

Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Cipharma

Efeito da variação de dose e das características de superfície de nanocápsulas sobre suas concentrações plasmáticas e hepáticas por via intravenosa

Mônica Auxiliadora de Paula

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil

2016

Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Cipharma

Efeito da variação de dose e das características de superfície de nanocápsulas sobre suas concentrações plasmáticas e hepáticas por via intravenosa

Linha de Pesquisa: Estudos e Desenvolvimento de Medicamentos
Área de Concentração: Farmacotécnica

Orientadora:

Profa. Dra Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Co-orientadora:

Pós-Dra. Gwenaelle Pound Lana

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil
Janeiro de 2016

P324e

Paula, Monica Auxiliadora de .

Efeito da variação de dose e das características de superfície de nanocápsulas sobre suas concentrações plasmáticas e hepáticas via intravenosa [manuscrito] / Monica Auxiliadora de Paula. - 2016.

102f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Vanessa Carla Furtado Mosqueira.

Coorientador: Gwenaelle Elza Nathalie Pound-Lana.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Quitosana. 2. Ftalocianina. 3. Nanopartículas. I. Mosqueira, Vanessa Carla Furtado. II. Pound-Lana, Gwenaelle Elza Nathalie. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 620.3

Catálogo: www.sisbin.ufop.br

Banca Examinadora da Dissertação intitulada

Efeito da variação de dose e das características de superfície de nanocápsulas sobre suas concentrações plasmáticas e hepáticas por via intravenosa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, CiPharma, da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, em 29 de janeiro de 2016.

Mônica Auxiliadora de Paula – Mestranda

Prof^a. Dr^a. Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Pós-Dr^a. Gwenaelle Pound Lana

Prof^a. Dr^a. Bruna Bueno Postacchini

Prof^a. Dr^a. Elaine Amaral Leite

Local de realização do projeto:

Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia / CiPharma / Escola de Farmácia / UFOP

Laboratório Multiusuário / CiPharma / Escola de Farmácia / Universidade Federal de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia



LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 107ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Mônica Auxiliadora de Paula**, com a defesa da dissertação intitulada: “Efeito da variação de dose e das características de superfície de nanocápsulas sobre suas concentrações plasmáticas e hepáticas via intravenosa”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 29 de janeiro de 2016.

Prof. Dra. Bruna Bueno Postacchini
UFOP

Prof. Dra. Elaine Amaral Leite
UFMG

Dedico esse trabalho...

**... à Santíssima Trindade, que me deu forças para chegar até aqui;
E aos meus pais, meus maiores motivadores.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Prof^a Dr^a Vanessa Carla Furtado Mosqueira, pela oportunidade e confiança.

Ao Vilela, pela atenção e disponibilidade na realização das imagens de Microscopia de Força Atômica.

Ao CNPq, à CAPES, à FAPEMIG (CDS - APQ 01510-14), à Universidade Federal de Ouro Preto e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (Cipharma), pelo auxílio financeiro e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Aos funcionários do Cipharma e da Escola de Farmácia, em especial à Mirela, ao Léo e aos Porteiros, pela boa convivência, amizade, pelos cafezinhos, bate-papos e por torcerem por mim. E em especial à Patrícia Capelari, pela dedicação, confiança, entusiasmo e toda ajuda durante esses 2 anos de trabalho.

Aos funcionários do CCA, em especial Erika e Líliam, pelos “quebra-galhos”.

À Líliam T. Oliveira, por me permitir continuar os estudos iniciados por ela.

Aos colegas da Pós-graduação, Lucas Andrade, Tamires Guedes, Marina, Ritinha, Fernanda Coelho, Dani (amiga desde a graduação), Gleici, Luíza, Deise, Luana, Thaís Paulino, Fernandinha Perasoli, Janine e Walyson, por compartilharem bons momentos; alguns de vocês sempre me ouvindo e permitindo-me também compartilhar os momentos de dor pelos quais tive que passar. De forma especial, quero agradecer à Janine, Walyson e à Fernandinha, pelas valiosas ajudas nos experimentos com os animais e por terem se tornado meus grandes amigos; sem vocês teria sido muito difícil; muito obrigada pela presença e apoio constantes, principalmente nos momentos mais complicados! A você também Dani! Pelas ajudas com o prisma e por sempre me ouvir!

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia (Giani, Polly, Lorens, Jéssica, Aniely, Anelise, Muti, Samantha, Pri, Carlos Henrique, Izabelê, Douglas, Kelly, Carlos Melo e Analia) pela convivência; em especial à Carina, à Gwen, ao Luan e ao Elton. Carina, obrigada por me surpreender com sua amizade, por estar sempre pronta para me ajudar e aconselhar, e por ser a grande motivadora de parte desse trabalho. Luan, obrigada por toda boa vontade e

disponibilidade em me ajudar, de forma tão gratuita! Gwen, meu anjo da guarda, agradeço por tudo! Por toda doação do seu tempo, em todas as conversas formais e informais, e principalmente por me ajudar a desvendar os “segredos” do AF4. Elton, obrigada por me encorajar e por ter sido tão solícito quando mais precisei e mal nos conhecíamos.

Aos meus ICs, Daline e Gabriel Lourenço, por todo auxílio e dedicação.

Agradeço também ao Bruno e ao Vitório, alunos da professora Dênia, por terem sido extremamente prestativos quando eu mais precisei.

Aos meus pais, pelo exemplo de vida e por todo apoio, em todas as minhas necessidades.

Aos meus irmãos, por acreditarem em mim, e a minha linda sobrinha, por dar mais alegria aos meus dias.

Ao Túlio, por todo amor, paciência e zelo; com seu apoio, sempre presente nos momentos mais difíceis. Obrigada por tornar mais leve essa caminhada! Obrigada por se dispor a se tornar um “engenheiro com especialização em fármacos” ao me ajudar nos experimentos mais complicados.

À minha sogra e ao meu sogro, agradeço pelo amor, confiança e orações.

Aos tios e tias, especialmente Tio Juarez e tia Do, pelas suas valiosas orações e por acreditarem em mim.

Aos amigos de graduação e indústria, especialmente Borrela, minha amiga-irmã Raquelzinha, Ludi, Mairão, Boguinha, Pitel, Flavão, Day, Ju Dalila, Ju Ribas, Marcos, Watson, Débora, Jeaninha, Jacque, Tarita, Saminha, Aline Madalena, Carla, Gleybiane, Aline Andrade e a Nayarinha, a todos vocês obrigada pela torcida e às meninas do trabalho pelas orações.

Sobretudo, agradeço a Deus! Meu Pai e Criador, que nunca deixou de me amparar, sempre me mostrando “as pegadas na areia”!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos”. (Isaac Newton)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rota dos carreadores poliméricos de fármacos no corpo humano.....	22
Figura 2: Ilustração esquemática dos métodos de preparação de NP poliméricas a partir de polímeros sintéticos.....	22
Figura 3: Representação esquemática do processo de formação de NC descrito por Fessi e colaboradores (1989)	26
Figura 4: Esquema da síntese do PLA.	27
Figura 5: Representação esquemática da estrutura química do polímero dibloco monometoxi-PEG-PLA.....	28
Figura 6: Representação esquemática da estrutura química do polietilenoglicol	28
Figura 7: Representação esquemática da unidade repetitiva comum à quitina e à quitosana.	29
Figura 8: Esquema de um vaso sanguíneo presente em um tecido lesado, ilustrando a importância do tamanho da partícula na liberação de fármacos nesses locais.	32
Figura 9: Ilustração esquemática do efeito de permeação e retenção aumentada, EPR, modulando a entrega passiva e ativa de fármacos nanocarreados.	33
Figura 10: Nanopartículas com superfícies diferenciadas e o efeito do tipo de superfície sobre a ligação de proteínas plasmáticas e a biodistribuição.....	34
Figura 11: Representação esquemática das configurações de PEG na superfície de uma NP polimérica.	35
Figura 12: Estrutura química da AICIPc.....	37
Figura 13: Ilustração de um canal de separação em um equipamento de fracionamento por fluxo em campo de fluxo assimétrico.....	40
Figura 14: Representação esquemática das etapas da preparação das nanopartículas (NP).	45
Figura 15: Representação esquemática das dosagens de AICIPc realizadas nas formulações de NP para determinação da porcentagem de encapsulação e eficiência de encapsulação.	53
Figura 16: Representação esquemática da estrutura e constituição das nanopartículas.	62
Figura 17: Fractogramas de todas as 5 formulações caracterizadas por AF4 com detecção em linha por UV, MALLS e EDL.	68
Figura 18: Relação do Rg/Rh em função do Rg calculada para todas as 5 formulações... ..	72
Figura 19: Fotos do ultrafiltrado das formulações de NC PLAPEG (a) e NC PLA (b) para ilustração do procedimento.....	77

Figura 20: Efeito das doses de polímeros de nanocápsulas com diferentes características superficiais, administradas por via intravenosa, sobre suas concentrações plasmáticas e hepáticas 20 minutos após injeção em camundongos.....	79
Figura 21: Efeito da dose de quitosana nas formulações de nanocápsulas de PLA, administradas por via intravenosa, sobre as concentrações plasmáticas e hepáticas dessas formulações 20 minutos após injeção em camundongos.....	82
Figura 22: Foto do sangue coletado e centrifugado imediatamente após o animal ter recebido uma dose de 160 mg/kg da formulação de NC PLAQUI 0,1%. É notória a hemólise ocasionada pela formulação. O animal foi a óbito logo após a administração.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos constituintes e suas quantidades necessárias ao preparo das diferentes formulações.....	46
Tabela 2: Métodos de fracionamento das NP.....	50
Tabela 3: Divisão dos grupos de animais e doses avaliadas para cada formulação.....	55
Tabela 4: Volumes e soluções utilizadas para preparar os padrões de calibração para quantificação de AICIPc em plasma de camundongos	57
Tabela 5: Volumes e soluções utilizadas para preparar os padrões de calibração para quantificação de AICIPc em fígado de camundongos.....	59
Tabela 6: Caracterização da carga de superfície das formulações em estudo	62
Tabela 7: Diâmetro hidrodinâmico (D_h) e índice de polidispersão (IP) das formulações em estudo ...	65
Tabela 8: Caracterização das diferentes formulações de NC e NE por AF4 acoplada a MALLS e EDL	73
Tabela 9: Porcentagem de encapsulação e eficiência de encapsulação da AICIPc nas formulações de NC PLA; NC PLAPEG; NE; NC PLAQUI 0,1% e NC PLAQUI 0,25%, utilizadas nos estudos <i>in vivo</i> .	76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AF4 - Fracionamento em campo de fluxo assimétrico “*Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation*”

AICIPc - Ftalocianina de Cloro e Alumínio

ANOVA - Análise de Variância

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

D_h - Diâmetro Hidrodinâmico

DMF - Dimetilformamida

DP - Desvio Padrão

ECF - Espectroscopia de Correlação de Fótons ou “*photon correlation spectroscopy*”

EDL - Espalhamento Dinâmico da Luz ou “*dynamic light scattering*”

EEL - Espalhamento Estático da Luz ou “*static light scattering*”

E_m - Emissão

EU - Unidades de Emissão

E_x - Excitação

g - Aceleração da Gravidade

kDa - kiloDaltons

kHz - kiloHertz

M - Molar (mol/L)

MALLS - Multi Angle Laser Light Scattering

MeOH - Metanol

MFA - Microscopia de Força Atômica

NC - Nanocápsulas

NE - Nanoemulsões

NS - Nanoesferas

nm - nanômetros

NP - Nanopartículas

PdI - Índice de polidispersão

PI - Padrão Interno

PLA - Ácido poli (*D,L*-láctico)

PLA-PEG - Ácido Polilático-co-polietilenoglicol

PM - Peso Molecular

PVDF - Fluoreto de Polivinilideno

QUI - Quitosana

rpm - rotações por minuto

SFM - Sistema Fagocitário Mononuclear

UV - Ultravioleta

ZnPc - Ftalocianina de Zinco

ζ - Potencial Zeta

\pm - mais ou menos

[] - concentração

RESUMO

A aplicação de nanopartículas como carreadores de fármacos para o tratamento de diversas patologias tem se mostrado extremamente promissora, mas ainda encontra grandes desafios relacionados ao estabelecimento de esquemas posológicos seguros. Diferentes formulações de nanopartículas (NP), encapsuladas com o marcador fluorescente ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc) foram obtidas pelo método de nanoprecipitação: nanocápsulas (NC) de ácido polilático (NC PLA), NC de ácido polilático em bloco com o polietilenoglicol (NC PLAPEG) e NC PLA revestidas de quitosana em duas concentrações distintas (NC PLAQUI 0,1% e NC PLAQUI 0,25% p/v), além de uma nanoemulsão equivalente à NC PLA, exceto na presença da parede polimérica. Todas foram caracterizadas quanto as suas propriedades físico-químicas. O tamanho e índice de polidispersão foram determinados em batelada por espalhamento dinâmico de luz e após fracionamento em sistema de fracionamento por campo de fluxo assimétrico acoplado a detectores de espalhamento dinâmico de luz e espalhamento de luz em multiângulos. Desse modo foi possível também determinar o fator de forma das NP pela relação entre o raio de giração/raio hidrodinâmico. A carga de superfície foi determinada por anemometria do laser Doppler. Todas as formulações apresentaram-se monodispersas, com o diâmetro hidrodinâmico entre 133 a 297 nm e potencial zeta positivo para as formulações com quitosana (+26 mV) e negativo para as demais (entre -35 e -44 mV). Os resultados para o fator de forma próximos a 1,0 confirmaram a estrutura vesicular das nanopartículas em todas as formulações. Estudos *in vivo* foram conduzidos com o objetivo de avaliar o impacto das características de superfície das partículas, bem como das doses crescentes de polímero, sobre a biodistribuição e a capacidade de saturação do sistema fagocitário mononuclear (SFM), em camundongos, pela via intravenosa. O estudo *in vivo* mostrou que a superfície das partículas tem uma maior influência no modo como elas se distribuem pelo organismo que o tamanho. Além disso, esse estudo evidencia a possibilidade de elevadas doses de partículas saturarem o SFM, uma vez que para todas as formulações, com o aumento da dose injetada, houve uma diminuição da porcentagem da dose encontrada no fígado.

Palavras Chave: nanocápsulas poliméricas, quitosana, ftalocianina, biodistribuição, fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4), dose polimérica, superfície de nanopartículas

ABSTRACT

The application of nanoparticles as drug carriers for the treatment of various pathologies has been extremely promising, but still faces major challenges related to the definition of safe dosage schedules. Different nanoparticle formulations (NP), encapsulating the fluorescence marker chloro-aluminum phthalocyanine (AlClPc) were obtained by the nanoprecipitation method, namely, nanocapsules (NC) of polylactic acid (NC PLA), NC of polylactic acid-*block*-polyethylene glycol NC PLAPEG) and NC PLA coated with chitosan at two different concentrations (NC PLAQUI 0.1% and NC PLAQUI 0.25% w/v), and a nanoemulsion deferring only from NC PLA by the absence of a polymer wall. All were characterized for their physicochemical properties. The particle size and polydispersity index were determined in batch by dynamic light scattering and after fractionation under asymmetric flow field fractionation coupled to dynamic light scattering and multi-angle scattering detectors. In this manner, it was also possible to determine the NP form factor by the ratio of the gyration radius by the hydrodynamic radius. The surface charge was determined by Doppler laser anemometry. All formulations were monodisperse, with a hydrodynamic diameter between 133 and 297 nm and positive zeta potential for the chitosan formulations (+26 mV) and negative for all others (between -35 and -44 mV). The results for the form factor, close to 1.0, confirmed the vesicular structure of the nanoparticles in all formulations. *In vivo* studies were conducted with the objective of evaluating the impact of particle surface characteristics, as well as increasing the polymer dose, on the biodistribution and saturation capacity of the mononuclear phagocytic system (MFS) in mice, intravenously. The *in vivo* study showed that the surface of the particles has a greater influence than their size on how they are distributed in the body. Moreover, this study evidences the possibility of high doses of particles saturating the SFM, since for all the formulations there was a decrease in the percentage of the dose found in the liver with an increase in injected dose.

Keywords: polymer nanocapsules, chitosan, phthalocyanine, biodistribution, asymmetric flow field fractionation (AF4), polymer dose, nanoparticle surface.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Revisão da Literatura.....	21
<i>1.1.1. Aspectos gerais da vetorização de fármacos: surgimento, importância biofarmacêutica e aplicações</i>	<i>21</i>
1.1.2. Sistemas nanoparticulados poliméricos.....	23
1.1.3. Biodistribuição e eliminação das nanopartículas administradas pela via intravenosa	30
1.1.3.1. Efeito do tamanho.....	31
1.1.3.2. Efeito das propriedades de superfície.....	33
1.1.3.3. Efeito da forma das partículas.....	36
1.1.4. Marcação fluorescente de nanocápsulas com ftalocianina de cloro e alumínio. 36	
1.1.5. Técnicas de caracterização de nanopartículas	38
1.1.5.1. Espalhamento dinâmico da luz	38
1.1.5.2. Espalhamento estático da luz laser com detecção multiângulo.....	38
1.1.5.3. Fracionamento por fluxo em campo de fluxo assimétrico.....	39
1.1.5.4. Potencial Zeta.....	42
2. OBJETIVO GERAL	43
2.1. Objetivos Específicos.....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. Material	44
3.2. Métodos.....	44
3.2.1. Preparo das Nanocápsulas	44
3.2.2. Caracterização físico-química das nanopartículas.....	48
3.2.2.1. Determinação do tamanho e do índice de polidispersão por EDL	48
3.2.2.2. Determinação da carga de superfície (potencial zeta).....	49
3.2.2.3. Caracterização de tamanho e forma por fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4).....	49

3.2.2.4. <i>Determinação da porcentagem e eficiência de encapsulação do marcador fluorescente nas formulações</i>	52
3.2.2.4.1. <i>Condições de quantificação da AICIPc por CLAE</i>	52
3.2.2.4.2. <i>Preparo das amostras</i>	52
3.2.3. <i>Determinação das concentrações plasmáticas e hepáticas de AICIPc</i>	54
3.2.3.1. <i>Animais</i>	54
3.2.3.2. <i>Delineamento Experimental</i>	55
3.2.3.3. <i>Método cromatográfico bioanalítico para quantificação da AICIPc em amostras de plasma e fígado</i>	56
3.2.3.4. <i>Extração e quantificação da AICIPc das amostras de plasma</i>	57
3.2.3.5. <i>Extração e quantificação da AICIPc das amostras de fígado</i>	58
3.2.3.6. <i>Análise estatística</i>	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1. Preparo das nanocápsulas	61
4.2. Caracterização físico-química das nanocápsulas	62
4.2.1. <i>Determinação da carga de superfície (potencial zeta)</i>	62
4.2.2. <i>Determinação do tamanho e do índice de polidispersão por EDL</i>	64
4.2.3. <i>Caracterização de tamanho e forma após fracionamento por fluxo em campo de fluxo assimétrico</i>	66
4.2.4. <i>Determinação da porcentagem e eficiência de encapsulação do marcador fluorescente</i>	75
4.3. Estudo de Biodistribuição das nanopartículas	79
5. CONCLUSÃO	87
6. REFERÊNCIAS	89

1. INTRODUÇÃO

O uso de nanotecnologias na área biomédica é de grande relevância e oferece muitas perspectivas, seja para o desenvolvimento de materiais de implantes; de regeneração tecidual (ZHANG; WEBSTER, 2009); para utilização em produtos para diagnóstico e imagem, os quais permitem aumentar a resolução de algumas técnicas e detectar precocemente tecidos lesados e principalmente pelo desenvolvimento de novas alternativas farmacêuticas (ETHERIDGE et al., 2013; PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012; SCHÄDLICH et al., 2011). Nesse sentido, muita atenção tem sido dada ao desenvolvimento de sistemas nanoparticulados de liberação de fármacos (WEISS et al., 2012) ou nanocarreadores, os quais possuem grandes vantagens terapêuticas em relação aos medicamentos convencionais. Eles permitem a manutenção de concentrações mais sustentadas do fármaco e, em alguns casos, apresentam maior eficácia por possuírem maior seletividade por tecidos específicos (por exemplo, tecidos tumorais) (MOHANRAJ; CHEN, 2006). Os nanocarreadores possibilitam, em alguns casos, a redução das doses administradas, minimizando os eventos adversos relacionados aos esquemas posológicos e/ou à via de administração utilizada (EHRHART; MINGOTAUD; VIOLLEAU, 2011) e favorecendo, portanto, a adesão do paciente ao tratamento. Além disso, podem veicular princípios ativos tanto hidro quanto lipofílicos, garantem a estabilidade de uma variedade de agentes terapêuticos como peptídeos e oligonucleotídeos (MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010) e melhoram também a biodisponibilidade oral de fármacos de baixa solubilidade e baixa permeabilidade (CAI et al., 2010).

Para o uso seguro e eficaz desses nanocarreadores, principalmente por via intravenosa, é necessário o conhecimento de suas características físico-químicas, as quais influenciam muito suas propriedades biológicas. Assim, o tamanho, o índice de polidispersão, a carga de superfície estimada por meio do potencial zeta, bem como a morfologia das partículas, devem ser minuciosamente avaliados (SINGH; LILLARD, 2009), pois podem afetar as vias de captação celular para os diversos nanocarreadores (poliméricos, lipídicos ou metálicos), uma vez que influenciam na adesão e no modo de interação destes com as células (BEIJA et al., 2012; HE et al., 2010; LI et al., 2013). O tamanho em torno de 30 a 200 nm é fator determinante para a permanência prolongada das nanopartículas na circulação sanguínea sem que

sejam rapidamente fagocitadas pelas células do sistema imune (mais especificamente do sistema fagocitário mononuclear - SFM), no caso de partículas maiores, ou eliminadas pela depuração renal (partículas em torno de 20 nm). Desta maneira o tamanho do nanocarreador tem grande relevância na biodistribuição plasmática e tecidual (AUGSTEN et al., 2008; GAUMET et al., 2008).

Existem várias técnicas de avaliação dos parâmetros mencionados anteriormente, porém cada uma apresenta suas vantagens e limitações. A mais utilizada delas é a espectroscopia de correlação de fótons, também denominada espalhamento dinâmico da luz (EDL) (*Dynamic Light Scattering*). É uma técnica simples, rápida e que permite determinar o tamanho das partículas em uma dispersão aquosa. No entanto, a análise dos resultados é limitada quando se trata de amostras complexas, heterogêneas e polidispersas (com uma ampla faixa de distribuição de tamanho). A técnica de espalhamento estático da luz (EEL) (*Static Light Scattering* – SLS) ou na sua forma mais avançada de análise, em multiângulo (*Multi-angle Laser Light Scattering* – MALLS), pode fornecer também informações adicionais sobre o estado de agregação e sobre o formato da partícula. Porém, possui as mesmas limitações que o EDL tratando-se de amostras polidispersas. As técnicas microscópicas (Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV, Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET – e Microscopia de Força Atômica – MFA) são de grande utilidade para determinar o tamanho geométrico, o formato da partícula e também sua estrutura interna no caso do MET. Contudo elas possuem alguns artefatos no preparo de amostras, que podem sofrer alterações durante a passagem do feixe eletrônico. As análises são realizadas geralmente no estado seco, o que pode influenciar a morfologia e o tamanho das partículas, diferindo da sua forma em solução (EHRHART; MINGOTAUD; VIOLLEAU, 2011).

Uma nova abordagem para a caracterização físico-química de suspensões coloidais, denominada fracionamento por fluxo em campo de fluxo assimétrico (*Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation* – AF4), tem sido empregada com sucesso para diversos sistemas (HAWE et al., 2012). A amostra é injetada em um canal de separação, onde as partículas são fracionadas e eluídas em função de seus respectivos coeficientes de difusão. Dessa forma, o diâmetro hidrodinâmico das mesmas pode ser obtido diretamente dos seus tempos de retenção (RUNYON; ULMIUS; NILSSON, 2014). Além disso, uma vez que o equipamento pode ser

acoplado a diversos detectores (como EDL, EEL, de absorção ultravioleta, de fluorescência, entre outros), o AF4 possibilita determinar, com uma maior precisão, não só o tamanho, mas também outros parâmetros como o formato e a massa absoluta das partículas; permite, assim, o estudo de amostras mais complexas e é aplicável a uma ampla faixa de tamanho, entre aproximadamente 2 nm e 50 μm (YOHANNES et al., 2011).

Após completa caracterização físico-química das formulações de nanocarreadores, é importante avaliar o efeito *in vivo* das suas características de superfície, como, por exemplo, composição química e carga. Um estudo da dose polimérica que pode ser administrada com segurança sem afetar a homeostase do organismo também deve ser realizado, pois, juntos, esses dois fatores podem interferir na farmacocinética e na biodistribuição das nanopartículas. Assim, estudos de eficácia de fármacos associados a nanocarreadores poderão ser realizados, utilizando-se doses seguras contendo nanoestruturas poliméricas. Nesse sentido, poucos são os estudos *in vivo* que demonstram a relação da dose polimérica ou de partículas com a extensão da biodistribuição das mesmas (ALLEN; HANSEN, 1991; OJA et al., 1996; PANAGI et al., 2001) e nenhum deles avalia nanopartículas de ácido polilático (PLA), ácido polilático em bloco com o polietilenoglicol (PLAPEG) e de ácido polilático revestido de quitosana (PLAQUI), as quais são nosso foco de estudo. Portanto, o presente trabalho se destinou a avaliar o impacto das características de superfície das nanopartículas sobre os níveis plasmáticos das mesmas, bem como o efeito das doses administradas sobre a capacidade de saturação do SFM.

1.1. Revisão da Literatura

1.1.1. Aspectos gerais da vetorização de fármacos: surgimento, importância biofarmacêutica e aplicações

A eficácia e a segurança das terapias medicamentosas convencionais, destinadas à profilaxia ou à cura das doenças, dependem de inúmeros fatores, complexos e interconectados. As características intrínsecas dos fármacos, tais como a seletividade por determinados receptores e suas propriedades físico-químicas (o peso molecular, a estrutura química, o pKa, a solubilidade nos fluidos biológicos, a capacidade de permear através de membranas biológicas e a extensão de ligação à proteínas plasmáticas), têm grande importância na velocidade e na extensão com que eles se distribuem pelo organismo (MURO, 2012); influenciam também na forma de tratamento, na via de administração, no regime de doses e no sucesso da resposta terapêutica. Até hoje, uma das principais limitações dos muitos medicamentos disponíveis é a falta de especificidade pelo tecido afetado. Tipicamente, apenas 1% da dose administrada atinge as células de interesse, enquanto o restante é distribuído por todo o corpo. Aproximadamente, metade de todos os novos fármacos é insolúvel ou fracamente solúvel em água; o que requer a aplicação de altas doses, para atingir uma concentração satisfatória no local de ação, aumentando a chance de efeitos adversos (GRAZÚ; MOROS; SÁNCHEZ-ESPINEL, 2012). A vetorização de fármacos, que é a associação de uma molécula ativa a um vetor, ou carreador, exerce, de certa forma, o direcionamento de fármacos, “*drug targeting*”. É uma ferramenta alternativa aos inconvenientes acima mencionados, na qual as propriedades físico-químicas do vetor (ou carreador) passam a orientar a distribuição do fármaco pelo organismo (Figura 1).

O conceito de “direcionamento de fármacos”, acúmulo do fármaco predominantemente na região de interesse, de forma independente do método e da via de administração utilizada (TORCHILIN, 2000), se originou da teoria da “*magic bullets*” primeiramente imaginada por Paul Erlich, o pai da quimioterapia (CHUAIRE; CEDIEL, 2008), em 1906 (GRAZÚ; MOROS; SÁNCHEZ-ESPINEL, 2012). Ele pensou em uma entidade composta de um agente terapêutico ligado a um componente capaz de reconhecer e ligar-se ao alvo da doença, proporcionando o transporte preciso do fármaco (MURO, 2012; TORCHILIN, 2000). De lá até hoje

muitos esforços têm sido aplicados no desenvolvimento de materiais e sistemas capazes de entregar fármacos de forma específica aos locais de ação, aumentando a eficácia terapêutica e reduzindo os seus efeitos adversos.

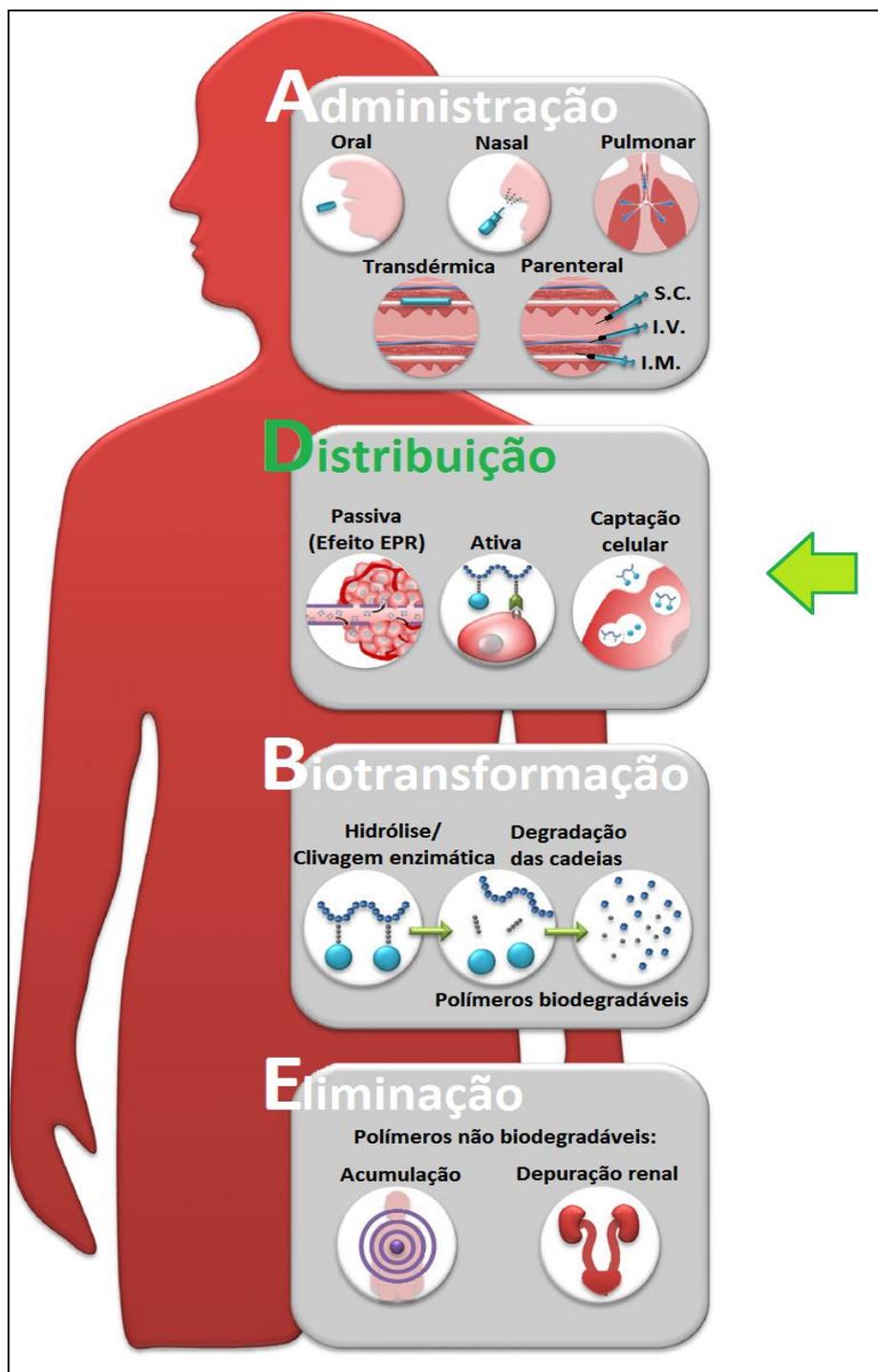


Figura 1: Rota dos carreadores poliméricos de fármacos no corpo humano. Administração por diferentes vias → Distribuição (onde atuam de forma particular frente à administração intravenosa) → Metabolização e Eliminação por diferentes vias. **Redesenhado e adaptado de:** MARKOVSKY et al., 2012.

Os rápidos avanços na biologia molecular, química, física, farmácia e o advento da nanotecnologia, possibilitaram a criação dos sistemas de liberação de fármacos nanoestruturados com amplas aplicações (MOSTAFAVI; BABU, 2013): para o tratamento do câncer (MISRA; ACHARYA; SAHOO, 2010), de doenças parasitárias (FRÉZARD; DEMICHELI, 2010; MOSQUEIRA et al., 2006), para terapia gênica (DAVIS, 2009), como agentes de diagnósticos por imagem (PEREIRA et al., 2009), entre outras. Na entrega ao alvo, eles podem atuar de forma passiva (explorando apenas suas características físico-químicas e a fisiologia dos tecidos alvo) ou ativa (a partir da modificação da superfície desses vetores pela conjugação de ligantes - proteínas, peptídeos, glicolipídeos, polissacarídeos, anticorpos monoclonais e aptâmeros - com reconhecimento específico pelos sítios alvo) (MOSTAFAVI; BABU, 2013). De acordo com a natureza dos materiais que os compõem são classificados em: lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, dendrímeros, micelas poliméricas, nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono, polímerosossomos, nanoemulsões e nanopartículas poliméricas, as quais oferecem vantagens sobre os demais sistemas. Possuem capacidade de atingir tumores de forma passiva, são susceptíveis a endocitose e carregam diversos tipos de moléculas com diferentes eficiências de encapsulação e, em alguns vetores, com liberação modificada dos ativos (FARAJI; WIPF, 2009; HE et al., 2010).

1.1.2. Sistemas nanoparticulados poliméricos

Nanopartículas poliméricas (NP) são definidas como dispersões particuladas na faixa de 10-1000 nm, preparadas a partir de polímeros biodegradáveis e/ou biocompatíveis, naturais ou sintéticos, e que são de grande interesse por serem estáveis, apresentarem distribuição de tamanho bem definida e liberação controlada das várias substâncias que carregam. Podem carrear moléculas grandes ou pequenas, hidrofílicas ou hidrofóbicas (NAGAVARMA et al., 2012). Estes sistemas têm grande estabilidade comparada aos demais nanocarreadores de natureza lipídica como os lipossomas. Além disso, a possibilidade de uso de polímeros biodegradáveis, que degradam em pequenos metabólitos que podem ser eliminados facilmente pelo corpo, é tão importante quanto à habilidade em formar partículas (MORACHIS; MAHMOUD; ALMUTAIRI, 2012).

O termo nanopartícula polimérica é um nome geral para dois tipos de carreadores de fármacos contendo polímeros em sua estrutura: nanoesferas (NS) e nanocápsulas (NC). O primeiro consiste de uma estrutura matricial, isto é, homogênea, na qual o fármaco pode estar adsorvido na superfície ou disperso no interior da matriz polimérica (RAO; GECKELER, 2011). As NC diferem das NS, uma vez que elas possuem a forma de reservatório, nas quais uma parede polimérica envolve o núcleo, que pode ser líquido, semi-sólido ou sólido à temperatura ambiente (15-25 °C). Nas NC, o fármaco pode estar dissolvido no interior do núcleo ou adsorvido na parede externa (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). As primeiras formulações de NC eram compostas de um núcleo oleoso, permitindo uma elevada taxa de encapsulação de substâncias altamente lipofílicas. Recentemente, NC de núcleo aquoso (BILATI; ALLÉMANN; DOELKER, 2005; VRIGNAUD; BENOIT; SAULNIER, 2011), aptas a encapsular compostos hidrofílicos, foram também desenvolvidas (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

Muitos procedimentos têm sido estabelecidos para preparar NP poliméricas. Geralmente eles são classificados em duas categorias principais: se a formação da partícula ocorre a partir de reações de polimerização de monômeros, ou se as partículas são formadas por meio da dispersão de polímeros pré-formados (Figura 2) (PINTO REIS et al., 2006; SOPPIMATH et al., 2001).

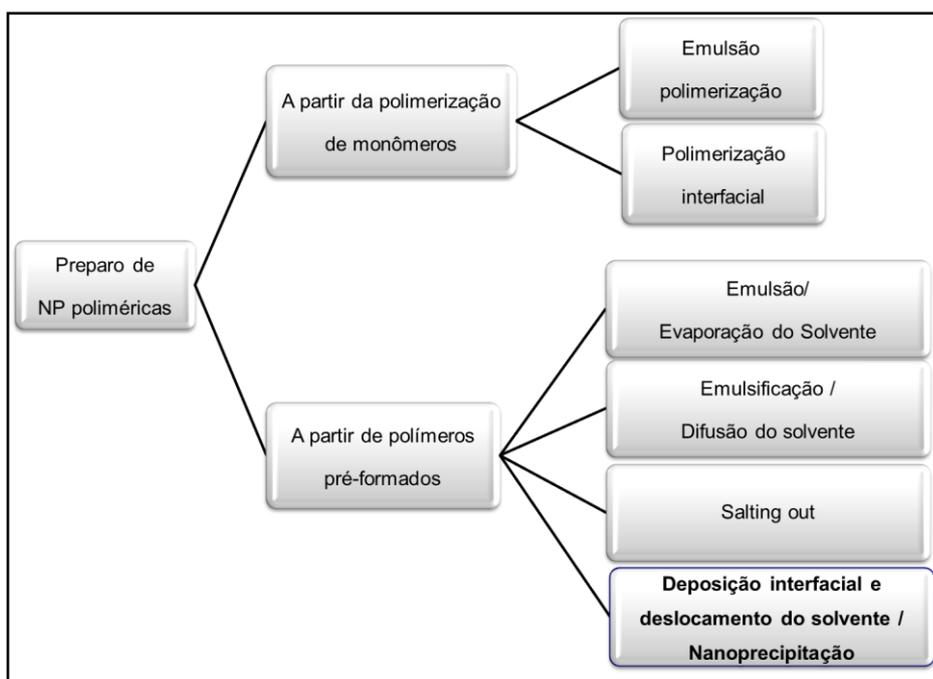


Figura 2: Ilustração esquemática dos métodos de preparação de NP poliméricas, conforme descrição de PINTO REIS et al., 2006.

Dependendo das características físico-químicas da molécula que se deseja encapsular, é possível escolher o melhor método e o melhor polímero para obter um eficiente carregamento (PINTO REIS et al., 2006). As características de tamanho, carga e liberação podem ser otimizadas para uma maior estabilidade da formulação para o uso *in vivo*. Os métodos que têm, por princípio, o processo de polimerização de monômeros resultam, muitas vezes, na obtenção de polímeros muito lentamente biodegradáveis ou não-biodegradáveis; reações cruzadas indesejáveis entre o polímero e o fármaco, além de moléculas residuais no meio, que podem ou não serem tóxicas, e por isso requerem um meticuloso processo de purificação. Esses inconvenientes têm gerado certa preferência ao uso dos procedimentos com polímeros pré-formados (PINTO REIS et al., 2006). Nesse sentido, uma das técnicas mais utilizadas é a de deposição interfacial do polímero pré-formado seguido do deslocamento do solvente, também chamada de nanoprecipitação (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). NP monodispersas, adequadas para a administração intravenosa, podem ser obtidas facilmente em um único passo de dispersão da fase orgânica na fase aquosa, com rendimento de encapsulação de compostos lipofílicos dependente do grau de lipofilia dos mesmos (LEGRAND et al, 1999; MOSQUEIRA et al., 2000). O princípio básico da técnica consiste em dissolver o polímero e o fármaco em um solvente orgânico miscível em água; e em seguida verter essa solução na fase aquosa, contendo ou não um tensoativo, sob agitação moderada. As NS são formadas imediatamente pela difusão mútua dos solventes, que em seguida são evaporados sob pressão reduzida (MARIN; BRICEÑO; CABALLERO, 2013). NC podem ser obtidas da mesma forma pela simples adição de óleo e de um surfactante lipofílico na solução orgânica contendo o polímero (RAO; GECKELER, 2011). A formação das NS e NC por esse método foi proposta por Fessi e colaboradores em 1989. De acordo com esses pesquisadores, é a turbulência interfacial, gerada durante a rápida difusão do solvente orgânico na água, que induz a formação das nanopartículas como resultado da diminuição da tensão interfacial entre as duas fases e migração do polímero para a interface óleo/água, onde é precipitado. A Figura 3 exemplifica esse fenômeno, com a produção de uma NC. As vantagens do procedimento acima mencionado são muitas: não requer a utilização de solventes organoclorados para compor a fase orgânica; é um método simples, rápido e reprodutível, que leva à obtenção de

dispersões coloidais estáveis, contendo partículas submicrométricas de estreita distribuição de tamanho (CHORNY et al., 2002; LEGRAND et al., 2007).

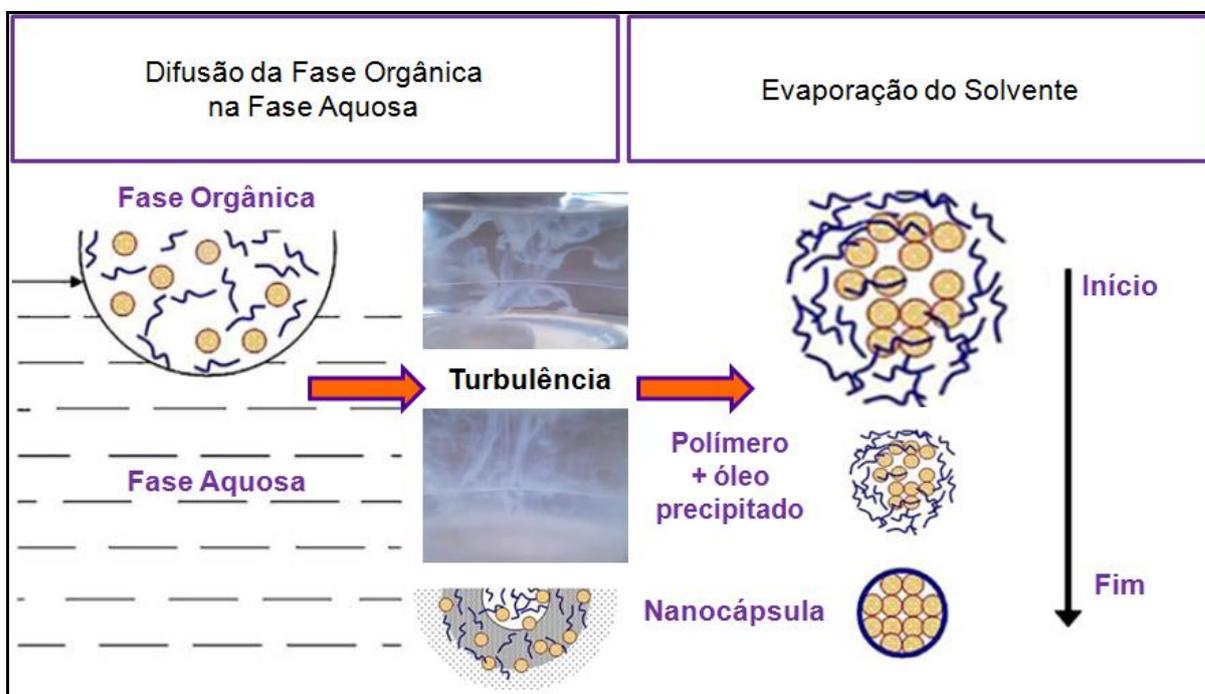


Figura 3: Representação esquemática do processo de formação de NC descrito por Fessi e colaboradores (1989). A rápida difusão da fase orgânica na fase aquosa leva à formação de nanogotas de óleo como resultado das variações locais na tensão interfacial que geram uma instabilidade mecânica e a formação cineticamente controlada das nanogotas. Uma vez que a difusão é completa e inicia-se a evaporação do solvente orgânico, o polímero (linhas azuis) se precipita em torno das gotículas de óleo (em laranja) (MOSQUEIRA et al., 2000). Em função disso, o método também é chamado de nanoprecipitação. **Redesenhado e adaptado de:** VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009.

Embora exista uma grande variedade de polímeros que possam ser utilizados como constituintes de sistemas de liberação de fármacos, a pesquisa prática tem sido realizada com somente um número limitado deles (Rao e Geckeler, 2011). Os mais amplamente empregados, desde o trabalho pioneiro de Fessi e colaboradores (1989), e que já possuem aprovação para uso pelo *Food and Drug Administration* (FDA) são: o ácido polilático (PLA), o ácido polilático-co-ácido glicólico (PLGA), o ácido poliglicólico (PGA), os polialquil-cianoacrilatos (PACA), a poli- ϵ -caprolactona (PCL) e seus copolímeros correspondentes, além de polímeros em bloco com o polietilenoglicol (PEG); em função de preencherem os requisitos de biodegradabilidade e/ou biocompatibilidade e baixa imunogenicidade (LEPELTIER; BOURGAUX; COUVREUR, 2014; MARIN; BRICEÑO; CABALLERO, 2013). Muitos

deles são hidrolisados e eliminados do corpo pelas vias metabólicas normais (MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010). Além destes, polímeros naturais de fonte tanto vegetal, como animal, também possuem numerosas aplicações como insumos no preparo de carreadores de fármacos nanoparticulados; entre eles: o colágeno, a albumina, a quitosana, os alginatos, as gelatinas, o hialuronato e o amido (MARIN; BRICEÑO; CABALLERO, 2013).

O PLA é um polímero relativamente hidrofóbico, que pode ser produzido por dois processos distintos: a partir da polimerização do ácido láctico pela condensação direta em solvente sob alta pressão; ou em outro processo, livre de solvente, um intermediário dímero cíclico, chamado lactídeo, é formado e a abertura do anel ocorre com a polimerização catalítica, que pode ser de vários tipos (Figura 4). O segundo método é o mais utilizado na produção comercial. Devido às propriedades ópticas do ácido láctico, o lactídeo pode ser encontrado em três diferentes formas quirais, isto é, (D,D)-lactídeo; (L,L)-lactídeo e (D,L)-lactídeo (composto meso). A composição estereoquímica do lactídeo determina as propriedades do polímero final. Geralmente, o ácido láctico obtido por processo fermentativo é quase predominantemente na forma L (99,5%), já aquele produzido por via petroquímica é opticamente inativo, portanto consistindo da mistura 50/50 dos dois enantiômeros (Rasal *et al.*, 2010).

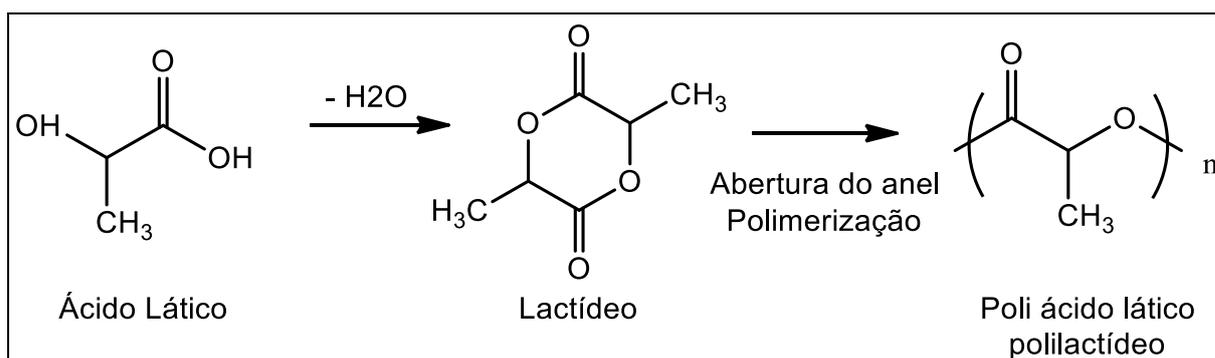


Figura 4: Esquema da síntese do PLA, conforme descrição de RASAL; JANORKAR; HIRT, 2010.

Na área biomédica, o PLA tem sido utilizado há anos e tem seu uso autorizado pelas agências regulatórias inclusive pela via intravenosa. Tem aplicações em materiais médicos de engenharia tecidual (materiais de implante), além do seu uso em nanocarreadores de fármacos (XIAO *et al.*, 2010), como já foi mencionado. Nesse sentido, devido a possibilidade de ser copolimerizado com

outros monômeros de poliésteres cíclicos, com monômeros lineares, como o PEG, e por permitir a introdução de grupos reativos (RASAL; JANORKAR; HIRT, 2010) ou adsorção de macromoléculas como a quitosana, as NP de PLA podem ter a superfície modificada e suas propriedades físico-químicas ajustáveis conforme o interesse pretendido. Isso é importantíssimo no caso das NP de uso intravenoso; por exemplo, o PEG copolimerizado em bloco com o PLA (Figura 5) insere um caráter hidrofílico à superfície do mesmo, o que faz diferença no modo como as partículas, preparadas com esses diblocos, interagem com os componentes biológicos e se distribuem pelo organismo.

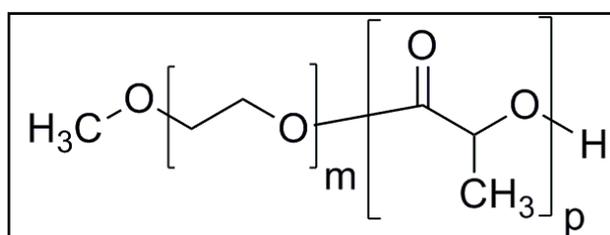


Figura 5: Representação esquemática da estrutura química do polímero dibloco monometoxi-PEG-PLA.

O PEG (Figura 6) é o único poliéter usualmente produzido pela polimerização aniônica do óxido de etileno. Essas reações de polimerização podem ser moduladas e uma variedade de pesos moleculares pode ser obtida com baixa dispersão e solubilidade em solventes polares e apolares (GREENWALD et al., 2003). Tem seu uso aprovado pelo FDA para formas farmacêuticas de uso parenteral, tópico, supositórios e sprays nasais; para produtos cosméticos e alimentícios (ALI; LAMPRECHT, 2013; FUERTGES; ABUCHOWSKI, 1990). É eliminado do corpo pelas vias renal e hepática (GREENWALD et al., 2003), apresentando biocompatibilidade e baixa imunogenicidade (KOLATE et al., 2014). Além disso, é muito utilizado para modificar a superfície dos sistemas de liberação de fármacos nanométricos, para prolongar o tempo de circulação sanguínea dos mesmos (KOLATE et al., 2014; MOSQUEIRA et al., 2006).

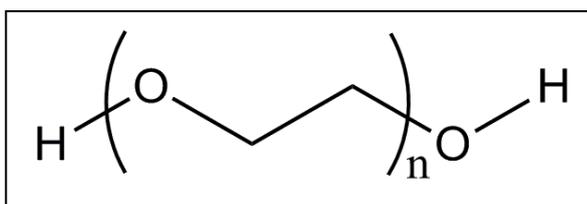


Figura 6: Representação esquemática da estrutura química do polietilenoglicol.

A quitosana (QUI) é considerada um polímero natural linear, composto de subunidades de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. É derivada da quitina, segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, através da desacetilação parcial das unidades de N-acetilglucosamina (GAN; WANG, 2007) (Figura 7). A desacetilação, por sua vez, pode ocorrer em diferentes graus e fornecer estruturas de variados pesos moleculares, solubilidade e propriedades iônicas distintas, lhes conferindo, portanto, características físico-químicas diferenciadas. O alto conteúdo de amins primárias possibilita a realização de modificações químicas, com a formação de uma grande variedade de derivados. Além disso, estes grupos amino têm valores de pKa intrínsecos de 6.5 e, dessa forma, as quitosanas são insolúveis em água (pH neutro), mas comportam-se como policátions em pH ácido a partir da protonação dos nitrogênios (LEE; POWERS; BANEY, 2004; MACLAUGHLIN et al., 1998; MARKOVSKY et al., 2012).

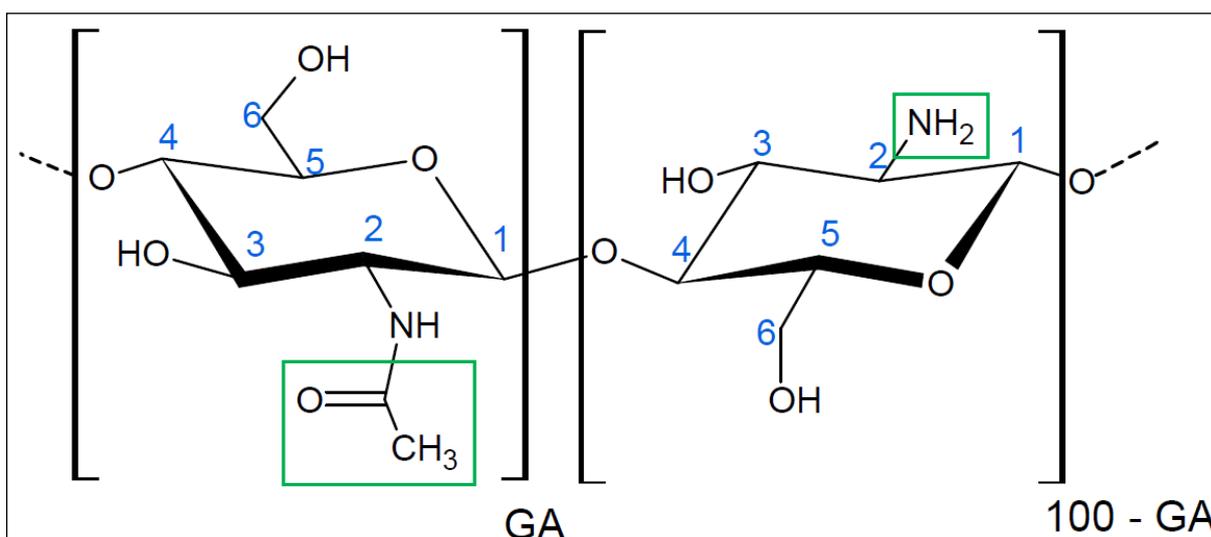


Figura 7: Representação esquemática da unidade repetitiva comum à quitina e à quitosana, sendo GA o grau médio de acetilação do copolímero e $100 - GA$ o grau médio de desacetilação. **Fonte:** Cardoso, 2008.

A vantagem de se trabalhar com esse polímero é a facilidade de aquisição, baixo custo e ausência da necessidade de utilizar solventes orgânicos para seu manuseio. Por outro lado, por serem de fonte natural possuem alta dispersão de tamanho de cadeias poliméricas e a possibilidade de existência de contaminantes de natureza biológica em matérias primas de baixa pureza.

Muitos estudos têm utilizado NP de quitosana ou NP revestidas de quitosana em sua superfície como sistemas de liberação tanto pela via intravenosa (KIM et al., 2008) quanto oral (LEE; LEE; JON, 2010; ZHANG et al., 2006b). Tem sido demonstrado que ela apresenta propriedades de absorção aumentada através da mucosa, liberação controlada e bioadesão (BILENSOY, 2010). Além disso, também tem sido relatado seu papel importante na terapia contra o câncer, apresentando atividade antitumoral por si só, inibindo a proliferação de células tumorais e induzindo a apoptose *in vitro* (HASEGAWA et al., 2001). A carga positiva das nanopartículas parece induzir uma forte interação com as células e moléculas negativamente carregadas (BILENSOY, 2010; GOKCE et al., 2014) e essa é uma característica a ser avaliada sob o aspecto de segurança terapêutica.

1.1.3. Biodistribuição e eliminação das nanopartículas administradas pela via intravenosa

Para exercerem seu papel, nanoestruturas administradas sistemicamente precisam permanecer na circulação sanguínea por um tempo suficiente para permitir o seu acúmulo no tecido/órgão de interesse e, assim, a entrega eficiente das moléculas que carregam ao alvo terapêutico (ISHAK et al., 2013). Nesse sentido, existe um grande obstáculo que deve ser superado por essas estruturas: a rápida opsonização pelas proteínas plasmáticas com a consequente remoção da circulação sanguínea pelo SFM (SHENG et al., 2009); compreendido principalmente pelas células de Kupffer, no fígado, e macrófagos, no baço. A partir desse conhecimento, várias pesquisas centraram na intensa investigação e otimização de parâmetros que pudessem minimizar ou até anular esse efeito (DUNN et al., 1997). Hoje, sabe-se que as características físico-químicas dos nanocarreadores, como o tamanho, a forma e as propriedades de superfície (carga e grupos funcionais ligados, caráter hidrofílico ou hidrofóbico), bem como a própria área superficial de contato têm um papel importantíssimo nesses processos. Além disso, a efetiva internalização das partículas pelas células alvo também é influenciada significativamente pelos seus parâmetros físico-químicos (DUAN; LI, 2013) e, portanto, devem ser criteriosamente estudados e controlados, frente ao desenvolvimento desses sistemas e de acordo com o uso pretendido para os mesmos.

Outro fator importante que influencia a velocidade de captação das partículas pelo SFM, e, portanto, o tempo de permanência na circulação sanguínea e a resultante biodistribuição, é o intervalo de aplicações (MOGHIMI; GRAY, 1997) ou a quantidade da dose injetada. A primeira dose pode suprimir a atividade das células fagocíticas por saturação dos receptores de fagocitose, reduzindo a depuração das doses subsequentes e prolongando o tempo de circulação das NP (ERNSTING et al., 2013a).

1.1.3.1. Efeito do tamanho

Na maioria das vezes, o tamanho das partículas é o primeiro parâmetro a ser considerado no desenvolvimento de sistemas nanométricos (CHOI et al., 2014), pois o tempo de permanência na circulação sanguínea, o acúmulo no tecido alvo e a toxicidade das partículas são, principalmente, influenciados por esse parâmetro (SINGH; LILLARD, 2009). Além disso, as características fisiológicas dos órgãos devem ser levadas em consideração quando se fala de tamanho e se deseja um tempo de circulação prolongado. Nesse sentido, as partículas não podem ser nem tão pequenas (< 20 a 30 nm), o que facilitaria a depuração renal (SCHÄDLICH et al., 2011a) e nem tão grandes (> 200 nm), primeiro, porque podem ativar o sistema do complemento com maior facilidade e, portanto, serem mais rapidamente fagocitadas (KULKARNI; FENG, 2013); segundo, porque elas podem ficar retidas mecanicamente nos sinusóides hepáticos ou nos capilares pulmonares (BERTRAND; LEROUX, 2012).

É muito importante considerar também que em circunstâncias particulares tais como inflamação, os vasos sanguíneos do tecido lesionado se tornam mais permeáveis do que aqueles dos tecidos saudáveis (TORCHILIN, 2011), em função de fenestras que surgem entre as células endoteliais, ocasionadas por diversos mediadores vasculares (bradicinina, óxido nítrico, fator de crescimento endotelial vascular) (MISRA; ACHARYA; SAHOO, 2010). Como resultado, em tais áreas, as partículas podem deixar o espaço vascular e acumularem-se no espaço intersticial, onde o fármaco encapsulado pode ser liberado do carreador (Figura 8). Essa permeação e acumulação espontânea, ou entrega passiva (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011), devido à ausência ou debilitada drenagem linfática nesses locais, é conhecida como efeito da permeabilidade e retenção aumentada, do inglês EPR –

Enhanced Permeability and Retention (MATSUMURA; MAEDA, 1986; TORCHILIN, 2011).

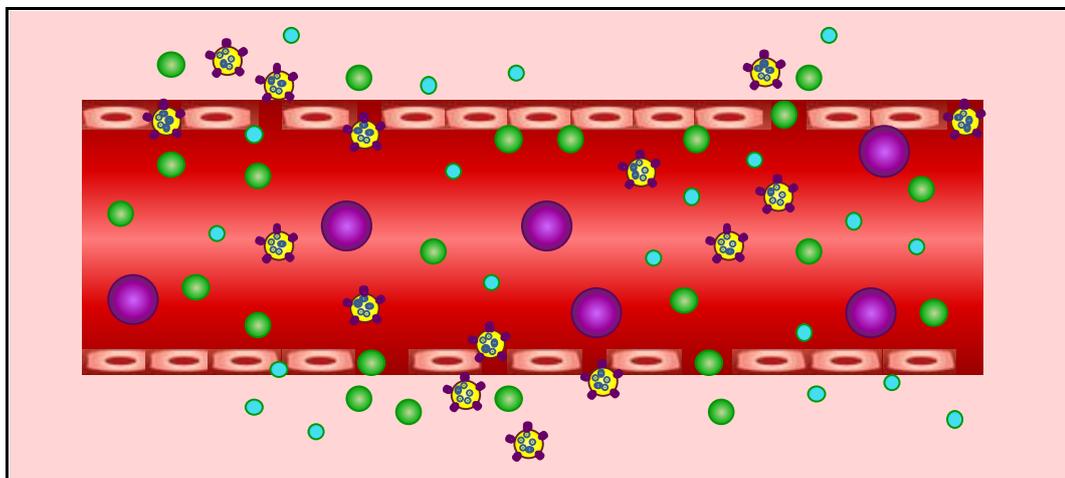


Figura 8: Esquema de um vaso sanguíneo presente em um tecido lesado, ilustrando a importância do tamanho da partícula na liberação de fármacos nesses locais. Partículas grandes ficam retidas no interior dos vasos sanguíneos e não conseguem alcançar o tecido de interesse, enquanto as partículas menores podem se difundir pelas fenestras que surgem nos vasos sanguíneos dos tecidos lesados e serem internalizadas pelas células desses tecidos ou liberarem o fármaco na matriz extracelular.

Após penetrarem nos tecidos de interesse, as NP também podem interagir com as células alvo por meio de ligantes que possam apresentar em suas superfícies e, assim, promover a entrega ativa do fármaco. A combinação dessas duas abordagens tem sido muito utilizada no desenvolvimento de sistemas de liberação de nanoparticulados (MARKOVSKY et al., 2012) (Figura 9).

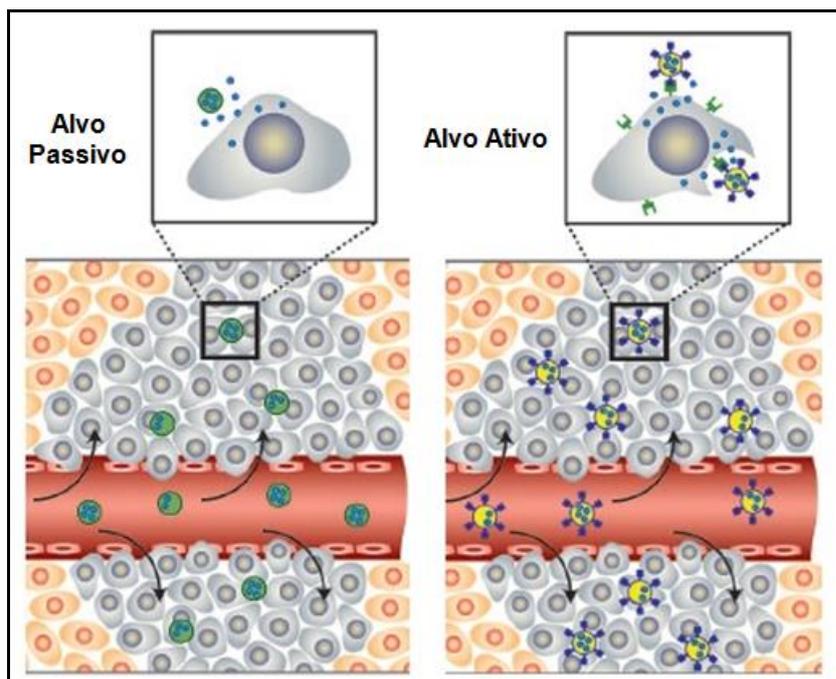


Figura 9: Ilustração esquemática do efeito de permeação e retenção aumentada, EPR, modulando a entrega passiva e ativa de fármacos nanocarreados. **Redesenhado e adaptado de:** FAROKHZAD; LANGER, 2009.

1.1.3.2. Efeito das propriedades de superfície

As partículas de superfície hidrofóbica, ou convencionais, são rapidamente opsonizadas pelas proteínas plasmáticas após a administração intravenosa (GREF et al., 1994). Isso tem limitado o seu uso, uma vez que são rapidamente eliminadas da circulação sanguínea devido ao reconhecimento pelos fagócitos. Visando diminuir esse efeito sobre os nanocarreadores, modificações de superfície foram propostas (Figura 10). Entretanto, o revestimento das nanopartículas é complexo e afetado pela natureza dos grupamentos químicos usados, os quais influenciam a superfície em termos de carga, hidrofília e densidade de recobrimento (ISHAK et al., 2013).

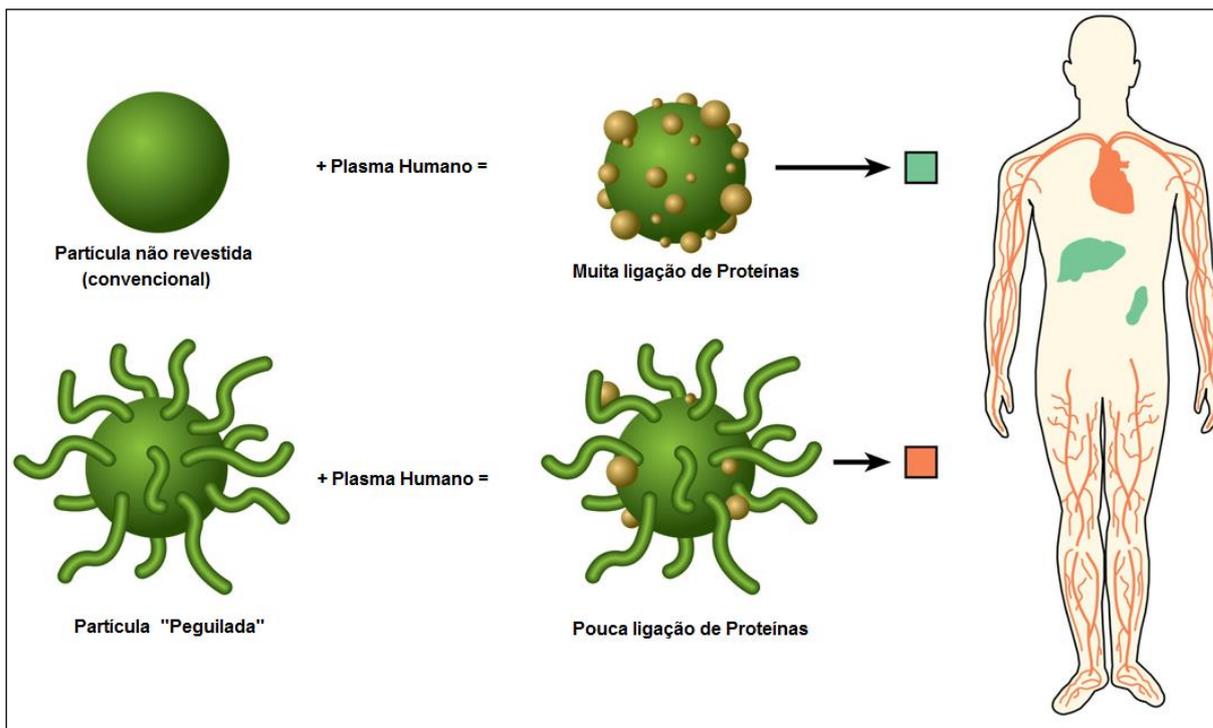


Figura 10: Nanopartículas com superfícies diferenciadas e o efeito do tipo de superfície sobre a ligação de proteínas plasmáticas e a biodistribuição. Partículas não revestidas (convencionais) são captadas pelo SFM (representado pelos órgãos em verde); partículas peguiadas são lentamente opsonizadas, como consequência permanecem mais tempo na circulação e se distribuem mais amplamente pelos tecidos e órgãos do corpo. **Redesenhado e adaptado de:** AGGARWAL et al., 2009.

Algumas moléculas hidrofílicas têm sido muito utilizadas na superfície das partículas para reduzir, por impedimento estérico, as interações responsáveis pela adsorção das proteínas nas partículas; entre eles: o polietilenoglicol (PEG) (OWENS; PEPPAS, 2006). Os surfactantes contendo PEG como os polissorbitos, poloxamers e poloxaminas (AGGARWAL et al., 2009); o polivinil álcool, a polivinil pirrolidona e os polissacarídeos (SHENG et al., 2009). O PEG é o mais utilizado dentre eles por conferir um tempo de circulação prolongado às partículas, podendo ser adsorvido à superfície da partícula ou ligado covalentemente aos grupamentos químicos formadores do nanossistema (OWENS; PEPPAS, 2006), por exemplo com os fosfolípidos (ALLEN et al., 1991) e na forma de copolímeros em diblocos (GREF et al., 1994; XIAO et al., 2010) ou triblocos (SHAN et al., 2009; ESSA; RABANEL; HILDGEN, 2010). A densidade e o tamanho (peso molecular) das cadeias de PEG ligadas à superfície das partículas impactam no quão estabilizadas elas serão e levam a dois tipos principais de conformações: em cabeleira (“brush”), com maior

densidade de cadeias e mais estabilizadora em relação à opsonização, e em cogumelo (“mushroom”) (MOGHIMI; SZEBENI, 2003), com menor densidade de cadeias conforme pode ser visto na Figura 11.

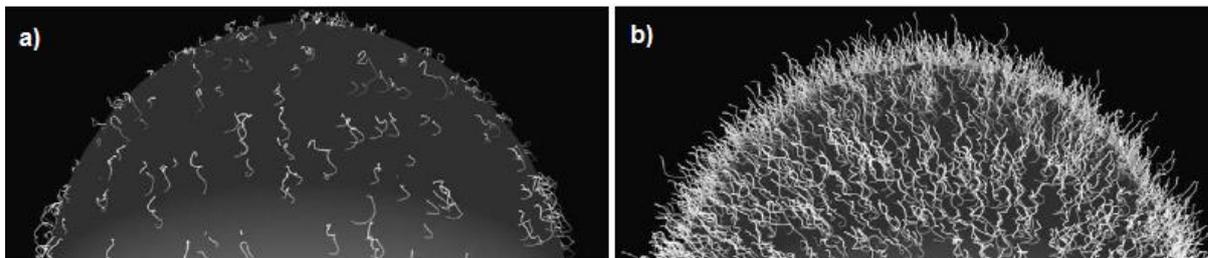


Figura 11: Representação esquemática das configurações de PEG na superfície de uma NP polimérica. a) a baixa densidade de cobertura das cadeias de PEG na superfície leva à configuração “mushroom”, onde as cadeias estão mais próximas da superfície. Em (b), a alta densidade das cadeias de PEG e falta de mobilidade dessas cadeias levam à conformação “brush”, onde a maioria das cadeias se estendem para fora da superfície. **Fonte:** (OWENS; PEPPAS, 2006).

Em relação às cargas de superfície, elas influenciam no modo como as NP interagem não só com os macrófagos, mas também com as células alvo; afetando as vias de captação/internalização celular. De um modo geral, partículas muito carregadas negativa ou positivamente, ou seja, apresentando altos valores absolutos de carga, podem ser mais facilmente fagocitadas e, portanto, eliminadas mais rapidamente da circulação (JAIN; STYLIANOPOULOS, 2010). No entanto, é notado que cargas positivas na superfície das partículas induzem uma maior depuração plasmática do que cargas negativas (BERTRAND; LEROUX, 2012). ERNSTING et al. (2013b) relataram que partículas neutras (± 10 mV) circulam três vezes mais na corrente sanguínea, do que análogas carregadas, além disso, se distribuem mais homogêneo dentro do tecido tumoral; sendo que as catiônicas tendem a interagir com matrizes negativamente carregadas, tais como ácido hialurônico, e as aniônicas tendem a interagir mais com matrizes intercelulares positivamente carregadas, como o colágeno; essas interações dificultam o transporte das mesmas pelo tecido. Além disso, relatos de toxicidade associada à carga positiva na superfície das partículas sugerem que elas induzem o rompimento das membranas celulares, promovendo um influxo de Ca^{2+} que, por sua vez, resulta em estresse oxidativo, citotoxicidade e morte celular (HWANG; LIN, 2015; FRÖHLICH, 2012).

1.1.3.3. Efeito da forma das partículas

No que diz respeito à forma das partículas, esta é outra propriedade essencial nos vários processos biológicos relacionados com a entrega direcionada dos agentes terapêuticos. Uma ampla variedade de formatos não esféricos, incluindo elipsóides, discos, cubos, cilindros, cones, entre outros, tem sido desenvolvida utilizando diversas técnicas de fabricação (DUAN; LI, 2013). VENKATARAMAN et al. (2011) relataram duas abordagens para se produzir partículas com diferentes geometrias: “top-down” e “bottom-up”. Eles também revisaram os estudos presentes na área e, de uma maneira geral, os relatos demonstram que partículas não esféricas além de prolongar o tempo de circulação sanguínea, em alguns casos também apresentaram diferentes perfis de distribuição das homólogas esféricas, fornecendo um meio de direcionamento para órgãos/tecidos específicos tais como baço, pulmão e outros. MORACHIS et al. (2012) também mencionaram que partículas em forma de disco têm aumentada distribuição, enquanto aquelas em forma de bastão são mais aderidas nas junções dos capilares, e aquelas ditas macias têm aumentada captação celular ou, no caso das deformáveis, melhorada penetração nos vários poros dos vasos sanguíneos. No entanto, apesar dos significantes ganhos no conhecimento relacionado à forma das partículas, numerosos desafios a nível biológico ainda permanecem endereçados à complexa e conjunta relação entre este e os demais parâmetros associados às mesmas (VENKATARAMAN et al., 2011).

1.1.4. Marcação fluorescente de nanocápsulas com ftalocianina de cloro e alumínio

O rastreamento das NP nos estudos de farmacocinética e biodistribuição pode ser realizado por meio de vários mecanismos: pela marcação das partículas utilizando sondas fluorescentes (LIAO et al., 2013) ou isótopos radioativos (PEREIRA et al., 2009; SA et al., 2012) e fazendo o acompanhamento das mesmas através de técnicas de imagem *in vivo* próximo ao infravermelho (NIR) (SCHÄDLICH et al., 2011b) ou pela quantificação da radiação *ex vivo* (PEREIRA et al., 2009); ou ainda pela encapsulação de moléculas, que apresentam alta emissão de fluorescência, no interior das partículas, com a respectiva quantificação dessa

fluorescência nos tecidos de interesse por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Tratando-se dessa última abordagem, Oliveira (2009) desenvolveu nanocápsulas contendo o marcador fluorescente Ftalocianina de Cloro e Alumínio (AICIPc) (Figura 12) e avaliou a estabilidade e a eficiência de marcação das partículas, contendo essa substância, em testes de interação entre as mesmas e células mononucleares do sangue periférico humano, incubadas em meio aquoso. Como o marcador é muito hidrofóbico e praticamente insolúvel em água, foi observado que a sua liberação foi muito pequena e lenta, não havendo associação deste com dois dos tipos celulares avaliados (linfócitos e monócitos) na ausência de contato, e apresentando uma discreta ligação com os neutrófilos. A análise desses dados indicou a necessidade de interação física entre NC e célula para que existisse algum tipo de associação da AICIPc às células. Esses resultados levaram a conclusão de que a AICIPc é um bom marcador para estudos de biodistribuição de nanopartículas poliméricas devido à sua afinidade pelo núcleo oleoso (Oliveira, 2009). Além disso, esses dados estão de acordo com os estudos de liberação da AICIPc realizados por de Paula (2008), que também desenvolveu NP contendo essa substância, entretanto com vistas ao emprego para terapia fotodinâmica.

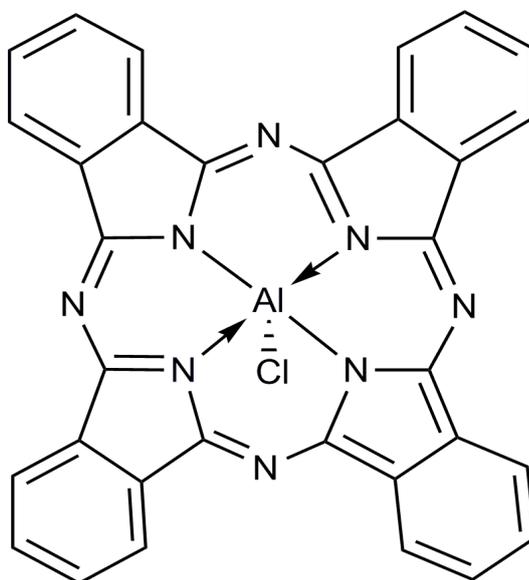


Figura 12: Estrutura química da AICIPc.

1.1.5. Técnicas de caracterização de nanopartículas

1.1.5.1. Espalhamento dinâmico da luz

A técnica mais utilizada na determinação do tamanho hidrodinâmico médio e distribuição de tamanho das nanopartículas é o espalhamento dinâmico da luz (EDL). Tem sido utilizada desde a década de 70, quando os lasers comerciais se tornaram disponíveis (XU, 2008). Ela tem a vantagem de ser rápida, não destrutiva, fornecer dados precisos e poder ser aplicada a amostras diluídas (ROSS HALLETT, 2010) em meio aquoso. Seu princípio se baseia no movimento Browniano das partículas em suspensão; partículas pequenas dispersam a luz do laser incidente muito rapidamente, enquanto as partículas grandes dispersam a luz do laser mais lentamente (LIU et al., 2015). Assim, as flutuações na intensidade da luz espalhada por partículas pequenas são maiores que aquelas produzidas por partículas grandes, em um mesmo intervalo de tempo. Dessa forma, o coeficiente de difusão translacional das partículas pode ser determinado pela função de autocorrelação da intensidade da luz dispersa. Através da equação de Stokes-Einstein (equação 1) é possível relacionar essas informações de modo a se obter o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas, considerando-as na forma esférica (LIU et al., 2015):

$$D_T = \frac{K_B \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_H} \quad (1)$$

Onde: D_T é o coeficiente de difusão translacional, K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta do meio de dispersão, η é a viscosidade do líquido suspensor e d_H é o diâmetro hidrodinâmico.

1.1.5.2. Espalhamento estático da luz laser com detecção multiângulo

A técnica de espalhamento estático multiangular da luz laser (MALLS) é frequentemente utilizada como técnica de caracterização de macromoléculas e de partículas submicrométricas, quando existe a necessidade de determinação precisa e absoluta da massa molecular e do raio de giração (ANDERSSON; WITTGREN; WAHLUND, 2003). O MALLS é muito útil para determinar a massa ou o tamanho das partículas originais ou de seus supra agregados estáveis ou instáveis (BRAR; VERMA, 2011). As partículas podem ser medidas suspensas em um líquido aquoso,

em um intervalo angular amplo de 0 grau a 180 graus, usando um braço de rotação ou detectores fixos ao longo de toda a faixa angular (XU, 2014). Geralmente, o MALLS é acoplado a métodos de separação por tamanho, tais como cromatografia por exclusão de tamanho (CET) e fracionamento em campo de fluxo (XU, 2014), o que resulta na determinação direta da massa molar média (M_w) e do raio de giração de cada fração eluída, sem a necessidade de calibração em comparação a padrões e suposições sobre a forma, permitindo, portanto, determinar com precisão a distribuição da massa molar e do raio de giração, assim como a conformação molecular (ANDERSSON; WITGREN; WAHLUND, 2003; WYATT, 1993).

1.1.5.3. Fracionamento por fluxo em campo de fluxo assimétrico

A técnica de fracionamento por fluxo em campo de fluxo assimétrico (*Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation – AF4*) é uma subtécnica da grande família de técnicas analíticas de separação que utilizam o princípio, introduzido por Giddings em 1966, de fracionamento por fluxo em um determinado campo (*Field-Flow Fractionation - FFF*). Elas foram desenvolvidas especificamente para separar e caracterizar macromoléculas, estruturas supramoleculares, coloides e partículas, ou seja, amostras complexas. Elas são denominadas de acordo com o tipo de campo aplicado, o qual atua sobre uma propriedade físico-química específica dos analitos para promover a separação (MESSAUD et al., 2009). Campos típicos incluem: gradiente de temperatura (*thermal FFF fractionation*), potencial elétrico (*electrical FFF*), força centrífuga (*centrifugal FFF*) e fluxos cruzados (*symmetrical flow FFF* e *asymmetrical flow FFF*) (GIDDINGS, 1993; LESPE; GIGAULT, 2011; YOHANNES et al., 2011).

A técnica de AF4 foi introduzida em 1987 por WAHLUND e GIDDINGS e é a mais difundida atualmente dentre as técnicas de FFF (YOHANNES et al., 2011). Ela é capaz de fracionar amostras sobre uma ampla faixa de tamanho (de aproximadamente 2 nm a 50 μm de diâmetro) e de peso molecular (10^3 a 10^{10} g/mol) e tem a vantagem de poder ser acoplada a diversos detectores (RUNYON; ULMIUS; NILSSON, 2014). Nesse sentido, quando EDL e MALLS são utilizados em linha ao equipamento de AF4, é possível realizar uma caracterização mais completa das formulações nanoestruturadas, obtendo-se informações sobre a dispersão de

tamanho e a forma das partículas (EHRHART; MINGOTAUD; VIOLLEAU, 2011; MATHAES et al., 2013; TILL et al., 2014).

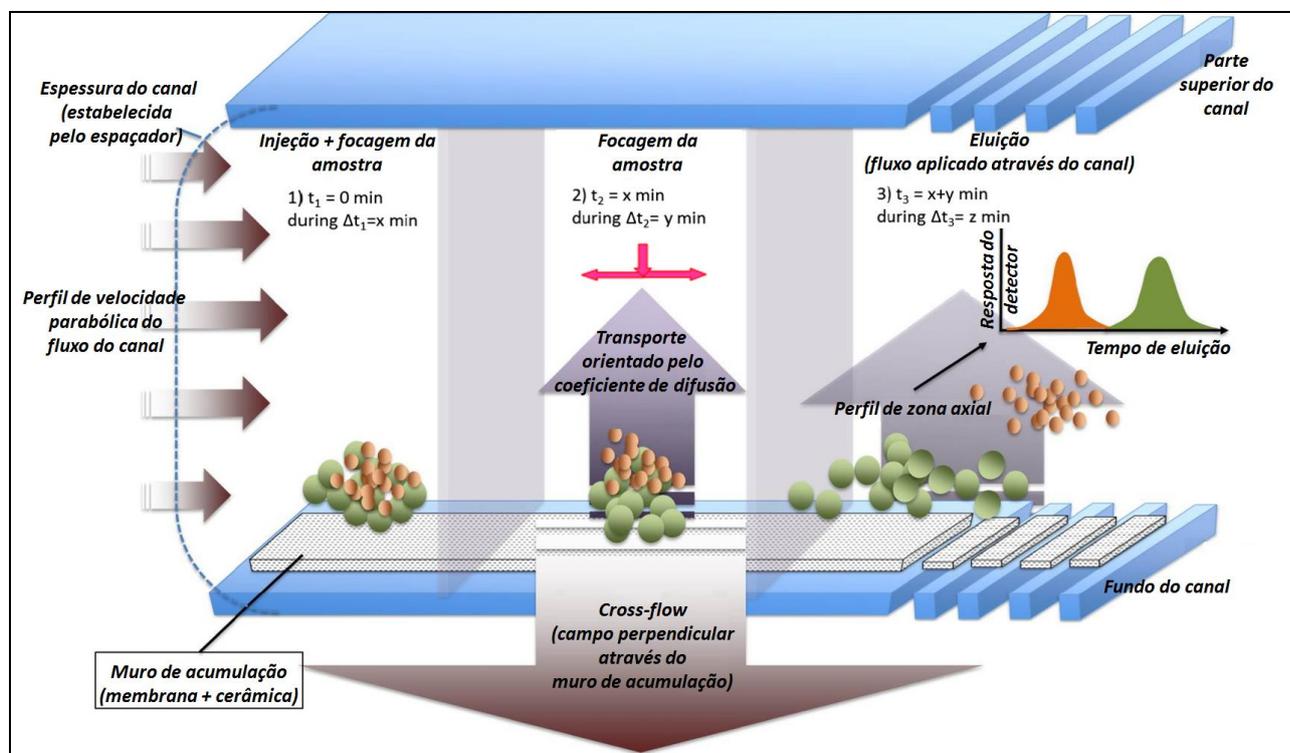


Figura 13: Ilustração de um canal de separação em um equipamento de fracionamento por fluxo em campo de fluxo assimétrico, simulando os passos e parâmetros envolvidos em uma análise de caracterização de partículas. **Redesenhada e adaptada de:** GIGAULT et al., 2014.

A figura 13 é uma representação esquemática do canal de separação do equipamento de AF4, formado por duas placas paralelas separadas entre si pelo espaçador (que pode ter sua espessura entre 100 e 500 μm) e pela membrana (chamada de muro de acumulação). A placa inferior é composta por uma cerâmica porosa e, portanto, permeável, sobre a qual a membrana é colocada; acima dela está o espaçador e por último a placa superior, impermeável, o que faz com que o campo dentro do canal tenha a característica assimétrica. Basicamente, o processo da separação se dá pela seguinte forma: o líquido carreador, que entra no canal por uma das extremidades através da bomba *tip flow*, se divide em dois fluxos: um longitudinal, o qual percorre todo o canal levando as partículas injetadas para os detectores (chamado fluxo do canal), e um perpendicular a este, o *cross-flow*, que sai do canal através de toda a superfície da membrana pela ação da bomba *cross-flow*. Assim, o fluxo resultante dentro do canal adquire um perfil parabólico, com

velocidade maior no centro do canal e próxima a zero nas extremidades (na superfície da membrana e da placa superior). A força de sucção da bomba *cross-flow* puxa as partículas injetadas para a superfície da membrana. Essas partículas sofrem, em seguida, uma difusão de retorno para o centro do canal. Quando elas atingem o equilíbrio, zonas de concentração são formadas, com espessuras e alturas definidas, as quais são correlacionadas ao coeficiente de difusão das partículas. Como resultado, uma vez que partículas menores se difundem mais facilmente, quando as forças dos fluxos entram em equilíbrio, elas são posicionadas nas regiões onde a velocidade do fluxo dentro do canal é maior, sendo, portanto, eluídas primeiramente. Já as partículas maiores se difundem menos, ficando mais próximas do muro de acumulação, em zonas onde as linhas de fluxo possuem baixa velocidade, o que resulta em uma eluição tardia dessas partículas (FRAUNHOFER et al., 2004; JOHN; LANGER, 2014; WAHLUND; GIDDINGS, 1987). Assim, o tempo de retenção no canal será diretamente relacionado ao coeficiente de difusão e, portanto, ao diâmetro hidrodinâmico dessas partículas, conforme a teoria de fracionamento *FFF* (FRAUNHOFER et al., 2004; GIDDINGS, 1993; WAHLUND; GIDDINGS, 1987) e equação abaixo.

$$d_H = \frac{2kTV_0}{\pi\eta V_c w^2 t_0} t_r \quad (2)$$

Onde:

d_H = Diâmetro Hidrodinâmico

k = Constante de Boltzmann

T = Temperatura

V_0 = Volume de retenção de um componente não retido

η = Viscosidade do líquido carreador

V_c = Volume de retenção de um componente retido

w^2 = Espessura do canal

t_0 = Tempo de retenção de um componente da amostra não retido

t_r = Tempo de retenção de um componente da amostra retido

1.1.5.4. Potencial Zeta

O potencial zeta, ζ , é uma medida indireta do potencial elétrico na superfície de uma partícula em suspensão em um fluido aquoso. A carga da superfície de partículas coloidais é equilibrada por contra-íons ligados à superfície da partícula, formando uma densa camada, denominada camada de Stern ou Helmholtz. Externamente a essa camada, forma-se outra camada de contra-íons, mais frouxa, chamada camada difusa. Nessa camada, por sua vez, existe um limite teórico dentro do qual os íons aí presentes se movem junto com a partícula, enquanto os íons mais distantes, fora desse limite, chamado plano de cisalhamento, não se movem com a partícula. O potencial elétrico que existe nesse plano de cisalhamento, ou seja, na interface da dupla camada formada pelos contra-íons é denominado potencial zeta (BHARTI, 2012). Diferentemente do tamanho ou do peso molecular, o potencial zeta é uma propriedade envolvendo não somente as partículas em si, mas também o seu ambiente, isto é, o pH do meio, a força iônica e até mesmo o tipo de íons em suspensão (XU, 2008). Tem sido usado por mais de um século como um parâmetro básico no controle da estabilidade das suspensões coloidais, independente da natureza das suas partículas, se orgânicas ou inorgânicas (USKOKOVIĆ et al., 2011). Ele não pode ser medido diretamente, mas pode ser calculado a partir da mobilidade eletroforética das partículas, que, por sua vez, pode ser determinada aplicando-se um campo elétrico; partículas carregadas, suspensas no eletrólito, migrarão para o eletrodo de carga oposta (BHARTI, 2012). Além disso, a velocidade com que as partículas se movem nesse percurso está relacionada com o seu conteúdo de carga. Assim, partículas que se movem rapidamente são mais carregadas que aquelas que se movem lentamente e essa medida da velocidade do movimento direcionado (cinética) das partículas, submetidas a um campo elétrico, é realizada através da técnica de anemometria do laser Doppler associada à microeletroforese.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito das características de superfície de nanocápsulas poliméricas e das doses poliméricas empregadas sobre as concentrações plasmáticas e hepáticas dessas partículas após administração por via intravenosa em camundongos, visando determinar os limites de saturação do sistema fagocitário mononuclear e o uso de doses seguras para utilização endovenosa.

2.1. Objetivos Específicos

✓ Caracterizar as preparações de nanocápsulas de PLA com diferentes características superficiais: NC PLA; NC PLAPEG; NC PLAQUI 0,1% e PLAQUI 0,25% utilizando diferentes técnicas.

✓ Determinar a porcentagem de encapsulação e a eficiência de encapsulação do marcador fluorescente utilizado como traçador biológico das partículas.

✓ Determinar as concentrações plasmáticas e hepáticas das NP após 20 minutos da administração intravenosa das diferentes formulações e avaliar o efeito das modificações superficiais.

✓ Analisar o efeito das doses poliméricas sobre a capacidade de saturação do SFM.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Foram utilizados os seguintes polímeros e compostos: poly(*D,L*-lactídeo) (PLA PM ~75.000-120.000 Da), quitosana de baixo peso molecular (QUI) (CAS 9012-76-4, 75 a 85% desacetilada), AICIPc (cloro (29H, 31H-ftalocianato) de alumínio), ZnPc (Ftalocianina de Zinco) e Poloxamer (Pluronic® F68) que foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. O monometoxi-poli(etilenoglicol)-*bloco*-polilactídeo (PLA 61.000 Da e bloco PEG 5000 Da) (PLA-PEG) foi gentilmente doado pela Alkermes (EUA). O Miglyol® 810N (triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico) foi adquirido da Huls (Alemanha). A lecitina de soja (~ 70% de fosfatidilcolina) (Epikuron 170®) foi doada pela Lucas Meyer, França. Os seguintes solventes e reagentes foram utilizados; etanol grau CLAE (VETEC, Brasil), acetato de etila PA (Synth, Brasil), acetona grau CLAE (Sigma Aldrich), acetonitrila grau CLAE (J.T.Baker), metanol grau CLAE (Sigma Aldrich), dimetilformamida grau CLAE (VETEC, Brasil), dextrose PA (Synth, Brasil), fosfato de sódio monobásico PA (Synth, Brasil), fosfato de sódio dibásico PA (Synth, Brasil), bicarbonato de sódio PA (Synth, Brasil), cloreto de sódio PA (Synth, Brasil). A água de qualidade ultrapura MilliQ foi purificada no sistema Symplicity/System 185 (Millipore®) e usada em todos os experimentos.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo das nanocápsulas

As suspensões de NC contendo AICIPc, um marcador fluorescente para rastreamento das partículas nos estudos *in vivo*, foram preparadas método de nanoprecipitação, também denominada técnica de deposição interfacial de um polímero pré-formado seguido pela evaporação do solvente. Este método foi descrito por FESSI et al., em 1989, e está esquematizado na Figura 14.

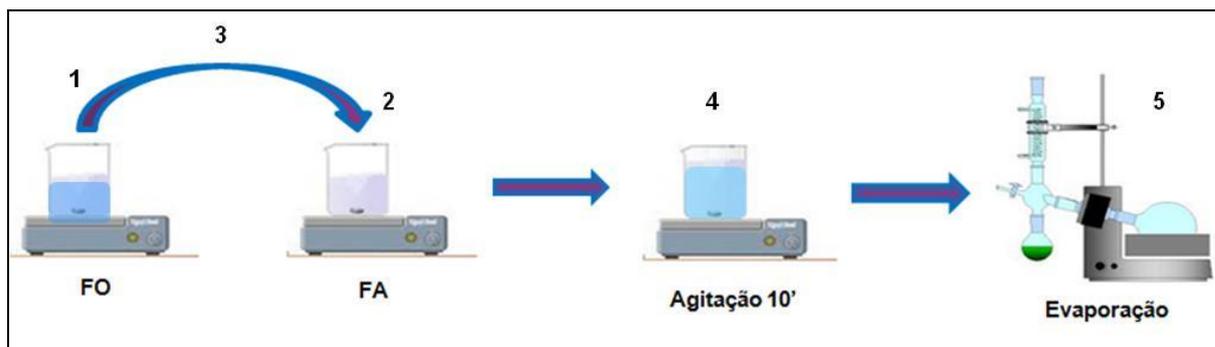


Figura 14: Representação esquemática das etapas da preparação das nanopartículas (NP). (1) Todos os componentes da fase orgânica (FO) são colocados sob agitação moderada até completa solubilização. (2) A solução aquosa, contendo ou não o tensoativo hidrofílico e demais componentes de fase aquosa (FA) também é mantida sob agitação. (3) A solução orgânica é vertida na solução aquosa, que é mantida sob agitação por 10 minutos para garantir a total dispersão das fases e deposição do polímero na interface. (4). Os solventes e o excesso de água são evaporados a pressão reduzida e em banho-maria a 40 °C (5).

Breves modificações no método descrito por Fessi foram realizadas no presente trabalho. Para as NC de PLAPEG não foi necessário adicionar o surfactante (poloxamer) à fase aquosa, visto que o bloco de PEG copolimerizado ao PLA, de acordo com MOSQUEIRA et al. (2001b), já exerce a função de redução da tensão superficial e estabilização estérica na interface.

Por serem requeridas massas muito pequenas de AICIPc para o preparo das formulações, e sendo esta substância altamente solúvel em etanol e pouco solúvel em acetona, optou-se por utilizar soluções etanólicas concentradas do referido marcador (soluções estoque), alíquotando-se o volume correspondente à massa desejada. Para as NC de PLA e PLAPEG utilizou-se uma solução etanólica contendo 0,2 mg/mL de AICIPc, enquanto para as NC PLAQUI foi necessário utilizar uma solução estoque de concentração igual a 1,0 mg/mL, utilizando-se assim o menor volume possível de etanol nessas formulações para evitar que a quitosana precipitasse, conforme observado por Oliveira (2009).

Uma nanoemulsão (NE) de AICIPc também foi preparada pelo método de nanoprecipitação, seguindo a mesma fórmula da NC PLA, retirando-se apenas o polímero da composição. Essa formulação foi utilizada nos testes *in vivo*, como sendo um controle do comportamento biológico das partículas testadas, na ausência da parede polimérica. A Tabela 1 apresenta as quantidades de cada constituinte requerido para a produção da NE e das NC.

Tabela 1: Relação dos constituintes e suas quantidades necessárias ao preparo das diferentes formulações

Formulação						
Constituintes		PLA	PLAPEG	PLAQUI 0,25%[#]	PLAQUI 0,1%[#]	NE
Fase Orgânica	Polímero (mg)	48	60	20 (PLA)	20 (PLA)	-
	Epikuron® (mg)	60	60	-	-	60
	Acetona (mL)	12	16	32	32	12
	AICIPc (mg)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
	Miglyol® (µL)	200	200	200	200	200
	¹ Etanol (mL)	12	16	-	-	12
Fase Aquosa	² Quitosana (mg)	-	-	20	8	-
	Pluronic® (mg)	60	-	60	60	60
	³ Água (mL)	48	64	64	64	48
Volume Final (após evaporação em mL)		8	8	8	8	8
Concentração Polimérica (mg/mL)		6	7,5	5 (2,5 PLA : 2,5 QUI)	3,5 (2,5 PLA:1,0 QUI)	-
Concentração Teórica AICIPc (mg/mL)		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

[#]Concentração de quitosana na formulação em p/v (essa nomenclatura será utilizada em todo o trabalho); ¹os valores descritos correspondem à quantidade total de etanol que contém na fase orgânica. Considerando o volume de solução estoque de AICIPc que é adicionado a essa fase, o restante de etanol foi inserido em quantidade suficiente para (q.s.p.) o volume mencionado; ²sabendo-se que a quitosana somente é solúvel em soluções aquosas de ácidos fracos diluídos, preparou-se uma solução estoque de concentração igual a 1 mg/mL em ácido acético 0,1M e utilizou-se o volume correspondente à massa de quitosana desejada; ³os valores descritos correspondem ao volume total de líquido da fase aquosa; para as formulações de quitosana, a água foi adicionada em q.s.p. o volume mencionado, ou seja, descontando o volume de solução estoque de quitosana utilizado.

Para a preparação das NC de PLA, a fase orgânica foi constituída de 12 mL de uma solução estoque de PLA dissolvido em acetona (concentração = 4,0 mg/mL), 60 mg de Epikuron 170® solubilizado em 8 mL de etanol, 200 µL de Miglyol® 810N e 4 mL de uma solução estoque de AICIPc 0,2mg/mL em etanol. A fase aquosa consistiu de um volume de 48 mL de água acrescidos de 60 mg de Pluronic® F68.

Dessa forma, foi mantida a proporção de 1 volume de fase orgânica para 2 volumes de fase aquosa (24:48). O solvente foi evaporado até um volume final de formulação de 8 mL em rotaevaporador Büchi-R3 (Suíça). Portanto, a concentração polimérica final na formulação foi de 6 mg/mL e a concentração teórica da AICIPc foi de 0,1 mg/mL.

Para a preparação das NC de PLAPEG, a fase orgânica foi constituída de 60 mg do polímero PLAPEG, 60 mg de Epikuron 170[®] solubilizado em 12 mL de etanol, 200 µL de Miglyol[®] 810N, 16 mL de acetona e 4 mL de uma solução estoque de AICIPc 0,2mg/mL em etanol. A fase aquosa consistiu de 64 mL de água. Também foi mantida a proporção de 1 volume de fase orgânica para 2 volumes de fase aquosa (32:64). E novamente o solvente foi evaporado até um volume final de formulação de 8 mL em rotaevaporador Büchi-R3 (Suíça). Portanto, a concentração polimérica final na formulação foi de 7,5 mg/mL e a concentração teórica da AICIPc foi de 0,1 mg/mL.

As NC de PLAQUI 0,25% foram preparadas pelo mesmo procedimento descrito por Oliveira (2009) e apresentado a seguir. Já as NC PLAQUI 0,1% tiveram a quantidade de quitosana na fase aquosa reduzida em 60% do valor presente na NC PLAQUI 0,25%, ou seja, retirando-se 1,5 mg de quitosana/mL de formulação final. Na formulação PLAQUI 0,25%, a fase orgânica consistiu de 5 mL de uma solução estoque de PLA em acetona (concentração = 4mg/mL), 200 µL de Miglyol[®] 810N, acrescentou-se mais 27 mL de acetona e 800 µL de uma solução estoque de AICIPc em etanol (1 mg/mL). Na fase aquosa, 50 mL de solução estoque de quitosana em ácido acético 0,1M (0,4 mg/mL) foram adicionados a 14 mL de água contendo 60mg de Pluronic[®] F68. A relação de fase oleosa/fase aquosa de 1:2 foi mantida (32:64). O volume final, após evaporação dos solventes foi de 8 mL. A concentração final dos polímeros foi 2,5 mg/mL de PLA e 2,5 mg/mL de QUI, e de AICIPc foi 0,1 mg/mL. Já a formulação PLAQUI 0,1% diferiu da anterior somente na quantidade de quitosana utilizada (8 mL de uma solução estoque em ácido acético 0,1M de concentração igual a 1,0 mg/mL). As proporções de fase orgânica/aquosa foram mantidas (32:64) e após a evaporação dos solventes, também para um volume final de 8 mL, as concentrações finais dos polímeros PLA, QUI e da AICIPc foram, respectivamente: 2,5 mg/mL 1,0 mg/mL e 0,1 mg/mL.

Para a realização dos estudos *in vivo* contemplando doses poliméricas a partir de 40 mg/kg foi necessário concentrar as formulações, evaporando-as, na etapa final, para um volume 4 vezes menor que o volume originalmente usado no preparo para as NC de PLA, PLAPEG, PLAQUI 0,25% e para a NE; e 9 vezes menor para as NC PLAQUI 0,1%. Desta forma, foi possível avaliar essas doses poliméricas em um volume máximo de injeção de 300 μ L. Para o preparo das formulações concentradas de NC PLA, NC PLAQUI 0,25% foi necessário manter a concentração final de AICIPc igual a 0,1mg/mL. Ou seja, a relação de massa de AICIPc adicionada por massa de polímero teve que ser reduzida, pois as partículas aglomeravam à medida em que a água da formulação era evaporada até o volume requerido para a concentração polimérica desejada. Já para as formulações de NC PLAPEG e NC PLAQUI 0,1%, as quantidades dos reagentes foram mantidas, uma vez que o processo de concentração das formulações não comprometeu a estabilidade das partículas. Para a formulação de NE concentrada, seguiu-se o mesmo procedimento de preparo da NC PLA, mantendo a concentração final de AICIPc igual a 0,1 mg/mL. Todo o procedimento foi realizado ao abrigo de luz, uma vez que o marcador fluorescente, AICIPc, é fotossensível.

3.2.2. Caracterização físico-química das nanocápsulas

3.2.2.1. Determinação do tamanho e do índice de polidispersão por EDL

O tamanho médio das NP (diâmetro hidrodinâmico médio) e o índice de polidispersão das suspensões foram determinados por EDL, utilizando o equipamento Nano Sizer série Nano ZS (Malvern, UK), no modo de leitura *back scatter signal* (ângulo de 173°). As amostras foram diluídas em água MilliQ (2 μ L de suspensão de NC para 4,0 mL de água) e 3 leituras, de aproximadamente 12-17 medidas em cada, foram efetuadas sobre cada diluição. Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão. Conforme estabelecido para as técnicas de EDL e pelo fabricante, índices de polidispersão inferiores a 0,3 correspondem a amostras monodispersas.

3.2.2.2. Determinação da carga de superfície (potencial zeta)

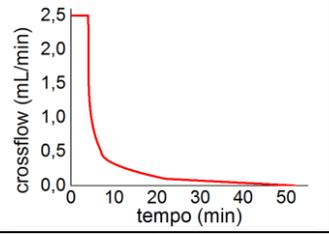
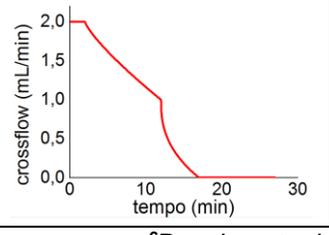
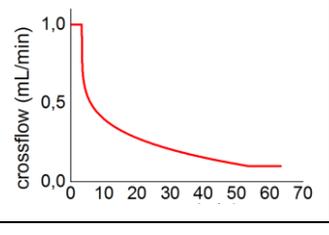
O potencial zeta (ζ) foi determinado pela técnica de microeletroforese associada à anemometria de laser Doppler (ALD), utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). As amostras foram analisadas diluindo-se 2 μL da suspensão de nanopartículas em 3000 μL de água ultrapurificada MilliQ®. Essa diluição foi adequada para a realização das medições, certificadas por um laudo dado pelo equipamento após cada leitura: “*results meets quality criteria*”, ou seja, satisfazendo os critérios de qualidade para uma boa leitura em termos de contagem de número de partículas e ausência de agregados macroscópicos (*dust*). Três leituras da mesma amostra, de 12-17 corridas cada, foram realizadas pelo equipamento e os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão.

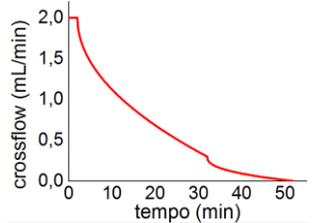
3.2.2.3. Caracterização de tamanho e forma por fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4).

As distribuições de raio de giração e de raio hidrodinâmico das partículas nas diferentes formulações foram caracterizadas, simultaneamente, utilizando a técnica de AF4 acoplada aos detectores de UV, EEL (MALLS) e EDL. Para isso, foi utilizado um fracionador Postnova Analytics AF2000 MT acoplado ao detector de radiação ultravioleta, modelo PN3211 (λ : 260 nm), ao detector de MALS, modelo PN 3621, e, por último, ao detector de EDL Malvern Zeta Sizer Nano ZS (programado para aquisição de dados em cada 3 segundos) todos em linha. O AF4 foi programado para o modo de amostragem automática, e o canal de separação foi montado com uma membrana de celulose regenerada, permeável a substâncias de massa molar inferior a 5 kDa (Postnova), e um espaçador de formato trapezoidal e espessura de 350 μm . Em todas as análises, a água Milli-Q foi filtrada em membrana 0,1 μm (MerckMillipore) e utilizada tanto como líquido carreador, como para a diluição das amostras até a concentração adequada (Tabela 2). As bombas *tip flow*, *focus flow* e *cross flow* foram programadas de modo que o fluxo resultante, de saída para os detectores, fosse igual a 0,5 mL/min durante toda a corrida, pois fluxos maiores impedem leituras corretas por EDL. Basicamente, o processo de separação das partículas se dá em duas etapas: o passo de injeção e focagem da amostra

no canal, no qual todas as bombas entram em operação; e o passo de eluição da amostra, em que a *cross flow* governa as taxas de fluxo em operação com a *tip flow* atuando de forma sincronizada. A Tabela 2 apresenta as condições de fluxo adotadas em cada método de fracionamento, aplicado a cada formulação.

Tabela 2: Métodos de fracionamento das NP.

Formulação	Concentração da Amostra	Volume de Injeção	Passo de Focagem da Amostra	Passo de Eluição da Amostra	
NC PLA	0,600 mg/mL	5 µL	¹ Fluxo de injeção (mL/min) 0,3	⁶ Decaimento da bomba <i>cross flow</i> (Cross-Flow Rate) (mL/min) 	
			² Tempo de injeção (min) 1,0		2,5 por 2' (constante)
			³ Fluxo de focagem (mL/min) 2,7		2,5 → 0,5 em 3' (<i>power</i> 0,2)
			⁴ Fluxo cruzado (mL/min) 2,5		0,5 → 0,1 em 15' (<i>power</i> 0,5)
			⁵ Tempo de transição (min) 1,0		0,1 → 0,0 por 30' (linear)
			<i>Tempo total de corrida (min)</i> 52,0		
NC PLAPEG	0,382 mg/mL	20 µL	¹ Fluxo de injeção (mL/min) 0,3	⁶ Decaimento da bomba <i>cross flow</i> (Cross-Flow Rate) (mL/min) 	
			² Tempo de injeção (min) 1,0		2,0 → 1,0 em 10' (<i>power</i> 0,8)
			³ Fluxo de focagem (mL/min) 2,2		1,0 → 0,0 em 5' (<i>power</i> 0,4)
			⁴ Fluxo cruzado (mL/min) 2,0		0,0 por 10' (constante)
			⁵ Tempo de transição (min) 1,0		
			<i>Tempo total de corrida (min)</i> 27,0		
NC PLAQUI 0,25% e PLAQUI 0,1%	0,250 mg/mL e 0,175 mg/mL	10 µL e 50 µL, respec.	¹ Fluxo de injeção (mL/min) 0,2	⁶ Decaimento da bomba <i>cross flow</i> (Cross-Flow Rate) (mL/min) 	
			² Tempo de injeção (min) 3,0		1,0 → por 0,2' (constante)
			³ Fluxo de focagem (mL/min) 1,3		1,0 → 0,1 em 50' (<i>power</i> 0,2)
			⁴ Fluxo cruzado (mL/min) 1,0		0,1 por 10' (constante)
			⁵ Tempo de transição (min) 0,2		
			<i>Tempo total de corrida (min)</i> 63,4		

NE	Equivalente a 0,3 mg/mL de NC de PLA	20 μ L	¹ Fluxo de injeção (mL/min)	0,3	⁶ Decaimento da bomba <i>cross flow</i> (<i>Cross-flow Rate</i>) (mL/min)	
			² Tempo de injeção (min)	1,0		
			³ Fluxo de focagem (mL/min)	2,2		2,0 \rightarrow 0,3 em 30' (<i>power</i> 0,5) 0,3 \rightarrow 0,0 em 20' (<i>power</i> 0,4)
			⁴ Fluxo cruzado (mL/min)	2,0		
			⁵ Tempo de transição (min)	1,0		
			<i>Tempo total de corrida (min)</i>	52,0		

1) Fluxo de injeção: fluxo gerado pela bomba *Tip flow* e sobre o qual a amostra é injetada no canal de separação. 2) Tempo de injeção: tempo gasto para que a amostra seja completamente injetada no canal de separação. 3) Fluxo de focagem: fluxo bidirecional que é operado pela bomba *Focus flow* enquanto a amostra é injetada no canal pela *Tip flow*, de forma a concentrá-la em uma pequena região, anteriormente ao início da separação, para evitar alargamentos de pico, devido à difusão lateral das partículas, e formando uma camada de espessura média de partículas pelo encontro com o fluxo de injeção. 4) Fluxo cruzado (*Cross flow*): fluxo que sai perpendicularmente do canal de separação pela bomba *Cross flow* e que durante o passo de focagem é constante. 5) Tempo de transição: tempo em que as válvulas das três bombas são comutadas para alternar os fluxos das mesmas para, na sequência, iniciar a separação. A *Focus flow* tem seu funcionamento reduzido a zero, enquanto a *Tip flow* passa a operar com o fluxo total que entra no canal, anteriormente dividido pela *Tip* e pela *Focus*. O fluxo da *Cross flow* ainda permanece constante nessa etapa. 6) Decaimento da bomba *Cross flow* (*Cross-flow Rate*): redução controlada da velocidade de fluxo (vazão) da bomba *Cross flow*, ao longo do tempo estabelecido no método, e que efetivamente promove o fracionamento das partículas no interior do canal. Essa redução pode ser um decaimento linear do fluxo da referida bomba ou um decaimento exponencial (*power*).

3.2.2.4. Determinação da porcentagem e eficiência de encapsulação do marcador fluorescente nas formulações

3.2.2.4.1. Condições de quantificação da AICIPc por CLAE

A quantificação da AICIPc nas amostras foi realizada empregando-se um método analítico por CLAE acoplada a detector de fluorescência (FLU), descrito por Oliveira (2009) com pequenas modificações. Foi empregada uma pré-coluna Phenomenex[®] cartucho Gemini NX C18 4 x 3.0 mm, modelo AJ0-8368-S, para evitar o rápido desgaste da coluna, uma Thermo Scientific[™] Hypersil[™] BDS C18 5 µm, de 250 x 4,6 mm. A fase móvel foi composta da mistura: metanol e dimetilformamida (DMF), na proporção 85:15 (v/v), filtrada em membrana FHLC com 47 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm (Millipore[®]), e degaseificada em banho ultrassônico por 10 minutos. O sistema (Waters Alliance 2695) foi programado para um fluxo de 0,8 mL/min, temperatura de 30°C, volume de injeção das amostras de 10 µL e tempo de corrida de 7 minutos. Os comprimentos de onda de excitação e emissão, adequados para a detecção do marcador fluorescente, AICIPc, foram 610 e 675 nm, respectivamente, e o detector utilizado um Waters modelo 2475.

3.2.2.4.2. Preparo das amostras

Todo o procedimento foi seguido conforme Oliveira (2009) e ao abrigo de luz. Uma curva analítica foi injetada anteriormente às amostras para que a concentração do marcador fluorescente, presente nas mesmas, fosse calculada utilizando a equação da reta então obtida. A curva foi preparada a partir de diluições seriadas de uma solução estoque de AICIPc em etanol (concentração igual a 100 µg/mL) até a obtenção de oito padrões de calibração, de concentração 0,025; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 5,0 µg/mL. Cada um desses padrões de calibração foi injetado três vezes. A média das áreas correspondentes a cada concentração foi utilizada para construir o gráfico e determinar a equação da reta de linearidade.

A **porcentagem de encapsulação** é a quantidade percentual de marcador associado às NC em relação ao total do marcador presente na suspensão coloidal. O seu cálculo foi realizado pela diferença entre a concentração total de AICIPc na suspensão coloidal após a filtração (Figura 15-II) e a concentração solúvel não

encapsulada (quantidade solúvel livre, dissolvida na fase aquosa e representada pelo ultrafiltrado, figura 15-V), dividido pela concentração total na formulação após a filtração (Figura 15-II), conforme a equação 1:

$$\% \text{ Encapsulação} = \frac{(C^{\text{Total (II)}} - C^{\text{Ultrafiltrado (V)}}) \times 100}{C^{\text{Total (II)}}} \quad (1)$$

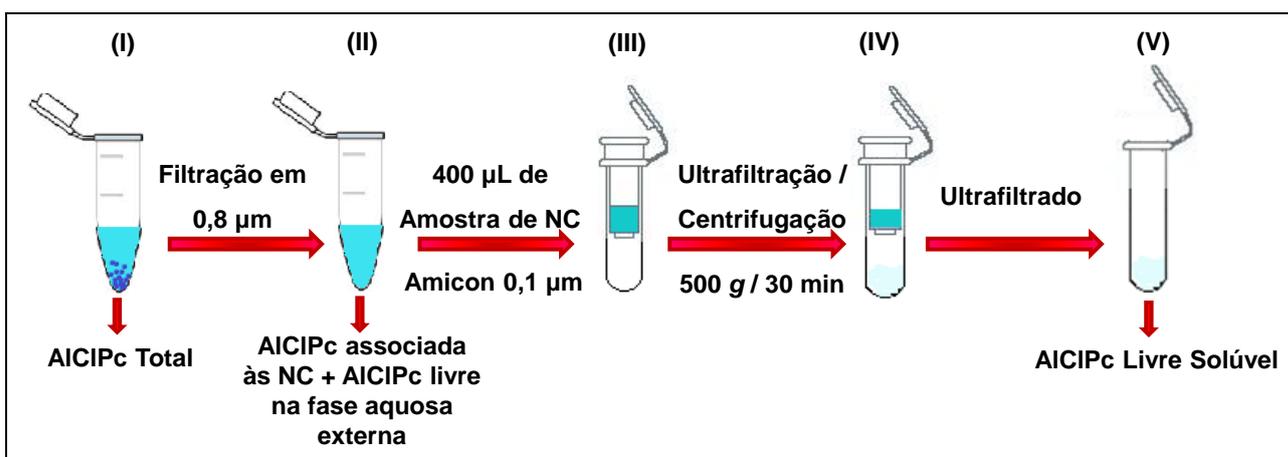


Figura 15: Representação esquemática das dosagens de AICIPc realizadas nas formulações de NP para determinação da porcentagem de encapsulação e eficiência de encapsulação.

Dessa forma, para calcular a concentração total de AICIPc (não precipitada) na amostra (C^{Total} em mg/mL), a suspensão de NC foi previamente filtrada em filtro de seringa 0,8 µm (Durapore Millipore®) para a remoção da quantidade de AICIPc precipitada. Em seguida, uma alíquota de 25 µL do material filtrado foi adicionada a 625 µL de uma mistura de etanol:acetonitrila (50:50) em tubo eppendorf®, que foi levado ao vórtex por 5 min e, posteriormente, submetido a centrifugação a 500×g por 30 minutos. Esse procedimento rompeu as nanocápsulas, liberando o marcador encapsulado na solução. O sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa de PVDF 0,45 µm e 10 µL foram injetados no cromatógrafo para a quantificação. Todo o procedimento foi realizado em duplicata.

Para determinar a concentração de AICIPc solúvel na fase aquosa externa, ou seja, a fração livre ($C^{\text{Ultrafiltrado (V)}}$ em mg/mL), 400 µL da amostra filtrada foi colocada em um dispositivo AMICON (Millipore®) de 0,1 µm (Figura 15-III). Este, por sua vez, foi levado à centrifugação a 500×g por 30 minutos (Figura 15-IV), de maneira que toda AICIPc associada às NC ficasse retida na parte superior do dispositivo,

passando através da membrana somente a quantidade solúvel na fase aquosa externa da suspensão (ultrafiltrado, figura 15-V). Então a 25 µL do ultrafiltrado foram adicionados 100 µL da mistura etanol:acetonitrila (50:50). Agitou-se a mistura em vórtex, por 15 min, e centrifugou-se a 500×g, por 15 min. A solução resultante foi filtrada em membrana PVDF 0,45 µm e 10 µL foram injetados no cromatógrafo. Todo o procedimento foi realizado em duplicata.

A **eficiência de encapsulação** é a determinação do rendimento do processo de encapsulação como um todo. É a porcentagem de AICIPc efetivamente associada às NC sobre a quantidade total colocada na formulação (expressa pela concentração teórica de AICIPc na formulação em mg/mL). Dessa forma, esse cálculo deixa evidente as perdas que ocorrem durante todas as etapas de preparo (por exemplo, perdas por precipitação do marcador), conforme explicitado na equação 2.

$$\% \text{ Eficiência Encapsulação} = \frac{(C^{\text{Total (II)}} - C^{\text{Ultrafiltrado (V)}})}{C^{\text{Total pesada}}} \times 100 \quad (2)$$

3.2.3. Determinação das concentrações plasmáticas e hepáticas de AICIPc

3.2.3.1. Animais

Camundongos Swiss fêmeas, pesando entre 25 a 30 g, foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e mantidos no biotério central da universidade, em salas climatizadas, com ciclos padronizados de claro/escuro e com livre acesso a ração e água. O protocolo experimental foi aprovado junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP (número 2014/20) contemplando todos os experimentos, que seguiram as normas do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2.3.2. Delineamento experimental

O estudo foi conduzido utilizando-se, ao todo, 150 animais, dos quais 128 foram randomicamente divididos em 32 grupos de 4 animais. A tabela 3 contempla todos os grupos e as doses avaliadas, em mg de polímero por quilograma de peso de animal, para cada formulação. Antes da administração intravenosa, as formulações foram diluídas em dextrose 5% de modo que o volume máximo de líquido administrado em cada animal fosse de 300 μ L. Os demais animais foram utilizados para a extração dos tecidos brancos (plasma e fígado), necessários para a confecção das curvas analíticas para quantificação dos tecidos dos animais em experimentação.

Tabela 3: Divisão dos grupos de animais e doses avaliadas para cada formulação.

Formulação	Doses avaliadas (mg de polímero/kg de peso do animal)							
	3	12	24	40	80	100	120	160
NC PLA	x	x	x	x	x			x
NC PLAPEG	x	x	x	x				x
NC PLAQUI 0,1%	x	x	x	x	x		x	x
NC PLAQUI 0,25%	x	x	x	x	x	x	x	x
NE	x	x	x	x	x			x

As células marcadas com o "x" na cor preta correspondem às doses de cada formulação em que os experimentos foram realizados satisfatoriamente; aquelas marcadas com o "x" em vermelho correspondem aos grupos em que a dose administrada foi letal aos animais e as células na cor cinza correspondem às doses que não foram avaliadas para uma determinada formulação.

Para a administração da formulação de NC PLAQUI 0,25% nas doses de 3, 12 e 24 mg/kg foi necessário neutralizar a formulação imediatamente antes da administração nos animais, adicionando bicarbonato de sódio 1M gota a gota até que o pH estivesse entre 6,8- 6,9; para as doses a partir de 40 mg/kg foi necessário dialisar a formulação até obtenção da mesma faixa de pH citada. Não foi possível proceder como anteriormente, uma vez que a quantidade de bicarbonato requerida nessas situações era muito alta e as partículas agregavam quase instantaneamente após sua adição. Para a formulação de NC PLAQUI 0,1% até a dose de 80 mg/kg foi possível neutralizar o pH com bicarbonato. A partir daí, também foi necessário dialisar a formulação. Esses procedimentos de neutralizar e dialisar essas duas formulações foram necessários devido ao fato de ambas possuírem o pH levemente

ácido (entre 4 e 5), decorrente do uso da solução estoque de quitosana em ácido acético glacial 0,1M durante o preparo das mesmas.

Todas as formulações foram filtradas em Millex HV 0,8 µm (Millipore®) antes da administração intravenosa. Foi considerado o peso médio dos animais de cada grupo para os cálculos das doses de polímero (mg/kg) a serem administradas. Após 20 minutos da administração intravenosa das formulações pela veia caudal dos animais, aproximadamente 1,0 mL de sangue foi retirado pelo sinus retro-orbital de cada animal. Os camundongos foram, então, sacrificados por deslocamento cervical e os seus órgãos retirados, lavados em solução de PBS gelada, secos em papel de filtro, para retirar o excesso da solução e de sangue, pesados e congelados a -80°C. O sangue foi coletado em tubos heparinizados e então centrifugados por 10 min a 2500 rpm para separação do plasma, que foi congelado a -80°C até o momento da análise.

3.2.3.3. Método cromatográfico bioanalítico para quantificação da AICIPc em amostras de plasma e fígado

O método bioanalítico por CLAE-FLU descrito por Oliveira (2009) foi utilizado com pequenas modificações. Uma pré-coluna Phenomenex® cartucho gemini NX C18 4 x 3.0 mm, modelo AJ0-8368-S, foi acoplada à coluna cromatográfica, uma Hypersil BDS C18 5 µm, de 250 x 4,6 mm, para protegê-la da rápida perda de eficiência. A fase móvel foi composta da mistura: metanol e dimetilformamida (DMF), na proporção 85:15 (v/v), filtrada em membrana FHLC de 47 mm de diâmetro com poro de 0,45 µm (Millipore®), e degaseificada em banho ultrassônico por 10 minutos. O sistema (Waters Alliance 2695) foi programado para um fluxo de 0,8 mL/min, temperatura de 30°C, volume de injeção das amostras de 20 µL e tempo de corrida de 14 minutos. O detector de fluorescência usado foi um Waters modelo 2475 nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 610 e 675 nm, respectivamente, para a detecção da AICIPc e do padrão interno (PI), a ftalocianina de zinco (ZnPc). Os tempos de retenção obtidos para a AICIPc e a ZnPc foram aproximadamente 4,2 e 11 minutos, respectivamente.

3.2.3.4. Extração e quantificação da AICIPc das amostras de plasma

Todo o procedimento de extração da AICIPc nas amostras oriundas dos plasmas foi realizado conforme descrito por Oliveira (2009). Para a confecção das curvas de calibração, utilizadas para quantificar as amostras de plasma dos animais, soluções padrão de trabalho de concentrações igual a 150, 200, 400, 500, 800, 900 e 1000 ng/mL de AICIPc foram preparadas em etanol grau HPLC (a partir da diluição de uma solução estoque etanólica de concentração igual a 10 µg/mL) e armazenadas em freezer, a -20 °C, até utilização das mesmas. Um “pool” de plasma de animais que não receberam as formulações (plasma branco) foi utilizado para o preparo das curvas. Assim, 80 µL do “pool” foram transferidos para tubos de microcentrífuga de 2,0 mL. Em seguida, foram adicionados, em cada um deles, 10 µL de cada solução padrão de trabalho e, em todos eles, 10 µL de uma solução estoque de PI preparada em etanol (concentração de ZnPc igual a 5000 ng/mL), conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Volumes e soluções utilizadas para preparar os padrões de calibração para quantificação de AICIPc em plasma de camundongos.

Curva de Calibração Método Bioanalítico					
Quantificação de AICIPc em Plasma					
Solução Pd de Trabalho (ng/mL)	Volume de Sol Pd de Trabalho (µL)	Volume (µL) de PI ZnPc (5000 ng/mL)	Volume de Plasma (µL)	Padrão de Calibração	
				Concentração Final de ZnPc (ng/mL)	Concentração Final de AICIPc (ng/mL)
150	10	10	80	500	15
200	10	10	80	500	20
400	10	10	80	500	40
500	10	10	80	500	50
800	10	10	80	500	80
900	10	10	80	500	90
1000	10	10	80	500	100

A última coluna, concentração final de AICIPc, mostra a faixa de concentração para a construção da curva de calibração injetada no cromatógrafo, considerando as etapas de extração, evaporação e reconstituição dos padrões de calibração.

Os tubos foram agitados em vórtex, por 15 segundos, e 500 µL de acetato de etila foram adicionados logo em seguida para iniciar a extração. As amostras foram, então, agitadas em vórtex, por 10 minutos, e centrifugadas a 9300 x g, também por

10 minutos. A camada superior foi retirada e armazenada em outro tubo. Mais dois passos de extração com 500 µL de acetato de etila, vórtex por 10 minutos e centrifugação a 9300 g foram realizados. O “pool” das camadas orgânicas coletadas foi, então, evaporado até *secura* em dessecador submetido a vácuo. As amostras foram reconstituídas em 100 µL de fase móvel (MeOH:DMF 85:15), agitadas por 20 minutos em vórtex, centrifugadas a 9300 x g por 10 minutos e filtradas em Millex®LH (0,45 µm, 4mm) diretamente para *vial* de polipropileno com *insert*, que foi levado ao cromatógrafo para quantificação. Uma vez que as ftalocianinas são fotossensíveis, todas as etapas do procedimento (extração, evaporação e reconstituição) foram realizadas ao abrigo da luz.

A extração dos plasmas dos animais deu-se da mesma forma descrita para a curva de calibração; partindo de amostras de 80 µL contaminadas com 10 µL de PI. Entretanto, para algumas das doses avaliadas e em algumas formulações, após a reconstituição da amostra com os 100 µL de fase móvel foi necessário realizar uma diluição, de maneira que as áreas dos picos ficassem compreendidas entre o limite de quantificação inferior e o superior da curva de calibração. Para calcular a porcentagem de fluorescência detectada em relação à administrada, quantificou-se o total de AICIPc presente no volume administrado de cada formulação, conforme o procedimento descrito no item 2.2.4. Além disso, foi considerado que o volume total de plasma em cada camundongo Swiss equivale a 4,5% do seu peso corporal (JACOBY; FOX, 1984).

3.2.3.5. Extração e quantificação da AICIPc das amostras de fígado

Frações de fígado de animais que não receberam as formulações (0,2 g de fígado branco) foram colocadas em tubos de microcentrífuga de 2,0 mL nos quais se adicionou 0,5 mL de PBS (pH 6,5). Os tecidos foram, então, triturados em banho de gelo, em um processador ultrassônico contendo uma sonda metálica e haste de titânio, modelo Vibra Cell™ VC750 300W, configurado com a amplitude de 40% e 20 segundos de operação por amostra. Foram transferidos 80 µL dos homogenatos resultantes para outros tubos de microcentrífuga e adicionados 10 µL de solução estoque de PI (ZnPc 5000 ng/mL) e o volume de solução estoque de AICIPc (1000 ng/mL) correspondente à obtenção de cada padrão de calibração (7.5, 9, 10, 20, 30, 40 e 50 µL), conforme a apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Volumes e soluções utilizadas para preparar os padrões de calibração para quantificação de AICIPc em fígado de camundongos.

Curva Calibração Método Bioanalítico					
Quantificação de AICIPc em Fígado					
Solução Estoque AICIPc (ng/mL)	Volume de Sol Estoque (µL)	Volume (µL) de PI ZnPc (5000 ng/mL)	Volume de homogenato Fígado (µL)	Padrão de Calibração	
				Concentração Final de ZnPc (ng/mL)	Concentração Final de AICIPc (ng/mL)
1000	7,5	10	80	500	75
	9	10	80	500	90
	10	10	80	500	100
	20	10	80	500	200
	30	10	80	500	300
	40	10	80	500	400
	50	10	80	500	500

A coluna de concentração final de AICIPc demonstra a faixa de concentração da curva injeta no cromatógrafo, considerando as etapas de extração, evaporação e reconstituição (100 µL) dos padrões de calibração.

Para iniciar a extração, acrescentou-se 0,4 mL de acetonitrila. Os tubos foram, então, deixados em agitação no vórtex, por 60 minutos, centrifugados a 9300 x *g*, por 15 minutos, e o líquido resultante foi removido para outro tubo de microcentrífuga para evaporação. Esse procedimento de extração foi repetido mais duas vezes e o “pool” das 3 etapas foi completamente evaporado em dessecador. Uma nova etapa de extração com 0,5 mL de acetonitrila foi realizada, deixando os tubos sob agitação em vórtex por 60 minutos; em seguida foram centrifugados a 9300 x *g*, por 15 minutos, e, novamente, os sobrenadantes foram coletados em tubos de microcentrífuga e deixados em dessecador, submetido a vácuo e ao abrigo de luz, para evaporarem até *secura*. O resíduo foi, então, reconstituído em 100 µL de fase móvel (MeOH:DMF 85:15) e os tubos foram agitados em vórtex por 20 minutos e centrifugados a 9300 x *g* por mais 15 minutos. Finalmente, os padrões de calibração foram filtrados em Millex®LH (0,45 µm, 4mm) diretamente para *vial* de polipropileno com *insert* e levados ao cromatógrafo para quantificação.

As amostras de fígado dos animais em estudo (0,2 g) foram preparadas igualmente aos padrões da curva de calibração. Assim, foram trituradas com 0,5 mL de PBS, em banho de gelo, e submetidas a todo o procedimento de extração

descrito, após a adição de 10 μ L do PI. Além disso, após a reconstituição em 100 μ L fase móvel e injeção no cromatógrafo, foi avaliada a necessidade de diluição dessas amostras em fase móvel, para garantir a quantificação dentro da faixa de linearidade do método (75-500 ng/mL), contemplada pela curva anteriormente citada. Os resultados obtidos a partir da equação da reta foram convertidos de ng/mL para μ g de AICIPc em fígado total, considerando uma massa de 66,2 g de fígado por quilograma de peso corporal do camundongo (GAD, 2008). A porcentagem de fluorescência detectada no fígado em relação à administrada também foi avaliada.

3.2.3.6. Análise estatística

Os dados dos estudos *in vivo* foram avaliados estatisticamente utilizando o programa Prisma 5.0. O teste estatístico ANOVA one way para comparação múltipla, seguido por um teste-t paramétrico com o pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, considerando diferença estatística significativa quando p apresentou valor menor ou igual a 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparo das nanopartículas

As cinco formulações de nanopartículas (NP) estudadas neste trabalho foram obtidas utilizando o método de nanoprecipitação, que se mostrou simples e reprodutível. São elas: NC de PLA, tanto convencional, quanto de superfície modificada (pelo uso do copolímero em bloco PLAPEG, NC PLAPEG, ou pela adsorção de quitosana em duas concentrações distintas, NC PLAQUI 0,1% e NC PLAQUI 0,25%), além de uma NE, utilizada como controle nos ensaios *in vivo*.

O método de nanoprecipitação possui a grande vantagem de não requerer o uso de solventes organoclorados potencialmente tóxicos para o preparo das partículas (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Ao contrário usa solventes de baixo ponto de ebulição, como acetona, metanol ou etanol, facilmente elimináveis da preparação. Além disso, para o uso intravenoso dessas formulações, etapas adicionais de purificação não são necessárias, uma vez que os constituintes utilizados no preparo das partículas são biocompatíveis (CHORNY et al., 2002). A Figura 16 esquematiza a estrutura das NP preparadas, as quais foram caracterizadas quanto aos seus parâmetros de tamanho, índice de polidispersão, carga de superfície e forma antes de serem utilizadas nos ensaios *in vivo*. Também foram avaliadas as porcentagens de encapsulação e eficiência de encapsulação do marcador nessas formulações.

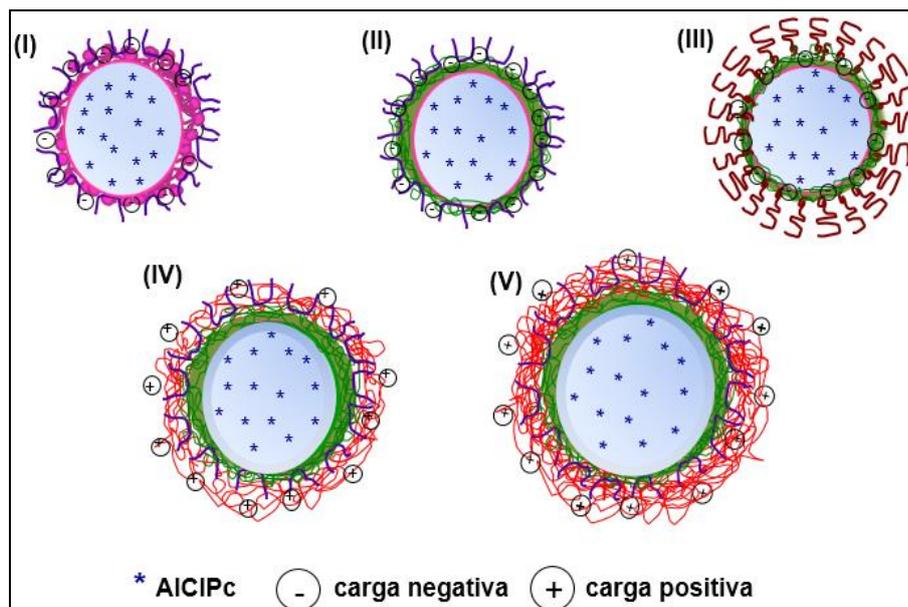


Figura 16: Representação esquemática da estrutura e constituição das nanopartículas. (I) NE, (II) NC convencional de PLA, (III) NC de circulação sanguínea prolongada, NC PLAPEG, (IV) e (V) NC de superfície carregada positivamente, NC PLAQUI 0,1% e 0,25%, respectivamente. Em verde: parede polimérica; em rosa: lecitina; em roxo: poloxamer; em vinho: cadeias de PEG; em vermelho: quitosana.

4.2. Caracterização físico-química das nanopartículas

4.2.1. Determinação da carga de superfície (potencial zeta)

Avaliando os dados de potencial zeta das formulações (Tabela 6), podemos observar que todas as NP se apresentaram carregadas em meio aquoso, sendo estabilizadas por repulsão eletrostática superficial.

Tabela 6: Caracterização da carga de superfície das formulações em estudo.

Formulação	NC PLA	NC PLAPEG	NE	NC PLAQUI 0,10%	NC PLAQUI 0,25%
Potencial Zeta ζ (mV) \pm DP ¹	-44 \pm 4	-35 \pm 1	-36,0 \pm 0,2	+25,6 \pm 0,3	+26,5 \pm 0,2

1. Desvio Padrão das leituras (n=3) de um lote de amostra.

De acordo com um estudo realizado por Mosqueira et al. (2000), no qual a influência da composição da formulação nas propriedades físico-químicas e

estruturais de nanocápsulas de PLA foi sistematicamente avaliada, todas as propriedades (carga, tamanho, índice de polidispersão e estabilidade) das NC foram altamente relacionadas com a presença da lecitina na formulação, particularmente o ácido fosfatídico como contaminante na mistura de fosfolipídeos do Epikuron 170[®]. Ou seja, há influência da pureza da lecitina sobre o potencial zeta. Para confirmar esse resultado, dois tipos de lipossomas foram preparados: um utilizando o referido Epikuron e o outro utilizando Epikuron 200[®] (uma lecitina pura, com menor teor de ácido fosfatídico), e os autores compararam os valores de carga de superfície obtidos. O resultado apontou que a pureza da lecitina foi fortemente responsável pela carga imposta na superfície desses sistemas. Da mesma forma, se justifica o valor negativo do potencial zeta encontrado para a formulação de NC PLA (-44,3 mV) e na NE (-36,0 mV), mesmo que em ambas as formulações o poloxamer (um tensoativo não-iônico de subunidades de polietileno óxido e polipropileno óxido) esteja adsorvido na superfície das partículas. A diferença significativa de valor de potencial zeta entre as duas formulações se deve, nesse caso, à presença do PLA que aumentou a negatividade da superfície devido à presença dos grupamentos polarizáveis ao longo do poliéster em relação as NE.

Nas NC PLAPEG, o valor de zeta foi significativamente reduzido em relação ao PLA ($p < 0.05$), comprovando a eficiência deste polímero na blindagem das cargas superficiais. No entanto, os valores de zeta são ainda bastante negativos (-34,7 mV) devido à presença da lecitina nessa formulação. Como já discutido anteriormente, a fase oleosa contém o Epikuron 170[®], uma lecitina de soja, que apesar de ser constituída por fosfatidilcolina em sua maioria (aproximadamente 70%), ela também contém o ácido fosfatídico, que pode ser o responsável, nesse caso, pela carga negativa na superfície dessas partículas (MOSQUEIRA et al., 2000).

As formulações contendo quitosana apresentaram um potencial zeta positivo, condizente com a presença do polímero poliacatiônico na superfície das nanoestruturas e sem a influência das cargas negativas impostas pelo ácido fosfatídico, já que na composição dessa formulação não consta o Epikuron 170[®]. A quantidade de quitosana utilizada não influenciou significativamente na carga superficial, o que pode indicar que acima de 0,1% de quitosana há um excesso desse polissacarídeo, que não necessariamente está associado à superfície e, portanto, não influencia o potencial superficial. Nessas partículas é a protonação dos

grupos amina presentes nas subunidades N-deacetiladas da quitosana que confere uma densidade de carga altamente positiva, promovendo a solubilização do polímero no meio aquoso (MACLAUGHLIN et al., 1998). Assim, pode-se dizer que o potencial zeta nessas formulações é influenciado também pelo grau de protonação dos grupos amina. Os valores de potencial obtidos, menores que +30 mV, podem ser responsáveis pela agregação das NC de PLAQUI ou pela sua menor estabilidade ao longo do tempo em relação às de PLA e PLAPEG (dados não mostrados).

De acordo com Clogston e Patri (2011), NP contendo potencial zeta entre -10 e +10 mV são consideradas praticamente neutras; enquanto valores maiores, em módulo, que 30 mV são consideradas fortemente aniônicas ou catiônicas e são efetivamente estabilizadas por repulsão elétrica em meio líquido. Esses valores positivos ou negativos são, sobretudo, influenciados pela natureza química do polímero e dos materiais utilizados para a modificação da superfície das partículas, em termos dos grupos funcionais ionizáveis ou polarizáveis em função do meio líquido em que se encontram (SOPPIMATH et al., 2001). As cargas presentes na superfície das partículas interferem não só na estabilidade das formulações, mas também no modo como as células interagem com essas partículas. Portanto, o potencial zeta é um importante parâmetro para a farmacocinética e biodistribuição dessas nanoestruturas (ALBANESE; TANG; CHAN, 2012). Uma vez que a maioria das membranas celulares é carregada negativamente, as partículas catiônicas, como as de PLAQUI, podem interagir mais facilmente com as células e até mesmo ocasionar toxicidade (CLOGSTON; PATR, 2011).

4.2.2. Determinação do tamanho e do índice de polidispersão por EDL

O tamanho e a carga de superfície das nanopartículas têm grande influência no modo como estas estruturas interagem com as células e com os componentes sanguíneos. São, portanto, fatores cruciais para a extensão com que elas se distribuem pelo organismo. O diâmetro hidrodinâmico médio (D_h) e o índice de polidispersão (IP) de cada formulação foram medidos em triplicata por espalhamento dinâmico da luz (EDL), no modo batelada, através do equipamento Nanosizer Nano ZS, leitura realizada em *backscattering* a 173° (Tabela 7).

Tabela 7: Diâmetro hidrodinâmico (D_h) e índice de polidispersão (IP) das formulações em estudo.

Formulação	NE	NC PLA	NC PLAPEG	NC PLAQUI 0,1%	NC PLAQUI 0,25%
$D_h \pm DP^*$ (nm)	133,0 \pm 1	181 \pm 2	204 \pm 1	248 \pm 5,0	297 \pm 1
$IP \pm DP^*$	0,15 \pm 0	0,19 \pm 0,04	0,11 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02	0,19 \pm 0,04

*Média de três determinações \pm desvio padrão.

As formulações apresentaram tamanhos médios compreendidos entre 133 e 297 nm. Os tamanhos obtidos são adequados para o uso intravenoso das mesmas. Nessa situação, o tamanho deve ser controlado para prevenir a oclusão dos capilares de menor calibre, compreendidos entre 4 a 7 micrômetros (CHORNY et al., 2002). De acordo com GAUMET et al. (2008), as medidas de tamanho sem a correspondente informação da distribuição de tamanho da amostra nada dizem sobre a homogeneidade da mesma, sendo que formulações de partículas monodispersas são fundamentais para aplicações biológicas. Por conseguinte, observando a distribuição de tamanho das diferentes suspensões coloidais preparadas, representada na Tabela 7 pelos valores de índice de polidispersão (IP), é possível verificar que todas se apresentaram monodispersas, uma vez que foram obtidos valores abaixo de 0,3 (limite especificado para a técnica utilizada). Portanto, essas formulações foram consideradas adequadas para a administração intravenosa, um dos focos do nosso trabalho, pois favorecem uma biodistribuição mais uniforme dessas nanopartículas.

Avaliando os valores de D_h obtidos, é possível perceber que estes estão relacionados com a natureza e constituição de cada formulação, uma vez que para a NE (formulação que não contém a parede polimérica) foi obtido um menor tamanho que para as NC de PLA. A presença de parede polimérica influenciou, portanto, no tamanho da nanoestrutura, o que está de acordo com os achados de RÜBE et al. (2005) usando a técnica de espalhamento de nêutrons em pequenos ângulos (SANS). Da mesma forma, avaliando-se comparativamente o D_h das NC PLA e das NC PLAPEG, 181 nm e 204 nm, respectivamente, verifica-se que as NC de PLAPEG apresentam diâmetros hidrodinâmicos ligeiramente maiores, provavelmente devido ao espaço ocupado em meio líquido pelas cadeias de PEG.

Comparando-se também o D_h das NC PLA, 181 nm, com aqueles referentes às NC PLAQUI 0,1% e 0,25%, 248 nm e 297 nm, respectivamente, pode-se verificar, mais uma vez, que a composição influenciou no tamanho da partícula resultante. As NC PLAQUI apresentaram tamanho médio significativamente maior em relação às NC PLA. Neste caso, provavelmente, em função do grande volume hidrodinâmico ocupado pelas cadeias de quitosana adsorvidas na superfície das partículas. Além disso, observa-se que o tamanho dessas NC foi relacionado diretamente à quantidade de polissacarídeo adicionada às formulações, indicando que há uma forte associação da quitosana à estrutura das NC formadas, mas não necessariamente à sua superfície, uma vez que o zeta não foi influenciado nas duas concentrações. GAUMET et al. (2008) relataram que, em suas experiências com NP de quitosana, o tamanho das medidas realizadas por EDL (mesma técnica que utilizamos) em pH 4 pode ser o dobro daquele medido em pH 7; isso porque em pH neutro, as cadeias de quitosana são mais condensadas do que em pH ácido. WU et al. (2005) verificaram que a força iônica do meio também pode afetar de forma considerável o tamanho e a estabilidade de nanocápsulas formadas com quitosana de baixo peso molecular (24 kDa). Assim, optou-se por realizar todas as determinações de potencial zeta e tamanho médio em água MilliQ®, para evitar interferências da força iônica do meio nessas medidas.

Os resultados de caracterização de tamanho e potencial zeta demonstrados neste trabalho estão de acordo com outros estudos previamente publicados, contemplando NP poliméricas de núcleo oleoso e preparadas pelo método de nanoprecipitação (BULCÃO et al. (2013), DE PAULA et al. (2013), GOVENDER et al. (1999), MOSQUEIRA et al. (2001b), ÜNAL et al. (2015), além de outros que foram revisados por MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Em todos eles, a composição influenciou grandemente no tamanho das NP resultantes, as quais se apresentaram monodispersas e em torno de 200 nm.

4.2.3 Caracterização de tamanho e forma após fracionamento por fluxo em campo de fluxo assimétrico.

A técnica de AF4 acoplada aos detectores de MALLS, UV e EDL foi empregada com o intuito de refinar os dados de caracterização das formulações,

uma vez que o fracionamento prévio das partículas às suas respectivas detecções por MALLS e EDL permite conhecer, de forma mais exata, a real dispersão de tamanho das formulações (sem o inconveniente das leituras em batelada, que subestimam a quantidade de partículas pequenas presentes na dispersão). Além disso, permite também se obter informações acerca da forma das partículas presentes na dispersão, através da relação R_g/R_h entre os raios de giração (R_g), obtidos pelo detector de MALLS, e os raios hidrodinâmicos (R_h), obtidos simultaneamente pelo detector de EDL. O detector de absorção UV é utilizado como detector de concentração. A figura 17 apresenta os picos nas frações de tempo de retenção correspondentes à eluição das partículas em cada fractograma, referente a cada método de separação que foi estabelecido para cada formulação, conforme descrito na Tabela 2 em material e métodos.

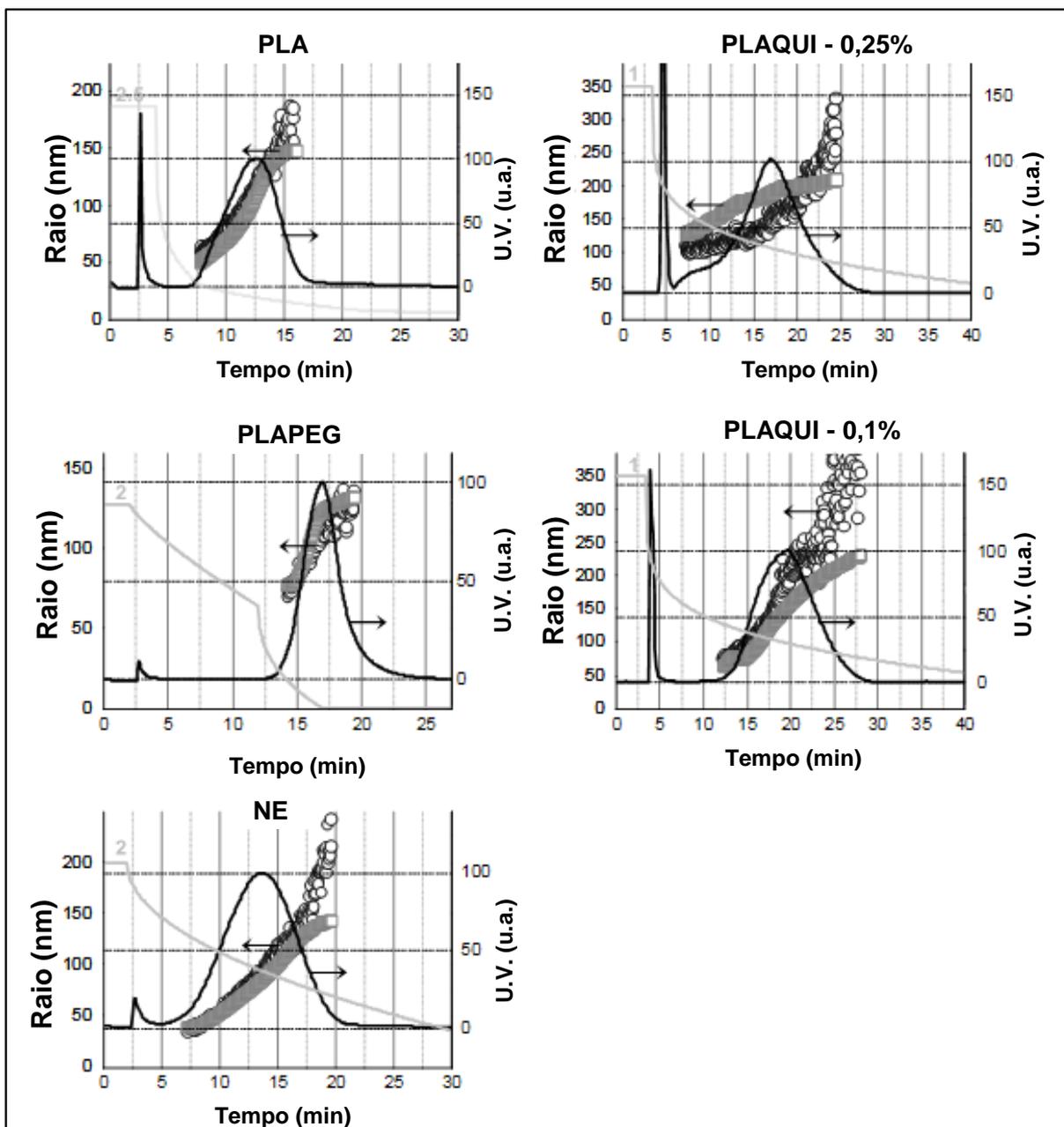


Figura 17: Fractogramas de todas as 5 formulações caracterizadas por AF4 com detecção em linha por UV, MALLS e EDL. Sinal de UV (linha preta, ordenada da direita), Rg determinado por MALLS (quadrados cinza claro vazios), Rh determinados por EDL (círculos pretos vazios) e o perfil de *cross-flow* aplicado (linha cinza, valores iniciais de *cross-flow* indicados pela fonte cinza acima da curva, em mL/min).

Várias condições de fracionamento das partículas, com diversas combinações de decaimento exponencial entre as taxas de fluxo da bomba *cross flow* foram testadas para cada formulação. Os métodos selecionados foram aqueles que atenderam a três critérios básicos: o primeiro deles, o pico referente à eluição das partículas deveria ter resolução em relação ao pico de volume morto, de modo que

nenhuma partícula sairia do canal sem uma efetiva separação (HAGENDORFER et al., 2011; LOESCHNER et al., 2013), ou seja, as condições de pré-eluição no passo de injeção e focagem deveriam ser favoráveis a uma adequada separação. Além disso, os raios hidrodinâmico e de giração deveriam aumentar em função do tempo de retenção, como definido para a técnica no modo normal de eluição (DOU et al., 2013; GIGAULT et al., 2014a; HÅKANSSON et al., 2012), em que as partículas são fracionadas em função dos seus coeficientes de difusão e, conseqüentemente, dos respectivos raios hidrodinâmicos, sendo as partículas pequenas eluídas primeiramente por possuírem maiores coeficientes de difusão. E por último, as partículas deveriam ser completamente eluídas do canal de separação em um tempo máximo de 30 minutos, para que as análises não fossem tão extensas. Assim, fluxos da bomba *cross flow* com valores iniciais maiores que 2,5 mL/min foram evitados, uma vez que nessas situações as partículas poderiam ficar imobilizadas na superfície da membrana por um tempo maior, resultando em tempos de corrida prolongados. Já o fluxo de saída do canal de separação para os detectores foi estabelecido em 0,5 mL/min, em todas as análises, de modo que as frações de amostra eluídas permanecessem na célula de fluxo do detector de EDL por um intervalo de tempo suficiente para a realização de medidas adequadas das variações na intensidade da luz dispersa. Esse fluxo poderia até ser menor, mas não maior, conforme recomendações do fabricante do detector (Malvern Instruments) para essas análises de detecção em fluxo, já que essa técnica não faz medidas instantâneas.

Outro cuidado tomado ao realizar as análises foi relacionado à saturação da membrana, fenômeno comum no AF4 (HUPFELD; AUSBACHER; BRANDL, 2009; MOQUIN; WINNIK; MAYSINGER, 2013). Para este propósito, as amostras de NC PLAQUI foram injetadas três vezes. As primeiras duas corridas foram desconsideradas. A terceira foi aquela em que se obteve maior recuperação de partículas, mas bem próxima àquela obtida na segunda corrida, como indicado pela área sob a curva de eluição que foi muito similar e, portanto, considerada representativa da amostra. Dessa forma, apesar da carga positiva na superfície das NC PLAQUI, confirmada pelas análises de potencial zeta, foi possível se obter uma eluição e recuperação satisfatória dessas partículas com o método estabelecido para ambas as formulações, mesmo utilizando uma membrana de celulose

regenerada (negativamente carregada) como muro de acumulação do canal de separação e água MilliQ® como líquido carreador. Diferentemente, MA, BUSCHMANN e WINNIK (2010), estudando as propriedades físico-químicas de complexos de DNA/Quitosana por AF4-UV-MALLS-EDL, utilizaram, na metodologia, membrana de celulose cationicamente modificada e, como líquido carreador, tampão acetato de sódio pH 4,0, para evitar as possíveis interações eletrostáticas que podem ocorrer entre partículas de carga positivas e membranas similares às que utilizamos. Nesse sentido, é possível também notar que as NC PLAQUI ficaram por um maior tempo retidas no canal de separação, em relação às demais partículas, apesar de ter sido empregada a menor taxa inicial de fluxo de operação da bomba *cross-flow* (1 ml/min).

Analisando os dados da Figura 17, é possível identificar as faixas de tamanho encontradas para cada formulação, que podem ser obtidas com maior precisão através do fracionamento das amostras. Em relação aos valores de Rg obtidos para as NC PLA, PLAPEG e NE, estes variaram, aproximadamente, de 60 a 150 nm, 70 a 140 nm e 50 a 140 nm, respectivamente, faixas dentro das quais se encontram, no mínimo, 95% das partículas de cada amostra. As formulações contendo quitosana apresentaram valores de Rg variando de 130 a 220 nm (PLAQUI 0,25%) e 70 a 240 nm (PLAQUI 0,1%).

A relação entre os raios Rg/Rh está associada a fatores de forma e/ou dureza das nanoestruturas. Observa-se que a evolução dos raios Rg e Rh, ao longo do fracionamento por AF4, ou seja, com o tempo de retenção, é bastante concordante para as formulações de NC PLA e NC PLAPEG, o que atesta a grande homogeneidade de tamanhos e forma das nanoestruturas obtidas nesses dois casos. Para a amostra de NE é possível observar essa mesma característica homogênea entre os raios Rh e Rg até os 17,5 minutos de eluição das partículas; entretanto, a partir daí pode-se notar certa discordância entre os raios (entre 17,5 e 20 minutos de eluição), com um maior aumento nos valores de Rg, o que sugere a presença de estruturas menos homogêneas em sua organização ultraestrutural, densidade e formato, e também formas de agregação, ou seja, a presença concomitante de estruturas maiores e mesmo diferentes, eventualmente lipossomas, como observado anteriormente por MOSQUEIRA et al., 1999. Nesse sentido, GIGAULT; GRASSL e LESPEL (2012), verificaram que a presença de agregados na

formulação pode ser evidenciada, em análises realizadas por AF4-MALLS, pela variação não contínua nos valores de R_g , ou seja, pelo aumento brusco dos valores de R_g em função do tempo de retenção das partículas. Assim, evidencia-se mais fortemente a heterogeneidade das formulações de NC de PLAQUI pela evolução discordante dos raios ao longo do fracionamento. Esta técnica permite, então, pela primeira vez, a observação dessa heterogeneidade dentro de uma amostra de NC PLAQUI (Figura 17). As cadeias de quitosana podem estar formando uma nuvem mais deformável na superfície das partículas, influenciando na medida do centro de massa das mesmas. É interessante observar que quantidades menores de quitosana na formulação (PLAQUI 0,1%) reduzem a heterogeneidade entre os valores de R_g e R_h , indicando partículas menos deformáveis e mais esféricas. É possível notar, também, raios hidrodinâmicos maiores para essas formulações contendo quitosana em relação às NC PLA, da mesma forma que foi observado pelas análises por EDL em batelada.

Valendo-se das vantagens de utilizar a técnica de fracionamento, acoplada aos diversos detectores que utilizamos (UV-MALLS-EDL), para a caracterização das partículas, foram calculados os valores de R_g/R_h em função do R_g para cada formulação (Figura 18). Para o cálculo, foram considerados os valores de R_g e R_h compreendidos dentro da faixa de tempo de retenção das partículas correspondente a valores de intensidade do sinal de UV a partir de 50% da intensidade máxima. Esse critério foi necessário para se obter dados confiáveis para a relação R_g/R_h , uma vez que a concentração das amostras nas frações de tempo fora dessa faixa era muito baixa para medidas precisas pelo EDL. Os valores médios obtidos se encontram sumarizados na Tabela 8. Uma relação de 0,775 é característica de esferas maciças de superfície lisa com uniformidade de densidade; valores próximos a 0,977 correspondem a esferas macias, valores próximos a 2 são obtidos para estruturas alongadas, semelhantes a um bastão; e valores entre 1 e 2 são obtidos quando as estruturas são alongadas e/ou esferas macias deformáveis (de densidade não uniformemente distribuída) ou ambas. Valores abaixo de 0,7 indicam, tipicamente, estruturas inchadas como microgéis (MATHAES et al., 2013; RUNYON; ULMIUS; NILSSON, 2014; WEISS et al., 2012).

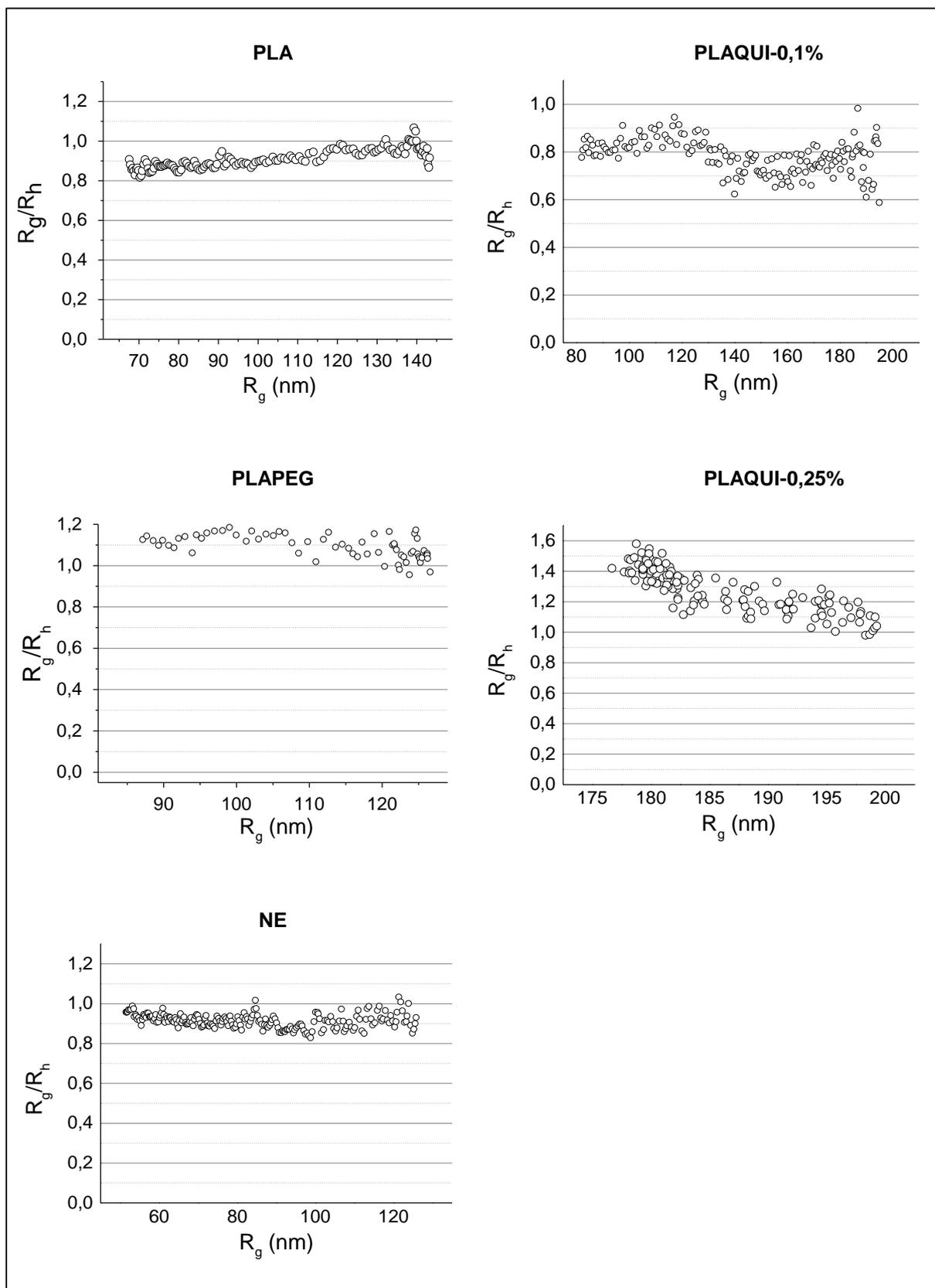


Figura 18: Relação do R_g/R_h em função do R_g calculada para todas as 5 formulações. Valores obtidos a partir das leituras de R_g e R_h realizadas à meia altura dos picos gerados pelo sinal de UV nos fractogramas.

Pode-se observar mais uma vez pelos gráficos da Figura 18 que as NC PLA, NC PLAPEG e a NE apresentaram organização estrutural e forma mais homogêneas que as NC PLAQUI em função da medida do raio de giração, ou seja, ao longo do fracionamento.

Para as NC PLA houve uma pequena variação na relação Rg/Rh, com valores entre 0,8 e 1,0 do início ao final do fracionamento. Sugere-se, então, que a precipitação do polímero ocorreu de maneira levemente heterogênea ao redor das nanotúbulas de óleo, durante a formação das nanoestruturas, o que resultou na obtenção de partículas com menor ou maior dureza e deformação. Entretanto, é interessante observar que o valor médio obtido para o fator de forma (0,93 conforme a tabela 8) corresponde a partículas esféricas vesiculares, o que confirma a estrutura das nanocápsulas (MATHAES et al., 2013).

Tabela 8: Caracterização das diferentes formulações de NC e NE por AF4 acoplada a MALLS e EDL

Formulação	Raio médio	Raio médio	Raio médio	Rg/Rh [†]
	Hidrodinâmico [#] (Rh) Em batelada (nm)	Hidrodinâmico [#] (Rh') Fracionado (nm)	de Giração [‡] (Rg) Fracionado (nm)	
NC PLA	90,6	113,4	105,8	0,93
NC PLAPEG	102,0	107,6	114,8	1,07
NE	66,5	94,2	84,4	0,90
NC PLAQUI 0,1%	124,2	121,7	107,6	0,88
NC PLAQUI 0,25%	148,7	119,0	160,6	1,35

[#]Leituras realizadas no equipamento Nanosizer Nano ZS, no modo *backscatter*, ângulo de 173°.

[‡]Valor calculado considerando as leituras realizadas pelo detector de MALLS Postnova PN3621 nos ângulos de 28°, 36°, 44°, 52°, 60°, 68°, 76°, 84°, 92°, 100°, 108°, 116°, 124°, 132°, 140° e 148° adotando o cálculo matemático *sphere fit*. As leituras dos ângulos de 158° e 164° foram desconsideradas nos cálculos em função da grande quantidade de ruído, já aquelas realizadas nos ângulos de 7°, 12° e 20° foram desconsideradas porque em meios aquosos esses ângulos não geram resultados confiáveis. [†]Fator de forma Rg/Rh obtido a partir dos valores de raios de giração e hidrodinâmico calculados através das médias ponderadas (raio médio = soma [intensidade de sinal UV x raio] / soma [intensidade de sinal UV]).

Recentemente, nanocápsulas de PCL foram caracterizadas por AF4-UV-MALLS-EDL (EHRHART; MINGOTAUD; VIOLLEAU, 2011; ROY et al., 2015). Os resultados indicaram valores similares da relação de forma (R_g/R_h) aos que encontramos aqui para as NC PLA, os quais indicam a presença de esferas macias, em conformidade com a natureza vesicular das NC de núcleo oleoso.

Para a formulação de NE, o fator de forma médio calculado foi igual a 0,90, indicando que essas nanoestruturas também são esféricas e macias. Entretanto, observando o gráfico da NE na figura 18, podemos verificar que não houve variação significativa da forma em função do R_g . Assim, as estruturas obtidas são mais homogêneas que as NC PLA, o que corrobora a influência do polímero na formação de estruturas diferenciadas naquela formulação. Mais uma vez podemos observar também a influência da parede polimérica no tamanho das partículas formadas. Apesar de os fatores de forma das formulações de NC PLA e NE terem sido bem próximos, os raios R_g e R_h da NE após o fracionamento são bem menores que aqueles da NC PLA (Tabela 8), confirmando os resultados de diâmetro hidrodinâmico médio obtidos do EDL em batelada.

Para as NC PLAPEG, o fator de forma se mantém bastante constante com o aumento do R_g , indicando estruturas bem homogêneas, mas com uma natureza bem mais macia e deformável que as demais estruturas já comentadas ($R_g/R_h' = 1,07$ conforme tabela 8). Este resultado está em conformidade com o que se espera da estrutura de uma nanopartícula revestida por cadeias de PEG, com revestimento denso e flexível (macio) tipo “brush”, como representado na figura 11 (p. 35). Além disso, podemos concluir que o PEG anexado em bloco ao PLA, favorece uma precipitação mais organizada do polímero durante a formação das NP.

As formulações de NC PLAQUI indicaram um padrão muito variável de forma e de natureza da organização estrutural, variando de estruturas semelhantes à microgéis, passando por esferas mais duras até estruturas macias e deformadas como pode ser visto na figura 18. Para a NC PLAQUI 0,1%, o R_g/R_h' médio obtido foi 0,88, com uma variação dentro da faixa (entre 0,6 e 0,95), enquanto para a NC PLAQUI 0,25%, o R_g/R_h' médio obtido foi igual a 1,35 (tabela 8), similar àquele obtido por MA, BUSCHMANN e WINNIK (2010), e variando entre 1,6 e 1,0. É possível que nas NC PLAQUI 0,1% toda a quitosana esteja fortemente adsorvida na superfície das partículas, enquanto nas NC PLAQUI 0,25%, um excesso de

quitosana esteja associado às camadas mais externas da nanoestrutura, fracamente adsorvido à superfície. Essa hipótese é suportada pelo fato do potencial zeta não ter sido alterado pela quantidade de quitosana adicionada à formulação, que, no entanto, influenciou no tamanho médio da partícula, uma vez que essas formulações apresentaram raios e, portanto, diâmetros hidrodinâmicos médios distintos entre si (Tabela 8). Além disso, análises realizadas por MFA (dados não apresentados aqui), confirmaram os resultados da relação de forma obtidos para essas formulações. Foi possível identificar na formulação de NC PLAQUI 0,1% esferas duras e lisas, sendo que na NC PLAQUI 0,25% foi visualizada uma morfologia pobremente resolvida, semelhante a uma matriz polimérica circundada por partículas nanométricas, ou seja, a amostra era composta de estruturas altamente deformáveis.

As formulações aqui estudadas e caracterizadas são adequadas para serem usadas nos estudos *in vivo* para determinação das doses seguras e eficazes dos polímeros e partículas em modelo animal.

4.2.4 Determinação da porcentagem e eficiência de encapsulação do marcador fluorescente

Para avaliar a capacidade das NP de incorporar o marcador fluorescente em seu interior, a porcentagem de encapsulação foi calculada. Para isso, levou-se em consideração a quantidade total da AICIPc presente na suspensão final, quantificada após a filtração da formulação em membrana de seringa (PVDF 0,8 μm) para a retirada dos cristais de AICIPc precipitados. Além disso, foi necessário também avaliar a quantidade do marcador livre (solúvel) na fase externa da suspensão, ou seja, não associada às partículas. Procedeu-se, então, à etapa de ultrafiltração/centrifugação de alíquotas das formulações, colocadas em dispositivo Amicon/Microcon[®] de 100 kDa, com a respectiva quantificação do ultrafiltrado. A diferença entre a concentração total dosada e a concentração presente no ultrafiltrado, dividido pela concentração total dosada, forneceu a porcentagem de encapsulação da referida substância. A eficiência de encapsulação, ou seja, o rendimento do processo como um todo foi também determinada. A técnica de CLAE acoplada a detector de fluorescência foi empregada por permitir a quantificação de frações das amostras com alta precisão, seletividade e com baixíssimos limites de

quantificação. A Tabela 9 apresenta os resultados das determinações realizadas nas cinco formulações de NC.

Tabela 9: Porcentagem de encapsulação e eficiência de encapsulação da AICIPc nas formulações de NC PLA; NC PLAPEG; NE; NC PLAQUI 0,1% e NC PLAQUI 0,25%, utilizadas nos estudos *in vivo*.

Formulação	Concentração de AICIPc adicionada (mg/mL)	Concentração de AICIPc dosada (mg/mL)	Porcentagem de Encapsulação (%)	Eficiência de Encapsulação (%) \pm DP
NC PLA	0,1018	0,0366	97,84	35 \pm 2
NC PLAPEG	0,3323	0,3013	100	91 \pm 2
NE	0,1324	0,1244	100	93,96 \pm 0,05
NC PLAQUI 0,10%	0,6992	0,2262	100	32 \pm 3
NC PLAQUI 0,25%	0,1086	0,0576	100	53 \pm 3

A eficiência de encapsulação variou grandemente entre as formulações, nas quais a natureza dos constituintes foi um fator determinante na capacidade de associação do marcador com a partícula, como se observa na Tabela 9. Foram obtidos valores de porcentagem de encapsulação de 100% para quase todas as formulações, exceto para a NC PLA, que foi de 98%. Entretanto, dentro da quantidade que foi retida nos diferentes tipos de nanoestruturas, um valor de porcentagem de encapsulação de 100% significa que toda a AICIPc presente na formulação final de NC encontra-se associada às nanoestruturas, e não solúvel no meio de dispersão. A figura 19 a e b ilustra o ultrafiltrado obtido para as NC PLAPEG e NC PLA, respectivamente. No caso da formulação de NC PLAPEG é possível observar o ultrafiltrado límpido e incolor, de acordo com os resultados de quantificação no HPLC, indicando que realmente não havia AICIPc dissolvida na fase externa da formulação e, portanto, que a porcentagem de encapsulação correspondia a 100%, ou seja, a AICIPc contida na formulação estava realmente associada às NP. O mesmo se deu para as formulações de NE, NC PLAQUI 0,1 e 0,25%. Já para a formulação de NC PLA, o ultrafiltrado obtido era levemente azulado, coincidindo com uma pequena fração dissolvida na fase externa da

formulação a qual foi detectada nas análises por HPLC, gerando o resultado de 98% de porcentagem de encapsulação.

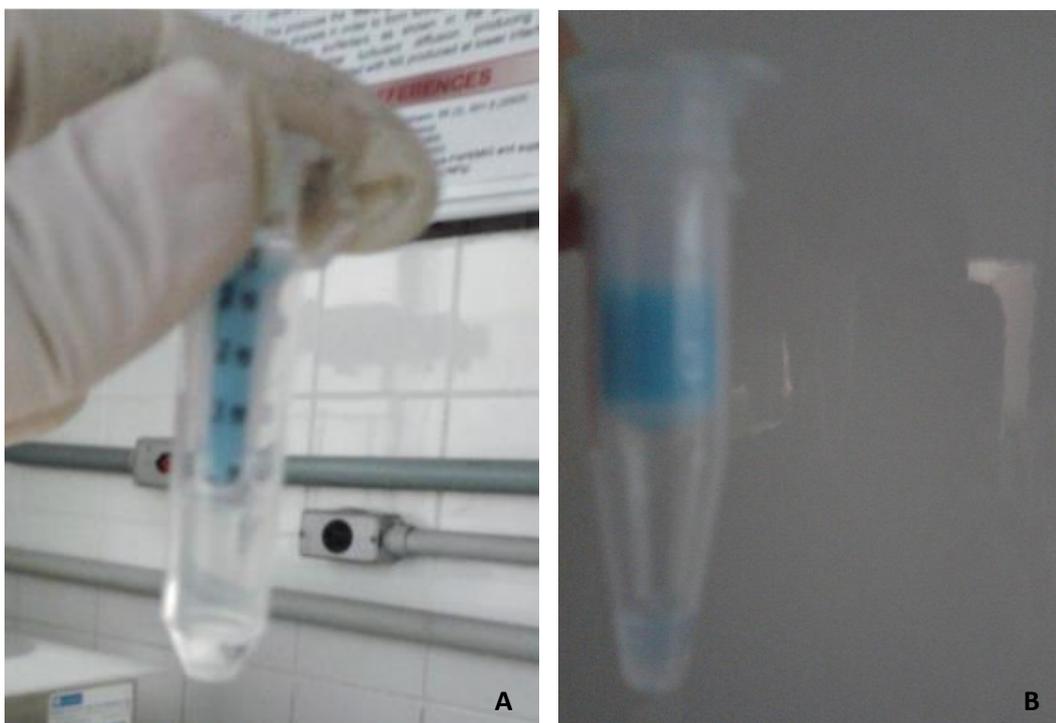


Figura 19: Fotos do ultrafiltrado das formulações de NC PLAPEG (a) e NC PLA (b) para ilustração do procedimento.

É possível concluir, então, que a característica hidrofóbica da AICIPc favorece sua encapsulação, provavelmente estando ela presente no núcleo oleoso das NC, o que possibilita o uso dessa substância como marcador das nanopartículas em estudo.

Avaliando, por outro lado, o rendimento do processo como um todo, representado pela eficiência de encapsulação e que é dado pela relação da quantidade de AICIPc de fato associada às NC na formulação final e a quantidade de AICIPc inicialmente adicionada ao preparo da formulação, a partir de uma concentração teórica (0,1mg/mL), pode-se constatar, então, que esse parâmetro é fortemente afetado pelo aparecimento de cristais macroscópicos do marcador precipitado e que ele não se correlaciona diretamente com a porcentagem de encapsulação, ou seja, não necessariamente uma porcentagem de 100% de encapsulação significa que houve um bom rendimento do processo (aproximadamente 100% de eficiência), como foi observado para as formulações de NC PLA e NC PLAQUI 0,1 e 0,25%. A AICIPc é solúvel em poucos solventes

orgânicos, é muito pouco insolúvel na acetona e praticamente insolúvel em água. Dessa forma, quando a fase orgânica é vertida sobre a fase aquosa no processo de nanoprecipitação, grande proporção dessa substância é precipitada pela rápida difusão entre os solventes. Assim, uma parte precipita, enquanto outra fica associada ao interior das gotículas de óleo.

Em estudos anteriores, realizados por DE PAULA (2008), foi observado que utilizando o etanol como um co-solvente da AICIPc na fase orgânica, aumentava-se a eficiência de encapsulação desse marcador nas NC de PLA, PLGA e PLAPEG, por ser este um bom solvente para o marcador. De maneira semelhante, OLIVEIRA (2009) também realizou um estudo e estabeleceu proporções adequadas de etanol:acetona para comporem a fase orgânica durante o preparo das NC de PLA, PLAPEG e, principalmente, de PLAQUI-0,25% (as quais foram reproduzidas neste trabalho). Ela verificou que o etanol adicionado no preparo das formulações de PLA e PLAPEG promovia a formação de partículas de menor tamanho e, ao mesmo tempo, com uma maior eficiência de encapsulação. Entretanto, no caso das NC de PLAQUI 0,25%, ela verificou que a quantidade de etanol adicionada deveria ser a mínima possível, sendo um parâmetro crítico para a formação das partículas em escala nano, uma vez que ele promovia a precipitação do polímero de quitosana, apesar de auxiliar na solubilidade de marcador, levando à formação de agregados de polímero e AICIPc durante a nanoprecipitação.

Diante dos aspectos mencionados, sobre a complexidade do preparo das formulações nos que diz respeito a uma eficiente encapsulação do marcador fluorescente, evidencia-se que a quantidade de AICIPc que de fato está presente na formulação final e que será avaliada nos experimentos *in vivo* é a quantidade dosada, a qual é determinada após todo o processo de preparo, e não a quantidade adicionada ao preparo, já que essa massa de AICIPc pode ser perdida na forma de precipitado durante o processo de nanoprecipitação. Além disso, é importante mencionar que a velocidade de agitação da fase aquosa durante a difusão da fase orgânica em seu interior, bem como a velocidade de difusão dessa fase sobre a fase aquosa e o grau de pureza dos solventes utilizados, todos esses fatores podem impactar de forma considerável no processo de formação das partículas e na eficiência de encapsulação do produto final. Foi possível observar no decorrer dos experimentos que a velocidade de agitação do balão no rotaevaporador, durante a

etapa de evaporação dos solventes, e o tempo demandado para evaporar os solventes orgânicos da formulação são, de fato, cruciais para a estabilidade das gotículas formadas e o aprisionamento do marcador em seu interior, impedindo ou promovendo a coalescência das nanogotas formadas e a precipitação da AICIPc na fase aquosa externa.

4.3. Estudo de Biodistribuição das Nanopartículas

As Figuras 20 e 21 apresentam os perfis de concentração plasmática e hepática para as 5 formulações nanoestruturadas (NE, NC PLA, NC PLAPEG, NC PLAQUI 0,1% e NC PLAQUI 0,25%), obtidos por meio da injeção de doses crescentes das mesmas, em mg de polímero por quilograma de peso de animal, e calculados a partir da porcentagem de fluorescência detectada nesses tecidos em relação à fluorescência administrada, 20 minutos após administração intravenosa.

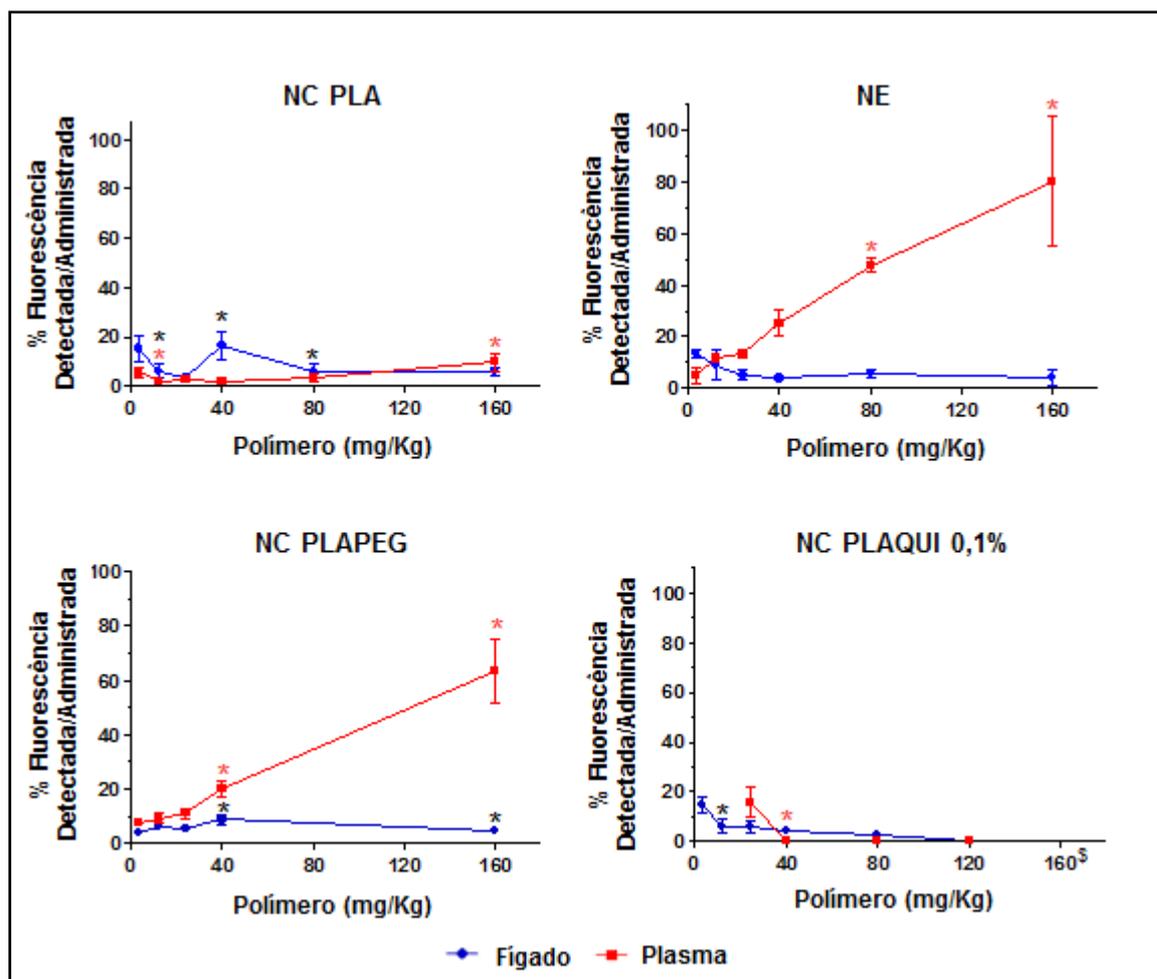


Figura 20: Efeito das doses de polímeros de nanocápsulas com diferentes características superficiais, administradas por via intravenosa, sobre suas concentrações plasmáticas e hepáticas 20

minutos após injeção em camundongos. Os dados são representados como % de fluorescência detectada em relação à administrada. NE (controle na ausência de polímero), NC PLA, NC PLAPEG e NC PLAQUI 0,1%. *Diferença significativa em relação à dose anterior ($p < 0,05$) ($n=4$). [§]Todos os animais morreram nas doses acima de 120 mg/kg para as formulações de NC PLAQUI 0,1%.

No gráfico referente ao perfil das NC de PLA não há variação significativa das concentrações plasmáticas ao longo das variações crescentes de concentração de polímero entre as doses de 3-160mg/Kg de PLA, indicando que doses maiores devem ser necessárias para que haja uma saturação do SFM com aumento significativo das concentrações plasmáticas. Nessa gama de concentrações testadas esse valor não foi encontrado, indicando que até 160mg/Kg as partículas de PLA são avidamente fagocitadas pelo SFM. No fígado, as concentrações foram mantidas dentro da faixa de 20% da dose injetada, mesmo com as doses mais altas, indicando que sua faixa de captura foi também mantida a mesma, apesar do aumento da concentração de polímero. Nesse caso, outros órgãos podem estar também participando da remoção das partículas do sangue como baço e medula óssea, ambos do SFM.

No gráfico referente à NE, estudada nesse trabalho como controle da ausência de polímero, observa-se, contrariamente, que as concentrações plasmáticas têm um perfil quase linear em relação ao aumento das doses administradas, indicando que esse tipo de sistema consegue permanecer pelo menos até 20 minutos no plasma, sem alterar significativamente a remoção pelo SFM hepático no intervalo das doses administradas de 3-160mg/Kg. É interessante notar que essas partículas se diferem das NC PLA somente pela presença do polímero, o que mostra nesse estudo que a natureza hidrofóbica deste polímero exerce uma grande influência na opsonização e consequente fagocitose pelo SFM. Provavelmente, a ausência deste polímero nas NE mantém uma superfície mais hidrofílica e, talvez, mais semelhante aos quilomícrons naturais, retardando o reconhecimento e a fagocitose das nanogotículas desse tipo de emulsão rica em lecitina. Esses dados são relevantes no transporte de fármacos administrados associados à nanoemulsões e microemulsões parenterais, como amplamente discutido por PRAKASH e THIAGARAJAN (2011) e SANTOS-MAGALHÃES et al. (2000).

De maneira semelhante às NE, as NC construídas a partir do polímero anfifílico de PLA-*bloco*-PEG se mantiveram no plasma, inclusive em concentrações mais elevadas de polímero. O perfil plasmático é dose dependente em relação à massa de polímero usada, o que indica que efetivamente a hidrofilição da superfície por cadeias de PEG influenciou na redução da remoção pelo SFM dentro dos 20 minutos estudados. Esses dados corroboram estudos anteriores referentes ao maior tempo de circulação sanguínea de NC de PLAPEG (AVGOUSTAKIS et al., 2003; DUNN et al., 1997; KOLATE et al., 2014; MOSQUEIRA et al., 2001a; OLIVEIRA (2009), PEREIRA et al., 2009; SHAN et al., 2009; SUK et al., 2015). Comparando-se o perfil obtido para a formulação de NC PLAPEG com aquele obtido para a NE pode-se dizer que eles são muito parecidos. Apesar de não possuírem a parede polimérica, as partículas da NE têm a constituição e o potencial zeta muito semelhantes àsquelas da formulação das NC PLAPEG, ou seja, a superfície dessas partículas teve grande impacto no seu comportamento biológico. Nesse caso, contrariamente aos estudos relatados por HE et al. (2010), podemos verificar que a superfície teve uma maior influência na biodistribuição dessas partículas do que o tamanho, já que os valores de D_h obtidos para ambas foram distintos (133 nm e 204 nm, respectivamente). O perfil hepático não se alterou significativamente até 40mg/Kg de polímero, mas, em doses superiores, houve redução significativa ($p < 0.05$) da remoção pelo SFM hepático. Esses dados indicam que a quantidade de polímero também exerce um papel importante no SFM que deve ser posteriormente avaliada.

Em relação ao gráfico referente as NC de PLA revestidas com quitosana na menor concentração (NC PLAQUI 0,1%), um perfil muito distinto pode ser observado. Na medida em que se aumentou a dose polimérica, a concentração plasmática foi reduzida de forma significativa. Entretanto, esta remoção não está correlacionada ao SFM hepático, pois as concentrações hepáticas foram também reduzidas com o aumento da concentração polimérica. Esses dados indicam que as NC de PLAQUI, provavelmente, não permanecem no plasma por muito tempo, ou causam algum tipo de associação com as hemácias que este estudo não foi capaz de detectar, pois não foi quantificada a fluorescência associada as células vermelhas do sangue. Para a formulação de NC PLAQUI 0,25%, todas as dosagens realizadas estiveram abaixo do limite de quantificação do método utilizado (15 ng/mL),

enquanto para as NC PLAQUI 0,1% foi possível detectar sua presença, entretanto em quantidades baixíssimas (Figura 21). Nesse caso, houve uma queda da porcentagem da dose encontrada quando se aumentou a dose injetada de 24 para 40 mg/kg e a partir daí não houve diferença significativa entre as dosagens. Entretanto, observou-se reações imediatas nos animais durante este estudo, referentes à administração de altas doses poliméricas dessas NC por via endovenosa, as quais sugerem que efeitos tóxicos intensos no sistema cardiovascular estejam ocorrendo com a presença do polímero policatiônico de quitosana. Outros trabalhos relataram a quitosana como polímero não tóxico, quando administrados pelas vias intravenosa (HIRSJÄRVI et al., 2013) e oral (ÜNAL et al., 2015; CHEN et al., 2013; ZHANG et al., 2006a). Mas o presente estudo é pioneiro em investigar esses efeitos pela via intravenosa relacionado ao efeito da dose.

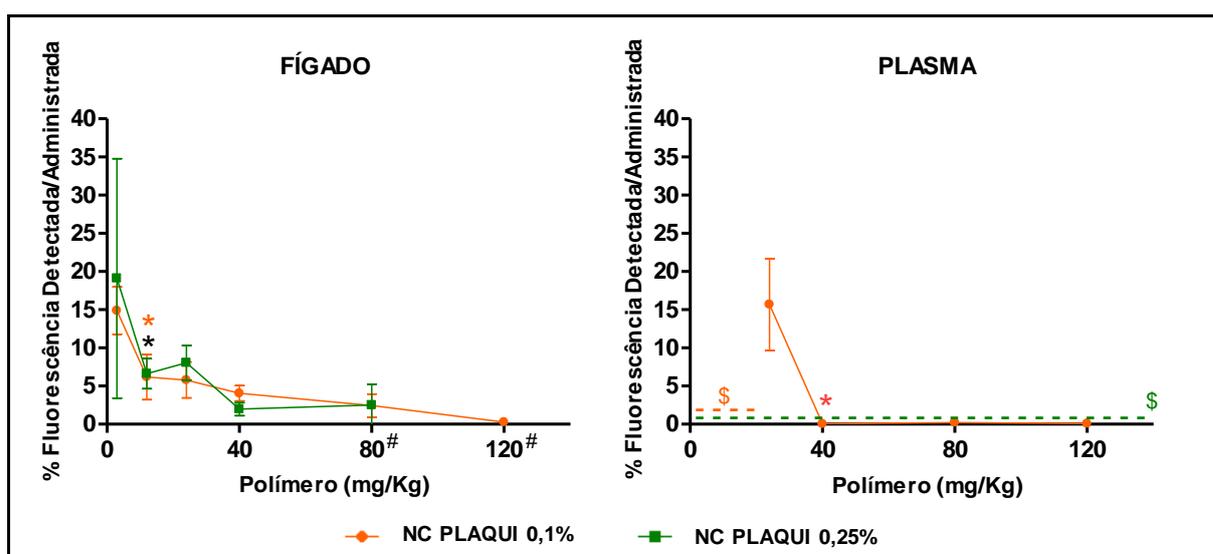


Figura 21: Efeito da dose de quitosana nas formulações de nanocápsulas de PLA, administradas por via intravenosa, sobre as concentrações plasmáticas e hepáticas dessas formulações 20 minutos após injeção em camundongos. Os dados são representados como % da dose de AICIPc (marcador fluorescente) administrada. Nanocápsulas de PLAQUI 0,1% e PLAQUI 0,25%. *Diferença significativa em relação à dose anterior ($p < 0,05$) ($n=4$). #Todos os animais morreram nas doses acima de 120 mg/kg para as formulações de PLAQUI 0,1% e acima de 80mg/kg para as de PLAQUI 0,25%. \$Valores no plasma abaixo do limite de quantificação para nanocápsulas de PLAQUI 0,1% nas doses de 3 e 12 mg/kg e em todas as doses para PLAQUI 0,25%.

De uma forma geral, observa-se que a natureza da superfície das partículas influenciou nos diferentes perfis de distribuição no plasma e fígado obtidos para as nanoestruturas avaliadas. Com o aumento da dose injetada, houve um maior

acúmulo, no plasma, das NC PLAPEG e da NE em relação às NC PLA, ao passo que as formulações de NC PLAQUI praticamente não são encontradas nesse compartimento. Em relação às quantidades encontradas no fígado, é possível notar uma ligeira queda com o aumento da dose injetada para todas as formulações, particularmente em doses altas.

Avaliando conjuntamente, para cada formulação, os perfis das curvas de porcentagem da dose detectada no plasma e fígado em função da dose injetada, com o intuito de se estabelecer uma relação de saturação da capacidade fagocítica pelas células do sistema fagocitário mononuclear, pôde-se verificar que as NC de PLA tendem a saturar esse sistema com doses acima de 160 mg/kg de polímero ($p < 0.05$). Isso porque à medida em que a dose de polímero administrada é aumentada (de 80 mg/kg para 160 mg/kg), no plasma ocorre um aumento estatisticamente significativo, apesar de pequeno, entre essas doses.

Com relação às NC de PLAPEG também parece haver uma tendência à saturação do sistema fagocitário mononuclear nas doses próximas a 160 mg/Kg diante da observação do perfil de concentração hepático. Não foi observado nenhum tipo de reação nos animais ou diferença clínica com o aumento das doses administradas em relação a essas NC de PLAPEG.

Para as NC de PLAQUI (Figura 21), é possível observar em ambas as formulações uma tendência de saturação hepática, uma vez que à medida em que se aumentou a dose administrada, houve uma tendência de redução da quantidade dosada no fígado (e também no plasma no caso da NC PLAQUI 0,1%). Esse comportamento, entretanto, sugere também que essas partículas estejam se distribuindo para outros tecidos do organismo, o que deve ser melhor investigado no futuro. Por outro lado, durante a execução dos experimentos com essas formulações, foi possível observar grande toxicidade que as mesmas geravam nos camundongos. Os animais desenvolviam taquicardia intensa, prostração, tremor, eriçamento de pelos e problemas respiratórios (semelhantes à asfixia) durante os 20 minutos de espera para a coleta do sangue e eutanásia. A coleta do sangue desses animais para ambas as formulações foi muito dificultada, principalmente para a NC PLAQUI 0,25%. O sangue coletado ficava bastante hemolisado, particularmente a partir das doses de 40 mg/kg com a formulação de NC PLAQUI 0,1% e com a NC PLAQUI 0,25% já nas doses de 12 e 24 mg/kg, sendo que em alguns casos

apresentava maior viscosidade que o normal e até mesmo coágulos. A Figura 22 ilustra essa situação, entretanto foi obtida de uma amostra de sangue de um animal que recebeu uma dose de 160 mg/kg de NC PLAQUI 0,1% e que foi a óbito logo após a administração da formulação. A partir daí a dose máxima administrada foi reduzida para 120 mg/kg.



Figura 22: Foto do sangue coletado e centrifugado imediatamente após o animal ter recebido uma dose de 160 mg/kg da formulação de NC PLAQUI 0,1%. É notória a hemólise ocasionada pela formulação. O animal foi a óbito logo após a administração.

Essas observações clínicas sugerem que o perfil atípico observado no caso das NC de PLAQUI, de redução da concentração das partículas no fígado e no plasma, pode também estar associado com esse contexto de toxicidade. Para a formulação de NC PLAQUI 0,1% foi possível avaliar até a dose de 120 mg/kg, na qual alguns animais apresentaram sangue na urina após a injeção da formulação e sinais de asfixia. Para a NC PLAQUI 0,25% todos os animais morreram nas doses que tentamos avaliar acima de 80 mg/kg, sendo que com 100 e 120 mg/kg eles morreram em poucos minutos após a administração da formulação e com 160 mg/kg a morte foi imediata. Observou-se que essas formulações induziram forte hemólise no sangue dos animais, o que, provavelmente, desencadeou insuficiência respiratória.

A quitosana pode induzir hemólise via interações eletrostáticas, uma vez que os grupos amino protonados (NH_3^+) podem atrair moléculas carregadas negativamente, nesse caso as glicoproteínas presentes nas membranas dos

eritrócitos, gerando uma angulação na membrana e ocasionando a lise da mesma (ZHOU et al., 2014). O resultado dessas interações eletrostáticas entre os carreadores carregados positivamente e os eritrócitos pode ser também o acúmulo desses sistemas nos pulmões, fígado e baço (BILENSOY, 2010).

Um estudo realizado por BENDER et al. (2012), avaliando a hemocompatibilidade de NC de PCL (poli- ϵ -caprolactona) revestidas ou não com quitosana, mostrou que a concentração e, portanto, a área superficial específica, influenciou de forma importante os resultados dos testes de hemólise e agregação plaquetária. Os ensaios foram realizados incubando as suspensões a 2% e 10% v/v com o sangue humano; tanto as formulações revestidas com quitosana quanto as não revestidas foram tóxicas quando incubadas na concentração de 10% v/v. Da mesma forma, em nossos resultados foi possível observar que a maior quantidade de quitosana na formulação NC PLAQUI 0,25% foi responsável por uma maior toxicidade, motivo pelo qual não foi possível atingir a dose de 120 mg/kg como aconteceu com a NC PLAQUI 0,1%.

ISHAK et al. (2013) compararam o efeito do revestimento hidrofílico da quitosana e do polissorbato 80 sobre o tempo de circulação sanguínea de NP de PLA em camundongos. Para isso, avaliaram a biodistribuição dessas NP revestidas sobre o fígado, baço e rins em até 6 horas após administração intravenosa. Da mesma forma que ocorreu em nossos experimentos, foi constatada uma baixíssima quantidade das NP revestidas de quitosana no fígado, além dos demais órgãos avaliados também terem apresentado quantidades bem menores que aquelas detectadas em relação às NP não revestidas e às revestidas com o polissorbato. Para esses autores, o revestimento pelas moléculas de quitosana foi eficaz em inibir o reconhecimento pelo SFM, entretanto, eles não informaram sobre efeitos indesejados observados nos animais. Esses dados sugerem que formulações revestidas com quitosana precisam ser melhor investigadas, tanto em relação ao seu destino, assim como pelas quantidades de quitosana na formulação e pelas doses utilizadas.

A respeito da influência da forma das NP sobre o perfil de biodistribuição, foi difícil encontrar diferenças no comportamento biológico das formulações em função da estrutura das partículas, uma vez que, à exceção das NC PLAQUI 0,25%, todas as formulações se apresentaram, de um modo geral, como sendo constituídas por

partículas esféricas macias (vesiculares) de densidades variadas (Rg/Rh próximo a 1), como já se esperava em função do método de preparo. Além disso, foi possível observar semelhante perfil de concentração plasmática e hepática nas formulações de NE e NC PLAPEG, as quais apresentaram diferentes valores para o fator de forma (0,90 e 1,07, respectivamente). Do mesmo modo, para as formulações de NC PLAQUI o perfil de concentração plasmática e hepática foi muito semelhante, apesar de terem apresentado fatores de forma distintos (0,88 para NC PLAQUI 0,1% e 1,35 para NC PLAQUI 0,25%). Como já discutido, os resultados de biodistribuição das partículas obtidos nesse estudo, parecem estar mais relacionados às características superficiais das mesmas. Os efeitos da forma das partículas sobre o sistema biológico devem ser melhor investigados, principalmente a nível celular, onde as pequenas diferenças relacionadas a esse parâmetro podem ser melhor observadas.

Em relação aos efeitos das doses de NP sobre o sistema biológico como um todo, mais especificamente sobre o SFM, foi possível constatar a importância de se estabelecer doses seguras e de se conhecer até quais concentrações uma formulação em específico pode ser administrada com esse propósito. Verificou-se uma tendência de redução da capacidade fagocítica do SFM na medida em que se administrou doses crescentes de polímero nos animais. Pode ser que essa redução seja acompanhada da completa saturação do SFM em doses superiores àquelas avaliadas, conseqüentemente, podendo afetar a farmacocinética dessas formulações. Portanto, estudos futuros podem revelar com mais clareza essas questões.

É importante entender que a redução da atividade do SFM resultará em um prolongado tempo de circulação sanguínea das nanopartículas, as quais terão maior chance de interagir com outros tecidos, além do seu destino, e induzir efeitos indesejáveis. Portanto, o conteúdo da dose administrada e o intervalo de doses devem ser cuidadosamente planejados, de modo que esquemas terapêuticos eficazes e seguros sejam estabelecidos (ERNSTING et al., 2013b).

5. CONCLUSÃO

Nanocápsulas de PLA com diferentes modificações de superfície e estreita distribuição de tamanho, adequadas para o uso intravenoso e, portanto, ideais para a investigação pretendida nesse trabalho, foram efetivamente preparadas pelo rápido método de nanoprecipitação. Da mesma forma, também se obteve uma nanoemulsão com formulação semelhante à da NC PLA, exceto pela presença do polímero, a qual serviu, nesse trabalho, como controle dos efeitos das paredes poliméricas.

As formulações foram todas caracterizadas em detalhe e apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio por EDL entre 133 nm e 297 nm e índices de polidispersão abaixo de 0,2, relacionados a uma estreita distribuição de tamanho, indicando que o método de nanoprecipitação é versátil para a produção de NC com diferentes características superficiais, mantendo-se a eficiência na obtenção de nanoestruturas de estreita distribuição de tamanho e em torno de 200 nm.

As análises por AF4-UV-MALS-DLS mostraram, de um modo geral, que as estruturas formadas em todas as formulações consistiram de estruturas esféricas, de densidades e durezas diferenciadas, com um raio hidrodinâmico bastante semelhante após fracionamento, em torno de 100 nm. A exceção das NC de PLAQUI 0,25% (Rg 161 nm), todas as NC apresentaram um raio de giração médio também bastante semelhante, em torno de 100 nm. Em concentrações mais altas na formulação, a quitosana modifica o formato e o centro de massa das NC de PLAQUI 0,25%.

As diferenças na composição química das formulações e, por conseguinte, nas características superficiais das partículas, resultaram em comportamentos biológicos distintos que parecem impactar na biodistribuição entre plasma e fígado mais que outros fatores, como forma e tamanho.

A partir das curvas com as doses avaliadas em todas as formulações, foi possível confirmar que há uma tendência de saturação da capacidade fagocítica das células do SFM presentes no fígado, principal órgão desse sistema avaliado nesse estudo, uma vez que, para todas as formulações, houve uma diminuição da porcentagem da dose encontrada nesse tecido com o aumento da dose injetada, o

que sugere que esse fenômeno ocorre, de maneira geral, independentemente da característica de superfície das partículas, a qual apenas modula diferentes perfis de saturação.

As características ótimas de tamanho, forma e propriedades de superfície dos vetores, bem como as doses utilizadas devem ser avaliadas de acordo com a via de administração em que esses sistemas serão aplicados, e com os alvos pretendidos, com vistas a uma estratégia terapêutica claramente definida e que seja segura e eficaz.

6- REFERÊNCIAS

AGGARWAL, P. et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 6, p. 428–37, 2009.

ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. W. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 14, n. 1, p. 1–16, 2012.

ALI, M. E.; LAMPRECHT, A. Polyethylene glycol as an alternative polymer solvent for nanoparticle preparation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 135–42, 2013.

ALLEN, T. M. et al. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1066, n. 1, p. 29–36, 1991.

ALLEN, T. M.; HANSEN, C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1068, n. 2, p. 133–141, 1991.

ANDERSSON, M.; WITTEGREN, B.; WAHLUND, K. Accuracy in Multiangle Light Scattering Measurements for Molar Mass and Radius Estimations. Model Calculations and Experiments. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 16, p. 4279–4291, 2003.

AUGSTEN, C. et al. A detailed analysis of biodegradable nanospheres by different techniques--a combined approach to detect particle sizes and size distributions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 1, p. 95–102, 2008.

AVGOUSTAKIS, K. et al. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA – mPEG nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 259, p. 115–127, 2003.

BEIJA, M. et al. Colloidal systems for drug delivery: from design to therapy. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 485–96, 2012.

BENDER, E. A. et al. Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with

chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, n. 1-2, p. 271–279, 2012.

BERTRAND, N.; LEROUX, J.-C. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 161, n. 2, p. 152–63, 2012.

BHARTI, B. Adsorption, Aggregation and Structure Formation in Systems of Charged Particles: From Colloidal to Supracolloidal Assembly. **Thesis**, 2012.

BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 67–75, 2005.

BILENSOY, E. Cationic nanoparticles for cancer therapy. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 7, p. 795–809, 2010.

BRAR, S. K.; VERMA, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 4–17, 2011.

BULCÃO, R. P. et al. Acute and subchronic toxicity evaluation of poly(ϵ -Caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. **Toxicological Sciences**, v. 132, n. 1, p. 162–176, 2013.

CAI, Z. et al. Nanocarriers: A General Strategy for Enhancement of Oral Bioavailability of Poorly Absorbed or Pre-Systemically Metabolized Drugs. **Current Drug Metabolism**, p. 197–207, 2010.

CARDOSO, M. B. **Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: Estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência.** Tese de doutorado em Ciências. Instituto de química de São Carlos. Universidade de São Paulo, 2008.

CHEN, D. et al. Comparative study of Pluronic® F127-modified liposomes and chitosan-modified liposomes for mucus penetration and oral absorption of cyclosporine A in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 449, n. 1-2, p. 1–9, 2013.

CHOI, J.-S. et al. Size-controlled biodegradable nanoparticles: preparation and size-dependent cellular uptake and tumor cell growth inhibition. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 122, p. 545–51, 2014.

CHORNY, M. et al. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. **Journal of Controlled Release** v. 83, p. 389–400, 2002.

CHUAIRE, L.; CEDIEL, J. F. Paul Ehrlich: From magic bullets to chemotherapy. **Colombia Médica**, v. 39, n. 3, p. 291–300, 2008.

CLOGSTON, Jeffrey D.; PATRI, Anil K. Zeta potential measurement. In: **Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery**. Humana Press, p. 63-70, 2011

DAVIS, M. E. The First Targeted Delivery of siRNA in Humans via a Nanoparticle: From Concept to Clinic. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 3, p. 659–668, 2009.

DE PAULA, C. S. et al. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 371–81, 2013.

DOU, H. et al. Study on steric transition in asymmetrical flow field-flow fractionation and application to characterization of high-energy material. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 211-219, 2013.

DUAN, X.; LI, Y. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. **Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 9, n. 9-10, p. 1521–1532, 2013.

DUNN, S. E. et al. In vitro cell interaction and in vivo biodistribution of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres surface modified by poloxamer and poloxamine copolymers. **Journal of Controlled Release**, v. 44, n. 1, p. 65–76, 1997.

EHRHART, J.; MINGOTAUD, A.-F.; VIOLLEAU, F. Asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering and quasi elastic light scattering for characterization of poly(ethyleneglycol-b- ϵ -caprolactone) block copolymer self-assemblies used as drug carriers for photodynamic therapy. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 27, p. 4249–4256, 2011.

ERNSTING, M. J. et al. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 782–794, 2013a.

ERNSTING, M. J. et al. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 782–94, 2013b.

ESSA, S.; RABANEL, J. M.; HILDGEN, P. Effect of aqueous solubility of grafted moiety on the physicochemical properties of poly(d,l-lactide) (PLA) based nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, n. 1-2, p. 263-273, 2010.

ETHERIDGE, M. L. et al. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2013.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950-2962, 2009.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. **ACS Nano**, v. 3, n. 1, p. 16–20, 2009.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. 1–4, 1989.

FRAUNHOFER, W. et al. Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and Multiangle Light Scattering for Analysis of Gelatin Nanoparticle Drug Carrier Systems. **Analytical Chemistry** v. 76, n. 7, p. 1909–1920, 2004.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 12, p. 1343–58, 2010.

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5577–5591, 2012.

FUERTGES, F.; ABUCHOWSKI, A. The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins. **Journal of Controlled Release**, v. 11, p. 139–148, 1990.

GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, n. 1, p. 24–34, 2007.

GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting

particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1–9, 2008.

GIDDINGS, J. C. Field-flow fractionation: analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. 5113, p. 1456–1465, 1993.

GIGAULT, J. et al. Rational strategy for characterization of nanoscale particles by asymmetric-flow field flow fractionation: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 809, p. 9–24, 2014a.

GIGAULT, J. et al. Rational strategy for characterization of nanoscale particles by asymmetric-flow field flow fractionation: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 809, p. 9–24, 2014b.

GIGAULT, J.; GRASSL, B.; LESPE, G. A new analytical approach based on asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to ultraviolet spectrometry and light scattering. **Analyst**, 2012, 137, 917, 2012.

GOKCE, Y. et al. Ultrasonication of chitosan nanoparticle suspension: Influence on particle size. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 462, p. 75–81, 2014.

GOVENDER, T. et al. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release** v. 57, p. 171–185, 1999.

GRAZÚ, V.; MOROS, M.; SÁNCHEZ-ESPINEL, C. Nanocarriers as Nanomedicines: Design Concepts and Recent Advances, capítulo 14, p. 337. In: **FRONTIERS OF NANOSCIENCE**, v. 4, **Nanobiotechnology - Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles**. Elsevier, 2012, 520 p.

GREENWALD, R. B. et al. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 217–250, 2003.

GRAF, R. et al. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. **Science**, v. 263, n. 5153, p. 1600–1603, 1994.

HAGENDORFER, H. et al. Application of an asymmetric flow field flow fractionation multi-detector approach for metallic engineered nanoparticle characterization-prospects and limitations demonstrated on Au nanoparticles. **Analytica Chimica**

Acta, v. 706, n. 2, p. 367–378, 2011.

HÅKANSSON, A. et al. Hydrodynamic radius determination with asymmetrical flow field-flow fractionation using decaying cross-flows. Part I. A theoretical approach. **Journal of Chromatography A**, v. 1253, p. 120–126, 2012.

HASEGAWA, M. et al. Chitosan induces apoptosis via caspase-3 activation in bladder tumor cells. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 92, n. 4, p. 459–466, 2001.

HAWE, A. et al. Asymmetrical flow field-flow fractionation method for the analysis of submicron protein aggregates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 11, p. 4129–4139, 2012.

HE, C. et al. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3657–3666, 2010.

HIRSJÄRVI, S. et al. Surface modification of lipid nanocapsules with polysaccharides: From physicochemical characteristics to in vivo aspects. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 5, p. 6686–6693, 2013.

HUPFELD, S.; AUSBACHER, D.; BRANDL, M. Asymmetric flow field-flow fractionation of liposomes: 2. Concentration detection and adsorptive loss phenomena. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 20, p. 3555–3561, 2009.

HWANG, T.; LIN, C. Cationic additives in nanosystems activate cytotoxicity and inflammatory response of human neutrophils: lipid nanoparticles versus polymeric nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, p. 371–385, 2015.

ISHAK, R. A. H. et al. A comparative study of chitosan shielding effect on nano-carriers hydrophilicity and biodistribution. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 669–676, 2013a.

JACOBY, R. O.; FOX, J. G. Biology and disease of mice. In: **Laboratory Animal Medicine**, eds J. G. Fox, B. J. Cohen and F. M. Loew, 31-89. New York: Academic Press, 1984.

JAIN, R. K.; STYLIANOPOULOS, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 7, n. 11, p. 653–664, 2010.

- JOHN, C.; LANGER, K. Asymmetrical flow field-flow fractionation for human serum albumin based nanoparticle characterisation and a deeper insight into particle formation processes. **Journal of Chromatography A**, v. 1346, p. 97–106, 2014.
- KIM, J.-H. et al. Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice. **Journal of Controlled Release**, v. 127, n. 1, p. 41–49, 2008.
- KOLATE, A. et al. PEG - A versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 192C, p. 67–81, 2014.
- KULKARNI, S. A; FENG, S.-S. Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 10, p. 2512–2522, 2013.
- LEE, D.; POWERS, K.; BANEY, R. Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 4, p. 371–377, 2004.
- LEE, E.; LEE, J.; JON, S. A novel approach to oral delivery of insulin by conjugating with low molecular weight chitosan. **Bioconjugate Chemistry**, v. 21, n. 10, p. 1720–1723, 2010.
- LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. **S.T.P. Pharma Sciences**, Paris v.9, p.411-418, 1999.
- 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.
- LEPELTIER, E.; BOURGAUX, C.; COUVREUR, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 71, p. 86–97, 2014.
- LESPEL, G.; GIGAULT, J. Hyphenated analytical techniques for multidimensional characterisation of submicron particles: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 692, n. 1-2, p. 26–41, 2011.
- LI, F. et al. The internalization of fluorescence-labeled PLA nanoparticles by macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 2, p. 506-513, 2013.

LIAO, W. et al. Comprehensive characterizations of nanoparticle biodistribution following systemic injection in mice. **Nanoscale**, v.5, p. 11079–11086, 2013.

LIU, L. et al. Particle-size Measurements in a Micro-channel with Image Dynamic Light Scattering Method. **Procedia Engineering**, v. 102, p. 904–910, 2015.

LOESCHNER, K. et al. Optimization and evaluation of asymmetric flow field-flow fractionation of silver nanoparticles. **Journal of Chromatography A**, v. 1272, p. 116–125, 2013.

MA, P. L.; BUSCHMANN, M. D.; WINNIK, F. M. Complete physicochemical characterization of DNA/chitosan complexes by multiple detection using asymmetrical flow field-flow fractionation. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 23, p. 9636–9643, 2010.

MACLAUGHLIN, F. C. et al. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 56, n. 1-3, p. 259–272, 1998.

MARIN, E.; BRICEÑO, M. I.; CABALLERO-, C. Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. **International Journal of Nanomedicine**, p. 3071–3091, 2013.

MARKOVSKY, E. et al. Administration, distribution, metabolism and elimination of polymer therapeutics. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 446–460, 2012.

MATHAES, R. et al. Application of different analytical methods for the characterization of non-spherical micro- and nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 2, p. 620–629, 2013.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agents Smancs. **Cancer Research**, v. 46, n. December, p. 6387–6392, 1986.

MESSAUD, F. A. et al. An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 34, n. 4, p. 351–368, 2009.

MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on

formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 9–24, 2010.

MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 19-20, p. 842–850, 2010.

MOGHIMI, S. M.; GRAY, T. A single dose of intravenously injected poloxamine-coated long-circulating particles triggers macrophage clearance of subsequent doses in rats. **Clinical Science**, v. 93, n. 4, p. 371-379, 1997.

MOGHIMI, S. M.; SZEBENI, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n. 6, p. 463–478, 2003.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n.1, p. 561–573, 2006.

MOQUIN, A.; WINNIK, F. M.; MAYSINGER, D. Methods in Molecular Biology. **Cellular and Subcellular Nanotechnology**. v. 991, p. 325–341, 2013.

MORACHIS, M.; MAHMOUD, E. A.; ALMUTAIRI, A. Physical and Chemical Strategies for Therapeutic Delivery by Using Polymeric Nanoparticles. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 3, p. 505–519, 2012.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113–142, 2010.

MOSQUEIRA, V. C. et al. Interactions between a macrophage cell line (J774A1) and surface-modified poly (D,L-lactide) nanocapsules bearing poly(ethylene glycol). **Journal of Drug Targeting**, v. 7, n. 1, p. 65–78, 1999.

MOSQUEIRA, F. C. V. et al. Poly (D , L -Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process : Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 5, p. 614–626, 2000.

MOSQUEIRA, V. C. F. et al. Biodistribution of Long-Circulating PEG-Grafted Nanocapsules in Mice : Effects of PEG Chain Length and Density. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 10, p. 1411-1419, 2001a.

MOSQUEIRA, V. C. F. et al. Relationship between complement activation , cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**, v. 22, n. 22, p. 2967-2979, 2001b.

MOSTAFAVI, S. H.; R, J. B. Nano-Sized Drug Delivery. **Molecular Pharmaceutics & Organic Process Research**, v. 1, n. 4, p. 1–2, 2013.

MURO, S. Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 2, p. 125-137, 2012.

NAGAVARMA, B. V. N. et al. Diferent techniques for preparation of polymeric nanoparticles - A review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research** v. 5, 2012.

OJA, C. D. et al. Influence of dose on liposome clearance : critical role of blood proteins. **Biochimica et Biophysica Acta** 1 v. 1281, p. 31–37, 1996.

OLIVEIRA, L. T. **Nanocápsulas: variação das características superficiais, caracterização e efeitos após administração intravenosa**. Dissertação de mestado em Ciências Farmacêuticas, Cipharma, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2009.

OWENS, D. E.; PEPPAS, N. A. Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics** v. 307, p. 93–102, 2006.

PANAGI, Z. et al. Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA–mPEG nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, n. 1-2, p. 143–152, 2001.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147–166, 2012.

PAULA, C. S. **Desenvolvimento e caracterização fotofísica de nanoestruturas contendo AICIPc para terapia fotodinâmica experimental de tumores sólidos**. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas, Nupeb, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2008.

PEREIRA, M. A. et al. Biodistribution study and identification of inflammatory sites using nanocapsules labeled with ^{99m}Tc –HMPAO. **Nuclear Medicine**

Communications, v. 30, n. 9, p. 749–755, 2009.

PINTO REIS, C. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.

PRAKASH, U. R. T.; THIAGARAJAN, P. Nanoemulsions for drug delivery through different routes. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 1–13, 2011.

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.

RASAL, R. M.; JANORKAR, A. V.; HIRT, D. E. Poly(lactic acid) modifications. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 3, p. 338–356, 2010.

ROSS HALLETT, F. Scattering and Particle Sizing Applications. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**, p. 2488–2494, 2010.

RÜBE, A. et al. Core-shell structure of Miglyol/poly(D,L-lactide)/Poloxamer nanocapsules studied by small-angle neutron scattering. **Journal of Controlled Release**, v. 107, n. 2, p. 244–252, 2005.

RUNYON, J. R.; ULMUS, M.; NILSSON, L. A perspective on the characterization of colloids and macromolecules using asymmetrical flow field-flow fractionation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 442, p. 25–33, 2014.

SA, L. T. M. et al. Biodistribution of nanoparticles: initial considerations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 602–604, 2012.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S. et al. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, n. 1-2, p. 71–80, 2000.

SCHÄDLICH, A. et al. How Stealthy are PEG-PLA Nanoparticles? An NIR In Vivo Study Combined with Detailed Size Measurements. **Pharmaceutical Research**, v.25, p. 1995-2007, 2011.

SHAN, X. et al. In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of long-circulation nanoparticles with poly(ethylene-glycol)-modified PLA (BAB type) triblock

- copolymer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, n. 2, p. 303–311, 2009.
- SHAYNE C. Gad. The mouse, capítulo 2, p.123. In:___“**Animal Models in toxicology**” 2 ed. Informa Healthcare, 933p, 2008.
- SHENG, Y. et al. Long-circulating polymeric nanoparticles bearing a combinatorial coating of PEG and water-soluble chitosan. **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2340-2348, 2009.
- SINGH, R.; LILLARD, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, n. 3, p. 215–223, 2009.
- SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 1–20, 2001.
- SUK, J. S. et al. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Published online, 2015.
- TILL, U. et al. Asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering and quasi-elastic light scattering for characterization of polymersomes: comparison with classical techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.406, n. 30, p. 7841–7853, 2014.
- TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3, p. 131–135, 2011.
- TORCHILIN, V. P. Drug targeting. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. S81–S91, 2000.
- ÜNAL, H. et al. Core–shell hybrid nanocapsules for oral delivery of camptothecin: formulation development, in vitro and in vivo evaluation. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 42, p. 1–13, 2015.
- USKOKOVIĆ, V. et al. Dynamic light scattering and zeta potential of colloidal mixtures of amelogenin and hydroxyapatite in calcium and phosphate rich ionic milieus. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 6, p. 521–532, 2011.
- VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1025–1058, 2009.
- VENKATARAMAN, S. et al. The effects of polymeric nanostructure shape on drug

- delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 14-15, p. 1228-1246, 2011.
- VRIGNAUD, S.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 33, p. 8593-8604, 2011.
- WAHLUND, K. G. Flow field-flow fractionation: Critical overview. **Journal of Chromatography A**, v. 1287, p. 97–112, 2013.
- WAHLUND, K. G.; GIDDINGS, J. C. Properties of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel having one permeable wall. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 1332–1339, 1987.
- WEISS, V. M. et al. Poly(glycerol adipate)-fatty acid esters as versatile nanocarriers: From nanocubes over ellipsoids to nanospheres. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 1, p. 156-164, 2012.
- WU, Y. et al. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, n. 1-2, p. 235-245, 2005.
- WYATT, P. J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Analytica Chimica Acta**, v. 272, n. 1, p. 1–40, 1993.
- XIAO, R. Z. et al. Recent advances in PEG-PLA block copolymer nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 1057-1065, 2010.
- XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 112–115, 2008.
- XU, R. Light scattering: A review of particle characterization applications. **Particuology**, v. 18, p. 11-21, 2015.
- YOHANNES, G. et al. Asymmetrical flow field-flow fractionation technique for separation and characterization of biopolymers and bioparticles. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 27, p. 4104-4116, 2011.
- ZHANG, L. et al. Chitosan Surface-Modified Hydroxycamptothecin Loaded Nanoparticles with Enhanced Transport Across Caco-2 Cell Monolayer. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, n. 9, p. 2912–2920, 2006b.
- ZHANG, L.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for

improved tissue regeneration. **Nano Today**, v. 4, n. 1, p. 66–80, 2009.

ZHOU, X. et al. Investigation of acetylated chitosan microspheres as potential chemoembolic agents. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 387–94, 2014.