, não foi possível obter contagens suficientes para se gerar uma curva de distribuição por NTA para as amostras B-SE-PEG e B-SE-PEG-PVA, devido à baixa concentração das partículas obtidas ainda nas sínteses. (113-114)

Um outro ponto é que para o NTA populações formadas por partículas grandes (1000 nm) não comprometem a resolução dos picos, sendo facilmente detectada e dimensionada com precisão, mas para o DLS, como partículas grandes espalham mais luz, a média de tamanhos é calculada em função destas partículas alterando o valor final como pode ser observado na figura

15 (K-L) e figura 15 (O-P). Outro fator importante, o ALA aumenta o tamanho, assim como a funcionalização e adsorção do PEG400 nas partículas. O sistema com maior concentração de partículas por mL, é o sistema C, na ordem de 10^{13} , sendo as concentrações calculadas entre 10^{11} e 10^{15} . A maior concentração de partículas pode justificar o aumento da absorção da região de 480 nm observada no UV-vis. Este é um dado importante para as análises em culturas de células, visto que as concentrações iniciais de partículas não serão fonte de diferença significativa nas maiores concentrações testadas (115).

O desvio do padrão do NTA é menor do que o obtido na média do DLS, o que pode ser consequência da quantidade de dados estatísticos coletados pelo DLS (além das médias, terem sido calculadas para cinco e três repetições de ocasião, respectivamente). Um ponto a se destacar, é que desvio padrão altos estão relacionados às diferentes contagens das partículas entre cada ocasião de repetição (a mesma amostra é mantida no equipamento ao longo das corridas). Este fato, pode levar a uma imprecisão maior na contagem das concentrações das partículas, embora este cálculo seja uma vantagem em relação ao DLS. O DLS é uma técnica mais rápida para se padronizar as leituras das amostras, já o NTA é mais preciso para leituras de amostras monodispersas. As duas técnicas são consideradas complementares, e por isso os resultados são de extrema importância para as etapas seguintes de análises. (113-114)



(continua)

(continuação)

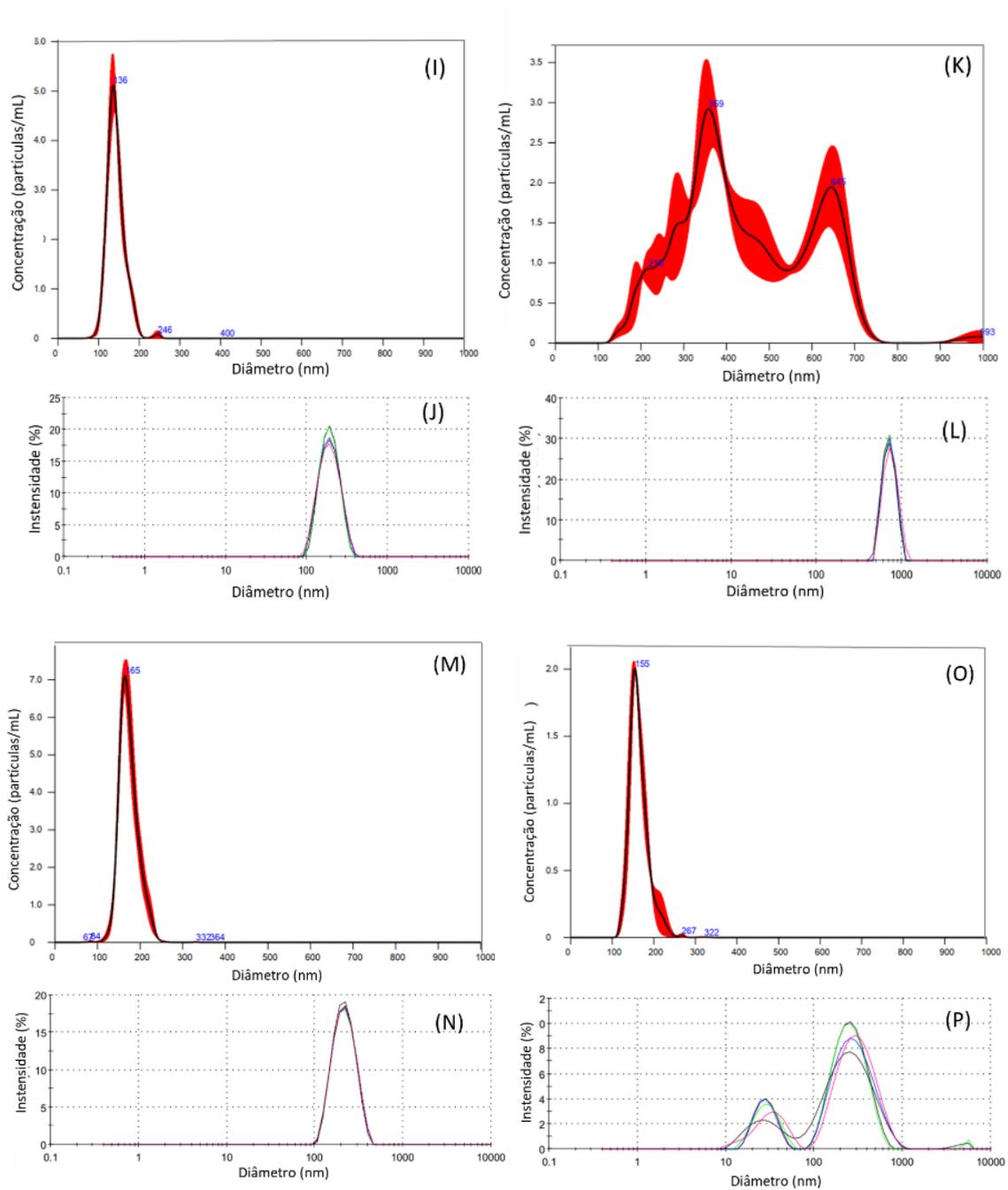


Figura 15 - Comparação de tamanho hidrodinâmico para as amostras (A - B) A-DE-PVA, (C-D) A-DE-PVA-ALA, (E-F) C-SE-PEG-PVA, (G-H) C-SE-PEG-PVA-ALA, (I-J) D-SE-PVA (K-L)D-SE-PVA-ALA,(M-N) E-DE-PEG-PVA e (O-P) E-DE-PEG-PVA-ALA, respectivamente para as técnicas de NTA (distribuição por número) e DLS (distribuição por intensidade). Gaussinas calculadas a partir dos ajustes dos softwares do DLS e NTA.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ângulo de contato e energia de superfície

Após se investigar os tamanhos e concentrações das partículas, o estudo buscou entender as superfícies das amostras para se associar estas características para a entrega transdérmicas. (116) A diferença de polaridade dos líquido-sondas usados nas medidas de ângulo de contato implicou nas diferentes respostas quanto ao grau de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, onde a proporção e diferença dos agentes tensoativos na superfície da partícula de PLGA, além da própria concentração de nanopartículas, interagiram diferente com cada um destes líquido-sondas. No nosso estudo a água, formamida e etilenoglicol são solventes altamente polares, enquanto que o diiodometano é apolar (dispersivo) e as amostras de nanopartículas foram sempre comparadas com o substrato (vidro). Os resultados estão apresentados na figura 16.

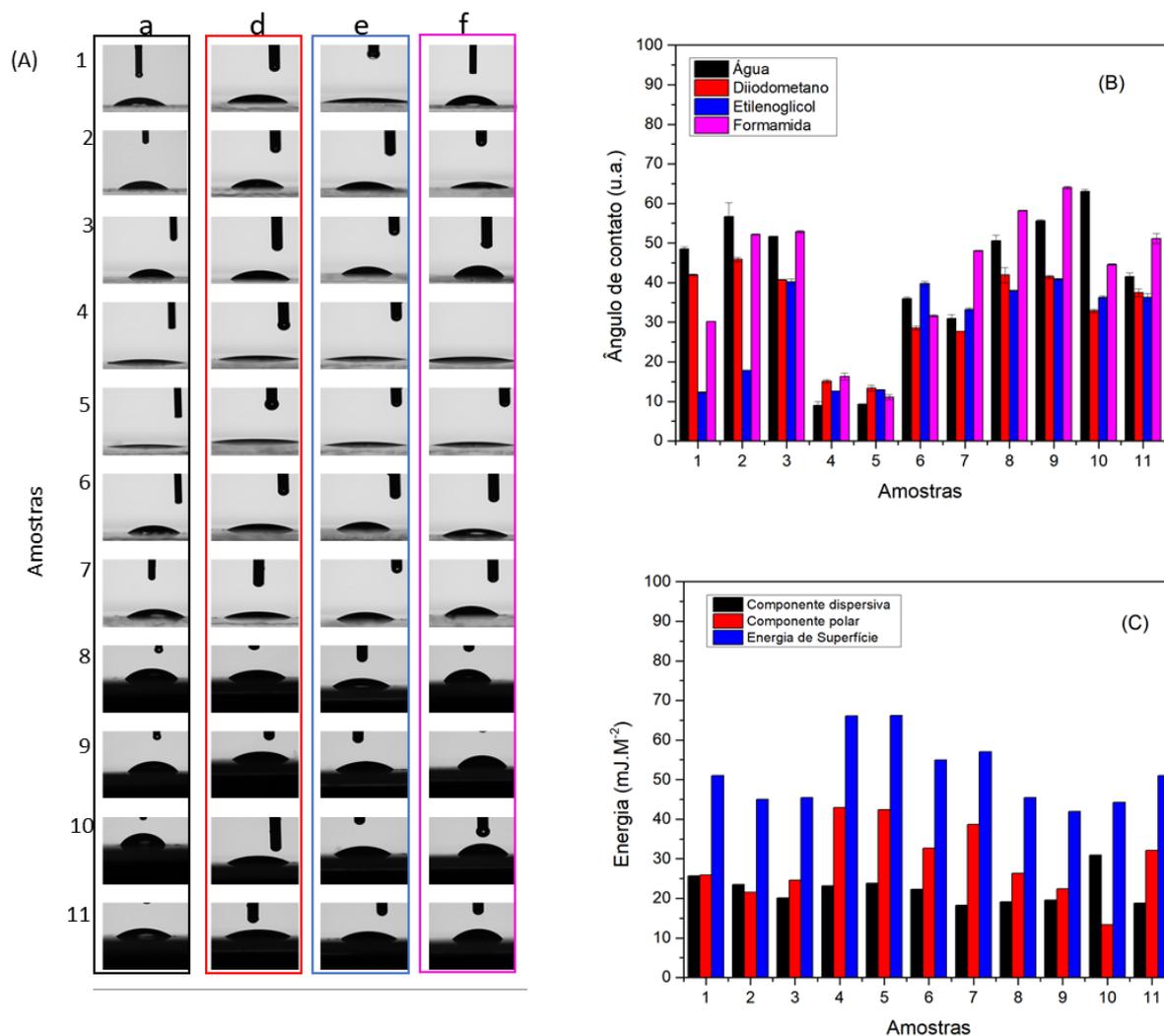


Figura 16 - (A) Representação do ângulo de contato e (B) variação do ângulo de contato para os líquido-sondas água (a), diiodometano (d), etilenoglicol (e) e formamida (f) e (C) energia de superfície e as suas componentes polares e dispersivas para as amostras (1) vidro, (2) A-DE-PVA, (3) A-DE-PVA-ALA, (4) B-SE-PEG, (5) B-SE-PEG-ALA, (6) C-SE-PEG-PVA, (7) C-SE-PEG-PVA-ALA, (8) D-SE-PVA (9)D-SE-PVA-ALA,(10) E-DE-PEG-PVA e (11) E-DE-PEG-PVA-ALA.

Fonte: Elaborada pela autora.

A representação (de uma das medidas) para o ângulo de contato é indicado na figura 16 (A) e as medidas de ângulo de contato são indicadas na figura 16 (B) e energia de superfície na figura 16 (C). Na figura 16 (B) observa-se que a hidrofiliidade é evidente para o sistema B, onde o ângulo de contato diminuiu mais de 80% em relação a água. O 5-ALA diminuiu o ângulo de contato para todos os sistemas, exceto para os sistemas B e D que ficam muito próximos aos sistemas sem ativo, e além disso, o ativo implica em mudança de 34% para o sistema E. Assim, os sistemas A e D, com ativo tem hidrofiliidade próximas, e o sistema C diminui aproximadamente 36% o ângulo de contato em relação a água, sendo segundo mais hidrofílico. Para o diiodometano, apenas o sistema E com ativo, aumenta o ângulo de contato em 14% e o

restante dos sistemas, o 5-ALA diminui o ângulo de contato, em relação as nanopartículas sem ativo. Os sistemas A e D com ativo, tiveram a hidrofiliidade muito próxima ao solvente. Novamente, B é o sistema mais hidrofílico, seguido do sistema C com ativo que diminui o ângulo de contato em 34%, em relação ao sistema sem ativo.

No caso do etilenoglicol, o sistema B apresenta polaridade muito próximo ao do líquido-sonda, e o 5-ALA influencia muito pouco nesta interação. Em relação as nanopartículas sem ativo, os sistemas A e D, apresentam similaridades e aumentam o ângulo de contato, para o sistema C e E os ângulos diminuem, e a influência do 5-ALA é menor para o sistema E. Para a formamida, todas as nanopartículas com ativo, o ângulo de contato fica maior em relação as nanopartículas com ativo, exceto para o sistema B. Note que, no sistema A, o 5-ALA tem pouca influência, e a maior influência é no sistema C, com aumento de mais de 16% do ângulo de contato, e o sistema mais hidrofóbico com ativo, em relação a formamida é o sistema D, com aumento de 47% no ângulo de contato.

Deste modo, apesar do PLGA ser considerado um polímero hidrofóbico, como todos os ângulos de contato foram menores de que 90° e especificamente para a água menor que 65° , temos que todas as superfícies das nanopartículas de PLGA são hidrofílicas, de acordo com esta definição. As medidas de ângulo de contato mostraram a diferença de hidrofobicidade entre os sistemas é dependente do tipo de tensoativo avaliado, e dentre destes grupos observa-se a contribuição do 5-ALA na superfície destas partículas. Esses resultados mostram que a mudança na química da superfície teve uma influência significativa na molhabilidade (hidrofílica ou hidrofóbica), pois, os grupos funcionais polares (-OH) interagem mais facilmente com as moléculas dos polímeros hidrofílicos (PVA e PEG), aumentando a propriedade de molhabilidade dos filmes de nanopartículas (quanto menor o ângulo de contato maior a molhabilidade dos sistemas, como observado para os sistemas B e C com ativo) e diminuindo a tensão superficial dos mesmos. (117-119)

O 5-ALA, tem menos influência nos sistemas B e D, e mostra que os sistemas C e E são semelhantes quanto a dispersividade. Quanto a polaridade o 5-ALA aumenta a interação, mas, para os sistemas A e D, a polaridade é menor. O ativo não apresenta diferença de polaridade para o sistema B. Portanto, a energia de superfície aumenta, quando maior a polaridade (hidrofobicidade) das nanopartículas, assim, como observado para os sistemas com PEG como (sistemas B, C, E em ordem), quanto ao aumento de polaridade.

As superfícies revestidas apenas com PVA são menos polares e diminuem a energia de superfície. Considerando o grau de mudança de energia de superfície causado pela modificação de PEG-PVA, pode-se considerar que a mudança de energia é relacionada mais ao PEG400 do

que a contribuição do PVA na interface, mas é clara a influência do ativo. Na literatura é visto que a estabilização de nanopartículas com Pluronic (não iônico) modifica consideravelmente a energia de superfície de nanopartículas de PLGA. Isto é um dado, que complementa o observado nas análises de potencial Zeta, pois, o PEG400 pode aumentar as interações estéricas repulsivas, capazes de prevenir a desestabilização destas partículas, além de ser um forte indicativo da funcionalização eficaz com o PEG400 (120). Os resultados se complementam de acordo com o observado no aumento da condutividade e o analisado nos espectros UV após a adição do 5-ALA.

A tensão superficial da pele humana é aproximadamente entre 27 mJ.m^{-2} e 28 mJ.m^{-2} , e formulações transdérmicas com igual valor ou inferior, podem facilitar a aderência das nanopartículas na pele facilitando a permeação. (116) Embora, as partículas aqui tenham sido obtidas energia de superfícies maiores do que a pele, outros fatores devem ser considerados como a associação dos tensoativos e a incorporação das soluções de nanopartículas em bases farmacêuticas, que possam diminuir a energia de superfície dos sistemas. Na literatura, o revestimento com tensoativos não-iônicos como o Pluronic F-127, por exemplo, aumentou significativamente a penetração de partículas em lipídios (120), assim, espera-se que os sistemas estabilizados com PVA-PEG potencializem a permeação na pele.

Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os estudos espectrométricos (que constam como FTIR e RMN) mostram a interação do ativo com a matriz de PLGA e a influência do PVA e PEG400 nos sistemas. Este dado é importante para se concluir sobre as análises de superfície das nanopartículas. A figura 17 representa as análises de FTIR para as amostras de (A) 5-ALA, (B) PEG400, (C) PLGA e (E) PVA. Após a análise de cada material, fez-se o estudo detalhado das nanopartículas. Uma análise completa dos grupos funcionais atribuídos para cada um destes materiais estão apresentados no APÊNDICE B na tabela 21, tabela 22, tabela 23 e tabela 24, respectivamente para as amostras (A), (B), (C) e (D).

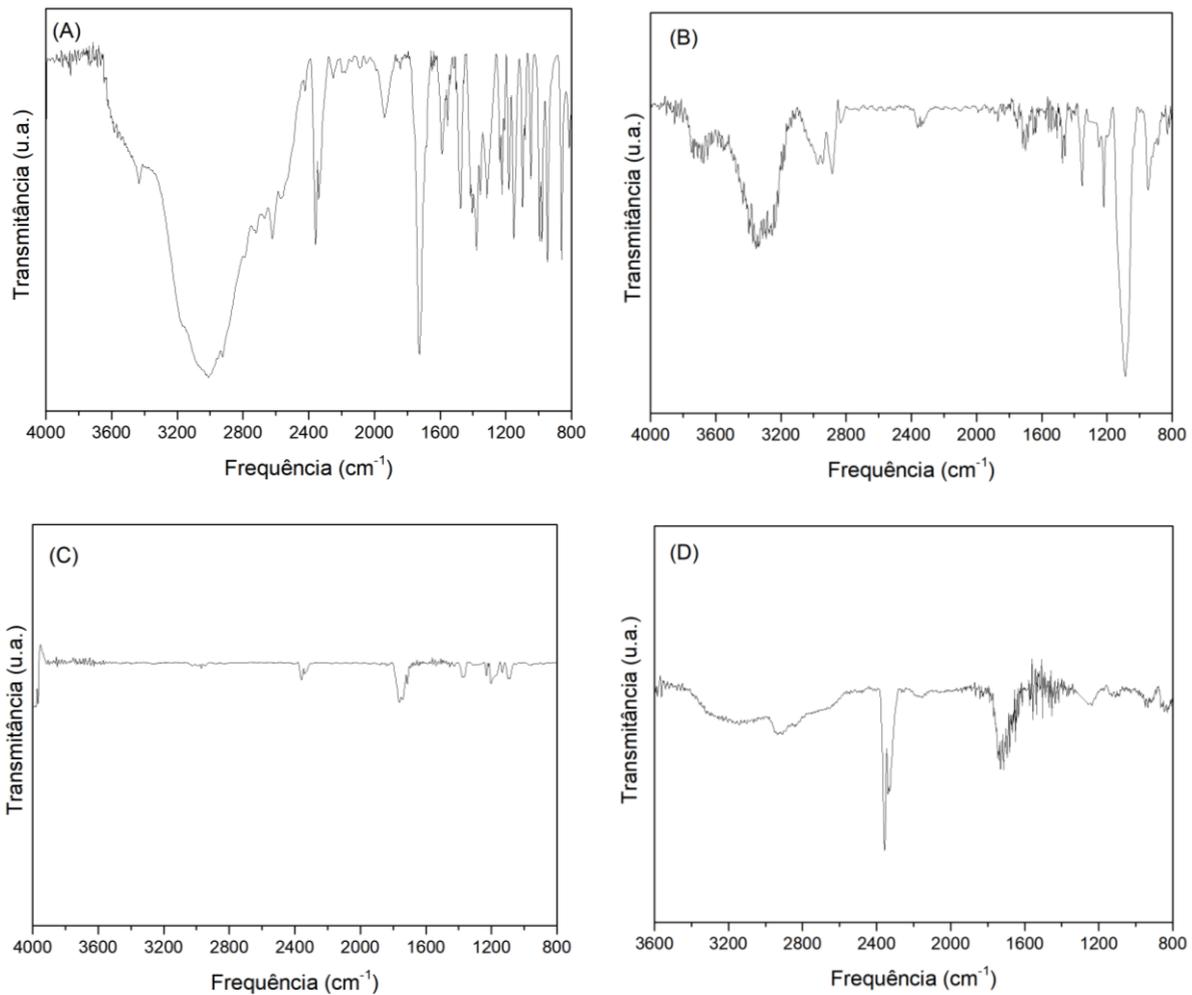


Figura 17 - Análises de FTIR para as amostras (A) 5-ALA, (B) PEG400, (C) PLGA e (D) PVA.

Fonte: Elaborada pela autora.

Depois de se analisar cada material, fez-se o estudo detalhado das nanopartículas. Na figura 18 (A) o pico em $3321,42 \text{ cm}^{-1}$ é atribuído ao grupo hidroxila do álcool polivinílico. O pico da hidroxila da nanopartícula A-DE-PVA tem um pico, que desaparece na presença do 5-ALA na amostra A-DE-PVA-ALA. Isso indica que o grupo hidroxila de dupla emulsão está ligado ao 5-ALA. (121) Além disso, na figura 18 (A), pode-se observar que o PVA tem um grupo funcional $\nu_{\text{as}}\text{C-O}$ típico em $1219,01 \text{ cm}^{-1}$ e $\nu_{\text{s}}\text{C-O}$ em $1097,50 \text{ cm}^{-1}$. (121) Na região carbonila, o pico $\nu_{\text{s}}\text{C=O}$ é encontrado em $1697,36 \text{ cm}^{-1}$ para a emulsão dupla sem ativo.

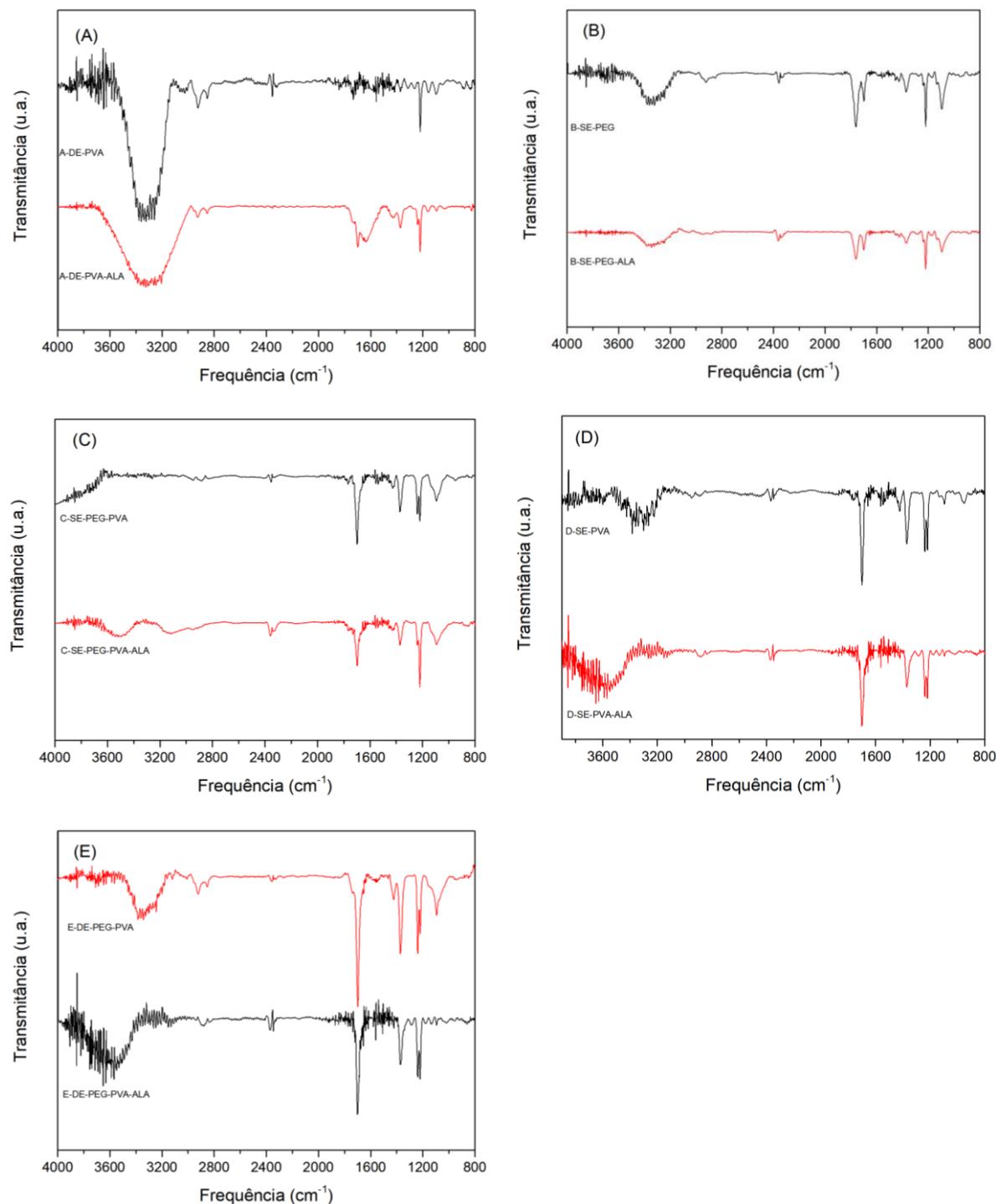


Figura 18 - Análises de FTIR, para as nanoparticulas com ativo e sem ativo, para os sistemas (A) A-DE-PVA e A-DE-PVA-ALA, (B) B-SE-PEG e B-SE-PEG-ALA, (C) C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA-ALA, (D) D-SE-PVA e D-SE-PVA-ALA, (E) E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA.

Fonte: Elaborada pela autora.

A inserção do ALA na dupla emulsão, muda a frequência e aumenta a largura de banda de ν C-O, além de aumentar e ampliar o pico ν C=O, mostrando que o 5-ALA afeta a região éster das duplas emulsões. A variação induzida pelo ativo na frequência de ν CH de 2924,09 cm^{-1} a 2926,01 cm^{-1} , indica um aumento do número da ligação gauche na região do metileno.

(122) Isso se deve à diminuição das interações de *Van der Waals*, permitindo um aumento na distância entre as cadeias de metileno do sistema, reduzindo o empacotamento molecular. (122-123) No espectro do FTIR figura 18 (D) é possível observar um pico amplo referente ao grupo -OH em $3300,20\text{ cm}^{-1}$. Esta banda está localizada na faixa de frequência de $3.200,00\text{ cm}^{-1}$ a $3.570,00\text{ cm}^{-1}$, é típica do hidrogênio ligado intra e intermolecular. (124,125) Considerando o sistema testado, as ligações de hidrogênio ocorrem entre cadeias de PVA, devido às suas maiores forças hidrofílicas. (125) Além disso, um pico observado a $1222,87\text{ cm}^{-1}$ está relacionado ao alongamento assimétrico das ligações $\nu_{as}\text{O-C-C}$ (121,125). Ainda, pelas análises da figura 18 (D), pode-se verificar que a presença do 5-ALA promove o aumento da intensidade do pico de alongamento em relação a -C=O, -OH e -O-C-C. O aumento da intensidade das bandas $\nu_s\text{CH}_2$ e $\nu_{as}\text{CH}_2$ dos polímeros resulta da interação com o 5-ALA. (126)

A diminuição da frequência em relação a $\nu_s\text{CH}_2$ e $\nu_{as}\text{CH}_2$, respectivamente, figura 18 (D), bem como a redução de seus valores de largura de banda, indica a redução de isomerização e a diminuição do movimento do metileno induzida pelo 5-ALA. Essas variações indicam uma organização paralela dos grupos metileno, que é estabilizada pelas interações de Van der Waals, promovidas pela inserção do ativo no sistema (123,127).

Ainda na figura 18 (D) a diminuição na frequência de $\nu\text{C=O}$ mostra que o ALA não perturba o grau de hidratação do sistema, relacionado à quantidade de ligações de hidrogênio. (128-130) No entanto, a diminuição induzida pelo 5-ALA em relação à largura de banda $\nu\text{C=O}$ sugere uma restrição no movimento molecular da carbonila. Por fim, a influência do 5-ALA na região éster dos polímeros também é demonstrada pela diminuição da largura de banda em relação ao $\nu\text{C-O-C}$. As amostras do sistema A e D mostram, portanto, que o 5-ALA interfere nas ligações dos sistemas, mas é possível ver a maior interação do ativo no sistema de simples emulsão. Assim, o ativo está adsorvido nas regiões de superfície das nanopartículas, e o tipo de emulsão pode favorecer estes tipos de ligação, onde o PVA interage significativamente nos sistemas com as ligações realizadas com o ativo. Com estes estudos mostra-se que a depender do método para se obter as emulsões há diferenças na superfície das partículas.

As atribuições dos picos e grupos funcionais para os sistemas de nanopartículas obtidas por dupla emulsão (A-DE-PVA e A-DE-PVA-ALA) e simples emulsão (D-SE-PVA e D-SE-PVA-ALA), estão apresentadas na tabela 9.

Tabela 9 - Comparação das atribuições analisadas por FTIR entre as nanopartículas obtidas por dupla emulsão (A-DE-PVA e A-DE-PVA-ALA) e simples emulsão (D-SE-PVA e D-SE-PVA-ALA), para sistemas estabilizados com PVA, indicando os grupos funcionais após a adição do 5-ALA.⁴

A-DE-PVA Frequência (cm ⁻¹)	A-DE-PVA-ALA Frequência (cm ⁻¹)	Grupo funcional	D-SE-PVA Frequência (cm ⁻¹)	D-SE-PVA-ALA Frequência (cm ⁻¹)	Grupo funcional
2924.09	2926.01	v _s CH	2949.16	2893.22	v _s CH ₂
2852.72	2852.72	v _{as} CH	2891.30	2837.29	v _{as} CH ₂
1697.36	1697.36	v _s C=O	1699.29	1697.37	vC=O
1097.50	1093.64	vC-O	1095.57	1093.64	vC-O

Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 18 (B), tem-se que a interação dos polímeros de nanopartículas com o 5-ALA desloca as frequências de v_sCH₂ e v_{as}CH₂ para valores mais elevados, indicando um aumento da isomerização *trans gauche*, relacionado as interações *core shell* da partícula. Um aumento da largura de banda v_{as}CH₂ pode confirmar a menor restrição no movimento dos metilenos, uma vez que esta banda é mais sensível que v_sCH₂ às mudanças no grau de mobilidade. Por outro lado, o aumento na largura de banda vC=O mostrou um aumento induzido pelo 5-ALA na mobilidade da carbonila. Nenhuma interação do ativo significativa foi detectada no grupo vC-O-C, este já era um resultado esperado dado as características dos sistemas (com aparente sobre polimérica no decorrer das sínteses). As atribuições dos picos e grupos funcionais para o sistema de nanopartículas obtida por simples emulsão (B-SE-PEG e B-SE-PEG-ALA), estão apresentadas na tabela 10.

Tabela 10 - Atribuições analisadas por FTIR entre as nanopartículas obtida por simples emulsão (B-SE-PEG e B-SE-PEG-ALA), para sistema estabilizados com PEG400, indicando os grupos funcionais após a adição do 5-ALA.

B-SE-PEG Frequência (cm ⁻¹)	B-SE-PEG ALA Frequência (cm ⁻¹)	Grupo funcional
2922.16	2945.30	v _s CH ₂
2850.79	2883.58	v _{as} CH ₂
1697.36	1699.29	vC=O
1093.64	1093.64	vC-O-C

Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 18 (C), o pico do grupo PVA -OH na amostra C-SE-PEG-PVA não foi observado, indicando uma forte interação com o PEG400. Estes resultados sugerem que além do PEG400 estar no sistema como tensoativo, este funcionaliza as nanopartículas. Uma sobreposição de bandas de metileno (v_sCH₂ e v_{as}CH₂) foi observada em 2949,16 cm⁻¹ para o

⁴ v (*stretching*, alongamento), v_s (*symetric stretching*, alongamento simétrico), v_{as} (*asymetric stretching*, alongamento assimétrico).

espectro da amostra C-SE-PEG-PVA-ALA. Antes da interação com o 5-ALA, o pico de alongamento do grupo hidroxila dos polímeros foi verificado em $3518,16 \text{ cm}^{-1}$ no espectro. Após a interação com 5-ALA, este pico mudou para $3115,04 \text{ cm}^{-1}$. Não foram observadas alterações no pico $\nu\text{C}=\text{O}$ após a inserção do 5-ALA no sistema, mas, foi observada uma interação discreta do ativo no grupo $-\text{C}-\text{O}-\text{C}$, sugerida pela diminuição da largura de banda do $\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$.

No espectro de FTIR figura 18 (E), da amostra E-DE-PEG-PVA foi possível observar o pico do grupo $-\text{OH}$ (banda de absorção em $3325,28 \text{ cm}^{-1}$), presente tanto nas estruturas de PVA quanto na de PEG. O ombro discreto em $1093,64 \text{ cm}^{-1}$ pode estar relacionado à contribuição de PVA e PEG (grupos $\nu\text{C}-\text{O}$). A variação da largura de banda $\nu\text{C}-\text{O}$ indica a influência do ALA na região interfacial da emulsão dupla. O aumento na largura de banda $\nu_{\text{a}}\text{CH}$ mostra que o ALA pode aumentar a mobilidade da região hidrofóbica, como é observado nas medidas de ângulo de contato e energia de superfície. (129) Além disso, nenhum grupo hidroxila ligado ao 5-ALA foi detectado por FTIR, uma vez que nenhuma alteração no ombro dessa banda foi encontrada. As atribuições dos picos e grupos funcionais para os sistemas de nanopartículas obtidas por dupla emulsão (E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA) e simples emulsão emulsão (C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA-ALA), estão apresentadas na tabela 11:

Tabela 11 - Comparação das atribuições analisadas por FTIR entre as nanopartículas obtidas por dupla emulsão (E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA -ALA) e e simples emulsão (C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA -ALA), para sistemas estabilizados com PVA e PEG, indicando os grupos funcionais após a adição do 5-ALA.

C-SE-PEG-PVA	C-SE-PEG-PVA- ALA		E-DE-PEG- PVA	E-DE-PEG-PVA- ALA	
Frequência (cm^{-1})	Frequência (cm^{-1})	Grupo funcional	Frequência (cm^{-1})	Grupo funcional	Grupo funcional
2947.23	2949.16	$\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$	2922.16	2922.16	$\nu_{\text{s}}\text{CH}$
2885.51	-	$\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$	2852.72	2852.72	$\nu_{\text{as}}\text{CH}$
1697.36	1697.36	$\nu\text{C}=\text{O}$	1699.29	1697.36	$\nu_{\text{s}}\text{C}=\text{O}$
1093.64	1093.64	$\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$	1093.64	1093.64	$\nu\text{C}-\text{O}$

Fonte: Elaborada pela autora.

O PEG gera uma restrição do movimento do grupo $-\text{CH}$, na dupla emulsão E-DE-PEG-PVA figura 18 (E), evidenciada pela redução do PEG da largura de banda do $\nu_{\text{as}}\text{CH}$, afetando, também, a região éster da dupla emulsão, uma vez que foi observada uma redução na largura de banda de $\nu\text{C}-\text{O}$. (129) Um pico típico do grupo hidroxila é mostrado em ambos os espectros, equivalente as amostras E-DE-PEG-PVA figura 18 (E) e D-DE-PVA figura 18 (A). Isso indica que o PEG não interfere na ligação entre os grupos hidroxila do PVA e um agente externo, portanto, funcionalizando as partículas. (121) Além disso, a inserção do PEG na dupla emulsão

E-DE-PEG-PVA afetou apenas a interface do sistema, prevista pela redução da largura de banda do pico ν C-O, mostrando que o grupo hidroxila não está ligado a outro agente, devido ao ombro inalterado do pico da hidroxila. As atribuições dos picos e grupos funcionais para os sistemas de nanopartículas obtidas por dupla emulsão (E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA) e (A-DE-PEG-PVA e A-DE-PEG-PVA-ALA), estão apresentadas na tabela 12:

Tabela 12 - Comparação das frequências por FTIR para os sistemas obtidos por dupla emulsão, mostrando a influência do PEG.

A-DE-PVA	E-DE-PEG-PVA		A-DE-PVA-ALA	E-DE-PEG-PVA-ALA	
Frequência (cm ⁻¹)	Frequência (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Frequência (cm ⁻¹)	Frequência (cm ⁻¹)	Grupo funcional
2924.09	2922.16	ν_s CH	2922.16	2922.16	ν_s CH
2852.72	2852.72	ν_{as} CH	2852.72	2852.72	ν_{as} CH
1697.36	1699.29	ν_s C=O	1697.35	1697.36	ν_s C=O
1097.50	1093.64	ν C-O	1093.64	1093.64	ν C-O

Fonte: Elaborada pela autora.

Novamente, estas análises indicam que o tipo de emulsão tem influência na formação das nanopartículas, além de comprovar a funcionalização do PEG e a interação do ativo na superfície das mesmas, estando de acordo com os resultados anteriores.

Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de átomos de hidrogênio (1H-RMN)

Para se complementar os estudos de superfície, analisamos os espectros de RMN. os espectros da indica que figura 19 (A) 5-ALA em D₂O onde tem-se os três picos principais correspondem ao grupo -CH₂ em ~2,7 ppm (t), o grupo -CH₂ em ~2,90 ppm (t), e o -CH₂ grupo a ~4,14 ppm (s), figura 19 (B) PEG em D₂O com um sinal em 3,65 ppm que pertence a -CH₂CH₂O prótons do metileno, figura 19 (C) PLGA em acetona mostrando três sinais bem claros que correspondem ao polímero (o grupo metil do ácido polilático (LA) a ~1,5 ppm (t), o grupo -CH de LA a ~5,2 ppm, e o grupo -CH₂ do ácido poliglicólico (GA) e em ~4,8 ppm é associado a acetona-D₆ e figura 19 (D) PVA em D₂O, mostrando um multiplete a 1,5-1,9 ppm para CH₂ e um pico largo 3,9-4,1 ppm para -CH. (131-134)

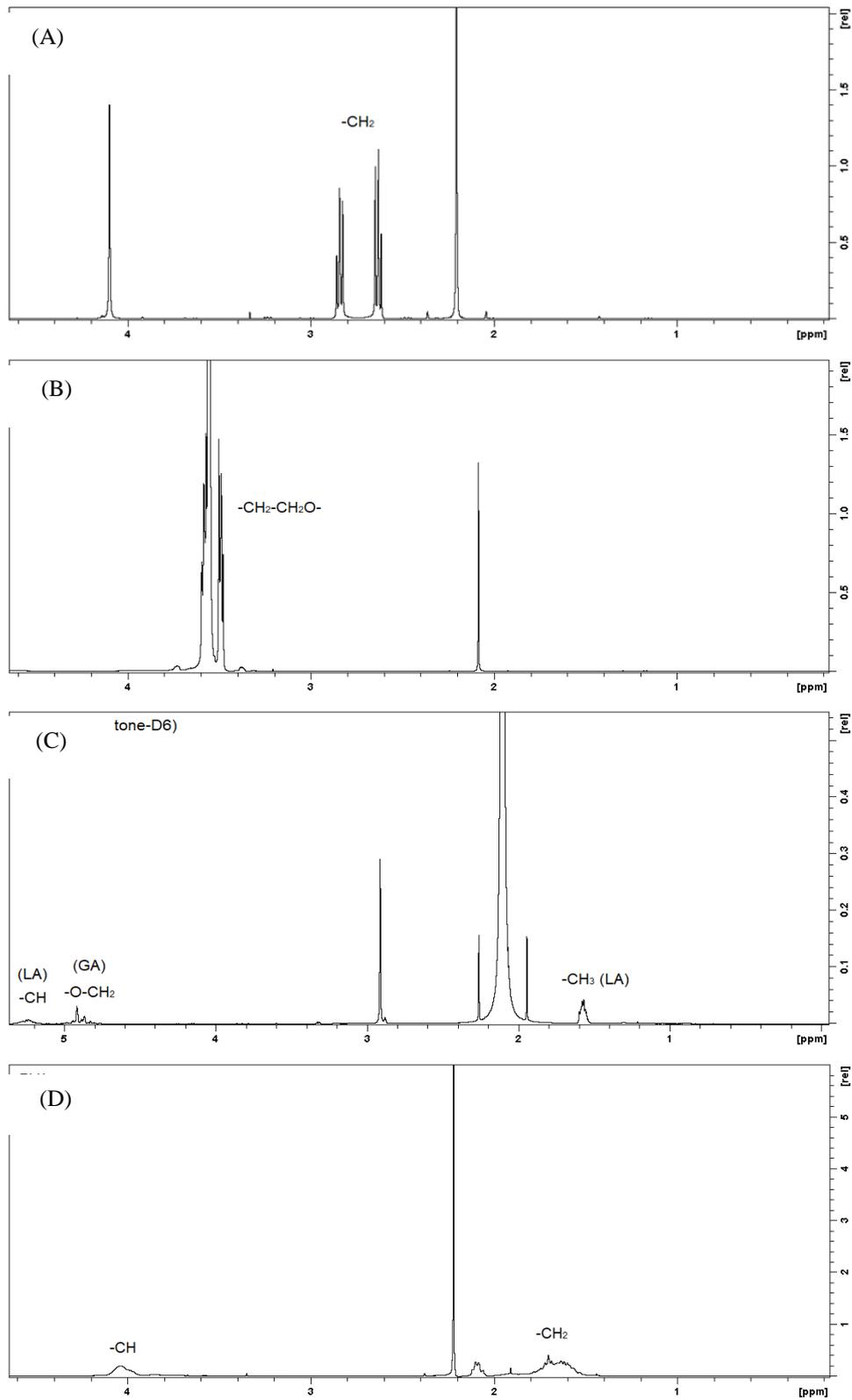


Figura 19 - Espectros de RMN (A) 5-ALA em D₂O, (B) PEG em D₂O, (C) PLGA em acetona e (D) PVA em D₂O.
Fonte: Elaborada pela autora.

Para as nanopartículas temos que a figura 20 (A) para a amostra A-DE-PVA apresenta o pico na faixa de 3,9 a 4,1 ppm que é atribuído ao próton metino do PVA (-CH) e o pico amplo a 1,50 ppm representa uma sobreposição dos grupos -CH₃ e CH₂ das estruturas PLGA e PVA, respectivamente. (132-135) Como o PLGA, é um copolímero de ácido polilático (LA) e ácido poliglicólico (GA), há a observação nítida da contribuição destes nos espectros. A figura 20 (B) mostra os espectros para as nanopartículas A-DE-PVA-ALA, onde a adição de ALA na amostra de PVA-PLGA foi confirmada pela presença de picos em 2,7 e 2,9 ppm relativos a grupos a -CH₂ das nanopartículas. (131)

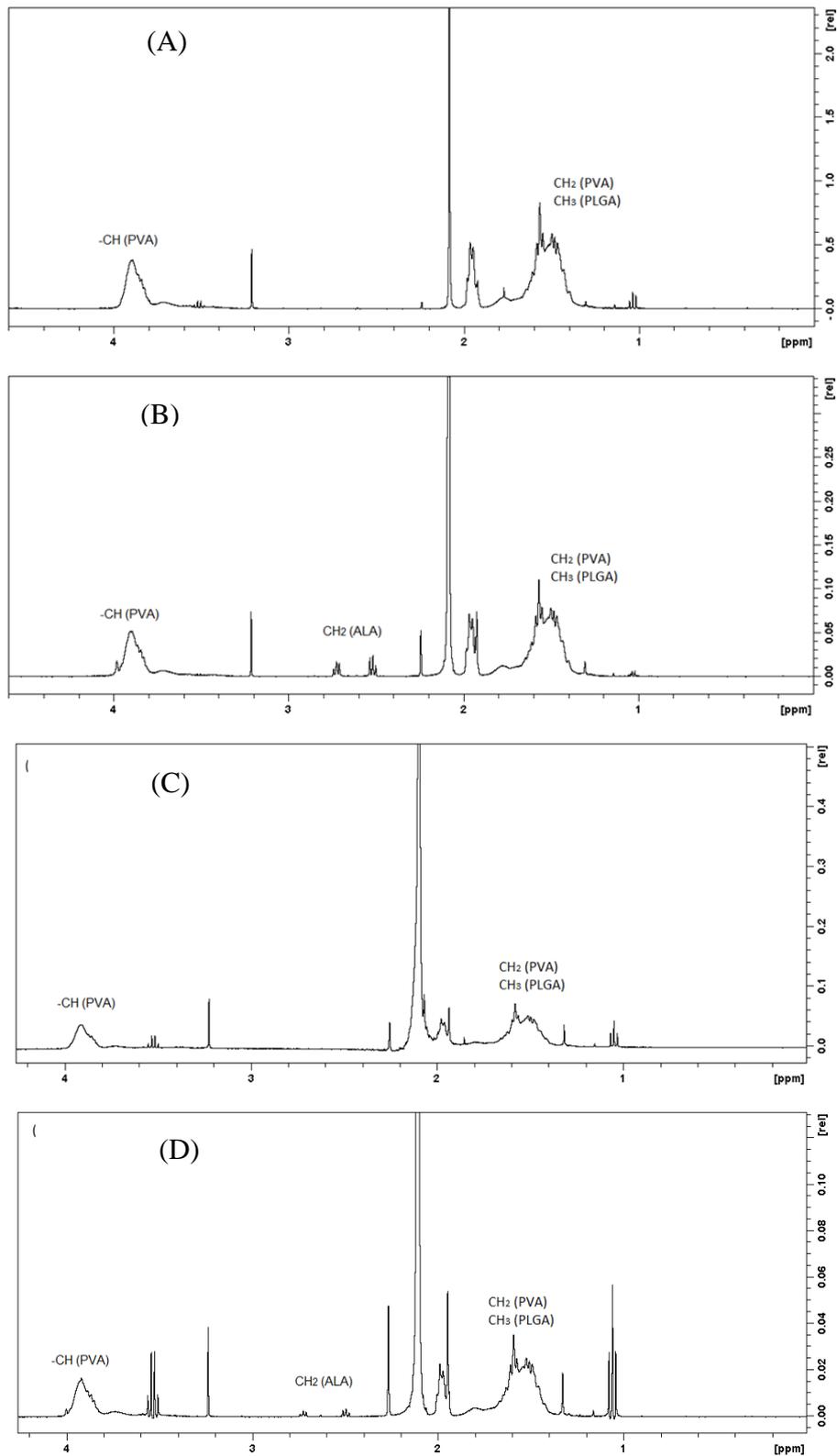


Figura 20 - RMN de nanopartículas obtidas por dupla emulsão (A) A-DE-PVA e (B) A-DE-PVA-ALA e simples emulsão (D) D-SE-PVA e (E) D-SE-PVA-ALA, estabilizadas com PVA.

Fonte: Elaborada pela autora.

As medidas dos tempos de relaxação T_1 fornecem informações sobre o movimento rotacional de grupos específicos em uma molécula, uma vez que este parâmetro é sensível às interações intermoleculares. (136-139) Foi realizado a recuperação de FID de próton de grupos PVA $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}$, antes e depois da interação com ALA, construindo uma curva onde os valores de T_1 foram calculados e estão listados na tabela 13. O ALA induziu um discreto aumento nos valores de PVA T_1 , reduzindo a taxa de rotação dos metilenos do tensoativo. (140,141)

Tabela 13 - Efeito do 5-ALA nos tempos de relaxação de spin-rede de ^1H NMR (T_1) em comparação aos sistemas obtidos por simples (D-SE-PVA e D-SE-PVA-ALA) e dupla emulsão (A-DE-PVA e A-DE-PVA-ALA).

Pico	T_1 (s) A-DE- PVA	A-DE-PVA-ALA	Δ	D-SE-PVA	D-SE-PVA- ALA	Δ
$-\text{CH}_2$ (PVA) (1.85-1.16 ppm)	0.1273	0.1378	0.0105 (7.62%)	0.2090	0.1331	-0.0759 (36.32%)
$-\text{CH}$ (PVA) (4.00-3.76 ppm)	0.1268	0.1314	0.0046 (3.50%)	0.1870	0.1159	- 0.0711 (38.02%)

Fonte: Elaborada pela autora.

O espectro B-SE-PEG figura 21 (A) mostra pico acentuado a 3,65 ppm, correspondendo aos grupos de metileno $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ do PEG mostrando a influência no sistema. Este pico foi também encontrado no espectro de B-SE-PEG-ALA figura 21 (B), onde é possível ser observado picos típico do 5-ALA em $\sim 2,7$ ppm (t) e o grupo CH_2 em $\sim 2,90$ ppm (t). (131)

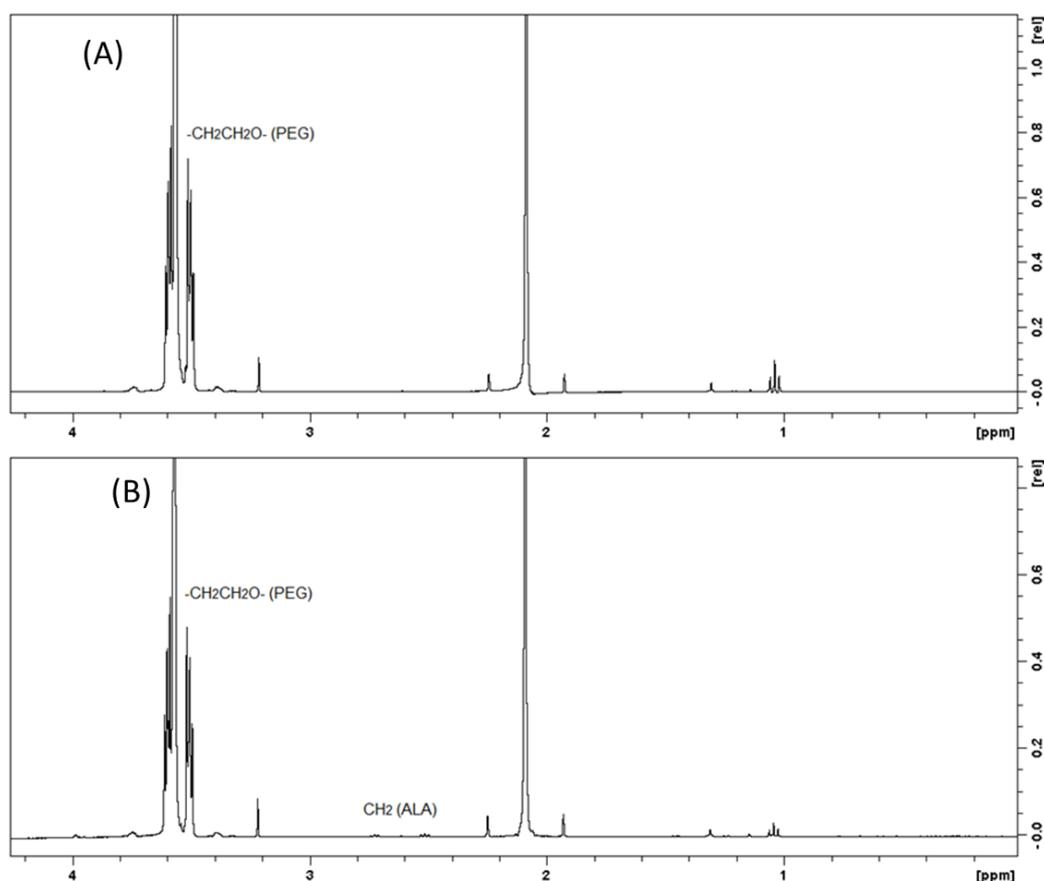


Figura 21 - NMR de nanopartículas obtidas por simples emulsão (A) B-SE-PEG e (B) B-SE-PEG-ALA, mostrando a interação do 5-ALA.

Fonte: Elaborada pela autora.

A tabela 14 mostra a recuperação FID de prótons do PEG $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, antes e após a interação com ALA, com os tempos de T_1 (s) calculados. Os resultados descritos mostraram que o ALA diminuiu em 8,42% os valores T_1 dos prótons PEG $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$. Isso sugere que o ALA aumenta o movimento de rotação na região do PEG.

Tabela 14 - Efeito do 5-ALA nos tempos de relaxação de spin-rede de ^1H NMR (T_1) no sistema de simples emulsão B-SE-PEG e B-SE-PEG-ALA, estabilizados por PEG.

Pico	T_1 (s)		
	B-SE-PEG	B-SE-PEG-ALA	Δ
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ (3.6-3.1 ppm)	0.1663	0.1549	-0.014 (8.42%)

Fonte: Elaborada pela autora.

Os espectros C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA-ALA são mostrados na figura 23 (A) e (B), respectivamente. Como citado antes, o pico acentuado em 3,65 ppm corresponde a grupos metileno $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ do PEG e entre 3,9 ppm e 4,1 ppm está relacionado à estrutura do PVA (133,134). O pico amplo a 1,50 ppm representa uma sobreposição dos grupos $-\text{CH}_3-$ e CH_2- das estruturas PLGA e PVA, respectivamente. (132-135) O espectro de C-PEG-PVA-

ALA figura 23 (B) mostra os picos de prótons típicos do grupo $-\text{CH}_2$ do ALA em $\sim 2,7$ ppm (t) e do grupo CH_2 em $\sim 2,90$ ppm (t) (131).

Os espectros de D-SE-PEG-PVA e D-SE-PEG-PVA-ALA são mostrados na figura 23 (C) e (D) , respectivamente. O pico em 3,65 ppm corresponde aos grupos $-\text{CH}_2\text{CH}_2$. O grupo metileno do PEG entre 3,9 ppm e 4,1 ppm é encontrado também na estrutura do PVA. O pico amplo a 1,50 ppm representa uma sobreposição dos grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ das estruturas PLGA e PVA, respectivamente. O espectro de D-SE-PEG-PVA-ALA também mostra os picos de prótons típicos do grupo 5-ALA $-\text{CH}_2$ em $\sim 2,7$ ppm (t) e do grupo $-\text{CH}_2$ em $\sim 2,90$ ppm (t).

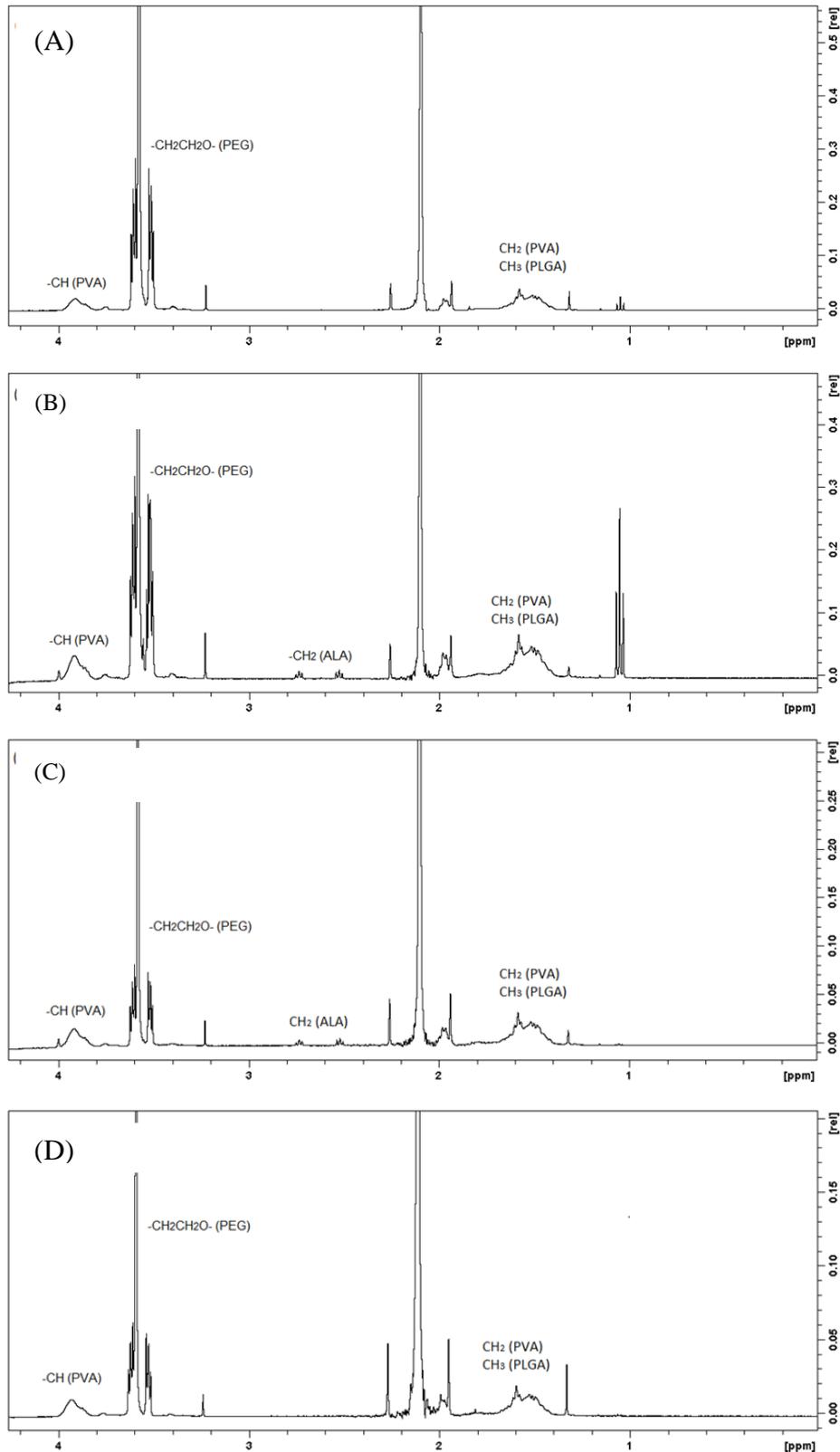


Figura 22 - RMN de nanopartículas de simples emulsão (A) C-SE-PEG-PVA e (B) C-SE-PEG-PVA- ALA e dupla emulsão (C) E-DE- PEG-PVA e (E) E-DE-PEG-PVA-ALA, estabilizadas com PVA e PEG, mostrando a interação do 5-ALA.

Fonte: Elaborada pela autora.

A tabela 15 mostra a recuperação de FID de RMN dos grupos PVA $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}$ e do grupo PEG $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, antes e após a interação com ALA, para os sistemas simples emulsão (A) C-SE-PEG-PVA e (B) C-SE-PEG-PVA-ALA e dupla emulsão (C) E-DE-PEG-PVA e (E) E-DE-PEG-PVA-ALA.

Tabela 15 - Efeito do 5-ALA nos tempos de relaxação de spin-rede de NMR (T_1) em comparação aos sistemas obtidos por simples (C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA-ALA) e dupla emulsão (E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA).

Pico	T_1 (s)		Δ	E-DE-PEG-PVA	E-DE-PEG-PVA-ALA	Δ
	C-SE-PEG-PVA	C-SE-PEG-PVA-ALA				
$-\text{CH}_2$ (PVA) (1.85-1.16 ppm)	0.1535	0.1386	-0.0149 (9.71%)	0.1872	0.1421	0.0451 (24.09%)
$-\text{CH}$ (PVA) (4.00-3.76 ppm)	0.1266	0.1199	-0.0067 (5.29%)	0.1317	0.1148	0.0169 (12.83%)
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ (PEG) (3.6-3.1 ppm)	0.1461	0.1518	0.0057 (3.75%)	0.1487	0.1268	0.0219 (14.73%)

Fonte: Elaborada pela autora.

Para os sistemas obtidos por simples emulsão, os resultados apresentados indicam que o ALA tem um leve efeito em todos os grupos dos polímeros testados, reduzindo os valores de T_1 para os grupos PVA e aumentando muito discretamente para o grupo PEG. Assim, o 5-ALA desordena os grupos de PVA, mas tem um efeito ligeiramente restrito, ou quase nenhum, nos grupos de PEG. Isto indica a forte interação do ativo com o PVA.

Para os sistemas obtidos por dupla emulsão, o 5-ALA reduziu os valores T_1 do PVA e PLGA, reduzindo o empacotamento molecular na região hidrofóbica. É importante notar que este efeito é oposto ao relacionado com a dupla emulsão A-DE-PVA, talvez por influência do PEG, assim como foi observado a mesma relação nos espectros de UV-Vis. Portanto, os resultados apresentam uma provável competição entre o PVA e PEG para interagir com o 5-ALA. O 5-ALA interage mais com as regiões do metileno quando o PEG está no sistema, isto é possível porque o PEG tem um papel espaçador nas camadas da superfície formada, e assim o ALA se insere mais profundamente no sistema E-DE-PEG-PVA, do que em relação ao A-DE-PVA, isto é, 5-ALA fica mais disponível no *core shell* da partícula ao interagir com o PEG. Assim, considerando as interações moleculares, é provável que o PEG interaja mais fortemente com o ALA do que com o PVA, possivelmente tornando o perfil de liberação do 5-ALA mais lento do que no caso dos sistemas sem o tensoativo PEG.

Fica fácil de entender estas interações, quando comparamos os espectros das duplas emulsões dos sistemas A e D, figura 20, e observamos que o pico encontrado na faixa entre 3,9 ppm a 4,1 ppm é atribuído ao próton metino do PVA (-CH) e o pico amplo a 1,50 ppm representa uma sobreposição dos grupos -CH₃ e -CH₂ das estruturas PLGA e PVA, respectivamente. O espectro das emulsões duplas D-DE-PEG-PVA mostra, também, um grande pico a 3,65 ppm, correspondendo aos grupos metileno -CH₂CH₂O do PEG. Quando olhamos o efeito de T₁, tabela 16, a inserção de PEG em nanopartículas de PVA-PLGA aumenta os valores T₁ dos grupos PVA -CH₂ e -CH em 32% e 3,7%, respectivamente, mostrando que o PEG diminui o movimento rotacional dos grupos de PVA no sistema.

Tabela 16 - Efeito do PEG em sistemas PVA-PLGA. Tempos de relaxação de spin-rede de ¹H NMR (T₁, s).

	PVA-PLGA	PEG-PVA-PLGA	Δ
-CH ₂ (PVA) (1.85-1.16 ppm)	0.1273	0.1872	0.0599
-CH (PVA) (4.00-3.76 ppm)	0.1268	0.1317	0.0049

Fonte: Elaborada pela autora.

Finalmente, as análises aqui apresentadas mostram as diferenças de superfícies para os diferentes métodos. Esta é uma etapa muito importante e que contribui significativamente com a literatura específica de obtenção de sistemas de nanopartículas poliméricas.

4.2.3 Estabilidade físico-química dos sistemas de nanopartículas

Estabilidade forçada do 5- ácido aminolevulínico em função do tempo

A estabilidade forçada do 5-ALA (PDT Pharma) em solução aquosa para a comparação com os sistemas com ativo, é uma etapa qualitativa e quantitativa importante para se associar possíveis degradações nos sistemas de nanopartículas, já que são obtidas e mantidas em meio aquoso. O grande aumento do uso do 5-ALA em terapia fotodinâmica requer o desenvolvimento de soluções quimicamente estáveis, principalmente para não se ter a dimerização da molécula, o que pode levar a formação de produtos químicos não desejáveis. (24) A figura 23 mostra que nas concentrações e temperaturas analisadas não houve mudanças significativas de pH e no final das análises não houve mudança de coloração das soluções. No entanto, para a temperatura de 40°C e o ciclo há uma maior instabilidade ao longo do tempo. Segundo a literatura, uma solução de ALA, à 0,3 g.mL⁻¹, no pH 1,7, ajustado com ácidos fortes como HCL (1N), não apresenta mudanças significativas de pH, durante seis semanas, à 40°C, enquanto houve a degradação de 5% do ALA em água (sem ajuste de pH) pura nas mesmas

condições de armazenamento. (142) O pH das soluções e a concentração é um fator muito importante para a estabilização da molécula em solução aquosa.

Segundo Cerize (21), para a maioria dos sistemas que incorporam o 5-ALA os pH são muito ácidos, o que pode interferir na conversão e produção de protoporfirina IX. O pH do meio pode ser aumentado para os valores de pH 7 a pH 7,5 o que podem potencializar a produção de protoporfirina IX, mas o pH fisiológico pode comprometer a estabilidade dos sistemas, pois, neste pH a molécula do 5-ALA sofre dimerização. Outro ponto da literatura (23,25) é que soluções em pH 3,0 (ou menores) apresentam maiores estabilidades do que aquelas mantidas em pH 7, apresentando estabilidades de 37 horas, quando mantidas a 50°C, no entanto estes resultados são dependentes também da concentração do ativo em solução e da temperatura de armazenamento. Quanto mais baixo a concentração em pH fisiológicos, menores a chance de degradação do ativo.

Para Novo *et al.* (25) quando o ALA é mantido no pH 2,35 o 5-ALA fica estável pois o seu grupo amino fica protonado, e estando protonado não reage com o grupo cetona de outras moléculas presentes no meio e não ocorre a dimerização. Quando há uma maior concentração de prótons no meio (relacionado ao tempo de reação) o pH diminui e tornando-se de coloração âmber-amarelada. Deste modo, os pHs das soluções das nanopartículas foram mantidos no pH ácido para retardar o processo de degradação. Como o 5-ALA está presente adsorvido na superfície e entre as cadeias poliméricas do PVA e do PEG400, esta é uma etapa importante no desenho destes sistemas.

É importante destacar que estas análises não apresentam-se na concentração teórica do 5-ALA utilizado nas nanopartículas de PLGA se há produtos de degradação (para isso seria necessário análises por espectroscopias como RMN ou UV-vis), apenas mostra o comportamento da molécula em meio aquoso, sem ajuste de pH ou adição de conservantes. Trabalhamos com a medida de pH como indicativo de estabilidade ao longo do tempo.

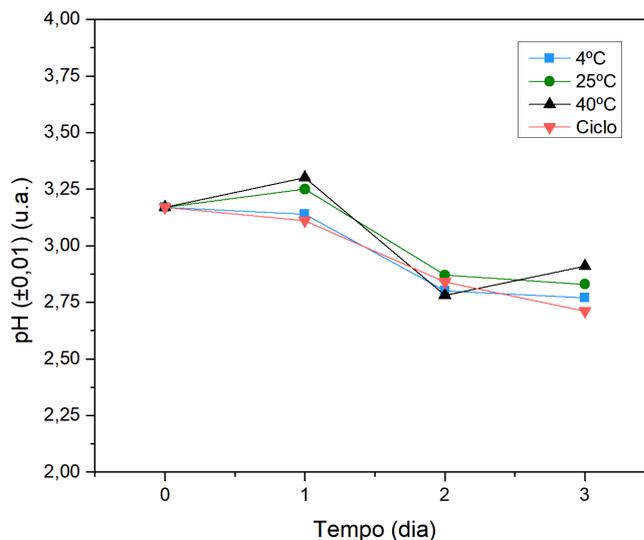


Figura 23 - Estabilidade forçada do 5-ALA em meio aquoso, por quatro dias consecutivos, à temperatura de 4°, 25°, 40°C e ciclo (24h à 4° e 24h à 40°C).

Fonte: Elaborada pela autora.

Estabilidade forçada das nanoemulsões em função do tempo (centrifugação 3000 rpm e temperatura 56°C)

Os testes de estabilidade forçada ou acelerada em função do tempo (centrifugação 3000 rpm e temperatura 56°C) implicaram na tomada de decisão quanto a escolha das nanoemulsões com perspectiva para serem produtos farmacêuticos embasados em qualidade, segurança e eficácia. Para se aumentar a confiabilidade da interpretação dos resultados incluiu-se em todas as análises dois sistemas como material de referência (um embasado na literatura, que é o sistema denominado A, representando a influência na formação e estabilidade do tensoativo PVA e o sistema denominado como B, representando a influência do PEG).

Em estágios iniciais de desenvolvimento, condições extremas de temperatura e umidade são investigadas não apenas para prever e identificar os produtos de degradação (que podem ser encontrados ao longo do tempo) mas, também, para avaliar as condições de armazenamento, para os candidatos a produtos promissores para a indústria (143). No teste forçado de centrifugação o aumento de mobilidade das partículas em solução, relacionado a aplicação da força centrífuga pode potencializar a precipitação das nanopartículas, simulando um aumento força/aceleração que o produto está submetido. (67) Isto é semelhante ao que pode acontecer em meios de transporte terrestres e aéreos destas partículas, da indústria até o consumidor final. Ambos são testes de caráter investigativo quantitativo e qualitativos.

Para os testes de centrifugação, figura 24, APÊNDICE B, as nanoemulsões apresentaram estabilidade de pH no final de três ciclos de agitação de 3000 rpm, por 30 minutos cada. As amostras para os sistemas D-SE-PVA e E-DE-PEG-PVA, apresentaram a maior

variação de pH entre o primeiro e o terceiro ciclo (com diferença de 3,72% e 8,03%, respectivamente para cada sistema). Quanto as avaliações organolépticas os sistemas com ativo não apresentavam corpo de fundo e não se observou-se alteração de pH significativas para nenhum dos sistemas com a presença de PEG-PVA como tensoativos. Como já era esperado, o sistema B-SE-PEG foi o menos instável, embora pelas características organolépticas da emulsão, não tenha se observado separação de fases. A diferença entre o pH inicial e o final foi de 4,46%, 4,08% e 1,42%, respectivamente para os sistemas B-SE-PEG-ALA, C-SE-PEG-PVA-ALA e E-DE-PEG-PVA-ALA. A amostra D-SE-PVA foi a única que era possível observar separação de fase com a formação de corpo de fundo denso e a amostra E-DE-PEG-PVA apesar de apresentar maior turbidez de meio e separação de fase, não havia a presença de corpo de fundo. O teste de centrifugação, não foi um teste de exclusão, pois, não houve evidências de desestabilização dos sistemas que implicavam em reformulações dos mesmos.

A partir do resultado anterior as sínteses foram submetidas a estabilidade forçada ou acelerada em função do tempo, através de uma condição extrema de temperatura (56°C) (67), APÊNDICE B, figura 66. Nas avaliações ao final de 48 horas de estudo percebeu-se que as emulsões ficavam mais translúcidas, indicando a sedimentação, confirmadas pelo aumento da distribuição de tamanho ao término do estudo. A alteração da temperatura levou a mudanças no pH e potencial Zeta, explicados pela presença de grupos funcionais ou espécies iônicas no meio e na superfície das nanopartículas (33). No final das análises as emulsões com a presença do PVA estavam mais translúcidas quando comparadas ao início do estudo, com a presença de corpo de fundo para as amostras de PVA-PEG. No entanto, este também não foi um teste de exclusão dos sistemas.

Em comparação ao 5-ALA livre, observa-se que o ativo nas nanopartículas se apresentam mais estáveis, este é um resultado que mostra a eficiência de sistemas nanoestruturados na proteção de moléculas de princípio ativos hidrofílicos, resultados semelhantes foram observados para outros trabalhos com o mesmo ativo, e matrizes de quitosana. (83)

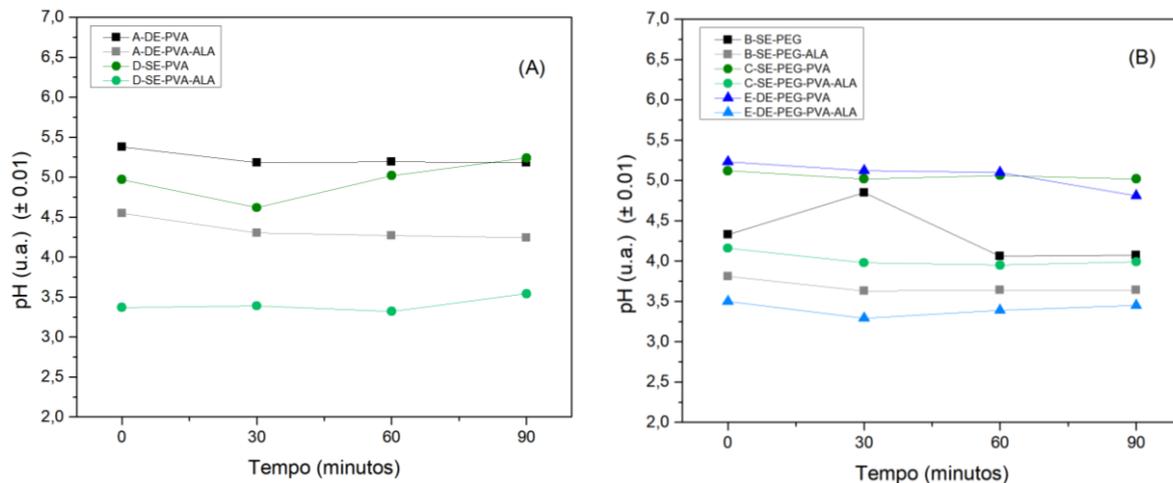


Figura 24 - Teste de estabilidade forçada em função do tempo (8000 rpm) (A) sistemas com PVA como tensoativo para dupla (A-DE-PVA e A-DE-PVA-ALA) e simples (D-SE-PVA e D-SE-PVA-ALA) emulsão, (B) sistemas com PVA e PEG como tensoativos para dupla (E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA) e simples (B-SE-PEG e B-SE-PEG-ALA) e C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA-ALA).

Fonte: Elaborada pela autora.

Diferenças de estabilidade físico-químicas em relação a temperatura de armazenamento das amostras ao longo do tempo

A estabilidade de emulsões é um processo termodinâmico complexo e muitos estudos são basicamente para entender estes processos. A instabilidade, normalmente, é devido aos efeitos de superfície, pois uma única fase sólida teria o estado de menor energia. No entanto, é possível que esses sistemas sejam cineticamente estáveis, dependendo de sua vida útil. O controle dessa estabilidade é de grande importância no desenvolvimento de sistemas para usos terapêuticos, como é proposto neste trabalho. (144)

Os estudos seguintes de estabilidade em tempo real, foram realizados em condições menos severas de temperaturas, o que ajuda a prever a vida útil das nanopartículas, através da avaliação do processo da cinética de degradação. Nos testes de estabilidade a cinética de degradação é aumentada em função da temperatura, sendo avaliada através de parâmetros como pH, diâmetro hidrodinâmico, polidispersidade e potencial Zeta. As amostras das nanopartículas (de mesmo lote) foram usadas para estudar o efeito da temperatura de armazenamento (4°C, 25°C, 40°C e um ciclo entre 4°C e 40°C) para se analisar sobre a estabilidade física durante um período de 40, 60 ou até 720 dias, dependente da temperatura. Este é um estudo de exclusão, para se optar a melhor temperatura de armazenamento para estas amostras. A tabela 17, indica os pH em solução aquosa 20°C para 5-ALA, PVA, PEG400 e suas misturas. De acordo com a tabela 17 e observando os dados apresentados na figura 25, as nanopartículas com ativo sofrem influência do 5-ALA, como já era esperado, o que justifica elas serem mais ácidas,

este é um resultado que corrobora com as medidas de condutividade elétrica, FTIR e RMN mostrando a influência do ativo nas emulsões.

Tabela 17 - pH das soluções aquosas ($20\pm 0,01$) °C, para 5-ALA, PVA, PEG400 e suas misturas físicas.

Material	pH (u.a.) ($20\pm 0,01$) °C
5-ALA	(3,31 \pm 0,05)
PVA	(5,36 \pm 0,03)
PVA+ALA	(3,55 \pm 0,02)
PEG400	(6,01 \pm 0,02)
PEG400+ALA	(3,64 \pm 0,05)
PEG400+PVA	(5,85 \pm 0,03)
PEG+PVA+5-ALA	(3,90 \pm 0,02)

Fonte: Elaborada pela autora.

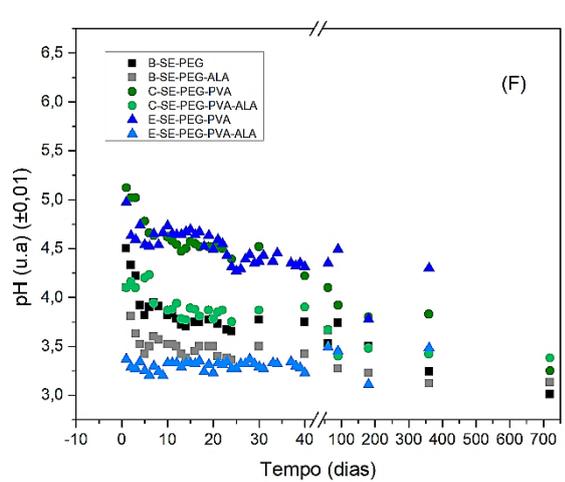
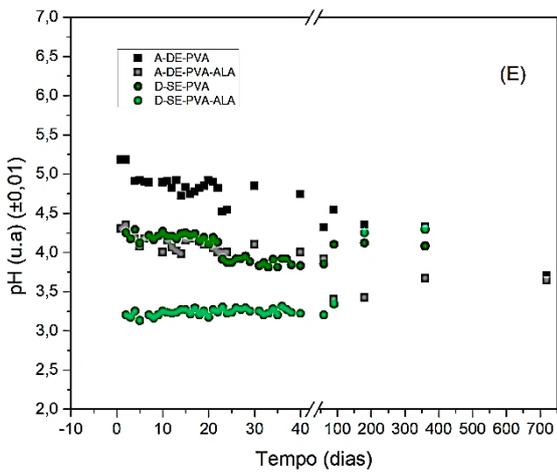
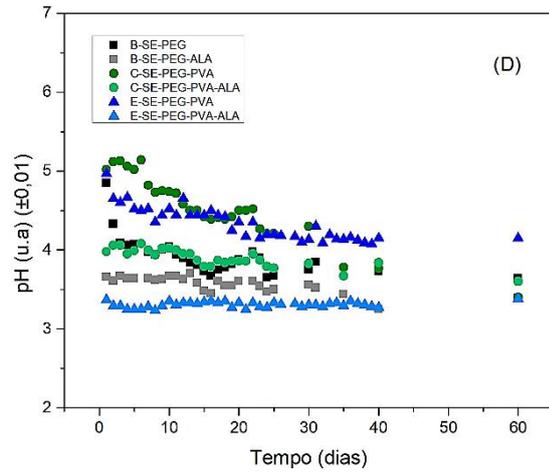
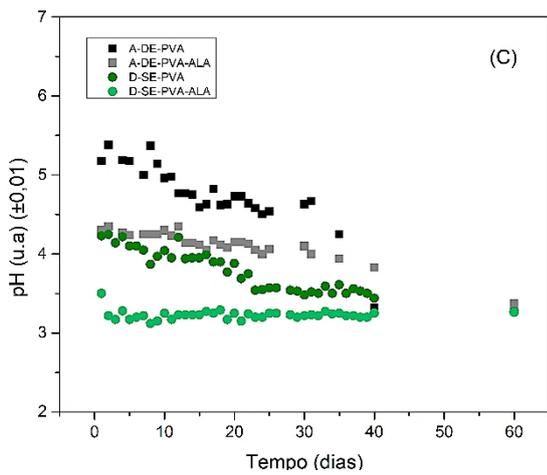
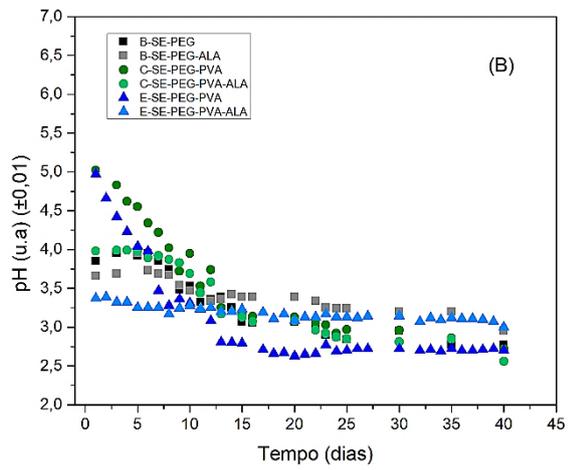
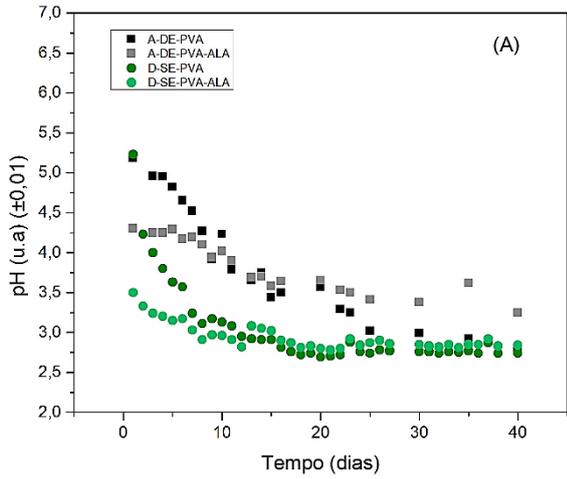
Para a avaliação de pH dos sistemas, todos ficaram mais ácidos ao decorrer das análises, independente da presença ou não do ativo. Na temperatura de 40°C, figura 25 (A-B), ao final das análises as amostras ficavam, translúcidas e com o aparecimento de corpos densos, onde esta característica ficava mais evidente para os sistemas A, D e E, em torno de sete dias era possível notar a diferença de pH inicial, podendo ser associado a uma faixa de aglomeração de partículas.

Quando as amostras eram expostas a temperatura ambiente, figura 25 (C-D), foi possível notar que os sistemas com 5-ALA ficavam mais estáveis ao longo do tempo, isto é, a faixa de estabilidade coloidal era observada ainda no início do gráfico, onde é possível observar que há uma variação de decaimento linear para todos os sistemas mantidos nesta temperatura. Para sistemas A e E, ao final de aproximadamente 40 dias, era possível observar separação de fase, embora, ao ser agitadas a emulsão voltava a ficar monofásica por ao menos 3h, sendo, portanto, não considerado desestabilização total dos sistemas.

Comportamento semelhante ao anterior, foi encontrado nas análises a 4°C, figura 25 (E-F), embora as análises mostram que há um comportamento estável entre 7 e 40 dias, observa-se que o decaimento torna-se mais instável ao longo de 60 dias, apresentando maior variação para o sistema C com ativo, as mudanças de pH entre 360 e 720 dias são observadas para os sistemas A, C e D, que carreavam o ALA.

Para as amostras no ciclo, figura 25 (G-H) as amostras ficaram translúcidas ao final dos estudos, sendo possível notar corpo de fundo para os sistemas A e E, e o sistema C com ativo. Uma observação importante, é que o sistema D se mostra mais estável que o sistema A, enquanto os sistemas C e E desenvolvidos para estes estudos apresentam estabilidade ao longo

do tempo similares. Logo, o tipo de emulsão (simples ou dupla) implica em mudanças importantes nos sistemas.



(continua)

(continuação)

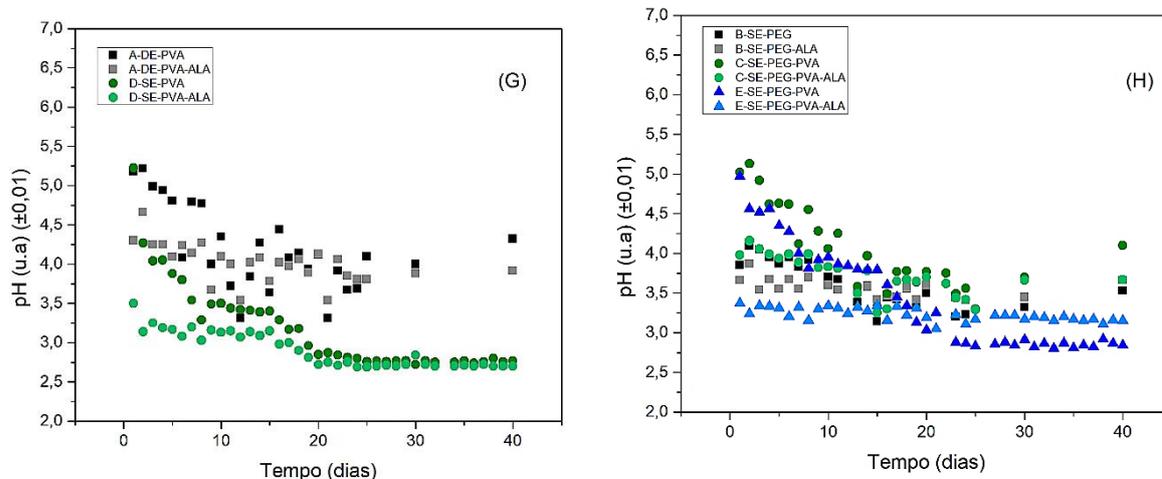


Figura 25 - Os gráficos representam os valores de pH em função do tempo, para diferentes temperaturas de armazenamento. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para diferentes temperaturas de armazenamento: (A e B) 40°C; (C e D) 25°C; (E e F) 4°C; (G e H) ciclo.

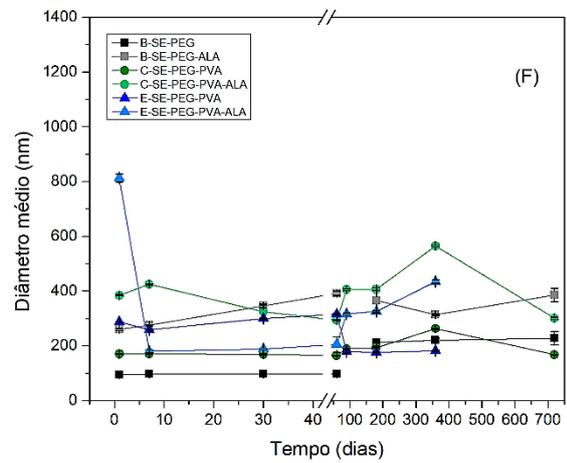
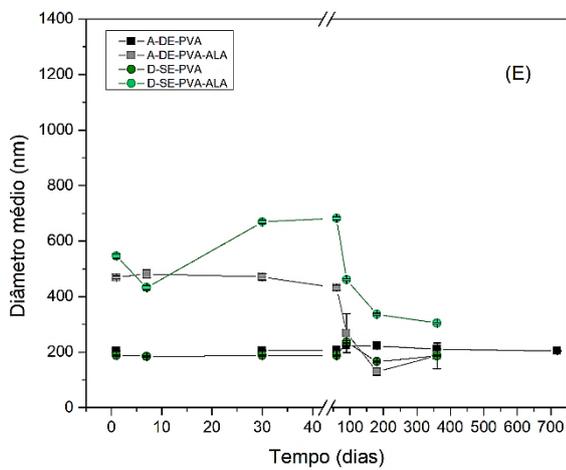
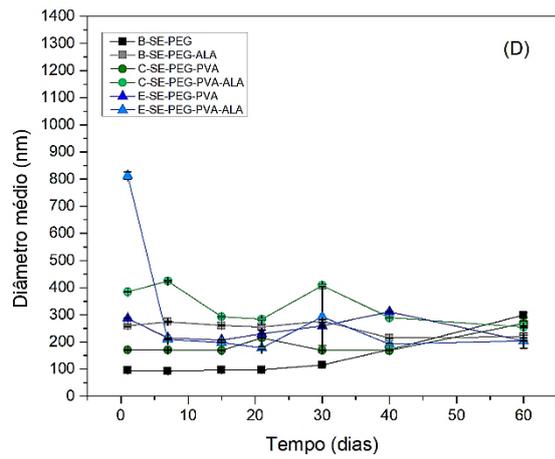
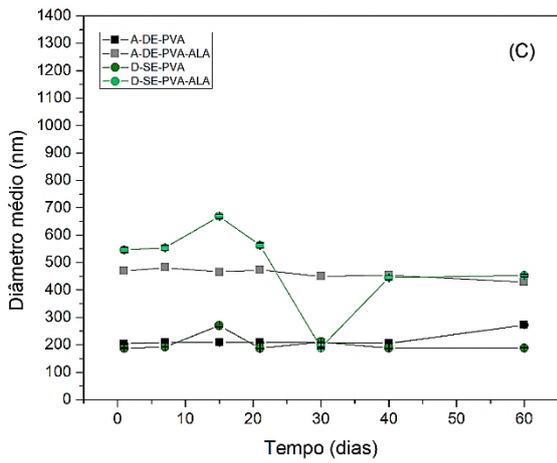
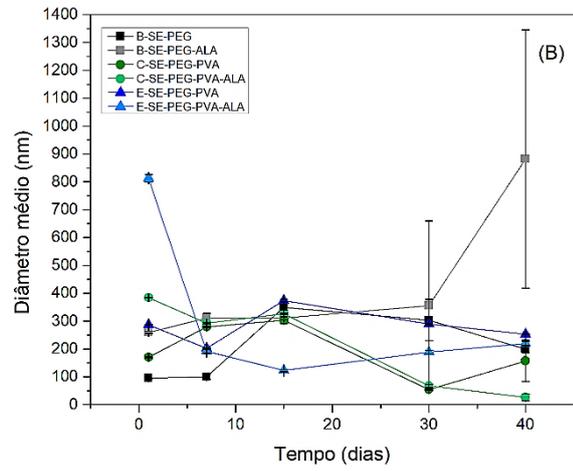
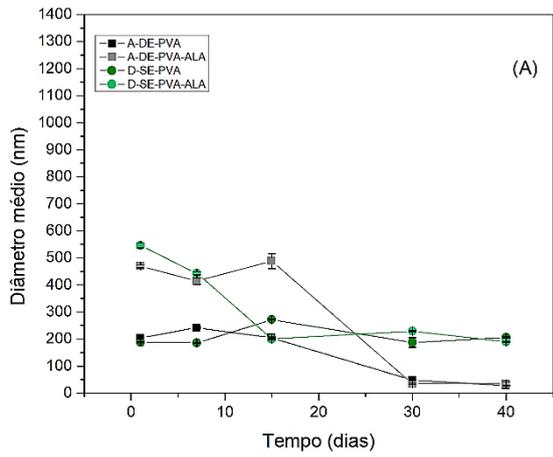
Fonte: Elaborada pela autora.

A estabilidade em termos de tamanho das nanopartículas é definida como a preservação da dimensionalidade durante o armazenamento, a variação de tamanho ao longo do tempo, pode implicar, em mudanças na propriedade térmica do material, liberação do ativo para meio e entre outros. (145)

No geral, observa-se que as partículas diminuem o tamanho ao longo do tempo, sendo os sistemas com 5-ALA mais estáveis. A estabilidade coloidal a 40°C, figura 25 (A-B) ocorrem entre 7 e 30 dias, quando não há variação de tamanho para o sistema D-SE-PVA-ALA e entre 7 e 20 dias para o sistema C-SE-PEG-PVA-ALA. O sistema que apresenta maior instabilidade, ao final de 40 dias é o B-SE-PEG-ALA, mostrando que as interações para estabilizar as partículas não eram suficientes. Para o ciclo, figura 25 (G-H), as amostras mostram um comportamento semelhante ao se observado em 40°C.

Para a temperatura de 25°C, figura 25 (C-D), observou-se que os sistemas permaneceram mais estáveis ao longo do tempo. O sistema A com 5-ALA permaneceu constante ao longo do estudo, embora tenha apresentado separação de fase. O sistema C não apresentou variação de tamanho ao longo do estudo, e para este sistema e o sistema E, o método de obtenção mostra diferença significativa.

Quando armazenados a 4°C, figura 25 (E-F), observa-se que a variação de tamanho para os sistemas, foi similar a temperatura de 25°C, embora para o sistema a maior variação, com o intumescimento da partícula, tenha ocorrido posterior a 100 dias de estudos.



(continua)

(continuação)

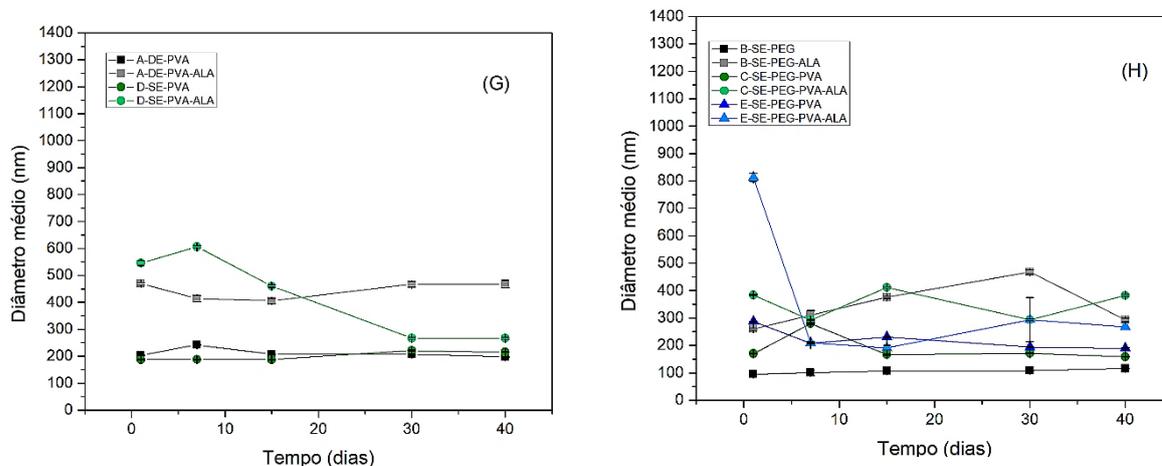
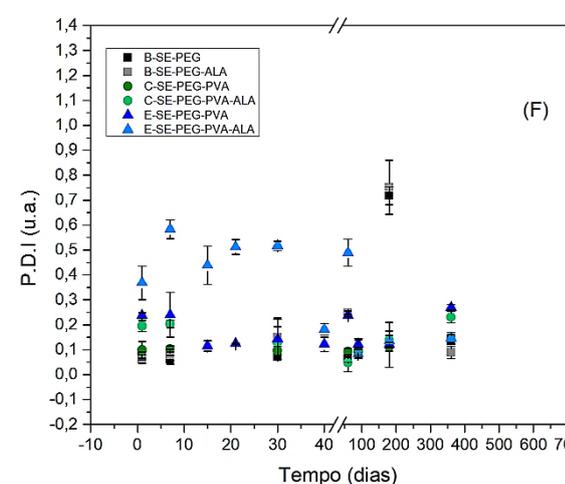
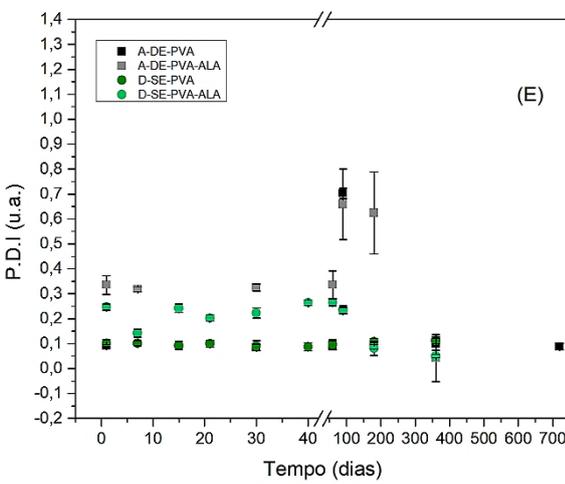
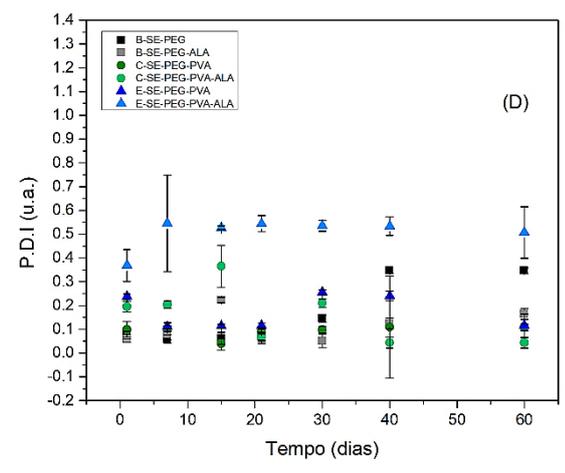
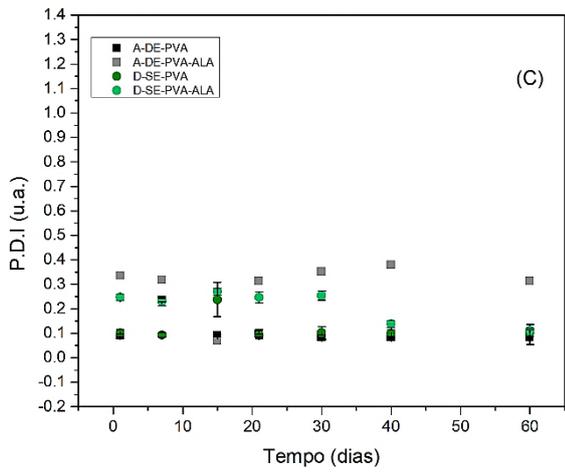
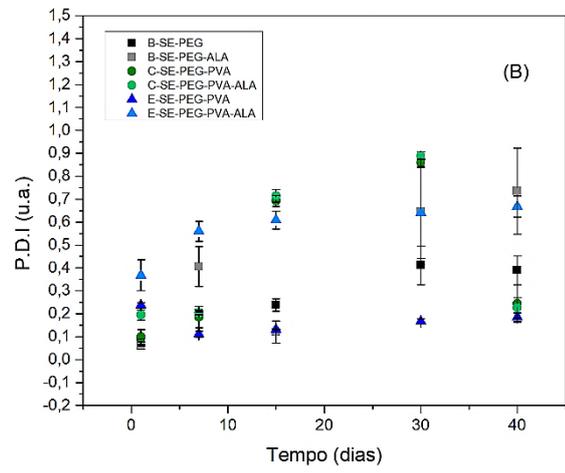
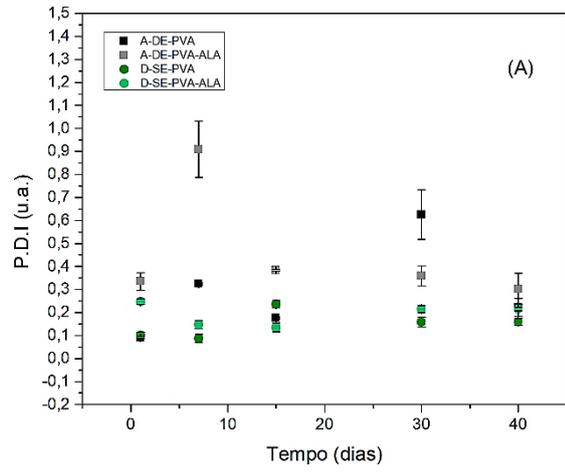


Figura 26 - Os gráficos representam os valores de diâmetro hidrodinâmico em função do tempo, para diferentes temperaturas de armazenamento. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para diferentes temperaturas de armazenamento: (A e B) 40°C; (C e D) 25°C; (E e F) 4°C; (G e H) ciclo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Do mesmo modo se avaliou a polidispersão dos sistemas. Todos as amostras inicialmente indicaram bons índices de polidispersividade, uma vez que eram todos abaixo de 0,2. No entanto para as amostras a 40°C, figura 27 (A-B), observa-se que os sistemas variavam até 1,1. As amostras em 25°C, figura 27 (C-D) não apresentaram mudanças de PDI ao longo do tempo, mantendo-se abaixo de 0,4, e para a temperatura de 4°C e ciclo, figura 27 (E-G), o índice manteve-se abaixo de 1,0.

Este parâmetro investigativo, é um índice importante de estabilidade visto que representa a faixa de distribuição de tamanho de partículas. A heterogeneidade de tamanho de partículas em suspensão inicialmente é representada por índices de polidispersividade altos, enquanto para variações ao longo do tempo, indicam a formação de população de partículas que antes não existiam, que podem indicar a agregação ou degradação das partículas. Na literatura, tem-se que índice de polidispersão mais baixos (entre a faixa de 0,1-0,2) são mais ideais, levando a distribuição de tamanho, na faixa estreita de tamanhos. (146)



(continua)

(continuação)

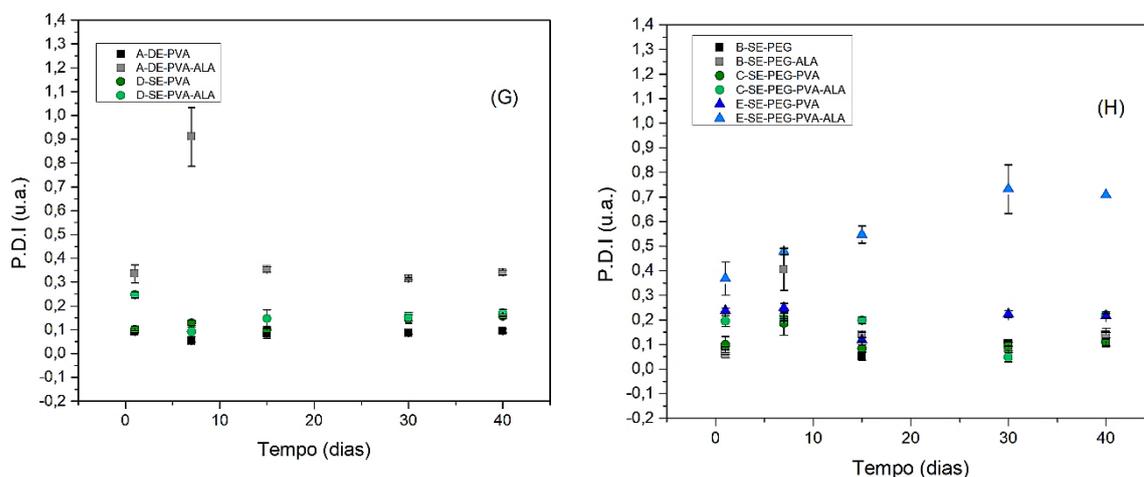
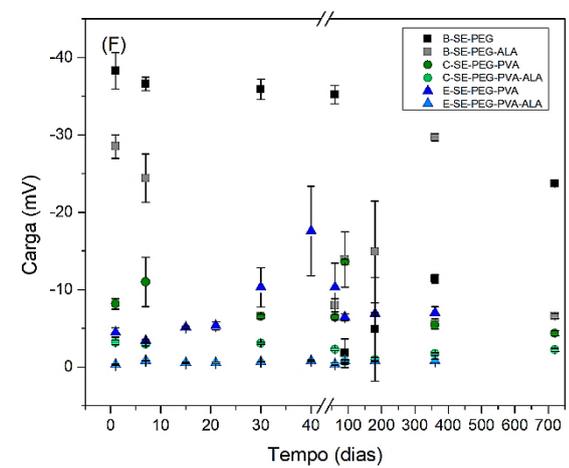
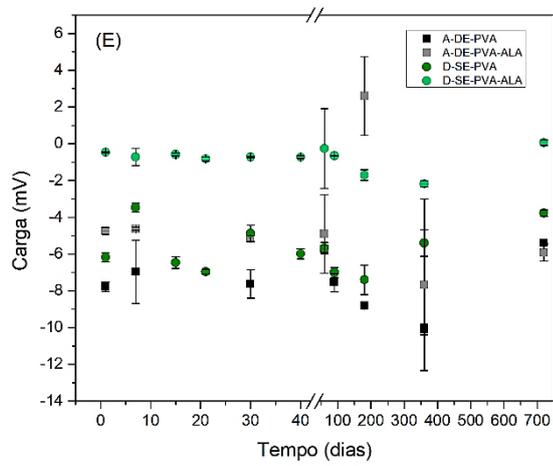
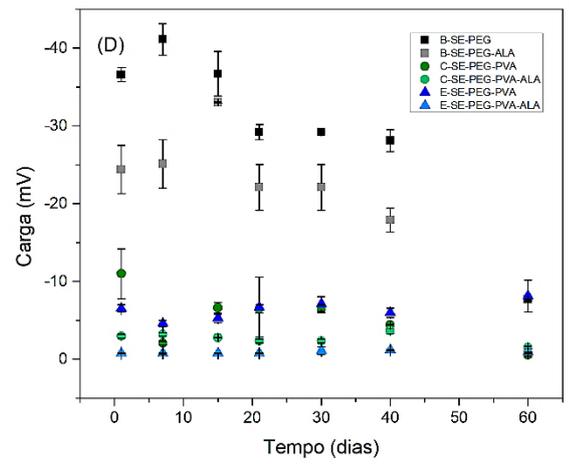
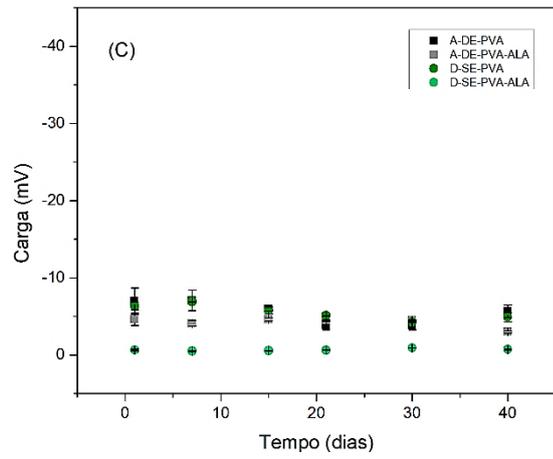
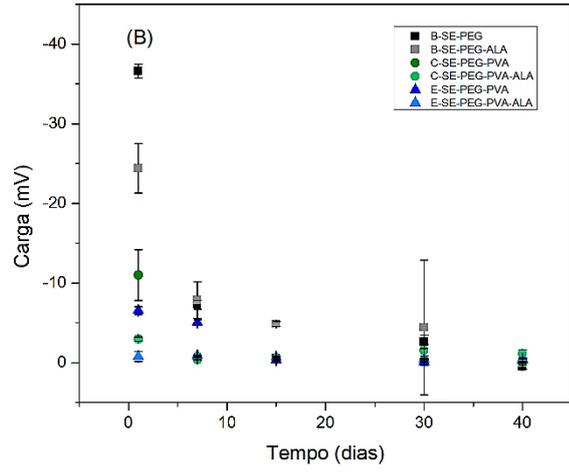
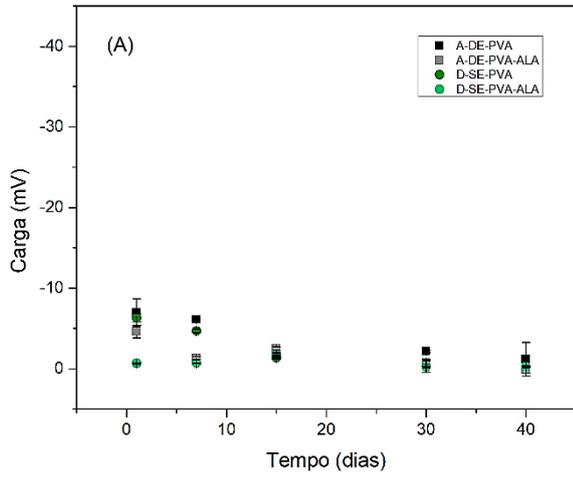


Figura 27 - Os gráficos representam as diferenças de PDI em função do tempo, para diferentes temperaturas de armazenamento. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para diferentes temperaturas de armazenamento: (A e B) 40°C; (C e D) 25°C; (E e F) 4°C; (G e H) ciclo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outro parâmetro importante avaliado foi o potencial Zeta. É importante destacar que a solução de PVA (25°C) apresenta carga de $(-0,07 \pm 2,26)$ mV, enquanto que para a temperatura de 0°C, a carga $(-9,82 \pm 2,26)$ mV. Estes resultados mostram a importância, como já apresentado, da temperatura de obtenção de síntese, quando o sistema estabilizado apenas pelo PVA. A carga é influenciada diretamente pela adição de PEG400, quando este é adicionado na solução de PVA (à 0°C), onde a carga é de $(-0,63 \pm 3,82)$ mV. No entanto, de acordo com as análises anteriores observa-se que o 5-ALA interfere e influencia, na estabilização dos sistemas, e isto pode ser também observado pela diferença de cargas entre os sistemas sem e com ativo.

Para 40°C, figura 28 (A-B), apresentou-se variação de carga ao longo do tempo, como resultado da própria desestabilização (separação de fases, corpo de fundo, decaimento do pH, intumescimento das partículas) dos sistemas como observado anteriormente. Para o sistema A, C e D, observa-se que a variação de carga foi próxima as primeiras medidas, na temperatura de 25°C figura 28 (C-D). Em 4°C, figura 28 (E-F), o sistema C-SE-PEG-PVA-ALA, teve o mesmo comportamento que para a temperatura ambiente. Para a avaliação em ciclo, figura 28 (G-H), mostra que o comportamento de estabilização de carga observadas para 40°C e 4°C, é similar.



(continua)

(continuação)

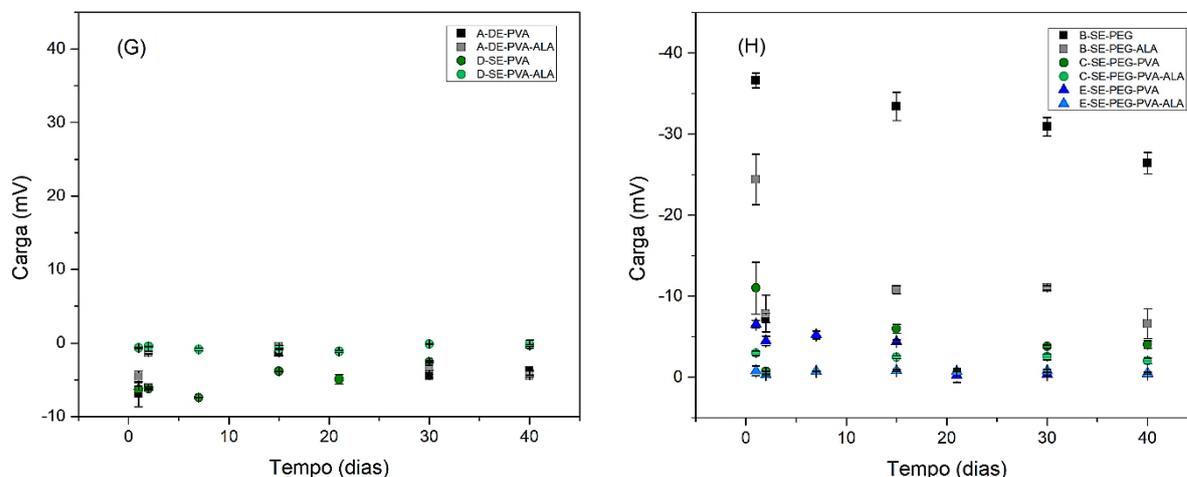


Figura 28 - Os gráficos representam os valores de potencial Zeta em função do tempo, para diferentes temperaturas de armazenamento. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para diferentes temperaturas de armazenamento: (A e B) 40°C; (C e D) 25°C; (E e F) 4°C; (G e H) ciclo.

Fonte: Própria autora.

Em alguns estudos da literatura (147), nestas mesmas temperaturas avaliadas, é observado que as propriedades físico-químicas do PLGA não é alterada, no entanto o armazenamento a 40°C, favorece a evaporação do solvente residual rapidamente, enquanto que nas temperaturas menores isto acontece lentamente, podendo alterar assim, as propriedades físico-químicas analisadas. Outro fator é que a massa do PLGA (50:50) também não favorece a formação de agregação, isto é igualmente observado para partículas do mesmo polímero que carregam o fármaco paclitaxel (não iônico e hidrofóbico) que se tem resultados de estabilidade próximos aos observados nas temperaturas de 4°C e 40°C. A agregação de partículas ocorre na maior temperatura, como é observado ao final do ciclo destes experimentos.

Uma outra observação importante é sobre degradação do PLGA que ocorre por vários meios conhecidos. Os copolímeros PLGA podem sofrer erosão superficial em algumas condições, e a erosão em massa é a principal via de degradação. Em alguns relatos de caso, são propostas ao menos três fases principais para a biodegradação do PLGA: inicialmente ocorre uma diminuição significativa na massa molecular, mas, sem a formação de monômeros solúveis após a divisão dos grupos ésteres da cadeia polimérica. Depois há novamente, a perda da massa molecular, com a formação de produtos monoméricos e oligoméricos solúveis e, por fim,

resulta-se na degradação completa do polímero. (148) Estas etapas de degradação levam a mudanças de parâmetros físico-químicos como os aqui analisados.

Chen et al. (149) mostrou que PEG-400 também é a fonte de prótons, pois, contém ligação O- C-H, podendo transferir prótons através dos seguintes processos, equação (9) e (10):



Como resultado, adicionando a quantidade adequada de PEG400 mais prótons são gerados, mantendo a estabilização dos sistemas. No entanto, as mudanças observadas podem indicar uma maior dissociação de grupos carboxílicos presentes na interface água/partícula devido a relaxação das cadeias poliméricas. Quando há a relaxação das cadeias poliméricas o raio hidrodinâmico das partículas fica maior e quando na presença de ativo leva a liberação deste para o meio, ocasionando mudanças na carga, pH e PDI, por exemplo (33).

Temos ainda que a homogeneização eficaz e os métodos de obtenção implicam diretamente na manutenção da estabilidade destes sistemas ao longo do tempo. Destaca-se que a estabilidade observada para os sistemas desenvolvidos, que se mostram potenciais para o carregamento do 5-ALA, e que o 5-ALA pode interferir na formação da dupla camada elétrica das partículas, observadas tanto nas análises de condutividade, quanto nas análises de pH e potencial Zeta.

Por ser um processo, termodinâmico para cada temperatura avaliada é esperado que haja uma região de estabilidade coloidal diferente, e por tanto, um comportamento de estabilidade para cada temperatura. Avaliar sistemas de nanopartículas quanto a estabilidade é um processo complexo visto que as partículas podem não ser uniformes em nível atômico e molecular (143), Além da resposta de estabilidade ser dependente, por exemplo, de processos físicos e químicos envolvidos ao longo do desenvolvimento, composição química, forma das partículas e das características a serem analisadas, como a distribuição de tamanho (145).

Outro ponto a destacar é quando se compra aos pontos iniciais de pH das curvas, as emulsões mantêm o 5-ALA mais estável ao longo do tempo, do que quando comparado com o pró-fármaco livre, resultando em sistemas promissores para o carregamento do ativo em relação ao tempo de estabilidade em meios aquosos, sendo um ganho no processo para a molécula, podendo ser evitado degradações ao longo do tempo, assim como sugerido na literatura (83).

Além dos resultados apresentados e de acordo com o fornecedor Sigma-Aldrich, o insumo em pó 5-ALA deve ser armazenado à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. No entanto, para possível transporte (por vias aéreas ou terrestre) destes materiais, poderão ser realizados à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, sem perda de estabilidade do produto (embora, estas análises possam ser investigadas por outras técnicas, como térmica). (25)

Deste modo, foi realizado a próxima etapa para se determinar o sistema com a melhor estabilidade ao longo do tempo, na temperatura de 4°C , de acordo com a variabilidade dos tensoativos e métodos de obtenção de síntese. Em nota, as amostras analisadas são uma réplica (isto é, não são do mesmo lote) das amostras apresentadas nos estudos por NTA, e por isso, diferem nos dados apresentados.

Análises de estabilidades de sistemas a partir de técnicas para visualização de informações

Para se otimizar o desenvolvimento de nanopartículas para o carreamento de fármacos, idealmente, é necessário que os sistemas apresentem reprodutibilidade, eficácia na estabilidade e liberação controlada. Para avaliar as respostas de estabilidade, propomos uma análise matemática para estes dados para se escolher o melhor sistema de nanopartículas.

Foram projetados mapas que permitem a visualização destes resultados, comparando qualitativamente os cinco sistemas analisados anteriormente. Nesta etapa, foram analisados em sequência cinco aspectos/características principais: análise global para os sistemas à 4°C , análises dos dados para as nanopartículas sem ativo e com ativo e análise da variabilidade dos tensoativos, observando a influência de cada componente. Os dados foram mapeados pela técnica de projeção multidimensional (IDMAP), analisado pelo PEXSensors. Para as projeções cada gráfico de pH, diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial Zeta, foi transformado em um único ponto, onde o IDMAP mantém a relação de similaridade no espaço multidimensional original, analisando assim as proximidades para cada caso. (89) Em resumo, técnicas como esta conseguem diferenciar distâncias entre conjuntos de dados, quanto mais próximo mais similares são, e quanto mais distante, mais diferenciados serão.

Para o potencial Zeta, figura 29, no mapa é possível identificar os sistemas que são estabilizados com PVA, e o 5-ALA apresenta pouca influência neste grupo, o que já era esperado. Assim, os sistemas estabilizados com PVA e a associação de PEG-PVA, estão mais próximos em relação a estabilidade. O PVA sofre mais influência do que em relação ao PEG400, quando as nanopartículas carregam o 5-ALA. Mesmo assim, o PEG400 apresenta grande diferenciação, observado com a influência direta do ativo, onde é confirmado, pela separação do grupo B-SE-PEG.

Como foi observado na análise temporal, figura 28, o ativo faz a carga aumentar para todos os sistemas, exceto para o PEG400, mostrando que o ativo não está na concentração para influenciar. O aumento da carga é comprovado pelas análises temporais de pH figura 25, onde o ativo deixa as soluções mais ácidas e, concomitantemente, modifica a carga dos sistemas. Além disso, o aumento da carga pode ajudar nas repulsões eletrostáticas e assim ajudar na estabilidade das emulsões.

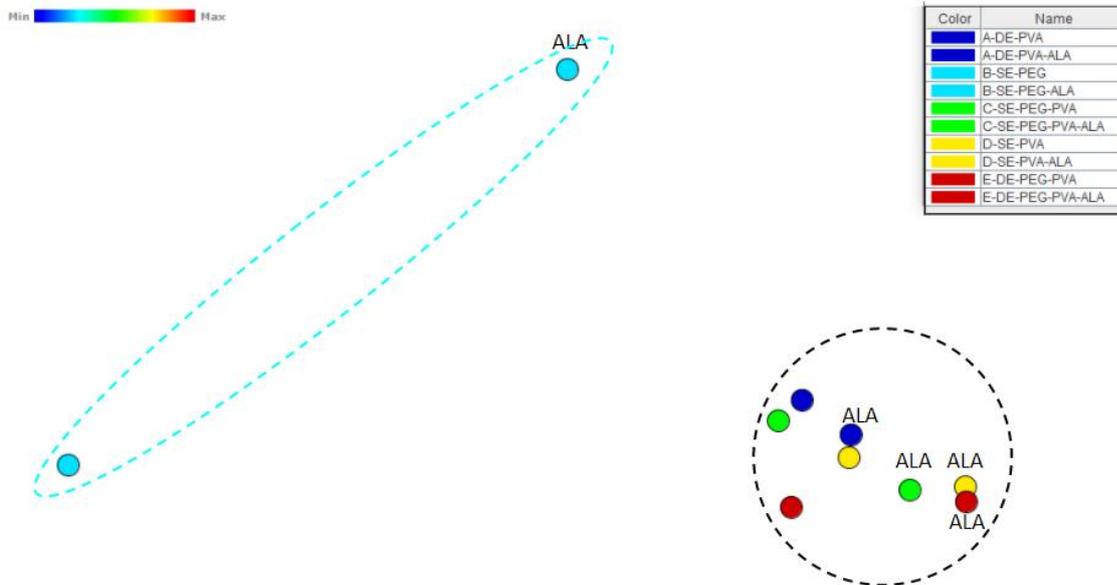


Figura 29 - Mapas do IDMAP para as análises de potencial Zeta, para os sistemas A-DE-PVA, A-DE-PVA-ALA, B-SE-PEG, B-SE-PEG-ALA, C-SE-PEG-PVA, C-SE-PEG-PVA-ALA, D-SE-PVA, D-SE-PVA-ALA, E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA mostrando as similaridades dos sistemas por proximidade - círculo preto e maior diferenciação pelo distanciamento entre a mesma síntese com e sem 5-ALA - elipse na cor do grupo.

Fonte: Elaborada pela autora.

As análises de pH figura 30 mostra que os sistemas com PVA-PEG, com e sem ativo, são diferenciados verticalmente dos demais. Novamente, a síntese B-SE-PEG tem pouca influência com ALA enquanto a relação contrária é observada na síntese E-DE-PEG-PVA, os demais sistemas são praticamente iguais, quanto a influência do ativo. Na análise temporal figura 25, o 5-ALA aumenta o pH de todos os sistemas, exceto o sistema B-SE-PEG, portanto, confirmando os resultados anteriores. O aumento da acidez, indica estabilidade para os sistemas. Além disso, o 5-ALA mantém o pH um pouco mais estável ao longo do tempo, observamos que os sistemas sem o ativo, há uma maior variação entre início e o fim do estudo, sendo mais ácido no final

Para as análises de diâmetro, figura 31, é possível observar que o 5-ALA influencia no aumento do raio hidrodinâmico das nanopartículas, o que pode levar a duas hipóteses centrais

que o ativo pode estar dentro ou adsorvido, justificando o aumento de volume, no entanto a hipótese que é sustentada através das análises de superfície é que o ativo está adsorvido na matriz das nanopartículas.

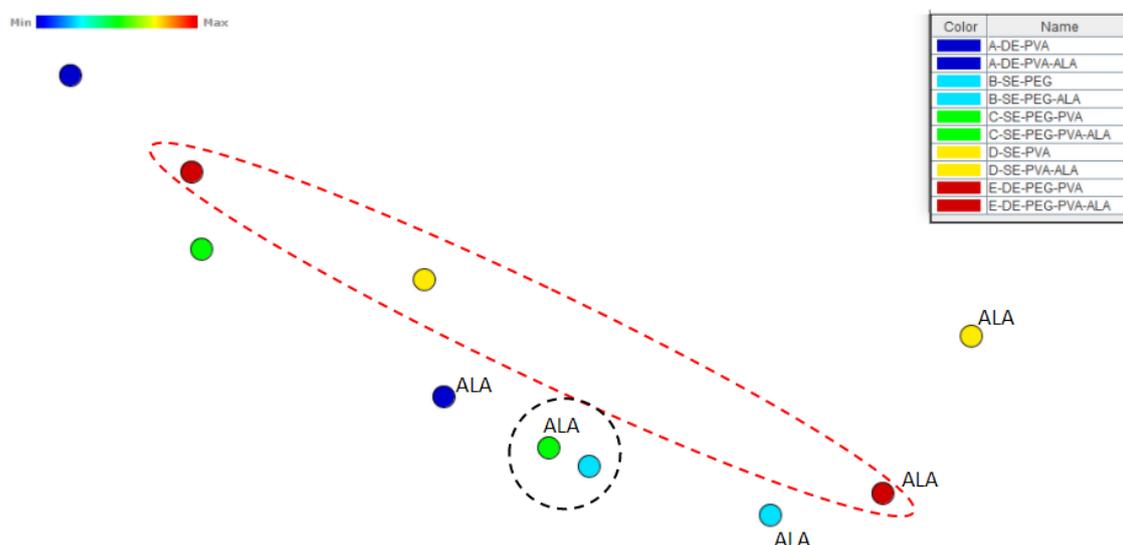


Figura 30 - Mapas do IDMAP para as análises de pH, para os sistemas A-DE-PVA, A-DE-PVA-ALA, B-SE-PEG, B-SE-PEG-ALA, C-SE-PEG-PVA, C-SE-PEG-PVA-ALA, D-SE-PVA, D-SE-PVA-ALA, E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA mostrando as similaridades dos sistemas por proximidade - círculo preto e maior diferenciação pelo distanciamento entre a mesma síntese com e sem 5-ALA - elipse na cor do grupo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os sistemas que contém o PEG e a associação PEG-PVA variam menor em relação a presença do 5-ALA. Além do ativo, o PEG400 influencia na diferença de tamanho nas partículas sem ativo, e o PVA nas partículas com ativo. Isto é possível, devido a maior interação do ativo com as cadeias do PEG, também comprovados pelas análises de superfície.

Nas sínteses A C, D e E mostramos que os diâmetros são próximos, e o ativo influencia praticamente igualmente em todos os sistemas, embora a síntese D-SE-PVA tenha a maior influência do 5-ALA. Para as análises temporais, o decaimento ao longo do tempo do tamanho, podem indicar perda de ALA para o meio aquoso. Os sistemas mais estáveis são os sistemas C-SE-PVA-PEG e E-DE-PVA-PEG.



Figura 31 - Mapas do IDMAP para as análises de diâmetro, para os sistemas A-DE-PVA, A-DE-PVA-ALA, B-SE-PEG, B-SE-PEG-ALA, C-SE-PEG-PVA, C-SE-PEG-PVA-ALA, D-SE-PVA, D-SE-PVA-ALA, E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA mostrando as similaridades dos sistemas por proximidade - círculo preto e maior diferenciação pelo distanciamento entre a mesma síntese com e sem 5-ALA - elipse na cor do grupo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nas análises de PDI, figura 32, não há diferença significativa para as nanopartículas sem ativo. Para as nanopartículas com ativo, o PEG apresenta pouca diferença entre o sistema sem e com ativo.

É possível afirmar que para as nanopartículas estabilizadas com PVA, com ativo, há uma maior diferenciação. Os sistemas de simples emulsão tem menor diferença quando adicionado 5-ALA. Quando comparados globalmente, os sistemas D-SE-PVA e E-DE-PVA-PEG, são sistemas que apresentam melhores estabilidade. Outro ponto é que quando comparados ao sistema de A-DE-PVA e B-SE-PEG os sistemas D-SE-PVA e C-SE-PEG-PVA são os que tem menor influência na presença do ativo. Com esta afirmação é possível comprovar o que é observado para as análises temporais, figura 27, onde o C-SE-PVA-PEG apresenta maior estabilidade e com menor influência do 5-ALA.

Com o conjunto destes dados, mostramos que é importante a avaliação de cada um dos parâmetros para se predizer sobre a estabilidade destes sistemas, visto que cada parâmetro deu um resultado importante para as análises. Também determinamos que o sistema C-SE-PEG-PVA-ALA é potencial para carrear o 5-ALA, sendo, portanto, o sistema de escolha para a finalização dos protocolos e os estudos *in vitro*.

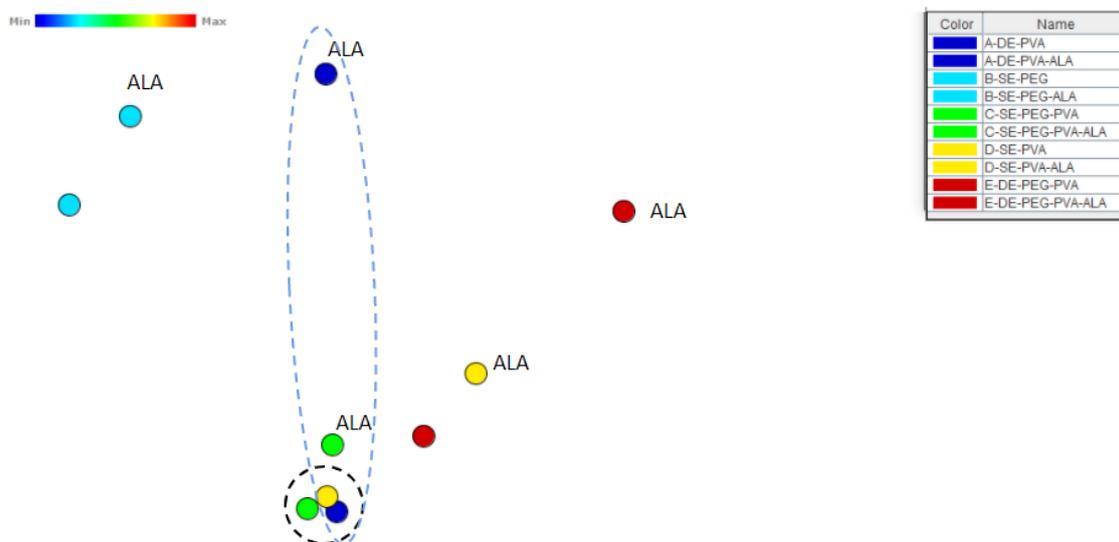


Figura 32 - Mapas do IDMAP para as análises de PDI, para os sistemas A-DE-PVA, A-DE-PVA-ALA, B-SE-PEG, B-SE-PEG-ALA, C-SE-PEG-PVA, C-SE-PEG-PVA-ALA, D-SE-PVA, D-SE-PVA-ALA, E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA mostrando as similaridades dos sistemas por proximidade - círculo preto e maior diferenciação pelo distanciamento entre a mesma síntese com e sem 5-ALA - elipse na cor do grupo.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Conclusões parciais

Nesta etapa, mostramos que o escalonamento de sistemas de nanopartículas é uma etapa desafiadora, onde o aumento do volume das soluções significa mudanças nas características físico-químicas. Inicialmente, aumentamos em mais de 78% os volumes das soluções produzidas, mantendo as proporções de (1:1), onde não tivemos poucas diferenças para as análises de tamanho, carga ou PDI, para as emulsões obtidas por simples ou dupla emulsão.

Posteriormente, trabalhamos com cinco sistemas que se diferenciavam quanto ao tipo de estabilização (PVA, PEG400 ou PEG400-PVA) e ao método de obtenção (simples ou dupla emulsão). Os sistemas foram analisados quanto as suas características de superfície, avaliadas por técnicas de condutividade elétrica, ângulo de contato e energia de superfície, UV-vis, FTIR e RMN. As análises de superfície nos permitiram mostrar que o 5-ALA está adsorvido nas superfícies das partículas e que interage com os tensoativos PEG e PVA. Além disso, foi possível mostrar que o PEG funcionaliza as superfícies das partículas através das análises observadas.

As características de superfícies destes sistemas mostravam que os sistemas eram potenciais para a melhora na permeação cutânea. Há uma contribuição significativa, nesta etapa, a primeira da relação do PEG na formação das partículas obtidas por dupla emulsão, que

mostra que o 5-ALA tem maior afinidade de interação nas partículas estabilizadas com PEG, contribuindo para a literatura, com sistemas para ativos hidrofílicos e obtidos por simples emulsão.

Por fim, através das análises de estabilidade temporais mostrou que os sistemas estabilizados com a mistura física de PEG-PVA podem apresentar boa estabilidade à 4° e 23°C, por apresentar pouca variação em análises de tamanho e carga, justificado por se obter sistemas monodispersos, além das interações analisadas para a superfície.

Outra contribuição deste trabalho possibilitou comprovar que um dos sistemas desenvolvidos é mais estável e, portanto, com maior capacidade de ser um bom produto farmacêutico final, mostrado através da técnica de visualização IDMAP. Esta técnica nos permitiu analisar de forma mais abrangente a grande quantidade de dados temporais, indicando que o melhor sistema seria o obtido por simples emulsão, estabilização com PVA e PEG4000. Esta etapa espera contribuir para a área, mostrando a importância de se avaliar matematicamente os resultados obtidos, antes da tomada de decisão para avaliações futuras de estabilidade. Com sucesso, conseguimos mostrar que o sistema desenvolvido para este trabalho apresentou a melhor estabilidade, com potencial para a indústria farmacêutica, além, de contribuir para a literatura de sistemas para ativos hidrofílicos.

5 ETAPA 3 - ANÁLISES DE MORFOLOGIA, TÉRMICAS E ESTUDOS *IN VITRO* DE PERMEAÇÃO, LIBERAÇÃO E EFICÁCIA DE ENCAPSULAÇÃO

5.1 Materiais e métodos

5.1.1 Materiais

Os reagentes para os estudos foram adquiridos como grau analítico, e a água ultra pura Milli-Q, com resistividade de 18,1 Ω , foi utilizada para o preparo de todas as soluções. Foram utilizados os seguintes reagentes: acetona, álcool etílico absoluto, metanol, formamida (LabSynth, Diadema-SP, Brasil). Álcool polivinílico (PVA, grau de hidrólise de 80,5 - 89,5%) (Vetec Química -Sigma-Aldrich, Duque de Caixias-RJ, Brasil)) e cloridrato de ácido aminolevulínico 95% (5-ALA) (PDT Pharma, Cravinhos-SP, Brasil). Cloridrato de ácido aminolevulínico 99% (5-ALA), poli (D, L-ácido láctico-co-glicólico) (50:50) (código:P2191) (Mw= 30000 -60000 g/mol). Kollisolv® PEG400 (polietileno glicol 400, Mw 380-420 g/mol) (Fluka Analytical -Sigma-Aldrich, St. Gallen, Suíça). Acetilacetona 99,5% (Riedel-de Haën, Alemanha).

5.1.2 Métodos

Sensibilidade ao pH em função da adsorção do 5-ALA na superfície das nanopartículas

Para se determinar a sensibilidade ao pH das nanopartículas através das análises de diâmetro hidrodinâmico e potencial Zeta, o volume inicial de 25 mL de nanopartículas foi titulado com NaOH (0,1 e 1M) e HCL (0,1 e 1M), com constante agitação, a 20°C, e variando o pH de 3 a 8 (61). Ao final da titulação, foram medidos o diâmetro hidrodinâmico e potencial Zeta. As medidas foram realizadas em quintuplicata.

Análises térmicas

Liofilização

Para as análises térmicas as nanopartículas foram inicialmente, concentradas e lavadas, para retirar o excesso de possíveis interferentes (tais como, sobra de polímeros e ativo). Assim,

15 mL da amostra de nanopartículas foram centrifugadas a 7300 rpm, por 30 minutos, à 4°C. Após, este primeiro ciclo o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o *pellet* foi resuspendido em 10 mL de água deionizada. Até o momento das análises, as amostras foram mantidas em geladeira. Posteriormente, as amostras foram congeladas a -80°C e liofilizadas a -55°C por 48 horas em um liofilizador LIOTOP, modelo L101.(150) Esta etapa foi realizada no Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP), em pareceria científica.

Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Em resumo, a termogravimetria (TG) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) são técnicas termoanalíticas. A TG investiga alterações na massa da amostra (podendo ser a perda ou o ganho) em função de variáveis físicas como a temperatura ou o tempo. Por sua vez, o DSC, é a técnica que determina a entalpia que ocorre entre a amostra e o processo de mudança de temperatura, seja por uma rampa de aquecimento ou resfriamento, em relação há um material de referência inerte (151).

Com as análises de TGA espera-se determinar a estabilidade das nanopartículas, mostrando a influência da composição das mesmas. Foram analisadas as amostras de 5-ALA, PVA, PEG400, PLGA e das nanopartículas com e sem ativo. As curvas TG / DTG e DSC foram obtidas em um módulo simultâneo TG/DTG - DTA Q 600 SDT (versão 20.9 Build 20), controlado com o software Thermal Advantage (versão 2.5.0.256, Instrumentos TA). As curvas de TG foram tomadas usando massas das amostras de aproximadamente (7,2±0,1) mg em porta amostra de alumina aberto, com taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹, com rampa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ a 700°C.min⁻¹ ou 10°C.min⁻¹ a 1000 °C.min⁻¹ com isoterma de 3 minutos e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio fluindo a 50mL.min⁻¹. As temperaturas T_{onset} foram obtidas como a temperatura do ponto de cruzamento entre a linha de base do termograma e a linha tangente à curva de perda de peso derivada no ponto de inflexão.

Embasados nos resultados de TG, as análises de DSC são importantes para mostrar a interação entre a matriz polimérica e o ativo. As curvas DSC foram obtidas em um Diferencial Q10, Módulo calorimétrico, controlado pelo software *Thermal Advantage Series* (versão 4.5A, T.A. Instruments) usando massas de amostra de aproximadamente (3,2±0,1) mg em um porta amostra de alumínio coberto com um orifício de 0,7 mm no centro da tampa, com taxa de aquecimento máxima de 10°C.min⁻¹ a 120°C.min⁻¹; 10°C.min⁻¹ a 190°C.min⁻¹; 10°C.min⁻¹ a 150°C.min⁻¹; 10°C.min⁻¹ a 190°C.min⁻¹; 10°C.min⁻¹ a 160°C.min⁻¹ respectivamente para as amostras de 5-ALA, PVA, PEG400, PLGA e das nanopartículas com e sem ativo. Todas as

medições foram realizadas sob atmosfera dinâmica de ar ou nitrogênio a $50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A célula DSC foi calibrada para temperatura e entalpia usando metal índio ($T_{\text{melt}} = 156,6^\circ\text{C}$; $\Delta H_{\text{fus}} = 28,7\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) com 99,99% pureza, de acordo com as instruções do fabricante. Nos gráficos temos a indicação dos eventos exotérmicos indicados para cima.

Estas medidas foram realizadas em colaboração científica, no Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP), no Departamento de Química e Física Molecular.

Microscopias

Microscopia de Força Atômica (AFM)

As soluções de nanopartículas foram depositadas em placas de vidro sem serem diluídas e, posteriormente, foram deixadas secar em temperatura ambiente. Todas as análises foram realizadas em temperatura ambiente e com 40% de umidade relativa. As micrografias foram obtidas em equipamento de AFM (Innova, Bruker), em uma área de $(10 \times 10)\ \mu\text{m}^2$, operando em modo de contato utilizando *cantilevers* de nitreto de silício para a varredura das amostras. Todas as imagens possuem uma resolução de 512×512 pixels a uma taxa de varredura de 1,0 Hz. As imagens topográficas foram montadas no plano para remover o plano inclinado, e a altura média das linhas da imagem foi ajustada com um filtro achatado de ordem zero. O *feedback* foi adaptado para a superfície, e foram analisados pelo software WSxM. As análises foram realizadas em colaboração científica na Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As soluções de nanopartículas foram depositadas em placas de sílicas sem serem diluídas em água deionizada e com concentrações 1:10 e 1:100. Posteriormente, submetidas a secagem em dessecador de vidro, com vácuo, à temperatura de 24°C , por 72 horas. As amostras para análise foram recobertas com 10 nm de Paládio-Ouro (Pd-Au) em um metalizador Coating System BALDEC MED 020 e um metalizador Balzers Sputter Coater SCD 050, respectivamente. As micrografias do MEV foram adquiridas em um equipamento LEO (modelo 440) com detector OXFORD (modelo 7060), operando com feixe de elétrons de 10-20 kV, corrente de 2,82 A e sonda de 200 pA, na CAQI (Central de Análises Químicas Instrumentais) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP).

Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão por campo (MEV-FEG)

O microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão por campo (MEV-FEG) é muito utilizado para a observação de nanoestruturas, menores que 1 nm na superfície do material, que podem ser desde nanopartículas de diferentes materiais a organelas celulares. É um microscópio onde um feixe de elétrons é usado ao invés da luz. Estes elétrons são emitidos por uma fonte de emissão de campo e acelerados em um alto gradiente de campo elétrico. Então, dentro de uma coluna de alto vácuo, os elétrons chamados primários são focados e desviados por lentes eletrônicas para produzir um estreito feixe de varredura que bombardeia o objeto a ser analisado, de acordo com um certo padrão. Como resultado, os elétrons secundários são emitidos de cada ponto do objeto, que é dependente da estrutura dos objetos, e assim um detector captura os elétrons secundários e produz um sinal eletrônico que é amplificado e transformado em imagem digital. (152) Esta técnica foi escolhida, pois, em comparação ao MEV convencional, pode-se reduzir a energia da incidência dos feixes de elétrons, para tentar não degradar as amostras.

O principal objetivo é caracterizar a morfologia das amostras de nanopartículas e do 5-ALA livre. As soluções de nanopartículas foram depositadas em placas de sílicas, in natura (sem diluição) ou com diluição em água deionizada de 1:10 e 1:100 (volume:volume). Posteriormente, foram submetidas a secagem em dessecador de vidro, com vácuo, à temperatura de 24°C, por 72 horas. As amostras de 5-ALA não sofreram nenhum preparo prévio. Todas as amostras foram recobertas com 10 nm de Paládio-Ouro (Pd-Au) em um metalizador Balzers Sputter Coater SCD 050. As micrografias MEV-FEG foram adquiridas em um microscópio Zeiss Modelo Sigma com detector de raios X (X-act Penta Fet Precision) operando com feixe de elétrons de 2-3 kV, no Laboratório de Multiusuários do Instituto de Física de São Carlos (IFSC). As micrografias foram tratadas no software livre Image J (National Institute of Health, NIH, EUA).

Padronização da derivatização do 5-ALA

A reação de derivatização é um processo químico onde compostos amínicos reagem com solventes como a acetilcetona e formaldeído para a geração de um composto fluorescente (no caso da reação do 5-ALA, um destes compostos é o 2,6-diacetil-1,5-dimetil-7-(2-Carboxietil)-3H-pirrolizina), figura 33. Neste estudo, a estequiometria de reação é dado por (1:1), portanto, podendo ser associado a concentração do composto fluorescente a concentração do composto amínico no meio (21).

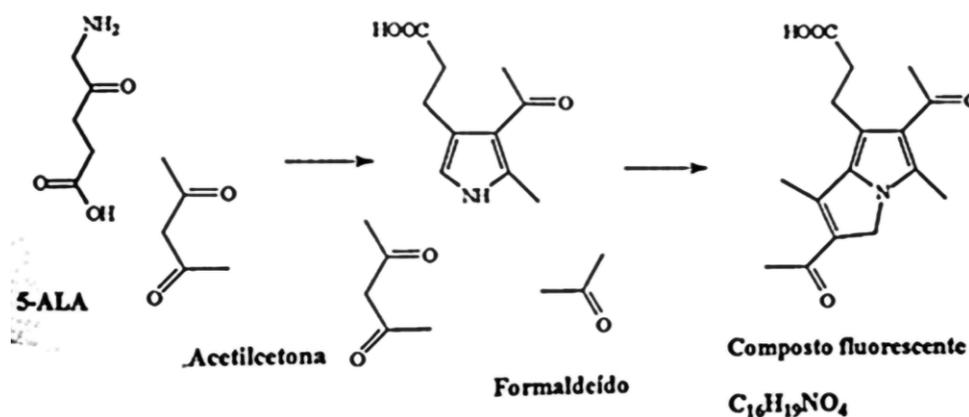


Figura 33 - Derivatização da molécula de 5-ALA.

Fonte: CERIZE (21).

O principal objetivo é fazer a derivatização da molécula do 5-ALA para que seja possível a quantificação por análise de espectroscopia por fluorescência. Este processo de derivatização é um processo de difícil reprodução em laboratório, por isso, a demanda de tempo e padronização do método é necessário. Esta etapa primordial, foi embasada em dois métodos trabalhados por Cerize, N.N.P. (21) e por Donnelly, R.F. (153), e receberam contribuições, deste trabalho, para a padronização do método, descritas em sequência. Foram preparadas duas soluções derivatizantes para a reação com o composto amínico e a solução aquosa do 5-ALA:

(1) Solução de acetilacetona: Uma solução com 7,5 mL de acetilacetona, 5 mL de etanol e 37,5 mL de água foi preparada ao abrigo de luz, em agitação magnética, por aproximadamente 20 minutos. Posteriormente, esta solução foi armazenada em frascos reagentes âmbar, ao abrigo da luz, e usada por um tempo não superior a duas semanas, para garantir que não houvesse a degradação da mesma.

(2) Solução de formaldeído (10%): Primeiramente, uma solução de formaldeído 37% foi preparada. Assim, 10 mL de formaldeído 37% foram agitados por 15 minutos, junto ao volume de 25 mL de água. A solução final, foi armazenada em frasco âmbar, ao abrigo da luz, e usada por um tempo não superior a duas semanas.

(3) Solução de 5-ALA: Foi preparada uma solução em PBS de 1000 µg/mL de 5-ALA, e realizado uma diluição seriada, para a curva de calibração no espectrofluorímetro: 0; 12,5; 25; 50; 100 e 150 µg/mL. Estas soluções foram preparadas apenas no momento do estudo.

A estufa de secagem e esterilização (Solab SL-100/81) foi aquecida, previamente, à 100°C. Foi preparado, ao abrigo da luz, 1 mL da solução de derivatização da seguinte forma: Em microtubos do tipo âmbar, foram adicionados 864 µL da solução (1); 0,124 µL da solução (2) e 0,123 µL da solução (3). Imediatamente, as soluções foram agitadas em um agitador do tipo vórtex (Gehaka AV-2), por 5 segundos e levados por 10 minutos na estufa. A reação foi

completada ao final de 3h resfriando em temperatura ambiente (23°C). Estes tempos de reação, foram estritamente seguidos a cada experimento realizado. Depois, do tempo de reação 100µL de cada solução foram dispostos em placas brancas, em triplicata, sendo o branco a solução de o PBS, sem o 5- ALA. A leitura de fluorescência foi realizada empregando as intensidades de 466 nm (emissão) e 378 nm (excitação). Para cada estudo em dias diferentes de análise de fluorescência todas estas etapas devem ser realizadas. A curva de calibração foi realizada em um espectrômetro de fluorescência (Agilent, Cary Eclipse) e calculado a região linear para se encontrar os volumes e concentrações para as etapas seguintes.

Espectroscopia de fluorescência

Basicamente, a espectroscopia de fluorescência requer que os objetos de interesse fluoresçam. A fluorescência é a emissão de luz que ocorre nanossegundos após a absorção de luz que normalmente é do menor comprimento de onda. A diferença entre os comprimentos de onda excitação e emissão é conhecida como mudança de Stokes (154). Assim, na microscopia de fluorescência, a amostra é iluminada (excitada) com luz de comprimento de onda relativamente curto, geralmente azul ou ultravioleta (UV), sendo analisada através de um filtro de barreira que absorve a luz de comprimento de onda curto usada para iluminação e transmite a fluorescência, que é vista como brilhante contra um fundo escuro. Como a fluorescência é observada como luminosidade em um fundo escuro, os componentes fluorescentes da amostra podem ser vistos mesmo em quantidades extremamente pequenas, sendo uma vantagem em relação as outras espectroscopias (155). As análises de fluorescência foram realizadas no Grupo de Óptica “Milton Ferreira de Souza” (IFSC/USP).

Eficiência de encapsulação

A *eficiência de encapsulação* do sistema de nanopartículas, foi realizada considerando a somatória dos pontos coletados acima como 100% e calculado em função do volume da amostra, anteriormente determinado para a liberação do ativo. Além disso, a eficiência foi determinada centrifugando-se 2 mL das soluções de nanopartículas, à 5000 rpm, por 5 minutos, à 4°C e posteriormente alíquotado 12,5µL do sobrenadante para realização do ensaio de liberação. Outro método testado foi alíquotar 12,5µL das nanopartículas sem centrifugação e analisar diretamente. A eficiência de encapsulação (E.E.) foi calculada como:

$$E. E. (\%) = \frac{\text{Concentração fluorescência}}{\text{Concentração teórica NP}} \times 100 \quad (11)$$

Perfil de liberação controlada

A forma de liberação do ativo é avaliada segundo a teoria que a membrana de diálise permite a passagem do ativo para o meio dispersante por meio de difusão. Primeiramente, o PBS (pH 5,0) foi determinado meio dispersante. (21) 9 béqueres de 250 mL foram previamente identificados e colocados em dois agitadores magnéticos de multiposição, com ímãs magnéticos de tamanho médio, com 135 mL de tampão PBS. A agitação magnética foi a mínima possível (300 rpm), para que a barra magnética não esbarre na membrana de diálise e para que o sistema fosse homogeneizado. 10 cm da membrana diálise de celulose (*Dialysis tubing cellulose membrane*, Sigma Aldrich, código D9527), foi previamente cortada, para cada ponto coletado. 15 mL da amostra de nanopartícula foi colocada em cada membrana preenchendo-a. Cada membrana foi presa nos extremos com presilhas de plásticos para a selagem. O conjunto (membrana e solução de nanopartícula) foi disposta no interior do béquer, com PBS, já em agitação e de imediato anotado o tempo de início do experimento para cada ponto. Os béqueres foram fechados com papel filme, para não haver a evaporação do meio dispersante e manter o equilíbrio da solução. Ao término de cada intervalo pré-estabelecido, foram coletados 2 mL do meio dispersante. Foram coletados os pontos: 0; 5; 15; 30; 60; 120; 180; 240; 300 e 420 minutos e armazenados em microtubos, em geladeira para ser realizado a etapa de derivatização segundo descrito em Padronização da derivatização do 5-ALA em triplicata. A figura 34 representa o aparato instrumental.

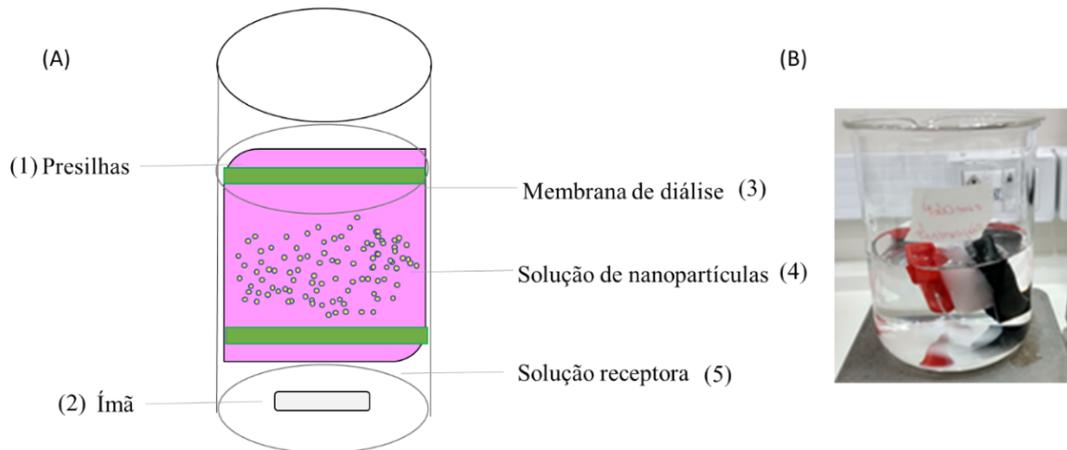


Figura 34 - (A) Aparato experimental para o estudo de liberação (1) Presilhas para fechar as membranas de diálises (em verde), (2) Ímã para agitação da solução receptora, (3) membrana de diálise com (4) solução de nanopartículas no interior (em rosa), (5) solução receptora (tampão PBS) para a difusão do ativo. A membrana foi mantida submersa na solução receptora. (B) Montagem do experimento para um dos pontos de permeação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Permeação das nanopartículas em célula de Franz (animal cruelty free)

As células de Franz são uma metodologia empregada para avaliar a permeação de medicamentos (ou outras moléculas de interesse) *in vitro* que apresenta vantagens como (i) pouca manipulação de tecidos animais, (ii) nenhuma coleta contínua de amostras e (iii) baixa quantidade de amostras para análise. Neste experimento não foi utilizado nenhum tecido animal, mas, de uma membrana poliéster sulfona (PES) que mimetiza a pele humana, optando por um estudo livre de crueldade animal (*animal cruelty free*). (156)

De acordo com o fabricante da membrana Strat-M[®], este produto é uma membrana polimérica sintética para testes de formulações transdérmica que apresenta uma série de vantagens em relação a experimentos *ex vivo*, dentre eles a uniformidade lote a lote, segurança e sem limitações de preparo ou armazenamento. É uma membrana composta por várias camadas de PES, que é formado por uma camada superficial muito compacta que cria uma morfologia semelhante à pele humana. (157) A figura 35 indica as camadas da membrana sintética utilizadas neste estudo, em comparação as camadas da pele.

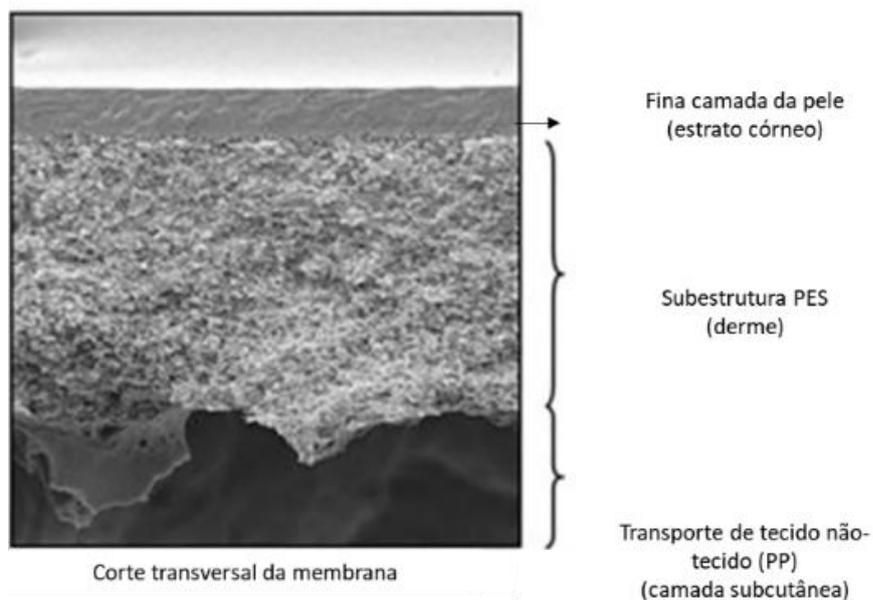


Figura 35 - Seção transversal da Strat-M e diagrama da pele humana. O Strat-M tem o "equivalente" de todas as três camadas de pele humana e a camada superior justa é representativa do estrato córneo.

Fonte: Adaptado de FU *et al.* (157).

Esta análise foi realizada a partir do preparo de 30 mL da solução receptora, tampão PBS (pH 5,5) foi preparada e filtrada em membrana de 0,22 μm previamente. O aparato da célula de Franz foi montado, figura 36.

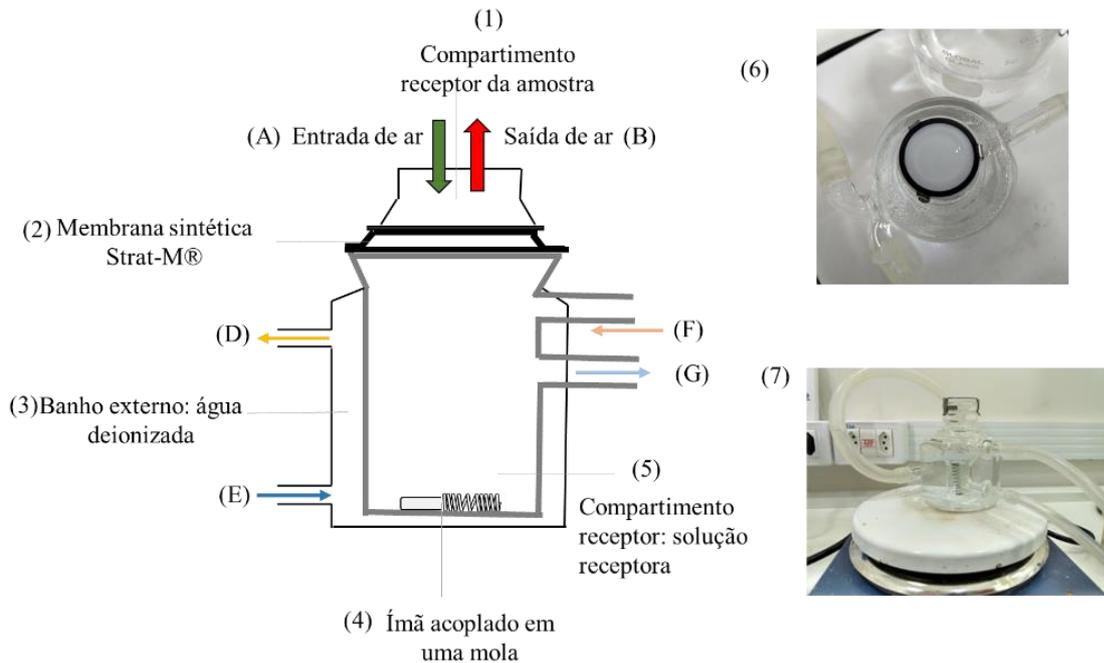


Figura 36 - Montagem experimental para a célula de Franz, para o estudo de permeação: (1) Compartimento que recebe a amostra para ser permeada na (2) membrana sintética, (3) banho externo com água deionizada à 37°C, (4) ímã acoplado em uma mola para agitação moderada e contínua da (5) solução receptora do ativo (tampão PBS). Na figura é possível observar ainda (A) a entrada de ar e (B) saída de ar para a regulação da pressão realizada na amostra, onde o (1) compartimento receptor da amostra é aberto para o ambiente, circulação do banho externo (D) conexão com mangueiras de silicone e seringa dosadora (insulina) para a saída e (E) conexão com mangueiras de silicone e seringa dosadora para a entrada da água deionizada, retirada e reposição da solução receptora (F) conexão com mangueiras de silicone e seringa dosadora para a entrada e (G) conexão com mangueiras de silicone e seringa dosadora para a saída, para se manter o equilíbrio da solução. (6) Vista do anel que segura a membrana com a solução de nanopartículas e (7) montagem da célula utilizada neste trabalho.

Fonte: Elaborado pela autora.

O banho externo foi completado com água deionizada e repostado sempre que necessário. A célula foi colocada em agitador magnético e o aparato foi mantido à 37°C (esta temperatura deve ser monitorada). Quando se atingiu a temperatura de 37°C a membrana Strat M® (*Transdermal Diffusion Test Model 25 mm* - Merck Millipore, (diâmetro = 2,5 cm²) foi colocada no compartimento receptor da amostra com o lado fosco em contato com a solução receptora interna. Sobre a membrana um anel de plástico, seguido de anel metálico com presilhas foi colocado sobre o conjunto de amostra e membrana. No lado brilhante da membrana (área de 3,94 cm²) foi colocado um volume de 500µL de nanopartículas com ativo, ou 500 µL de nanopartículas incorporadas ao PEG400 (50:50) (v:v) ou 5-ALA incorporadas ao PEG400 na concentração de 0,44736 mg.mL⁻¹. O compartimento do receptor interno (volume total de 10mL) foi preenchido com tampão fosfato salino (PBS, pH 5,5) (21), evitando a presença de bolhas. Para cada ponto coletado, um volume igual da solução receptora era repostado para se manter o equilíbrio da solução. Foram coletados, assim, 500 µL da solução receptora para nove pontos: 0; 5; 15; 30; 60; 120; 180; 240 e 300 minutos e armazenados em microtubos. Além

destes pontos, ao final do estudo a membrana foi retirada e submersa em 2 mL da solução receptora, os pontos foram derivatizados segundo descrito em Padronização da derivatização do 5-ALA, em triplicata.

Foram calculados o fluxo de difusão (J) que é a taxa de passagem de uma substância absorvida por unidade de área em função do tempo e o *lag time* que é o tempo necessário para que o fluxo de difusão se torne estável ou em equilíbrio, portanto, é calculado por extrapolação da reta de regressão linear até o eixo do tempo (21).

5.2 Resultados e Discussão

5.2.1 Sensibilidade ao pH em função da adsorção do 5-ALA na superfície das nanopartículas

Como foi observado nas análises de superfície do capítulo 0 é possível afirmar que o 5-ALA interage com o PVA e o PEG, de forma que o ativo possa estar adsorvido na nanopartícula, e portanto, contribuindo para características específicas de superfície das mesmas. Deste modo, buscamos investigar o estímulo ao pH do sistema C-SE-PEG-PVA, em comparação ao sistema com ativo, figura 37, em diferentes condições. Segundo Fu *et. al.* (158), sabe-se que nanopartículas de PLGA são estáveis em solução aquosa devido às interações hidrofóbicas entre as próprias nanopartículas, que é mostrado nos estudos anteriores de estabilidade. Outro ponto a se destacar é que com as análises de estabilidade é possível afirmar que as nanopartículas sofrem estímulos diferentes em diferentes temperaturas, o que é um comportamento esperado estes tipos de sistemas. (159).

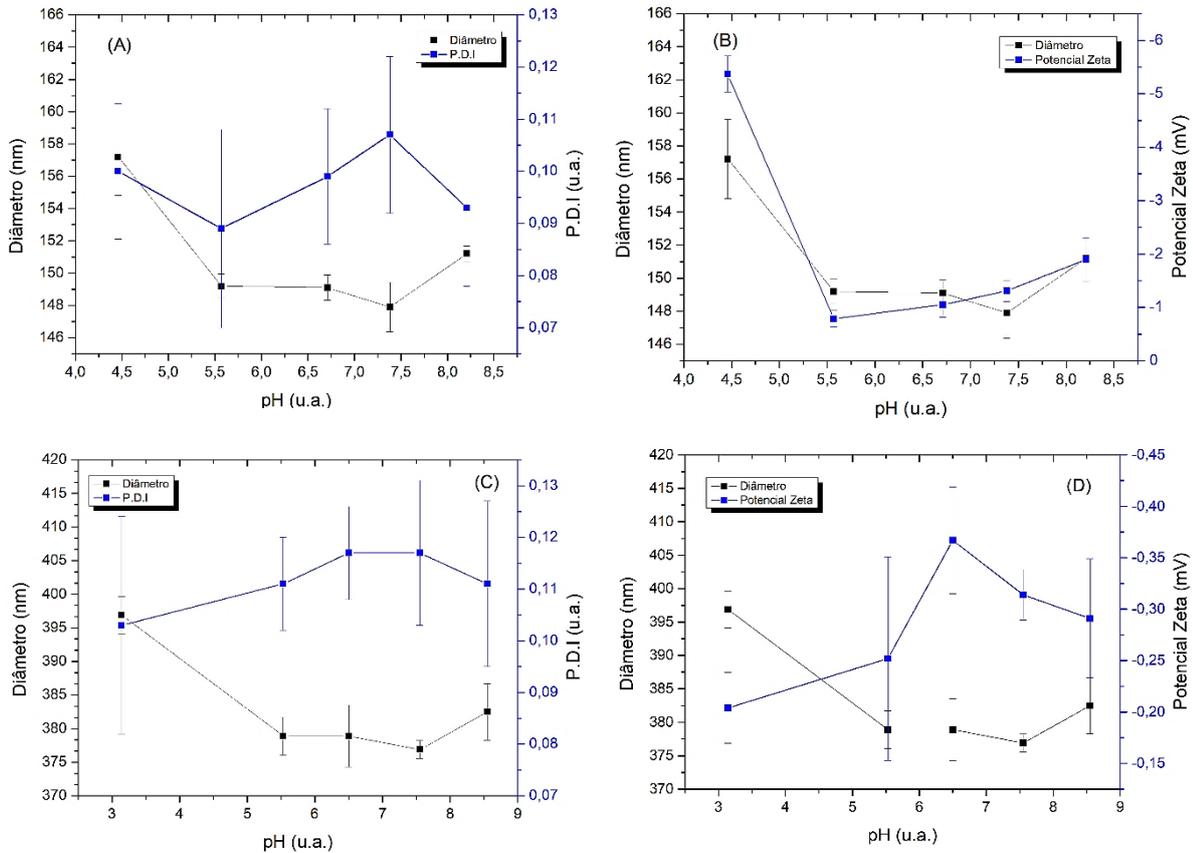


Figura 37 - Análise do estímulo ao pH através do (A) diâmetro em comparação ao PDI e (B) diâmetro em comparação ao potencial para o sistema C-PEG-PVA e (C) diâmetro em comparação ao PDI e (D) diâmetro em comparação ao potencial para o sistema C-PEG-PVA-ALA.

Fonte: Elaborado pela autora.

No geral, os sistemas sem e com ativo mostram que o tamanho médio das nanopartículas e PDI diminui conforme o pH aumenta de 4,0 para 8,0 e de 3,0 para 8,0, respectivamente para os sistemas C-SE-PEG-PVA, figura 37 (A), e C-PEG-PVA-ALA, figura 37 (C), isto demonstra a mudança na estrutura das nanopartículas poliméricas ocorrem ainda em ambiente ácido. (159) O mesmo comportamento se repete para as análises de carga da figura 37 (B) no entanto, a carga do sistema aumenta conforme o pH também aumenta como é observado na figura 37 (D), mostrando a influência do ativo no sistema. A faixa de pH entre 5,5 e 7,5 não há mudança de tamanho nas duas amostras analisadas.

A quantidade adsorvida de 5-ALA na superfície das nanopartículas aponta para a dependência do pH dos sistemas e é fácil de observar isso, comparando as nanopartículas com ou sem ativo. Esses resultados sugerem que a alteração do pH exerce um efeito na quebra do equilíbrio hidrofílico/hidrofóbico das nanopartículas o que leva a desestabilização da estrutura, isto é, o 5-ALA fica mais exposto entre a cadeia do PEG e da superfície das partículas em pH ácido, justificando, também, o aumento do potencial das partículas. É possível que o grupo

amino do 5-ALA se oriente em direção à água, enquanto a carboxila se orienta para o PLGA. Então, quando o pH diminui, há a protonação destes grupos $-NH_2$ e $-COOH$ e, portanto, aumenta-se a força repulsiva eletrostática, o que resulta no aumento da agregação das partículas, tamanho e PDI em relação ao pH. (159-160)

De acordo com os resultados e com a literatura, sabe-se que o PLGA forma o núcleo hidrofóbico das nanopartículas, enquanto que a associação de PEG-PVA forma um involucro hidrofílico em torno das mesmas, em contato com a solução aquosa. O PVA se adsorve na superfície das nanopartículas de PLGA, possivelmente via interações hidrofóbicas. Por outro lado, o PEG parece exibir um equilíbrio hidrofílico/ hidrofóbico sensível ao PLGA e ao PVA (e ao 5-ALA). À medida que o pH aumenta, o equilíbrio hidrofílico/hidrofóbico é quebrado e leva-se a desidratação do PEG, o que implica, por sua vez, ao encolhimento da camada externa na faixa de pH entre 5,5 e 7,5, levando a formação de nanopartículas menores. (159,161)

Em geral células tumorais apresentam uma pequena mudança na temperatura e pH, em relação aos tecidos de células saudáveis. É muito difícil projetar nanopartículas responsivas ao pH com uma resposta precisa ao pH ácido do tumor (pH $\sim 6,0$). Este sistema mostra que não é capaz de responder a mudança de pH do ambiente extra tumoral de pH 7,5 para o pH 6,0, assim como em outros exemplos da literatura, portanto, a nanopartícula não é suficiente estável no pH neutro, para desencadear a liberação na célula tumoral. No entanto, nos estudos de estabilidade mostramos que as nanopartículas deste sistema diminui o diâmetro em aproximadamente 24%, com aumento da carga de 13%, mostrando que na temperatura de 40°C, que é próximo a temperatura corporal entre 36,5 e 37°C, há uma possível desestruturação das nanopartículas, o que pode levar a liberação mais rápida do fármaco nas células tumorais (no entanto, esta hipótese de estímulo resposta à temperatura deva ser melhor investigada com análises de liberação, espectroscopias e até mesmo com análises em diferentes comprimentos de onda de luz). Além disso, nanopartículas responsivas ao pH pode oferecer uma grande vantagem que é aumentar a liberação mais rapidamente do 5-ALA incorporado, em comparação a outros sistemas que não respondem ao estímulo, além de poder contornar barreiras biológicas, para a melhor distribuição do fármaco em relação a molécula livre. (158-159)

5.2.2 Análises térmicas

Liofilização

A liofilização antes das análises térmicas é um processo importante, para não se analisar os picos da água nos termogramas. Ao final do processo de liofilização obteve-se duas massas brancas, parecidas com filmes. Foi calculado o rendimento de produção deste filme, para 15 mL de solução de nanopartículas. Considerando-se que em 15 mL de nanopartículas sem ativo há $(0,0975 \pm 0,0004)$ g de teor sólido, isto implica que foram recuperados 42,35% da massa de nanopartículas. Do mesmo modo, para as nanopartículas com ativo, o rendimento foi de 32,82%, considerando o total de massa sólida como $(0,1042 \pm 0,0005)$ g. O rendimento baixo pode ser associado a vários fatores como o tempo da etapa de congelamento, a lavagem das soluções de nanopartículas, adição de crioprotetores entre outros processos físicos envolvidos, onde a quantidade final do produto depende de quanto de material é perdida nas paredes do vaso de nitrogênio líquido. Para nanopartículas de PLGA como carregadores de leucina, há rendimentos na literatura de 33 e 38%, para diferentes técnicas de secagem. Não houve adição de crioprotetores antes da liofilização das nanopartículas, muito embora, na literatura é mostrado que a presença de PVA em soluções de nanopartículas poliméricas minimiza as fusões entre as nanopartículas. (162,163)

Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A figura 38 mostra o processo de decomposição térmica para o 5-ALA, PLGA, PVA e PEG400, obtidas por meio da análise termogravimétrica (TGA).

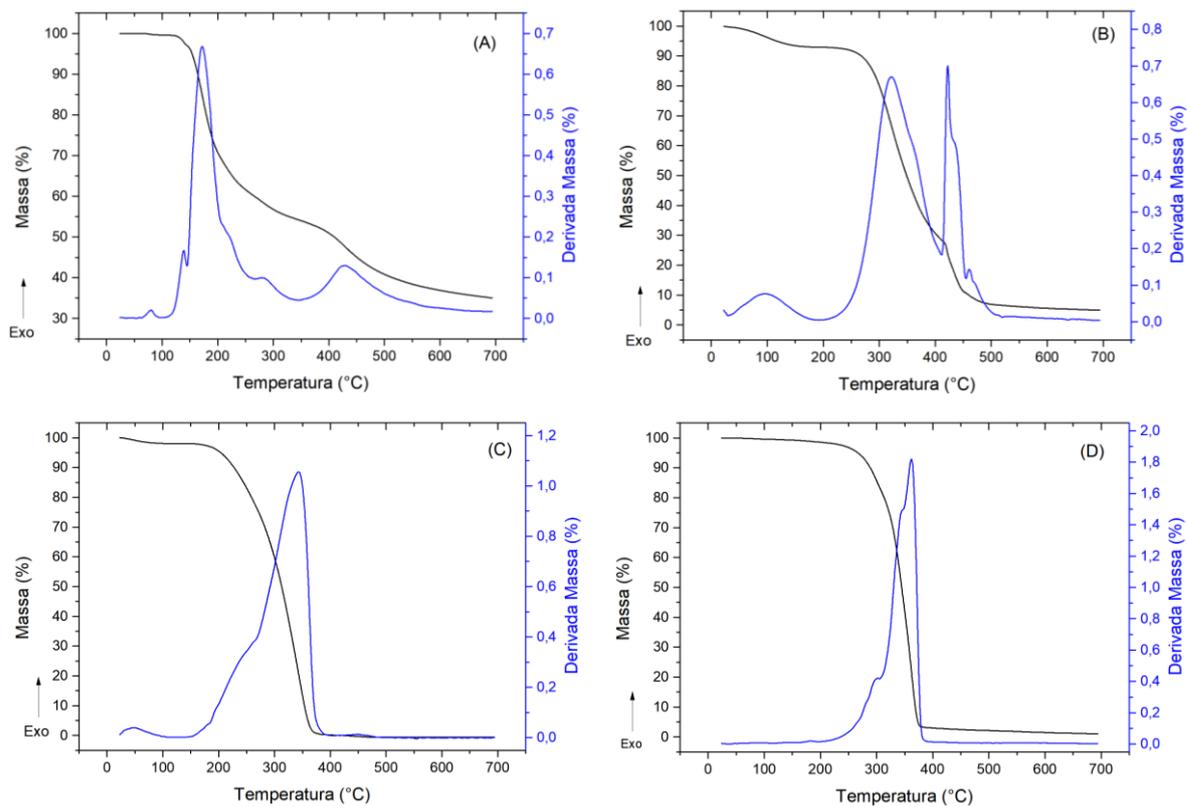


Figura 38 - Análises de TGA (em % massa) e a derivada primeira (A) 5-ALA, (B) PVA, (C) PEG400 e (D) PLGA.

Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 38 análises dos eventos térmicos obtidos por DSC para o 5-ALA, PLGA, PVA e PEG400.

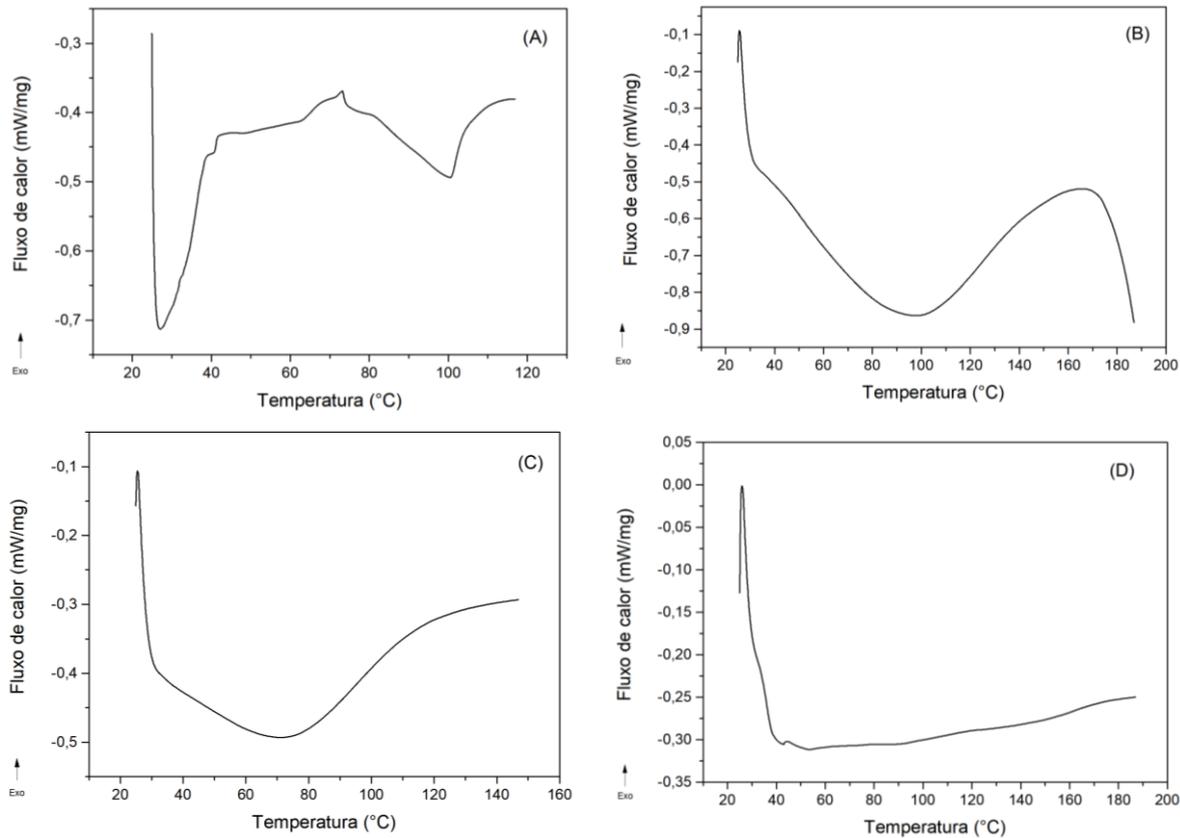


Figura 39 - Análises de DSC, mostrando os eventos térmicos para as amostras de (A) 5-ALA, (B) PVA, (C) PEG400 e (D) PLGA.

Fonte: Elaborado pela autora.

Observa-se que o 5-ALA se decompõe em quatro estágios diferentes, a primeira etapa se inicia aproximadamente em 55°C com uma perda de massa de 0,38%, seguida em 101,53°C com perda de massa de 39,58%, a terceira etapa se inicia em 266,23°C e a terceira em 347,86°C, com 5,93% e 19,09% de perda de massa, respectivamente. Isto indica que a estabilidade do 5-ALA deve ser considerada até aproximadamente 100°C, no qual se inicia a perda de massa, embora assim como evidenciado pela curva DTG, é possível observar um evento exotérmico caracterizado por um pico largo, e antes dele um pico menor, relacionado ao primeiro estágio de decomposição do material, em aproximadamente 70°C. Isto é observado pelas curvas de DSC, onde há a indicação de três regiões em 40,92 - 41,27°C, um pequeno evento exotérmico em 73,31°C e um evento endotérmico em 100,57°C, que pode ser relacionado a fusão do fármaco. Nestas análises, observa-se que as degradações são eventos cinéticos e não termodinâmicos, não sendo determinado o cálculo de entalpia de fusão do pró-fármaco. (83)

O PEG400 é líquido viscoso e, portanto, espera-se diferentes contribuições térmicas em relação as amostras em pó ou *pellets*. As etapas de perda de peso ocorrem principalmente

nas temperaturas de 266,23°C e 405,77°C, respectivamente para 21,03 e 76,92%, com uma perda inferior abaixo de 148,99°C de 1,988%, e posterior a 405,77°C de 0,6736%, relacionada a decomposição das cadeias do PEG. O pico exotérmico da DTG coincide com a maior perda de massa. O pico entorno de 266°C pode ser relacionado a transição vítrea do polímero, e combustão completa em torno de 405°C, semelhante ao reportado na literatura. O DSC, mostra um único evento endotérmico em 70,80°C. (164,165)

O termograma TGA do PVA mostra que há quatro eventos térmicos com estágios de perda de peso. Segundo a literatura, o primeiro atribuído antes de 200°C, pode ser atribuída à perda da água absorvida pelo polímero, com 7,042%. A segunda perda de peso de 64,45%, com início em 200°C e término em 410,52°C, pode ser atribuído à eliminação de átomos de hidrogênio e grupos hidroxilas das moléculas de PVA. Por fim, a terceira perda de massa entre 410,00°C e 525,38°C, é atribuído à decomposição térmica das cadeias poliméricas. As análises de DSC sugerem que o pico endotérmico na região de 97,61°C pode ser atribuída a região de temperatura vítrea, na literatura esta região é encontrada em próximo a 73°C, diferenças que podem ser atribuídas as diferenças do grau de hidrólise e massa molecular do polímero, além das próprias condições experimentais. (166)

Finalmente, para o PLGA há três eventos térmicos com perda de massa. Há uma perda de 1,48% até 204,53°C. Em seguida, a maior perda de 95,53% a 398,65°C e a segunda perda de massa de 1,95%, acima de 398 °C são relacionadas a decomposição da amostra. A maior perda de massa, coincide com o pico exotérmico da DTG. Nenhum ponto de fusão foi observado, pois, o PLGA parece ser de natureza amorfa. Isto pode ser observado pelo único pico analisado no DSC entorno de 44,53°C que pode ser relacionado a temperatura de transição vítrea do polímero. (167,168)

A figura 40 mostra o processo de decomposição térmica para as nanopartículas C-PEG-PVA e C-PEG-PVA-ALA obtidas por meio da análise termogravimétrica (TGA).

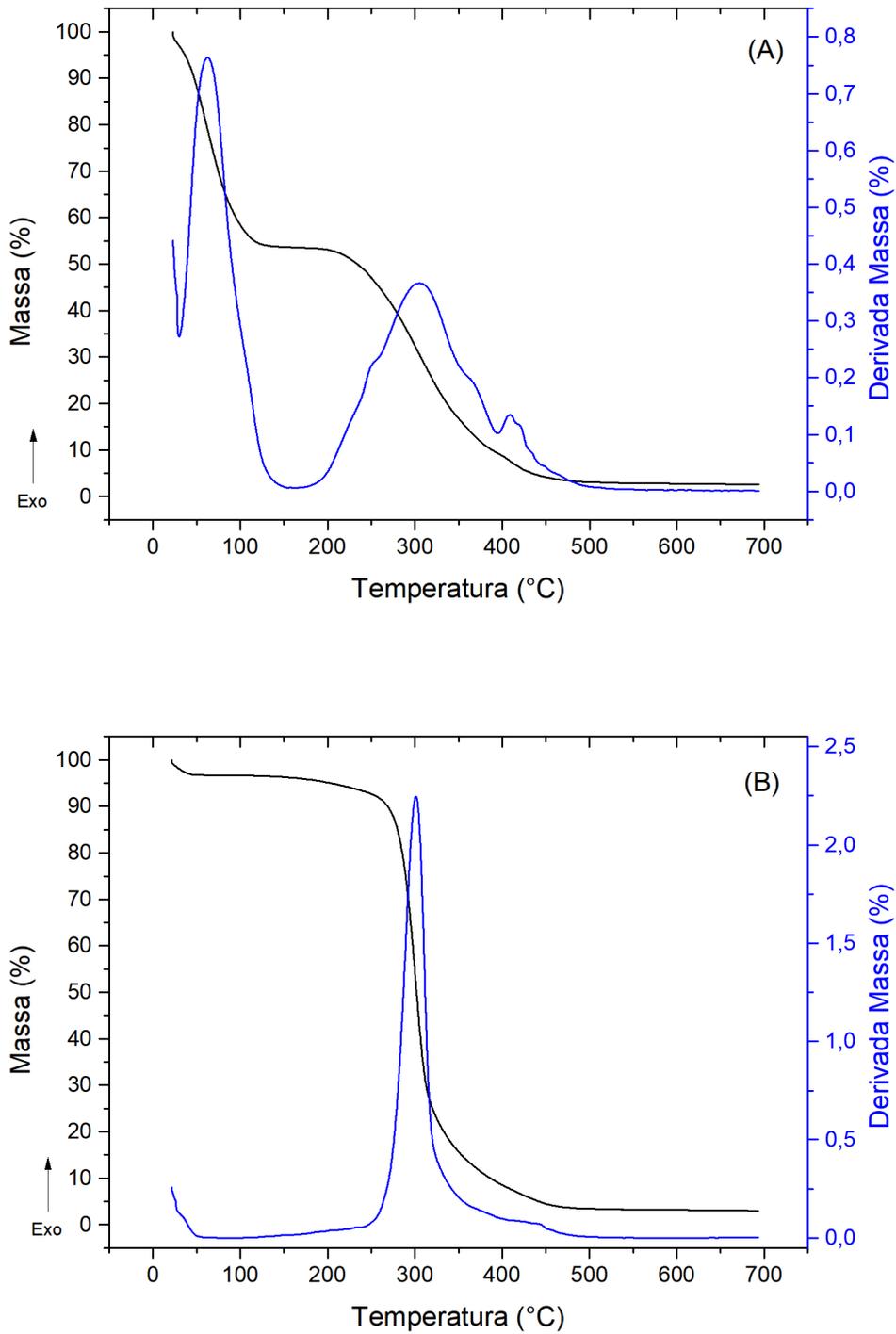


Figura 40 - Análises de TGA (em % massa) e a derivada primeira (A) C-SE-PEG-PVA, (B) C-SE-PEG-PVA-ALA.

Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 41 análises dos eventos térmicos obtidos por DSC para as nanopartículas C-PEG-PVA e C-PEG-PVA-ALA.

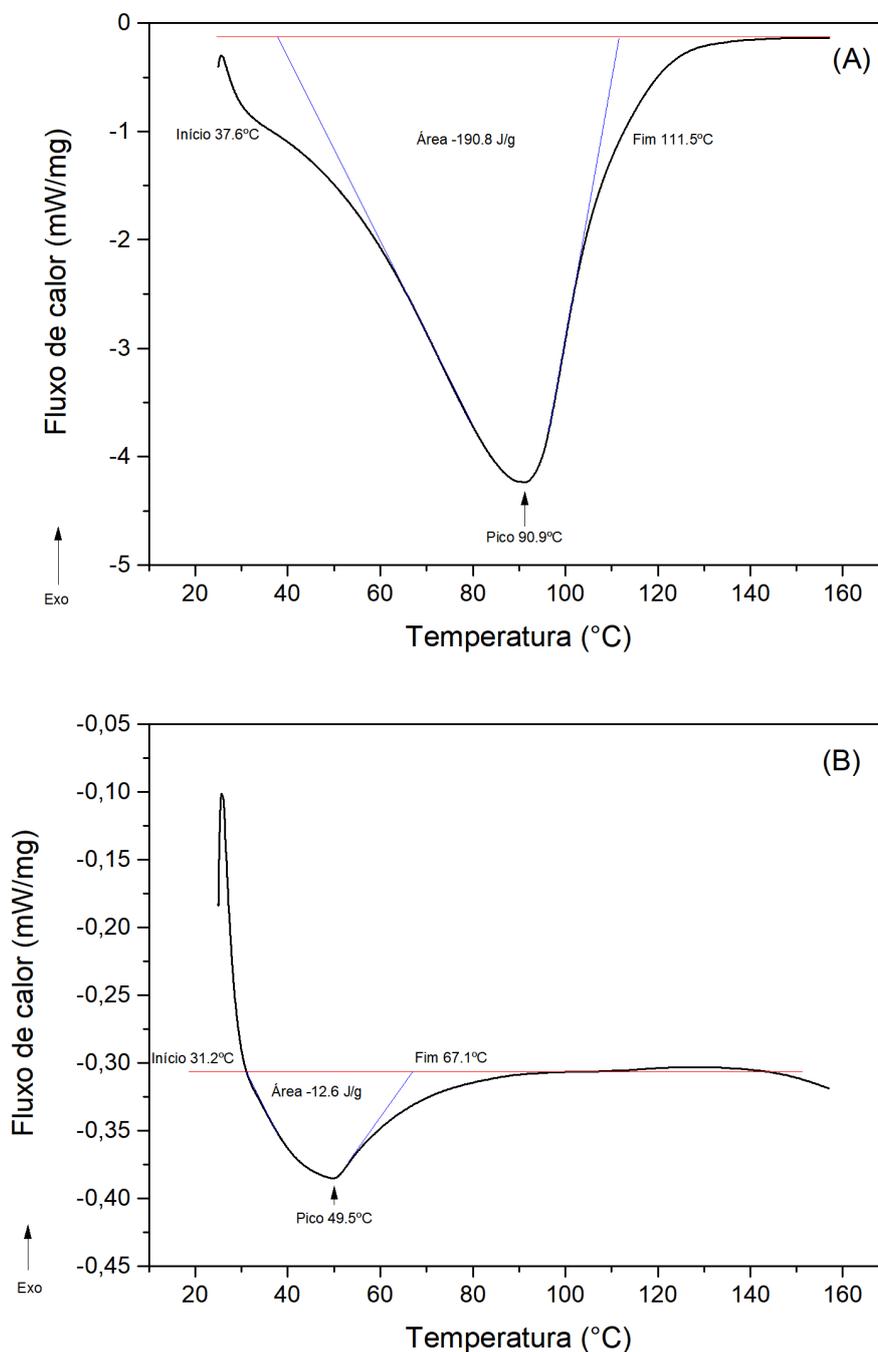


Figura 41 - Análises de DSC, mostrando os eventos térmicos para as amostras de (A) C-SE-PEG-PVA, (B) C-SE-PEG-PVA-ALA.

Fonte: Elaborado pela autora.

Para a nanopartícula C-PEG-PVA a curva TG apresenta quatro eventos térmicos caracterizados por picos largos em 70,68°C, a 152,32°C e a 393,90 °C e acima deste intervalo até 700°C, com perdas de massa respectivas de 27,04%, 19,24%, 44,30% e 6,78%. A curva

DTG apresenta três picos endotérmicos, nas regiões de maior perda de massa, enquanto o DSC apresentou um único pico endotérmico, na região de 90,97°C, maior do que o pico observado para o PLGA (44,43°C). A decomposição térmica das nanopartículas sem ativo apresentou uma temperatura mais baixa (70,68°C) em relação ao PLGA puro (204,53°C), isto acontece porque as nanopartículas apresentam uma área de superfície maior devido a sua escala nanométrica, ficando mais expostas a degradação térmica, logo, a mesma relação de área superficial explica o porquê as nanopartículas se degradam mais rápido do que o PLGA. Observamos ainda, que há o pico endotérmico na região de 393,90°C que é correspondente ao mesmo pico do PLGA em 398,65°C, que parece ser um pico típico do polímero, o que pode mostrar que as nanopartículas sem ativo podem ter estabilidade térmicas próximas ao PLGA. Outro ponto é que o perfil de degradação térmica, sugere a interação entre o PVA e o PEG e a matriz de PLGA, e não apenas uma mistura física.

A adição do 5-ALA nas partículas muda o perfil de degradação térmica das nanopartículas. Diferentemente da nanopartícula sem ativo, para a nanopartícula C-PEG-PVA-ALA a curva TG apresenta dois eventos térmicos em 58,81°C e 511,14°C com perdas de massa respectivas de 3,26% e 93,22%. A curva DTG apresenta um único pico fino endotérmico na região de 300°C. Aqui a decomposição térmica das nanopartículas com ativo (58,81°C) é menor que as nanopartículas sem ativo e o PLGA puro, o que implica, que a temperatura de degradação diminui com o carregamento do medicamento. Não foi observado o pico endotérmico (na região do 398,65°C) característico do PLGA, o que novamente confirma que a estabilidade térmica das nanopartículas com ativo é menor do que as nanopartículas sem ativo e que a matriz polimérica. É provável que o evento térmico mais intenso, seja devido a fração do PLGA na mistura, mas, também, está relacionado a contribuição dos polímeros que formam o corana das nanopartículas (o pico em 511,14°C é muito próximo ao do PVA em 525,38°C). Este resultado contribui para mostrar que o PVA fica mais externo as nanopartículas, enquanto o PEG e o 5-ALA interagem mais próximo ao núcleo do PLGA (como foi mostrado nas análises de FTIR e RMN). (167,169)

O DSC apresentou um único pico endotérmico, na região de 49,51°C, que mostra o evento correspondente a entalpia do polímero (44,43°C), esta região é a mesma encontrada para o PEG400. Assim, pode-se observar que o 5-ALA não afetou a estrutura do polímero, pois, os valores encontrados no DSC foram muito próximos. Embora o valor encontrado no DSC seja próximo ao do PLGA, esta região é também encontrada para o 5-ALA (entre 40,92 e 41,55°C) e pode ter contribuição do fármaco. Isso, pode levar a conclusão que o 5-ALA pode estar disperso em uma região mais amorfa das nanopartículas ou adsorvido na matriz de PLGA

(assim como observado nas análises anteriores de espectroscopia), indicando uma forte interação entre o 5-ALA e os outros componentes poliméricos, este é resultado já encontrado para nanopartículas de PLGA que encapsulam drogas hidrofóbicas. Por fim, as nanopartículas com ativo diminuem a entalpia do sistema, mostrando que com o aumento de temperatura pode diminuir a taxa de liberação do 5-ALA. (169) Por outro lado, o tipo de interação encontrada, também, sugere que a carga do 5-ALA afetou a estrutura do polímero, e as alterações no perfil do DSC leva a mostrar que essas alterações nos valores medidos, em relação as nanopartículas sem e com ativo, são atribuídas ao efeito já conhecido de que fármacos atuam como plastificantes para o polímeros. (167,169)

5.2.3 Microscopias

Microscopia de Força Atômica

Para o AFM não foi possível realizar imagens representativas para morfologia, figura 42 (D) ou contraste de fase figura 42 (E) das amostras C-PEG-PVA-ALA, e por consequência a imagem topológica não continha, também, representação significativa figura 42 (E) . De acordo com as análises, as amostras C-PEG-PVA são esféricas, de superfície lisa e apresentam topologia não uniforme, com tamanhos médios de 187,48 nm, determinado pelo software do equipamento.

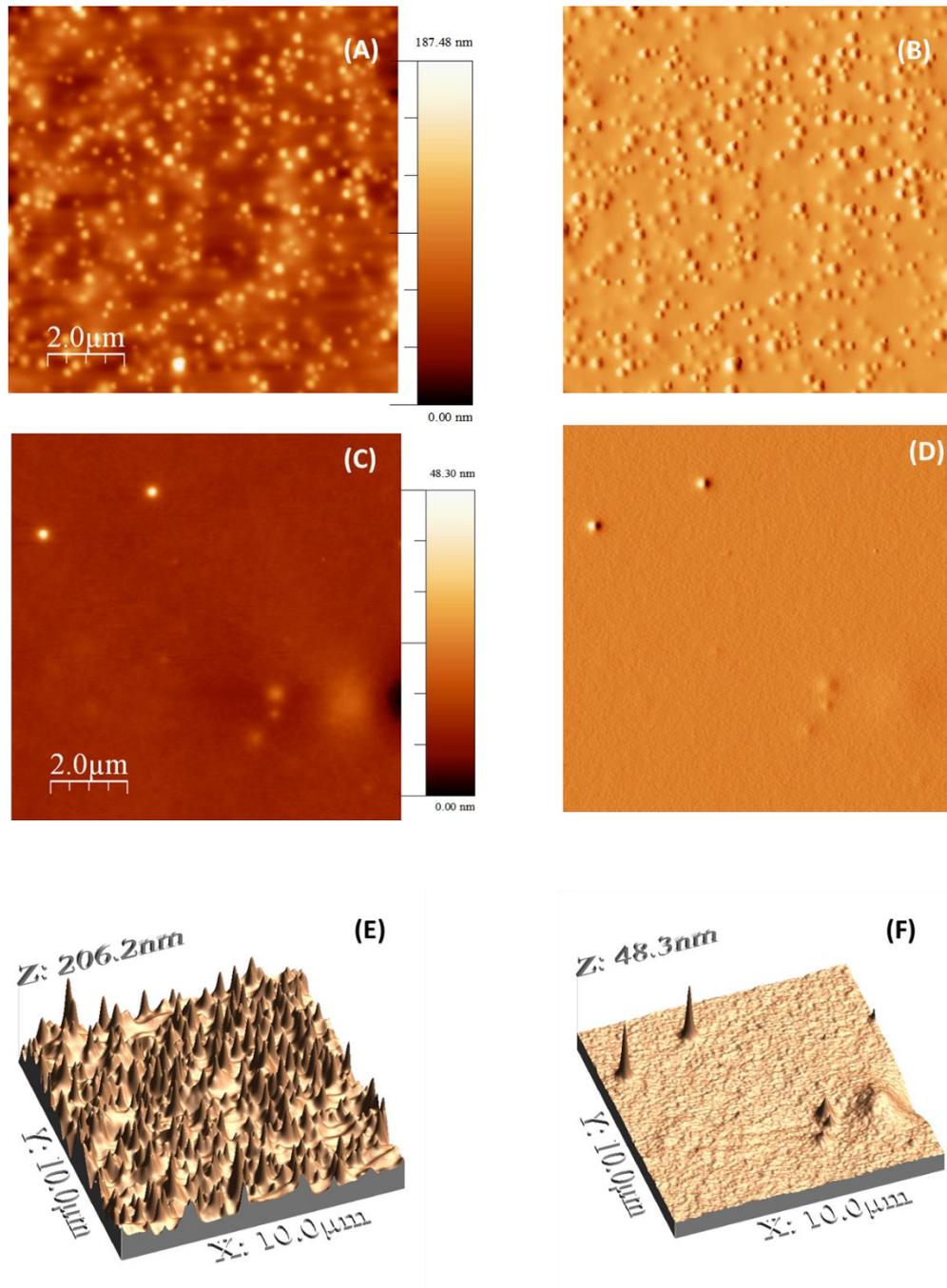


Figura 42 - Análises por AFM para as nanopartículas (A) e (C) imagem morfológica; (B) e (D) contraste de fase e (E) e (F) topológica, respectivamente para as amostras C-PEG-PVA e C-PEG-PEV-ALA. As imagens de morfologia e contraste de fase estão na mesma escala.

Fonte: Elaborada pela autora.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para o MEV as amostras de nanopartículas sofreram degradação, não sendo possível realizar imagens morfológicas definidas para a amostra de C-PEG-PVA-ALA. A degradação observada pode ser associada a energia dissipada pelo feixe de elétrons para gerar as imagens, o que é justificável pela baixa estabilidade de degradação das nanopartículas com ativo, que é menor para as nanopartículas sem ativo, como constatado nas análises térmicas. Toda via, para as nanopartículas C-PEG-PVA é observado a formação de esferas de superfície lisas com dispersão não uniforme de tamanho de partículas, figura 43.

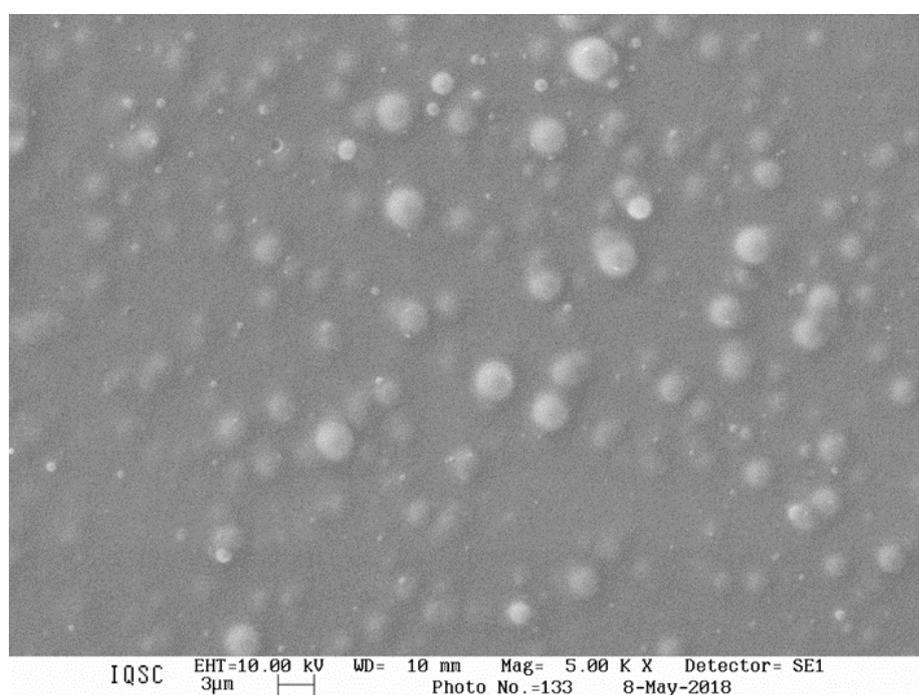


Figura 43 - Análise morfológica por MEV para o sistema C-PEG-PVA.

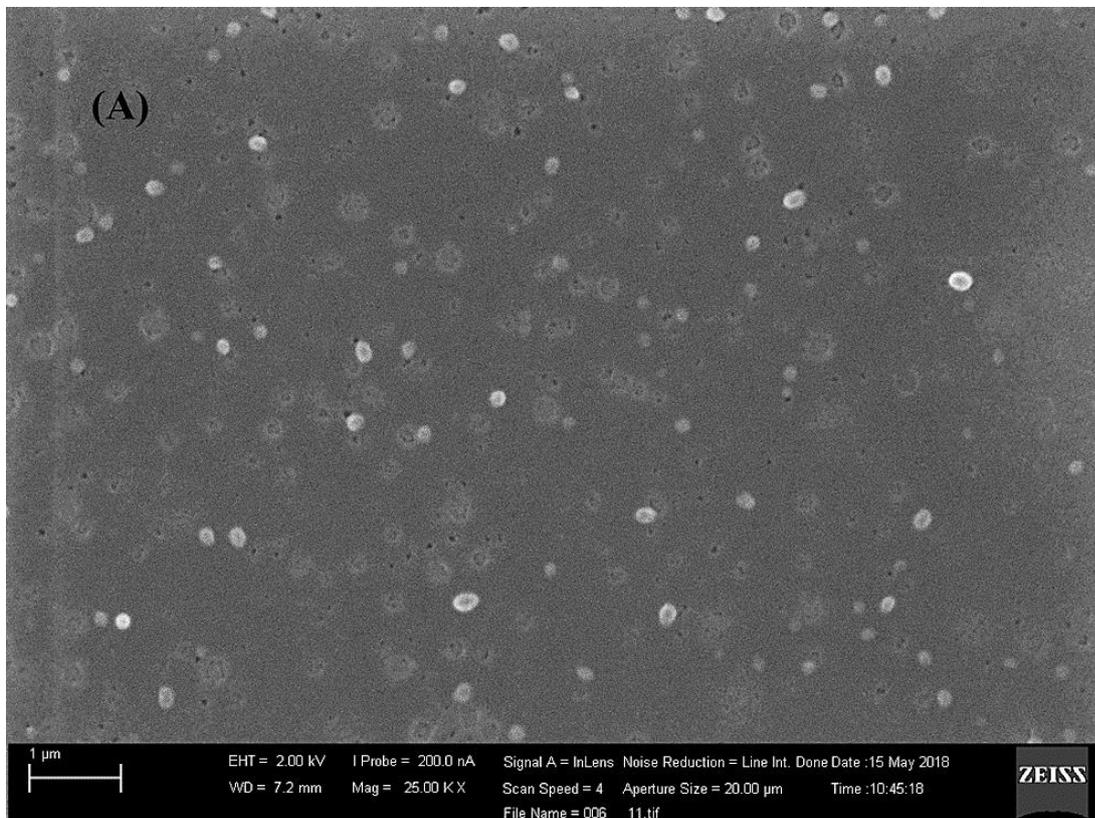
Fonte: Elaborada pela autora.

Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão por campo (MEV-FEG)

Com o MEV-FEG é possível diminuir a energia para geração das imagens, entretanto, ainda assim, observou-se alguma degradação nos sistemas, não sendo possível avaliar as nanopartículas sem ativo, pois, as amostras pareciam muito aglomeradas formando uma espécie de filme rugoso figura 51 (D) . Este fato foi associado ao preparo das amostras. O mesmo artefato rugoso é observado nas imagens para as amostras com ativo, destaque figura 51 (A), (B) e (C). Nas imagens é possível observar ainda a formação de partículas igualmente de superfície lisa e de distribuição polidispersas, estando de acordo com a formação de nanopartículas de PLGA (170). Embora circulares, algumas destas nanopartículas ficavam mais

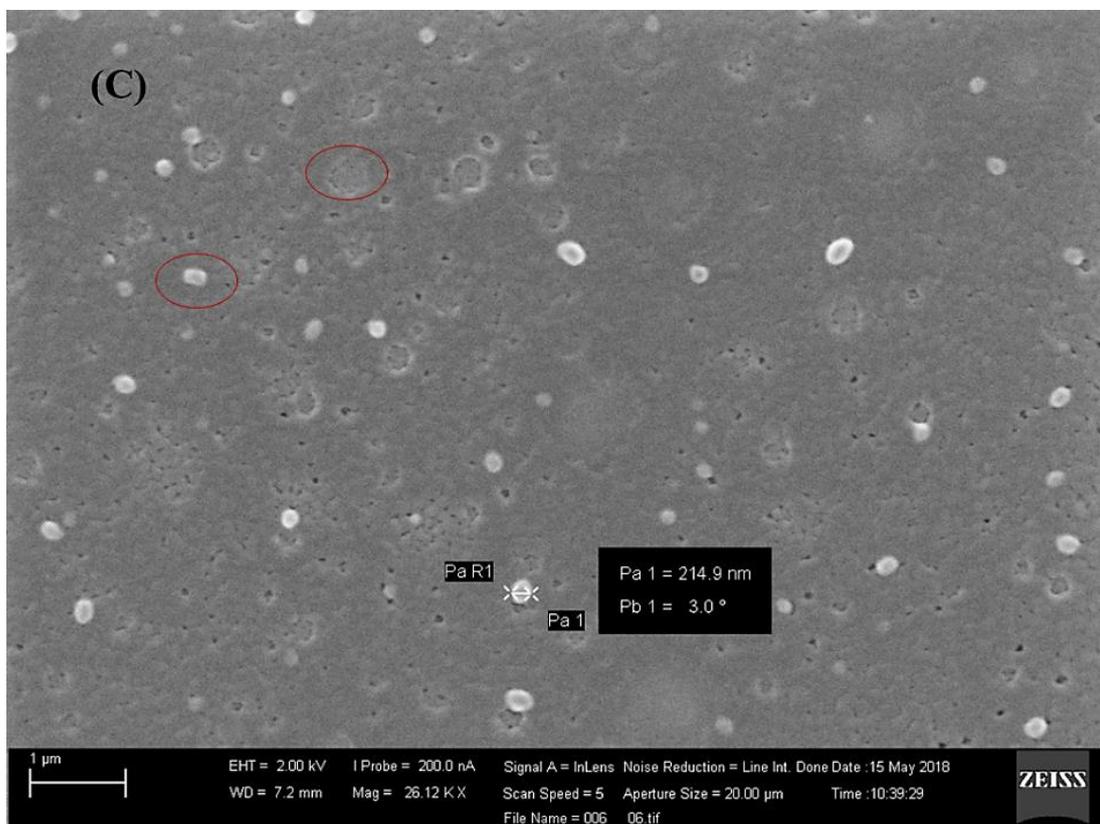
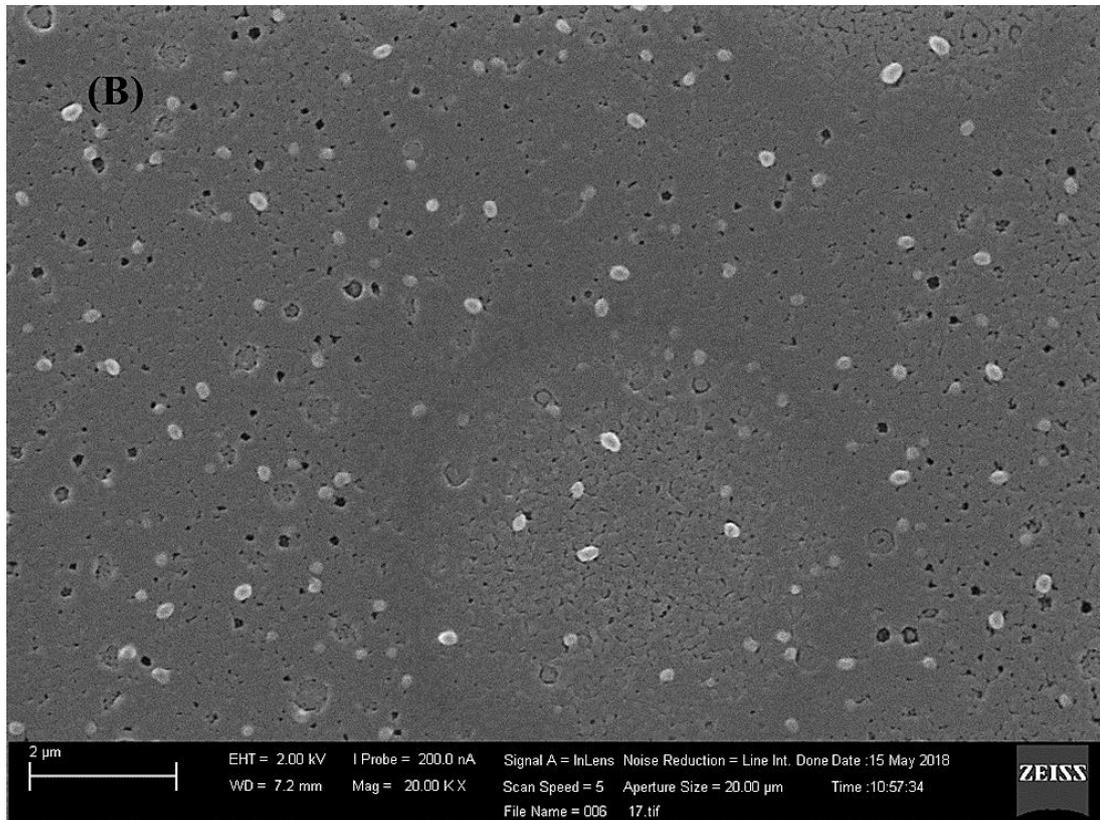
achatadas ao decorrer das análises indicando sinal de degradação das amostras (destaque figura 51 (D)).

O PVA forma nanopartículas de PLGA com superfícies lisas, esféricas e bem definidas. Este fato mostra que o tensoativo é importante para estabilizar a fase dispersa, gerando superfícies de forma esférica e fina, e sem qualquer agregação ou adesão, este fato é condizente ao observado pelas análises térmicas, onde é possível que o PVA esteja interagindo mais com a fase aquosa na nanoemulsão. Além do tensoativo, as características das partículas mostram a homogeneização eficiente. (163,171)



(continua)

(continuação)



(continua)

(continuação)

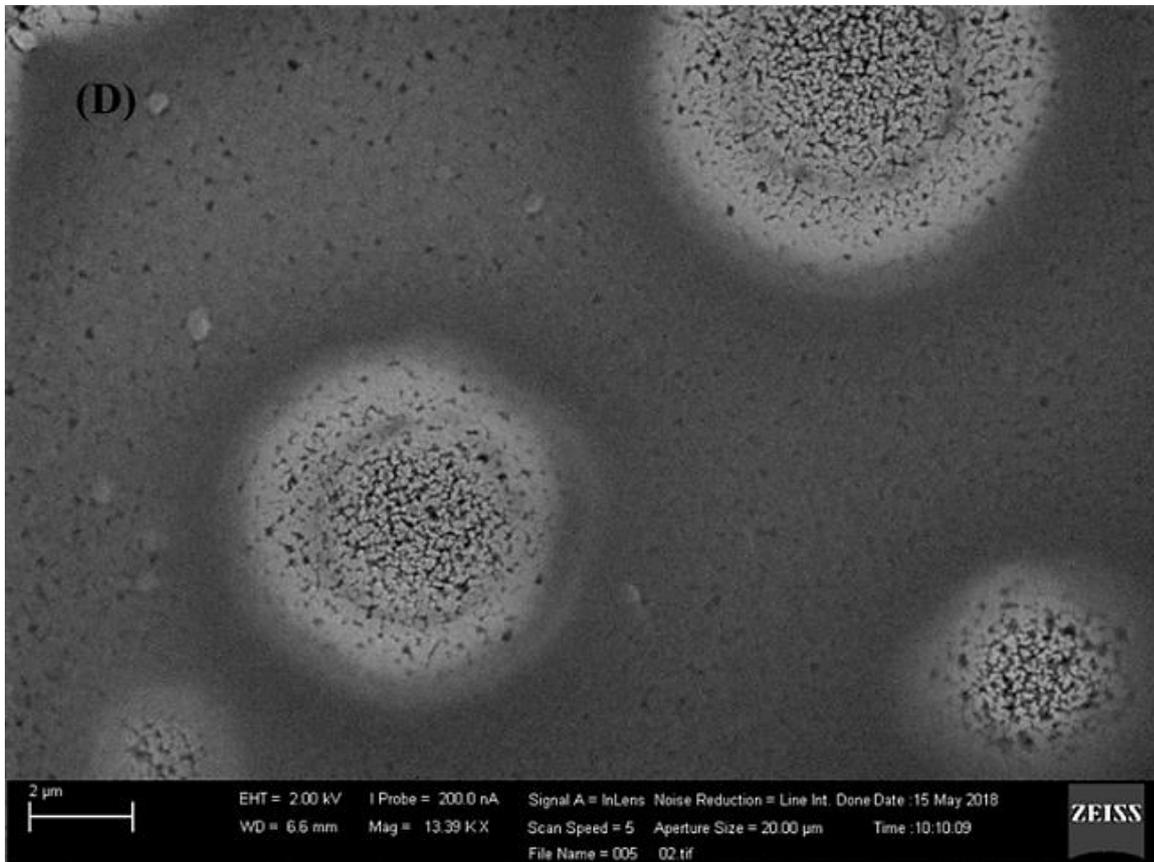


Figura 44 - Análise morfológica por MEV-FEG para o sistema (A), (B) e (C) C-PEG-PVA-ALA para diferentes regiões (A) e (B). A figura (C) destaca a mudança de forma de algumas partículas no decorrer das análises e a formação de agregados de poliméricos. A figura (D) mostra a formação de aglomerados para o sistema C-PEG-PVA.

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com os resultados investigados até aqui é possível fazer uma representação da formação das nanopartículas figura 45, onde as cadeias de PVA e PEG400 interagem com a superfície das nanopartículas, e o 5-ALA fica adsorvido na matriz do PLGA.

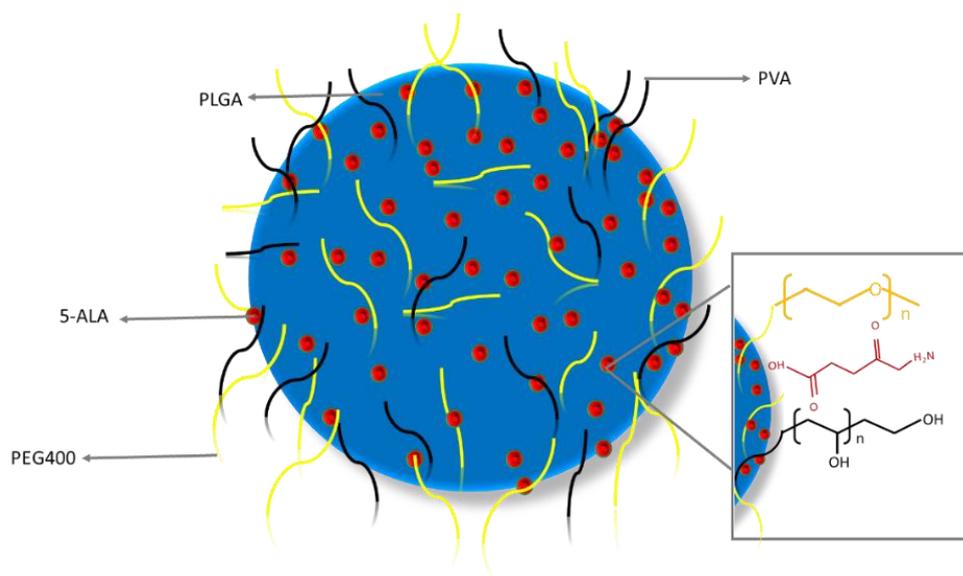


Figura 45 - Representação da formação da nanopartícula em solução aquosa do sistema C-PEG-PVA-ALA, mostrando a formação das camadas do PVA e PEG400 (formação da coroa) com o 5-ALA adsorvido em toda a superfície da nanopartícula, embasado nas caracterizações de superfície, morfologia e análises térmicas.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.4 Eficiência de encapsulação

Apesar de ser um técnica conhecida desde meados da década de 1990 (172), o método de derivatização do 5-ALA é um método de difícil reprodução no laboratório, por ser uma metodologia que envolve várias etapas e cada qual dentro de uma padronização, podendo somar vários erros dos experimentos.

Os estudos de eficiência de encapsulação, liberação e permeação foram realizados a partir da derivatização do 5-ALA em tampão PBS em pH 5,0. A figura 46 mostra a curva de calibração para o composto fluorescente $C_{16}H_{19}NO_4$. Este método deve ser padronizado restritamente quanto aos tempos de reação e agitação em estufa e em temperatura ambiente, senão não há reprodução do método. Assim, a equação da reta utilizada é dada por $f(x) = a + bx$, onde o intercepto da reta é ajustado conforme o branco das análises para cada experimento. Na figura o melhor ajuste com intercepto de $a = 30.9528$ e $b = 1.740845$, com $R^2 = 0.96$. Com isso temos a curva que representa a concentração de 5-ALA respectiva a intensidade de fluorescência. Para a conversão dos experimentos, o valor de “a” foi utilizado como o valor corresponde ao controle (PBS), ao invés de mantermos fixo no valor determinado na calibração a fim de melhor representar os dados do experimento corrente.

Para a eficiência de encapsulação foram realizados dois métodos quantitativos, logo após o preparo das nanopartículas. Considerando que o 5-ALA esta adsorvido na superfície da

nanopartícula, a solução foi centrifugada e o sobrenadante derivatizado. Para a concentração teórica de $(4,473 \pm 0,003) \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$, a E.E. foi calculada como 45%. Quando as nanopartículas não foram centrifugadas a E.E. foi de 57%. Outros resultados na literatura mostram que para sistemas de PLGA-ALA as eficiências de encapsulação são de 65.80%(59), 66.80 % todos para concentrações maiores do 5-ALA nas soluções, respectivamente para 2.7 e 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente. (164)

Podemos concluir que há uma concentração significativa do pró-fármaco nas nanopartículas. A eficiência de incorporação de 5-ALA nas nanopartículas de PLGA pode ser atribuída a vários fatores, dentre eles, a metodologia utilizada para realizar a derivatização (com acúmulos de sucessivos erros), além da própria polidispersividade das nanopartículas (que podem mudar a porcentagem de carregamento do fármaco) são fatores associados a baixa eficiência. (21) Além disso, como o 5-ALA é de natureza hidrofílica o ativo tende a migrar para a fase aquosa, para que isso não aconteça é necessário que as interações físicas e químicas entre o PLGA e o 5-ALA, sejam fortes. Neste ponto de vista, os resultados mostram que além da matriz e os tensoativos foram eficazes para manter o 5-ALA adsorvido no sistema, como era esperado pelas análises de espectroscopia. Além disso, o método de incorporação do ativo, temperatura, agitação, tensoativos, taxa de remoção do solvente orgânico, solvente orgânico residual, massa molecular e proporção dos copolímeros no PLGA são fatores que podem influenciar na E.E. (164)

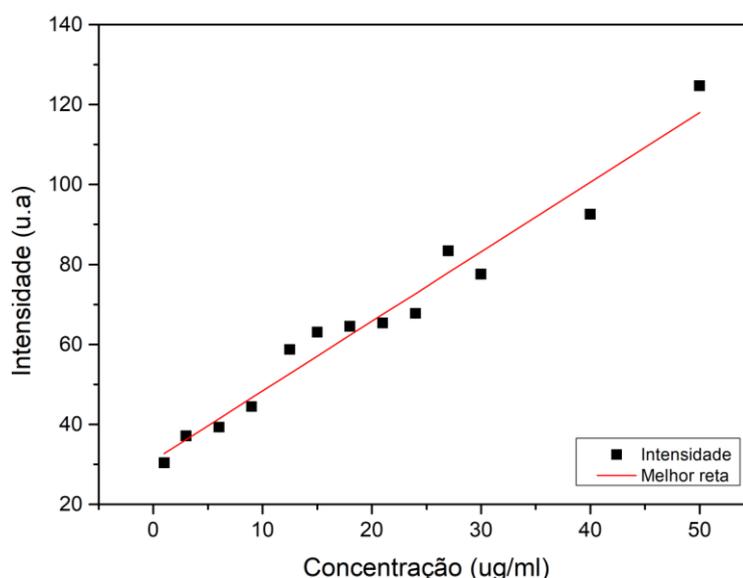


Figura 46 - Curva de calibração de intensidade de fluorescência para a reação de derivatização do 5-ALA em PBS (pH 5,0), para o composto fluorescente $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_4$.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.5 Perfil de liberação controlada

Os estudos de perfil de liberação controlada têm como objetivo mostrar o comportamento cinético da liberação do fármaco para o meio aquoso. É um processo complexo visto que há uma série de etapas físicas que impõem a limitação da taxa de liberação até que toda a massa do ativo seja toda liberada. A taxa de liberação de nanopartículas de PLGA ocorre devido a diversos fatores como permeação e solubilização em meio aquoso, erosão e difusão de fragmentos poliméricos e a taxa de difusão do fármaco de liberação. Esses processos ocorrem em escalas de tempo muito semelhantes, e por isso o mecanismo de liberação é complexo de se interpretar. (173) Os volumes no gráfico estão ajustados para 1 mL.

O padrão de liberação na figura 47 representa a liberação em duas fases. Na primeira fase, em 60 minutos cerca de 50% da concentração de 5-ALA foi liberada. Nesta fase, a liberação caracterizada por ser rápida relacionada à desorção e difusão do ativo localizado na matriz do polímero. Na segunda fase, é observada uma liberação lenta e sustentada. Após a incubação das nanopartículas em meio aquoso (tampão fosfato salino), as nanopartículas podem sofrer um intumescimento gradual, levando a uma liberação lenta e constante ao longo do tempo.(174) Novamente aqui, os desvios padrões são justificáveis pela metodologia experimental usada para a avaliação dos resultados. Destaca-se aqui, que a metodologia deve ser melhor padronizada para se obter menores desvio padrão para cada experimento.

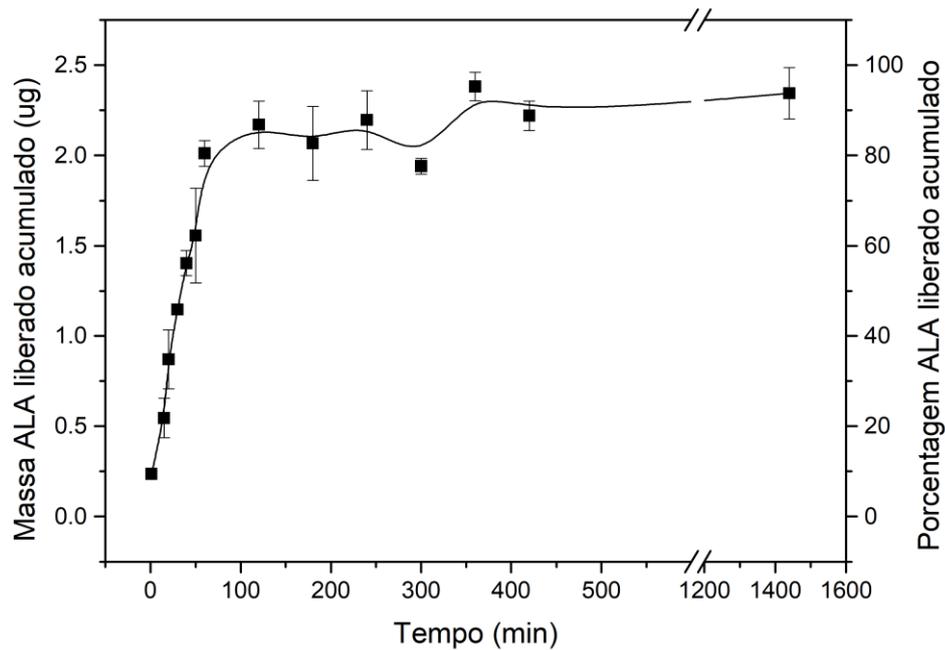


Figura 47 - Perfil de liberação controlada para as nanopartículas do sistema C-PEG-PVA-ALA até 24 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para se descrever um mecanismo de liberação de uma matriz de PLGA, considera-se a taxa de permeação de água e hidratação da matriz. A água, penetra na superfície para o centro da nanopartícula, que por sua vez leva a degradação por hidrólise da matriz, levando a difusão do ativo que está adsorvido na matriz polimérica. Conforme a degradação do polímero acontece, monômeros e pequenos fragmentos do polímero são formados/soltos, acelerando a taxa de difusão do ativo. Se um gradiente de pH é formado, a degradação por hidrólise do PLGA irá acelerar os processos de difusão do ativo. Quando uma massa suficiente do PLGA é degradada totalmente, acontece um contrabalanço da hidrólise até que todo o fármaco seja liberado. No entanto, como o 5-ALA já está adsorvido na superfície da nanopartícula, além de ser uma molécula pequena que contribui para a difusão mais rápida para o meio, não necessariamente o último processo citado de degradação ou erosão completa da matriz tenha que acontecer para a segunda etapa de liberação. (173)

O PEG na superfície das partículas pode ajudar na liberação rápida do 5-ALA, o que implica que em 24h há 100% da liberação da droga. (175) Este perfil é um ganho para o uso em TFD, visto que, quanto mais rápido for a liberação do fármaco, mais rapidamente é a metabolização e consequente produção de protoporfirina IX, para a aplicação de luz. Este tipo de perfil para o 5-ALA é apresentado em outros trabalhos da literatura. (21)

5.2.6 Permeação das nanopartículas em célula de Franz (animal *cruelty free*)

Essa etapa do desenvolvimento teve por objetivo calcular a quantidade de composto ativo permeado (5-ALA), para aplicação tópica. As soluções em PEG400 do 5-ALA tem com concentração próxima a concentração teórica incorporada nas nanopartículas. A figura 48 mostra que os resultados da permeação usando a membrana Strat-M®

. O *lag time* para as duas análises foi determinado em 60 minutos, com o fluxo ($4,56 \times 10^{-4}$) e ($3,94 \times 10^{-4}$) $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente para o C-PEG-PVA-ALA em PEG e o 5-ALA. O perfil de permeação é semelhante para a molécula livre e as nanopartículas. No entanto, quando comparado ao 5-ALA com a nanopartícula em solução de PEG observamos que há um aumento de 13,56% no aumento do fluxo das nanopartículas. Em estudos *ex vivo* a baixa retenção do 5-ALA em entregas transdérmicas está relacionada à sua hidrofiliabilidade, o que dificulta a penetração do fármaco na pele, ainda com a adição do PEG como agente para ajudar na permeabilidade pode não implicar em mudanças no perfil, estando os resultados de acordo com a literatura. A baixa permeabilidade do pró-fármaco destaca a necessidade de desenvolvimento de veículos para a entrega dos fármacos na pele. (176)

Em geral nanoestruturas aumentam a oclusão da pele o que faz com que as estruturas permeiem com mais facilidade. A pele com perda de água reduzida e exposta a nanopartículas facilita o mecanismo de intumescimento destas, levando ao mecanismo de liberação do ativo. Além disso, uma das maiores vantagens ao uso do ativo livre, está na proteção do ativo nas nanopartículas, diminuindo o tempo de degradação do 5-ALA consideravelmente. Deste modo, o aumento de permeabilidade das nanopartículas implica em promissoras melhorias para a TFD tópica. (21)

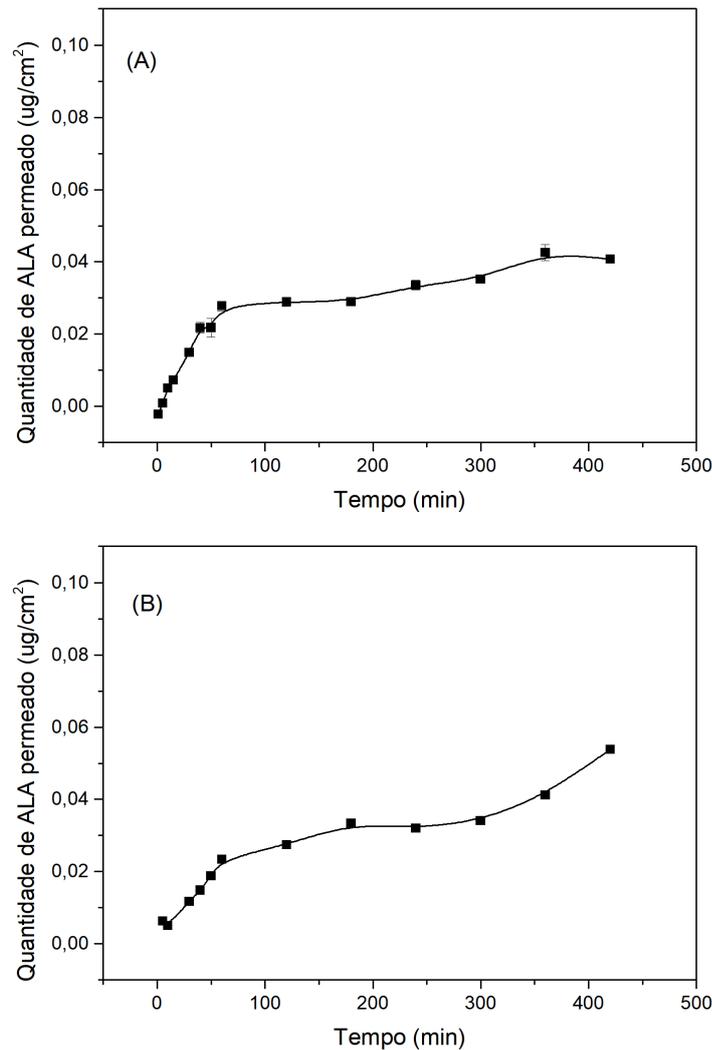


Figura 48 - Estudo on vitro de permeação cutânea do (A) C-PEG-PVA-ALA em solução de PEG (50:50) (v:v), (B) 5-ALA livre.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ainda existem poucos relatos sobre a permeabilidade de nanopartículas em membranas Strat-M®, e o tamanho dos poros da membrana não é claro. Em alguns estudos da literatura mostram que nanopartículas de PLGA, com tamanho médio de 277nm, ficam na camada profunda de PES da membrana, mas, em outros relatos nanopartículas de 30 nm ficam retidas na camada superficial da membrana, isto implica que a membrana embora, otimizada para os testes de permeação transdérmica, ainda tem suas limitações.

Especificamente na metodologia de estudo aplicado neste estudo, há muitos erros envolvidos a começar pelo uso de uma única célula para a coleta de todos os pontos, que mesmo repondo o volume da solução retirada (0,5 mL), estas diluições sucessivas podem elevar a erros das medidas, logo, embora o gráfico apresente mais de 13% de aumento de fluxo em relação ao 5-ALA livre, este experimento, pode conter muitos erros sistemáticos e aleatórios, um deles é do próprio ajuste da curva de concentração, além dos erros acumulativos nas derivatizações

para leitura de fluorescência, como já relatado anteriormente. Um outro ponto é que pode ter ocorrido a resistência de permeabilidade da membrana tanto com a permeação das nanopartículas, quanto pela adição do PEG na solução das nanopartículas preparadas para estas análises. (177)

Ainda, segundo a literatura, para nanopartículas de PLGA-PEG, os resultados obtidos mostram que os folículos capilares desempenham um papel importante na absorção transdérmica de nanopartículas. Como esperado, nanopartículas de PLGA que contém a liberação da droga relativamente rápida, como as desenvolvidas neste trabalho, apresentam alta retenção na pele e são úteis para promover a permeação através da pele humana. (177) Em outros estudos NP de PLGA (de meados de 100 nm) podem entregar drogas mais rapidamente no extrato córneo e no folículo capilar, portanto, novas investigações devem ocorrer para esta etapa, com estudos *ex vivos*. (178) Para nanopartículas na faixa de 643 nm, são relatados, ainda, que há a permeação mais profundamente para no folículo capilar até a região da protuberância, levando a entregas mais elevadas de nanopartículas na derme. (179)

Logo, estes resultados mostram que pode ser possível empregar uma quantidade menor do pró-fármaco, pois, há a maior biodisponibilidade do fármaco nanoencapsulado do que em relação ao fármaco livre. No entanto, estes resultados merecem ser melhores investigados *in vitro* e em *ex vivo*, para análise de reprodutibilidade, para se obter relações de permeabilidade mais confiáveis, dado que o perfil de liberação das nanopartículas é muito relevante para a literatura.

5.3 Conclusões parciais

Neste capítulo foi possível determinar que as nanopartículas são sensíveis ao pH, respondendo ainda no ambiente ácido a mudança na estrutura das nanopartículas (tamanho) e pH, podendo favorecer que o 5-ALA fique mais exposto na superfície das partículas, levando à mudanças de carga e tamanho, isto é uma característica que pode ajudar na liberação das nanopartículas em ambientes ácidos, tais como os microambientes tumorais (embora este não deva ser o único fator para a liberação do ativo nestes ambientes).

Também foi verificado que o 5-ALA muda o perfil de degradação do sistema, mostrando que há interações do ativo com o polímero, além de mostrar que a interação entre o PVA e o PEG e a matriz de PLGA não é apenas uma mistura física. Além, disso foi mostrado que o PVA pode ficar mais externo as nanopartículas, enquanto o PEG e o 5-ALA interagem mais próximo ao núcleo do PLGA (como foi mostrado nas análises de FTIR e RMN). Também

em consequência ao PVA é atribuído a morfologia das nanopartículas como superfícies lisas, esféricas e bem definidas.

Finalmente, para a concentração teórica de $(4,473 \pm 0,003) \mu\text{L.mL}^{-1}$, a eficiência de encapsulação foi calculada como 45%, para soluções centrifugadas e de 57% para soluções de nanopartículas sem qualquer centrifugação. Estes resultados mostram que há uma boa resposta de eficiência nos sistemas, visto que é um sistema obtido por simples emulsão para ativos hidrofílicos.

O padrão de liberação apresentou duas fases, com a primeira fase, em 60 minutos, mostrando que cerca de 50% da concentração de 5-ALA foi liberada, e na segunda fase é observada uma liberação lenta e sustentada. Por fim, o perfil de permeação é semelhante para a molécula livre e as nanopartículas. No entanto, quando comparado ao 5-ALA com a nanopartícula em solução de PEG observamos que há um aumento de 13,56% no aumento do fluxo das nanopartículas, no entanto estes resultados de permeação devem ser melhores investigados dados os erros sistemáticos e aleatórios envolvidos no desenho experimental para as análises.

Como principal conclusão temos um sistema potencial para o uso tópico em terapia fotodinâmica que pode vir a melhorar os resultados de eficiência quando comparados aos sistemas já em uso.

6 ETAPA 4 - TESTES IN VITRO EM CÉLULAS HDFN (FIBROBLASTOS) E A431 (CÂNCER DE PELE NÃO-MELANOMA)

6.1 Materiais e Métodos

6.1.1 Materiais

Os reagentes para a obtenção das nanopartículas poliméricas foram adquiridos como grau analítico, e a água ultra pura Milli-Q, com resistividade de 18,1 Ω , foi utilizada para o preparo de todas as soluções. Foram utilizados os seguintes reagentes: acetona, (LabSynth, Diadema-SP, Brasil). Álcool polivinílico (PVA, grau de hidrólise de 80,5 - 89,5%) (Vetec Química -Sigma-Aldrich, Duque de Caixias-RJ, Brasil) e cloridrato de ácido aminolevulínico 95% (5-ALA) (TFD Pharma, Cravinhos-SP, Brasil). Cloridrato de ácido aminolevulínico 99% (5-ALA), poli (D, L-ácido láctico-co-glicólico) (50:50) (código:P2191) (Mw=30000-60000 g/mol), poli (D, L-ácido láctico-co-glicólico)-block-poli (etileno glicol)- poli (D, L-ácido láctico-co-glicólico) (PLGA-PEG-PLGA (50:50), código: 764787), Protoporphyrin IX (\geq 95%, P8293), Kollisolv® PEG400 (polietileno glicol 400, Mw 380-420 g/mol) (Fluka Analytical -Sigma-Aldrich, St. Gallen, Suíça). Acetilacetona 99,5% (Riedel-de Haën, Alemanha).

Nos estudos in vitro, foram utilizados os seguintes reagentes e linhagens celulares, adquiridos pelo Grupo de Biofotônica (IFSC-USP), todos de padrão analíticos (P.A.). Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Dimetilsulfóxido (DMSO); NaCl, KCl, Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ (sais utilizados para o preparo do tampão fosfato-salino (phosphate saline buffer, PBS) (LabSynth, Brasil) e meios de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com e sem fenol vermelho, com alta e sem glicose, soro fetal bovino (SFB) (VitroCell, Brasil).

As linhagens celulares utilizadas foram: Carcinoma epidermóide humano (A-431, ATCC®CRL-1555™) (Manasses, VA, EUA) e fibroblasto dérmico neonatal humano (HDFn, C0045C, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA). Esta etapa foi realizada no Laboratório de Cultura Celular no Grupo de Óptica “Milton Ferreira de Souza” (IFSC/USP).

Culturas celulares

A linhagem de carcinoma epidermóide A431 humano são células derivadas do gênero feminino de 85 anos, do tecido da pele (epiderme), de morfologia epitelial, figura 49 e de

crescimento aderente (180). São células de uma série de linhas celulares estabelecidas a partir de tumores sólidos por D.J. Giard *et al.* (181).

ATCC Number: **CRL-1555**
Designation: **A-431**

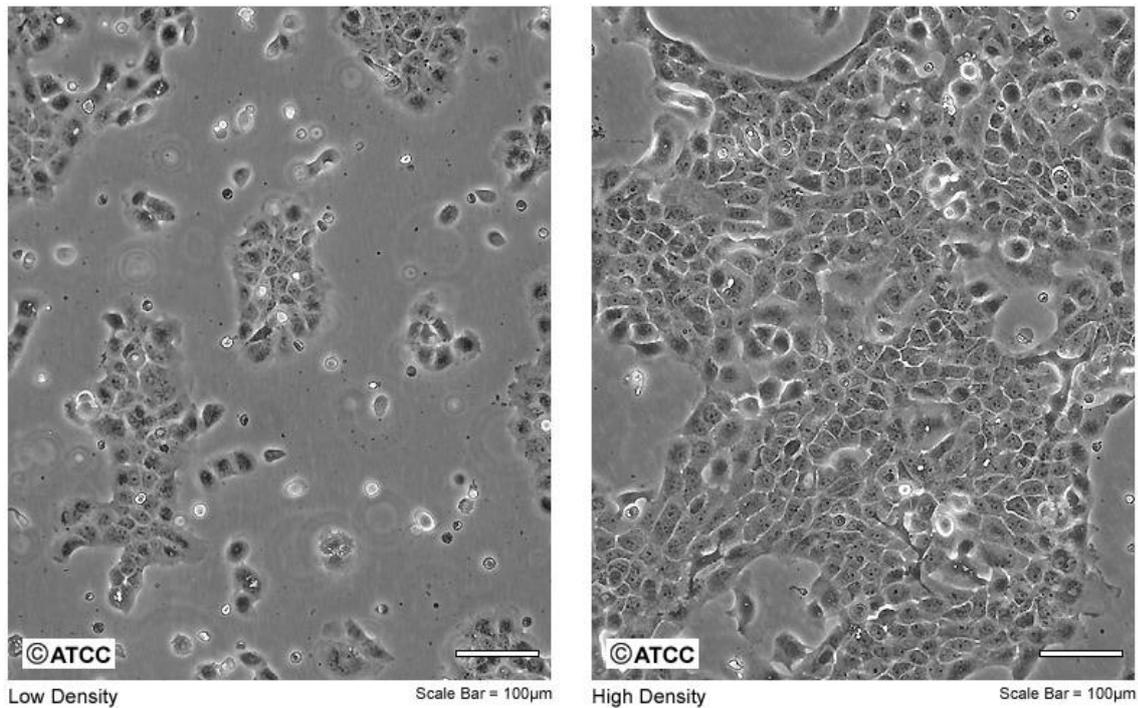


Figura 49 - Morfologia epitelial da linhagem A-431 com baixa e alta densidade (confluência) de células.

Fonte: ATCC (181).

Os fibroblastos dérmicos neonatais humanos HDFn são isolados do prepúcio neonatal, com idade de 14 dias ou menos, de doador único e crescimento aderente (182), figura 50.

Thermo Fischer Scientific Code: **C-004-5C**

Designation: **HDFn**

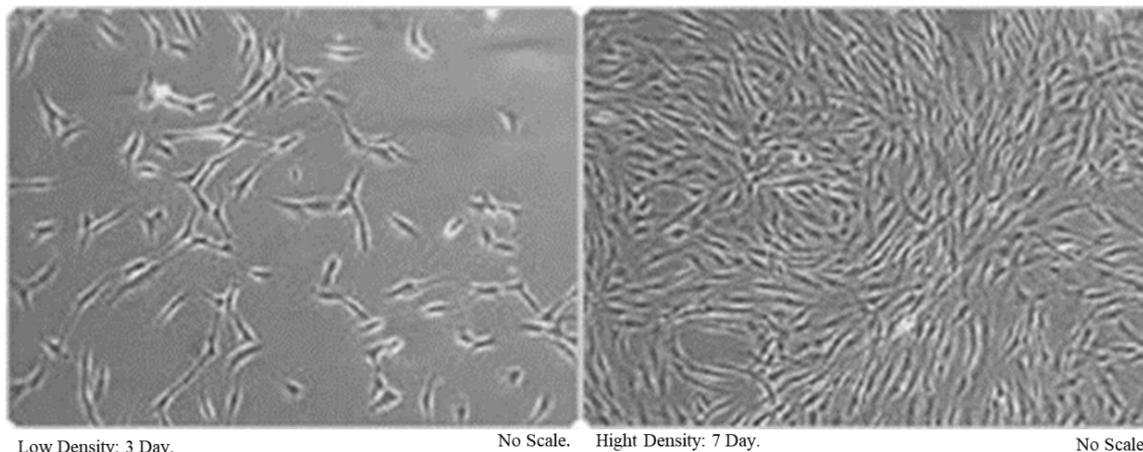


Figura 50 - Morfologia da linhagem HDFn com baixa e alta densidade (confluência) de células.

Fonte: Adaptado de Thermo Fischer Scientific (182).

6.1.2 Métodos

Descongelamento das linhagens celulares

As linhagens celulares são mantidas em tubos criogênicos na concentração de 1×10^6 células, armazenadas em tambor com nitrogênio líquido. Os meios de cultura apropriados para cada linhagem celular - DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com alta glicose, respectivamente para as linhagens HDFn e A431, ambos com vermelho de fenol e suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) - são aquecidos em banho com aquecimento, à 37°C. O processo de descongelamento é um processo rápido, onde os tubos criogênicos são colocados em banho com aquecimento, também à 37°C. Posteriormente, 9 mL de meio são colocados em tubo de 15 mL tipo Falcon (Croning®), e acrescido 1 mL da cultura de células, centrifugado a 800 rpm, por 3 minutos. O sobrenadante é descartado e então ressuspensionado em 5 mL do meio completo. A suspensão de células é colocada em uma garrafa estéril P (área 25cm²; Croning®), para serem aderidas. A garrafa com a cultura celular é levada a uma incubadora umidificada (MCO-17AC, Sanyo Electric Co. Ltd., Osaka, Japão) com 5% de CO₂, a 37°C, até que as células confluem (aproximadamente em 48 horas ou mais, dependente da linhagem), para ser realizado a primeira passagem celular (repique), sendo as culturas transferidas para garrafas M (área de 45cm²; Croning®) com 10 mL de meio de cultura. (183-184)

Passagens (repique) das linhagens celulares

O repique é realizado através da retirada do meio de cultura antigo, lavagem rápida da área total da garrafa, com 5mL tampão PBS e acréscimo de 4 mL de Tripsina (Sigma Aldrich®), valores de volumes referentes a garrafa média (área=74 cm²). Neste processo, após o acréscimo da Tripsina, as culturas celulares são levadas para a incubadora, para que as células aderidas se descolem, por aproximadamente 6 minutos e 8 minutos, para a HDFn e A431, respectivamente. À cada 48 horas é realizada a troca de meio e quando as células atingem 80% de confluência é realizado novamente o processo de repique. Estas etapas são realizadas de capela de fluxo laminar. (183,184)

Ensaio de viabilidade celular pelo método do corante azul de Tripán

O método do corante azul de Tripán, foi utilizado para se determinar a viabilidade celular. Para tanto, após a centrifugação e ressuspenso em 1mL de meio, 10 µL da suspensão celular é adicionado em 90 µL de azul de Tripán (1:10) e homogeneizado. Assim, 10 µL desta solução é colocada em uma câmara de Neubauer. Neste método, o corante determina a integridade da membrana celular, onde, células vivas são impermeáveis e células mortas são permeáveis ao corante, levando-se assim a presença da coloração azul. A presença da coloração azul, ocorre porque a carga residual negativa do corante, interagem por afinidade iônica, no citoplasma intracelular de membranas com algum tipo de alteração (21). Culturas com viabilidade maior que 95% foram utilizadas para os estudos. Após a contagem das células vivas, a viabilidade celular é dada pela seguinte equação (12):

$$\frac{N^{\circ} \text{ células viáveis}}{\text{volume (mL)}} = \frac{n^{\circ} \text{ células contadas}}{n^{\circ} \text{ quadrante contados}} \times \text{Fator da câmara (10}^4\text{)} \times \text{Diluição (célula: Tripán)} \quad (12)$$

Ensaio de viabilidade Celular pelo método do MTT

O ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) é um dos testes mais apropriados para análise de citotoxicidade de nanopartículas e diversos materiais. O MTT é carregado por cargas positivas e assim penetra com facilidade nas células viáveis, e portanto, pode ser considerado como uma medida do metabolismo mitocondrial. Assim, as células com o metabolismo ativo convertem o sal tetrazolium (de cor amarela) em cristais de formazan (de cor azul) e insolúveis. Estes cristais, são posteriormente solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) ou isopropanol ácido (preparado a partir de 0,04 mol/L de HCL). Neste método, a quantidade de formazan (que se

associa proporcionalmente ao número de células viáveis) é medida através da leitura de absorbância em 570 nm e 690nm, utilizando um espectrofotômetro de leitura de placas. Por outro lado, quando as células não estão viáveis e, portanto, apresentam algum dano mitocondrial, não transformam o MTT em cristais de formazan (185).

A solução de MTT foi preparada na concentração de 0,5mg/ml, em tampão fosfato salino, pH 7,4 e armazenada em congelador. Antes dos ensaios, a solução é colocada em banho térmico, a 37°C, por 1 a 3 minutos. O preparo para a incubação do MTT para a incubação do MTT é realizado com o preparo de uma solução de 10% de MTT em meio de cultura DMEM, sem fenol vermelho e sem SFB, e sem ou com glicose, respectivamente para as linhagens celulares HDFn e A431. Para cada poço da placa de 96 poços, o volume utilizado de MTT é de 100µL. Assim, é retirado o meio celular de incubação e plaqueado, por grupo, a solução de MTT. Após esta etapa, a placa é levada para a incubadora de CO₂, por 3 horas (tempo padronizado para todos os experimentos). Decorrido o tempo de incubação, acontece a etapa de lise celular. O MTT é retirado dos poços, e neles acrescido 100µL de DMSO para a solubilização das cristas de formazan, homogeneizados com a multicanal (Eppendorf®), e realizado a leitura de fluorescência 10 minutos depois. A leitura das absorbâncias foi realizada em um leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA) nos comprimentos de onda de 570 e 690 nm. (183,184) O cálculo de viabilidade celular é realizado subtraindo-se o valor de absorbância de 570 nm do valor da absorbância de 690 nm, sempre considerando o valor de 100% de viabilidade a absorbância dos grupos controles (específicos para cada estudo). O método do MTT foi utilizado como avaliação para os estudos propostos.

Estudo de citotoxicidade dos materiais poliméricos (PLGA, PVA, PEG400 e PLGA-PEG)

Esta etapa do estudo teve por objetivo avaliar se as concentrações presentes nos sistemas de nanopartículas se há citotoxicidade dos biopolímeros e tensoativo. O resumo do experimento está indicado na figura 51.

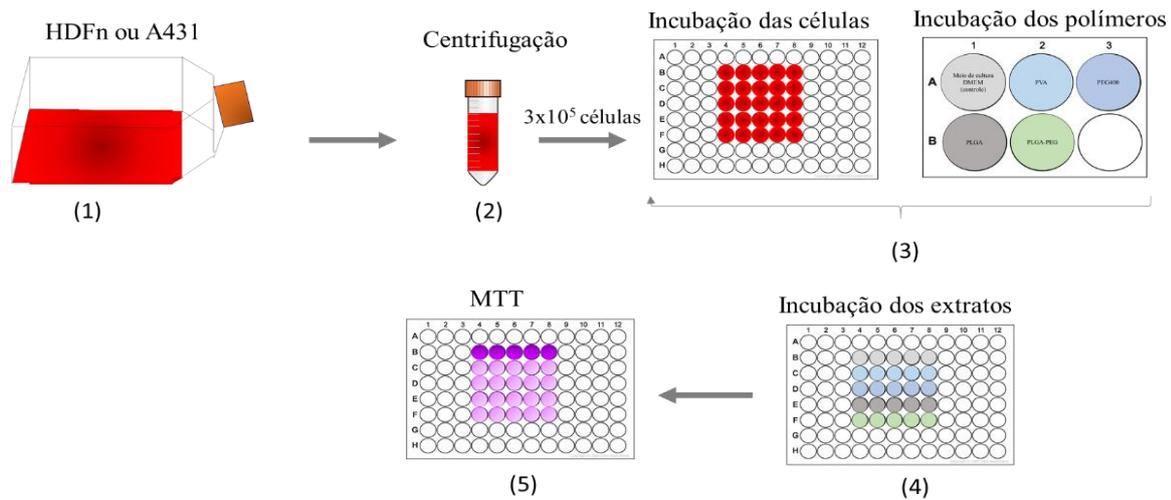


Figura 51 - Resumo gráfico para o estudo de citotoxicidade dos materiais poliméricos: (1) Células aderidas em garrafa de cultura, (2) centrifugação, (3) etapa de incubação das células e polímeros, por 24 horas, (4) incubação dos extratos poliméricos nas placas com cultura de células e (5) teste para citotoxicidade polimérica.

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com a figura 51, as células aderidas nas garrafas, foram lavadas com 5 mL de tampão PBS e logo após tripsinizadas com 4 mL e levadas para a incubadora de CO₂. Depois da determinação da viabilidade celular, para cada poço, da microplaca de 96 poços, foram plaqueados 100 µL de células ressuspensas em DMEM com fenol e 10% SFB, com o valor 5×10^3 células por poço. Para ocorrer a aderência das células nas placas, estas foram levadas por 24 horas para a incubadora de CO₂. Em uma placa de 6 poços, foram preparados o volume final de 2 mL de DMEM, sem fenol vermelho, com 5% de SFB, e sem ou com alta glicose, respectivamente para as linhagens de HDFn e A431, nas concentrações indicadas na tabela 18. Destaca-se que estas concentrações foram calculadas, de acordo com a concentração presente na síntese das nanopartículas.

Tabela 18 - Concentrações dos polímeros para os testes de citotoxicidade.

Polímero	Concentração (g/mL)
Controle	-
PLGA (50:50)	0,0015
PVA	0,005
PEG400	5 µL/mL
PLGA-PEG	0,0015

Fonte: Elaborada pela autora.

Em placa de 6 poços, estéril foi preparada com um poço por polímero, levada para a incubadora de CO₂ por 24h. Ao final deste período, em microscópio de luz, foi procurado a formação ou não de corpos estranhos que poderiam ser associados com algum tipo de contaminação (por exemplo, fungos). Decorrida as 24 horas, a placa de 96 poços, foi retirada o

DMEM com fenol e 10% SFB, e lavado com 100 μ L de PBS por poço, por duas vezes. Então, foram incubados 100 μ L por poço, do extrato formado pelos polímeros, formado na placa de 6 poços e levado para incubação por mais 24 horas na incubadora de CO₂. No terceiro dia, foram realizados o ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT, assim como descrito em “*O Ensaio de viabilidade Celular pelo método do MTT*”. Foram plaqueados 5 poços por concentração, com três repetições de ocasião, para cada uma das linhagens celulares.

Comparação fotocitotoxicidade do 5-ALA livre e das nanopartículas com e sem ativo

O principal objetivo deste estudo é determinar a melhor dose de luz para se realizar a TFD, avaliando a fotocitotoxicidade das nanopartículas com ALA, sempre em comparação com o ALA livre e as nanopartículas sem ALA. Esta etapa o trabalho, está dividido em três partes e o resumo gráfico é indicado na Figura 52.

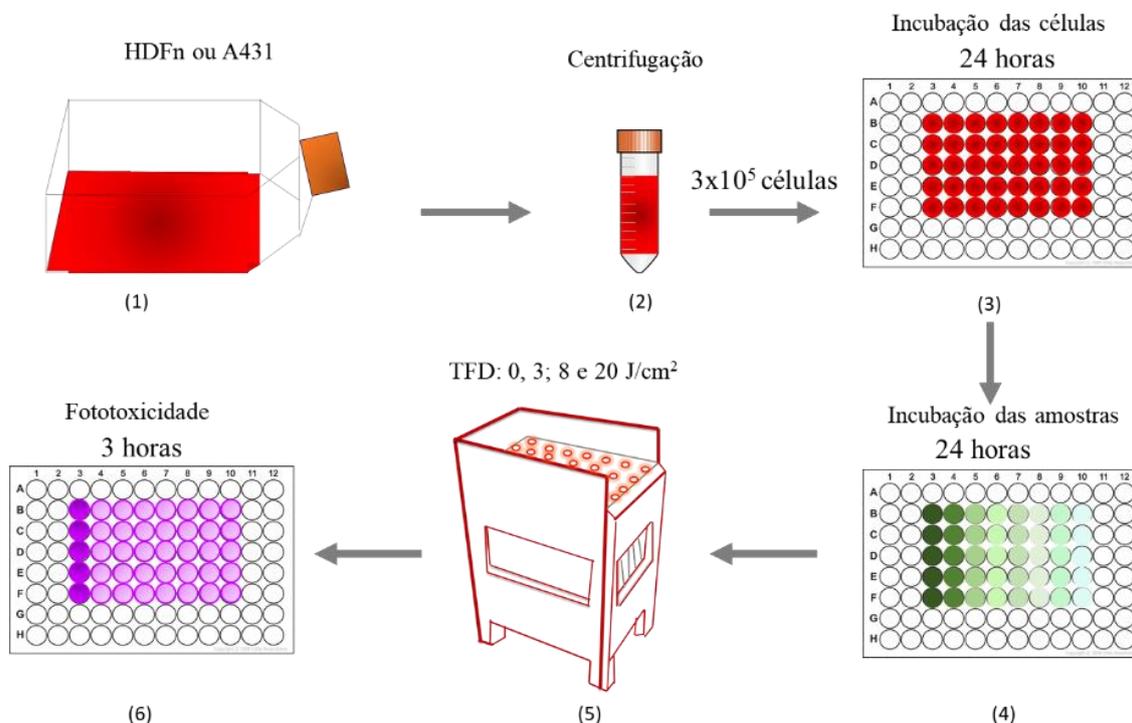


Figura 52 - Resumo gráfico genérico para o estudo de investigação para terapia fotodinâmica: (1) Células aderidas em garrafa de cultura, (2) centrifugação, (3) etapa de incubação das células, por 24 horas, (4) incubação do 5-ALA livre ou nanopartículas poliméricas (com ou sem ativo) placas com cultura de células por 24 horas e (5) testes para terapia fotodinâmica (doses de luz: 0, 3, 8 e 20 J/cm^2) e incubação por 24 horas, posteriormente (6) leitura de viabilidade celular por MTT.

Fonte: Elaborada pela autora.

Fotocitotoxicidade e determinação do LD50 para o 5-ALA livre

Para se determinar o LD50 do 5-ALA em cultura de células e se comparar com o sistema de nanopartícula com 5-ALA, uma solução estoque de 5mM de 5-ALA em tampão PBS

foi preparada para o volume final de 5 mL, sendo filtrada em membrana de 0,22 μm . Esta concentração foi escolhida para que o pH se mantivesse abaixo do pH 5 (186), para que ativo não dimerizasse no meio tampão, evitando, assim a perda de reatividade molecular da molécula (21). Imediatamente após, uma diluição seriada foi realizada, para volumes finais de 2mL, onde a solução de 5-ALA foi diluída em DMEM sem fenol, com 5% de SFB e sem ou com alta glicose, respectivamente, para as linhagens celulares de HDFn e A431, nas seguintes concentrações: 1 de 0,00; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 mM (concentração zero é o controle). Foram plaqueados 3 poços por concentração, com três repetições de ocasião, para cada uma das linhagens celulares.

Fototoxicidade para os sistemas de nanopartículas A, B, C, D e E

Na segunda etapa foram centrifugadas 10 mL das soluções de células, a 3800 rpm, por 30 minutos, à 4°C. O *pellet* foi recuperado e ressuspendido em igual volume com água deionizada. Para o plaqueamento as sínteses (A, B, C, D e E) com ou sem ativo, foi diluída, para 2 mL finais de solução, na proporção de (1:1) (volume: volume) em DMEM sem fenol, com 5% de SFB e sem ou com alta glicose, respectivamente, para as linhagens celulares de HDFn e A431. Não foi realizada nenhum tipo de diluição, visto que o principal objetivo era analisar se os sistemas com ativo apresentação reatividade, em relação aos sistemas sem ativo e ao 5-ALA livre, além disso era poder entender a viabilidade de cada sistema para se comparar com a toxicidade das materiais primas.

Fototoxicidade para os sistemas de nanopartículas C-PEG-PVA e C-PEG-PVA-ALA

Na terceira etapa, foi avaliado a variação do pH das nanopartículas C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA-ALA, além do 5-ALA em solução de PBS, nos meios de estudos (DMEM e DEMEM com alta glicose), mantendo a proporção de 3 mL da amostra para 5mL de meio. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente, com um pHmetro de bancada (Gehaka), afim de se averiguar mudanças de pH do meio antes das incubações. Então, foi preparada a síntese C, para se avaliar a citotoxicidade quando expostas a diferentes intensidades de luz. Foi realizado o processo de centrifugação e lavagem, como descrita anteriormente. Para o plaqueamento as sínteses com ou sem ativo, foram diluídas, para 2mL finais de solução, na proporção de (1:1) (volume: volume) em DMEM sem fenol, com 5% de SFB e sem ou com alta glicose, respectivamente, para as linhagens celulares de HDFn e A431. E também foram realizadas as diluições 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; e 3,0 mM, com as massas já ajustadas pela eficiência de encapsulação (zero é o controle). O principal objetivo era analisar se os sistemas

com ativo apresentavam reatividade, em relação aos sistemas sem ativo e ao 5-ALA livre. Foram plaqueados 3 poços por concentração, com três repetições de ocasião, para cada uma das linhagens celulares.

Fonte de iluminação

Para a irradiação das amostras no estudo de TFD, foi utilizado um equipamento desenvolvido no Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT), do Grupo de Óptica (IFSC/USP), que recebeu o nome de Biotable. A Biotable é uma mesa, que é formada pelo arranjo de 24 LEDs, com comprimento de onda de 630 nm em sua base. Esta disposição permite que placas de 24 ou 96 poços sejam irradiadas, de forma homogênea e com intensidade máxima de 30 mW/cm², e o comprimento de onda escolhido tem a sua emissão se sobrepondo ao último pico de absorção da PpIX. (187)

Terapia fotodinâmica (TFD)

As células aderidas nas garrafas, foram lavadas com 5 mL de tampão PBS e logo após tripsinizadas com 4 mL e levadas para a incubadora de CO₂, o processo é o mesmo descrito em Estudo de citotoxicidade dos materiais poliméricos (PLGA, PVA, PEG400 e PLGA-PEG). Cada energia foi estudada em uma placa distinta. Depois da determinação da viabilidade celular, para cada poço, das quatro microplacas de 96 poços, estéril, foram plaqueados 100 µL de células ressuspensas em DMEM com fenol e 10% SFB, e sem ou com alta glicose, respectivamente, para as linhagens celulares de HDFn e A43, com o valor 5x10⁶ células por poço. Para ocorrer a aderência das células nas placas, estas foram levadas por 24 horas para a incubadora de CO₂. Decorrida o tempo necessário, em cada placa de 96 poços, foi realizado o processo de retirada do DMEM e lavadas com 100 µL de PBS por poço, por duas vezes. Então, foram incubados 100µL por poço, de cada uma das soluções indicadas para os estudos, onde os controles eram as soluções de 0 mM, que foram preparadas com a proporção de (1:1) de tampão PBS diluído em DMEM ou apenas DMEM, respectivamente para as amostras de 5-ALA e de nanopartículas. Após o plaqueamento, as placas foram para incubação por mais 24 horas na incubadora de CO₂. No terceiro dia, foi realizado o estudo TFD. Foram retiradas as soluções incubadas, e lavadas com 100 µL de PBS por poço, por duas vezes e adicionadas nos poços 100µL de DMEM sem fenol, com 5% de SFB, sem ou com alta glicose, respectivamente, para as linhagens celulares de HDFn e A431. Posteriormente, as placas foram preparadas para irradiação, nas seguintes doses de luz 0; 3; 8 e 20 J/cm², utilizando como fonte a Biotable. Os

tempos de exposição foram calculados, a partir da equação (12). As placas foram protegidas com papel alumínio ao final das iluminações.

$$\text{dose de luz } \left(\frac{J}{\text{cm}^2} \right) = \text{intensidade } \left(\frac{W}{\text{cm}^2} \right) \cdot \text{tempo de exposição (s)} \quad (13)$$

No quarto dia, foram realizados o ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT, assim como descrito em Ensaio de viabilidade Celular pelo método do MTT. Foram plaqueados 5 poços por concentração, com três repetições de ocasião, para cada uma das linhagens celulares. Os controles foram normalizados pela menor energia 0 J.cm^{-2} , e os dados foram analisados pelo teste ANOVA, considerando p valor $<0,05$.

Quantificação da produção de protoporfirina IX por espectroscopia de fluorescência

Nesta etapa, foram realizados estudos por espectroscopia de fluorescência para a determinação da produção de protoporfirina endógena (PpIX). O resumo do experimento está indicado na figura 53.

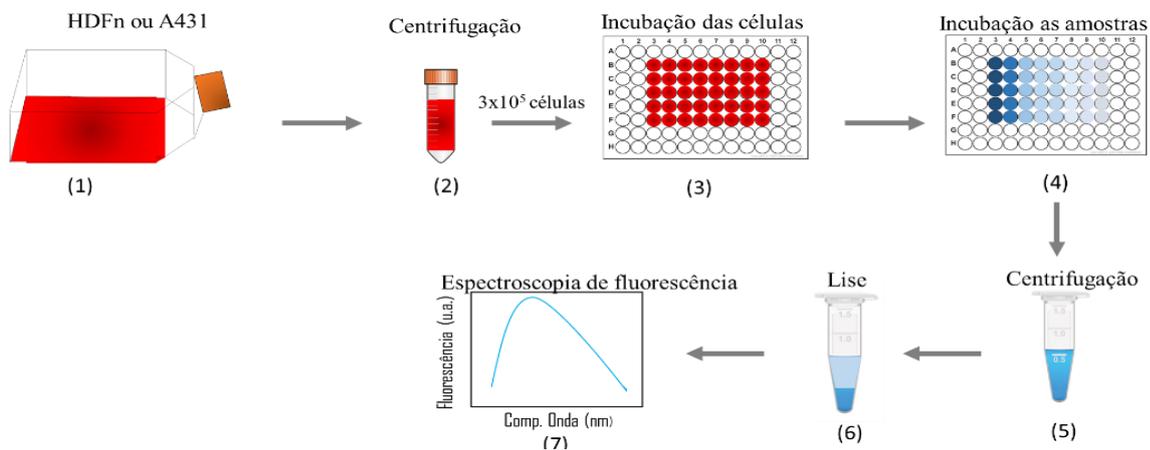


Figura 53 - Resumo gráfico para o estudo de produção de PpIX endógena: (1) Células aderidas em garrafa de cultura, (2) centrifugação, (3) etapa de incubação das células, por 24 horas, (4) incubação da PpIX, 5-ALA livre ou nanopartículas poliméricas (com ativo) em placas com cultura de células por 24 horas e (5) centrifugação das amostras (6) lise celular com a adição de detergente iônico (laurel sulfato de sódio) e recuperação do sobrenadante para (6) leitura de fluorescência.

Fonte: Elaborada pela autora.

Primeiramente, as células de HDFn ou A431, foram plaqueadas em placas de 96 poços, na concentração de 5×10^3 células (volume de $100 \mu\text{L}$ por poço) de acordo com as condições descritas em Estudo de citotoxicidade dos materiais poliméricos (PLGA, PVA, PEG400 e PLGA-PEG) e incubadas por 24 horas. Depois da etapa de aderência celular, os poços foram lavados com $100 \mu\text{L}$ de PBS e acrescido as soluções de PpIX, ALA livre ou nanopartículas previamente preparadas, como descritas;

(1) A curva de calibração para a PpIX foi preparada com uma solução estoque de $50 \mu\text{g/mL}$, para uma solução final de 5 mL em DMSO e foi seguido o protocolo de Rossetti *et al.*

(2010) (188), e assim, realizado a curva de concentração 0 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, sendo escolhida a região linear da curva para os cálculos de internalização e produção de PpIX.

(2) A curva de concentração com o ALA livre, foram as concentrações de 0,00; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 mM, sendo as amostras preparadas como já detalhado em “*0 Comparação fotocitotoxicidade do 5-ALA livre e das nanopartículas com e sem ativo*”.

(3) Do mesmo modo que o 5-ALA livre, as amostras de nanopartículas passaram pelo mesmo processo anterior, para as concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mM. A incubação da PpIX, ALA-livre e das nanopartículas foram realizadas por 24 horas na incubadora de CO_2 ao abrigo da luz.

Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS e removidas com tripsina, e centrifugadas por 3 minutos, a 800 rpm e ressuspensas em uma solução de 20% de metanol em água para ocorrer o processo de *lise* celular com rompimento da membrana plasmática, agitadas em vórtex e novamente centrifugadas por 3 minutos, onde, o sobrenadante foi retirado, dispostos 100 μL das soluções em placas de 96 poços brancas, com posterior e a produção e quantificação de PpIX por espectroscopia de fluorescência desta solução. (21) Para a leitura de fluorescência, o comprimento de onda de excitação foi o de 400 nm e o de emissão em 630nm. Assim, com a curva de concentração do ALA livre e da PpIX, é possível correlacionar as intensidades de emissão de fluorescência com as obtidas com as concentrações de nanopartículas.

Foram plaqueados 3 poços por concentração de cada um dos materiais incubados, com duas repetições de ocasião, para cada uma das linhagens celulares. A curva de calibração foi realizada em um espectrômetro de fluorescência (Agilent, Cary Eclipse). A leitura de fluorescência foi realizada no Grupo de Óptica “Milton Ferreira de Souza” (IFSC/USP).

Métodos estatísticos

Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo Teste Tukey, para análise de multivariada ANOVA.

6.2 Resultados e Discussão

6.2.1 Estudo de citotoxicidade dos materiais poliméricos (PLGA, PVA, PEG400 e PLGA-PEG)

Apesar dos poliésteres como o PLGA serem amplamente estudados como carreadores para diversos tipos de substâncias ativas principalmente por serem materiais biodegradáveis, é importante se determinar a toxicidade destes materiais para garantir a segurança dos sistemas de nanopartículas. Ao mesmo tempo, neste trabalho a toxicidade da matriz polimérica foi comparada com o PEG400 e com PVA, nas concentrações utilizadas nas sínteses das nanopartículas aqui estudadas. (189,190) Desata-se que neste estudo a avaliação PLGA-PEG se diz sobre o polímero poli (D, L-ácido lático-co-glicólico)-block-poli (etileno glicol) poli (D, L-ácido lático-co-glicólico) (PLGA-PEG-PLGA) (50:50), pois, nas sínteses o PLGA é solubilizado na acetona com posterior adição do PEG400 - onde o próprio solvente pode aumentar o potencial de toxicidade *in vitro*.

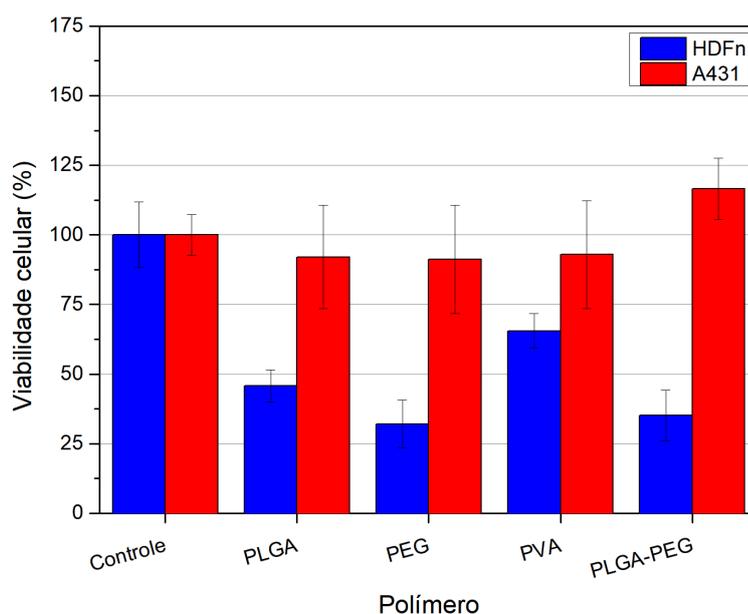


Figura 54 - Viabilidade das linhagens de células de câncer de não-melanoma (A431) e fibroblastos (HDFn) incubadas por 24h com os polímeros PLGA(50:50), PEG400, PVA e PLGA-PEG. A porcentagem de células vivas estão normalizadas em função das células sem incubação (0 J.cm⁻²). Os valores representam a média e desvio padrão (n=15, para três repetições de ocasião).

Fonte: Elaborada pela autora.

A citotoxicidade dos polímeros envolvidos nas sínteses foram avaliados por MTT (figura 54). Observou-se que na linhagem A431 houve aumento de proliferação celular após 24 horas de incubação com o PLGA-PEG. Para a mesma linhagem celular, a viabilidade celular para os polímeros PLGA, PEG e PVA apresentaram-se próximos a 92%, portanto, não apresentando baixa mortalidade para as células de não-melanoma. No entanto, para a linhagem de fibroblastos a maior toxicidade foi do polímero PEG e do tribloco PLGA-PEG, podendo

indicar que maior toxicidade é do polietilenoglicol. O PVA apresentou boa biocompatibilidade com as células saudáveis, visto que, a viabilidade celular foi de aproximadamente 65% enquanto a do PLGA foi de 46%.

O primeiro ponto a se destacar nestes estudos é que as células saudáveis (HDFn) diferem das células tumorais (A431) em relação a sua origem, metabolismo e morfologia, por consequência estas características implicam em respostas diferentes de citotoxicidade para iguais tipos de tratamentos ou incubações celulares. Nos resultados deste trabalho observa-se a proliferação celular para a incubação de PLGA-PEG nas culturas de células não-melanoma, além das diferenças de citotoxicidade entre as duas linhagens celulares. A proliferação celular pode ser resultado do próprio fato da célula tumoral não ser sensível à inibição dependente da densidade, portanto, não cessando sua proliferação e crescendo em altas densidades, por não exigirem requisitos de fatores de crescimento extracelular como acontece com células saudáveis como os fibroblastos que crescem até um ponto finito no estágio do ciclo celular no qual as células permanecem metabolicamente ativas, mas não proliferam (G_0). (191)

A tendência de citotoxicidade observada para o PEG e para o PLGA-PEG nas células saudáveis de fibroblastos foi observada no estudo de Liu *et al.* (2017) (190) em seus estudos conduzidos com células HeLa (células de câncer cervical humano) e células L929 (fibroblastos derivados de camundongos), no estudo mencionado soluções de PEG com baixa massa molecular se mostrou baixa toxicidade para as células tumorais, mostrando que as células tumorais tem melhor tolerância do que as células saudáveis, devido ao seu metabolismo. O mesmo acontece para os polímeros PLGA e PVA, apresentados neste estudo.

6.2.2 Comparação fotocitotoxicidade do 5-ALA livre e das nanopartículas com e sem ativo

Fotocitotoxicidade e determinação do LD50 para o 5-ALA livre

Nesta etapa as linhagens celulares de pele HDFn e A431 foram escolhidas para os estudos de citotoxicidade em comparação aos sistemas de nanopartículas desenvolvidas. Para cada linhagem foram realizados quatro séries de experimentos com a variação de 0, 3, 8 ou 20 $J.cm^{-2}$ com as concentrações variando de 0 a 1 mM. As curvas de concentrações analisadas foram mantidas iguais, com igual tempo de incubação de 24 horas em todos os estudos. Os estudos foram realizados em triplicata (n=9), em três repetições de ocasião.

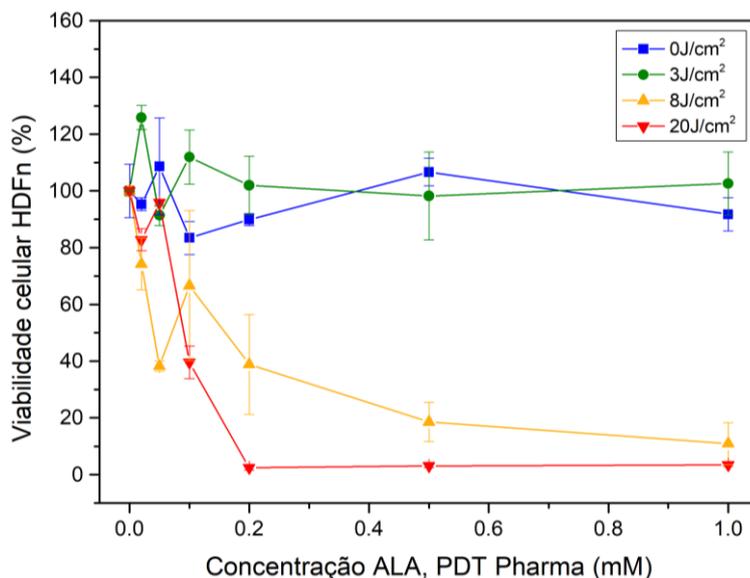


Figura 55 - Viabilidade das linhagem de pele normal fibroblastos (HDFn) incubadas por 24h com o 5-ALA livre. A porcentagem de células vivas estão normalizadas em função das células sem incubação (0 J.cm^{-2}). Os valores representam a média e desvio padrão ($n=9$, para três repetições de ocasião).

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 55 mostra as incubações realizadas para a linhagem HDFn. É possível observar dois grupos divididos entre as maiores e as menores energias. Além disso, observa-se que para cada curva é possível determinar uma dose letal mediana (LD50), onde 50% da população da célula teste é morta. Para as energias de 0 e 20 J.cm^{-2} , observa-se que as doses mínimas foram de aproximadamente de 0,1 mM e para as doses de 3 e 8 J.cm^{-2} são, respectivamente, 0,05 e 0,2 mM aproximadamente. As diferenças de dose mediana são esperadas, visto a diferença entre as doses de luz analisadas. Deste modo, a menor concentração com efeito citotoxicidade é de 0,05 mM ($0,033 \text{ mg. mL}^{-1}$), para a energia de 8 J.cm^{-2} . A massa teórica encapsulada foi calculada acima do LD50 ($0,4473 \text{ mg. mL}^{-1}$) ficando próxima a massa real encapsulada ($0,0254 \text{ mg. mL}^{-1}$).

A figura 56 mostra as incubações realizadas para a linhagem A431. Assim, como foi determinado para a HDFn, para cada curva é possível determinar LD50, sendo comportadamente semelhante ao observado para as células de linhagens saudáveis. Para as energias de 0 e 3 J.cm^{-2} , observa-se que as doses mínimas foram de aproximadamente 0,02 e 1 mM, respectivamente. Para as doses de 8 e 20 J.cm^{-2} a concentração encontrada foi de aproximadamente 0,2 mM para ambos. Deste modo, a menor concentração com efeito citotoxicidade é de 0,02 mM ($0,0133 \text{ mg. mL}^{-1}$), para a energia de 8 J.cm^{-2} , estando a massa real encapsulada 52,36% acima do LD50 mínimo calculado.

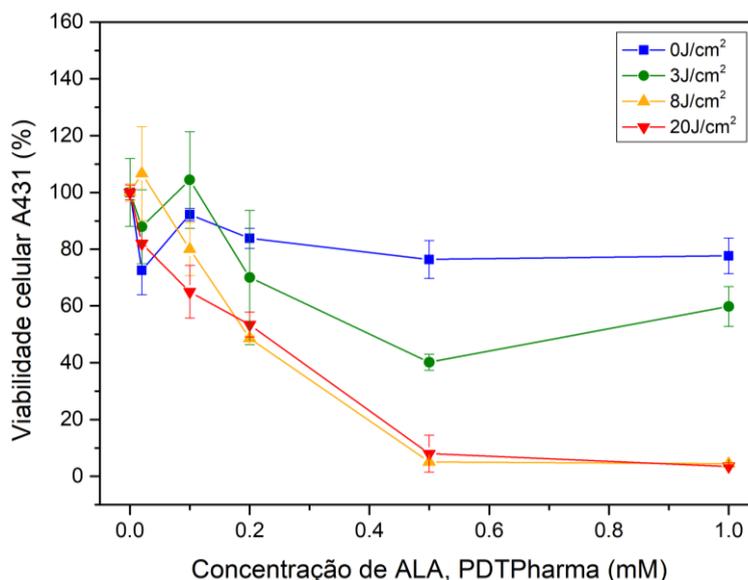


Figura 56 - Viabilidade das linhagem de pele não-melanoma (A431) incubadas por 24h com o 5-ALA livre. A porcentagem de células vivas estão normalizadas em função das células sem incubação (0 J.cm⁻²). Os valores representam a média e desvio padrão (n =9, para três repetições de ocasião).

Fonte: Elaborada pela autora.

Com estes resultados é possível mostrar que a viabilidade celular é dependente da dose de luz aplicada, bem como das concentrações de 5-ALA. Um ponto importante é que concentrações tão baixas quanto a 0,02 mM já é possível observar que a viabilidade celular diminui para mais de 50%. O aumento da concentração leva a maior morte celular quando aplicada altas energias. A diferença entre os perfis de viabilidade celular é esperada, principalmente por causa da diferença entre o mecanismo e metabolismo celular das células. Doses de luz mais altas implicaram em maior morte celular, em ambas as linhagens. A viabilidade celular, por tanto, é um processo dependente do tratamento de TFD aplicado, que está diretamente ligado a concentração de PpIX produzida ao se incubar o 5-ALA, muito embora, segundo a literatura (192) a localização do ALA nas células e o efeito citotóxico relacionado à localização, concentração do ALA e a dose de luz de iluminação devam ser melhores investigados.

Liu *et al.* (2019) (193), depois de 12 horas de incubação, observou esta mesma tendência apresentada neste estudo. As análises foram apresentadas para queloides derivados de fibroblastos, onde foi variado as concentrações de 0 a 2,0 mM, não observando proliferação celular depois de irradiar as células por 0,5 horas. Do mesmo modo, nos estudos de Chi *et al.* (2020) (194) a TFD com 5-ALA em células de A431 diminuiu a viabilidade celular de uma maneira dependente da concentração, com taxas inibitórias sendo muito mais altas do que nas células saudáveis como a HaCat, mas estes resultados são referentes a dose de luz de 1mW.cm-

2, com incubação de 6 horas e para concentrações de 2, 4 e 8 mM. E por fim, ainda segundo Ye *et al.* (2020) (192), a etapa de determinação do LD50 é uma etapa importante visto a concentração do 5-ALA pode influenciar na permeabilidade e letalidade da membrana celular, onde doses de citotóxicas baixas podem inibir o crescimento celular levando principalmente a autofagia enquanto doses citotóxicas altas podem levar a apoptose ou necrose.

Fototoxicidade para os sistemas de nanopartículas A, B, C, D e E

Apesar de na etapa de nas análises do IDMAP ter sido determinado o sistema C-SE-PVA-PEG como o sistema promissor para o 5-ALA, esta etapa de análise é importante para se tentar entender o mecanismo de citotoxicidade para cada sistema separadamente. Deste modo os sistemas de nanopartículas foram incubados sem nenhum tipo de tratamento prévio, isto é, as nanopartículas não foram concentradas. A figura 57 apresenta as avaliações dos resultados para as linhagens HDFn e A431.

Ainda pelas análises estatísticas é possível mostrar que os sistemas com 5-ALA apresentam diferença significativa em relação ao controle e as nanopartículas sem ativo para ambas as linhagens celulares, as avaliações para A431 podem ser melhores estudadas.

Observa-se que citotoxicidade é dependente do tratamento (dose de luz) aplicada, além das doses-respostas serem diferentes para cada linhagem estudada. No geral o sistema A-DE-PVA apresenta menor citotoxicidade, em ambas as linhagens celulares, e na presença ou não do ativo 5-ALA, isto concorda com os experimentos mostrados na figura 54 e figura 56, onde se observa uma boa biocompatibilidade tanto do PVA quanto do PLGA em ambas as linhagens.

Para os sistemas sem ativo figura 57 (A) e para a linhagem HDFn, o sistema C-SE-PVA-PEG apresenta viabilidade alta, mostrando-se, por tanto pouco citotóxico para as células em ambas doses de luz, mantendo a maior viabilidade pra 8 J.cm^{-2} . Em contrapartida, para esta mesma dose de luz o sistema com maior taxa de mortabilidade é o sistema B-SE-PEG com 77,25% de morte celular. Para 8 J.cm^{-2} , no entanto, as viabilidade celulares de ambos os sistemas são bem próximas com aproximadamente 62 e 67%, respectivamente. Para os sistemas com ativo figura 57 (B) e para a linhagem HDFn, o sistema C-SE-PVA-PEG-ALA apresenta a menor viabilidade, aproximadamente 33% quando as células foram mantidas no escuro. No escuro a maior viabilidade celular é dado para o sistema A-DE-PVA. Para 3, 8 e 20 J.cm^{-2} C-SE-PVA-PEG-ALA novamente apresenta a menor viabilidade celular baixa, correspondendo, aproximada e respectivamente, à 22%; 9% e 8% de viabilidade, que pode ser associado a maior concentração de PEG nos sistemas, além de poder ser um indício de maior liberação *in vitro* do 5-ALA, que por consequência pode levar ao maior acúmulo de PpIX. Do

mesmo modo o sistema A pode liberar mais lentamente o 5-ALA mostrando melhores resultados de viabilidade celular.

Quando avaliamos os resultados para a linhagem tumoral A431 figura 57 (C) para os sistemas sem ativo, observamos que o A-DE-PVA novamente apresenta, na maioria das doses, a maior viabilidade celular. O sistema C-SE-PVA-PEG manteve a viabilidade de 52 a 57% de viabilidade, mostrando que a toxicidade não foi dependente da dose de luz aplicada, e mantendo a viabilidade de aproximadamente 78% para os sistemas mantidos no escuro. Novamente os sistemas com PEG respectivamente para B-SE-PEG e E-DE-PEG-PVA mantiveram o comportamento de viabilidade próximos ao sistema C, mostrando que para a linhagem tumoral, o PEG pode influenciar na toxicidade dos sistemas. No entanto em comparação aos análogos analisados para HDFn, o sistema C é o menos citotóxico para as células.

Para os sistemas com ativo figura 57 (D) é possível avaliar que o A-DE-PVA-ALA apresenta boa viabilidade celular no escuro, porém para 3 J.cm^{-2} a melhor viabilidade celular é para o sistema E-DE-PEG-PVA-ALA. Para as 3, 8 e 20 J.cm^{-2} o sistema A apresenta citotoxicidade próxima ao sistema D-SE-PVA-ALA. Para aquela linhagem o sistema C-SE-PVA-PEG-ALA apresenta viabilidade celular decrescente e aproximada de 87%; 11%; 9% e 8% conforme aumenta-se as energias. Com estes conjuntos de resultados podemos sugerir que a dose de luz de 3 J.cm^{-2} , pode ser uma boa dose para ser aplicado na linhagem celular A431, pois, nesta dose há morte celular de mais de 90% das células, com viabilidade de 21,91% para linhagem normal. Além disso, é possível dizer que a viabilidade celular é consequência da liberação do ativo *in vitro*, e por tanto, associada ao 5-ALA presente nas nanoestruturas e que o método de obtenção de síntese (se por simples ou dupla emulsão), além da diferenciação da presença de tensoativos (PVA, PEG400 ou PEG-PVA) que mostram toxicidades diferentes. Mas, estas respostas são dependentes, ainda, do tipo de internalização celular, concentração do ativo das nanopartículas, acúmulo nas mitocôndrias, formato das nanopartículas, tempo de incubação e produção de PpIX dentre outros fatores (59,195). Embora, não se possa comparar em quantidade de concentração do ativo em relação ao ativo livre este é um dado relevante, visto que, a melhor dose de luz para se matar as células tumorais com o 5-ALA livre é de 8 J.cm^{-2} . Estes dados são melhores estudados na sequência.

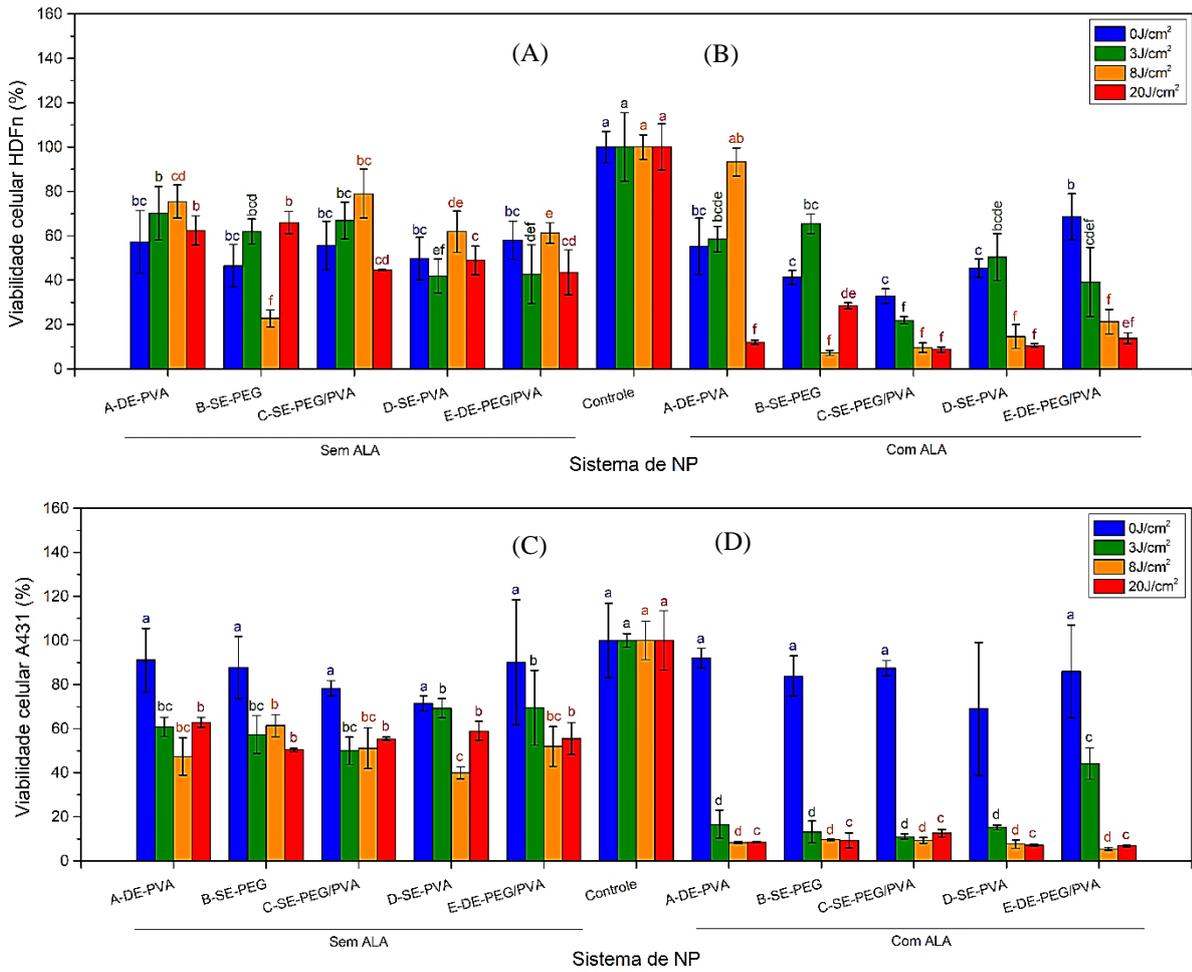


Figura 57 - Terapia fotodinâmica para as linhagens de pele (A) e (B) fibroblatos (HDFn) e (C) e (D) não-melanoma incubadas por 24h com os sistemas de nanopartículas A-DE-PVA, B-SE-PEG, C-SE-PEG-PVA, E-DE-PEG-PVA (A) e (C) sem ativo e (B) e (D) com ativo. A porcentagem de células vivas estão normalizadas em função das células sem incubação (0 J.cm⁻²). Os valores representam a média ± desvio padrão (n =9, para três repetições de ocasião). *Grupos que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes (alfa=0,05), ajustado por Tukey.

Fonte: Elaborada pela autora.

Fototoxicidade para os sistemas de nanopartículas C-PEG-PVA e C-PEG-PVA-ALA

Como a dimerização do 5-ALA é um fator dependente do pH do meio, nesta etapa investigamos as mudanças de pH quando o ativo livre ou nanoencapsulado é adicionado aos meios biológicos de estudos, medindo à temperatura de $(25,0 \pm 0,02)^\circ\text{C}$, estes resultados são qualitativos visto que não se determinou a dimerização do 5-ALA no meio. Os resultados estão mostrados na tabela 19:

Tabela 19 - Variação média de pH para o 5-ALA, C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA para PBS, DEMEM (alta glicose) e DEMEM.

Solução/Amostra	\overline{pH} (u.a.) ($\pm 0,03$)	Coloração
PBS	7,41	Transparente
PBS + ALA⁵	3,50	Transparente
PBS + C-SE-PEG-PVA	7,60	Transparente
PBS + C-SE-PEG-PVA-ALA	7,46	Transparente
DEMEM (alta glicose) (a.g)	7,72	Vermelho claro
DEMEM (a.g) + ALA⁶	7,25	Amarelo
DEMEM (a.g) + C-SE-PEG-PVA⁷	7,91	Rosa claro
DEMEM (a.g) + C-SE-PEG-PVA-ALA	7,60	Vermelho claro
DEMEM	7,76	Vermelho escuro
DEMEM + ALA	7,20	Laranja
DEMEM + C-SE-PEG-PVA	7,84	Vermelho escuro
DEMEM + C-SE-PEG-PVA-ALA	7,60	Vermelho claro

Fonte: Elaborada pela autora.

Para as soluções analisadas, observou-se que apenas para a solução PBS + 5-ALA o pH ficou na faixa ácida. Tanto para o tampão PBS, quanto para os meios DEMEM de alta e baixa glicose ao se adicionar o 5-ALA ou as nanopartículas com ativo o pH das soluções ficaram mais ácidas, no entanto todas as soluções ficaram na faixa básica de pH, podendo indicar que a acidez das soluções de nanopartículas não leva a morte celular. As mudanças de coloração dos meios estão relacionadas aos produtos de reação, no entanto os pHs mais básicos podem indicar a quebra da molécula do 5-ALA no pH mais neutro ou simplesmente pela interação iônica do ativo com os meios, além de possíveis produtos de degradação relacionados a degradação do PLGA. (196)

Dando continuidade aos estudos das nanopartículas, já alinhando aos estudos anteriores, avaliamos para o sistema C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA-ALA, em diferentes concentrações e para as linhagens HDFn e A431 a eficácia da terapia fotodinâmica, para as mesmas doses de energia avaliadas para o 5-ALA. Deste modo temos a figura 58:

⁵ Concentração 5-ALA: 5mM.

⁶ Concentração (3:5) (v:v) (5-ALA: meio).

⁷ Concentração (3:5) (v:v) (nanopartículas: meio).

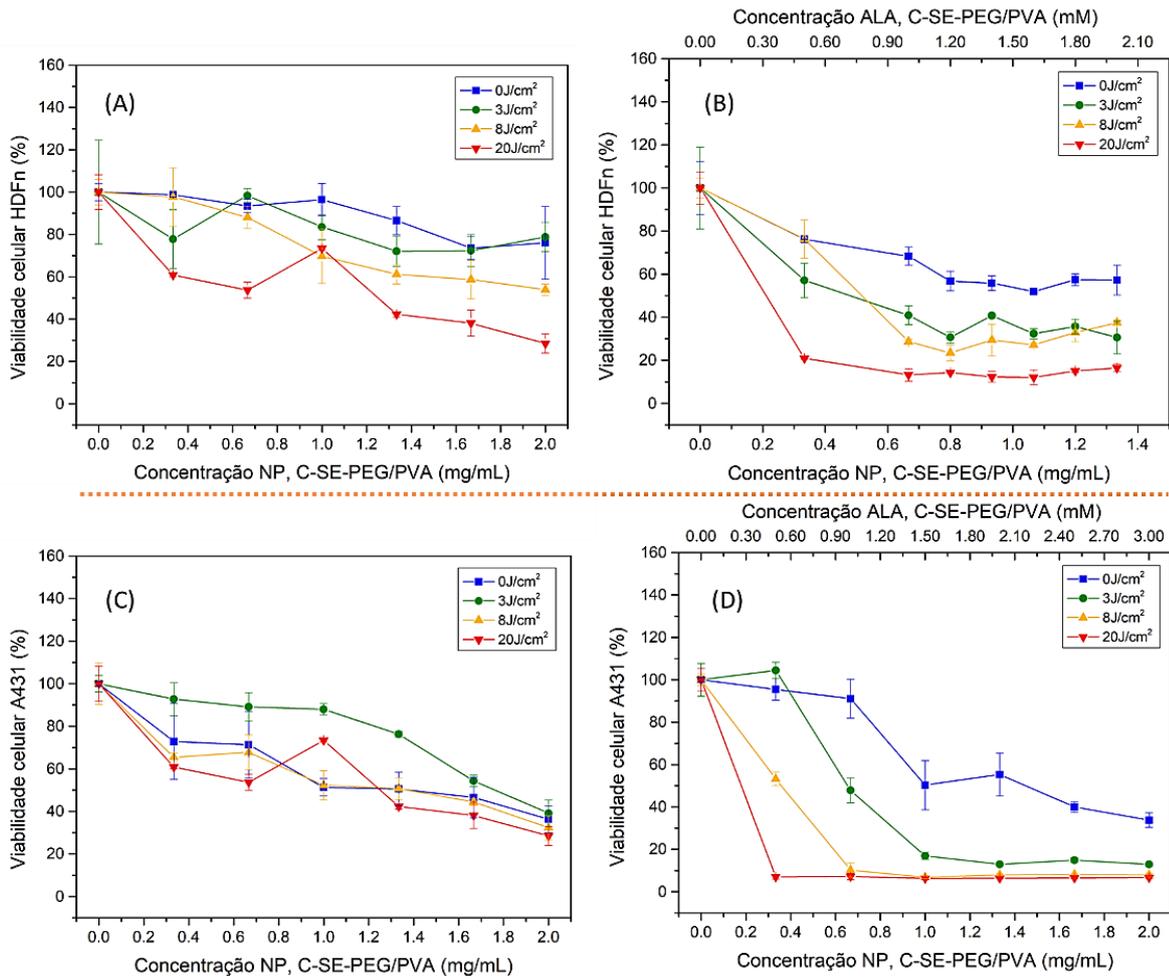


Figura 58 - Terapia fotodinâmica para as linhagens de pele (A) e (B) fibroblatos (HDFn) e (C) e (D) não-melanoma incubadas por 24h com os sistemas de nanopartículas (A) e (C) C-SE-PEG-PVA e (B) (D) C-SE-PEG-PVA. A porcentagem de células vivas estão normalizadas em função das células sem incubação (0 J.cm⁻²). Os valores representam a média e desvio padrão (n =9, para três repetições de ocasião).

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que para ambas as linhagens e na presença ou não do ativo quando a concentração de nanopartículas aumenta, a viabilidade celular diminui, também é possível analisar que na figura 58 (A) e figura 58 (C), as nanopartículas sem ativo são menos citotóxicas, do que quando comparadas as nanopartículas com ativo figura 58 (B) e figura 58 (D).

Para as nanopartículas sem ativo, as menores viabilidades estão relacionadas as maiores concentrações, quando incubadas tanto nos fibroblastos quanto pelas células não-melanoma. Este é um resultado esperado, visto que o aumento de concentração destes materiais alteram o ciclo de proliferação celular, como também mostrado para as análises poliméricas na figura 54.

Além da concentração, a morte celular está relacionada diretamente ao aumento de dose de luz empregada. Para as nanopartículas com ativo incubadas na linhagem celular de câncer não-melanoma, depois de 24 horas, figura 58 (D), observou-se que há uma clara divisão

entre dois grupos com as energias de 8 e 20 J.cm⁻² e 0 e 3 J.cm⁻², onde em situações de maiores energias há a tendência de ocorrer maior morte celular. Ainda nestas mesmas condições, figura 58 (D), só foi observado a proliferação celular para a dose 3 J.cm⁻², na concentração de 0,5 mM, com aumento de 10,44% em relação ao controle.

Comparando as doses de luz aplicadas, em relação às células tumorais e às células saudáveis, temos que para a dose de 8 J.cm⁻² a melhor dose-resposta. Para a célula tumoral na concentração de 0,3333 mg.mL⁻¹, o que equivale a 0,5 mM figura 58 (D), naquela dose há a mortalidade 46,78%, em relação ao controle que corresponde a viabilidade de 53,22%. Nestas mesmas condições para a linhagem de fibroblastos a viabilidade é de 76,28%, figura 58 (B). Para as nanopartículas sem ativo figura 58 (C), na mesma dose luz, a linhagem não-melanoma apresenta viabilidade de 65,42% enquanto a linhagem de células saudáveis apresenta viabilidade de 97,47%. Estas respostas implicam que as nanopartículas com ativo são capazes de matar as células tumorais, mas mantendo a viabilidade das células saudáveis.

Para aquelas condições para o 5-ALA livre, temos que para a linhagem normal, figura 55, a viabilidade celular é de 18% e para as células de câncer de pele não-melanoma, figura 56, a viabilidade celular é de 5%, aproximadamente. Isto implica que para as mesmas concentrações (0,5 mM) e mesma dose de luz (8 J.cm⁻²), apesar das nanopartículas matarem menos células tumorais, ela aumenta a viabilidade celular para a célula de pele normal o que é um ganho para a TFD.

Quando fazemos a mesma comparação para 1 mM as células saudáveis, notamos que o 5-ALA livre, a nanopartícula sem ativo e a nanopartícula com ativo apresentam, respectiva e aproximadamente, 11%, 88% e 28% de viabilidade. Enquanto que para as células tumorais na mesma ordem anterior apresentam 4%, 67% e 10% de viabilidade. Estes resultados novamente podem mostrar que as nanopartículas com ativo mostram maior interação com as células tumorais. Analisando-se estes dados estatisticamente, temos que:

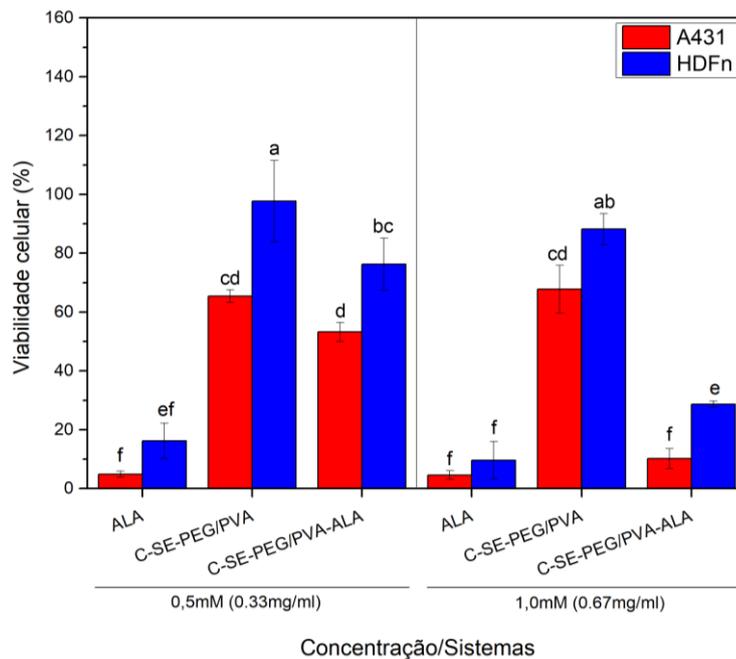


Figura 59 - Análise estatística para as linhagens de pele fibroblatos (HDFn) não-melanoma incubadas por 24h com os sistemas de nanopartículas C-SE-PEG-PVA, C-SE-PEG-PVA-ALA e 5-ALA livre para duas concentrações: 0,5 mM e 1,0 mM, para a dose resposta de 8 J.cm⁻². A porcentagem de células vivas estão normalizadas em função das células sem incubação (0 J.cm⁻²). Os valores representam a média ± desvio padrão (n =9, para três repetições de ocasião). *Grupos que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes (alfa=0,05), ajustado por Tukey. Diferença significativa (p <0,001); teste multivariada ANOVA).

Fonte: Elaborada pela autora.

O 5-ALA não apresenta diferença estatística para nenhuma das linhagens. As nanopartículas sem ativo apresentam diferença estatística apenas para a HDfn. E por fim as nanopartículas com ativo apresentam diferenças estatísticas entre as linhagens, onde é possível observar que este grupo aumenta a mortalidade das células tumorais, mostrando a maior diferenciação entre os grupos e, por tanto, mostrando a eficácia das nanopartículas nos testes *in vitro*. As duas doses-respostas são satisfatórias para o estudo.

Da literatura sabemos de vários estudos de casos de que mostram a eficácia de nanopartículas de PLGA, na encapsulação de FS, aumentando a eficiência e reduzindo a viabilidade de células de cânceres. Além disso, devido a sua área superficial é esperado que as nanopartículas sejam capazes de entregar uma maior quantidade de 5-ALA e por consequência melhorar a internalização e produção de PpIX, por tanto, os resultados apresentados parecem promissores para isto. (21,197)

Segundo Shi *et al.* (2013) (59) um ponto importante é que estes resultados são dependentes da somatória dos materiais usados nas sínteses das nanopartículas. Por exemplo, o PVA residual pode diminuir a absorção celular, no entanto este fato pode ser melhorado com o

uso do PEG. As propriedades das nanopartículas são melhoradas exatamente por causa da carga superficial formada além das ligações covalentes entre o PLGA e o PEG. No mesmo trabalho citado, para a concentração de $2,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ de nanopartículas de PLGA-ALA (equivalente a $0,1 \text{ mM ALA}$) melhorou a mortalidade de células não-melanoma depois de 4 horas de incubação. Estudos *in vivo* também são relatados com sucesso para nanopartículas semelhantes destes estudos. (60)

Os resultados dos nossos estudos colaboram com a literatura, mostrando que desenvolvemos um sistema de nanopartículas bem-sucedido que pode melhorar a eficácia da TFD, em relação ao uso do 5-ALA livre, para aplicações em cânceres de pele não-melanoma. Estudos *in vitro* devem ser propostos para comprovar esta relação de melhoria de dose-resposta das nanopartículas aplicadas ao uso da TFD, bem como novas doses de incubação das nanopartículas.

6.2.3 Quantificação da produção de protoporfirina IX por espectroscopia de fluorescência

Os principais métodos desenvolvidos para sua quantificação de PpIX são espectrofluorometria, HPLC com detecção UV ou fluorescência e detecção ultravioleta. Neste trabalho, para a análise da quantificação de PpIX endógena analisamos por espectrofluorimetria. O DMSO foi escolhido como solvente da PpIX devido a boa solubilidade do PpIX neste meio. (188) A curva de emissão em 200 nm e excitação em 630 nm da PpIX em DMSO é apresentada no APÊNDICE C, na figura 67.

Para se determinar a PpIX produzida pela internalização das nanopartículas nas células de pele normal e tumoral foi realizado a curva de calibração da PpIX, como emissão em 630 nm e excitação em 400 nm e a partir da região linear da curva foi calculado as respectivas concentrações. A curva de calibração é apresentada na figura 60. Neste método, assim como o método de derivatização apresentado anteriormente, há muitas etapas e padronizações que podem induzir aos erros sistemáticos. Assim, este estudo deve ser melhor investigado, por outras técnicas, como microscopia de fluorescência.

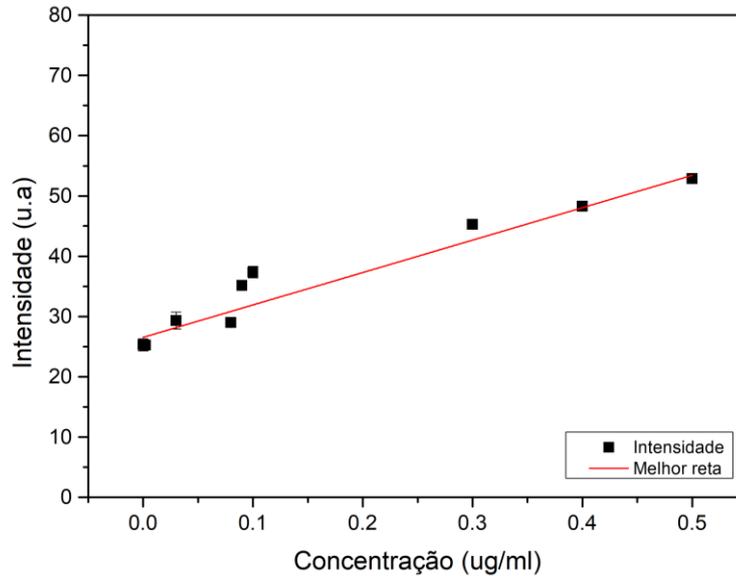


Figura 60 - Curva de calibração de produção de fluorescência para PpIX em DMSO, com excitação em 400 nm e emissão em 630 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 61 mostra a produção de PpIX endógena depois de 24 horas de incubação em comparação com o 5-ALA livre e as nanopartículas com ativo para as células de fibroblastos (HDFn) e não-melanoma (A431).

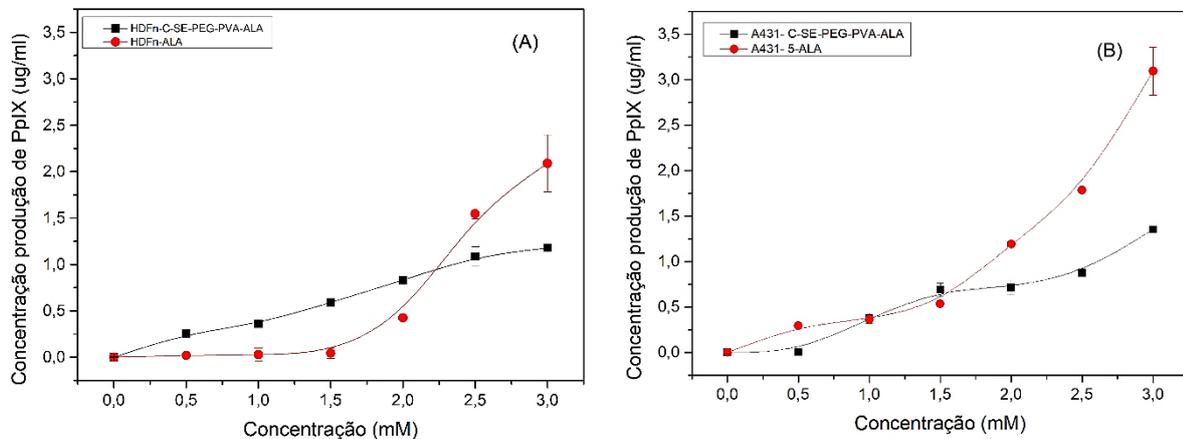


Figura 61 - Produção de PpIX endógena depois de 24 horas de incubação em comparação com o 5-ALA livre e as nanopartículas com ativo para as (A) células fibroblastos (HDFn) e (B) células não-melanoma (A431). Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n = 6$, para duas repetições de ocasião).

Fonte: Elaborada pela autora.

Para os fibroblastos observa-se que há maior acúmulo de PpIX para as nanopartículas, do que em relação as mesmas concentrações iniciais do 5-ALA livre. No entanto para concentrações mais altas é possível observar que a curva do 5-ALA livre aumenta a sua produção. No caso das células tumorais um efeito não esperado foi encontrado, visto que para concentrações entre 1,0 e 1,5 mM as produções são bem próximas tendo um aumento para o 5-

ALA livre a partir das concentrações de 2,0 mM. Este era um efeito esperado para 0 J.cm⁻² embora outras avaliações para diferentes doses respostas de luz devam ser realizadas (59)

Nos estudos de Shi *et al.* (2013) (59) a principal diferença entre a internalização de nanopartículas de PLGA que carregam o 5-ALA e o 5-ALA livre são as rotas de entrega e internalização nas células. Nos seus estudos ficou claro que o 5-ALA nanoencapsulado é entregue diretamente no citoplasma se acumulando nas mitocôndrias e por isso o aumento elevado de PpIX é observado. Além disso, sabemos que as nanopartículas podem oferecer uma melhor estabilidade para a molécula, melhorando também a produção de PpIX. Neste trabalho, apenas a fotocitotoxicidade induzida foi melhor para as nanopartículas, mas não a produção. Para Shi e seus colaboradores isto pode ocorrer principalmente porque o 5-ALA livre pode ser dissolvido diretamente no compartimento extracelular, se decompondo enquanto que as nanopartículas de PLGA direcionam e protegem o ativo de tal a degradação. No entanto, diferentes rotas de captação celular podem ocorrer com o 5-ALA livre e as nanopartículas levando a estas diferenças na produção de PpIX. Novos estudos podem ser propostos para a avaliação da PpIX endógena, visto os erros experimentais envolvidos ao longo da padronização dos experimentos.

No geral como as concentrações necessárias de nanopartículas é menor do 5-ALA livre, pode-se mostrar uma melhora na fotocitotoxicidade, pois, houve melhora na mortalidade de células não-melanoma em relação ao 5-ALA. Atingir igual ou efeito próximo ao da molécula livre com concentrações menores pode reduzir efeitos colaterais *in vivo* e até mesmo diminuir o custo dos tratamentos para a TFD.

6.3 Conclusões parciais

Nestes estudos foi observado que o PEG é menos citotóxico para as células tumorais de A431, do que quando comparadas as células saudáveis HDFn. O mesmo foi observado para os polímeros PLGA e PVA, que formar as nanopartículas poliméricas.

Na segunda etapa foi mostrado que a viabilidade celular para o 5-ALA é dependente das concentrações e das doses de luz aplicadas, onde quanto maior a dose de luz maior a dose-resposta de citotoxicidade, relação está mantida para as concentrações. Tivemos como principal resultado que concentrações tão baixas quanto 20 µM já foi responsável em diminuir a viabilidade celular, onde para diferentes linhagens, tivemos respostas diferentes de perfil de morte celular. A melhor dose de luz para se matar as células tumorais com o 5-ALA livre foi de 8 J.cm⁻².

Mostramos também que quando comparamos todos os sistemas de nanopartículas obtidos em diferentes rotas sintéticas e também formados por diferentes associações de tensoativos, os perfis de viabilidade foram diferentes. Nesta etapa comparativa tivemos como primeira pergunta que, para a linhagem tumoral, a melhor dose-resposta em relação a TFD foi de 3 J.cm^{-2} , no entanto esta hipótese foi melhor avaliada, e concluímos que uma das melhores doses-resposta foi obtida para 8 J.cm^{-2} e para a concentração de $0,3333 \text{ mg.mL}^{-1}$ de nanopartículas, o que equivale a $0,5 \text{ mM}$ do 5-ALA livre. Pressupomos também que a viabilidade é diretamente proporcional a liberação do ativo nanoencapsulado *in vitro*, o que foi apenas confrontado com a literatura.

Apesar do sistema melhorar a fototoxicidade a produção de PpIX, mostrou o resultado contrário tendo o acúmulo preferencial nas células saudáveis e não nas tumorais. Estes resultados devem ser melhores investigados, levando-se em consideração aspectos morfológicos e intracelulares, como por exemplo, o pH citosólico, deficiências na geração da PpIX pelas mitocôndrias e a ação de bombas localizadas em membranas de células tumorais, que poderão atuar expulsando a PpIX formada.

Por fim, conseguimos mostrar que a partir das comparações entre as nanopartículas sem ativo, com ativo e 5-ALA e comparando entre as duas linhagens de pele estudadas tivemos uma internalização eficaz do 5-ALA pelas membranas celulares. Melhoramos a mortalidade celular da célula de câncer não-melanoma em aproximadamente 21% quando comparado nas mesmas condições que o 5-ALA livre. Estes são dados relevantes, mostrando que sistemas de nanopartículas obtidos por simples emulsão podem melhorar a eficácia de ativos lipofílicos, inclusive mostrando resultados promissores para a melhoria da TFD tópica e transdérmica.

7 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho contribui para mostrar que o uso da nanotecnologia associada a TFD tópica pode ser muito promissor. Com o principal objetivo de se desenvolver um sistema de nanopartículas que fosse capaz de aumentar a biodisponibilidade do 5-ALA nas células tumorais, melhorando o tratamento tópico e com potencial para uso e produção na indústria farmacêutica, este trabalho desenvolveu dois sistemas para tanto, modificando rotas sintéticas, de modo a se obter sistemas simples (objetivando menor custo de produção), de boa estabilidade, de fácil reprodução em laboratório e futuras escalas industriais.

Primeiramente foram realizadas buscas por materiais já em aprovação para uso de sistemas de nanopartículas por órgão regulamentadores como a ANVISA e o FDA. Posteriormente, realizamos diversos testes com métodos de obtenção, reagentes químicos, proporções de fases e materiais, com o objetivo de obter sistemas que fosse primeiramente estável suficientes para se passar pelo primeiro processo de escalonamento laboratorial. Nesta fase, foram obtidos sistemas de nanopartículas com ativo na faixa de tamanho entre 200 e 500 nm, dependentes dos métodos de obtenção de síntese. A maior contribuição foi a importância da temperatura de obtenção de síntese para se obter a formação de dupla camada elétrica para se estabilização dos sistemas, a partir do uso do tensoativo PVA. A primeira colaboração desta tese foi o desenvolvimento de um sistema obtido por simples emulsão para o carreamento de ativos hidrofílicos.

Na segunda etapa, analisamos cinco sistemas de nanopartículas divididos em dois grupos principais obtidos por simples ou dupla emulsão, com a estabilização dos sistemas com os tensoativos PVA e PEG400 ou associação entre estes. Comparando os sistemas por medidas temporais de estabilidades, em diferentes temperaturas, mostramos que as nanopartículas melhoram a estabilidade do 5-ALA livre, sendo bons sistemas para aplicações na indústria farmacêutica, podendo ser mantidos ao longo tempo na temperatura de 4°C e em 24°C. Além disso, analisamos a superfície das partículas por técnicas que nos permitiram dizer sobre a formação a estabilidade das nanopartículas. Assim, mostramos que o PEG funcionaliza as superfícies das partículas através das análises observadas, e que o 5-ALA está adsorvido na superfície das nanopartículas. Foram através destas análises e com os resultados de tamanho, potencial Zeta e PDI, que mostramos através dos mapas de visualizações (IDMAP) o melhor sistema potencial com o método de simples emulsão, contribuindo para a literatura atual.

Na terceira etapa, foi mostrado que o sistema de nanopartículas determinado anteriormente como potencial para uso em TFD, é um sistema que varia em função do pH, levando o ativo a ficar mais exposto na superfície. Uma das etapas que mostramos maior contribuição foi no entendimento da degradação térmica propondo que a interação entre o PVA e o PEG e a matriz de PLGA não é apenas uma mistura física, indicando que o PVA fica mais externo na superfície, seguido da interação do PEG e PVA na superfície do PLGA. Mostramos que os sistemas têm uma eficiência de encapsulação alta de 57%, com um padrão de liberação lento e sustentado, levando ao um aumento de fluxo de permeação das nanopartículas em relação ao 5-ALA livre, quando estudado pela técnica células de Franz.

Por último, caracterizamos os sistemas com e sem ativo, em comparação ao 5-ALA livre em culturas de células de pele normal (fibroblastos, HDFn) e tumorais (não-melanoma, A431). Mostramos que a viabilidade celular é diretamente relacionada à concentração e do aumento de dose de luz aplicado tanto do ativo livre quanto do ativo nanoencapsulado *in vitro*, o que foi apenas confrontado com a literatura. Mostramos que a melhor dose-resposta para nanopartículas nas células tumorais é 8 J.cm^{-2} , para $0,3333 \text{ mg. mL}^{-1}$ de nanopartículas, o que equivale a 0,5 mM do 5-ALA livre, o que implica na maior seletividade às células tumorais, portanto, potencializando a ação do 5-ALA. Apesar das nanopartículas melhorarem a fototoxicidade, indicando a internalização eficaz em princípio não melhoramos a produção de PpIX. Neste ponto, sugere-se estudos para o melhor entendimentos dos mecanismos que levam a uma menor concentração da PpIX em tumores de pele não-melanoma.

Finalmente os dados obtidos nesta tese são relevantes e colaborativos mostrando que sistemas de nanopartículas obtidos por simples emulsão podem ter eficácia de carrear ativos lipofílicos, inclusive mostrando resultados promissores para o tratamento de cânceres de pele com o uso da TFD tópica e transdérmica. Espera-se com este trabalho contribuir com o uso da nanotecnologia para a melhoria da TFD para tratamentos de cânceres de pele não-melanoma e, até mesmo, outras doenças de pele relacionadas.

REFERÊNCIAS

- 1 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. *Tipos de câncer: câncer de pele*. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-sistema-nervoso-central%0Ahttps://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>. Acesso em: 11 fev. 2020.
- 2 NATIONAL CANCER INSTITUTE. *What is Cancer?*. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>. Accessible at: 23 jan. 2020.
- 3 WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. *Estimated number of incident cases from 2018 to 2040, all cancers, both sexes, all ages: cancer tomorrow*. 2019. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/home%0Ahttps://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-line?type=0&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0. Acesso em: 23 jan. 2020.
- 4 DE SOUZA, R. J. S. A.P.; MATTEDI, A. P.; CORRÊA, M. P.; REZENDE, M. L.; FERREIRA, A. C. A. Estimativa do custo do tratamento do câncer de pele tipo não-melanoma no estado de São Paulo - Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 4, p. 657–662, 2011.
- 5 SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today*, v. 4, n. 11, p. 507–517, 1999.
- 6 ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, v. 473, n. 4, p. 347–64, 2017.
- 7 DIANZANI, C. *et al.* Drug delivery nanoparticles in skin cancers. *BioMed Research International*, 2014. DOI: 10.1155/2014/895986.
- 8 CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTI, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. *Química Nova*, v. 37, n. 3, p. 521–526, 2014.
- 9 WANG, Y. *FDA's Regulatory Science Program for Generic PLA/PLGA-Based Drug Products*. 2016. Disponível em: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/188841-FDA-s-Regulatory-Science-Program-for-Generic-PLA-PLGA-Based-Drug-Products/>. Acesso em: 08 jul. 2020.
- 10 BOBO, D.; ROBINSON, K. J.; ISLAM, J.; THURECHT, K. J.; CORRIE, S. R. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharmaceutical Research*, v. 33, n. 10, p. 2373–2387, 2016. DOI: 10.1007/s11095-016-1958-5.
- 11 INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar da Silva. *Pele não melanoma*. 2018. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_nao_melanoma. Acesso em: 23 Jan. 2019.
- 12 MADAN V, LEAR JT, SZEIMIES RM. Non-melanoma skin cancer. *Lancet*, v. 375, n. 9715, p. 673–85, 2010. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61196-X.
- 13 DOMINGUES, B.; LOPES, J.; SOARES, P.; POPULO, H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Therapy*, v. 7, p. 35–49, 2018. DOI: [10.2147/ITT.S134842](https://doi.org/10.2147/ITT.S134842).

14 BADASH, I.; SHAULY, O.; LUI, C. G.; GOULD, D. J.; PATEL, K. M. Nonmelanoma facial skin cancer: a review of diagnostic strategies, surgical treatment, and reconstructive techniques. *Clinical Medicine Insights: ear, nose and throat*, v. 12, p. 117955061986527, 2019. DOI: [10.1177/1179550619865278](https://doi.org/10.1177/1179550619865278).

15 SZYMAŃSKA, K. Squamous cell and basal cell carcinoma of the skin: diagnosis and treatment. *Encyclopedia of Cancer*, v. 3, p. 412–416, 2018.

16 ČEOVIĆ, R.; PETKOVIĆ, M.; MOKOS, Z. B.; KOSTOVIĆ, K. Nonsurgical treatment of nonmelanoma skin cancer in the mature patient. *Clinics in Dermatology*, v. 36, n. 2, p. 177–187, 2018.

17 CALIXTO, G. M.; BERNEGOSI, J.; DE FREITAS, L. M.; FONTANA, C. R.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review. *Molecules*, v. 21, n. 3, p. 342, 2016.

18 SILVA, Z. S.; BUSSADORI, S. K.; SANTOS FERNANDES, K. P.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Animal models for photodynamic therapy (PDT). *Bioscience Reports*, v. 35, n. 6, p. 1–14, 2015.

19 KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 66, n. 2, p. 89–106, 2002.

20 AMERICAN CANCER SOCIETY. *Getting photodynamic therapy: what is photodynamic therapy?*. 2015. Available from: <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/photodynamic-therapy>. Accessible at: 10 Sept. 2020.

21 CERIZE, N. N. P. *Estudo de sistemas nanocarreadores para o ácido 5-aminolevulínico com aplicação na terapia fotodinâmica*. 2012. 174 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

22 KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H.; PROSS, D. C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin. IX: basic principles and present clinical experience. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 6, n. 1–2, p. 143–148, 1990.

23 ELFSSON, B.; WALLIN, I.; EKSBORG, S.; RUDAEUS, K.; ROS, A. M.; EHRSSON, H. Stability of 5-aminolevulinic acid in aqueous solution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 7, n. 2, p. 87–91, 1999.

24 HUNTER, G. A.; RIVERA, E.; FERREIRA, G. C. Supraphysiological concentrations of 5-aminolevulinic acid dimerize in solution to produce superoxide radical anions via a protonated dihydropyrazine intermediate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 437, n. 2, p. 128–137, 2005.

25 NOVO, M.; HÜTTMANN, 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, n. 2–3, p. 143–148, 1996.

26 KALISZEWSKI, M *et al.* Biological activity of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester after storage under different conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 87, n. 2, p. 67–72, 2007.

27 NG, K. W.; LAU, W. M. Skin deep: the basics of human skin structure and drug penetration. In: DRAGICEVIC, N.; MAIBACH, H. (ed.) *Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement*. Berlin: Springer, 2015. p. 3–11.

- 28 ALKILANI, A. Z.; MCCRUDDEN, M. T. C.; DONNELLY, R. F. Transdermal drug delivery: innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics*, v. 7, n. 4, p. 438–470, 2015.
- 29 LUÍS, A.; RUELA, M.; PERISSINATO, A. G.; ESSELIN, M.; LINO, D. S. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 52, n. 3, p. 527–544, 2016.
- 30 RAI, V.; GHOSH, I.; BOSE, S.; SILVA, S. M. C.; CHANDRA, P.; MICHNIAK-KOHN, B. A transdermal review on permeation of drug formulations, modifier compounds and delivery methods. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 20, n. 2, p. 75–88, 2010. DOI: 10.1016/S1773-2247(10)50011-X.
- 31 WANG, S. *et al.* Development of an efficient transdermal drug delivery system with TAT-conjugated cationic polymeric lipid vesicles. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 2, n. 7, p. 877–884, 2014.
- 32 PINTO REIS, C.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.
- 33 SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.
- 34 JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *British Journal of Pharmacology*, v. 154, n. 1, p. 1–3, 2008.
- 35 AQUINO JUNIOR, A. E.; CARBINATTO, F. M.; COELHO, V. H. M.; BAGNATO, V. S. *Feridas: um desafio para a saúde pública*. São Carlos: IFSC, 2019.
- 36 SPRING, B. Q. *et al.* A photoactivable multi-inhibitor nanoliposome for tumour control and simultaneous inhibition of treatment escape pathways. *Nature Nanotechnology*, v. 11, p. 1–12, 2016. DOI: 10.1038/nnano.2015.311.
- 37 BRASSEUR, N.; BRAULT, D.; COUVREUR, P. Adsorption of hematoporphyrin onto polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: carrier capacity and drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 70, n. 1–2, p. 129–35, 1991.
- 38 EUROPEAN MEDICINES AGENCY. AMELUZ: an overview of Ameluz and why it is authorised in the EU what is Ameluz and what is it used for? Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ameluz#:~:text=Ameluz%20is%20a%20medicine%20used,can%20lead%20to%20skin%20cancer.&text=Ameluz%20contains%20the%20active%20substance%205%2Daminolaevulinic%20acid>. Accessible at: 09 Sept. 2020
- 39 SENGE, M. O. MTHPC - a drug on its way from second to third generation photosensitizer? *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 9, n. 2, p. 170–179, 2012. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2011.10.001
- 40 ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X. H.; CHILDS, C. J. H.; SIBATA, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 1, n. 1, p. 27–42, 2004.
- 41 SEVERINO, P.; SANTANA, M.; MALMONGE, S.; SOUTO, E. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. *Polímeros* v. 21, n. 5, p. 361–368, 2011.

42 KUMARI, A.; YADAV, S. C. S. K. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids & Surfaces B: biointerfaces*, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

43 DANHIER, F.; ANSORENA, E.; SILVA, J.M.; COCO, R.; LE BRETON, A.; PRÉAT, V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Control Release*, v. 161, n. 2, p. 505–22, 2012. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.

44 HIRENKUMAR, M.; STEVEN, S. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, v. 3, n. 3, p. 1–19, 2012.

45 TABATABAEI MIRAKABAD, F. S. *et al.* PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 15, n. 2, p. 517–35, 2014.

46 ASTETE, C. E.; SABLIOV, C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 17, n. 3, p. 247–289, 2006. DOI: 10.1163/156856206775997322

47 MELO, C. S.; CUNHA JUNIOR, A. S.; FIALHO, S. L. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 33, n. 4, p. 469–77, 2012.

48 SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros: parte I. *Polímeros*, v. 22, n. 1, p. 96–100, 2012.

49 SHI, C.; ZENG, F.; FU, D. Surfactant-free poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for improving in vitro anticancer efficacy of tetrandrine. *Journal of Microencapsulation*, v. 33, n. 3, p. 249–256, 2016.

50 CU Y, SALTZMAN WM. Controlled surface modification with poly(ethylene)glycol enhances diffusion of plga nanoparticles in human cervical mucus. *Molecular Pharmaceutics*, v. 6, n. 1, p. 173–181, 2009.

52 HONG, E. J.; CHOI, D. G.; SUK, M. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 6, n. 4, p. 297–307, 2016. DOI: 10.1016/j.apsb.2016.01.007.

53 KUMARI, R. M.; SHARMA, N.; GUPTA, N.; CHANDRA, R.; NIMESH, S. Synthesis and evolution of polymeric nanoparticles. In: GRUMEZESCU, A. M. (ed.). *Design and development of new nanocarriers*. Amsterdam: Elsevier, 2018. p. 401-438. DOI: 10.1016/B978-0-12-813627-0.00011-9.

54 SOM, I.; BHATIA, K.; YASIR, M. Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, v. 4, n. 1, p. 2–9, 2012.

55 JUNYAPRASERT, V. B.; SINGHSA, P.; JINTAPATTANAKIT, A. Influence of chemical penetration enhancers on skin permeability of ellagic acid-loaded niosomes. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, n. 2, p. 110–117, 2013. doi: 10.1016/j.ajps.2013.07.014.

56 MOREIRA, T. S. Síntese de nanopartículas poliméricas por polimerização radicalar (RAFT) para vetorização biodirigida de tamoxifeno. 2015. Available from: <http://www.ti.com/lit/ds/symlink/cc2538.html>. Accessible at:2020-20-10

57 MISHRA, P.; NAYAK, B.; DEY, R. K. PEGylation in anti-cancer therapy: an overview. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 11, n. 3, p. 337–348, 2016. DOI: 10.1016/j.ajps.2015.08.011.

58 ALEXANDER, A.; DWIVEDI, S.; GIRI, T. K.; SARAF, S.; SARAF, S.; KRISHNA, D. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *Journal of Controlled*

Release, v. 164, n. 1, p. 26–40, 2012.

59 SHI, L. *et al.* In vitro evaluation of 5-aminolevulinic acid (ALA) loaded PLGA nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 2669–2676, 2013. DOI: 10.2147/IJN.S45821.

60 SHAKER, M. N.; RAMADAN, H. S.; MOHAMED, M. M.; KHATIB, A. M.; ROSTON, G. D. Enhanced photodynamic efficacy of PLGA-encapsulated 5-ALA nanoparticles in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Applied Nanoscience*, v. 4, p. 777–789, 2014. DOI: 10.1007/s13204-013-0268-z.

61 SILVA, G. R. *Estudo de formação e estabilidade de nanopartículas de poliácido láctico para liberação controlada do óleo essencial de *Shinus Molle L.** 2015. 127 p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

62 KRISHNASWAMY, K.; ORSAT, V. Sustainable delivery systems through green nanotechnology. In: GRUMEZESCU, A. M. (ed.). *Nano-and microscale drug delivery systems: design and fabrication*. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 17–32. DOI: 10.1016/B978-0-323-52727-9/00002-9.

63 PAZZINI, C. E. *Estudo de solubilidade do poliestireno (PS) e da policaprolactona (PCL) em diferentes solventes orgânicos*. 2015. 43f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

64 REICHARDT, C. Empirical parameters of solvent polarity. In: REICHARDT, C; WELTON, T. (ed.) *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. p. 389–469.

65 SILVA, A. *Nanopartículas catiônicas obtidas por emulsificação com evaporação de solvente para liberação modificada de benznidazol*. 2015. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

66 USP-NF. General Chapters. *Solvent residual*. Available from: https://www.uspnf.com/sites/default/files/uspnf_pdf/EN/USPNF/generalChapter467Current.pdf. Accessible at: 23 Sept. 2020.

67 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia de estabilidade de produtos cosméticos*. 2004. Available from: <https://www.elementum.far.br/assets/pdf/ANVISA-Guia-de-Estabilidade-de-Produtos-Cosm%C3%A9ticos-2004.pdf>. Accessible at: 17 Sept. 2020.

68 MALVERN INSTRUMENTS. *Zetasizer nano series user manual*. 2004. Available from: [http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Zetasizer+Nano+Series+User+Man](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Zetasizer+Nano+Series+User+Manual#0)ual#0. Accessible at: 11 Nov. 2014.

69 WU, G.; CHEN, L.; LI, H.; DENG, C. L.; CHEN, X. F. Comparing microspheres with different internal phase of polyelectrolyte as local drug delivery system for bone tuberculosis therapy. *BioMed Research International*, 2014. DOI:10.1155/2014/297808.

70 LEGRAND, P. *et al.* Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 344, n. 1–2, p. 33–43, 2007.

71 SIGMA-ALDRICH. *Physical properties of solvents*. 2001. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Aldrich/General_Information/labbasics_pg144.pdf. Accessible at: 12 Oct. 2020

72 YE, Z.; SQUILLANTE, E. The development and scale-up of biodegradable polymeric nanoparticles

loaded with ibuprofen. *Colloids Surfaces A: physicochemical engineering aspects*, v. 422, p. 75–80, 2013. DOI: [10.1016/J.COLSURFA.2013.01.016](https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2013.01.016).

73 SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; DE LUCCA FREITAS, L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

74 HILL, M.; CUNNINGHAM, R. N.; HATHOUT, R. M.; JOHNSTON, C.; HARDY, J. G.; MIGAUD, M. E. Formulation of antimicrobial tobramycin loaded PLGA nanoparticles via complexation with AOT. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 10, n. 2, p. 26, 2019.

75 MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, v. 3, n. 3, p. 1377–1397, 2011.

76 TURK, C. T. S.; OZ, U. C.; SERIM, T. M.; HASCICEK, C. Formulation and optimization of nonionic surfactants emulsified nimesulide-loaded PLGA-based nanoparticles by design of experiments. *AAPS PharmSciTech*. v. 15, n. 1, p. 161–176, 2014.

77 RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011. DOI: [10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001](https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001).

78 ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T. Aspects of surfactant toxicity. In: ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T. (ed). *Surfactant systems*. London: Chapman & Hall, 1983. p. 614–97.

79 KOBAYASHI M.; KANEKIYO M.; ANDO I.; AMIYA S. A study of the gelation mechanism of poly(vinyl alcohol) in aqueous solution by high-resolution solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. *Polymer Gels and Networks*, v. 6, n. 6, p. 425-428, 1998. DOI: [10.1016/S0966-7822\(98\)00031-8](https://doi.org/10.1016/S0966-7822(98)00031-8).

80 MALVERN LTD. *A basic guide to particle characterization*. 2015; Available from: <http://www.malvern.com>. Accessible at: 18 Set. 2020

81 WIŚNIEWSKA, M. *et al.* Impact of poly(vinyl alcohol) adsorption on the surface characteristics of mixed oxide MnxOy-SiO_2 . *Adsorption*, v. 22, n. 4–6, p. 417–423, 2026.

82 ROCA, Montserrat Foguet. **Nanoemulsion**. Depositante: Biofrontera Bioscience GmbH. US 2009/0324727A1. Deposito: Dec.20,2007. Concessao: Dec.30,2009..

83 NETO PEREIRA CERIZE, N.; MARIM DE OLIVEIRA, A.; R, BR, RÉ MI [BR/BR];, TEDESCO AC [BR/BR]. NANOCARREADORES COLOIDAIIS PARA ATIVOS HIDROFÍLICOS E PROCESSO DE PRODUÇÃO (57) Wo 201 1/156880. 2011.

84 LAMPMAN, G. M. *et al.* *Introdução a espectroscopia*. Boston: CENGAGE, 2010.

85 MALVERN. *Nanosight Ns300 operating manual*. 2015. Available from: https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/NanoSight_NS300%20-%20user%20guide.pdf. Accessible at: 19 Oct. 2020.

86 ADAMSON, A. W. *Physical chemistry of surfaces*. New Jersey: Wiley, 1990.

87 BRACCO, G.; HOLST, B. *Surface science techniques*. Berlin: Springer, 2013. (Springer series in surface sciences, v. 51).

88 MUNSHI, A. M. *et al.* Effect of nanoparticle size on sessile droplet contact angle. *Journal of Applied Physics*, v. 103, n. 8, p. 084315, 2008.

- 89 SOARES, A. C. *Filmes nanoestruturados aplicados em biossensores para detecção precoce de câncer de pâncreas*. 2016. 135 p. Tese (Doutorado em Ciência) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 90 TORRES, B. B. M. *Filmes finos do ácido poli 3-tiofeno acético*. 2011. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Escola de Engenharia de São Carlos; Instituto de Física de São Carlos; Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- 91 SILVERSTEIN, R. M.; FRANCIS, X.; WEBSTER, D. J. K. Proton magnetic resonance spectrometry. In: SILVERSTEIN, R. M (ed.). *Spectrometric identification of organic compounds*. 8th ed. New Jersey: John Wiley & Sons 2005.
- 92 DUVALL, M. N.; KNIGHT, K. *FDA regulation of nanotechnology*. 2011. Available from: https://www.harrisbeach.com/wp-content/uploads/2012/02/FDA_Regulation_of_Nanotechnology.PDF. Accessible at: 19 Oct. 2020.
- 93 LIECHTY, W. B.; KRYSZCIO, D. R.; SLAUGHTER, B. V.; PEPPAS, N. A. Polymers for drug delivery systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, v. 1, n. 1, p. 149–173, 2010. DOI: 10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847.
- 94 NIMESH, S. Poly(D,L-lactide- co-glycolide)- based nanoparticles. In NIMESH, S. (ed.). *Gene therapy: potential applications of nanotechnology*. Oxford: Woodhead Publishing, 2013. p. 309–29.
- 95 GRAMA, C. N.; VENKATPURWAR, V. P.; LAMPROU, D. A.; RAVI KUMAR, M. N. V. Towards scale-up and regulatory shelf-stability testing of curcumin encapsulated polyester nanoparticles. *Drug Delivery and Translational Research*, v. 3, n. 3, p. 286–93, 2013.
- 96 VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v. 26, n. 5, p. 1025–1058, 2009.
- 97 DUARTE, D. S.; NASCIMENTO, J. A. A.; BRITTO, D. Scale-up in the synthesis of nanoparticles for encapsulation of agroindustrial active principles. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 43, 2019. DOI: [10.1590/1413-7054201943023819](https://doi.org/10.1590/1413-7054201943023819).
- 98 RAHMAN, S. M. *et al.* Synthesis and characterization of polymer electrolyte using deep eutectic solvents and electrospun poly(vinyl alcohol) membrane. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 55, n. 30, p. 8341–8348, 2016.
- 99 PARHIZKAR, M. *et al.* Electrohydrodynamic encapsulation of cisplatin in poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for controlled drug delivery. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, v. 12, n. 7, p. 1919–29, 2016. DOI: 10.1016/j.nano.2016.05.005.
- 100 WIEDMANN, T. S.; NAQWI, A. Pharmaceutical salts: theory, use in solid dosage forms and in situ preparation in an aerosol. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 11, n. 6, p. 722–734, 2016. DOI: 10.1016/j.ajps.2016.07.002.
- 101 DESHMUKH, K.; AHMAD, J.; HÄGG, M. B. Fabrication and characterization of polymer blends consisting of cationic polyallylamine and anionic polyvinyl alcohol. *Ionics*, v. 20, n. 7, p. 957–967, 2014.
- 102 DESHMUKH, K. *et al.* Graphene oxide reinforced polyvinyl alcohol/polyethylene glycol blend composites as high-performance dielectric material. *Journal of Polymer Research*, v. 23, n. 8, 2016. DOI: 10.1007/s10965-016-1056-8

- 103 GUPTA, R.; DWADASI, B. S.; RAI, B.; MITRAGOTRI, S. Effect of chemical permeation enhancers on skin permeability: in silico screening using molecular dynamics simulations. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019. DOI: 10.1038/s41598-018-37900-0.
- 104 KARANDE, P.; MITRAGOTRI, S. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. *Biochimica et Biophysica Acta - biomembrane*, v. 1788, n. 11, p. 2362–2373, 2009. DOI: 10.1016/j.bbamem.2009.08.015.
- 105 HUANG, W.; ZHANG, C. Tuning the size of poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) nanoparticles fabricated by nanoprecipitation. *Biotechnology Journal*, v. 13, n. 1, p. 1–19, 2018.
- 106 DESHMUKH, K. *et al.* Influence of K₂CrO₄ doping on the structural, optical and dielectric properties of polyvinyl alcohol/K₂CrO₄ composite films. *Polymer: plastics technology and engineering* v. 55, n. 3, p. 231–241, 2016.
- 107 MALLAKPOUR, S.; NEZAMZADEH, E. A. Preparation and characterization of chitosan-poly(vinyl alcohol) nanocomposite films embedded with functionalized multi-walled carbon nanotube. *Carbohydrate Polymers*, v. 166, p. 377–386, 2017. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.02.086.
- 108 REZVANI, M. A. *et al.* An organic-inorganic hybrid based on an Anderson-type polyoxometalate immobilized on PVA as a reusable and efficient nanocatalyst for oxidative desulphurization of gasoline. *RSC Advances*, v. 6, n. 58, p. 53069–53079, 2016. DOI: 10.1039/C6RA08033B.
- 109 SLEPIČKA, P. *et al.* Stabilization of sputtered gold and silver nanoparticles in PEG colloid solutions. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 17, n. 1, 2015. DOI: [10.1007/s11051-014-2850-z](https://doi.org/10.1007/s11051-014-2850-z).
- 110 BASU, T.; PAL, B.; SINGH, S. Fabrication of core–shell PLGA/PLA–pNIPAM nanocomposites for improved entrapment and release kinetics of antihypertensive drugs. *Particuology*, v. 40, p. 169–176, 2018. DOI: 10.1016/j.partic.2017.10.002.
- 111 BASU, T.; PAL, B.; SINGH, S. Synthesis and characterization of ramipril embedded nanospheres of biodegradable poly-D,L-lactide-co-glycolide and their kinetic release study. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, v. 8, n. 6, p. 444–449, 2016.
- 112 YI, S.; YANG, F.; JIE, C.; ZHANG, G. A novel strategy to the formulation of carmustine and bioactive nanoparticles co-loaded PLGA biocomposite spheres for targeting drug delivery to glioma treatment and nursing care. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 47, n. 1, p. 3438–3447, 2019. DOI: 10.1080/21691401.2019.1652628.
- 113 FILIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*, v. 27, n. 5, p. 796–810, 2010.
- 114 MALVERN INSTRUMENTS LIMITED. Comparison of statistical measures reported by NTA and DLS techniques. 2015. Available from: <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/technical-notes/TN160115ComparingStatisticalMeasuresNTADLS>. Accessible at: 23 Sept. 2020.
- 115 MELO, C. C. *Nanopartículas de quitosana como veículo para entrega de oligodeoxiribonucleotídeos antisense*. 2018. 125 p. Dissertação(Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.
- 116 FATHI, A.; LIN, H.; WEI, C. Surface tension and wettability in transdermal delivery : a study on the in-vitro permeation of haloperidol with cyclodextrin across human epidermis. *Journal of Pharmacy*

and Pharmacology, v. 62, n. 6, p. 770-778, 2010.

117 ROTTA, J. *Propriedades físico-químicas de soluções formadoras e de filmes de quitosana e hidroxipropilmetilcelulose*. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

118 LINO, R. C. *Desenvolvimento de filmes de metilcelulose incorporados por nanopartículas de poli- ϵ - caprolactona / β - caroteno*. 2012. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

119 ZHANG, L.; WEBSTER, T. J. Effects of chemically modified nanostructured PLGA on functioning of lung and breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 1907–1919, 2013. DOI: [10.2147/IJN.S41570](https://doi.org/10.2147/IJN.S41570).

120 GYULAI, G.; KISS, É. Interaction of poly (lactic- co -glycolic acid) nanoparticles at fluid interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 500, p. 9–19, 2017. DOI: [10.1016/j.jcis.2017.03.114](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.03.114)

121 MANSUR, H. S.; ORÉFICE, R. L.; MANSUR, A. A. P. Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. *Polymer*, v. 45, n. 21, p. 7193–7202, 2004.

122 MANNOCK, D. A. *et al.* The effect of variations in phospholipid and sterol structure on the nature of lipid-sterol interactions in lipid bilayer model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 163, n. 6, p. 403–448, 2010. DOI: [10.1016/j.chemphyslip.2010.03.011](https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.03.011)

123 NAGLE, J. F. Theory of the main lipid bilayer phase transition. *Annual Review of Physical Chemistry*, v. 31, n.1, p. 157–96, 1980. DOI: [10.1146/annurev.pc.31.100180.001105](https://doi.org/10.1146/annurev.pc.31.100180.001105).

124 BARBOSA, L. C. A. *Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*. Viçosa: UFV, 2013. 189 p.

125 DOS REIS, E. F. *et al.* Synthesis and characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogels and hybrids for rMPB70 protein adsorption. *Materials Research*, v. 9, n. 2, p. 185–191, 2006.

126 PORJAZOSKA, A. *et al.* Poly(lactide-co-glycolide) microparticles as systems for controlled release of proteins -- preparation and characterization. *Acta Pharmaceutica*, v. 54, n. 3, p. 215–29, 2004.

127 FASEHEE, H. *et al.* Delivery of disulfiram into breast cancer cells using folate-receptor-targeted PLGA-PEG nanoparticles: in vitro and in vivo investigations. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 14, n. 1, p. 32, 2016.

128 CHEN, J. Y.; PENG, Q.; JODL, H. J. Infrared spectral comparison of 5-aminolevulinic acid and its hexyl ester. *Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy* . v. 59, n. 11, p. 2571–2576, 2003

129 MORENO, M. M.; GARIDEL, P.; SUWALSKY, M.; HOWE, J.; BRANDENBURG, K. The membrane-activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen:a physico-chemical study with lecithin phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta - biomembrane*, v. 1788, n. 6, p. 1296–1303, 2009. DOI: [10.1016/j.bbamem.2009.01.016](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.01.016)

130 SEVERCAN, F.; SAHIN, I.; KAZANCI, N. Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes-evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta - biomembrane*, v. 1668, n. 2, p. 215–222, 2005.

131 BUTLER, A. R.; GEORGE, S. The nonenzymatic cyclic dimerisation of 5-aminolevulinic acid. *Tetrahedron*, v. 48, n. 37, p. 7879–7886, 1992.

132 GARNER, J. *et al.* A protocol for assay of poly(lactide-co-glycolide) in clinical products. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 495, n. 1, p. 87–92, 2015. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.08.063.

133 SHAPIRO, Y. E. ¹H NMR self-diffusion study of morphology and structure of polyvinyl alcohol cryogels. *Journal of Colloid Interface Science*, v. 212, n. 2, p. 453–465, 1999.

134 PETIT, J. M.; ZHU, X. X. ¹H and ¹³C NMR study on local dynamics of poly(vinyl alcohol) in aqueous solutions. *Macromolecules*, v. 29, n. 6, p. 2075–2081, 1996.

135 ZHANG, Q.; GUO, N.; SUN, Y.; LI, X.; YANG, H. Absolute quantification of poly(DL-lactide-co-glycolide) in microspheres using quantitative ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 146, p. 273–278, 2017. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.08.046.

136 DA ROCHA RODRIGUES, E. J.; DE PAULA CAVALCANTE, M.; TAVARES, M. I. B. Time domain NMR evaluation of poly(vinyl alcohol) xerogels. *Polimeros*, v. 26, n. 3, p. 221–227, 2016.

137 KROON, P. A.; KAINOSHO, M.; CHAN, S. I. Proton magnetic resonance studies of lipid bilayer membranes experimental determination of inter- and intramolecular nuclear relaxation rates in sonicated phosphatidylcholine bilayer vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta - biomembrane*, v. 433, n. 2, p. 282–293, 1976.

138 BROWN, M. F. Theory of spin-lattice relaxation in lipid bilayers and biological membranes. dipolar relaxation. *Journal of Chemical Physical*, v. 80, n. 6, p. 2808, 1984.

139 BLOOM, M.; THEWALT, J. Spectroscopic determination of lipid dynamics in membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 73, n.1–2, p. 27–38, 1994.

140 MELLO, N. C. *et al.* NMR study of ion-conducting organic-inorganic nanocomposites poly(ethylene glycol) - Silica - LiClO₄. *Macromolecules*, v. 33, n. 4, p. 1280–8, 2000.

141 AUSTIN, D. T. R.; HILLS, B. P. Two-dimensional NMR relaxation study of the pore structure in silicone hydrogel contact lenses. *Applied Magnetic Resonance*, v. 35, n. 4, p. 581–91, 2009. DOI: 10.1007/s00723-009-0187-z

142 CLAUSEN, A. E.; BERNKOP-SCHNU, A. In vitro evaluation of the effect of natural-resumos. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 89, n. 10, p. 1253–1261, 2000. DOI: 10.1002/1520-6017(200010)89:10%3C1286::AID-JPS6%3E3.0.CO;2-O

143 SANTAMARÍA-AGUIRRE, J.; ALCO CER-VALLEJO, R.; LÓPEZ-FANÁRRAGA, M. Drug nanoparticle stability assessment using isothermal and nonisothermal approaches. *Journal of Nanomaterials*, v. 2018, 2018. DOI: 10.1155/2018/3047178.

144 GONZATTI, G. K.; NETZ, P. A.; FIEL, L. A.; POHLMANN, A. R. Colloidal dispersion stability: kinetic modeling of agglomeration and aggregation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 26, n. 2, p. 373–380, 2015.

145 PHAN, H. T.; HAES, A. J. What does nanoparticle stability mean? *Journal of Physical Chemistry C: nanomaterials and interfaces*, v. 123, n. 27, p. 16595–16507, 2019.

- 146 MORAES, C. M. *et al.* Physicochemical stability of poly(lactide-co-glycolide) nanocapsules containing the local anesthetic bupivacaine. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 6, p. 995–1000, 2010.
- 147 DE, S.; ROBINSON, D. H. Particle size and temperature effect on the physical stability of PLGA nanospheres and microspheres containing bodipy. *AAPS PharmSciTech*, v. 5, n. 4, 2004. DOI: 10.1208/pt050453.
- 148 DINARVAND, R.; SEPEHRI, N.; MANOOCHEHRI, S.; ROUHANI, H.; ATYABI, F. Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, p. 877–95, 2011. DOI: 10.2147/IJN.S18905
- 149 CHEN, W.; SHEN, H.; ZHU, X.; YAO, H.; WANG, W. Preparation and photochromic properties of PEG-400 assisted WO₃-TiO₂-ZnO composite films. *Ceramics International*, v. 41, n. 10, p. 14008–14012, 2015.
- 150 HOLZER, M.; VOGEL, V.; MÄNTELE, W.; SCHWARTZ, D.; HAASE, W.; LANGER, K. Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 72, n. 2, p. 428–37, 2009. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.02.002.
- 151 BERNAL, C. *et al.* Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 849–855, 2002.
- 152 SEMNANI, D. Geometrical characterization of electrospun nanofibers electrospun nanofibers. In: AFSHARI, M. (ed.). *Electrospun nanofibers*. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 151-180. DOI: 10.1016/B978-0-08-100907-9.00007-6.
- 153 DONNELLY, R. F. *et al.* Pharmaceutical analysis of 5-aminolevulinic acid in solution and in tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 82, n. 1, p. 59–71, 2006.
- 154 LICHTMAN, J. W.; CONCHELLO, J. A. Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, v. 2, n. 12, p. 910–919, 2005.
- 155 FEY, H. Fluorescence microscopy. *Revue Medicale de la Suisse Romande*, v. 85, n. 10, p. 768–775, 1965.
- 156 SALAMANCA, C. H. *et al.* Franz diffusion cell approach for pre-formulation characterisation of ketoprofen semi-solid dosage forms. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 3, p. 1–10, 2018.
- 157 HAQ, A. *et al.* Membrane properties for permeability testing: skin versus synthetic membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 539, n. 1–2, p. 58–64, 2018. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.01.029.
- 158 FU, X.; HOSTA-RIGAU, L.; CHANDRAWATI, R.; CUI, J. Multi-stimuli-responsive polymer particles, films, and hydrogels for drug delivery. *Chemistry*, v. 4, n. 9, p. 2084–2107, 2018. DOI: 10.1016/j.chempr.2018.07.002.
- 159 HONG, W. *et al.* Thermo- and pH-responsive copolymers based on PLGA-PEG-PLGA and poly(l-histidine): synthesis and in vitro characterization of copolymer micelles. *Acta Biomaterialia*, v. 10, n. 3, p. 1259–71, 2014. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.12.033
- 160 BABIČ, A. *et al.* 5-Aminolevulinic acid-squalene nanoassemblies for tumor photodetection and therapy: in vitro studies. *Nanoscale Research Letters*, v. 13, n. 10, 2018. DOI: [10.1186/s11671-017-](https://doi.org/10.1186/s11671-017-)

2408-y

161 MURAKAMI, H.; KOBAYASHI, M.; TAKEUCHI, H. Preparation of poly (DL -lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 187, n. 2, p. 143–152, 1999.

162 LOGANATHAN, S. *et al.* Thermogravimetric analysis for characterization of nanomaterials. In: THOMAS, S. *et al.* (ed.). *Thermal and rheological measurement techniques for nanomaterials characterization*. Berlin: Elsevier, 2017. p. 67-108.

163 ISMAIL, R. *et al.* Synthesis and statistical optimization of Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) nanoparticles encapsulating GLP1 analog designed for oral delivery. *Pharmaceutical Research*, v. 36, n. 7, 2019. DOI: 10.1007/s11095-019-2620-9.

164 SHAKER, M. N. *et al.* Enhanced photodynamic efficacy of PLGA-encapsulated 5-ALA nanoparticles in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Applied Nanoscience*, v. 4, n. 7, p. 777–789, 2014.

165 HUANG, L.; NISHINARI, k. Interaction between Poly(ethylene glycol) and water as studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Polymer Science Part B: polymer physics*, v. 39, n. 5, p. 536–547, 2001.

166 ZHANG, R.; LIANG, B.; QU, T.; CAO, B.; LI, P. High-performance sulfosuccinic acid cross-linked PVA composite pervaporation membrane for desalination. *Environmental Technology*, v. 40, n. 3, p. 312–320, 2019. DOI: 10.1080/09593330.2017.1388852

167 MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; EVANGELISTA, R. C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*; v. 42, n. 4, p. 523–530, 2006.

168 KHALIL, K. A.; FOUAD, H.; ELSARNAGAWY, T.; ALMAJHDI, F. N. Preparation and characterization of electrospun PLGA/silver composite nanofibers for biomedical applications. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 8, n. 3, p. 3483–3493, 2013.

169 JUSU, S. M. *et al.* Drug-encapsulated blend of PLGA-PEG microspheres: in vitro and in vivo study of the effects of localized/targeted drug delivery on the treatment of triple-negative breast cancer. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1–23, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-71129-0

170 TOMODA, K.; YABUKI, N.; TERADA, H.; MAKINO, K. Surfactant free preparation of PLGA nanoparticles: the combination of antisolvent diffusion with preferential solvation. *Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, v. 457, n. 1, p. 88–93, 2014.

171 MU, L.; FENG, S. S. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol®). *Journal of Controlled Release*, v. 80, n.1–3, p. 129–44, 2002.

172 KAJIWARA, M.; HARA, K.; TAKATORI, K.; MATSUMOTO, K. Revised structure of a delta-aminolevulinic acid derivative. *Clinical Chemistry*, v. 39, n. 9, p. 1867–1871, 1993. DOI: 10.1093/clinchem/39.9.1867

173 HINES, D. J.; KAPLAN, D. L. Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: Experimental and modeling insights. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 30, n. 3, p. 257–76, 2013.

174 DI MARTINO, A.; PAVELKOVA, A.; POSTNIKOV, P. S.; SEDLARIK, V. Enhancement of 5-

aminolevulinic acid phototoxicity by encapsulation in polysaccharides based nanocomplexes for photodynamic therapy application. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 175, p. 226–234, 2017. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.08.010.

175 PEREIRA, E. D. *et al.* Influence of PLGA and PLGA-PEG on the dissolution profile of oxaliplatin. *Polimeros*, v. 26, n. 2, p. 137–143, 2016.

176 PIERRE, M. B. R.; LOPEZ, R. F. V.; BENTLEY, 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 Sciences*, v. 45, n. 1, p. 109–116, 2009.

177 TAKEUCHI, I.; KAGAWA, A.; MAKINO, K. Skin permeability and transdermal delivery route of 30-nm cyclosporin A-loaded nanoparticles using PLGA-PEG-PLGA triblock copolymer. *Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, v. 600, p. 124866, 2020. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2020.124866

178 TAKEUCHI, I.; SUZUKI, T.; MAKINO, K. Skin permeability and transdermal delivery route of 50-nm indomethacin-loaded PLGA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: biointerfaces*, v. 159, p. 312–317, 2017. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.08.003

179 PATZELT, A. *et al.* Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *Journal of Controlled Release*, v. 150, n. 1, p. 45–48, 2011. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.11.015.

180 ATCC. A-431 (ATCC® CRL-1555™). 1994. Available from: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1555.aspx#generalinformation>. Accessible at: 12 Oct. 2020

181 GIARD, D. J. *et al.* In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 51, n. 5, p. 1417–1423, 1973.

182 THERMO FISHER SCIENTIFIC. Human dermal fibroblasts, neonatal (HDFn) (C-004-5C) Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C0045C#/C0045C>. Accessible at: 19 Oct. 2020.

183 ATCC®. ATCC animal cell culture guide: tips and techniques for continuous cell lines. Available from: www.atcc.org. Accessible at: 12 Oct. 2020.

184 ATCC®. ATCC® primary cell culture guide: tips and techniques for culturing primary cell Available from: www.atcc.org. Accessible at: 12 Oct. 2020

185 RISS, T. L. *et al.* Cell viability assays. In: MARKOSSIAN, S. *et al.*(ed.). Assay guidance manual. Bethesda: Ely Lilly/ National Center for Advancing Translational Sciences, 2004. p. 1–25.

186 ONUKI, J. *et al.* Danos ao DNA promovidos por ácido 5-aminolevulínico: possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em portadores de porfiria aguda intermitente. *Quimica Nova*, v. 25, n. 4, p. 594–608, 2002.

187 HAMBLIN, M. R.; DEMIDOVA, T. N. *Mechanisms of low level light therapy*. 2006. Available from: <https://lifewave.com/Content/images/home/science/pdf/science.pdf>. Accessible at: 20 Oct. 2020.

188 ROSSETTI, F. C.; DEPIERI, L.V.; TEDESCO, A. C.; BENTLEY, M. V. L. B. Fluorometric quantification of protoporphyrin IX in biological skin samples from in vitro penetration/permeation studies. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 46, n. 4, p. 753–760, 2010.

189 GRASEL, F. S. *et al.* Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity of acacia mearnsii proanthocyanidin-loaded plga microparticles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 36, n. 1, p.

239–250, 2019.

190 LIU, G. *et al.* Cytotoxicity study of polyethylene glycol derivatives. *RSC Advances*, v. 7, n. 30, p. 18252–18259, 2017. DOI: [10.1039/C7RA00861A](https://doi.org/10.1039/C7RA00861A).

191 COOPER, G. M. *The cell: a molecular approach*. 2nd ed. Washington: ASM Press, 2000. 689 p.

192 YE, T. L. *et al.* 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy enhance the effect of acitretin on squamous cell carcinoma cells: an in vitro study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 31, p. 1–5, 2020. DOI: [10.1016/j.pdpdt.2020.101887](https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101887).

193 LIU, T. *et al.* Efficacy of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy against keloid compromised by downregulation of SIRT1-SIRT3-SOD2-mROS dependent autophagy pathway. *Redox Biology*, v. 20, p. 195–203, 2019. DOI: [10.1016/j.redox.2018.10.011](https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.10.011)

194 CASAS, A.; FUKUDA, H.; DI VENOSA, G.; BATLLE, A. Photosensitization and mechanism of cytotoxicity induced by the use of ALA derivatives in photodynamic therapy. *British Journal of Cancer*, v. 85, n. 2, p. 279–84, 2001.

195 ZHANG, B.; SAI LUNG, P.; ZHAO, S.; CHU, Z.; CHRZANOWSKI, W.; LI, Q. Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017. DOI: [10.1038/s41598-017-07588-9](https://doi.org/10.1038/s41598-017-07588-9)

196 GADMAR, Ø.B.; MOAN, J.; SCHEIE, E, MA, L.W.; PENG, Q. The stability of 5-aminolevulinic acid in solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 67, n. 3, p. 187–193, 2002.

197 PIETRA, R. C.C. S. *et al.* Evaluation of polymeric PLGA nanoparticles conjugated to curcumin for use in aPDT. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 53, n. 2, p. 1–9, 2017

198 DA SILVA, C. L. *et al.* PLGA nanoparticles as delivery systems for protoporphyrin IX in topical PDT: cutaneous penetration of photosensitizer observed by fluorescence microscopy. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 13, n. 10, p. 6533–6540, 2013.

199 PASSOS, S. K. *et al.* Quantitative approach to skin field cancerization using a nanoencapsulated photodynamic therapy agent: a pilot study. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, v. 6, p. 51–59, 2013. DOI: [10.2147/CCID.S36758](https://doi.org/10.2147/CCID.S36758).

APÊNDICE A - ETAPA 1 - PESQUISA DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO

Principais referências para o nanoencapsulamento do 5-ALA. Tipos de emulsões e resultados para tamanho (DLS) reportados da literatura.

Tabela 20 - Principais referências para o desenvolvimento dos sistemas.

Tipo de emulsão	Ativo encapsulado	Tamanho	Referência
Simples⁸	Ativo lipofílico (óleo essencial)	(189±55) nm	Silva, G.R., 2015 (61)
Dupla⁹	5-ALA	249,5 nm	Shi, L. et al., 2013. (59)
Simples¹⁰	5-ALA	194 a 249,5 nm	Shaker, M.N., et al., 2014 (60)
Simples	PPIX	(280±60,2) nm	Silva, C.L. et al., 2013 (198)
Simples¹¹	Nano-ALA e metil-ALA	210,2 nm	Passos, S.K. et al., 2013 (199)

Fonte: Elaborada pela autora.

⁸ Nanopartículas desenvolvidas com poli(ácido láctico) (PLA).

⁹ PLGA(75:25) e tamanho depois da liofilização.

¹⁰ PLGA (85:15)

¹¹ Polilactídeo-poliglicol e lipídeo lipídios de fosfatidilcolina de ovo (50:50).

Gráficos de análises de estabilidade para os sistemas iniciais para as de síntese dupla emulsão, tensoativo PVA, agitação de 750 rpm (fase interna) e 3000rpm (fase externa), avaliados em duas temperaturas de armazenamento (4°e 23°C), com e sem a encapsulação do ativo (5-ALA).

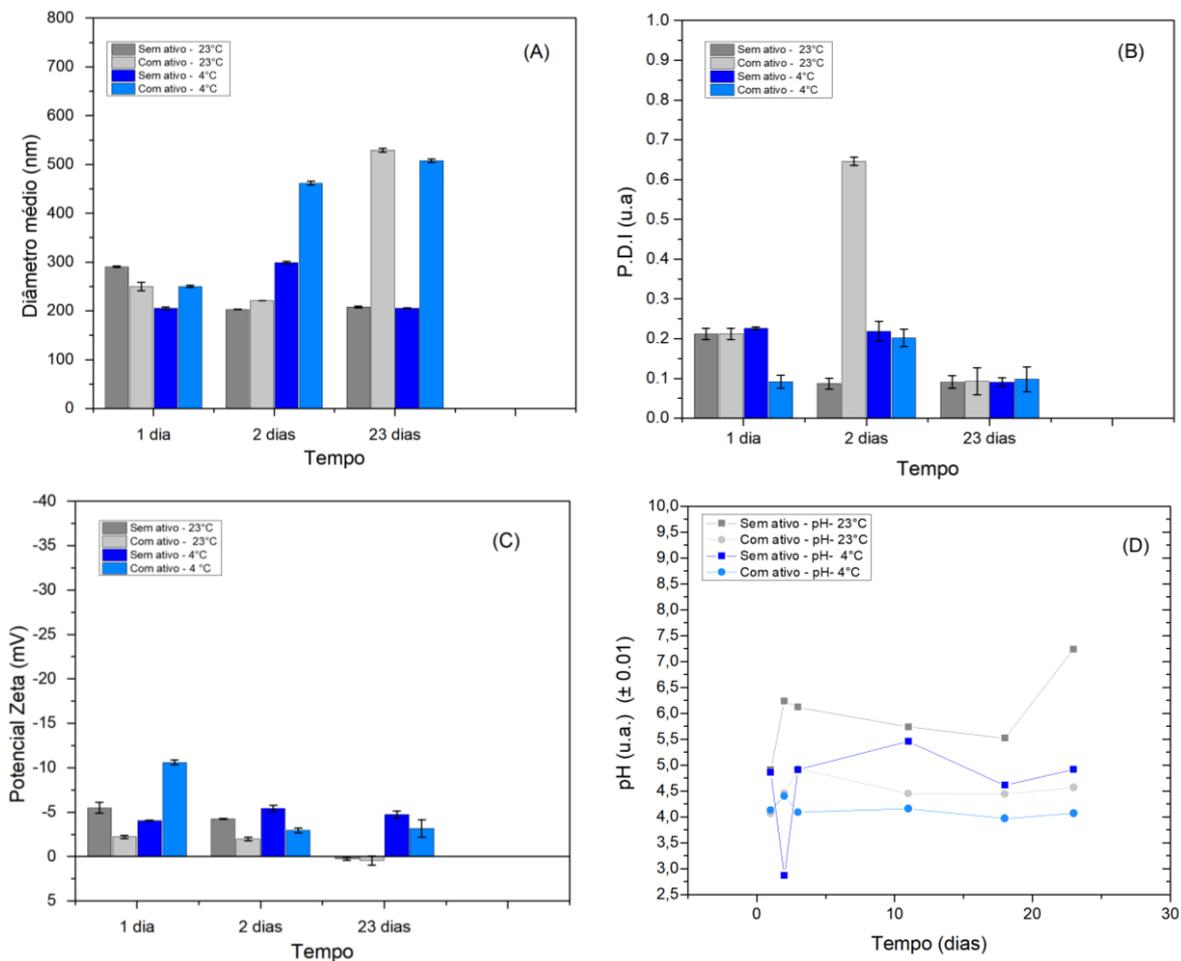


Figura 62 - Os gráficos representam as diferenças no (A) diâmetro médio, (B) PDI, (C) potencial Zeta e (D) pH em função do tempo. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para a velocidade de fase externa de 750 rpm, avaliadas nas temperaturas de 4° e 23°C, entre os dias 1 e 23. A fase tensoativa é formada pelo PVA. Os erros representam os valores do desvio padrão de análises em quintuplicata.

Fonte: Elaborada pela autora.

Síntese simples emulsão, tensoativo PVA, agitação de 1500 rpm, avaliados em uma temperatura de armazenamento (23°C), com e sem a encapsulação do ativo (5-ALA).

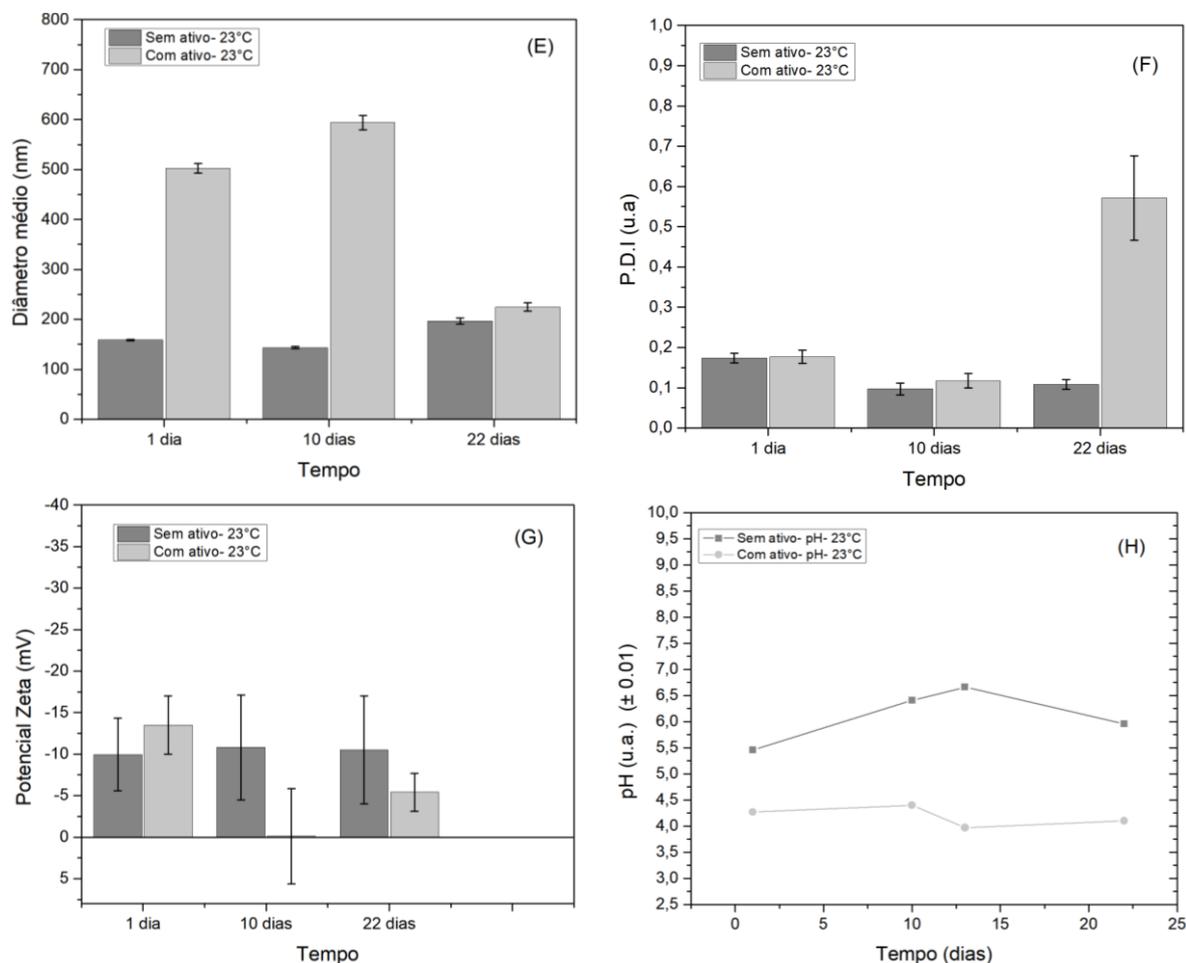


Figura 63 - Os gráficos representam as diferenças no (E) diâmetro médio, (F) PDI, (G) potencial Zeta e (H) pH em função do tempo. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para a velocidade de fase externa de 1500 rpm, avaliadas na temperatura 23°C, entre os dias 1 e 22. A fase tensoativa é formada pelo PVA. Os erros representam os valores do desvio padrão de análises em quintuplicata.

Fonte: Elaborada pela autora.

Teste (19), síntese dupla emulsão, tensoativo PVA, agitação da fase interna de 1500 rpm e da fase externa de 3000 rpm, avaliados em duas temperaturas de armazenamento (4° e 23°C), com e sem a encapsulação do ativo (5-ALA).

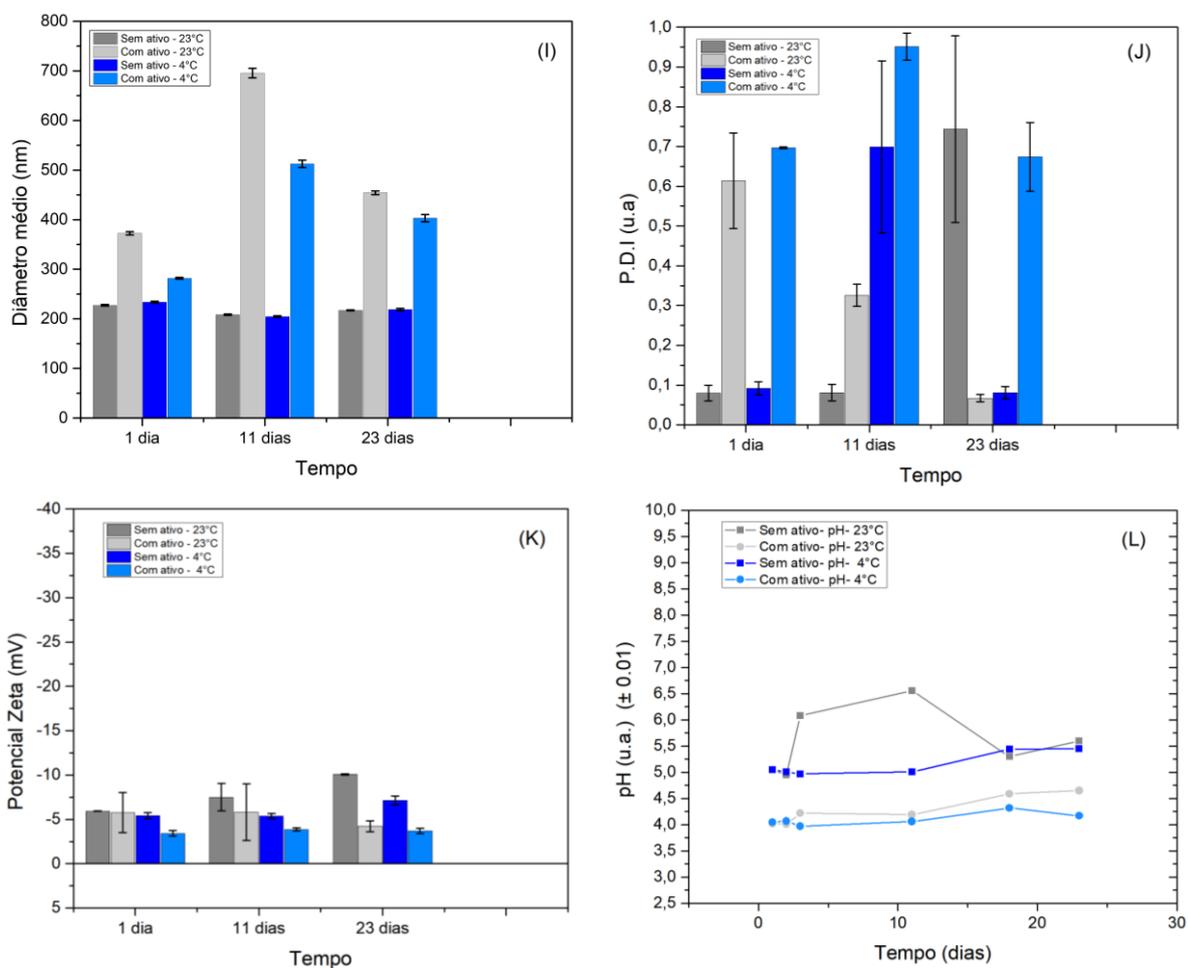


Figura 64 - Os gráficos representam as diferenças no (I) diâmetro médio, (J) PDI, (K) potencial Zeta e (L) pH em função do tempo. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para a velocidade de fase interna de 1500 rpm e fase externa 3000 rpm, avaliadas nas temperaturas de 4° e 23°C, entre os dias 1 e 23. A fase tensoativa é formada pelo PVA. Os erros representam os valores do desvio padrão de análises em quintuplicata.

Fonte: Elaborada pela autora.

Teste (16) e teste (17) tensoativo PEG400 e PVA-PEG, respectivamente, com agitação da fase de 1500 rpm, síntese simples emulsão, avaliados em duas temperaturas de armazenamento (4° e 23°C), com e sem a encapsulação do ativo (5-ALA).

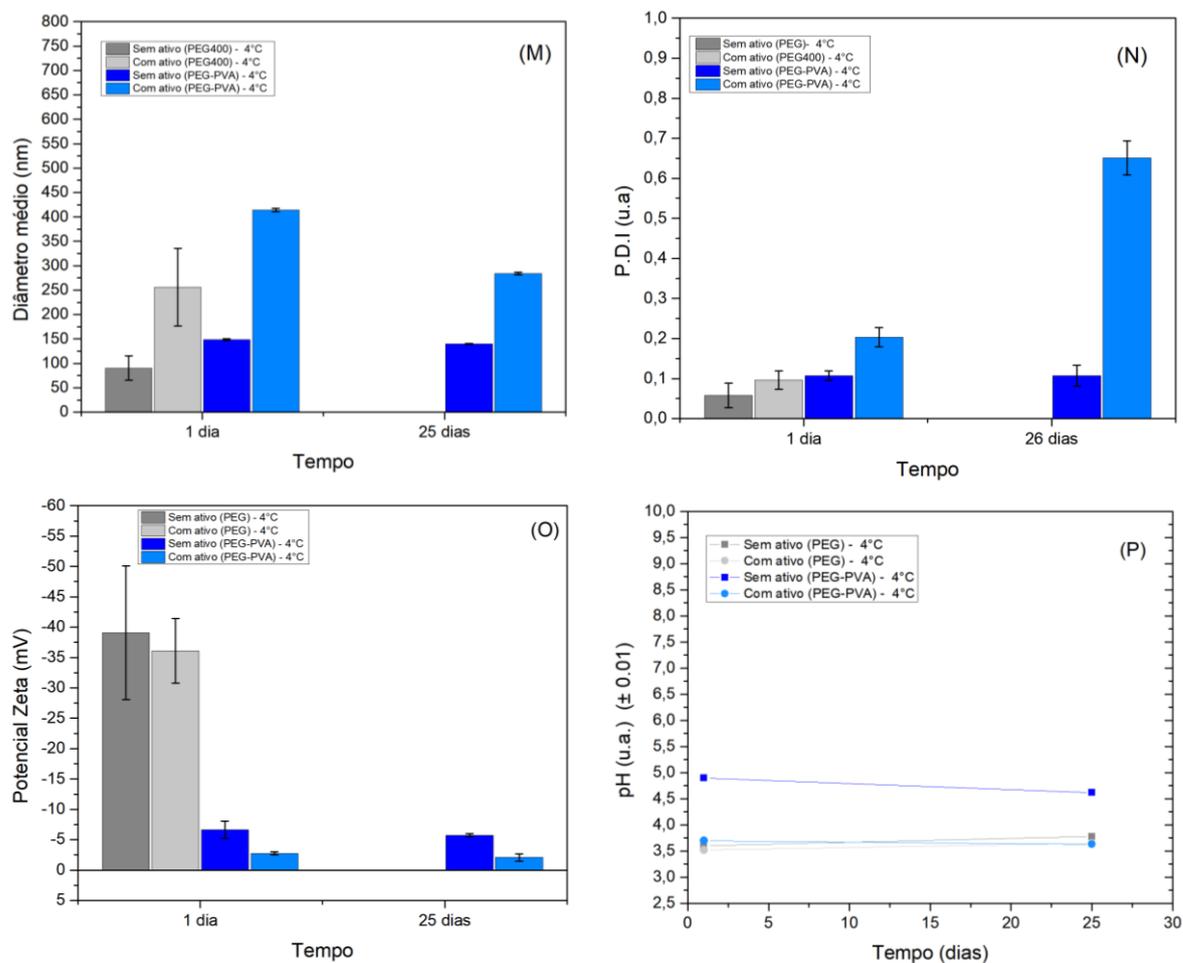


Figura 65 - Os gráficos representam as diferenças no (M) diâmetro médio, (N) PDI, (O) potencial Zeta e (P) pH em função do tempo. Em cada um dos gráficos podemos ver os valores para nanopartículas com e sem ativo, para a velocidade de fase de 1500 rpm e, avaliadas nas temperaturas de 4° e 23°C, entre os dias 1 e 23. A fase tensoativa é formada pela associação física PEG400-PVA e PEG. Os erros representam os valores do desvio padrão de análises em quintuplicata.

Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE B - ETAPA 2 - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÕES PARA OS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS

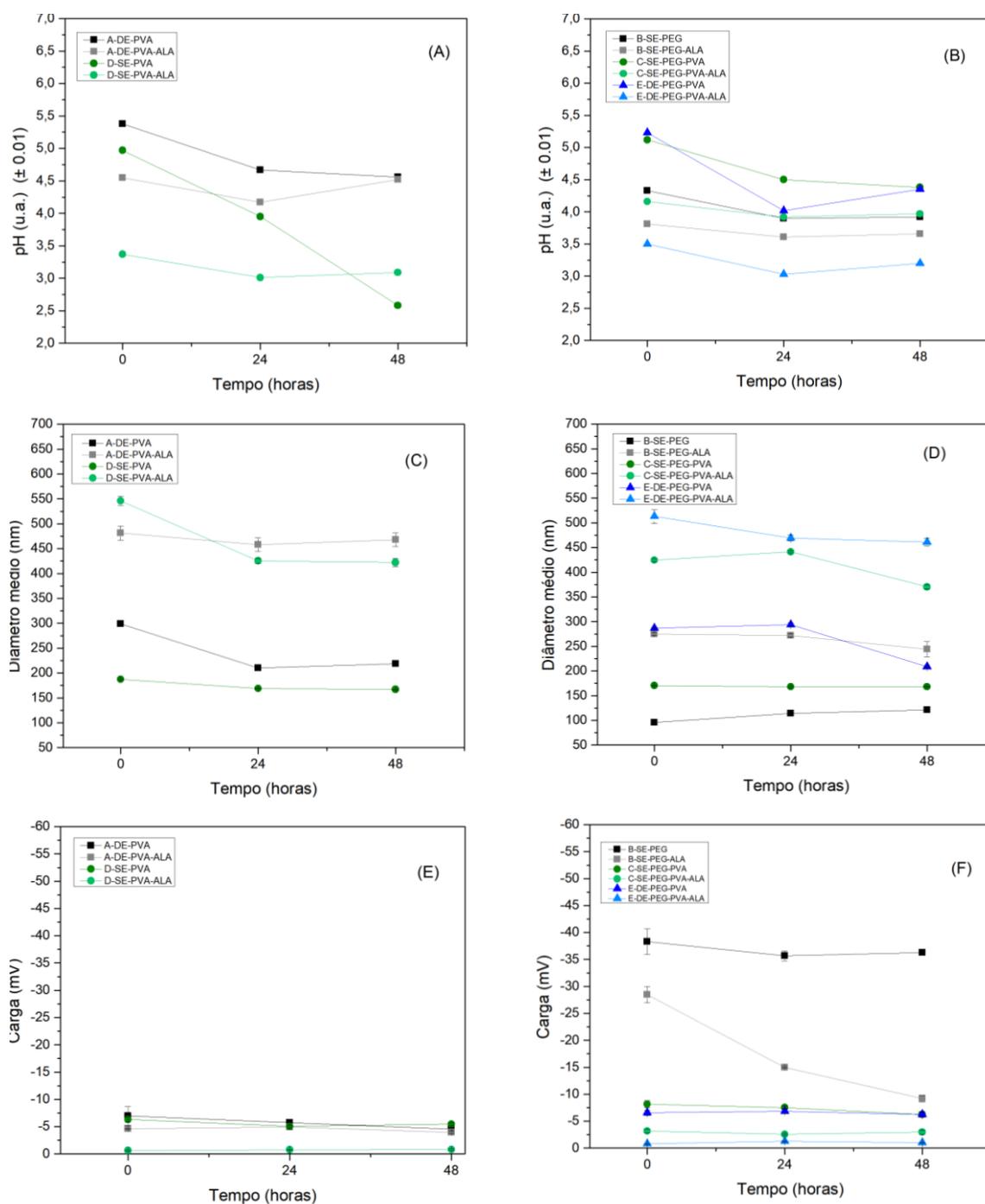


Figura 66 - Teste de estabilidade forçada em função do tempo (56°C) (A) sistemas com PVA como tensoativo para dupla (A-DE-PVA e A-DE-PVA-ALA) e simples (D-SE-PVA e D-SE-PVA-ALA) emulsão e para (B) sistemas com PVA e PEG como tensoativos para dupla (E-DE-PEG-PVA e E-DE-PEG-PVA-ALA) e simples (B-SE-PEG e B-SE-PEG-ALA) e C-SE-PEG-PVA e C-SE-PEG-PVA-ALA).

Fonte: Elaborada pela autora.

Principais grupos atribuídos para as análises de FTIR para as matérias primas (PVA, PLGA, PEG400) e o 5-ALA.

Tabela 21 - Atribuições de FTIR para os principais grupos presentes no 5-ALA.

5-ALA/ Frequência (cm⁻¹)	Grupo funcional
3433.29	v _{as} NH ₂
3008.95	OH--O (dímero)
2621.26	v _{as} CH
1938.46	(Fermi, fotossensibilizador)
1724.36	C=O aminoácido (OH acoplado)
1589.34	NH ₂ (deformação)
1379.10	CN
1222.87	C-OH (deformação antiassimétrica)
1097.50	v CO
1047.35	NH ₂ (deformação)
860.25	NH ₂ (deformação)
775.38	C-Cl
632.65	CH (<i>Wagging</i>)

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 22 - Atribuições de FTIR para os principais grupos presentes no PEG(400). Fonte: Própria autora

PEG/ Frequência (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3352.28	OH
2972.31	v _s CH ₂
2885.96	CH ₂ (<i>biphonic</i>)
1699.29	OH (<i>scissoring bending</i> duas ligações de OH na molécula de água)
1473.62	v _s CH ₂ (<i>trissure</i> no plano)
1350.17	OH (deformação no plano))
1219.01	v _{as} C-O-C
1085.92	C-O-C
947.06	C-C
773.46	C-C

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 23 - Atribuições de FTIR para os principais grupos presentes no PLGA.

PLGA/ Frequência (cm ⁻¹)	Grupo funcional
2997.38	v _s CH
2833.43	v _{as} CH ₃
1761.01	C=O
1427.32	CH ₂ (deformação assimétrica)
1377.17	CH ₃ (deformação antissimétrica)
1132.21	C-O-C (poliéster alifático)
1087.85	C-O-C (poliéster alifático)

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 24 - Atribuições de FTIR para os principais grupos presentes no PVA. Fonte: Própria autora

PVA/ Frequência (cm⁻¹)	Grupo funcional
3140.11	OH (com bandas H)
2933.73	v _{as} CH
2835.36	v _s CH
1714.72	C=O
1105.21	C-O-C (acetal)
1373.32	CH ₃
1238.30	O-C-C
1093.64	C-O-C

Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE C - ANÁLISES COMPARATIVAS DE PREÇO DE CUSTO PARA OS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS

Preço de custo para materiais primas/ insumos farmacêuticos utilizados no escalonamento laboratorial (não inclusa água Milli-Q e cotação para apenas um fornecedor no Brasil). Dados de 26/08/2020, consultados em Sigma Aldrich (<https://www.sigmaldrich.com/brazil.html>), Neon Comercial (<https://www.neoncomercial.com.br/>) e PDT Pharma (<http://www.pdtpharma.com.br/>). (Data de consulta: 26/08/2020).

Tabela 25 - Custo para materiais primas/insumos farmacêuticos utilizados no escalonamento laboratorial (não inclusa água Milli-Q e cotação para apenas um fornecedor no Brasil).

Matéria Prima	Quantidade	Preço (R\$)
PLGA (50:50)	5 g	4286,00
PVA	1 kg	891,00
Kollisolv PEG400 -	1 kg	305,00
Acetona P.A.	1 L	36,16
5-ALA (Sigma-Aldrich)	5 g	7745,00
5-ALA (PDT Pharma)	1 g	850,00

Fonte: Elaborada pela autora.

Cálculo de custo aproximado para cada sistema desenvolvido, para nanopartículas com ativo e volume final de 190 mL (não inclusa água Milli-Q, materiais permanentes e energia elétrica).

Dados baseados na tabela 25.

Tabela 26 - Cálculo de custo aproximado para escalonamento laboratorial (não inclusa água Milli-Q e cotação para apenas um fornecedor no Brasil), para volume final de 190mL, mostrando a diferença de preço com o cálculo do insumo 5-ALA fornecido pela Sigma-Aldrich e pela PDT Pharma.

Nanosistema	Preço de custo (R\$)¹²	Preço de custo (R\$)¹³
A	381,88	322,46
B	380,77	321,35
C	381,38	321,97
D	269,67	269,43
E	210,25	210,02

Fonte: Elaborada pela autora.

¹² Para o insumo 5-ALA (Sigma-Aldrich)

¹³ Para o insumo 5-ALA (PDT Pharma)

APÊNDICE D - ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA DA PPIX EM DMSO

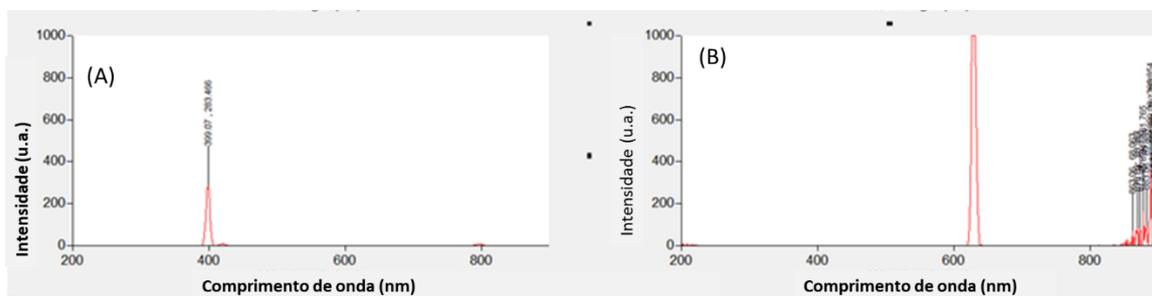


Figura 67 - Espectro de fluorescência da PpIX (A) emissão em 400 nm e excitação em 630 nm. A solução de PpIX foi analisada em DMSO na concentração de 5mg mL^{-1} .

Fonte: Elaborada pela autora.