

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FALCULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

WALLACE MATEUS PRATA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS
CARREADORAS DE PROTEINAS COMO POTENCIAIS
ADJUVANTES PARA USO EM VACINAS**

BELO HORIZONTE - MG

2011

WALLACE MATEUS PRATA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS
CARREADORAS DE PROTEINAS COMO POTENCIAIS
ADJUVANTES PARA USO EM VACINAS**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Junior (Faculdade de Farmácia – UFMG)

Co-orientadora: Dr^a. Sílvia Ligório Fialho (Fundação Ezequiel Dias – FUNED)

BELO HORIZONTE - MG

2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

WALLACE MATEUS PRATA

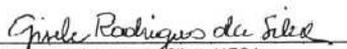
"Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas carreadoras de proteínas como potenciais adjuvantes para uso em vacinas"

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA



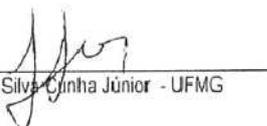
Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva - CEFET-MG



Profa. Dra. Giselle Rodrigues da Silva - UFSJ



Dra. Sílvia Ligório Fialho - Fundação Ezequiel Dias



Prof. Dr. Armando da Silva Cinha Júnior - UFMG

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2011

Dedico esta dissertação,

Aos meus Pais, por tudo que existe em mim que não é só meu, pela construção compartilhada de valores que alicerçam meu caráter.

A minha importante irmã sempre por perto com amizade e força.

A Olívia, não vou dizer pela compreensão mútua existente, mas nem por isso pouco divertida. Ao Incentivo norteador, minha iluminação. Caminho sonhado e percorrido junto.

Aos meus familiares e amigos por todo apoio e presença que fazem do trajeto um sucesso.

A todas as mulheres com histórico de câncer ginecológico, em especial as que cederam parte do problema por expectativas na ciência.

Meus sinceros agradecimentos,

Em especial ao Armando, pela orientação, confiança e respeito.

A Sílvia, pela co-orientação, confiança, apoio, oportunidade e pelos momentos de prospecção científica.

A Luciana, por respeitar minha experiência profissional, me ajudar a sistematizar a forma acadêmica e pelas portas abertas na pesquisa. Muito mais que colaboradora, a aproximação fez intensificar uma amizade, franca e sincera.

Ao fenômeno de humanidade e competência, Prof. Dr. Agnaldo e toda sua equipe.

Ao Thiago, Bic J., que começou como bolsista e se tornou um grande profissional e sobre tudo um grande amigo.

A minha grande amiga Isabela, bolsista, dedicada e competente, que se esforçou com disposição, empenho e satisfação nas ações do projeto. Uma excelente pessoa com um futuro brilhante pela frente. Obrigado por tudo!

A Jamile e Randel, por sempre acompanhar a trajetória, pelos conselhos e treinamentos.

Ao Bruno, Stela, Alisson, Maria Amélia e toda a equipe da DDFB sempre muito disposta.

A Priscila, Elislene e Rafael por toda contribuição de espaço, equipamentos e principalmente companhia.

A toda minha grande equipe da Unidade I, sempre unida e forte, torcendo por mim em todas as ocasiões.

A Ana Elisa, Mariana e Luiz pela amizade sincera e apoio profissional quando da necessidade de cobrir minha ausência na produção feita com inteligência, responsabilidade e destreza.

Ao Cláudio da fazenda sempre disposto e tranquilo em todas as participações no projeto.

Ao Alisson pela colaboração e conversas e toda DPF, pelo auxílio, principalmente a Margareth.

A Roberta pelas palavras de último momento, em poucos minutos houve um "impulsionante" clareamento, pela compreensão e por me ajudar dispostamente e a toda equipe da DPB.

A todas as pessoas do laboratório de biologia celular, em especial a Josiane.

Aos sensacionais, Flávia e Toninho, pela forte parceria e por estarem comigo sempre, sem medir esforços.

A Sandra e Rômulo do SAP pela colaboração nas liofilizações.

Ao laboratório de engenharia de biomateriais da UFMG pela contribuição com os testes de degradação e MEV.

A todos do laboratório de tecnologia farmacêutica, principalmente aos que contribuíram com atividades ou boas intenções, ressaltando o Daniel, Lorena, Cristiane, Elton, Guilherme e Samuel.

Destaque a Leila, Lili e Diego pelo crescimento científico conjunto, pelas dicas, treinamentos, conversas e ajudas fornecidas.

Ao Sr. Adil e a equipe que mantêm o laboratório organizado e em condições de operação.

Aos porteiros da faculdade de farmácia que quase nunca reclamavam com o horário que eu executava os testes.

A Fundação Ezequiel Dias, Funed, pelo projeto e infra-estrutura.

Aos diretores da Associação dos Trabalhadores da Funed, que suportaram minha ausência e quando foi preciso decidiram, sabiamente, por mim.

Ao grande amigo André, pela força e dedicação.

Ao jornalista e amigo, Thiago, pela revisão ortográfica da dissertação.

A todos meus amigos e aos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

A nanotecnologia vem avançando no âmbito nacional e internacional na área farmacêutica, visando à administração de novas substâncias com atividade farmacológica/imunológica. A nanomedicina ou o desenvolvimento de tratamentos clínicos efetivos relacionados à nanotecnologia é baseado nos sistemas de liberação controlada com o objetivo de carrear moléculas de interesse terapêutico nos organismos, tecidos ou células, para melhorar a eficácia terapêutica e diminuir efeitos tóxicos. As nanopartículas são preparadas por polímeros biodegradáveis ou não, em que a molécula de interesse terapêutico pode estar dissolvida, recoberta, encapsulada ou dispersa na matriz polimérica. Apesar de muitos tipos de polímeros apresentarem algumas vantagens específicas, os poli-ésteres derivados dos ácidos láctico e glicólico possuem estudos para uso em humanos, inicialmente em suturas e próteses ortopédicas e estão sendo comumente utilizados para preparação de nanopartículas essencialmente por sua característica biodegradável e de controle de liberação. Com o objetivo de dominar o processo de fabricação de nanopartículas e desenvolver um adjuvante para produção de vacinas, foi formulado e caracterizado um modelo para incorporação e encapsulamento de proteínas. Para escolha da melhor formulação, foram avaliados os diferentes métodos de obtenção de nanopartículas, bem como os equipamentos utilizados na produção, tempo de mistura e sonicação, volume da fase aquosa interna, concentração de polímero, concentração de tensoativo, concentração de proteína e concentração de crioprotetor. Os parâmetros investigados para escolha desse modelo e processo de fabricação foram pH da preparação, tamanho, distribuição, potencial zeta das partículas e taxa de encapsulamento das proteínas. Para avaliação da citotoxicidade foi realizado o ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT, utilizando a linhagem celular HEK (rim de embrião humano) e diferentes concentrações de nanopartículas, PLGA e de tensoativo. Os resultados obtidos reforçam a ausência de toxicidade das nanopartículas, de seus componentes isolados e de substâncias de degradação, no entanto, estudos em outras linhagens celulares deverão ser realizados. As nanopartículas produzidas apresentaram baixa dispersão de tamanho, diâmetro suficiente para serem filtradas a 220 nm com alto rendimento, valores de potencial zeta satisfatórios para proporcionar estabilidade da formulação e eficiência de encapsulamento de proteínas acima de 70%, indicando grande capacidade do sistema. No contexto atual, a nanotecnologia farmacêutica tem o potencial de ser o principal instrumento no processo de desenvolvimento de novos medicamentos com tecnologia avançada, solucionando vários problemas terapêuticos das formulações convencionais. A associação “substância com potencial terapêutico + nanocarreador” representa uma mudança de paradigma para o desenvolvimento de fármacos, biofármacos e vacinas, contribuindo para o aumento da produção científica e para geração de produtos inovadores.

Abstract

Nanotechnology has been advancing at the national and international pharmaceutical, seeking the administration of new substances with pharmacological immunological activity. The nanomedicine or the development effective clinics treatments related to nanotechnology is based on controlled release system with purpose of carrying active agents in organisms, tissues or cells, to improve therapeutic efficacy and decrease toxic effects. The nanoparticles are controlled release systems prepared with biodegradable polymers or non-biodegradable, where molecules of therapeutic interest can be dissolved, coated, encapsulated or dispersed in the polymeric matrix. Although many types of polymers present some specific advantages, the lactic and glycolic acids derivatives have been studied for use in humans, initially in sutures and orthopedic prostheses and they are commonly used for preparation of nanoparticles mainly by its characteristic of biodegradability and release control. With the aim of dominate the manufacturing process of nanoparticles and to develop an adjuvant for vaccine, was designed and characterized a model for incorporation and encapsulation of proteins. The best formulation was chosen by examining the different methods of obtaining nanoparticles, and equipment used in production, mixing and sonication time, internal aqueous phase volume, polymer concentration, surfactant concentration, protein concentration and cryoprotectant. The parameters investigated for choosing this model and manufacturing process were pH of the preparation, distribution, size, zeta potential of the nanoparticles and encapsulation rate of proteins. The purpose will be to induce immunity, using nanoparticles containing proteins extracted from human epithelial ovarian cancer. The cellular viability in the cell line HEK (Human Kidney embryo) and osteoblasts were determined by the colorimetric assay of MTT which consists in the reduction of MTT by mitochondrial dehydrogenase enzyme, present only in viable cells, producing formazan, a blue-violet compound that once precipitated is quantified by spectrophotometry at 595 nm. The results indicate the lack of toxicity of nanoparticles, their components and degradation of substances, however, studies in other cell lines should be conducted. Nanoparticles produced showed low size dispersion, diameter enough to be filtered at 220 nm with high yield, values of zeta potential to provide satisfactory stability of the formulation and encapsulation efficiency of proteins above 70%, indicating a high system capacity. In the present context, pharmaceutical nanotechnology has the potential to be the main instrument in the process of developing new products with advanced technology, solving several problems of therapeutic conventional formulations. The association "of potential therapeutic substance + nanocarrier" represents a paradigm shift for the development of pharmaceuticals, biopharmaceuticals and vaccines, contributing to the increase of scientific production and to generate innovative products.

Lista de figuras

Figura 1 – Diagrama esquemático das categorias de nanopartículas, nanocápsulas e nanoesferas. (Adaptado de SCHAFFAZICK <i>et al.</i> , 2003).....	20
Figura 2 - Diagrama esquemático do modo de preparo da formulação.	34
Figura 3 – Diagrama esquemático do processo de preparo das amostras para ensaio de doseamento de proteínas.	40
Figura 4 – Preparo das amostras para avaliação da eficiência de crioproteção.	42
Figura 5 – Perfil de distribuição de tamanho, utilizando o método de emulsão múltipla seguido pela evaporação do solvente.....	48
Figura 6 – Perfil de distribuição de tamanho, aumentando o tempo de homogeneização mecânica.	49
Figura 7 – Perfil de distribuição de tamanho, aumentando a velocidade de agitação mecânica.	49
Figura 8 – Perfil de distribuição de tamanho, substituindo o tensoativo.	50
Figura 9 – Perfil de distribuição de tamanho, adicionando tensoativo na fase aquosa interna. .	50
Figura 10 – Perfil de distribuição de tamanho, introduzindo agitação por sonda de ultrassom durante a segunda emulsificação.	51
Figura 11 – Perfil de distribuição de tamanho, aumentando do tempo da homogeneização por sonicação.	51
Figura 12 – Perfil de distribuição de tamanho, introduzindo agitação por sonicação durante a primeira emulsificação.	51
Figura 13 – Perfil de distribuição de tamanho, utilizando método de emulsão múltipla seguido de difusão do solvente.	52
Figura 14 – Perfil de distribuição de tamanho, substituindo a agitação mecânica pela sonicação.	52
Figura 15 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 10% (v/v) de fase aquosa interna.	53
Figura 16 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 13% (v/v) de fase aquosa interna.	54
Figura 17 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 16% (v/v) de fase aquosa interna.	54
Figura 18 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 20% (v/v) de fase aquosa interna.	55
Figura 19 – Influência dos diferentes volumes de fase aquosa interna no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com o índice de polidispersão e carga superficial.	56
Figura 20 – Influência dos diferentes volumes da fase aquosa interna no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com a eficiência de encapsulamento.	59

Figura 21 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações preparadas por agitação de 60 segundos.	60
Figura 22 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações preparadas por agitação de 90 segundos.	61
Figura 23 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações preparadas por agitação de 120 segundos.	61
Figura 24 – Influência dos diferentes tempos de agitação no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com o índice de polidispersão e carga superficial.	63
Figura 25 – Influência dos diferentes tempos de agitação por sonda de ultrassom no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com a eficiência de encapsulamento.	65
Figura 26 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 2% (p/v) de PLGA.	67
Figura 27 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 3% (p/v) de PLGA.	67
Figura 28 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 4% (p/v) de PLGA.	68
Figura 29 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 5% (p/v) de PLGA.	68
Figura 30 – Influência das diferentes concentrações de polímero no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com o índice de polidispersão e carga superficial.	71
Figura 31 – Influência das diferentes concentrações de polímero no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com a eficiência de encapsulamento.	72
Figura 32 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações sem tensoativo.	73
Figura 33 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 1% (p/v) de tensoativo.	74
Figura 34 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 2% (p/v) de tensoativo.	74
Figura 35 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 3% (p/v) de tensoativo.	75
Figura 36 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 4% (p/v) de tensoativo.	75
Figura 37 – Influência das diferentes concentrações de tensoativo no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com o índice de polidispersão e carga superficial.	77
Figura 38 – Influência das diferentes concentrações de tensoativo no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com a eficiência de encapsulamento.	79
Figura 39 – Perfis de distribuição de tamanho para formulações contendo 0,00:1,00 razão em massa de Trealose:PLGA.	81
Figura 40 – Perfis de distribuição de tamanho para formulações contendo 0,20:1,00 razão em massa de Trealose:PLGA.	82
Figura 41 – Perfis de distribuição de tamanho para formulações contendo 0,35:1,00 razão em massa de Trealose:PLGA.	82

Figura 42 – Perfis de distribuição de tamanho para formulações contendo 0,50:1,00 razão em massa de Trealose:PLGA.....	83
Figura 43 – Perfis de distribuição de tamanho para formulações contendo 1,00:1,00 razão em massa de Trealose:PLGA.....	83
Figura 44 – Perfis de distribuição de tamanho para formulações contendo 2,00:1,00 razão em massa de Trealose:PLGA.....	84
Figura 45 – Teor de proteína encapsulada para os grupos de preparações contendo diferentes razões em massa de Trealose:PLGA.....	88
Figura 46 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 2,50 % (p/p) de BSA.....	90
Figura 47 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 5,00 % (p/p) de BSA.....	90
Figura 48 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 7,50 % (p/p) de BSA.....	91
Figura 49 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 10,00 % (p/p) de BSA.....	91
Figura 50 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 15,00 % (p/p) de BSA.....	92
Figura 51 – Teor de proteína encapsulada para os grupos de preparações contendo diferentes concentrações de BSA.....	94
Figura 52 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 5,00 % (p/p) de Citocromo C.	96
Figura 53 – Eficiência de encapsulamento comparando os grupos de preparações contendo diferentes proteínas.....	98
Figura 54 – Perfis de distribuição de tamanho da formulação de nanopartículas contendo proteínas extraídas de câncer de ovário.	100
Figura 55 – Perfis de distribuição de potencial zeta da formulação de nanopartículas contendo proteínas extraídas de câncer de ovário.	101
Figura 56 – Eficiência de encapsulamento da formulação de nanopartículas contendo proteínas extraídas de câncer de ovário.	102
Figura 57 – Fotomicrografia de nanopartículas marcadas com Lysotracker red®.....	103
Figura 58 – Fotomicrografia da suspensão de nanopartículas sem crioprotetor.....	104
Figura 59 – Fotomicrografias da suspensão de nanopartículas com crioprotetor.....	105
Figura 60 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta.	108
Figura 61 – Fotografia das suspensões de nanopartículas.....	109
Figura 62 – Viabilidade celular de células renais de embrião humano (HEK) expostas a diferentes concentrações de componentes da formulação e de suspensões de nanopartículas.	110
Figura 63 – Viabilidade celular de osteoblastos submetida a substâncias de degradação de nanopartículas liofilizadas.....	112

Lista de tabelas

Tabela 1 – Amostras biológicas obtidas de pacientes com câncer de ovário do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.	35
Tabela 2 – Volumes e concentrações das soluções para elaboração da curva de calibração do método direto.	41
Tabela 3 – Preparações obtidas por meio da variação da concentração da fase aquosa interna.	53
Tabela 4 – Valores médios de tamanho das nanopartículas.	56
Tabela 5 – Valores médios de índice de polidispersão das nanopartículas.	58
Tabela 6 – Valores médios de potencial zeta das formulações de nanopartículas.	58
Tabela 7 – Preparações obtidas por meio da variação do tempo de agitação por sonda de ultrassom.	60
Tabela 8 – Valores médios de tamanho das nanopartículas.	62
Tabela 9 – Valores médios de índice de polidispersão das nanopartículas.	63
Tabela 10 – Valores médios de potencial zeta das formulações de nanopartículas.	64
Tabela 11 – Preparações obtidas por meio da variação da concentração de polímero na fase orgânica.	66
Tabela 12 – Valores médios de tamanho das nanopartículas.	69
Tabela 13 – Valores médios de índice de polidispersão das nanopartículas.	70
Tabela 14 – Valores médios de potencial zeta das formulações de nanopartículas.	71
Tabela 15 – Preparações obtidas por meio da variação da concentração de tensoativo.	73
Tabela 16 – Valores médios de tamanho das nanopartículas.	77
Tabela 17 – Valores médios de índice de polidispersão das nanopartículas.	78
Tabela 18 – Valores médios de potencial zeta das formulações de nanopartículas.	78
Tabela 19- Preparações obtidas por meio da variação na razão em massa de Trealose:PLGA adicionadas a fase aquosa externa da suspensão.	80
Tabela 20 - Valores médios de tamanho de nanopartículas e índice de ressuspensão.	85
Tabela 21 - Valores médios de potencial zeta das nanopartículas antes da etapa de congelamento/liofilização.	86
Tabela 22 - Valores médios de potencial zeta das nanopartículas após reconstituição.	87
Tabela 23 - Preparações obtidas por meio da variação na concentração de proteína.	89
Tabela 24 – Valores médios de tamanho de nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações de nanopartículas.	93
Tabela 25 – Quantitativo em gramas de BSA encapsulado por cada grupo de nanopartículas preparadas.	95
Tabela 26 - Preparações obtidas por meio da variação na concentração de proteína.	96
Tabela 27 – Valores médios de tamanho de nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações de nanopartículas contendo Citocromo C.	97

Tabela 28 – Quantitativo em gramas de proteína encapsulada por cada grupo de nanopartículas preparadas.....	99
Tabela 29 – Resultados de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulamento para nanopartículas contendo proteínas extraídas de câncer de ovário.	101
Tabela 30- Componentes avaliados no ensaio de citotoxicidade com as respectivas concentrações testadas.	106
Tabela 31: Nanopartículas avaliadas no ensaio de citotoxicidade com as respectivas concentrações testadas.	106
Tabela 32- Grupos das formulações de nanopartículas liofilizadas submetidas à degradação e ao ensaio de citotoxicidade com a respectiva concentração testada.....	111



Lista de abreviaturas e símbolos

BSA – Albumina Soro Bovina

PLGA – Ácido poli-lático-co-glicólico

PLA – Ácido poli-lático

PBS – Solução tampão fosfato

RPM – rotações por minuto

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonila

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

DLS – Espalhamento dinâmico de luz (Dynamic light scattering)

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

HEK – Linhagem celular renal de embrião humano (Human Embryonic Kidney)

SFB – Soro fetal bovino

MTT – (3 - [4,5-dimethylthiazol-2, 5 - difeniltetrazolium bromide thiazole blue)

PVA – Álcool polivinílico

PLX – Poloxamer

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

O/A – Emulsão simples do tipo óleo em água

A/O/A – Emulsão múltipla do tipo água em óleo em água

A/O – Emulsão simples do tipo água em óleo

EUA – Estados Unidos da América

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

Da - Dalton

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Nanotecnologia	16
1.2. Cadeia de valor da nanotecnologia	18
1.3. Nanopartículas	19
1.4. Polímeros utilizados na fabricação de nanopartículas	20
1.5. Nanotecnologia e vacinas	24
1.6. Neoplasias e imunização utilizando nanopartículas	27
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Materiais	30
3.2. Equipamentos e instrumentos utilizados.....	31
3.3. Metodologia	32
3.3.1. Obtenção de nanopartículas	32
3.3.1.1. Preparação das nanopartículas brancas.....	33
3.3.1.2. Preparação das nanopartículas contendo BSA	34
3.3.1.3. Preparação das nanopartículas contendo Citocromo C	35
3.3.1.4. Preparação das nanopartículas contendo proteínas extraídas de câncer de ovário.....	35
3.3.1.4.1. Amostras biológicas de câncer de ovário.....	35
3.3.1.4.2. Extração de proteínas	36
3.3.1.4.3. Nanopartículas	36
3.3.2. Caracterização das nanopartículas	37
3.3.2.1. Determinação do pH.....	37
3.3.2.2. Determinação do diâmetro das partículas e do índice de polidispersão	37
3.3.2.3. Determinação da carga superficial das nanopartículas	38
3.3.2.4. Determinação da taxa de encapsulamento de proteína	39
3.3.2.4.1. Preparo das amostras para doseamento de proteínas	39
3.3.2.4.2. Método de doseamento de proteínas totais	40
3.3.3. Liofilização e ressuspensão do pó de nanopartículas liofilizadas.....	42
3.3.4. Avaliação da morfologia e característica de encapsulação	43
3.3.4.1. Microscopia ótica de fluorescência	43
3.3.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV.....	43
3.3.5. Ensaio de citotoxicidade	44
3.3.5.1. Ensaio de citotoxicidade celular dos componentes da formulação e das nanopartículas	44
3.3.5.2. Ensaio de degradação acelerada e citotoxicidade das substâncias de degradação	46
3.3.6. Análise estatística.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1. Obtenção de nanopartículas	48
4.2. Efeito da variação da concentração da fase aquosa interna	52
4.3. Efeito da variação do tempo de agitação por sonda de ultrassom	60
4.4. Efeito da variação da concentração de polímero	66

4.5.	Efeito da variação da concentração de tensoativo	72
4.6.	Efeito da variação da concentração de crioprotetor	80
4.7.	Efeito da variação da concentração de proteína.....	89
4.8.	Efeito da variação da massa molar das proteínas encapsuladas	96
4.9.	Avaliação das nanopartículas contendo proteínas extraídas do câncer de ovário	100
4.10.	Avaliação da morfologia e característica de encapsulação	103
4.10.1.	Microscopia ótica de fluorescência	103
4.10.2.	Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV.....	104
4.11.	Ensaio de citotoxicidade celular das nanopartículas	106
4.12.	Ensaio de citotoxicidade das substâncias de degradação acelerada das nanopartículas	111
5.	CONCLUSÃO.....	113
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nanotecnologia

Entre os principais objetivos da indústria farmacêutica está o desenvolvimento de agentes terapêuticos seletivos para áreas específicas do organismo de forma a potencializar os efeitos terapêuticos e diminuir os efeitos adversos sistêmicos.

Historicamente, o tratamento com substâncias quimioterápicas apresenta alta ocorrência de efeitos adversos sistêmicos, sendo exemplos comumente conhecidos do desequilíbrio entre efeito terapêutico e tóxico. Os agentes citotóxicos podem ser efetivos contra as células tumorais, porém são perigosos para as outras células, resultando em possíveis efeitos indesejados. O principal objetivo dos pesquisadores é direcionar o fármaco para liberação no local adequado, em concentrações e tempo suficientes para proporcionar efeito terapêutico (KINGSLEY *et al.*, 2006).

O direcionamento das moléculas de interesse, por si só, é complexo, pois depende de fatores como composição química, tamanho molecular, lipofilicidade e afinidade de interações específicas com o sítio de ação. Tudo isso torna o trabalho dos pesquisadores, em delinear novas moléculas para lançamento de novos produtos, muito complicado, considerando que apenas uma pequena parte das novas moléculas chega a ser aplicável do ponto de vista clínico. Mesmo que uma nova molécula de interesse terapêutico seja desenvolvida e demonstre atividade que supere as expectativas clínicas, dificilmente apresentará propriedades físico-químicas ideais para que ocorra interação específica e direcionada ao local de ação, considerando solubilidade, absorção, biodistribuição, pH, captação celular e fatores como eliminação adequados (KINGSLEY *et al.*, 2006).

Uma alternativa para minimizar estes problemas é a associação dessas substâncias a sistemas carreadores de moléculas com base em nanotecnologia, que podem apresentar vantagens nos aspectos que limitam o lançamento de novos produtos ou melhorias dos já existentes no mercado.

O termo nanotecnologia foi empregado pela primeira vez em uma publicação datada de 1974 por um engenheiro japonês, Norio Taniguchi. Antes dessa denominação, em 1959, Richard Feynman já chamava atenção para o fato, em um contexto visionário para possíveis máquinas moleculares de que, na dimensão atômica, trabalha-se com leis diferentes e, assim, devem ser esperados eventos diferenciados, ou seja, outros tipos de efeitos e novas possibilidades. Desde então e somado a outros acontecimentos importantes, como o desenvolvimento do microscópio de tunelamento, capaz de processar imagens eletrônicas, a descoberta dos Fullerenos e desenvolvimento dos nanotubos de carbono, a nanotecnologia vem tomando papel importante entre as pesquisas científicas para o desenvolvimento de novos produtos (BRASIL, 2010 a; ZHANG & WEBSTER, 2009; KINGSLEY, *et. al.*, 2006; USKOKOVIC, 2007; SILVA, 2007).

A história da nanotecnologia, denominada como tal, é recente, porém há um exemplo emblemático de sua aplicação no século IV d.C, com o chamado vidro rubi na taça de Licurgo. Esta taça, feita de bronze com um baixo relevo em vidro rubi, continha partículas de 20 nm de ouro em sua composição, fornecendo coloração avermelhada ao vidro. A variação no tamanho dessas partículas fazia com que o vidro adquirisse colorações diferentes com absorção de luz em 530 nm. Essa característica foi observada por Faraday, no ano de 1857, em experimentos com colóides de metais. Contribuições como essa e outras, como por exemplo, na área da metalurgia com a composição do aço de Wootz ou aço de damasco, evidencia que, mesmo inconscientemente, o homem do passado executava processos “muito pequenos” (BRASIL, 2010a; SILVA, 2007; REIBOLD *et al.*, 2009).

A nanotecnologia, com conceitos atuais, não é somente uma promessa de futuro, ela permeia quase todas as áreas produtivas no mundo e, ainda que de forma mais singela do que revolucionária, ela está presente nas seguintes áreas:

- Energética em pás para geradores eólicos, células solares e baterias.
- Iluminação em LEDs.
- Automobilísticas em pinturas especiais.

- Esportiva nas raquetes de tênis, roupas antitranspirantes, tacos de golfe e calçados.
- Tecelagem em tecidos resistentes a sujidades.
- Acondicionamento em embalagens com barreiras a umidade e bactericidas
- Farmacêutica e cosmética com liberação controlada e direcionamento de fármacos e protetores solares (BRASIL, 2010a; HORTON & KHAN, 2006).

1.2. Cadeia de valor da nanotecnologia

De acordo com a Lux Research Inc., não existe um mercado restrito de nanotecnologia, mas uma cadeia de valor com vasta amplitude, desde nanomateriais e nanointermediários até nanoaplicações. O mercado total da cadeia de valor de produtos nanotecnológicos atingiu US\$ 135 bilhões em 2007, podendo alcançar US\$ 693 bilhões até o final de 2012 e cerca de US\$ 2,95 trilhões em 2015 (LUX RESEARCH INC., 2004; CIENTIFICA, 2008).

A percepção de que a nanotecnologia e a nanociência representam um novo patamar de conhecimento, com imensos e ainda não devidamente mensurados impactos científicos e econômicos, levou os países desenvolvidos, como os Estados Unidos da América, Japão e os integrantes da comunidade Européia, a desenhar iniciativas de financiamento privilegiadas para a área, procurando novas vantagens competitivas e tecnológicas (BRASIL, 2010b)

Com financiamentos mais modestos do que os exibidos nos países desenvolvidos, os países em desenvolvimento também descobriram o potencial da nanotecnologia e como consequência formularam suas iniciativas, nos campos da energia, agricultura, preservação ambiental e saúde pública. Desde o ano de 2000, o governo brasileiro vem empreendendo esforços para a definição de um programa para o desenvolvimento e a disseminação das nanociências e da nanotecnologia. Entre 2000 e 2007, o Brasil investiu por meio de suas universidades e centros de pesquisa

R\$ 160 milhões na pesquisa da nanotecnologia. Somando os investimentos do setor privado, estima-se um total de R\$ 320 milhões no período (BRASIL, 2010b).

Os recursos, ainda que modestos comparados a outros investimentos feitos no País nos últimos anos, permitiram que as redes de pesquisa e desenvolvimento fossem criadas, aumentando a contribuição científica, porém sem grandes avanços até o momento na geração de produtos (BRASIL, 2010b).

Grande parcela do crescimento do mercado não provém da produção de nanomateriais básicos, mas sim da capacidade de alguns segmentos como o farmacêutico de transformar os nanomateriais básicos em produtos de alto valor agregado, como as nanopartículas para transporte de fármacos (BRASIL, 2010b).

1.3. Nanopartículas

Assim como em outras áreas produtivas, a nanotecnologia se destaca intensamente na área farmacêutica em sistemas de carreamento de moléculas de interesse terapêutico. As estruturas que mediam esse transporte, chamadas de nanopartículas, são colóides sólidos estáveis, constituídas por polímeros ou materiais lipídicos capazes de carrear substâncias e controlar liberação. Essas estruturas, geralmente, possuem tamanho que variam de 10 a 1000 nm, onde a molécula pode estar dissolvida, recoberta, encapsulada ou dispersa na matriz da nanopartícula. O termo nanopartículas inclui classificações em duas categorias, as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (figura 1). As nanocápsulas são sistemas vesiculares em que a molécula pode estar inserida no interior de uma cavidade aquosa ou oleosa, a qual é circundada por uma membrana lipídica ou polimérica. As nanoesferas são sistemas matriciais em que a molécula encontra-se dispersa fisicamente e uniformemente na matriz polimérica ou lipídica (ZHANG & WEBSTER, 2009; KINGSLEY *et al.*, 2006; USKOKOVIC, 2007; BRIGGER *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; FATTAL *et al.*, 2002).

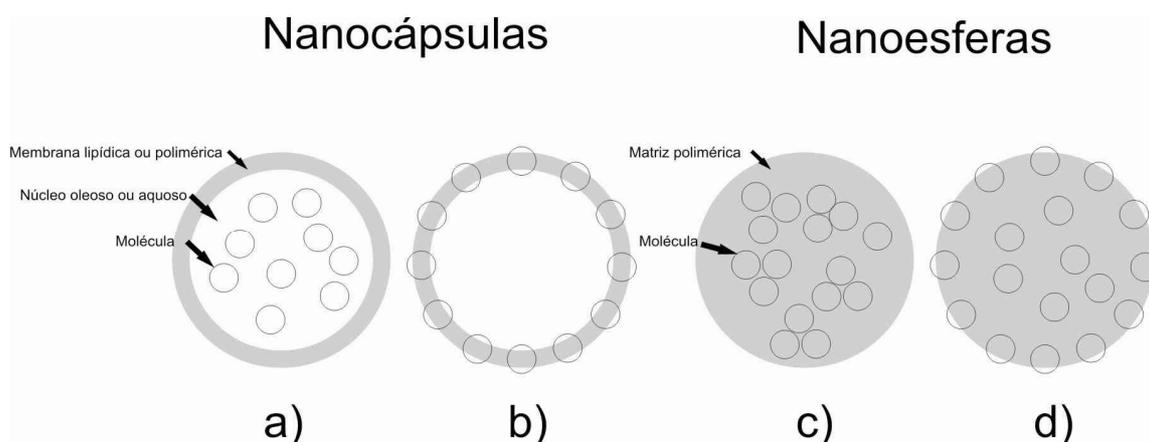


Figura 1 – Diagrama esquemático das categorias de nanopartículas, nanocápsulas e nanoesferas. (Adaptado de SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Legenda: a) Molécula de interesse terapêutico dissolvida no núcleo aquoso ou oleoso das nanocápsulas; b) Moléculas de interesse terapêutico adsorvidas na membrana das nanocápsulas; c) Moléculas de interesse terapêutico retidas na matriz das nanoesferas; d) Moléculas de interesse terapêutico adsorvidas ou dispersa na matriz das nanoesferas.

1.4. Polímeros utilizados na fabricação de nanopartículas

As nanopartículas, poliméricas, têm atraído maior atenção dos pesquisadores em relação às lipídicas, devido as suas potencialidades terapêuticas, maior estabilidade nos fluídos biológicos e durante o armazenamento. Dentre os polímeros existentes, os biodegradáveis são os candidatos preferidos para o desenvolvimento de nanopartículas, pois podem atuar controlando e sustentando a liberação de fármacos, além de serem facilmente eliminados do organismo (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; RIEUX *et al.*, 2006).

Os polímeros sintéticos e biológicos foram amplamente estudados em suas potencialidades biodegradáveis. A degradação de biomateriais poliméricos envolve clivagem por hidrólise ou enzimática das ligações entre os monômeros, causando erosão polimérica das nanopartículas, e liberação de substâncias, além da

possibilidade de ocorrência de difusão da substância (RIEUX *et al.*, 2006; NAIR *et al.*, 2007).

Os primeiros biomateriais utilizados na clínica foram os polímeros naturais biodegradáveis, porém eles podem possuir ação bioativa, o que não é interessante para veiculação de fármacos. Os polímeros sintéticos, por outro lado, são geralmente mais inertes, possuem propriedades mais previsíveis e uniformidade entre lotes de fabricação do polímero. Essas vantagens sobre os polímeros naturais tornam os polímeros sintéticos biodegradáveis os mais indicados para aplicação na área da saúde. Os primeiros polímeros sintéticos que demonstraram sucesso em seu uso foram os derivados dos ácidos lático e glicólico, utilizados para suturas na década de 1960. Outra tendência de utilização de polímeros são os que apresentam degradação por hidrólise mais acentuada, pois possuem degradação mais previsível no organismo do que os que possuem degradação enzimática mais acentuada, que dependendo do local de aplicação pode apresentar diferenças significativas no tempo de degradação. A natureza dos polímeros empregados em sistemas de liberação de fármacos influencia significativamente no tamanho e no perfil de liberação do sistema. Os principais critérios na seleção de um polímero são, principalmente, a biodisponibilidade, a biocompatibilidade e a sua velocidade de degradação (RIEUX *et al.*, 2006; NAIR e LAURENCIN, 2007).

A classe dos poli(α -ésteres) é a mais antiga e amplamente investigada de polímeros termoplásticos, empregados pela característica biodegradável e por serem passíveis de hidrólise predominantemente. Os poliésteres são representados pela poli(caprolactona), poli(D,L-lático) (PLA) e os copolímeros derivados dos ácidos lático e glicólico (PLGA). Eles podem ser preparados a partir de uma variedade de monômeros pela abertura do anel e por vias de polimerização dependendo da unidade monomérica utilizada (DASH e CUDWORTH II, 1998; NAIR e LAURENCIN, 2007; SINGH e LILLARD, 2009).

O ácido lático co-polimerizado com o ácido glicólico, forma o ácido poli-lático-co-glicólico), PLGA. O PLGA com razão em porcentagem de massa de 50:50 de ácido lático:glicólico tem maior instabilidade frente a hidrólise e menor resistência a degradação do que o PLGA que possui razão de 75:25 de ácido lático:glicólico. O

PLGA com proporção 50:50 apresenta degradação em 1 a 2 meses, ao passo que o de 75:25 sofre degradação em 4 a 5 meses. Em outras palavras, quanto maior a proporção de unidades de ácido láctico no polímero, maior é seu caráter hidrofóbico e, conseqüentemente, menor o índice de hidrólise do mesmo. Por outro lado, quanto maior a proporção de unidades de ácido glicólico, maior caráter hidrofílico, favorecendo a hidrólise do polímero. A popularidade na utilização deste polímero é atribuída à aprovação pelo FDA para uso em humanos. Suas características físico-químicas contribuem para o bom processamento do material, podendo ser transformado em várias formas com degradação controlada comparada com outros polímeros. Devido a isso, o PLGA tem sido amplamente investigado para uso como sistemas de liberação de moléculas com várias estruturas baseadas neste polímero, tais como microesferas, microcapsulas, nanoesferas, nanocápsulas e nanofibras têm sido desenvolvidas para carrear e controlar a liberação de proteínas. Dependendo do tipo de PLGA utilizado, consegue-se uma liberação mais rápida ou prolongada dessas substâncias (DASH e CUDWORTH II, 1998; NAIR e LAURENCIN, 2007).

Nanopartículas de PLGA têm sido utilizadas para obter produtos contendo proteínas e peptídeos, genes e hormônios. O interesse em se encapsular proteínas e peptídeos é atribuído ao curto tempo de meia-vida dessas moléculas devido à degradação enzimática no local de administração. Independente da via de administração utilizada, muitas delas não apresentam propriedades físico-químicas adequadas para serem absorvidas e atingirem ou entrarem em contato com as células-alvo, necessitando de sistemas de transporte que apresentam como objetivo superar estas limitações. As vantagens do desenvolvimento de formulações de liberação controlada contendo proteínas incluem a proteção contra degradação enzimática, a capacidade do sistema em transportar a substância para um local específico de ação e a redução de efeitos adversos (ALMEIDA *et al.*, 2007; LEE e YUK, 2007; CEGNAR *et al.*, 2004b).

As nanopartículas de PLGA podem ser preparadas pelo método de emulsão simples seguido de difusão ou evaporação do solvente. Esse processo envolve um sistema de emulsão óleo em água (O/A), onde o polímero e a molécula de interesse terapêutico são solubilizados em solvente orgânico e um tensoativo é solubilizado na

água. As soluções são misturadas sob agitação e temperatura apropriadas. A emulsão formada é submetida à remoção do solvente por evaporação sob pressão reduzida. Entre as desvantagens deste método estão a baixa eficiência de encapsulamento e a dificuldade em se encapsular moléculas hidrofílicas, conseqüentemente, esse método é mais adequado para moléculas lipofílicas como hormônios esteróides (REIS *et al.*, 2007; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; JAIN *et al.*, 2000; HANS e LOWMAN, 2002).

Os métodos de emulsão múltipla seguida de evaporação ou difusão de solvente geram emulsões do tipo água em óleo em água (A/O/A). Esse método é empregado para encapsular moléculas solúveis em água como os peptídeos e proteínas. A execução desta técnica consiste em solubilizar a molécula de interesse em água concomitantemente a um tensoativo e solubilizar o polímero na fase orgânica, efetuando-se vigorosa agitação para formar uma emulsão água em óleo. Essa emulsão é adicionada em outro recipiente contendo água que pode estar acrescida de tensoativo ou não e sob ação de agitação forma-se uma emulsão água em óleo em água (A/O/A). O solvente é retirado por evaporação sob pressão reduzida (REIS *et al.*, 2006; BILATI *et al.*, 2005; TEWES *et al.*, 2007).

Entre os maiores obstáculos e limitações na produção de nanopartículas estão: a instabilidade física pela agregação e fusão, a instabilidade química pela hidrólise e durante a armazenagem. Para melhorar a estabilidade durante a armazenagem o processo mais comumente utilizado é a liofilização, que permite converter suspensões de nanopartículas em sólidos que apresentam melhor estabilidade. Esse é um processo industrial que consiste na remoção da água de uma amostra congelada pela sublimação sob vácuo. Usualmente, é adicionado um tipo de protetor na formulação para resguardar as nanopartículas do estresse causado pelo congelamento e dessecação, esses protetores, conhecidos como crioprotetores ou lioprotetores, são açúcares como a Trealose, Sacarose, Dextrose, Frutose, Manitol e Lactose. Eles proporcionam uma imobilização das nanopartículas com uma matriz vítrea que pode prevenir eventuais agregações e estresses gerados por mecanismos de congelamento e formação de cristais de gelo. (ABDELWAHED *et al.*, 2006; KONAN, *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003)

Dentre os açúcares, a Trealose parece ser a o crioprotetor preferido para biomoléculas, pois apresenta algumas vantagens sobre os outros açúcares como menor higroscopicidade, ausência de ligações de hidrogênio internas que permite maior flexibilidade para formação de ligações com as superfícies da nanopartículas durante a etapa de congelamento e liofilização, baixa reatividade química e alta temperatura de transição vítrea. (ABDELWAHED, *et. al.*, 2006; CROWE, *et. al.*, 1996; SCHAFFAZICK, *et. al.*, 2003)

1.5. Nanotecnologia e vacinas

Há cerca de uma década, uma série de trabalhos vem sendo desenvolvidos, demonstrando o potencial das nanopartículas para utilização como adjuvantes em vacinas. Adjuvantes são definidos como quaisquer substâncias que, incorporadas à formulação de uma vacina, atuam para acelerar, prolongar, ou, ainda aumentar a qualidade e a especificidade da resposta imunológica a um determinado antígeno. O desenvolvimento de vacinas é uma das mais importantes realizações da medicina e sua influência sobre a saúde na humanidade é apropriadamente notória pela efetiva diminuição da mortalidade mundial. Muitas doenças tais como, rubéola, difteria, tétano, poliomelite, varicela e febre amarela estão sob controle devido à vacinação. Outras doenças como a hepatite tipo B, influenza e meningite pneumocócica estão sendo no mínimo contidas, porém ainda há muito a se fazer para eliminar essas e outras doenças no mundo. Historicamente, muitas vacinas foram desenvolvidas utilizando organismos vivos atenuados, mortos ou com toxinas inativadas. As desvantagens das vacinas vivas incluem o risco do organismo voltar à forma virulenta e a instabilidade intrínseca. Já as vacinas compostas por organismos mortos, inativados ou toxóides, geram uma resposta imune fraca e tipicamente necessita de múltiplas doses. O desenvolvimento de novos tipos de vacinas e uma nova roupagem para as já existentes necessita de veículos de transporte e liberação mais eficientes. Esses veículos, os adjuvantes, em muitos casos, intensificam a resposta imune do antígeno

que sozinho teria uma imunogenicidade fraca. Isso pode ser especialmente interessante quando considerados os desenvolvimentos de vacinas para câncer, HIV ou para imunizações na mucosa. Muitos antígenos podem ser beneficiados pelas ações específicas dos adjuvantes, pois eles podem facilitar o direcionamento e/ou o controle da liberação dos antígenos para as células apresentadoras de antígenos. (EDELMAN, 2002; BORGES *et al.*, 2005; PEEK *et al.*, 2008; KINGSLEY *et al.*, 2006; LEE & YUK, 2007; GUPTA, 1998; CONWAY *et al.*, 2001).

Sais de alumínio são utilizados atualmente como um dos poucos adjuvantes licenciados na Europa e único adjuvante permitido em humanos nos EUA. Para explicar a ação dos sais de alumínio como adjuvantes, três hipóteses foram construídas, a primeira sugere a formação de um depósito no local de administração que causa uma retenção dos antígenos, liberando-os gradualmente. A segunda propõe que o mecanismo é atribuído a adsorção dos antígenos nas partículas dos sais de alumínio, que possuem tamanho médio menor que 10 μm , e por isso são facilmente fagocitados pelos macrófagos e células dendríticas. Nesta captação, a eficiência da imunização é aumentada pela elevação do reconhecimento e apresentação dos antígenos. O terceiro mecanismo sugere que a ação é realizada por uma estimulação direta da resposta imune pela inflamação causada pelo estímulo na produção de citocinas no local de administração da vacina. Porém os sais de alumínio possuem desvantagens no uso como adjuvantes devido à instabilidade ao congelamento e liofilização e evidência de sintomas adversos, tais como eritema, respostas alérgicas, hipersensibilidade ao contato, inflamações granulomatosas e nódulos subcutâneos (PEEK, *et al.*, 2008; GUPTA, 1998).

Estudos pré-clínicos realizados por Panyam e colaboradores mostram que nanopartículas de PLGA podem induzir maior resposta em títulos de anticorpos comparada com a resposta obtida utilizando o sal de alumínio (PANYAM, *et al.*, 2003a).

Adjuvantes e veículos de carreamento nanoparticulados tem mostrado proteção dos antígenos contra degradação, Borges e colaboradores demonstraram em seu trabalho que nanopartículas de quitosana e alginato protegem e estabilizam a ovoalbumina (BORGES, *et al.*, 2005; PEEK, *et al.*, 2008).

Cegnar e colaboradores apresentaram em seu estudo que as nanopartículas de PLGA preparadas pelo método de emulsão múltipla seguido de difusão solvente foram capazes de encapsular cistatina e manter a atividade, integridade funcional e a estrutura tridimensional da proteína (CEGNAR *et al.*, 2004b).

Outros pesquisadores demonstraram que o uso oral de nanopartículas favorece a captação linfática pelas placas de peyer presentes no íleo. As placas de peyer são caracterizadas por células M, microvesiculares, capazes de efetuar endocitoses e conduzir antígenos intra e inter-epitelialmente até o tecido linfóide adjacente, estimulando o sistema imunológico. (RIEUX *et al.*, 2006; FLORENCE, 1997; HANS & LOWMAN, 2002; GUPTA *et al.*, 2007; CHALASANI, 2007). De acordo com Garinot e colaboradores, nanopartículas contendo ovalbumina foram administradas por via oral em ratos e induziu resposta imune por meio de IgG, atestando a habilidade da preparação em se obter uma ação imunogênica (GARINOT *et al.*, 2007).

Raghuvanshi e colaboradores demonstraram que quando o toxóide tetânico foi encapsulado em nanopartículas a base de PLGA e PLA, utilizando o método de emulsão múltipla seguido de evaporação solvente, houve proteção do antígeno e geração de resposta imune prolongada por meio de uma única dose de vacinação (RAGHUVANSHI *et al.*, 2002).

De acordo com Kanchan e Panda, o tamanho das nanopartículas poliméricas, sua interação com antígeno e células apresentadoras de antígenos, influenciam qualitativamente e quantitativamente a resposta imune. Esses pesquisadores encapsularam antígenos de superfície da hepatite B em nanopartículas e micropartículas e avaliaram comparativamente a resposta imune (KANCHAN & PANDA, 2007).

As vantagens potenciais no uso de nanopartículas como adjuvantes nas formulações de vacinas incluem o aumento da imunogenicidade de imunógenos fracos, a redução da quantidade de imunógeno e do número de inoculações necessárias para conferir a proteção adequada, além do aumento de sua eficácia. A resposta imunológica pode ser alterada por efeitos de imunomodulação, aumentando a liberação de citocinas, preservação, capacidade do adjuvante em manter a conformação nativa do imunógeno, indução de resposta citotóxica, direcionamento, capacidade do

adjuvante em liberar o imunógeno em órgãos e tecidos alvos e depósito, capacidade de um adjuvante em reter o imunógeno no local de inoculação com liberação controlada do antígeno. (GOODMAN *et al.*, 1995; COX & COULTER, 1997; SINGH & O`HAGAN, 1999; QUINTILIO, 2005; GAO *et al.*, 2007)

1.6. Neoplasias e imunização utilizando nanopartículas

O termo neoplasia significa literalmente “crescimento novo” e a palavra câncer é o termo comum utilizado para referir-se a todos os tumores malignos. Os tumores possuem 2 comportamentos básicos: (1) células neoplásicas proliferantes, que constituem o parênquima, e (2) o estroma de suporte, constituído de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. A diferenciação entre tumor benigno e maligno pode ser feita no nível morfológico com considerável certeza. Algumas vezes, entretanto, a neoplasia desafia qualquer classificação, pois certos aspectos anatômicos podem sugerir um caráter inofensivo, enquanto outros apontam para um potencial canceroso. O crescimento dos tumores malignos é acompanhado de infiltração progressiva, invasão e destruição do tecido circundante. As metástases definem o tumor como maligno e a invasão do câncer permite a sua penetração nos vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, proporcionando-lhes a oportunidade de disseminação. Em cerca de 30 % dos pacientes recém-diagnosticados com tumores sólidos (excluindo-se os cânceres da pele do tipo não melanoma) se manifestam metástases. A disseminação com metástase reduz acentuadamente a possibilidade de cura. Neste caso faz-se urgente e necessário o desenvolvimento de novos fármacos para conter a progressão da doença (WEINBERG, 2008)

No Brasil, as estimativas para o ano de 2011 apontam que ocorrerão 489.270 casos novos de câncer. Destes casos, são esperados em 2011, 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para o sexo feminino. Segundo Jemal e colaboradores, o câncer de ovário é a quinta causa de morte mais freqüente por câncer em mulheres nos Estados Unidos e em 2010 eram esperados 21.880 novos casos,

com 13.850 mortes O câncer de ovário é a neoplasia ginecológica menos diagnosticada nos estágios iniciais: cerca de $\frac{3}{4}$ dos tumores malignos de ovário apresentam-se em estágio avançado no momento do diagnóstico. Segundo Parkin, este é o câncer ginecológico de maior letalidade, sendo responsável pela morte de 114.000 mulheres no ano de 2000. (BRASIL, 2010c; JEMAL *et al.* 2010; PARKIN *et al.*, 2005)

Os dados estatísticos acumulados do ano de 1999 a 2005, mostram que a probabilidade de sobrevida após diagnóstico de câncer de ovário quando localizado é de 94 %, porém somente 15 % dos casos são diagnosticados precocemente, antes de ocorrer metástases. A maioria das pacientes tem a doença diagnosticada em estágios avançados, sendo que 63% dos casos apresentam metástases com frequência de sobrevida de 28%, situação em que as opções de tratamento são restritas à cirurgia citorrredutora e a quimioterapia baseada nos derivados da platina. Estas modalidades terapêuticas não são, na maioria das vezes, efetivas e, conseqüentemente, grande parte das pacientes apresentará recorrência e óbito por causa da doença (JEMAL *et al.*, 2010).

Diante de tal cenário, fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação como: na promoção da saúde, na detecção precoce, na assistência aos pacientes, na vigilância, na formação de recursos humanos, na comunicação e mobilização social, na pesquisa e na gestão do SUS. As imunizações contra proteínas de câncer estão sendo amplamente avaliadas e indicam uma possível intervenção imunoterápica com indução de resposta imune capaz de controlar e até mesmo retardar o crescimento tumoral. A estratégia consiste em gerar um processo pro-inflamatório com indução de resposta imune com ação antitumoral capaz de eliminar células cancerígenas. As nanopartículas têm demonstrado capacidade de carreamento efetivo de antígenos para indução de respostas imunológicas antitumorais, exibindo propriedades imunomoduladoras capazes de serem utilizadas em estratégias para desenvolvimento de vacinas contra câncer (BRASIL, 2010c; DOMINGUEZ & LUSTGARTEN, 2010; PEEK *et al.*, 2008;)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver modelo para obtenção de suspensão de nanopartículas a base de polímero biodegradável capaz de encapsular eficientemente proteínas para possível utilização como vacinas.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver nanopartículas à base de PLGA.
- Caracterizar diferentes preparações de nanopartículas, avaliando o diâmetro das partículas, índice de polidispersão, carga elétrica superficial, e taxa de encapsulamento.
- Otimizar o processo de formulação de nanopartículas.
- Comparar encapsulamento de proteínas com diferentes massas moleculares e pontos isoelétricos.
- Avaliar a citotoxicidade das substâncias utilizadas na formulação e das nanopartículas em linhagem celular.
- Avaliar a citotoxicidade das substâncias de degradação da preparação de nanopartículas em linhagem celular.
- Desenvolver método de marcação das nanopartículas utilizando sondas fluorescentes e visualizar em microscópio de fluorescência.
- Utilizar microscopia eletrônica de varredura (MEV) para determinação da morfologia das nanopartículas.
- Extrair proteínas a partir de macerado de amostras de tecido de câncer epitelial de ovário para encapsulamento em nanopartículas.
- Encapsular proteínas tumorais e caracterizar as nanopartículas para posterior ensaio de imunização.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Ácido poli-lático-co-glicólico 75:25, Resomer[®] RG 756 S, Boehringer Ingelheim

Acetato de etila, Quimex, art. BR10X3701000, lote 33549, cod. 1173

Diclorometano, Vetec, cód. 234

Acetona, Vetec, cód. 1510

Poloxamer, Basf, cat. 583097 (copolímero do óxido de etileno-óxido de propileno)

Álcool polivinílico (PVA), Merck, cat. 141360

Albumina de soro bovino, Sigma, cat. A-8551

Citocromo C de coração eqüino, Sigma, cat. C2506

Trealose dihidratada, Sigma, T0167

Reagente de Biureto: Sulfato de cobre anidro, Nuclear, cod. 311719

Iodeto de potássio(KI), F.Maia,cat. 114140

Tartarato de sódio e potássio, Nuclear, cod. 317923

Hidróxido de sódio(NaOH), Vetec, cod. 1137

Álcool isopropílico, Vetec, cod. 2003X

Lysotracker red[®], Invitrogen, cat. L7528

Carcinoma epitelial de ovário, nº de prontuário: # HC001, # 913086, # 910029, Departamento de ginecologia e obstetrícia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Célula HEK 293 (Rim de embrião Humano), Banco ATCC^R, CRL-1573,congelação 985, nº FUNED 933

Fluoreto de sulfonilfenilmetil (PMSF), Sigma, cat. P7626

EDTA, Sigma, cat. E5134

Sulfato de cobre anidro, Nuclear, cod. 311719

DMSO (Dimetilsulfóxido), Sigma, cat. 2650
Monohidrogeno fosfato de sódio (Na_2HPO_4), Sigma, cat. 55136
Cloreto de sódio (NaCl), Sigma, cat. S5886
Hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), Sigma, cat. P5655
Cloreto de potássio (KCl), Merck, art. 49362, lot. 9030091
MTT, Sigma, cat. M2128
Meio de Cultura, Sigma, cat. M0268 (EMEM)
Soro fetal bovino, Gibco, cat. 12657 – 029
Glutamina, Sigma, cat. G5763
Aminoácidos não essenciais, Sigma, cat. M7145
Estreptomicina (Sulfato de estreptomicina), Sigma, cat. S-9137
Hepes, Sigma, cat. H4034
Tripsina, Sigma, cat. T4424
Colagenase, Sigma, cat. C1639
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Sigma, cat. H1009
Iodeto de potássio(KI), F.Maia,cat. 114140
Tartarato de sódio e potássio, Nuclear, cod. 317923
NaF, Pro Analysi, Lot. 060028
 NaH_2PO_4 , Sigma, cat. 04815

3.2. Equipamentos e instrumentos utilizados

Espectrofotômetro, Thermo Scientific, Biomate 3
Espectrofotômetro, Molecular Devices, SpectraMax M5^e
pHmetro, Digimed, DM20
Microscópio ótico de fluorescência com câmera acoplada, ZEISS,
Microscópio eletrônico de varredura, Quanta 200 - FEG - FEI – 2006

Centrífuga, Eppendorf, centrifuge 5415C
Centrífuga, Beckman, CS6R
Mastersizer, Malvern, Mastersizer 2000 módulo Hydro 2000S
Zetasizer, Malvern, HSA 3000
Liofilizador, Terroni Fauvel, modelo LB 1500
Banho de sonicação, Elma, Transsonic Digital S
Sonda sonicadora, Branson, Sonifier 250
Balança analítica, Mettler Toledo, AT201
Coulter, Beckman Coulter, Coulter Z1
Estufa com aporte de CO₂ à 5% e temperatura à 37°C
Agitador de tubos vortex, Quimis, Q220B1
Ultraturrax, IKA, T25 digital

3.3. Metodologia

3.3.1. Obtenção de nanopartículas

Inicialmente, para desenvolvimento das nanopartículas foi testado o método de emulsão múltipla seguido de evaporação do solvente e o método de emulsão múltipla seguido de difusão do solvente. Nestes métodos, o tipo de solvente, a composição das formulações e as operações de processo foram variadas conforme listagem abaixo:

- Método de emulsão múltipla seguida pela evaporação do solvente, utilizando diclorometano;
- Método de emulsão múltipla seguida pela difusão do solvente, utilizando acetato de etila;
- Homogeneização mecânica de alta rotação e cisalhamento durante as duas etapas de emulsão;

- Diferentes tempos e rotações programados no homogeneizador mecânico de alta rotação e cisalhamento para a produção das suspensões;
- Utilização de homogeneização por sonda de ultrassom seguida por agitação mecânica de alta rotação e cisalhamento;
- Utilização de diferentes tensoativos, PVA e Poloxamer, solubilizados na fase aquosa interna, na fase aquosa externa ou em ambas;

Depois de executadas todas estas alterações e verificando a distribuição de tamanho das partículas obtidas, o método de emulsão múltipla seguido de difusão do solvente com agitação por sonda de ultrassom e poloxamer como tensoativo na fase aquosa interna foi selecionado para ser empregado em todo o estudo.

3.3.1.1. Preparação das nanopartículas brancas

Nanopartículas brancas, também denominadas vazias, não possuem proteínas encapsuladas. As nanopartículas de PLGA foram preparadas pela técnica de emulsão múltipla seguida pela difusão do solvente (COHEN-SELA et al., 2009). Inicialmente, uma emulsão primária foi preparada, contendo na fase aquosa interna poloxamer em concentração que variou de 0,00 a 4,00 % (p/v). A fase orgânica desta emulsão continha 6 mL de acetato de etila e PLGA com concentração que variou de 2,00 a 5,00 % (p/v). Após agitação, utilizando sonda de ultrassom durante um período que variou de 60 a 120 segundos a 25 Watts e 4 °C, a dispersão foi homogeneizada em 20 mL de solução aquosa contendo uma razão em massa de Trealose:PLGA, variando de 0:1 a 2:1 e sonicada sob as mesmas condições anteriores. O solvente orgânico foi removido sob agitação e pressão reduzida. O pH da formulação foi corrigido para 7,0 - 7,5, utilizando solução de hidróxido de sódio a 0,1 mol/L e o volume foi completado com água purificada para 25 mL. A caracterização das amostras foi realizada conforme descrito no item 3.2.2. O diagrama esquemático do modo de preparo da formulação está demonstrado na Figura 2.

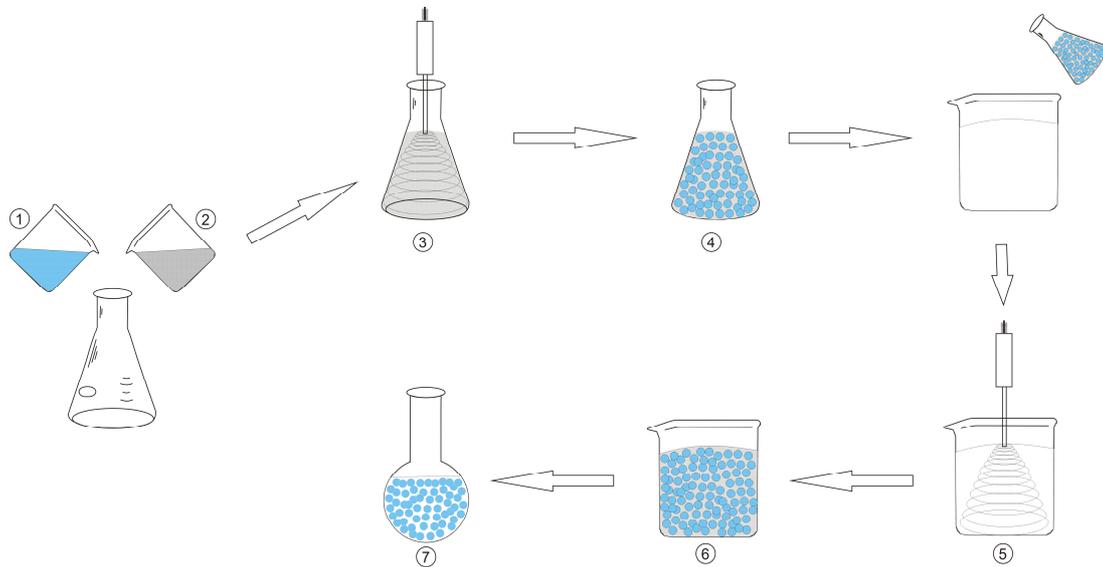


Figura 2 - Diagrama esquemático do modo de preparo da formulação.

Legenda: 1- Fase aquosa interna; 2- Fase orgânica; 3- Agitação por sonda de ultrassom; 4- Emulsão primária (A/O); 5- Agitação por sonda de ultrassom com difusão do solvente orgânico; 6- Emulsão final (A/O/A); 7- Evaporação do solvente orgânico e formação da suspensão de nanopartículas.

3.3.1.2. Preparação das nanopartículas contendo BSA

As nanopartículas foram preparadas conforme descrito no item 3.2.1.1 com incorporação de BSA, massa molecular 66.430 Da e ponto isoelétrico de 4,70, na fase aquosa interna em concentração que variou de 2,50 a 15,00 % (p/v). Todas as formulações foram preparadas em duplicata.

3.3.1.3. Preparação das nanopartículas contendo Citocromo C

Formulações contendo Citocromo C, uma proteína de massa molar de 12.384 Da e ponto isoelétrico igual a 10,00, também foram preparadas conforme descrito no item 3.2.1.1. Para esse encapsulamento, utilizou-se concentração de 5 % (p/v) do Citocromo C na fase aquosa interna. As formulações foram preparadas em duplicata.

3.3.1.4. Preparação das nanopartículas contendo proteínas extraídas de câncer de ovário

3.3.1.4.1. Amostras biológicas de câncer de ovário

As amostras dos tumores, conforme demonstrado na tabela 1, foram extraídas por intervenção cirúrgica sob o livre consentimento de pacientes com câncer de ovário do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) situado em Belo Horizonte.

Os tecidos das pacientes que foram previamente tratadas por quimioterapia e/ou radioterapia, diagnosticadas com evidências à laparotomia de algum processo infeccioso agudo peritoneal e histórico de uso de imunossupressores, corticosteróides e/ou antiinflamatórios não esteróides há pelo menos 3 meses foram excluídos do estudo. No Laboratório as amostras foram dissecadas, fracionadas em criotubos e congeladas diretamente em nitrogênio líquido e mantidas a baixa temperatura em freezer (-80 °C).

Tabela 1 – Amostras biológicas obtidas de pacientes com câncer de ovário do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Código das amostras	Tipo de neoplasia
#HC001	Carcinoma epitelial de ovário
#913086	Carcinoma epitelial de ovário
#916690	Carcinoma epitelial de ovário

3.3.1.4.2. Extração de proteínas

As amostras dos tumores armazenadas a -80 °C foram maceradas com auxílio de pistilo, no gral de porcelana, adicionando nitrogênio líquido para evitar o descongelamento e facilitar a criofatura do tecido. O tecido pulverizado foi ressuspenso em 1,5 mL de PBS, agitado sob sonicação durante 120 segundos a 4 °C e centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi reservado e o “pellet”, descartado. Em seguida, o sobrenadante foi congelado em nitrogênio líquido e descongelado em banho-maria a 37 °C. A preparação se deu novamente centrifugada durante 5 minutos a 10.000 rpm a 4 °C. Um coquetel de inibidores de proteases (6 µL PMSF a 1 mM e 3 µL de EDTA a 1 mM) foi adicionado e novamente centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm a 4 °C. O doseamento das proteínas foi realizado pelo método de Biureto (PARVIN *et. al.*, 1965).

3.3.1.4.3. Nanopartículas

O método descrito no item 3.2.1.1., também foi utilizado para preparar as nanopartículas contendo a solução de proteínas de câncer de ovário extraídas do tecido tumoral. Inicialmente, esta foi adicionada na fase aquosa interna para posterior processamento da emulsão primária. As concentrações de poloxamer e de PLGA, utilizadas nesta etapa foram de 3,00 % (p/v), em PBS, e 1,50 mL de acetato de etila, respectivamente. O período de agitação foi de 90 segundos a 25 Watts a 4 °C. A dispersão obtida foi homogeneizada em 5,00 mL de uma solução aquosa contendo 6,00 % (p/v) de trealose e sonicada sob as mesmas condições anteriores. O solvente orgânico foi removido sob agitação suave e pressão reduzida. O pH da formulação foi corrigido para faixa de 7,0 a 7,5.

3.3.2. Caracterização das nanopartículas

3.3.2.1. Determinação do pH

O pH das preparações de nanopartículas foram medidos diretamente logo após obtenção das suspensões e durante a correção do pH das mesmas até faixa de 7,0 a 7,5. Foram utilizados para essa avaliação, ensaios em triplicata em pHmetro digital com eletrodo de vidro a temperatura ambiente.

3.3.2.2. Determinação do diâmetro das partículas e do índice de polidispersão

O diâmetro das partículas foi medido pelo método de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS – Dynamic Light Scattering), utilizando laser de Hélio-Neon de 5 mW, potência contínua e comprimento de onda de 633 nm. Para mensurar esse parâmetro, um feixe de laser atravessa a amostra e contabiliza a luz espalhada em um fotomultiplicador posicionado em um ângulo de 90°. O movimento Browniano das partículas produz as flutuações, em que há uma interferência mútua das partículas individuais e as ondas de luz espalhadas, que determinam a intensidade de luz identificada pelo detector. A frequência média dessas flutuações, que em DLS é determinada pela autocorrelação da intensidade do espalhamento, é proporcional ao coeficiente de difusão das partículas e, então, o diâmetro hidrodinâmico de partícula pode ser calculado (MALVERN, 2004).

A polidispersão é um parâmetro calculado da análise da função de autocorrelação em medidas de espalhamento dinâmico da luz. Nesta análise, assume-se que as partículas possuem um único tamanho e um ajuste exponencial simples é

aplicado à função de autocorrelação. A polidispersão foi definida em índice de polidispersão (PDI), que representa a variância relativa (MALVERN, 2004).

O diâmetro e o índice de polidispersão das suspensões de nanopartículas foram determinados, após diluição das amostras em água purificada (MilliQ, Millipore), usando o Zetasizer HSA 3000[®]. As medidas foram executadas a temperatura de 25 °C, e os resultados, apresentados como média de 10 mensurações.

Para as avaliações de distribuição de tamanho da etapa que houve incorporação de crioprotetor na fase aquosa externa em diferentes concentrações, utilizou-se o equipamento Mastersize 2000[®], modelo APA2000 com módulo hidro 2000G, emissão de laser vermelho (Hélio-Neon de 5 mW, potência contínua e comprimento de onda de 633 nm), emissão de laser azul de estado sólido e faixa de detecção de tamanhos de 20 nanômetros a 2 milímetros. Os resultados foram apresentados como média de 3 mensurações (MALVERN, 1999).

3.3.2.3. Determinação da carga superficial das nanopartículas

A carga superficial dada como potencial zeta é influenciada por mudanças na interface com a fase contínua da dispersão, pela dissociação de grupos funcionais na superfície ou pelo encapsulamento de substâncias passíveis de ionização. Partículas com alto potencial zeta e mesmo sinal de carga, seja positivo ou negativo, irão se repelir. Às partículas pequenas e com densidade baixa o suficiente para permanecerem em suspensão, um alto potencial zeta indica uma estabilidade potencial do sistema coloidal, isto é, a dispersão terá menor tendência à agregação (MALVERN, 2004; MALVERN, 2011).

O potencial zeta foi determinado pela análise de mobilidade eletroforética das partículas associada à técnica de espalhamento dinâmico de luz, ou seja, velocimetria a laser do efeito Doppler, em que a velocidade de escoamento do fluido é mensurada.

As medidas foram realizadas, utilizando o equipamento Zetasizer HSA 3000, em triplicata, com alíquotas diluídas cerca de 42 vezes. A técnica foi executada a temperatura de 25 °C em ângulo de 90°.

3.3.2.4. Determinação da taxa de encapsulamento de proteína

3.3.2.4.1. Preparo das amostras para doseamento de proteínas

Inicialmente, conforme ilustrado na figura 3, 1 mL da preparação de nanopartículas foi adicionado em 3 microtubos, previamente pesados. As suspensões contidas nos microtubos foram centrifugadas durante 25 minutos a 14.000 rpm. Após centrifugação, duas fases foram formadas distintamente: sobrenadante e precipitado. Os sobrenadantes foram retirados, restando apenas as nanopartículas precipitadas nos microtubos. Em seguida, adicionou-se 1 mL de água purificada em cada recipiente e efetuou-se agitação por 5 minutos em vórtex para ressuspender o precipitado. As suspensões obtidas foram novamente centrifugadas durante 25 minutos a 14.000 rpm, separando o líquido, sobrenadante, do sólido, precipitado. Essa operação de lavagem foi repetida por mais duas vezes. O processo de lavagem é importante para retirar as proteínas que não foram encapsuladas do meio, mitigando uma possível distorção dos resultados no doseamento das proteínas. As nanopartículas precipitadas no microtubo foram congeladas a -80 °C, liofilizadas e pesadas. Os microtubos contendo os sólidos, após o emprego das operações de lavagem e liofilização, foram processados conforme relatado no item 3.2.2.4.2.

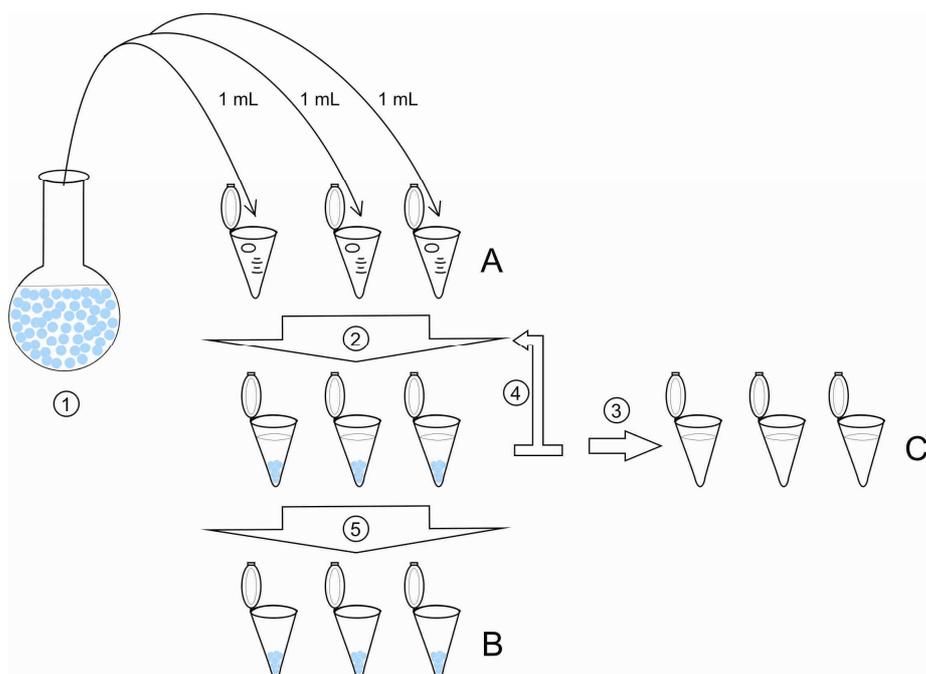


Figura 3 – Diagrama esquemático do processo de preparo das amostras para ensaio de doseamento de proteínas.

Legenda: 1: Suspensão de nanopartículas; 2: Centrifugação; 3: Separação do sobrenadante; 4: Adição de 1 mL de água purificada e ressuspensão do precipitado; 5- Congelamento e liofilização; A: Microtubos previamente pesados; B: Microtubos com precipitados e C: Microtubos com sobrenadante retirados.

3.3.2.4.2. Método de doseamento de proteínas totais

Comparações entre metodologias espectrofotométricas para a determinação de proteínas totais foram amplamente estudadas. O método de Biureto, demonstrado no estudo de comparação, conforme descrito por Marjan De Mei e colaboradores, evidenciou confiabilidade na avaliação da quantidade de proteínas totais. Isso foi verificado e confirmado concomitantemente nos trabalhos realizados por outros pesquisadores (MEI, *et. al.*, 2008; OKUTUCU, *et. al.*, 2007; WILLIAMS, *et. al.*, 2003; ZAIA, *et. al.*, 1998; 1999; 2000; COTTON *et al.*, 1997). Métodos de doseamento de proteínas totais foram amplamente utilizados por outros pesquisadores para

doseamento de proteínas encapsuladas em nanopartículas (PANYAM, *et. al.*, 2003; LU, *et. al.*, 1999; CORRIGAN, *et. al.*, 2009; DEMENTO, *et. al.*, 2009; FECZKÓ *et. al.*, 2008).

No presente estudo, utilizamos a técnica de doseamento direto pelo método de Biureto. Essa mensuração consiste na determinação da taxa de encapsulamento de proteínas pela reação do cobre, em meio alcalino, com proteínas, formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica (GORNALL *et al.*, 1945; PARVIN *et. al.*, 1965; FECZKÓ *et. al.*, 2008; ZAIA, *et. al.*, 1998)

Para execução desse método, os microtubos contendo precipitado, conforme descrito no item 3.2.2.4.1, foram pesados para determinação do peso do precipitado de nanopartículas, em seguida, hidróxido de sódio foi pesado até proporção de 1:6, respectivamente, e adicionado em 2 mL de água purificada. O preparado foi armazenado em temperatura ambiente durante 2 horas. Essa técnica foi empregada para que ocorresse a lise das nanopartículas, liberando as proteínas encapsuladas para detecção pelo método de doseamento direto.

A calibração do método foi realizada, utilizando solução de albumina padrão, solução de nanopartículas brancas lisadas, água purificada e reagente de Biureto. A curva de calibração foi construída com 6 pontos de concentrações distintas, conforme demonstrado na tabela 2. As medições foram realizadas em triplicata a temperatura ambiente.

Tabela 2 – Volumes e concentrações das soluções para elaboração da curva de calibração do método direto.

Pontos	Volume de albumina padrão a 1 mg/mL (mL)	Volume de água purificada (mL)	Volume de nanopartículas brancas lisadas (µL)	Volume de reagente de Biureto (mL)	Concentração equivalente BSA (mg/mL)
1	-	5,00	100,00	5,00	0,00
2	0,25	4,75	100,00	5,00	0,025
3	1,00	4,00	100,00	5,00	0,10
4	2,00	3,00	100,00	5,00	0,20
5	3,00	2,00	100,00	5,00	0,30
6	4,00	1,00	100,00	5,00	0,40

O doseamento das amostras foi realizado utilizando 100,00 μL da amostra de nanopartículas lisadas com proteínas, 5 mL de água purificada e 5 mL de reagente de Biureto. A solução foi armazenada ao abrigo da luz durante 30 minutos e a leitura foi executada em triplicata em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram determinados a partir da equação da reta obtida da curva de calibração.

3.3.3. Liofilização e ressuspensão do pó de nanopartículas liofilizadas

As amostras foram congeladas por meio de nitrogênio líquido e liofilizadas durante ciclo de 24 horas a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esse processo foi executado tanto para as amostras utilizadas no ensaio de doseamento de proteínas, quanto para as amostras utilizadas para avaliar a eficiência de crioproteção. As amostras utilizadas para doseamento de proteínas foram processadas conforme relatado no item 3.2.2.4.2. As amostras utilizadas para ressuspensão e avaliação da eficiência da crioproteção foram preparadas, coletando 10 mL da suspensão de nanopartículas, congelando e em seguida liofilizando as alíquotas. Para ressuspender o pó liofilizado, foi adicionado 10 mL de água purificada, agitando a suspensão por 10 minutos em vórtex, conforme descrito na figura 4.

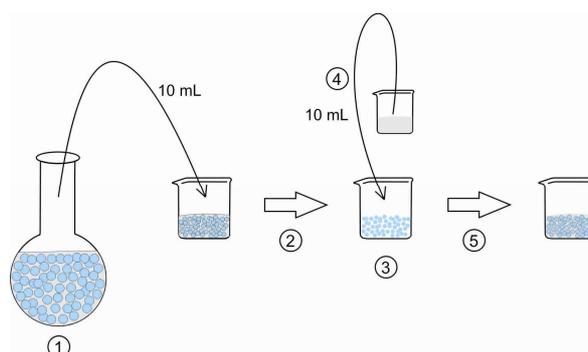


Figura 4 – Preparo das amostras para avaliação da eficiência de crioproteção.

Legenda: 1: Suspensão de nanopartículas; 2: Congelamento e liofilização; 3: Pó liofilizado; 4: Adição de 10 mL de água purificada; 5- Agitação em vórtex por 10 minutos e ressuspensão do pó de nanopartículas.

3.3.4. Avaliação da morfologia e característica de encapsulação

3.3.4.1. Microscopia ótica de fluorescência

A microscopia ótica de fluorescência foi realizada em nanopartículas encapsuladas com LysoTracker Red[®], que é comumente utilizado como marcador de lisossomas, pois se acumula em compartimentos celulares com caráter ácido. A substância apresenta em sua estrutura química grupo amina que pode ser protonado, exibindo fluorescência. Para protonar o grupo amina da molécula, 50 µL a 1 mM de LysoTracker Red[®] foi diluído em uma solução de Ácido Clorídrico a 0,10 M e adicionada na fase aquosa interna da suspensão de nanopartículas. As nanopartículas foram preparadas conforme processo descrito no item 3.2.1.1, sendo que sua execução foi realizada ao abrigo da luz, utilizando laminado de PVC âmbar para efetivar a proteção em ambientes iluminados. Após preparação da suspensão, foi utilizada microscopia ótica para confirmação da produção e visualização da forma das nanopartículas.

3.3.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

A análise morfológica das nanopartículas permite estimar as correlações estruturais com as propriedades da preparação. Nesta técnica, a área a ser analisada é irradiada por um feixe estreito de elétrons e como resultado da interação deste com a superfície da amostra, uma série de radiações que quando captadas fornecem informações características sobre a topografia da superfície, disposição estrutural do material e porosidades da amostra (LU, *et. al.* 1999; CORRIGAN, *et. al.*, 2009; BILATI, *et. al.*, 2005; MUNDARGI, *et. al.*, 2007; JIN, *et. al.*, 2009).

A preparação das nanopartículas para emprego da técnica de MEV foi realizada de acordo com o processo descrito no item 3.2.1.2, considerando a alteração

em um dos grupos que não possui crioprotetor. As amostras das suspensões de nanopartículas foram preparadas e divididas em 2 grupos:

- Suspensão de nanopartículas sem crioprotetor para secagem sob vácuo
- Suspensão de nanopartículas com crioprotetor para secagem sob vácuo

Durante o preparo dos suportes de alumínio para execução da análise, as lamínulas de vidro foram fraturadas até que coubesse no suporte, aproximadamente $\frac{1}{4}$ do tamanho original. Em seguida, as mesmas foram fixadas no suporte com auxílio de cola de prata e 200 μ L da suspensão foi adicionado sob a superfície da lamínula. As amostras foram secadas sob vácuo e acondicionadas em dessecador contendo sílica, durante 24 horas. Todas as amostras foram metalizadas com ouro usando uma corrente de 40 mA, distância da placa de ouro de cerca de 2,5 cm e tempo de exposição de 90 segundos, com espessura de revestimento de aproximadamente 20 nm. Após revestimento, a morfologia do material foi avaliada em Microscópio Eletrônico de Varredura.

3.3.5. Ensaio de citotoxicidade

3.3.5.1. Ensaio de citotoxicidade celular dos componentes da formulação e das nanopartículas

A linhagem de células renais de embrião humano, HEK (Human Embryonic Kidney, ATCC# CRL-1573), foi utilizada neste estudo para avaliar a citotoxicidade das nanopartículas e seus componentes isoladamente. Após o descongelamento das células, a linhagem foi cultivada em frascos de 25cm² contendo 5mL de meio de cultura apropriado, suplementado com SFB e Glutamina. As células foram incubadas a 37 °C sob pressão de CO₂ a 5%.

Durante o cultivo, o meio de cultura foi substituído a cada 48 horas. As células formaram uma monocamada confluyente aderida à parede do frasco e para liberar essa monocamada celular foi necessário o uso de 5 mL de Tripsina a 0,005 %. Após o

repique, as células foram expandidas em novos frascos de 75cm² contendo 15mL de meio de cultura suplementado com estreptomicina (100 mg/mL). Para determinar a citotoxicidade, o método colorimétrico MTT (3 - [4,5-dimethylthiazol-2, 5 - difeniltetrazolium bromide thiazole blue) foi utilizado. As células foram cultivadas em placas com 96 poços (1 x 10⁵ células/poço) por 24 horas a temperatura de 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. Em seguida, os poços foram lavados com PBS 1X e meio de cultura fresco contendo 1% de SFB foi adicionado.

As suspensões de nanopartículas foram preparadas para o ensaio e todos os componentes da formulação foram testados isoladamente, em diferentes concentrações conforme descrito a seguir:

- Nanopartículas sem Poloxamer, BSA e Trealose (5 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL and 0,1 mg/mL);
- Nanopartículas sem BSA (5 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL and 0,1 mg/mL);
- Nanopartículas completas e carregadas com BSA (5 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL and 0,1 mg/mL);
- Trealose (10 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL and 0,2 mg/mL);
- BSA (0,45 mg/mL, 0,09 mg/mL, 0,045 mg/mL, 0,0225 mg/mL and 0,009 mg/mL);
- Poloxamer (9 mg/mL, 1,8 mg/mL, 0,9 mg/mL, 0,45 mg/mL and 0,18 mg/mL).

Todas as amostras foram preparadas em triplicata. A placa foi incubada por 24 horas sob as mesmas condições anteriores. Após etapa de incubação, os poços foram lavados com PBS 1x e o MTT foi diluído em meio de cultura com 1 % de SFB. A placa foi tratada com o MTT e incubada por mais 3 horas sob as mesmas condições anteriores (ATHANASIOU *et al.*, 1996; POHJALA *et al.*, 2007; PERES *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2004);

Em seguida, a placa foi centrifugada a 1.000 RPM por 10 minutos para que ocorresse a precipitação dos cristais de formazan, o sobrenadante foi removido e 50 µL de DMSO foram aplicados em cada poço da placa para que os cristais de formazan fossem solubilizados. A leitura foi realizada em leitor de Microplacas Spectramax M5e (Molecular Devices, EUA) a 595 nm.

3.3.5.2. Ensaio de degradação acelerada e citotoxicidade das substâncias de degradação

O ensaio de degradação e citotoxicidade das substâncias de degradação de nanopartículas foram executados pela equipe do Laboratório de Biomateriais do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais em parceria com o Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais.

O teste de degradação acelerada foi realizado por mecanismos de hidrólise e oxidação forçada, que pode ser utilizado para obter as substâncias de degradação, mimetizando a degradação das nanopartículas *in vivo*. Dois grupos de nanopartículas foram liofilizados. O primeiro contemplava nanopartículas brancas e segundo continha BSA. Em seguida, os grupos foram pesados em quantidade suficiente para atingir concentração de 0,1 mg/mL em solução de peróxido de hidrogênio 30%. A preparação foi incubada por 24 horas a temperatura de 85 °C até completa degradação visual.

A linhagem de células utilizadas para o ensaio de citotoxicidade das substâncias de degradação foram isoladas da calvária de ratos Wistar com 1 a 5 dias de idade neonatal. A calvária foi dissecada, separada em pequenos pedaços e lavada com solução tampão fosfato sem cálcio e magnésio. Esses fragmentos foram tratados com solução de tripsina a 1% suplementada com EDTA durante 5 minutos e, em seguida, com solução de colagenase 2% por 4 vezes durante 30 minutos a 37 °C.

As últimas suspensões de células contendo osteoblastos foram centrifugadas por 5 minutos a 1000x g.

As células foram cultivadas em meio de cultura apropriado, suplementado com SFB, Glutamina, Estreptomicina (100 mg/mL), Penicilina G (10unidades/mL) e Anfotericina B (0,25 mg/mL) e utilizadas para avaliar a citotoxicidade das substâncias de degradação das nanopartículas.

Os osteoblastos foram plaqueados em placas com 96 poços (1 x 10⁵ células/poço) e incubados por 24 horas a temperatura de 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ para ocorrer fixação celular. Após esse período, os poços foram lavados com PBS 1X, o meio de cultura fresco foi suplementado com 1% de SFB e solução com os

produtos de degradação em concentração de 10 % (v/v). O ensaio foi realizado em triplicata. O meio utilizado na cultura controle de vida celular foi suplementado com solução tampão fostato (PBS) e com polietileno para o controle de morte celular. A placa foi incubada por mais 24 horas sob as mesmas condições anteriores.

Para determinar a citotoxicidade, analisando a viabilidade celular, utilizou-se o método colorimétrico MTT (3 - [4,5-dimethylthiazol-2, 5 – difenil-tetrazolium bromide thiazole blue). Após etapa de incubação, os poços foram lavados com PBS 1x e o MTT foi diluído em meio de cultura com 1 % de SFB. A placa foi tratada com 60 µL de MTT a 5 mg/mL e incubada por mais 2 horas sob as mesmas condições anteriores. 2 horas mais tarde, a morfologia dos osteoblastos foram avaliadas por microscopia ótica, a placa foi centrifugada a 1.000 RPM por 10 minutos para que ocorresse a precipitação dos cristais de formazan, o sobrenadante foi removido e 60 µL de SDS contendo 10% de HCl e Iodeto de Propídio foram aplicados em cada poço da placa para que os cristais de formazan fossem solubilizados. A placa foi incubada por mais 18 horas e a densidade ótica foi medida em leitor de Microplacas Spectramax M5e (Molecular Devices, EUA) a 595 nm.

3.3.6. Análise estatística

A comparação entre as médias dos valores dos experimentos de teor encapsulado foi realizada pela análise de variância (ANOVA). As relações foram consideradas estatisticamente significativas sobre as taxas de encapsulamento para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção de nanopartículas

Para desenvolvimento e obtenção de nanopartículas, inicialmente, foram testados diferentes métodos, processos e excipientes, totalizando 91 formulações distintas até conseguir um resultado satisfatório para o preparo de sistema de liberações nanométricos, considerando alta produtividade, repetibilidade e reprodutibilidade. Durante esse desenvolvimento, foi analisada apenas a distribuição de diâmetro das nanopartículas com objetivo de que o tamanho médio fosse menor que 200 nm, o que proporcionaria capacidade da preparação em ser esterilizada por filtração a 220 nm, objetivo futuro da pesquisa. Dos 91 resultados de DLS gerados, foram escolhidas 10 formulações para retratar esse histórico de desenvolvimento.

A figura 5 retrata a primeira preparação formulada, utilizando o método de emulsão múltipla seguido pela evaporação do solvente (diclorometano) e utilizando homogeneização mecânica de alta rotação e cisalhamento durante as duas etapas de emulsificação.

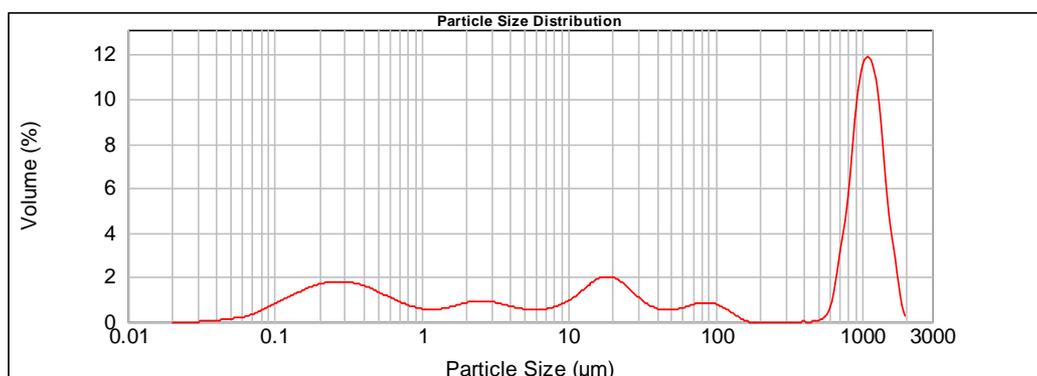


Figura 5 – Perfil de distribuição de tamanho, utilizando o método de emulsão múltipla seguido pela evaporação do solvente.

Em seqüência, os tempos de homogeneização mecânica foram alterados, a velocidade de rotação e cisalhamento foi aumentada, o tensoativo foi substituído (PVA para Poloxamer) e houve modificação na adição de tensoativo da fase aquosa externa para a fase aquosa interna. Os resultados podem ser visualizados nas figuras 6, 7, 8 e 9.

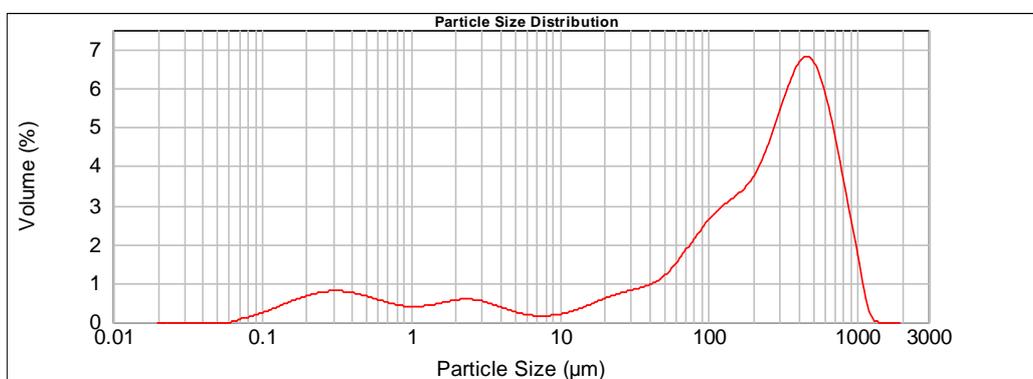


Figura 6 – Perfil de distribuição de tamanho, aumentando o tempo de homogeneização mecânica.

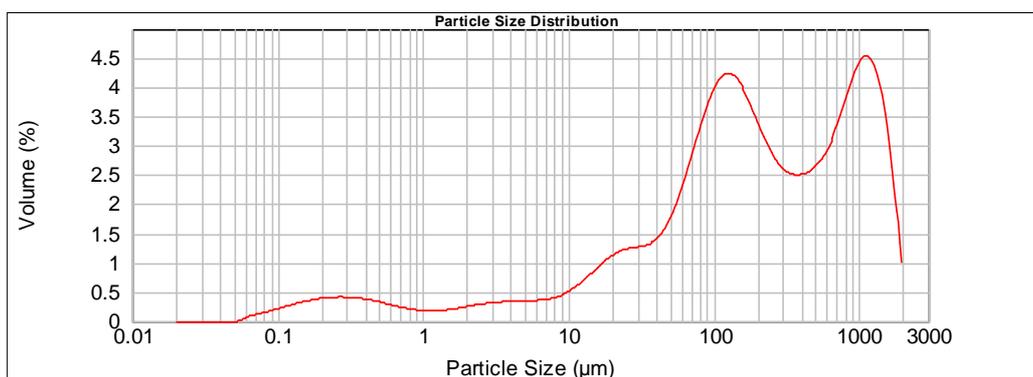


Figura 7 – Perfil de distribuição de tamanho, aumentando a velocidade de agitação mecânica.

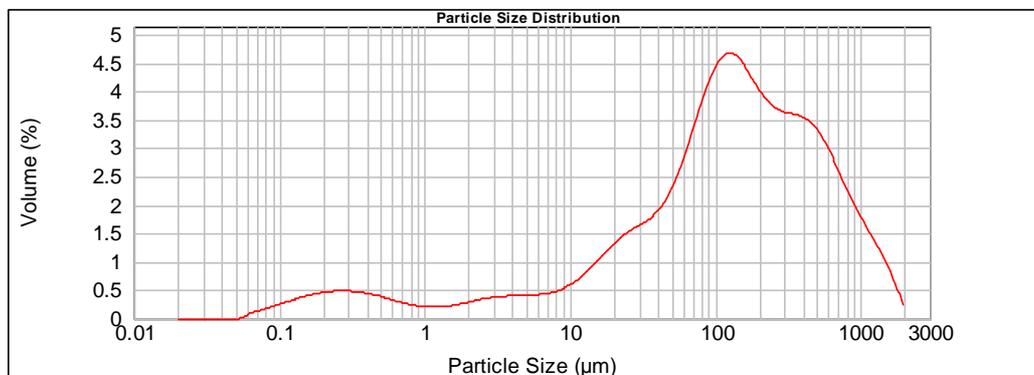


Figura 8 – Perfil de distribuição de tamanho, substituindo o tensoativo.

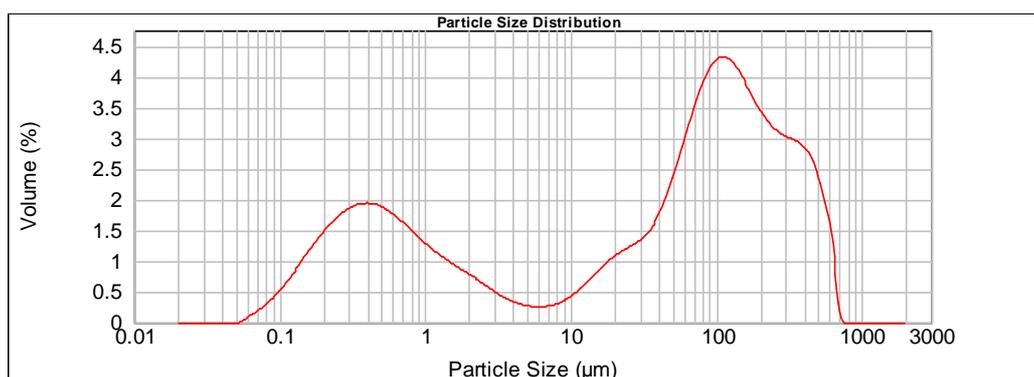


Figura 9 – Perfil de distribuição de tamanho, adicionando tensoativo na fase aquosa interna.

Nas figuras 10, 11, 12, 13 e 14 são exibidos os resultados referentes à introdução no processo de agitação da homogeneização por sonda de ultrassom antes da agitação mecânica durante a segunda emulsificação, aumento do tempo da homogeneização por sonicação, introdução da sonicação na primeira emulsificação, modificação do método para emulsão múltipla seguido de solvente difusão e substituição da agitação mecânica nas duas emulsificações pela sonicação, respectivamente.

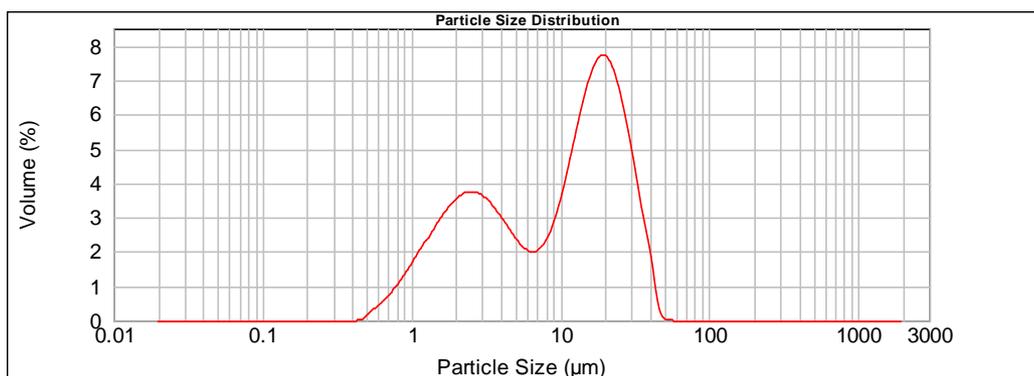


Figura 10 – Perfil de distribuição de tamanho, introduzindo agitação por sonda de ultrassom durante a segunda emulsificação.

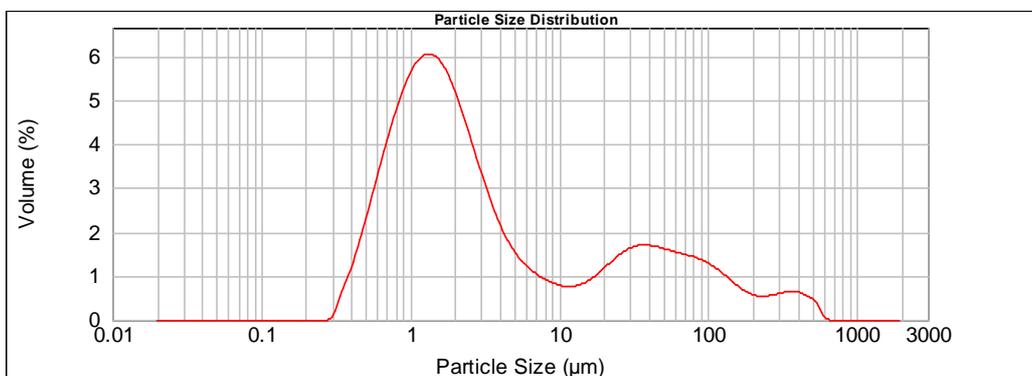


Figura 11 – Perfil de distribuição de tamanho, aumentando do tempo da homogeneização por sonicação.

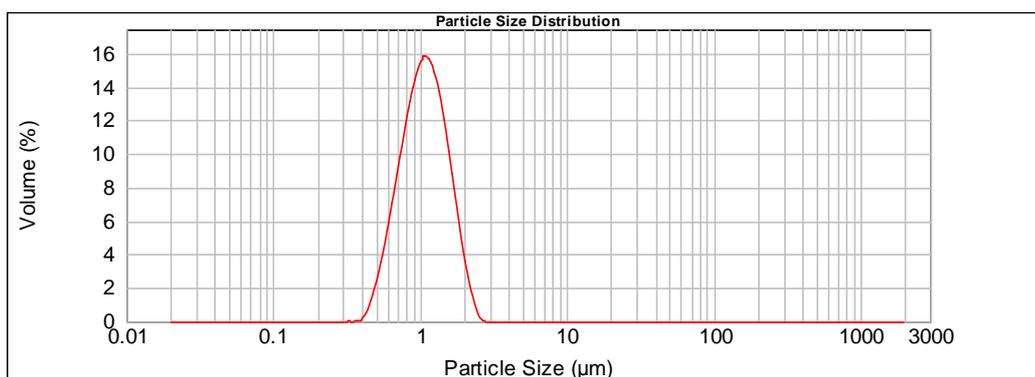


Figura 12 – Perfil de distribuição de tamanho, introduzindo agitação por sonicação durante a primeira emulsificação.

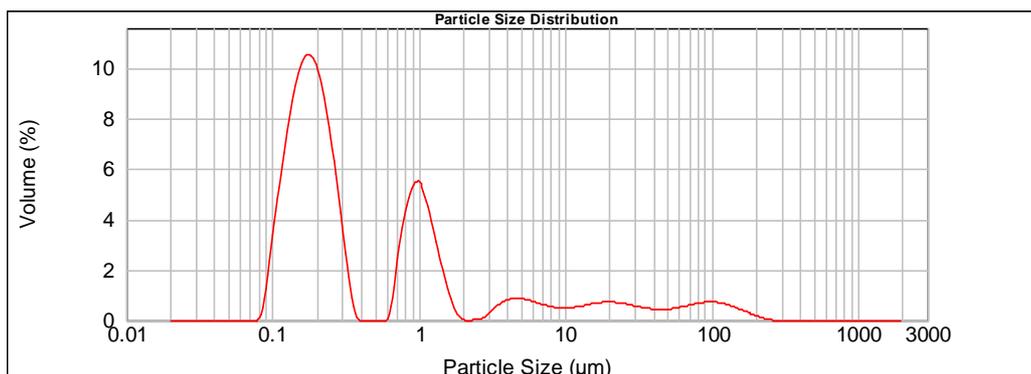


Figura 13 – Perfil de distribuição de tamanho, utilizando método de emulsão múltipla seguido de difusão do solvente.

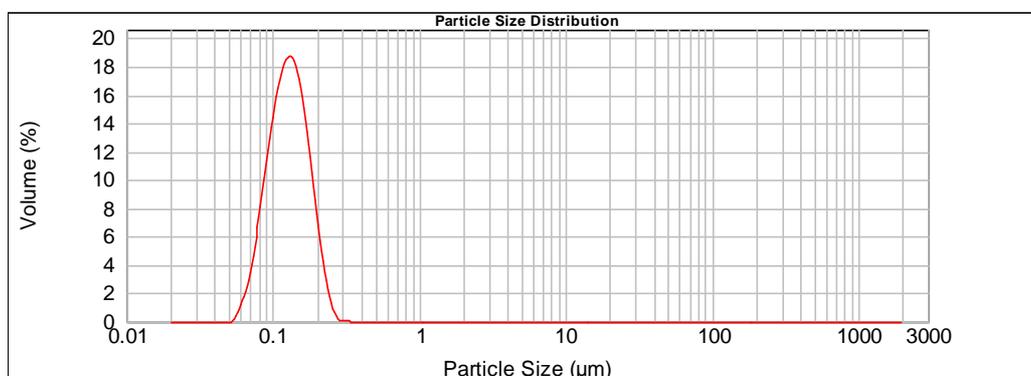


Figura 14 – Perfil de distribuição de tamanho, substituindo a agitação mecânica pela sonicação.

O último processo de obtenção de nanopartículas foi selecionado para otimização e estudo da influência dos parâmetros de processo e formulação sob o tamanho de partículas, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência no encapsulamento de proteínas.

4.2. Efeito da variação da concentração da fase aquosa interna

Para verificar o efeito da variação da concentração da fase aquosa interna sob o tamanho das nanopartículas, carga superficial, índice de polidispersão e taxa de encapsulamento, as concentrações de PLGA, BSA, poloxamer, volume da fase

orgânica e da fase aquosa externa, além do tempo de agitação por sonda de ultrassom, foram fixadas.

Nesta seção estão demonstrados os resultados e discussões, avaliando essa influência. Na tabela 3, estão identificadas as concentrações que foram utilizadas para a preparação das suspensões e a codificação das amostras obtidas.

Tabela 3 – Preparações obtidas por meio da variação da concentração da fase aquosa interna.

Volume da fase aquosa interna (v/v)	Código das preparações	
	Branças	Encapsuladas com BSA
10%	ET1-01-B1 e B2	ET1-01-A1 e A2
13%	ET1-02-B1 e B2	ET1-02-A1 e A2
16%	ET1-03-B1 e B2	ET1-03-A1 e A2
20%	ET1-04-B1 e B2	ET1-04-A1 e A2

Os resultados de distribuição de tamanho e carga superficial das formulações brancas plotadas em gráficos, concomitantemente com as contendo BSA, estão expostos nas figuras 15, 16, 17 e 18.

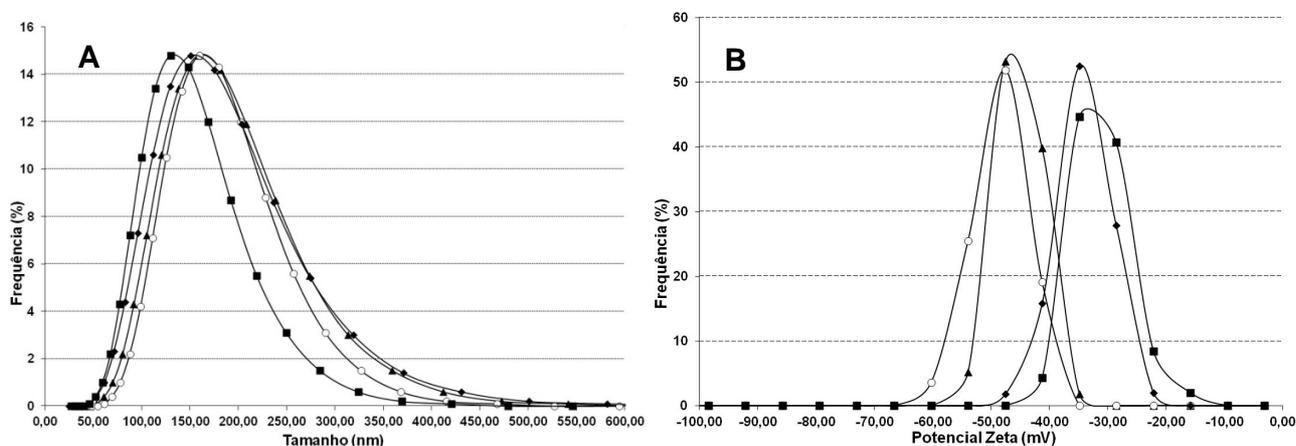


Figura 15 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 10% (v/v) de fase aquosa interna.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas – ET101B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA – ET101A1 e A2)

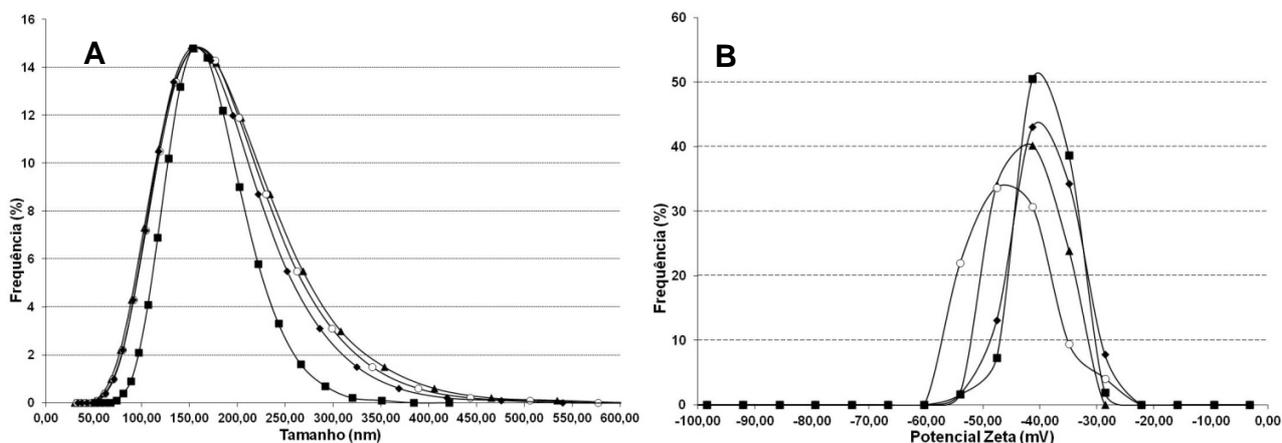


Figura 16 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 13% (v/v) de fase aquosa interna.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas – ET102B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA – ET102A1 e A2)

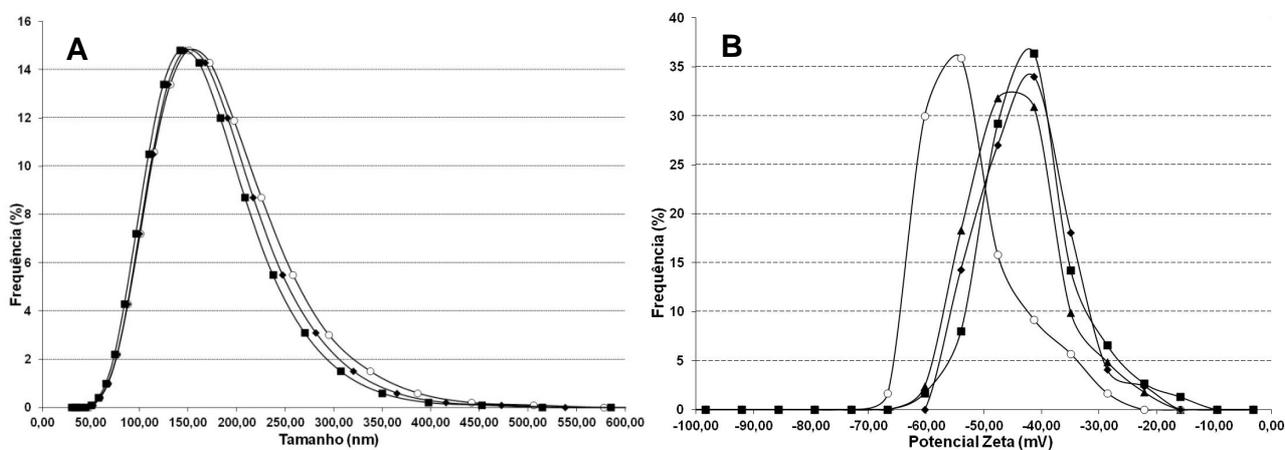


Figura 17 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 16% (v/v) de fase aquosa interna.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas – ET103B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA – ET103A1 e A2)

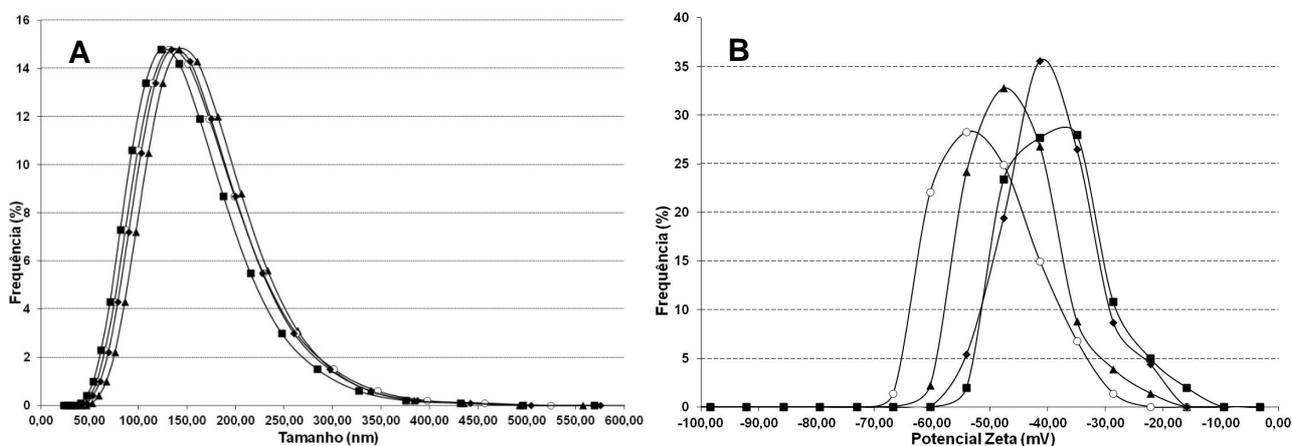


Figura 18 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 20% (v/v) de fase aquosa interna.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e **B-** Perfil de distribuição de potencial zeta. (**▲,○**:representam as formulações brancas – ET104B1 e B2; **◆, ■**: representam as formulações com BSA – ET104A1 e A2)

Analisando isoladamente cada gráfico de perfil de distribuição de tamanho exibido nas figuras de 15 a 18, pode-se verificar que todas as formulações, incluindo as de nanopartículas brancas e as contendo BSA, possuem repetibilidade, ou seja, alto grau de concordância entre as medidas realizadas para mesma propriedade. Esse fator demonstra a capacidade do método em se produzir nanopartículas, apontando eficiência e robustez suficiente para obtenção deste produto em escala laboratorial.

Outro fator importante demonstrados na tabela 4 e figura 19, são os resultados de tamanho médio das nanopartículas. Pode-se averiguar que não houve diferenças significativas dos valores medidos para nanopartículas brancas e as respectivas nanopartículas contendo BSA. Pode-se considerar também que a influência da concentração da fase aquosa interna não é representativa no diâmetro médio das nanopartículas, visto que a faixa de variação da média foi de 10 nm para as ambas formulações, tanto as de nanopartículas brancas quanto as contendo BSA.

Tabela 4 – Valores médios de tamanho das nanopartículas.

		ET101	ET102	ET103	ET104
Tamanho (nm)	B1	163,00	159,30	155,10	146,10
	B2	164,30	159,50	155,10	135,30
	Media	163,65	159,40	155,10	140,70
	Desvio	0,92	0,14	0,00	7,64
	A1	155,30	156,00	151,50	138,40
	A2	133,90	158,20	146,00	127,40
	Media	144,60	157,10	148,75	132,90
	Desvio	15,13	1,56	3,89	7,78

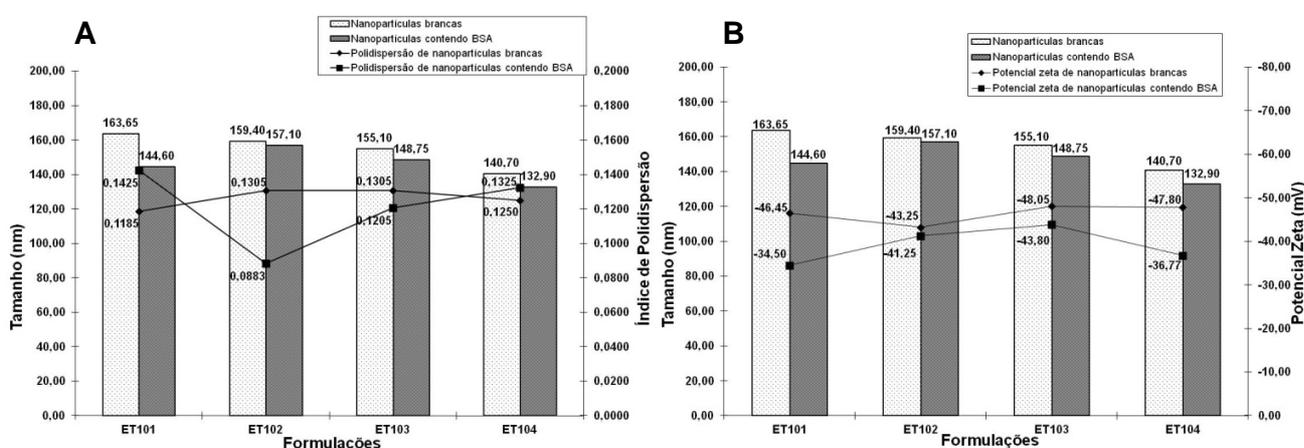


Figura 19 – Influência dos diferentes volumes de fase aquosa interna no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com o índice de polidispersão e carga superficial.
Legenda: A- Gráfico comparativo entre tamanho médio versus índice de polidispersão e B- Gráfico comparativo entre tamanho médio versus carga superficial.

Esse efeito, também foi observado por Courant e colaboradores, durante o desenvolvimento e caracterização físico-química de nanopartículas de PLGA complexadas com cobre. Esse pesquisador observou que quando se aumentava o volume da fase aquosa interna de 250 μ L para 1 mL, o tamanho médio de nanopartículas apresentaram alterações insignificantes, mantendo a faixa de tamanho médio dentro de 160-180 nm (COURANT, *et. al.*, 2009).

De acordo com Feczko, na maioria dos casos, o volume da fase aquosa interna, da fase orgânica e da fase aquosa externa mantém uma proporcionalidade (1:10:80, FAI; FO; FAE, respectivamente). Conforme o autor, o aumento em duas vezes do volume da fase aquosa interna ou da fase orgânica não altera significativamente o tamanho das nanopartículas. Entretanto, o tamanho pode ser alterado substancialmente, caso a fase aquosa externa se mantenha constante e uma das outras fases forem aumentadas em uma razão de 4 vezes (FECZKÓ *et al.*, 2008).

No presente estudo, as proporções 1:3:10; 1:2,31:7,70; 1:1,88:6,25 e 1:1,5:5 foram avaliadas. A premissa de não aumentar o volume da fase aquosa interna mais que o dobro, considerando a proporcionalidade inicial, foi seguida. Sendo assim, não foi observado nenhum aumento significativo no tamanho das nanopartículas, confirmando a indicação descrita por Feczko, apesar da diferença no delineamento da proporção das fases e no método de obtenção das nanopartículas. (FECZKÓ *et al.*, 2008)

Ainda observando os gráficos de distribuição de tamanho das figuras 15 a 18, constata-se que os perfis de distribuição são estreitos, ou seja, com baixa dispersão dos resultados. Essa afirmação pode ser confirmada analisando os dados lançados na tabela 5 e figura 19. O índice de polidispersão é um indicador de quanto os valores estão dispersos, observados em uma escala de frequência ou probabilidades, em outras palavras, determina o grau de afastamento ou de concentração entre os valores medidos. Mais especificamente, o índice de polidispersão representa a variância relativa que leva em consideração em seu cálculo o quadrado da média. Portanto, essa variância é diretamente influenciada pelo valor da média. Quanto menores são os resultados do índice de polidispersão, menor é a dispersão em torno da média e maior robustez do processo em se obter nanopartículas. Os resultados do índice de polidispersão das concentrações de fase aquosa interna de todos os grupos analisados distintamente estão compatíveis com índices encontrados na literatura e abaixo do índice (0,3) relatado por Trierweiler, confirmando homogeneidade na distribuição de tamanho de todas as formulações produzidas (TRIERWEILER, 2009; TEIXEIRA, *et al.*, 2005; HOLZER, *et al.*, 2009; JIN, *et al.*, 2009; BILATI, *et al.*, 2005; SILVA, *et al.*, 2010; COURANT, *et al.*, 2009).

Tabela 5 – Valores médios de índice de polidispersão das nanopartículas.

		ET101	ET102	ET103	ET104
Índice de Polidispersão	B1	0,1340	0,1360	0,1310	0,1120
	B2	0,1030	0,1250	0,1300	0,1380
	Media	0,1185	0,1305	0,1305	0,1250
	Desvio	0,0219	0,0078	0,0007	0,0184
	A1	0,1620	0,1160	0,1210	0,1260
	A2	0,1230	0,0605	0,1200	0,1390
	Media	0,1425	0,0883	0,1205	0,1325
	Desvio	0,0276	0,0392	0,0007	0,0092

O potencial zeta de algumas preparações contendo BSA apresentou deslocamento da curva de distribuição de carga para valores tendendo a menor intensidade negativa, ver gráficos de potencial zeta nas figuras 15, 16, 17, 18, 19 e tabela 6. Esse efeito pode ser explicado pela característica da molécula de BSA e seu provável posicionamento dentro das nanopartículas.

Tabela 6 – Valores médios de potencial zeta das formulações de nanopartículas.

		ET101	ET102	ET103	ET104
Potencial Zeta (mV)	B1	-45,60	-42,30	-43,20	-46,10
	B2	-47,30	-44,20	-52,90	-49,50
	Media	-46,45	-43,25	-48,05	-47,80
	Desvio	1,20	1,34	6,86	2,40
	A1	-37,30	-41,80	-43,10	-40,00
	A2	-31,70	-40,70	-44,50	-33,53
	Media	-34,50	-41,25	-43,80	-36,77
	Desvio	3,96	0,78	0,99	4,57

A BSA, bem como a Albumina humana, não apresenta uma distribuição de carga uniforme em sua molécula e em meio neutro, ela pode exibir cargas que podem variar de -10, -8 e 0, dependendo do sítio observado. O balanço total da carga da molécula de BSA em meio neutro é negativo, porém, com intensidade de carga muito menor do que a apresentada pelas nanopartículas brancas. (HIRAYAMA, *et. al.*, 1990; CARTER & HU, *et. al.*, 1994; EMERSON, *et. al.*, 1989). Diante desse fator, pode-se atribuir essa alteração, menos negativa, das formulações contendo BSA comparada as brancas ao encapsulamento dessa proteína e o deslocamento mais proeminente da curva de algumas formulações, à disposição da molécula na superfície das nanopartículas, que pode estar com o sítio neutro mais exposto. No entanto, o

potencial zeta não apresentou diferenças consideráveis, avaliando o grupo das formulações distintas de nanopartículas brancas e das contendo BSA.

A modificação do volume da fase aquosa interna na suspensão causou intensas influências na eficiência de encapsulamento. A taxa de encapsulamento das proteínas aumentou consideravelmente quando a concentração da fase aquosa interna aumentou de 10% para 13% para 16%, ver figura 20. Subseqüente a esse aumento, houve uma diminuição do encapsulamento quando a concentração foi variada de 16 para 20 %. Sugere-se que o aumento do volume foi capaz de melhorar o desempenho da solubilização da proteína e isso proporcionou condições mais favoráveis para ocorrer o encapsulamento até o limite, observado com a diminuição da taxa de encapsulamento para a concentração de 20%. Diante destes valores, sugere-se que a concentração de fase aquosa interna mais adequada para formulação das nanopartículas seja a de 16% (v/v) ($p < 0,05$).

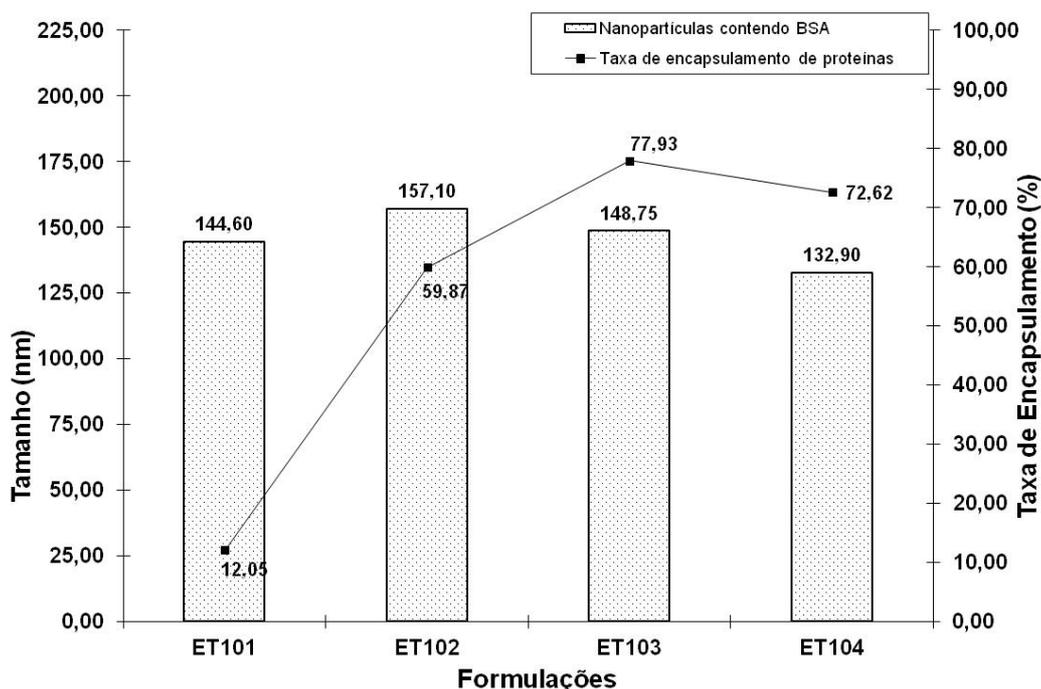


Figura 20 – Influência dos diferentes volumes da fase aquosa interna no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com a eficiência de encapsulamento.

4.3. Efeito da variação do tempo de agitação por sonda de ultrassom

As concentrações de PLGA, de Poloxamer, de BSA, do volume da fase aquosa interna, fase orgânica e fase aquosa externa foram fixados para avaliação da influência da variação do tempo de agitação por sonda de ultrassom sob os parâmetros estudados. Estão demonstradas, na tabela 7, as variações do tempo de agitação e as identificações das suspensões obtidas.

Tabela 7 – Preparações obtidas por meio da variação do tempo de agitação por sonda de ultrassom.

Tempo de sonicação (emulsão A/O)	Tempo de sonicação (emulsão A/O/A)	Código das preparações	
		Branças	Encapsuladas com BSA
60 segundos	60 segundos	ET2-01-B1 e B2	ET2-01-A1 e A2
90 segundos	90 segundos	ET2-02-B1 e B2	ET2-02-A1 e A2
120 segundos	120 segundos	ET2-03-B1 e B2	ET2-03-A1 e A2

Os resultados de distribuição de tamanho e carga superficial das formulações estão expostos nos gráficos das figuras 21, 22 e 23.

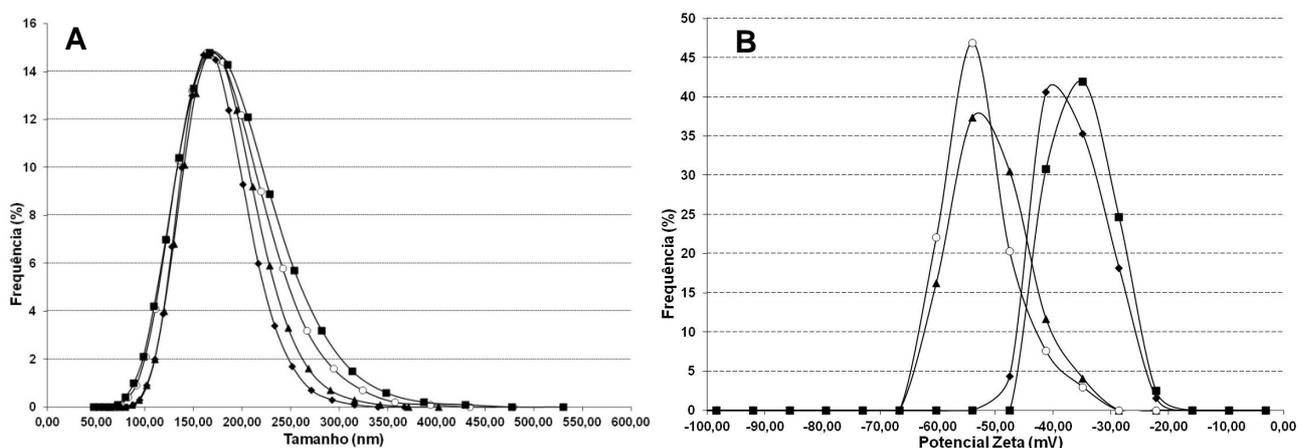


Figura 21 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações preparadas por agitação de 60 segundos.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas – ET201B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA – ET201A1 e A2)

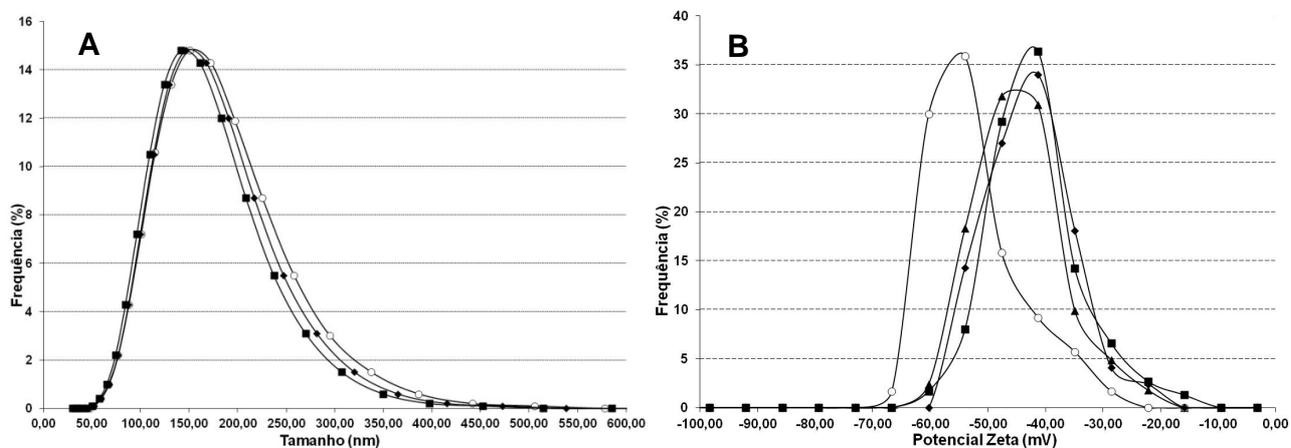


Figura 22 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações preparadas por agitação de 90 segundos.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas – ET202B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA – ET202A1 e A2)

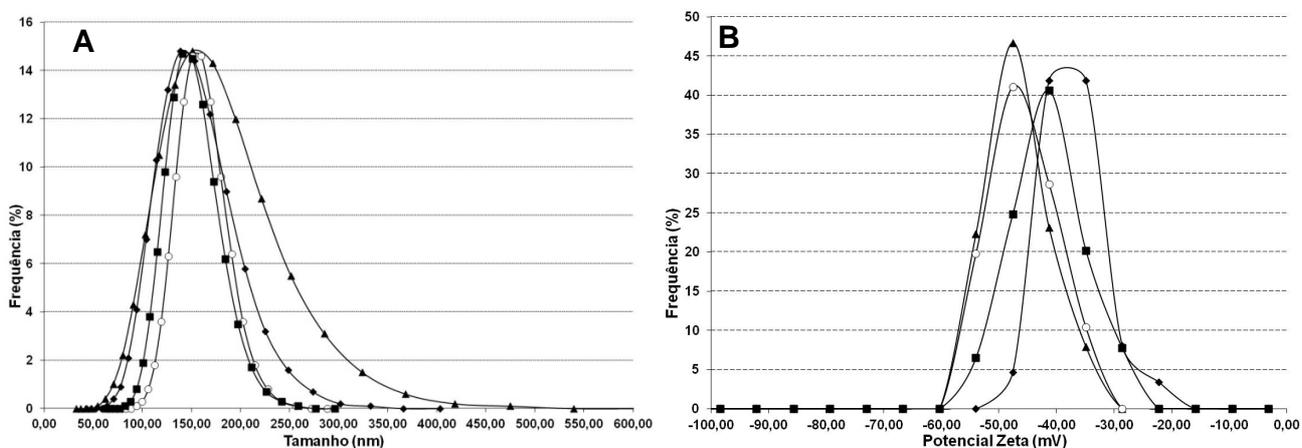


Figura 23 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações preparadas por agitação de 120 segundos.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas – ET203B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA – ET203A1 e A2)

Os resultados obtidos desta avaliação, conforme pode ser visualizado nas figuras 21, 22, 23, 24 e na tabela 8, mostram que um aumento no tempo de agitação durante as duas etapas de emulsificação induz um decréscimo no tamanho de partículas até um possível limite, identificado na comparação entre os tempos de 90 e 120 segundos. O decréscimo foi mais pronunciado quando a agitação foi superior a 60 segundos e não foi significativo quando houve aumento de 90 para 120 segundos, considerando as nanopartículas carregadas com BSA. Além disso, quando se compara os resultados das nanopartículas brancas, com a variação no tempo de agitação modificada de 90 para 120 segundos, o tamanho médio não apresentou alteração significativa, confirmando a indicação de limitação do efeito do tempo de agitação na diminuição de tamanho das partículas.

Tabela 8 – Valores médios de tamanho das nanopartículas.

		ET201	ET202	ET203
Tamanho (nm)	B1	170,10	155,10	155,60
	B2	168,60	155,10	155,40
	Media	169,35	155,10	155,50
	Desvio	1,06	0,00	0,14
	A1	164,90	151,50	143,10
	A2	171,40	146,00	145,30
	Media	168,15	148,75	144,20
	Desvio	4,60	3,89	1,56

Konan e colaboradores mostraram que o aumento no tempo de agitação durante a etapa de emulsificação anterior à diluição produz diminuição no tamanho das partículas. Logo, aumentando-se o tempo de agitação em 3 vezes, houve uma redução de 25 % no tamanho médio das nanopartículas. No entanto, aumentando-se ainda mais o tempo de agitação não houve redução adicional de tamanho (KONAN, *et al.*, 2002). Esses resultados, apesar das diferenças na metodologia e no processo de obtenção de nanopartículas, confirmam as indicações dos dados reunidos no presente estudo e simplificados na figura 24.

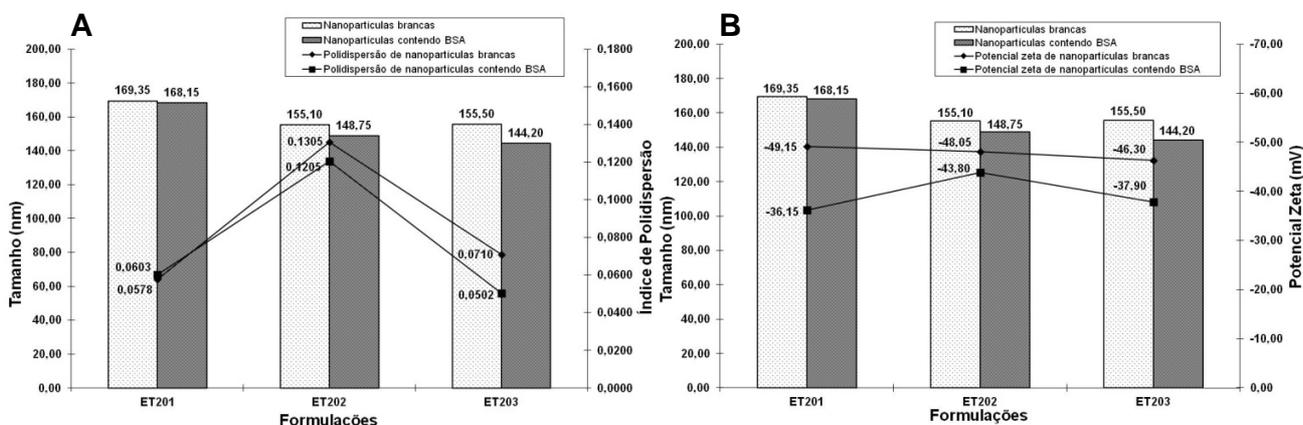


Figura 24 – Influência dos diferentes tempos de agitação no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com o índice de polidispersão e carga superficial.

Legenda: A- Gráfico comparativo entre tamanho médio versus índice de polidispersão e B- Gráfico comparativo entre tamanho médio versus carga superficial.

Cohen-Sela e colaboradores, ao prolongar o tempo de sonicação de 30 para 90 segundos obtiveram redução no tamanho de 10 %, utilizando método de obtenção semelhante ao executado neste estudo (COHEN-SELA, *et al.*, 2009). A influência do tempo de sonicação pode ser verificada tanto para as formulações brancas quanto para as carregadas com proteína, quando houve aumento do tempo de sonicação de 60 para 90 segundos, houve redução no tamanho médio em 8 e 12 %, respectivamente.

Ainda conforme apresentado nas figuras 21, 22, 23, 24 e tabela 9 a análise dos resultados de distribuição de tamanho e dos índices de polidispersão sugerem que a dispersão de diâmetro das nanopartículas está dentro de níveis descritos na literatura, conforme relatado no item 4.2 e que o processo de fabricação foi adequado, formando nanopartículas com tamanhos homogêneos.

Tabela 9 – Valores médios de índice de polidispersão das nanopartículas.

		ET201	ET202	ET203
Índice de Polidispersão	B1	0,0470	0,1310	0,1170
	B2	0,0685	0,1300	0,0250
	Media	0,0578	0,1305	0,0710
	Desvio	0,0152	0,0007	0,0651
	A1	0,0407	0,1210	0,0676
	A2	0,0799	0,1200	0,0328
	Media	0,0603	0,1205	0,0502
	Desvio	0,0277	0,0007	0,0246

Tsukada e colaboradores, observaram que com o aumento do tempo de agitação houve uma melhoria na dispersão das gotas, ou seja, das nanopartículas, prevenindo a coalescência e diminuindo o tamanho. (TSUKADA, *et al.*, 2009).

O efeito na melhoria da dispersão não foi observado durante o presente estudo, pois os melhores índices de polidispersão foram visualizados no menor e maior tempo de sonicação, 60 e 120 segundos, respectivamente. As formulações com tempo de sonicação de 90 segundos foram as que apresentaram maior heterogeneidade dentre as formulações elaboradas. Logo, os resultados descritos por Tsukada não foram confirmados e não se pode sugerir, neste trabalho, que com o aumento no tempo de agitação, há uma melhoria nos índices de dispersão.

O potencial zeta, conforme verificado nas figuras 21, 22, 23 e tabela 10, apresentam efeitos semelhantes aos descritos no item 4.2 relacionados às características da molécula de BSA e posicionamento da mesma na superfície da nanopartícula. A carga superficial não apresentou diferenças consideráveis, avaliando os grupos das formulações distintas de nanopartículas brancas, porém houve uma diferença entre cargas menos pronunciada, comparando os valores das preparações brancas e BSA-encapsuladas expostas ao tempo de sonicação de 90 segundos. Isso pode ser interessante pelo fato da carga superficial mais intensa, mas, por si só, não torna o grupo mais adequado, já que os outros grupos também apresentam altos valores (< -30 mV), conferindo carga suficientemente alta para que ocorra repulsão entre partículas e possivelmente manter a preparação estável (MALVERN, 2011).

Tabela 10 – Valores médios de potencial zeta das formulações de nanopartículas.

		ET201	ET202	ET203
Valor de Potencial Zeta	B1	-49,30	-43,20	-46,40
	B2	-49,00	-52,90	-46,20
	Media	-49,15	-48,05	-46,30
	Desvio	0,21	6,86	0,14
	A1	-37,00	-43,10	-36,50
	A2	-35,30	-44,50	-39,30
	Media	-36,15	-43,80	-37,90
	Desvio	1,20	0,99	1,98

Todos os tempos de sonicação foram eficientes para produção de nanopartículas com tamanhos médios menores que 220 nm, monodispersas e com alta carga elétrica superficial. No entanto, avaliando os parâmetros de tamanho médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta na figura 24, percebe-se que não existem diferenças consideráveis para escolha do melhor tempo de sonicação, apesar dos grupos ET202 e ET203 apresentarem melhores resultados relacionados ao tamanho médio de partícula.

Para que o melhor processo fosse definido, a eficiência de encapsulamento foi avaliada comparativamente ao diâmetro médio das nanopartículas (figura 25). Percebe-se que a taxa de encapsulamento foi 7,72 % maior e o tamanho médio de partícula 11,54 % menor, quando o tempo de sonicação foi modificado de 60 para 90 segundos e quando o tempo de sonicação foi modificado de 90 para 120 segundo, a taxa de encapsulamento foi 39,02 % menor, apesar do diâmetro médio da nanopartícula também ter diminuído com o aumento do tempo de agitação ($p < 0,05$).

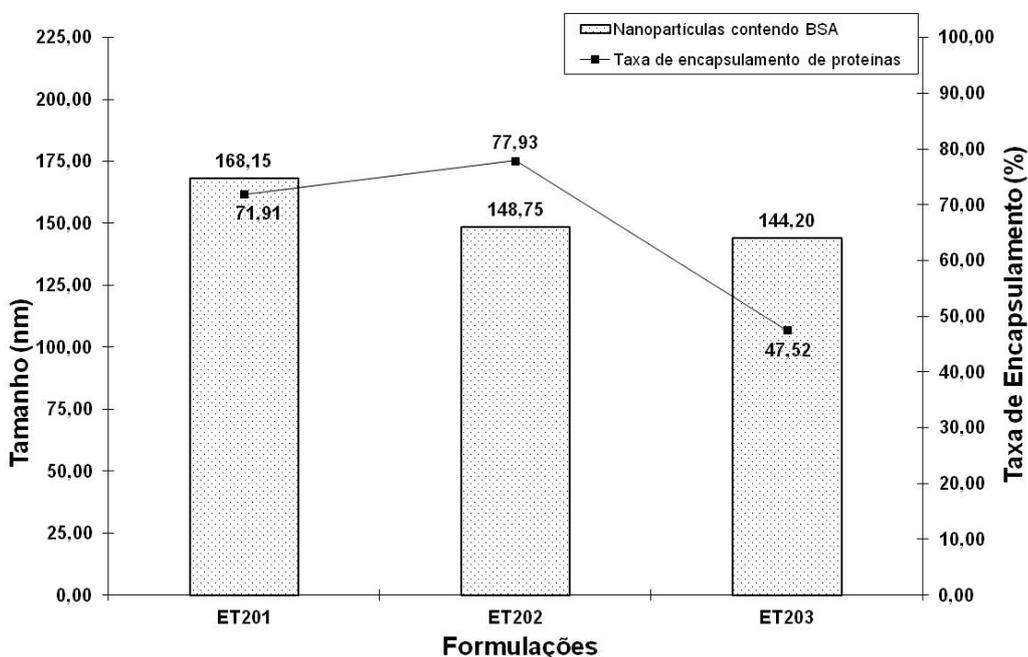


Figura 25 – Influência dos diferentes tempos de agitação por sonda de ultrassom no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com a eficiência de encapsulamento.

Este estudo sugere a mesma observação ressaltada por Feczko e colaboradores, expondo que quando há aumento na duração da sonicação, o tamanho das partículas pode ser diminuído, porém quando o tempo é igual ou maior a 120 segundos, a eficiência de encapsulamento pode ser reduzida. (FECZKO *et al.*, 2008).

Diante dos resultados obtidos, estima-se que o tempo de agitação por sonda de ultrassom mais adequado para produção de nanopartículas seja de 90 segundos, nas duas etapas de emulsificação.

4.4. Efeito da variação da concentração de polímero

Inicialmente, para comprovar a influência e selecionar a melhor concentração de polímero na fase orgânica na formulação, as concentrações de Poloxamer, de BSA, o volume da fase aquosa interna, fase orgânica e da fase aquosa externa, além do tempo de agitação por sonda de ultrassom, foram fixados para isolar a interferência causada pela adição de PLGA. Essa interferência foi analisada, observando os parâmetros de tamanho médio das nanopartículas, distribuição de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e a eficiência de encapsulamento. Na tabela 11 estão identificadas as concentrações do polímero utilizadas para a preparação das suspensões e os códigos atribuídos a rotulagem das amostras.

Tabela 11 – Preparações obtidas por meio da variação da concentração de polímero na fase orgânica.

Concentração de PLGA (p/v)	Código das preparações	
	Branças	Encapsuladas com BSA
2 %	ET3-01-B1 e B2	ET3-01-A1 e A2
3 %	ET3-02-B1 e B2	ET3-02-A1 e A2
4 %	ET3-03-B1 e B2	ET3-03-A1 e A2
5 %	ET3-04-B1 e B2	ET3-04-A1 e A2

Os resultados de distribuição de tamanho e carga superficial das formulações brancas plotadas em gráficos, concomitantemente com as contendo BSA, estão expostos nas figuras de 26 a 29.

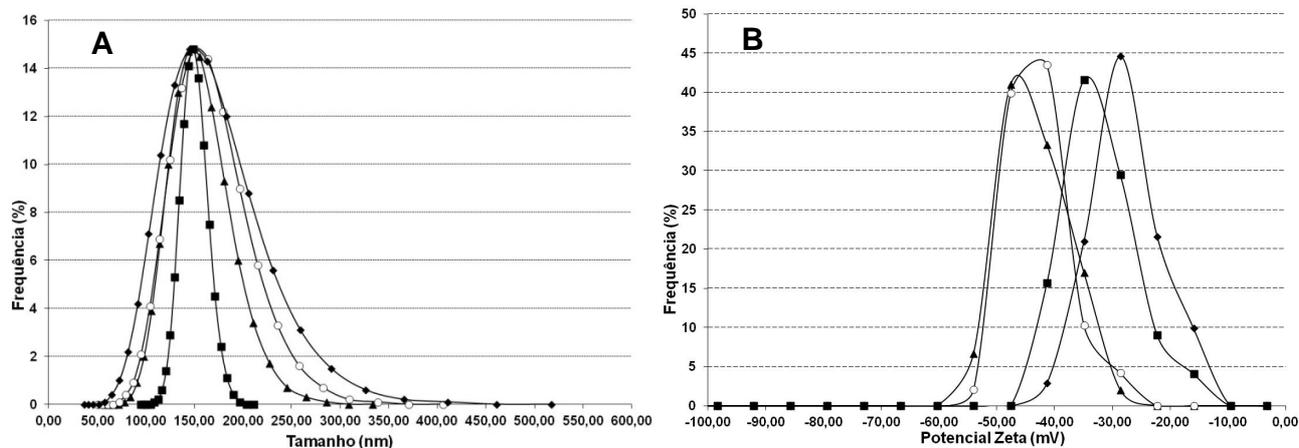


Figura 26 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 2% (p/v) de PLGA.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas – ET301B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA – ET301A1 e A2)

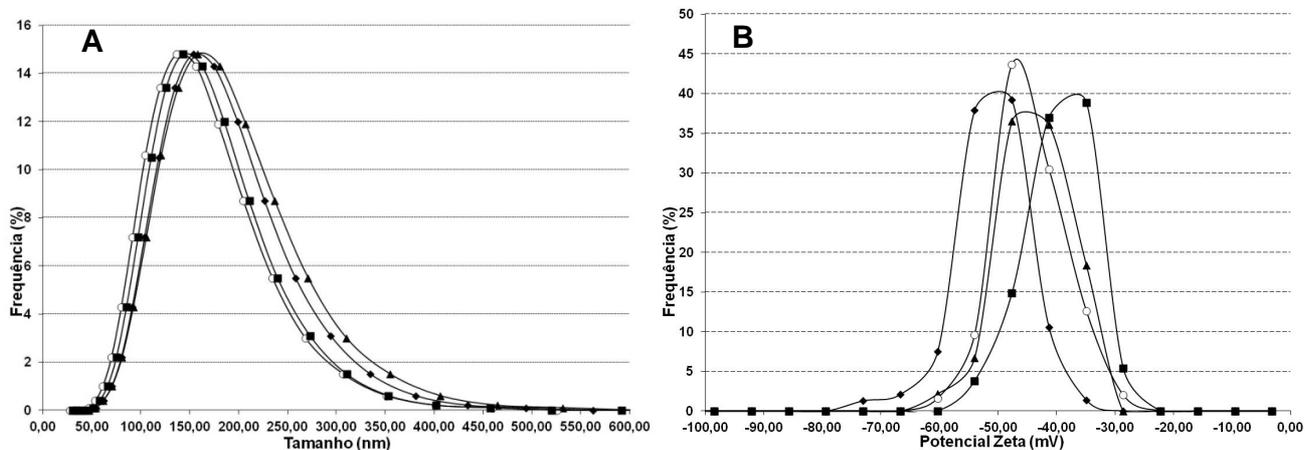


Figura 27 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 3% (p/v) de PLGA.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas – ET302B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA – ET302A1 e A2)

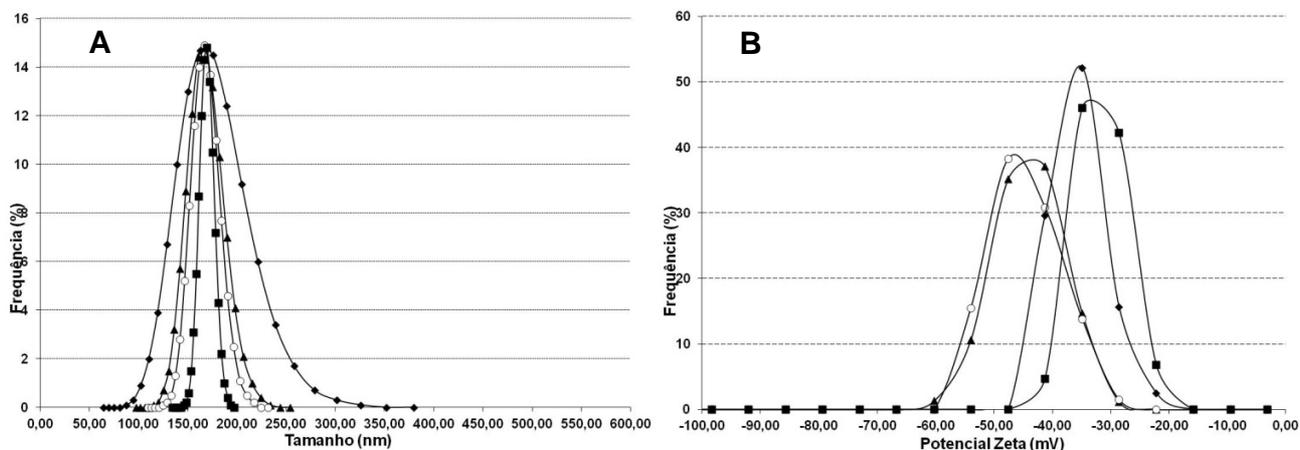


Figura 28 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 4% (p/v) de PLGA.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas – ET303B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA – ET303A1 e A2)

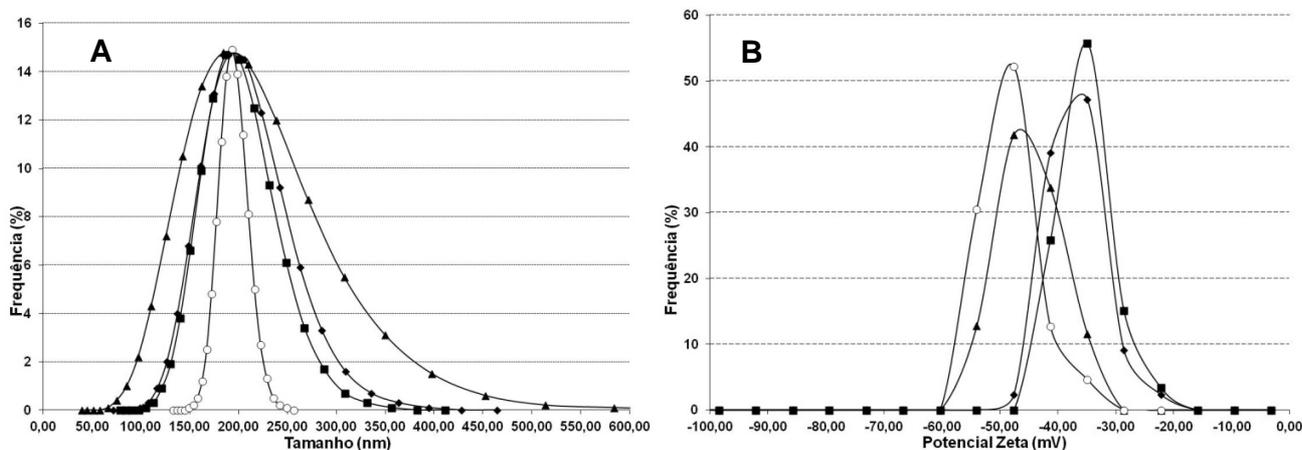


Figura 29 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 5% (p/v) de PLGA.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas – ET304B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA – ET304A1 e A2)

As etapas formuladas com diferentes concentrações de polímero apresentaram resultados que demonstram que com o aumento da concentração de PLGA na fase orgânica da preparação há um deslocamento do perfil de distribuição de tamanho para aumento no diâmetro médio das nanopartículas. Essa afirmação pode ser visualizada nas figuras de 26 a 29. Ao se avaliar as etapas do ensaio em que as concentrações de PLGA foram aumentadas de 2 para 3 % (p/v), pode-se verificar (tabela 12) que houve um aumento no diâmetro médio das nanopartículas de aproximadamente 3 e 1 % para a preparação branca e com BSA, respectivamente. Porém, não se pode considerar este aumento significativo, comparado com os aumentos de 7 e 9 % entre as etapas com concentrações de 3 e 4% (p/v) e um aumento de 13 %, tanto para nanopartículas brancas quanto para as carregadas com BSA, quando comparado os efeitos entre as concentrações de 4 e 5 % (p/v).

Tabela 12 – Valores médios de tamanho das nanopartículas.

		ET301	ET302	ET303	ET304
Tamanho (nm)	B1	147,90	162,86	165,90	190,20
	B2	154,10	141,00	166,70	193,30
	Media	151,00	151,93	166,30	191,75
	Desvio	4,38	15,45	0,57	2,19
	A1	149,70	158,32	167,40	195,60
	A2	148,00	147,61	168,80	192,40
	Media	148,85	152,96	168,10	194,00
	Desvio	1,20	7,57	0,99	2,26

Cohen-Sela e colaboradores obtiveram como resultados aumentos de 7 % no tamanho médio das nanopartículas quando aumentaram de 0,5 para 4,5 % (p/v) a concentração de PLGA, utilizando método semelhante ao empregado neste trabalho. (COHEN-SELA, *et al.*, 2009).

Segundo Tsukada e colaboradores, o tamanho médio das nanoesferas de PLGA diminui drasticamente quando a concentração de PLGA em solvente adequado reduz de 133,00 mg/mL para 6,70 mg/mL sob condições ótimas de preparo. (TSUKADA, *et al.*, 2009)

Analisando os gráficos de perfil de distribuição de tamanho, exibidos nas figuras de 26 a 29, pode-se verificar que o grupo de formulações ET302 possuem melhor repetibilidade do que os outros grupos, devido a distribuição similar em todos os lotes produzidos. Não obstante, podemos atestar que as formulações dos outros grupos (ET301, ET303 e ET304) possuem resultados para índices de polidispersão excelentes, apresentando distribuição de tamanho da população de nanopartículas muito próximo a média (ver tabela 13). Essa verificação, confirma a capacidade do método em se obter resultados cada vez mais confiáveis em relação à distribuição de tamanho. Esses resultados foram diferentes dos apresentados por Courant e colaboradores que atestaram uma elevação linear do índice de polidispersão com a elevação da concentração de PLGA, porém no trabalho citado, os autores utilizaram processo para obtenção das suspensões diferente do processo empregado nesse estudo (COURANT, *et al.*, 2009).

Tabela 13 – Valores médios de índice de polidispersão das nanopartículas.

		ET301	ET302	ET303	ET304
Índice de Polidispersão	B1	0,0422	0,1152	0,0124	0,1180
	B2	0,0593	0,1249	0,0077	0,0058
	Media	0,0508	0,1201	0,0100	0,0619
	Desvio	0,0121	0,0069	0,0034	0,0793
	A1	0,0960	0,1041	0,0429	0,0476
	A2	0,0088	0,1127	0,0020	0,0371
	Media	0,0524	0,1084	0,0225	0,0424
	Desvio	0,0617	0,0061	0,0289	0,0074

Com base nas figuras de 26 a 29 e tabela 14, observa-se que a tendência das nanopartículas contendo BSA em se manter com menor intensidade da carga negativa permaneceu. Os resultados de potencial zeta se mantiveram adequados para estabilidade da suspensão (MALVERN, 2011).

Tabela 14 – Valores médios de potencial zeta das formulações de nanopartículas.

		ET301	ET302	ET303	ET304
Potencial Zeta (mV)	B1	-43,80	-47,40	-44,00	-44,50
	B2	-43,60	-44,10	-43,90	-49,00
	Media	-43,70	-45,75	-43,95	-46,75
	Desvio	0,14	2,33	0,07	3,18
	A1	-28,40	-46,70	-33,50	-37,20
	A2	-32,10	-38,40	-31,10	-33,60
	Media	-30,25	-42,55	-32,30	-35,40
	Desvio	2,62	5,87	1,70	2,55

Os resultados das tabelas 12, 13 e 14, estão indicados graficamente na figura 30.

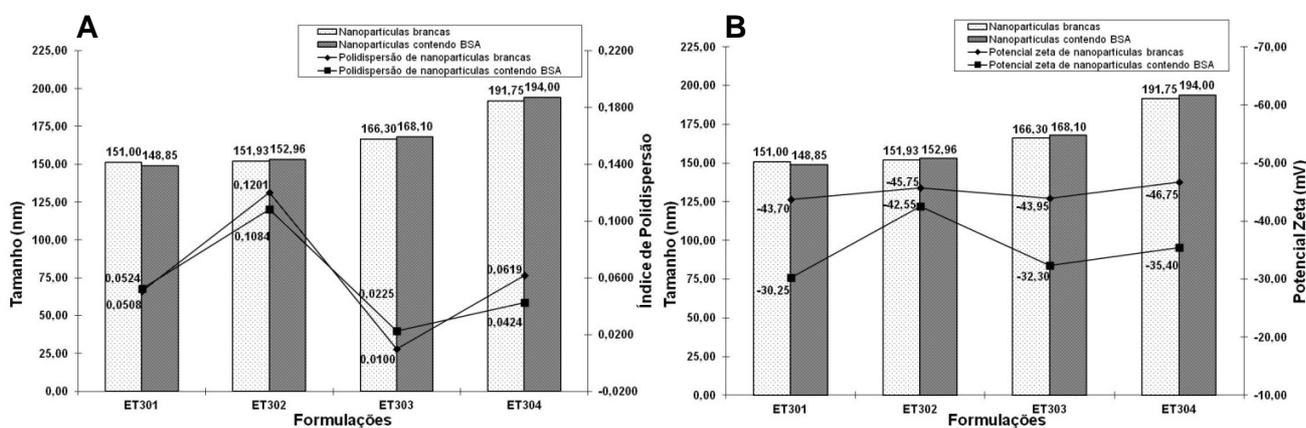


Figura 30 – Influência das diferentes concentrações de polímero no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com o índice de polidispersão e carga superficial.

Legenda: A- Gráfico comparativo entre tamanho médio versus índice de polidispersão e B- Gráfico comparativo entre tamanho médio versus carga superficial.

Para escolha da melhor formulação além da avaliação dos parâmetros demonstrados na figura 32, analisou-se a eficiência de encapsulamento comparada aos resultados de diâmetro médio das nanopartículas encapsuladas. O grupo ET302 apresentou maior taxa de encapsulamento 71,07%, comparativamente aos demais grupos ($p < 0,05$). Somada a essa característica de eficiência no encapsulamento, o grupo demonstrou alta repetibilidade com índice de polidispersão adequado, carga superficial capaz de contribuir para a estabilidade da suspensão e tamanho médio de partículas adequado para uma possível filtração a 220 nm. Diante dos resultados

obtidos, considera-se que a melhor concentração de polímero na fase orgânica é a de 3 % (p/v).

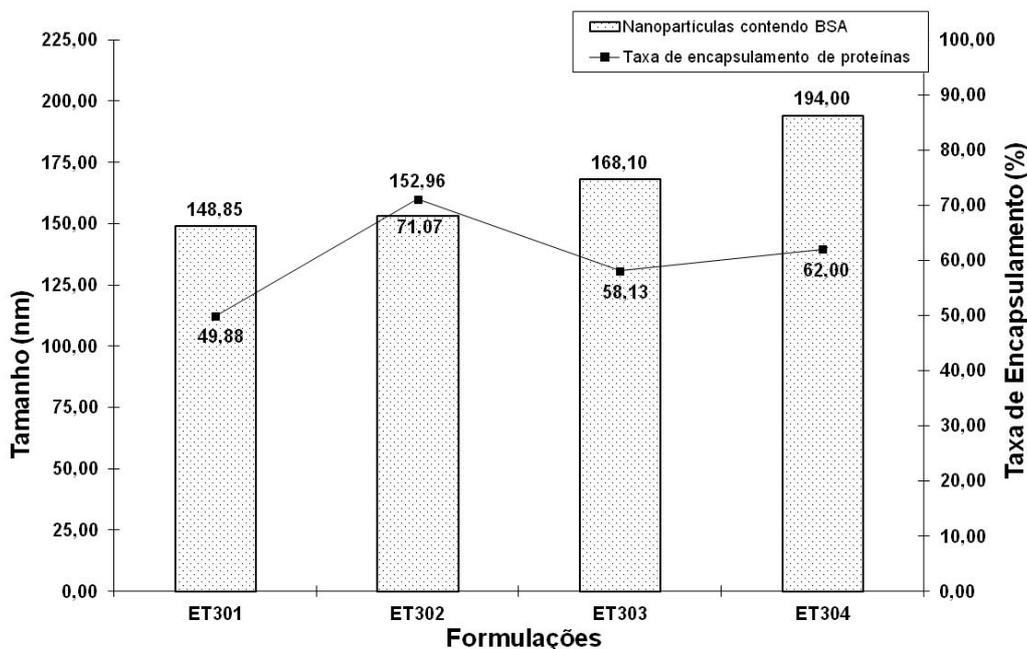


Figura 31 – Influência das diferentes concentrações de polímero no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com a eficiência de encapsulamento.

4.5. Efeito da variação da concentração de tensoativo

Durante a execução desta etapa para avaliação do efeito da variação da concentração de tensoativo, as concentrações de PLGA, de BSA, o volume da fase aquosa interna, fase orgânica e da fase aquosa externa, além do tempo de agitação por sonda de ultrassom, foram fixados.

Estão identificadas, na tabela 15, as concentrações utilizadas em cada etapa do desenvolvimento da formulação e a codificação das amostras obtidas.

Tabela 15 – Preparações obtidas por meio da variação da concentração de tensoativo.

Concentração de Poloxamer (p/v)	Código das preparações	
	Branças	Encapsuladas com BSA
0,0 %	ET4-01-B1 e B2	ET4-01-A1 e A2
1,0 %	ET4-02-B1 e B2	ET4-02-A1 e A2
2,0 %	ET4-03-B1 e B2	ET4-03-A1 e A2
3,0 %	ET4-04-B1 e B2	ET4-04-A1 e A2
4,0 %	ET4-05-B1 e B2	ET4-04-A1 e A2

Os resultados obtidos nesta etapa do processo de desenvolvimento da formulação de nanopartículas, analisando os gráficos de perfil de distribuição de tamanho e carga superficial exibidos nas figuras de 32 a 36, apresentaram, similarmente aos dados medidos para as outras influências estudadas, repetibilidade no processo de produção de nanopartículas e potencial zeta suficientemente alto para manter a estabilidade da suspensão. O fenômeno, da carga superficial com menor intensidade negativa para nanopartículas encapsuladas com BSA, observado anteriormente, foi semelhante para esta etapa do desenvolvimento.

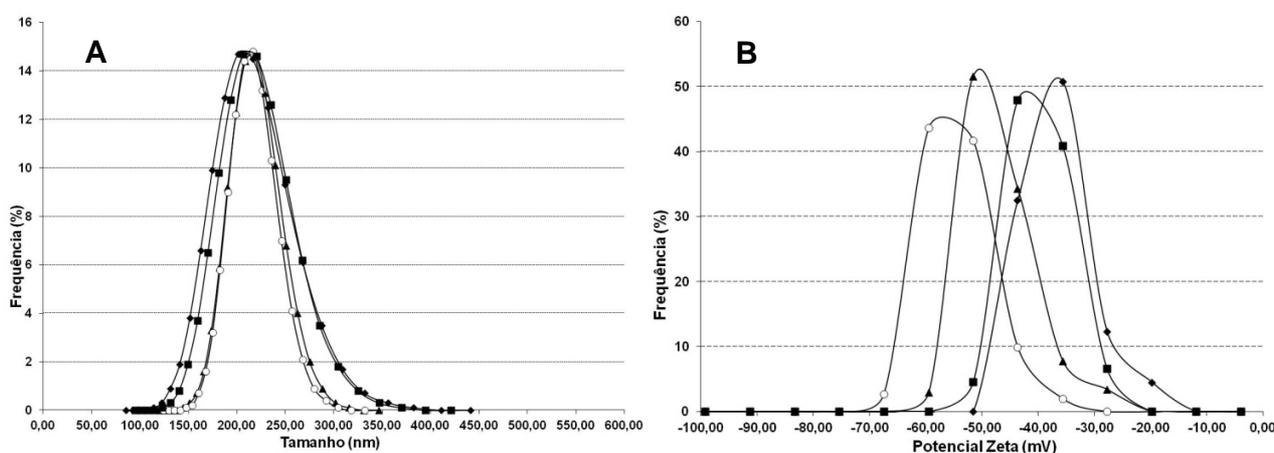


Figura 32 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações sem tensoativo.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas – ET401B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA – ET401A1 e A2)

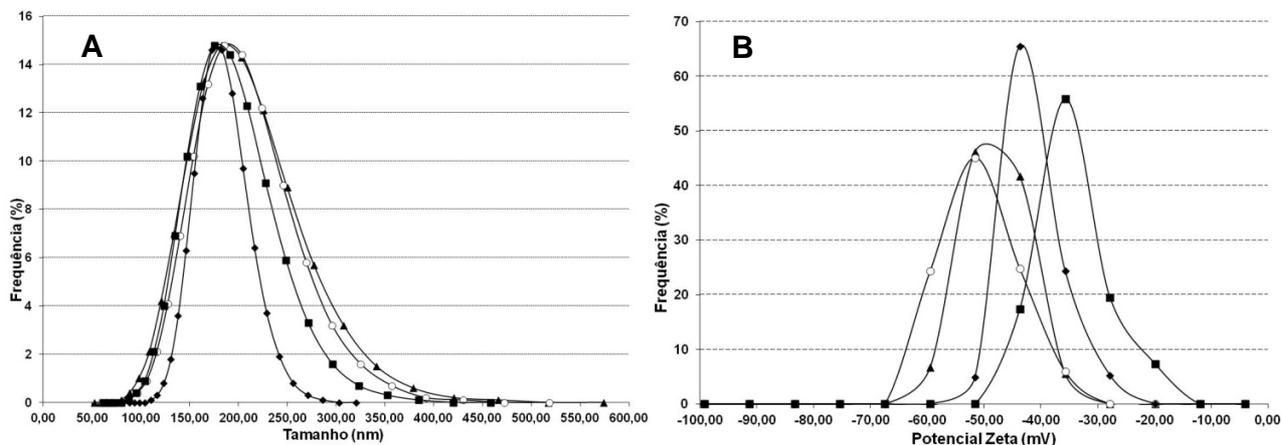


Figura 33 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 1% (p/v) de tensoativo.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas – ET402B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA – ET402A1 e A2)

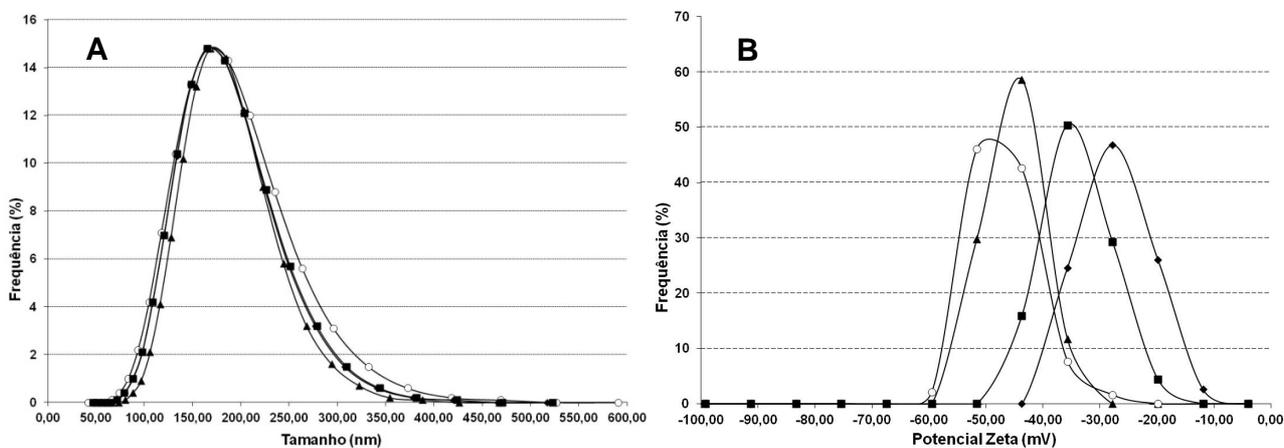


Figura 34 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 2% (p/v) de tensoativo.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas – ET403B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA – ET403A1 e A2)

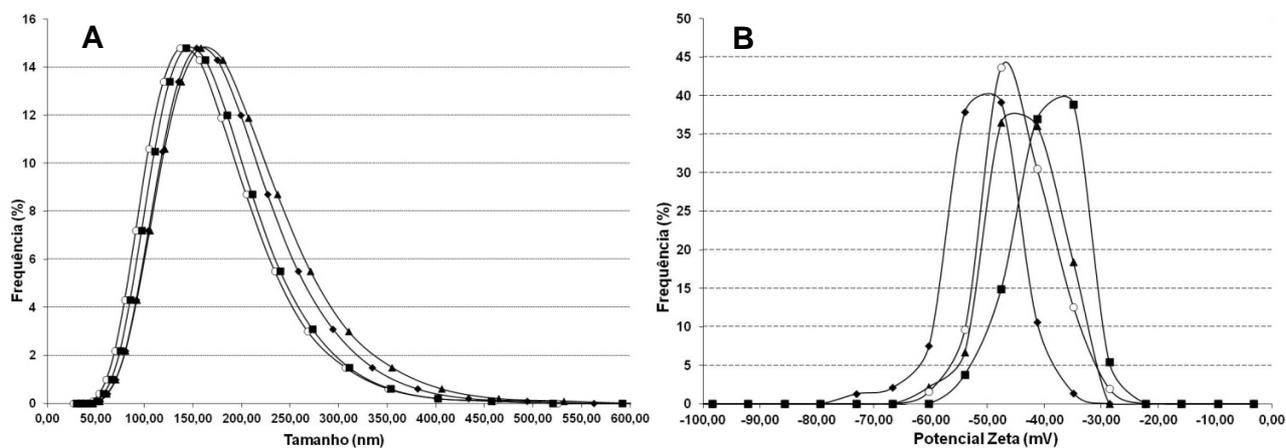


Figura 35 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 3% (p/v) de tensoativo.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas – ET404B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA – ET404A1 e A2)

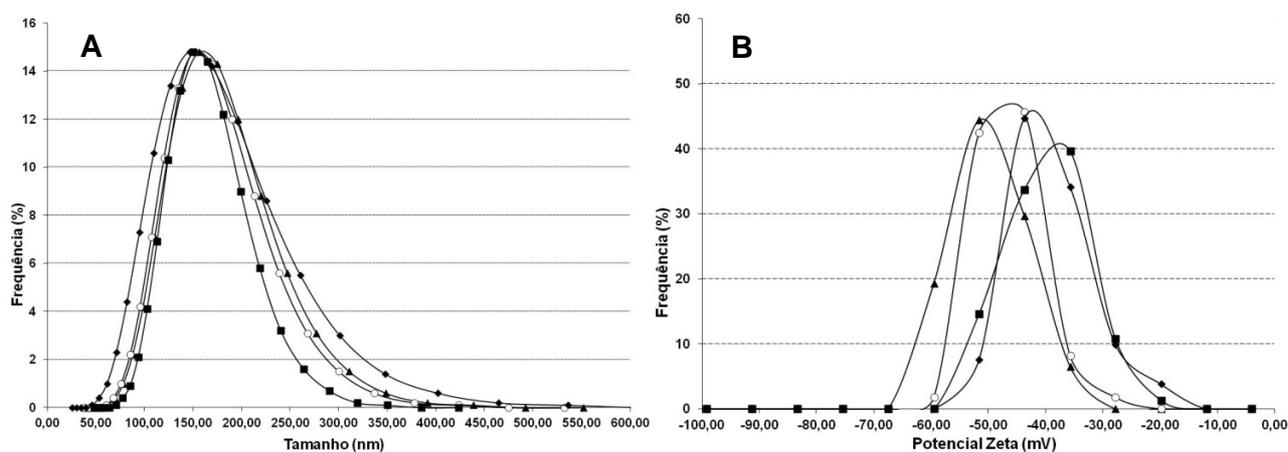


Figura 36 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 4% (p/v) de tensoativo.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas – ET405B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA – ET405A1 e A2)

Konan e colaboradores identificaram em seus estudos que, com o aumento da concentração de tensoativo na formulação, o diâmetro médio das partículas reduziu de 275 para 148 nm (KONAN *et al.*, 2002).

Utilizando a técnica de emulsão múltipla seguida de evaporação do solvente e agitação mecânica na segunda emulsão, Feczko e colaboradores julgaram surpreendente o efeito da concentração de Poloxamer na formulação. Eles demonstraram que quando a concentração de tensoativo estava a 0,5% (p/v), o diâmetro médio das nanopartículas era de 22,20 μm e aumentando a concentração para 1,0% (p/v), o diâmetro médio reduziu para 0,52 μm . Porém, quando a concentração de Poloxamer foi 5 % (p/v), o diâmetro médio das nanopartículas aumentou significativamente para 15,80 μm . Eles sugerem que esse efeito pode ser resultante da agregação das nanopartículas por interações com o emulsificante (FECZKÓ, *et al.*, 2008).

Avaliando a figura 37 e tabela 16, percebe-se que o fenômeno descrito pelos pesquisadores citados também foi verificado neste trabalho. Ao aumentar a concentração de tensoativo na fase aquosa, há uma diminuição do tamanho médio das nanopartículas. Houve uma redução do tamanho médio das nanopartículas brancas e contendo BSA, respectivamente, de 11,45 % e 14,65 % entre os grupos da ET401 e a ET402, de 9,14 % e 5,24 % entre os grupos da ET402 e a ET403, de 11,90 % e 10,00 % entre os ET403 e ET404 e não houve variação perceptível entre os grupos ET404 e ET405. A análise dos dados medidos demonstra que a diminuição de tamanho médio das nanopartículas ocorre com o aumento da concentração de Poloxamer, porém até um limite de 3 % (p/v), após esse valor, o diâmetro das partículas permanece sem modificações expressivas, isso pode ser verificado, avaliando os resultados da ET404 e ET405.

Tabela 16 – Valores médios de tamanho das nanopartículas.

		ET401	ET402	ET403	ET404	ET405
Tamanho (nm)	B1	215,00	188,50	173,60	162,86	160,90
	B2	213,70	191,10	171,30	141,00	155,80
	Media	214,35	189,80	172,45	151,93	158,35
	Desvio	0,92	1,84	1,63	15,45	3,61
	A1	207,50	178,00	169,70	158,32	151,10
	A2	212,80	180,70	170,20	147,61	154,70
	Media	210,15	179,35	169,95	152,96	152,90
	Desvio	3,75	1,91	0,35	7,57	2,55

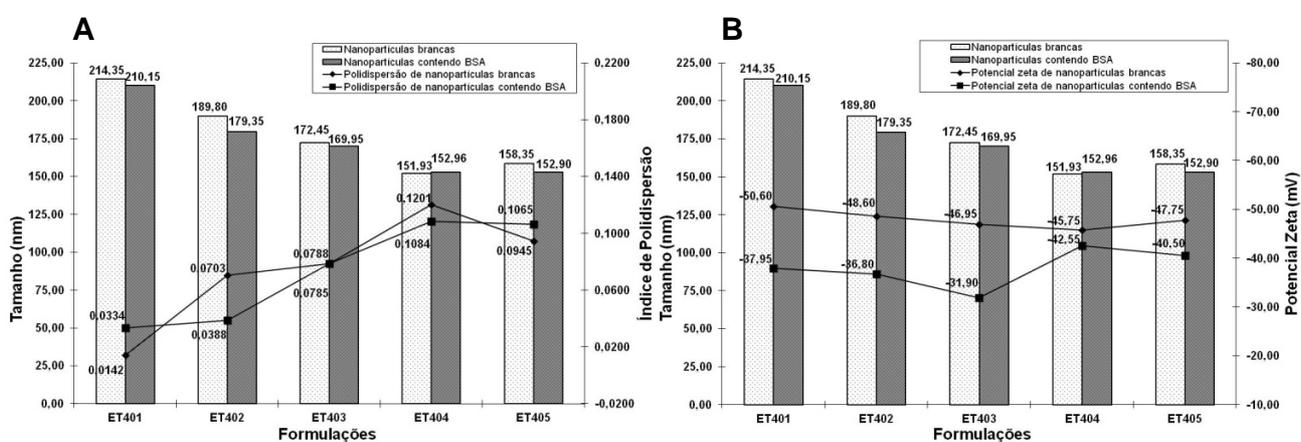


Figura 37 – Influência das diferentes concentrações de tensoativo no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com o índice de polidispersão e carga superficial.

Legenda: A- Gráfico comparativo entre tamanho médio versus índice de polidispersão e B- Gráfico comparativo entre tamanho médio versus carga superficial.

Em contrapartida, não houve semelhança do efeito percebido para tamanho médio nos resultados de índice de polidispersão. Ao contrário do que se observou com o diâmetro, diminuição com o aumento da concentração de Poloxamer, a polidispersão aumentou com a elevação da quantidade de Poloxamer na formulação. Os dados medidos estão apresentados na tabela 17. As formulações ET401, ET402 e ET403 exibiram índices excelentes de homogeneidade do tamanho, ou seja, a dispersão em torno da média teve baixa amplitude de variação.

Tabela 17 – Valores médios de índice de polidispersão das nanopartículas.

		ET401	ET402	ET403	ET404	ET405
Índice de Polidispersão	B1	0,0153	0,0778	0,0619	0,1152	0,0948
	B2	0,0131	0,0628	0,0957	0,1249	0,0942
	Media	0,0142	0,0703	0,0788	0,1201	0,0945
	Desvio	0,0016	0,0106	0,0239	0,0069	0,0004
	A1	0,0365	0,0227	0,0779	0,1041	0,1490
	A2	0,0302	0,0549	0,0790	0,1127	0,0639
	Media	0,0334	0,0388	0,0785	0,1084	0,1065
	Desvio	0,0045	0,0228	0,0008	0,0061	0,0602

As preparações ET404 e ET405 tiveram resultados menos expressivos que as outras, porém compatíveis com resultados apresentados como satisfatórios na literatura. (TRIERWEILER, 2009; TEIXEIRA, *et. al.*, 2005; HOLZER, *et. al.*, 2009; JIN, *et. al.*, 2009; BILATI, *et. al.*, 2005; SILVA, *et. al.*, 2010; COURANT, *et. al.*, 2009). Os gráficos da figura 39 expõem um aumento linear no índice de polidispersão em relação ao aumento da concentração de Poloxamer, exceto para as suspensões ET405 que permaneceu sem modificações pronunciadas quando comparadas as preparações ET404.

Todos os grupos exibiram potencial zeta médio, conforme verificado na tabela 18 e na figura 37, mais negativos que -30 mV, o que indica carga suficientemente alta para ocorrer repulsão entre partículas e possivelmente aumentar a estabilidade da preparação. Além disso, não houve diferenças significativas entre as cargas superficiais dos grupos de nanopartículas brancas, observação essa que é válida também para os grupos de nanopartículas contendo BSA (MALVERN, 2011).

Tabela 18 – Valores médios de potencial zeta das formulações de nanopartículas.

		ET401	ET402	ET403	ET404	ET405
Potencial Zeta (mV)	B1	-46,70	-47,40	-46,40	-47,40	-49,20
	B2	-54,50	-49,80	-47,50	-44,10	-46,30
	Media	-50,60	-48,60	-46,95	-45,75	-47,75
	Desvio	5,52	1,70	0,78	2,33	2,05
	A1	-36,40	-38,90	-27,70	-46,70	-40,00
	A2	-39,50	-34,70	-36,10	-38,40	-41,00
	Media	-37,95	-36,80	-31,90	-42,55	-40,50
	Desvio	2,19	2,97	5,94	5,87	0,71

Os resultados descritos por Feczko demonstraram que quando ocorreu aumento da concentração de Poloxamer, houve elevação da eficiência de encapsulamento. Conforme esse pesquisador, a concentração de poloxamer necessária para formar nanopartículas com eficiência no encapsulamento maior que 90%, foi de aproximadamente 5% (p/v) de tensoativo (FECZKÓ, *et. al.*, 2008).

No presente trabalho, não foi encontrada taxa de encapsulamento tão alta quanto às relatadas por Feczko e a tendência referenciada para aumento na taxa de encapsulamento com o aumento da concentração de tensoativo também não foi percebida na intensidade demonstrada pelo autor. Houve aumento representativo na eficiência de encapsulamento entre as ET402, ET403 e ET404, porém não houve aumento na taxa para a ET405, que manteve nível levemente menor que a ET404 ($p < 0,05$), (figura 38), (FECZKÓ, *et. al.*, 2008).

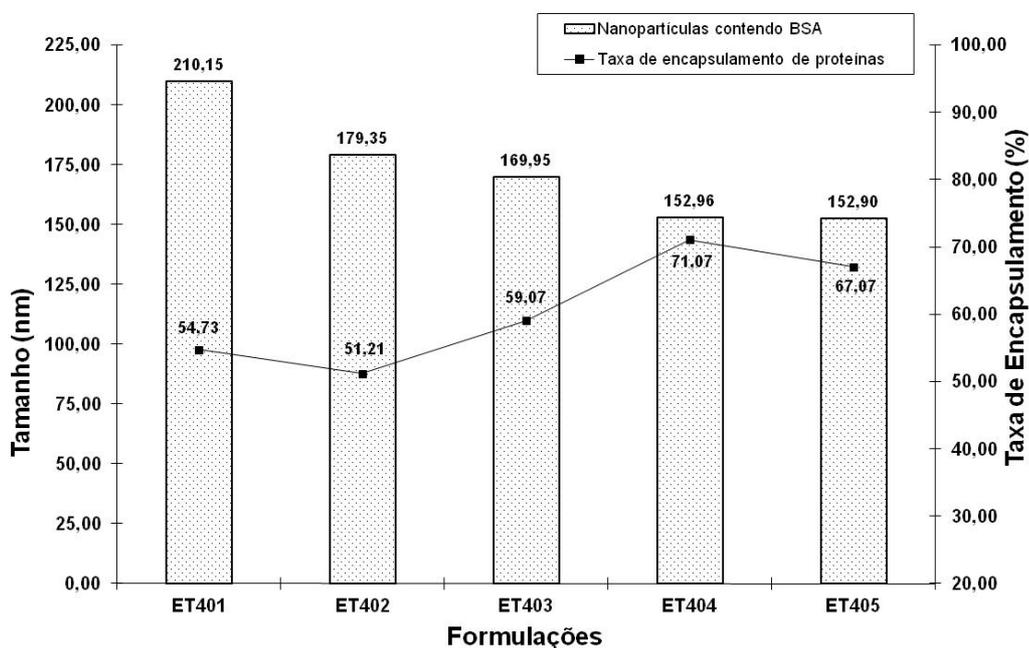


Figura 38 – Influência das diferentes concentrações de tensoativo no diâmetro médio das nanopartículas em comparação com a eficiência de encapsulamento.

Diante dos resultados obtidos, sugere-se que a concentração de Poloxamer mais adequada para obtenção de nanopartículas seja a de 3% (p/v).

4.6. Efeito da variação da concentração de crioprotetor

Estudos relatam que a adição de excipientes, tais como Trealose, na formulação mitiga a agregação das nanopartículas durante o processo de congelamento e liofilização da suspensão (KONAN, *et. al.*, 2002; ABDELWAHED, *et. al.*, 2006).

Inicialmente, para comprovar essa influência e selecionar a melhor razão em massa de Trealose:PLGA na formulação, as concentrações de PLGA, de BSA, o volume da fase aquosa interna, fase orgânica e da fase aquosa externa, além do tempo de agitação por sonda de ultrassom, foram fixados para isolar a interferência causada pela Trealose.

O efeito da Trealose foi analisado, observando os parâmetros de tamanho médio das nanopartículas, distribuição de tamanho, conservação do diâmetro médio das nanopartículas após reconstituição da amostra liofilizada com água purificada e a eficiência de encapsulamento. Na tabela 19 estão identificadas as razões em massa de Trealose:PLGA utilizadas para a preparação das suspensões e os códigos atribuídos a rotulagem das amostras.

Tabela 19- Preparações obtidas por meio da variação na razão em massa de Trealose:PLGA adicionadas a fase aquosa externa da suspensão.

Razão em massa de Trealose:PLGA	Código das preparações encapsuladas com BSA
0,00:1,00	ET5-00-AS1; ET5-00-AS2
0,20:1,00	ET5-01-A1; ET5-01-A2
0,35:1,00	ET5-02-A1; ET5-02-A2
0,50:1,00	ET5-03-A1; ET5-03-A2
1,00:1,00	ET5-04-A1; ET5-04-A2
2,00:1,00	ET5-05-A1; ET5-05-A2

Os resultados de distribuição de tamanho das nanopartículas, antes do congelamento/liofilização e após reconstituição do pó liofilizado, nas formulações contendo proteínas foram compilados em gráficos e estão expostos nas figuras de 39 a 44. As análises de tamanho de partículas desta etapa do estudo foram medidas pelo método de espalhamento dinâmico de luz, empregando o equipamento Mastersize 2000[®] e as análises de potencial zeta foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer HSA 3000[®].

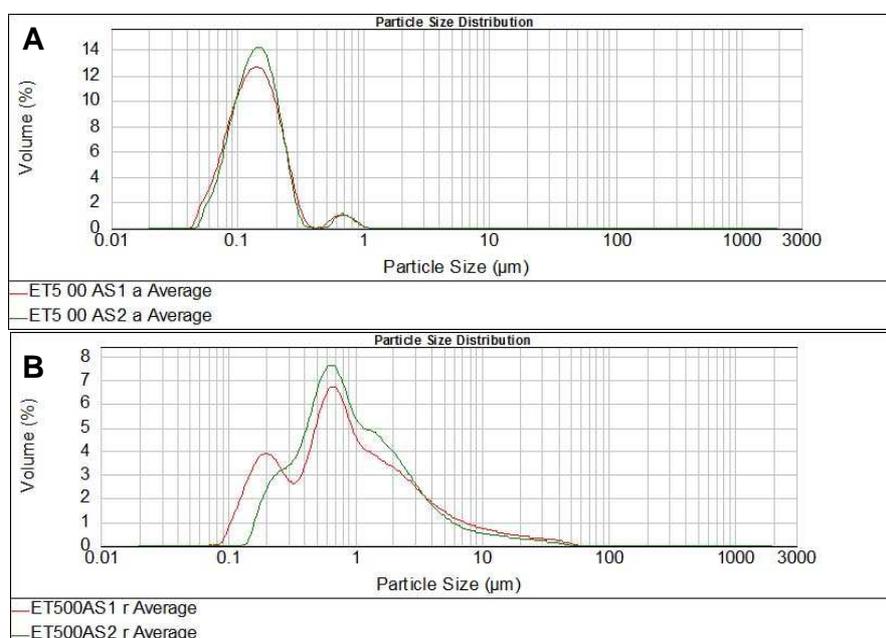


Figura 39 – Perfis de distribuição de tamanho para formulações contendo 0,00:1,00 razão em massa de Trealose:PLGA.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho antes do congelamento e liofilização e B- Perfil de distribuição de tamanho após reconstituição das nanopartículas liofilizadas.

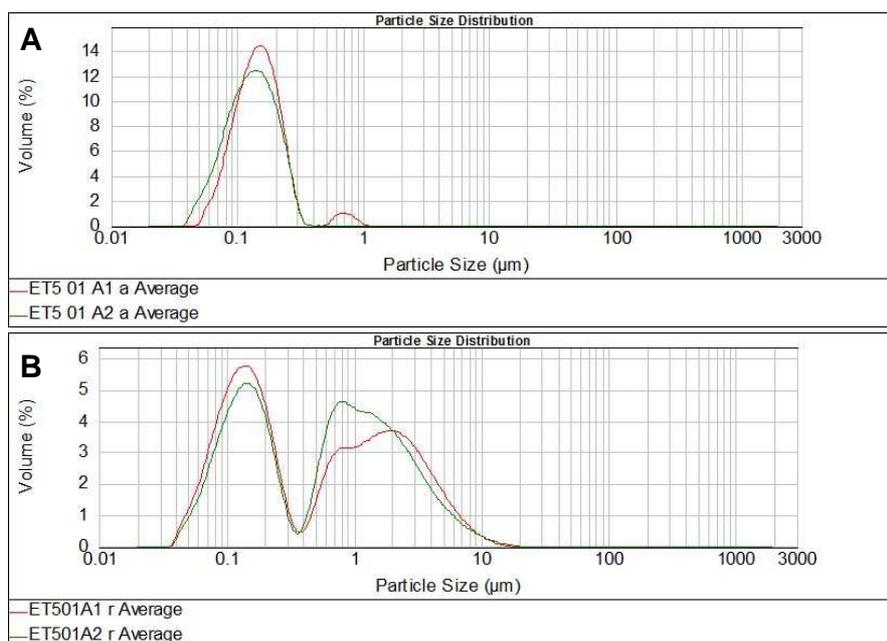


Figura 40 – Perfis de distribuição de tamanho para formulações contendo 0,20:1,00 razão em massa de Trealose:PLGA.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho antes do congelamento e liofilização e B- Perfil de distribuição de tamanho após reconstituição das nanopartículas liofilizadas.

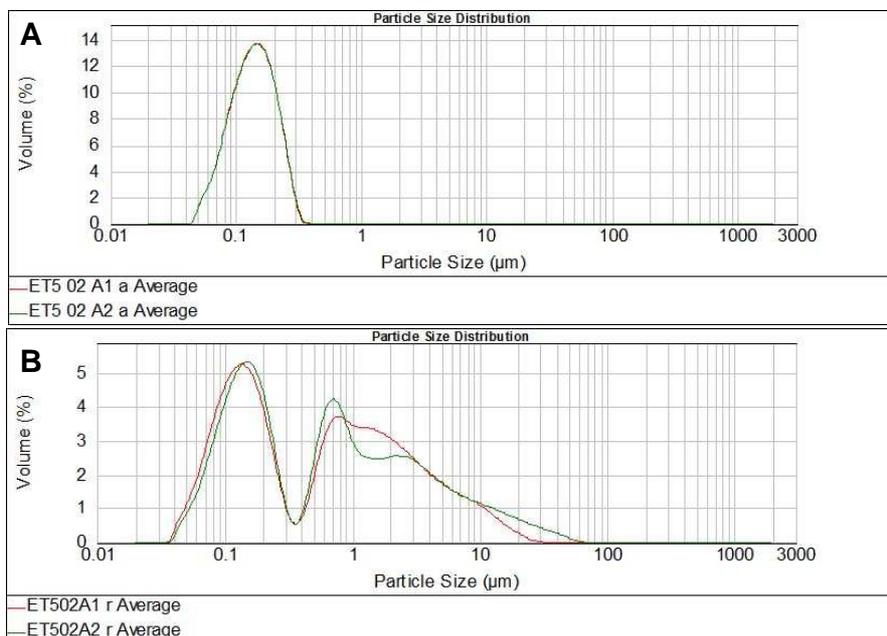


Figura 41 – Perfis de distribuição de tamanho para formulações contendo 0,35:1,00 razão em massa de Trealose:PLGA.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho antes do congelamento e liofilização e B- Perfil de distribuição de tamanho após reconstituição das nanopartículas liofilizadas.

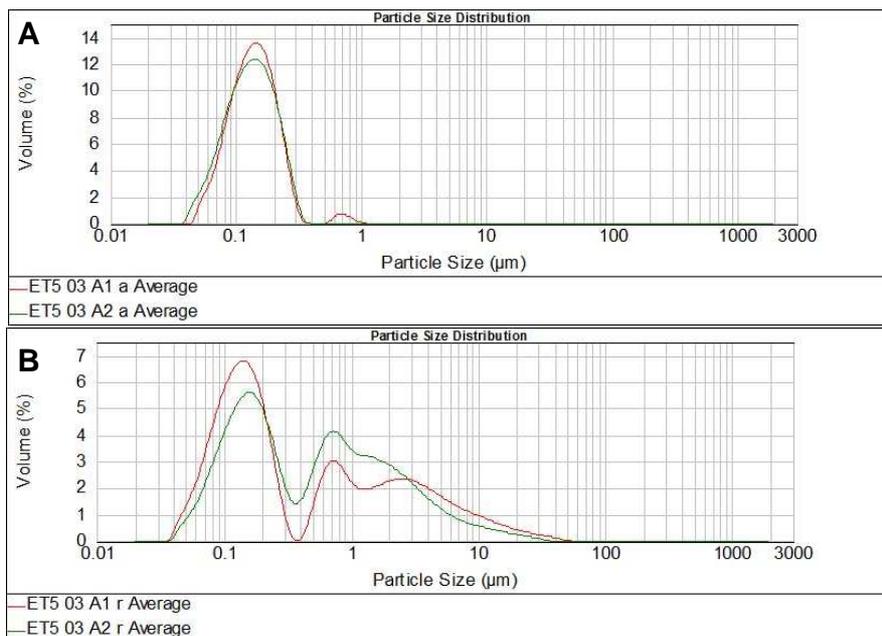


Figura 42 – Perfis de distribuição de tamanho para formulações contendo 0,50:1,00 razão em massa de Trealose:PLGA.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho antes do congelamento e liofilização e B- Perfil de distribuição de tamanho após reconstituição das nanopartículas liofilizadas.

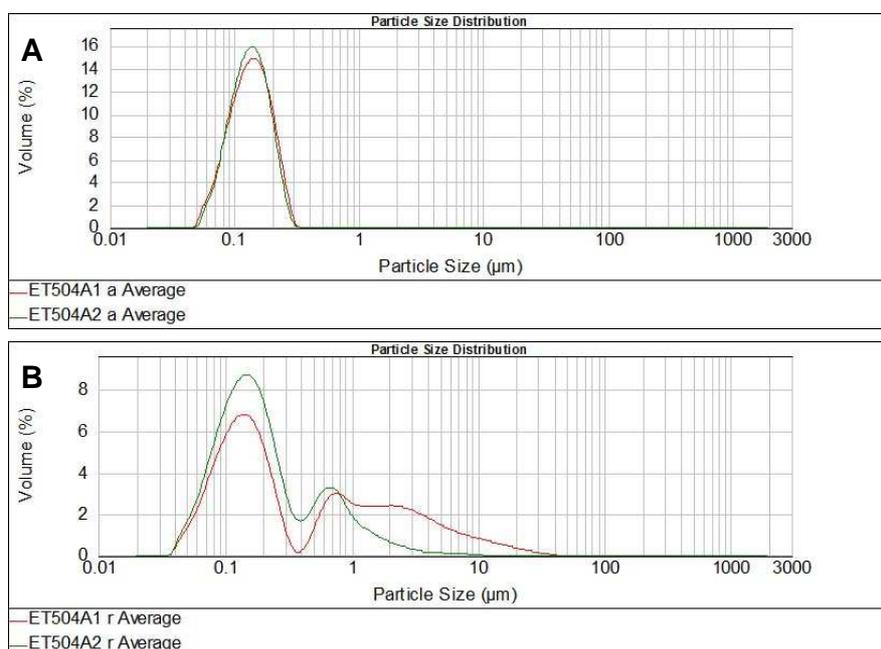


Figura 43 – Perfis de distribuição de tamanho para formulações contendo 1,00:1,00 razão em massa de Trealose:PLGA.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho antes do congelamento e liofilização e B- Perfil de distribuição de tamanho após reconstituição das nanopartículas liofilizadas.

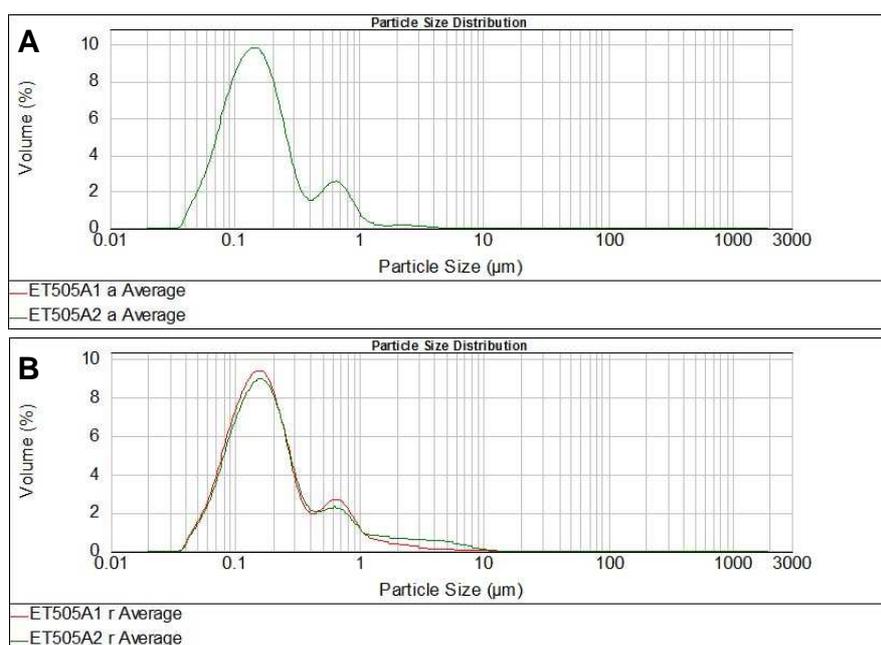


Figura 44 – Perfis de distribuição de tamanho para formulações contendo 2,00:1,00 razão em massa de Trealose:PLGA.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho antes do congelamento e liofilização e **B-** Perfil de distribuição de tamanho após reconstituição das nanopartículas liofilizadas.

A manutenção do diâmetro das nanopartículas após liofilização e reconstituição do pó com água purificada é considerada indicativo de sucesso no processo de produção e liofilização da suspensão. Em geral, a razão de tamanho de nanopartículas antes do congelamento/liofilização e após reconstituição do pó deve ser calculada para analisar a eficiência da crioproteção proporcionada pela Trealose. (ABDELWAHED, et. al., 2006). Essa razão, índice de ressuspensão, está apresentada na tabela 20 e a forma de cálculo demonstrada na equação 1:

(1)

Tabela 20 - Valores médios de tamanho de nanopartículas e índice de ressuspensão.

		ET500S	ET501	ET502	ET503	ET504	ET505
Tamanho médio (nm)	Nanopartículas a1	124,00	134,00	123,00	124,00	124,00	131,00
	Nanopartículas a2	130,00	113,00	123,00	114,00	124,00	131,00
	Media	127,00	123,50	123,00	119,00	124,00	131,00
	Desvio	4,24	14,85	0,00	7,07	0,00	0,00
	Nanopartículas r1	486,00	211,00	224,00	189,00	187,00	144,00
	Nanopartículas r2	648,00	239,00	245,00	235,00	147,00	152,00
	Media	567,00	225,00	234,50	212,00	167,00	148,00
	Desvio	114,55	19,80	14,85	32,53	28,28	5,66
	Índice de ressuspensão	0,22	0,55	0,52	0,56	0,74	0,89

* a1 e a2 representam as formulações preparadas antes do congelamento e liofilização; r1 e r2 representam as formulações após reconstituição do pó liofilizado.

Quanto mais próximo de 1 o índice de ressuspensão estiver, maior é a manutenção do diâmetro das nanopartículas, pois indica menor variação entre o tamanho médio das nanopartículas antes e depois da liofilização. Quanto menor o valor do índice e mais próximo a zero, maior variação entre os tamanhos médios, inferindo que houve formação de agregados de nanopartículas.

Pode-se verificar na tabela 20 que não houve variação significativa dos valores de tamanho médio de nanopartículas entre os grupos avaliados antes da etapa de congelamento/liofilização. Essa afirmação pode ser confirmada pela observação dos gráficos de distribuição exibidos nas figuras de 39 a 44.

Após liofilização e reconstituição do pó com água purificada, observou-se considerável aumento do diâmetro médio das nanopartículas para todos os grupos, ET500S, ET501, ET502, ET03, ET504 e ET505, comparando os valores de antes e depois da liofilização. O aumento calculado foi de 346,45%, 82,20%, 90,65%, 78,15%, 34,68% e 12,98%, respectivamente. Porém, observa-se também, que quando se aumentou a proporção de Trealose na formulação, o aumento do tamanho médio das nanopartículas não foi tão intenso. Ao examinar os índices de ressuspensão apresentados na tabela 20, verifica-se que houve grande formação de agregados de nanopartículas para a formulação que não possuía Trealose, com índice igual a 0,22. Essa capacidade de formar agregados após liofilização foi reduzida com a adição de Trealose, porém não proporcionou diferença considerável na redução do efeito de formação de grumos, quando a razão em massa aumentou de 0,20:1,00 para

0,50:1,00. Para razão maior que 0,50:1,00, observou-se grande capacidade em prevenir formação de agregados com índices de ressuspensão maiores que 0,70, o que demonstra alta taxa de preservação dos diâmetros das nanopartículas.

Konan e colaboradores, em seus estudos, constataram que quando a razão em massa é menor que 0,50:1,00 há intenso aumento no tamanho da partícula após redispersão. Contudo, a cada acréscimo de crioprotetor, até a razão referenciada, há redução de 1,5 vezes o tamanho da partícula quando comparada com a formulação sem crioprotetor (KONAN, *et. al.*, 2002). Essa intensidade de redução, como já exposto, não foi observada, no presente estudo, entre as razões em massa de 0,20:1,00 para 0,50:1,00.

Concomitantemente a avaliação da preservação do diâmetro médio das partículas é interessante analisar os resultados obtidos para potencial zeta, apresentados na tabela 21, pois a medida de potencial zeta é essencial para detectar uma possível modificação da carga antes e após a liofilização. Assim, pode-se usar essa operação para avaliar possíveis interações entre o crioprotetor e a superfície das nanopartículas.

Tabela 21 - Valores médios de potencial zeta das nanopartículas antes da etapa de congelamento/liofilização.

		ET500S	ET501	ET502	ET503	ET504	ET505
Potencial Zeta médio (mV)	Nanopartículas a1	-31,60	-27,30	-28,40	-24,60	-27,50	-30,30
	Nanopartículas a2	-31,10	-24,70	-22,90	-27,20	-28,90	-27,60
	Media	-31,35	-26,00	-25,65	-25,90	-28,20	-28,95
	Desvio	0,35	1,84	3,89	1,84	0,99	1,91

* a1 e a2 representam as formulações preparadas antes do congelamento e liofilização

Chasteiner e colaboradores verificaram em seus estudos que a adição de sacarose em nanopartículas de Poli (ϵ -caprolactona) diminui a carga superficial de -40,9 mV para - 20,4 mV. De acordo com esse pesquisador, as nanopartículas foram “mascaradas” superficialmente pelos açúcares como resultado da ligação de hidrogênio entre grupos do crioprotetor e do polímero (CHASTEIGNER, *et. al.*, 1996).

Não foi observada modificação acentuada na carga superficial das nanopartículas de PLGA contendo BSA, comparando a ET500S que não possui crioprotetor, com a ET505 que possui maior proporção de crioprotetor. Apesar da diferença nos métodos utilizados, polímero, tensoativo, substância encapsulada e crioprotetor que pode, por si só, explicar essa não modificação, comparando o presente trabalho com o desenvolvido por Chasteigner, infere-se que as ligações de hidrogênio foram estabelecidas nas formulações contendo Trealose, já que houve efeito na preservação do tamanho das nanopartículas, porém essas interações não foram suficientes para causar alteração na carga superficial das nanopartículas. (CHASTEIGNER, *et. al.*, 1996). Abdelwahed e colaboradores ressaltaram duas hipóteses sob o efeito de proteção. Um dos mecanismos de estabilização por crioprotetores, durante a etapa de congelamento, é a hipótese de isolamento da partícula. Os açúcares são capazes de isolar individualmente cada partícula em uma fração não congelada, prevenindo a agregação durante o congelamento. Neste caso, o efeito é uma separação física das partículas pela fração não congelada suficiente para mitigar a agregação. Outro mecanismo de estabilização é apoiado pela hipótese de realocação da água durante a etapa de liofilização. Isso supõe a formação de ligações de hidrogênio entre o crioprotetor e o da superfície da nanopartícula. Assim, essas substâncias preservam as estruturas das nanopartículas, servindo como moléculas substitutas da água (ABDELWAHED, *et. al.*, 2006). Comparando os resultados de potencial zeta expostos na tabela 21, antes do congelamento/liofilização, com os da tabela 22, após reconstituição do pó liofilizado, pode-se afirmar que não houve rearranjo das estruturas das nanopartículas com alteração ou modificação significativa da carga superficial, considerando os valores medidos para os grupos ET504 e ET505.

Tabela 22 - Valores médios de potencial zeta das nanopartículas após reconstituição.

		ET504	ET505
Potencial Zeta médio (mV)	Nanopartículas r1	-35,40	-28,50
	Nanopartículas r2	-31,80	-25,40
	Media	-33,60	-26,95
	Desvio	2,55	2,19

* r1 e r2 representam as suspensões após reconstituição.

Percebe-se, pela verificação da figura 45, que a interferência da razão em massa de Trealose:PLGA sob a eficiência de encapsulamento não é muito acentuada, mesmo porque a Trealose foi adicionada na fase externa da preparação, o que determina pouca influência sob esse parâmetro, já que a segunda emulsão tem como finalidade maior, a difusão do solvente com conseqüente precipitação das estruturas já definidas. Mesmo com baixa interferência, observa-se que a eficiência de encapsulamento de alguns grupos foram maiores que outros ($p < 0,05$), porém o grupo selecionado como o mais estável frente a todo o exposto foi o grupo ET505, pois possuem resultados mais adequados à eficiência de crioproteção das estruturas nanoparticuladas.

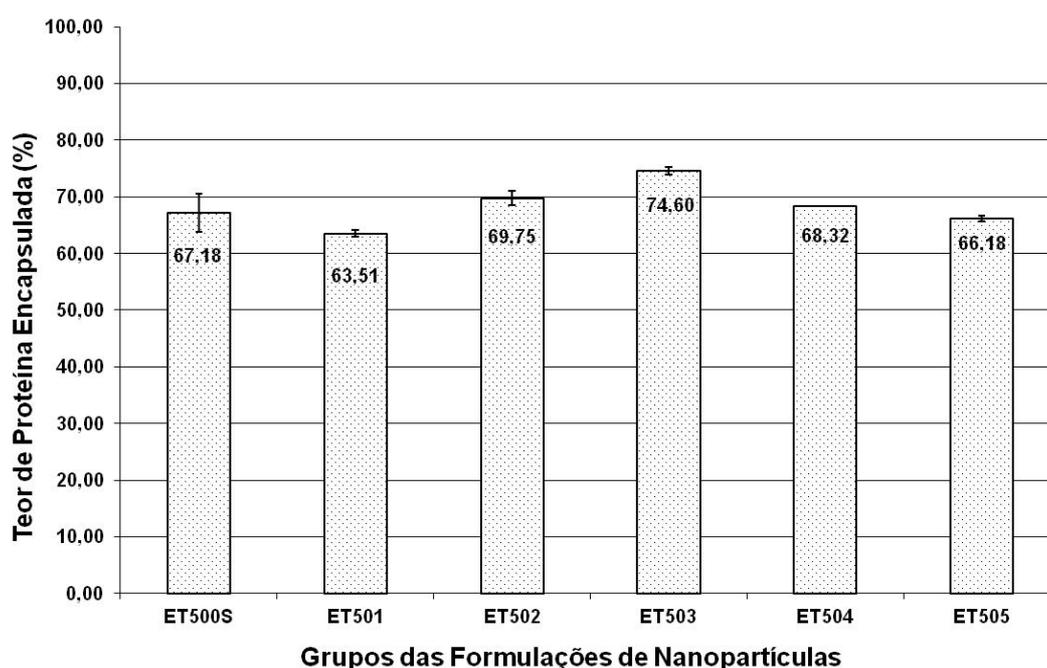


Figura 45 – Teor de proteína encapsulada para os grupos de preparações contendo diferentes razões em massa de Trealose:PLGA.

4.7. Efeito da variação da concentração de proteína

Para verificar o efeito da variação na concentração de proteína sob o tamanho das nanopartículas, carga superficial, índice de polidispersão e taxa de encapsulamento, as concentrações de PLGA, poloxamer, trealose, o volume da fase aquosa interna, fase orgânica e da fase aquosa externa, além do tempo de agitação por sonda de ultrassom foram fixados.

Nesta seção estão demonstrados os resultados e discussões, avaliando essa influência. Na tabela 23, estão identificadas as concentrações de proteínas que foram utilizadas para a preparação das suspensões e os códigos utilizados para identificação das amostras obtidas.

Tabela 23 - Preparações obtidas por meio da variação na concentração de proteína.

Concentração de BSA % (p/p)*	Código dos grupos de formulações
Branca	ET600 B1 e B2
2,50 %	ET601 A1 e A2
5,00 %	ET602 A1 e A2
7,50 %	ET603 A1 e A2
10,00 %	ET604 A1 e A2
15,00 %	ET605 A1 e A2

*em relação à quantidade de PLGA adicionada.

Os resultados de distribuição de tamanho e carga superficial das formulações brancas plotadas em gráficos, concomitantemente com as contendo BSA, estão expostos nas figuras de 46 a 50.

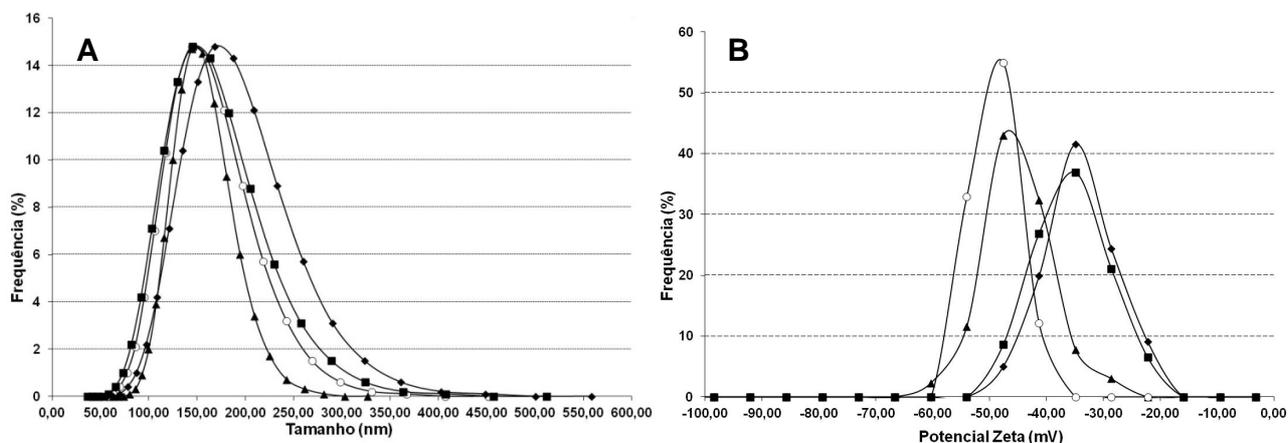


Figura 46 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 2,50 % (p/p) de BSA.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas - ET600B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA - ET601A1 e A2)

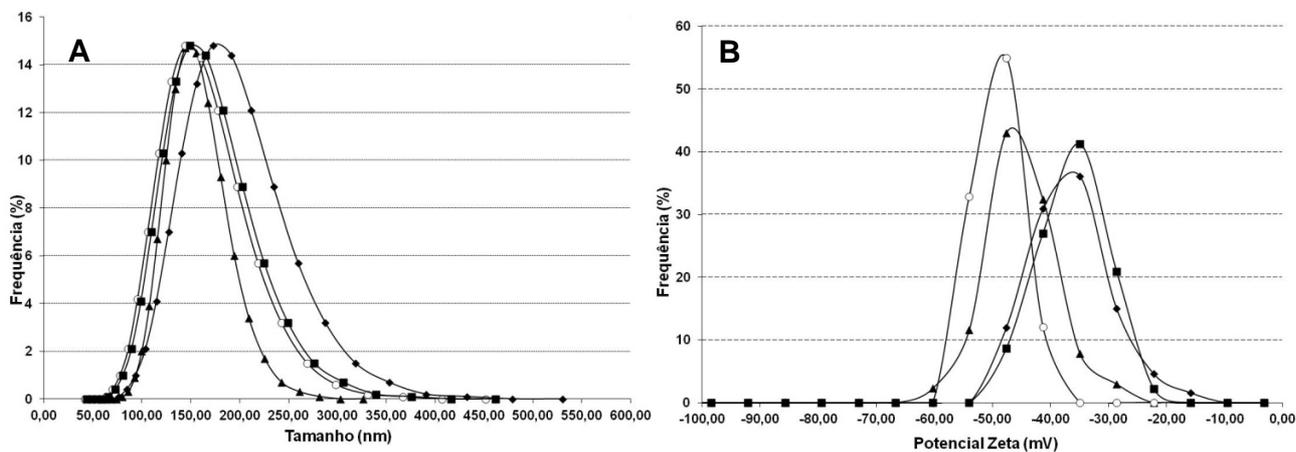


Figura 47 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 5,00 % (p/p) de BSA.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas - ET600B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA - ET602A1 e A2)

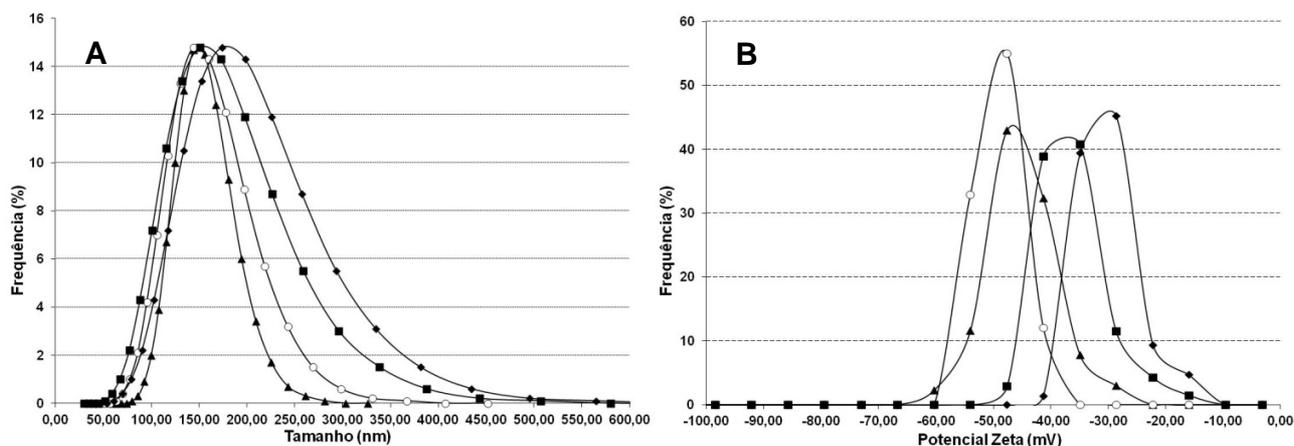


Figura 48 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 7,50 % (p/p) de BSA.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas - ET600B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA - ET603A1 e A2)

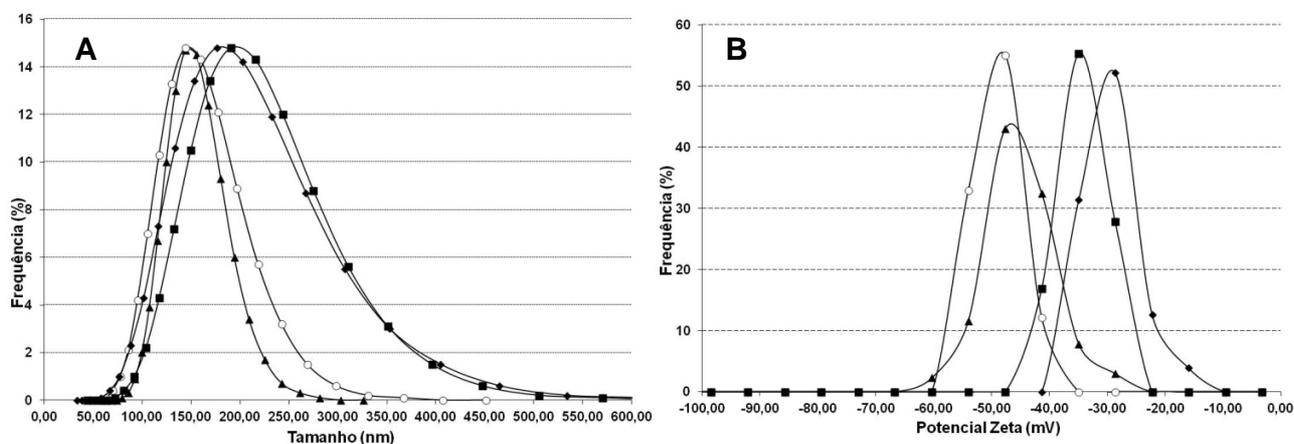


Figura 49 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 10,00 % (p/p) de BSA.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas - ET600B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA - ET604A1 e A2)

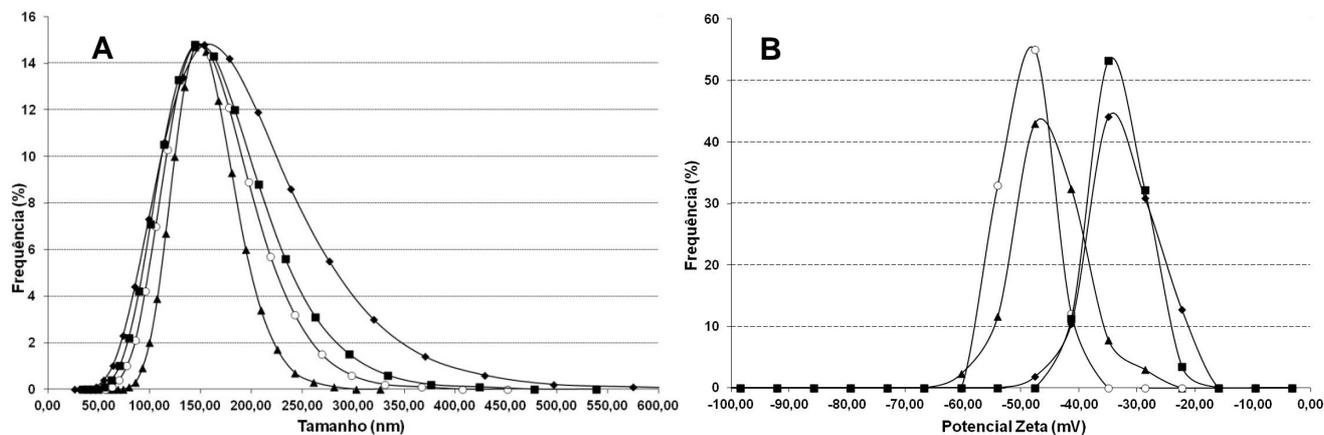


Figura 50 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 15,00 % (p/p) de BSA.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas - ET600B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com BSA - ET605A1 e A2)

Observando a tabela 24, pode-se constatar que o grupo ET604 apresentou maior variação de tamanho médio quando comparado às outras formulações contendo BSA. Não se deve inferir que o maior tamanho das nanopartículas neste grupo seja resultado do aumento da concentração de BSA, pois se verifica que o grupo ET605 possui maior concentração de BSA e apresentou uma diminuição no tamanho médio. Nas demais preparações, não houve variação significativa. Diante do exposto, sugere-se que essa alteração de tamanho entre os grupos de diferentes concentrações de BSA não se deve ao aumento da concentração de proteínas e sim a uma possível variação durante a agitação do processo de obtenção do produto.

Tabela 24 – Valores médios de tamanho de nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações de nanopartículas.

		ET600	ET601	ET602	ET603	ET604	ET605
Tamanho (nm)	1	148,90	173,20	178,10	179,30	181,80	158,60
	2	148,90	150,00	153,70	155,60	196,90	148,90
	Media	148,90	161,60	165,90	167,45	189,35	153,75
	Desvio padrão	0,00	16,40	17,25	16,76	10,68	6,86
Índice de Polidispersão	1	0,0395	0,0857	0,0748	0,1230	0,1380	0,1540
	2	0,0772	0,0941	0,0758	0,1300	0,1060	0,1030
	Media	0,0584	0,0899	0,0753	0,1265	0,1220	0,1285
	Desvio padrão	0,0267	0,0059	0,0007	0,0049	0,0226	0,0361
Potencial Zeta (mV)	1	-43,4	-33,90	-37,30	-28,90	-30,00	-33,40
	2	-46,7	-35,90	-40,10	-37,10	-33,30	-33,10
	Media	-45,05	-34,90	-38,70	-33,00	-31,65	-33,25
	Desvio padrão	2,33	1,41	1,98	5,80	2,33	0,21

Ao verificar os gráficos das figuras de 46 a 50, onde se observa os perfis de distribuição de tamanho das nanopartículas contendo BSA comparadas às brancas, pode-se indicar que o grupo ET602 possui melhor distribuição do que os outros grupos. Isso é confirmado pelos dados de índice de polidispersão, ou seja, variância relativa que leva em consideração a dispersão em relação à média, indicando qual é a melhor distribuição dos resultados obtidos (tabela 24). Quanto menores são os resultados do índice de polidispersão, menor é a dispersão em torno da média e maior robustez do processo em se obter nanopartículas. Os resultados de todos os grupos de concentrações distintas estão compatíveis com índices encontrados na literatura e abaixo do índice de 0,3, relatado por Trierweiler, indicando homogeneidade na distribuição de tamanho de todos os grupos produzidos. (TRIERWEILER, 2009; TEIXEIRA, *et. al.*, 2005; HOLZER, *et. al.*, 2009; JIN, *et. al.*, 2009; BILATI, *et. al.*, 2005; SILVA, *et. al.*, 2010; COURANT, *et. al.*, 2009)

O resultado da distribuição e da média de potencial zeta do grupo ET602, apresentado nas figuras de 46 a 50 e tabela 12, também apresentam destaque, pois demonstram possuir homogeneidade na dispersão e a mais alta carga média entre os grupos elaborados. Sabe-se que quanto maior a carga superficial, maior é o indicativo de estabilidade da dispersão, porém, pode-se afirmar que a influência da concentração de proteína sobre os resultados médios de potencial zeta, não são tão significativos,

ponderando que todos os valores médios estão acima da carga considerada como elevado valor para potencial zeta e que indicam estabilidade para o sistema disperso (MALVERN, 2011).

Para finalizar as avaliações da influência da concentração de BSA, deve-se levar em discussão os resultados obtidos do teor de encapsulamento das dispersões, exemplificados no gráfico da figura 51.

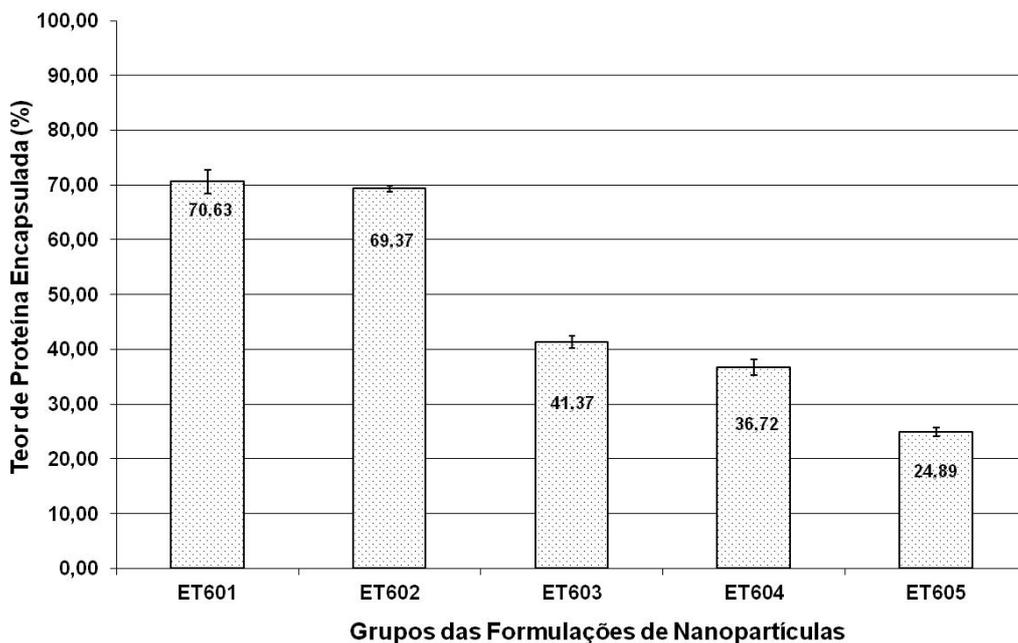


Figura 51 – Teor de proteína encapsulada para os grupos de preparações contendo diferentes concentrações de BSA.

Segundo Feczko e colaboradores, a quantidade e distribuição das proteínas associadas com as nanopartículas de PLGA preparadas mostraram dependência quanto à concentração de proteínas e polímero. O pesquisador sugere que a razão entre BSA e PLGA é um parâmetro mais importante do que a concentração de proteína na fase aquosa interna. Eles demonstraram que quando o BSA não está em uma concentração maior que 7,5 % (p/p) da quantidade inicial de PLGA, há uma eficiência de encapsulamento de 90 %, utilizando o PLX como tensoativo. Caso a concentração esteja igual ou maior que 10 % (p/p), há um decréscimo de 20 % na eficiência de

encapsulamento, comparado com os resultados da concentração de 7,5 % (p/p). (FECZKÓ, *et. al.*, 2008)

No presente estudo, foram formuladas nanopartículas com diferentes concentrações de BSA em relação à quantidade de PLGA na formulação, para investigar a sua influência no encapsulamento de proteínas. Os resultados expressos por Feczko e colaboradores não foram confirmados, pois se verificou a diminuição da eficiência de encapsulamento quando a concentração de BSA aumentou de 5% (p/p). A eficiência de encapsulamento também não atingiu 90 %, porém demonstrou razoável eficiência no processo para concentrações abaixo de 5 % (p/p). Comparando os dados apresentados na figura 51 com os dados expressos na tabela 25, infere-se que a explicação para as afirmações de Lamprecht e colaboradores que a eficiência no encapsulamento aumenta quando a concentração de BSA na fase aquosa interna diminui e que as constatações de Feczko e colaboradores de que quando a razão de BSA/PLGA não é maior que 0,1, os resultados de encapsulamento são maiores, é que ocorre uma saturação da capacidade de encapsulamento e quanto menor a concentração de BSA, tanto na fase aquosa interna quanto em comparação à massa de PLGA adicionada, em relação a esta capacidade, maior é a eficiência de encapsulamento (LAMPRECHT *et. al.*, 1999; FECZKÓ *et. al.*, 2008).

Neste estudo, foi verificado que a capacidade média de saturação da formulação foi de 6,29 mg de BSA e quando era adicionado quantidades superiores a este valor, as proteínas não eram encapsuladas, diminuindo o percentual de eficiência da preparação. Analisando a tabela 25, foi verificado que a melhor concentração para produção de nanopartículas com máxima eficiência de encapsulamento, considerando a massa de BSA incorporada, foi de 5 % (p/p), ou seja, o grupo ET602 ($p < 0,05$).

Tabela 25 – Quantitativo em gramas de BSA encapsulado por cada grupo de nanopartículas preparadas.

		ET601	ET602	ET603	ET604	ET605
Massa encapsulada (mg)	1	3,11	6,28	5,48	6,79	6,87
	2	3,25	6,21	5,69	6,43	6,57
	Media	3,18	6,24	5,58	6,61	6,72
	Desvio padrão	0,10	0,05	0,16	0,26	0,21

4.8. Efeito da variação da massa molar das proteínas encapsuladas

Para verificar o efeito da variação da massa molar de proteínas sob o tamanho das nanopartículas, carga superficial, índice de polidispersão e taxa de encapsulamento, foi preparada uma suspensão de nanopartículas contendo Citocromo C. Na tabela 26, a preparações estão identificadas e codificadas.

Tabela 26 - Preparações obtidas por meio da variação na concentração de proteína.

Concentração de proteína % (p/p)*	Código dos grupos de formulações
Branca	ET600 B1 e B2 ^{*2}
Citocromo C a 5,00 %	ET701 A1 e A2

*em relação à quantidade de PLGA adicionada. ^{*2} Mesma formulação de nanopartículas brancas que o grupo ET600 B1 e B2, utilizou-se os mesmos resultados para avaliação desta etapa.

Os resultados de distribuição de tamanho e carga superficial das formulações brancas plotadas em gráficos, concomitantemente com as contendo Citocromo C, estão demonstrados na figura 52.

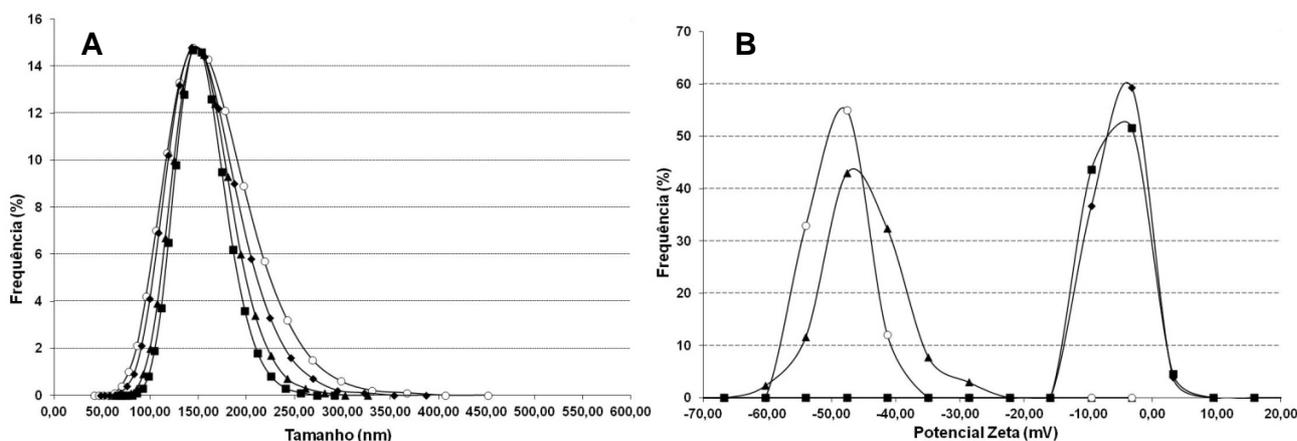


Figura 52 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta para formulações contendo 5,00 % (p/p) de Citocromo C.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,○:representam as formulações brancas - ET600B1 e B2; ◆, ■: representam as formulações com Citocromo C – ET701A1 e A2)

Ao verificar os gráficos da figura 52, onde se observa os perfis de distribuição de tamanho das nanopartículas carregadas comparadas às brancas, pode-se afirmar que o grupo ET701 apresenta, visualmente, ótima distribuição. Essa observação é confirmada pelos dados de índice de polidispersão, expressos na tabela 27. As nanopartículas encapsuladas com Citocromo C possuem baixos índices de polidispersão, o que demonstra que a distribuição dos valores de tamanho se concentra em torno da média, indicando homogeneidade na distribuição de diâmetro da suspensão.

Tabela 27 – Valores médios de tamanho de nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações de nanopartículas contendo Citocromo C.

		ET701
Tamanho (nm)	1	147,10
	2	148,40
	Media	147,75
	Desvio padrão	0,92
Índice de Polidispersão	1	0,0591
	2	0,0296
	Media	0,0444
	Desvio padrão	0,0209
Potencial Zeta (mV)	1	-4,60
	2	-3,80
	Media	-4,20
	Desvio padrão	0,57

O resultado de potencial zeta do grupo ET701, apresentado na figura 52 e tabela 27, pode ser facilmente explicado avaliando o ponto isoelétrico do Citocromo C, que é igual a 10,00. Quando essa proteína está em meio neutro, como é o caso da suspensão de nanopartículas, que corrigida possui pH semelhante ao meio fisiológico, o Citocromo C estará com caráter positivo. Diante disso, há um aumento da carga superficial das nanopartículas encapsuladas com Citocromo C comparado as suspensões brancas e contendo BSA, que possui caráter negativo mais proeminente. Estima-se que esta suspensão não seja muito estável devido ao potencial zeta, tendendo a neutralidade, o que pode gerar sedimentação, porém não foi observado deposição das nanopartículas no recipiente de estocagem. Houve deposição das nanopartículas quando a suspensão branca não foi preparada com tensoativo,

conforme se pode verificar no item 4.11, figura 61, porém efeito semelhante não foi verificado no grupo ET701. Isso pode ser explicado pelas dimensões reduzidas das partículas dessa suspensão somada à estabilização pelo tensoativo.

Para finalizar as avaliações da influência da massa molar da proteína, devem-se levar em discussão os resultados obtidos do teor de encapsulamento das dispersões, exemplificados no gráfico da figura 53.

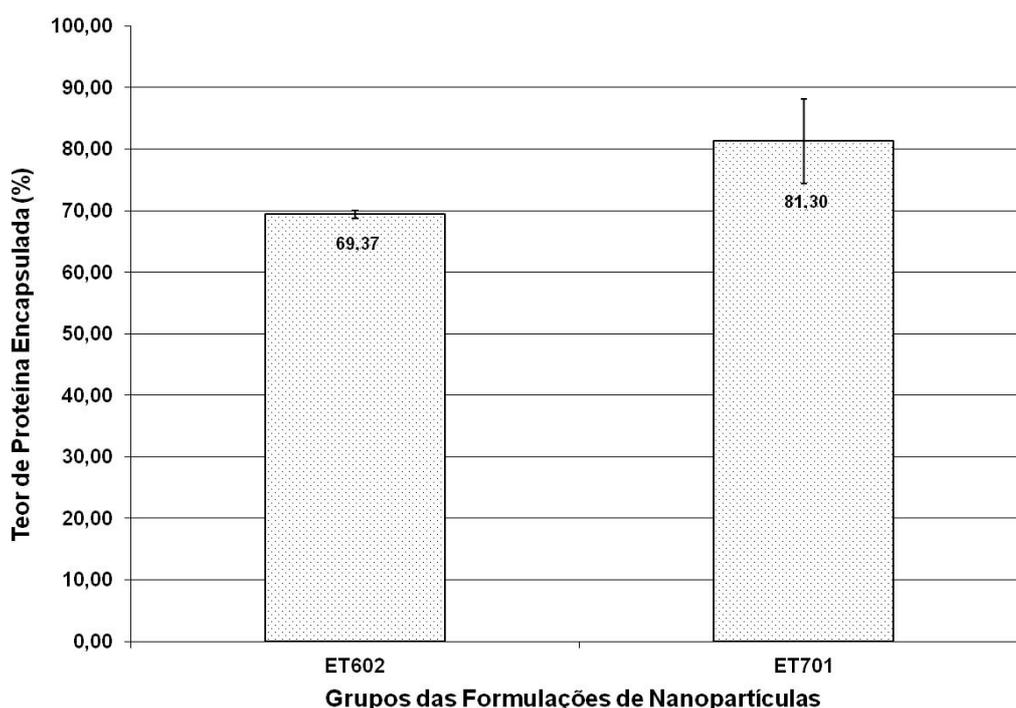


Figura 53 – Eficiência de encapsulamento comparando os grupos de preparações contendo diferentes proteínas.

Legenda: ET602- formulação contendo BSA; ET701- formulações contendo Citocromo C. Ensaio realizado em duplicata.

A eficiência de encapsulamento medida para a suspensão de nanopartículas contendo Citocromo C, massa molecular de 12,38 kDa, foi maior do que as nanopartículas contendo BSA, massa molecular de 66,40 kDa. Sugere-se que quanto menor a massa molecular da proteína, maior a taxa de encapsulamento, considerando o processo e a formulação executada, porém esse fenômeno não foi verificado por Cegnar e colaboradores, que demonstraram que a maior taxa de encapsulamento para cistatina, massa molecular de 13,00 kDa, foi de 57%. Essa observação não

desqualifica os resultados obtidos neste trabalho, pois os pesquisadores utilizaram outros componentes de formulação, PLGA (razão 50:50), PVA, e diferentes condições de agitação durante a formação das nanopartículas, o que pode ter influenciado na eficiência de encapsulamento. Analisando as observações realizadas no estudo de Fezckó e colaboradores, que as partículas formuladas com PVA apresentam porosidade em sua superfície e isso proporciona maior liberação de proteínas, pode-se confirmar as inferências descritas sobre as condições do experimento de Cegnar que utilizou em suas preparações o tensoativo PVA, que pode ter facilitado a cinética de liberação das proteínas pela formação de poros superficiais. (CEGNAR, *et. al.*, 2004a; CEGNAR, *et. al.*, 2004b; FECZKÓ, *et. al.*, 2008).

Pode-se afirmar, fazendo analogia aos resultados obtidos no item 4.7, que a menor massa molar da proteína (Citocromo C) concomitante aos resultados de eficiência de encapsulamento, provocam uma alteração da razão entre Citocromo C e PLGA em comparação à razão entre BSA e PLGA. Essa constatação pode ser verificada, avaliando a tabela 28 e relacionando a capacidade média de saturação para essa preparação contendo Citocromo C, 7,32 mg, em relação a formulação contendo BSA, 6,24 mg.

Tabela 28 – Quantitativo em gramas de proteína encapsulada por cada grupo de nanopartículas preparadas.

		ET602	ET701
Massa encapsulada (mg)	1	6,28	7,76
	2	6,21	6,88
	Media	6,24	7,32
	Desvio padrão	0,05	0,62

*O grupo ET602 foi encapsulado com BSA e o grupo ET701 foi encapsulado com Citocromo C.

4.9. Avaliação das nanopartículas contendo proteínas extraídas do câncer de ovário

Medidas de tamanho de partículas, potencial zeta, perfis de distribuição e taxa de encapsulamento foram executadas para verificação e confirmação dos ensaios realizados com proteínas padrões.

Avaliando a figura 54 e a tabela 29, pode-se verificar que houve coerência dos resultados de distribuição de tamanho com os obtidos anteriormente e essa formulação possui nanopartículas com tamanho médio de 140,60 nm. Preconiza-se que diante desse diâmetro médio de partículas, pode-se efetuar filtração esterilizante (220 nm) com alta eficiência de rendimento. Espera-se que o rendimento dessa filtração seja maior que 80%, pois verifica-se que mais de 90% das nanopartículas possuem diâmetro menor que 200 nm. Essa operação é importante para que seja possível efetuar administração parenteral do produto.

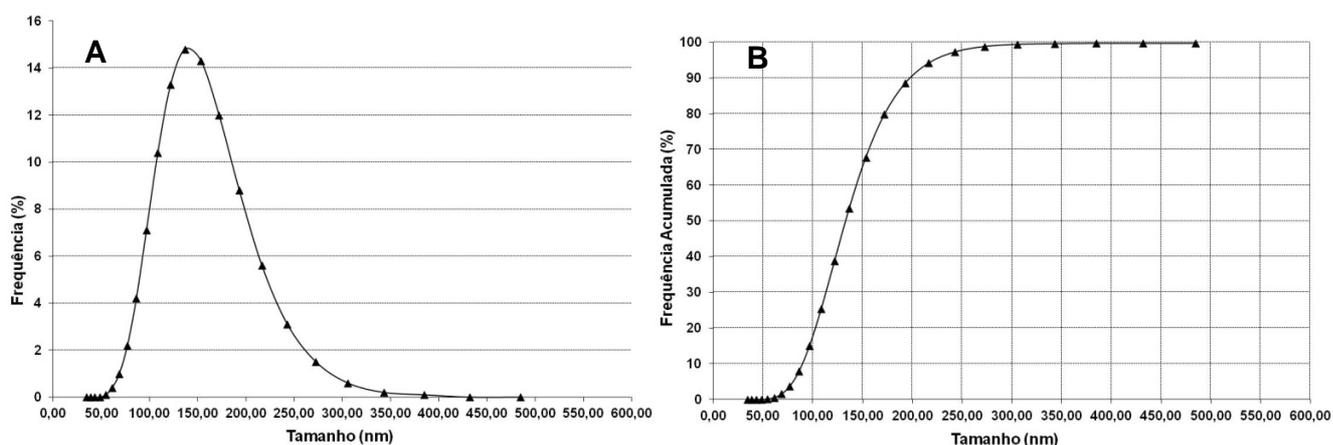


Figura 54 – Perfis de distribuição de tamanho da formulação de nanopartículas contendo proteínas extraídas de câncer de ovário.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de tamanho acumulado.

Tabela 29 – Resultados de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulamento para nanopartículas contendo proteínas extraídas de câncer de ovário.

Nanopartículas contendo proteínas extraídas do câncer de ovário			
Tamanho (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)	Taxa de encapsulamento (%)
140,60	0,0955	-38	59,33

A figura 55 e tabela 29 exibem o perfil de carga superficial das nanopartículas e apresentam valores de potencial zeta adequados para estabilidade da formulação.

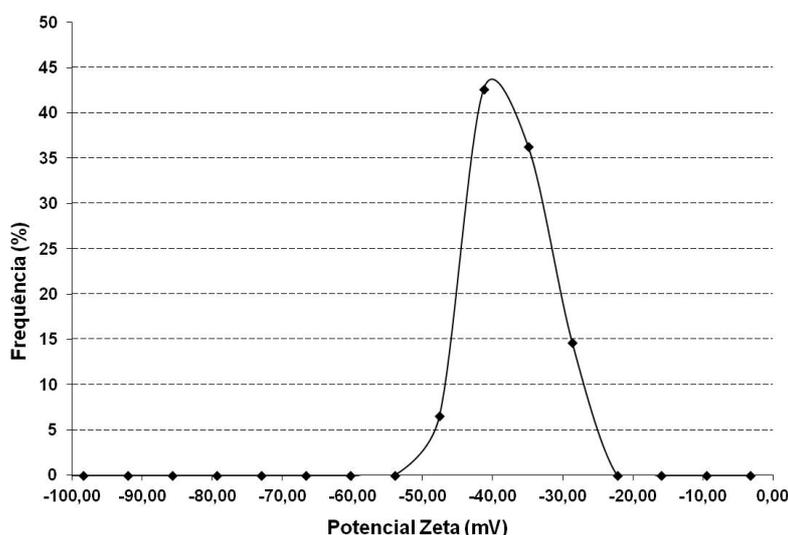


Figura 55 – Perfis de distribuição de potencial zeta da formulação de nanopartículas contendo proteínas extraídas de câncer de ovário.

A eficiência de encapsulamento, conforme demonstrado na figura 56 e tabela 29, foi adequada e exibe valores esperados para a quantidade de proteínas presente no extrato, 4,52 mg, adicionado na fase aquosa interna da suspensão. Diante do exposto, considera-se o produto gerado satisfatório para prosseguimento dos ensaios futuros, como filtração esterilizante e administração *in vivo* para avaliação da resposta imune induzida.

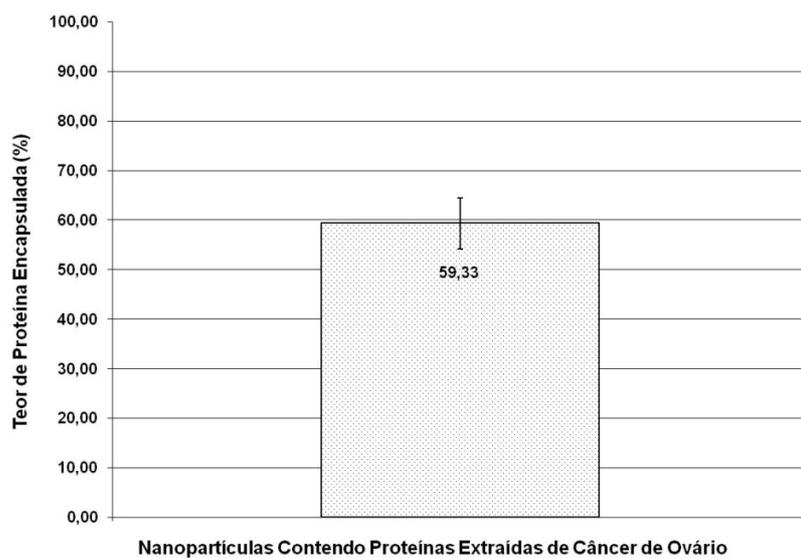


Figura 56 – Eficiência de encapsulamento da formulação de nanopartículas contendo proteínas extraídas de câncer de ovário.

4.10. Avaliação da morfologia e característica de encapsulação

4.10.1. Microscopia ótica de fluorescência

A microscopia ótica de fluorescência foi realizada para verificar a forma das nanopartículas, confirmando que as mesmas foram obtidas pelo método de produção empregado, de acordo com as fotomicrografias mostradas na figura 57. O desenvolvimento dessa técnica permitiu também verificar o encapsulamento do LysoTracker Red[®], demonstrando visualmente a incorporação e a eficiência do método para utilização como marcador de nanopartículas.

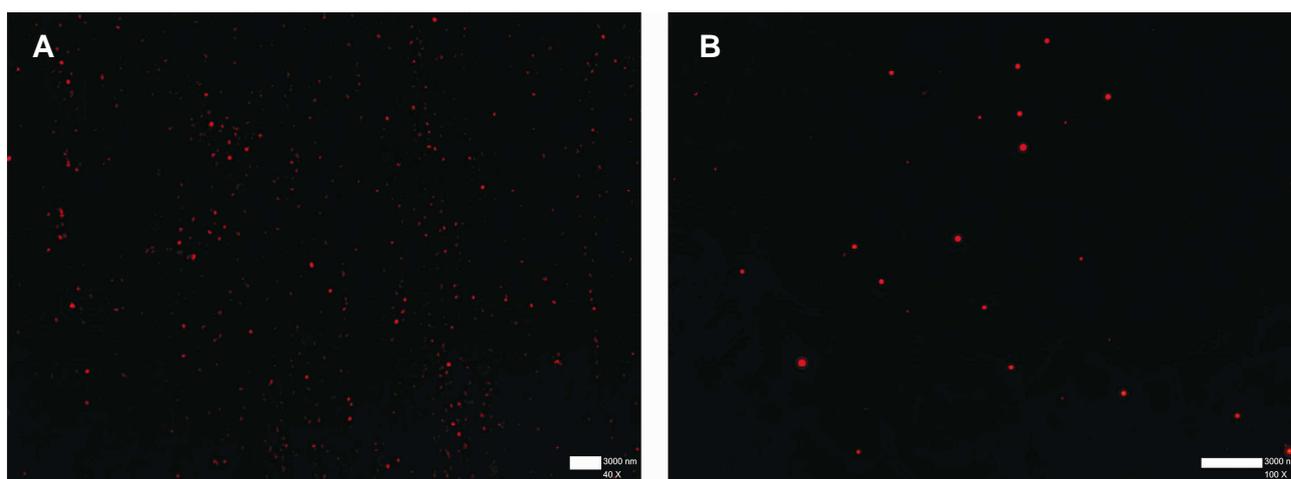


Figura 57 – Fotomicrografia de nanopartículas marcadas com LysoTracker red[®].

Legenda: A- Fotomicrografia das nanopartículas em aumento de 40 vezes. B- Fotomicrografia das nanopartículas em aumento de 100 vezes.

4.10.2. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

A morfologia das nanopartículas foi avaliada por MEV. A análise das fotomicrografias da suspensão de nanopartículas sem crioprotetor, figura 58, confirma os resultados demonstrados no item 4.10.1, quanto à formação das nanopartículas pelo método empregado. As nanopartículas apresentam formas esféricas e superfícies rugosas, sem possuir porosidade aparente. As estruturas também não demonstraram agregação entre partículas, o que também foi observado por outros pesquisadores (LU, *et. al.* 1999; CORRIGAN, *et. al.*, 2009; BILATI, *et. al.*, 2005; MUNDARGI, *et. al.*, 2007; JIN, *et. al.*, 2009).

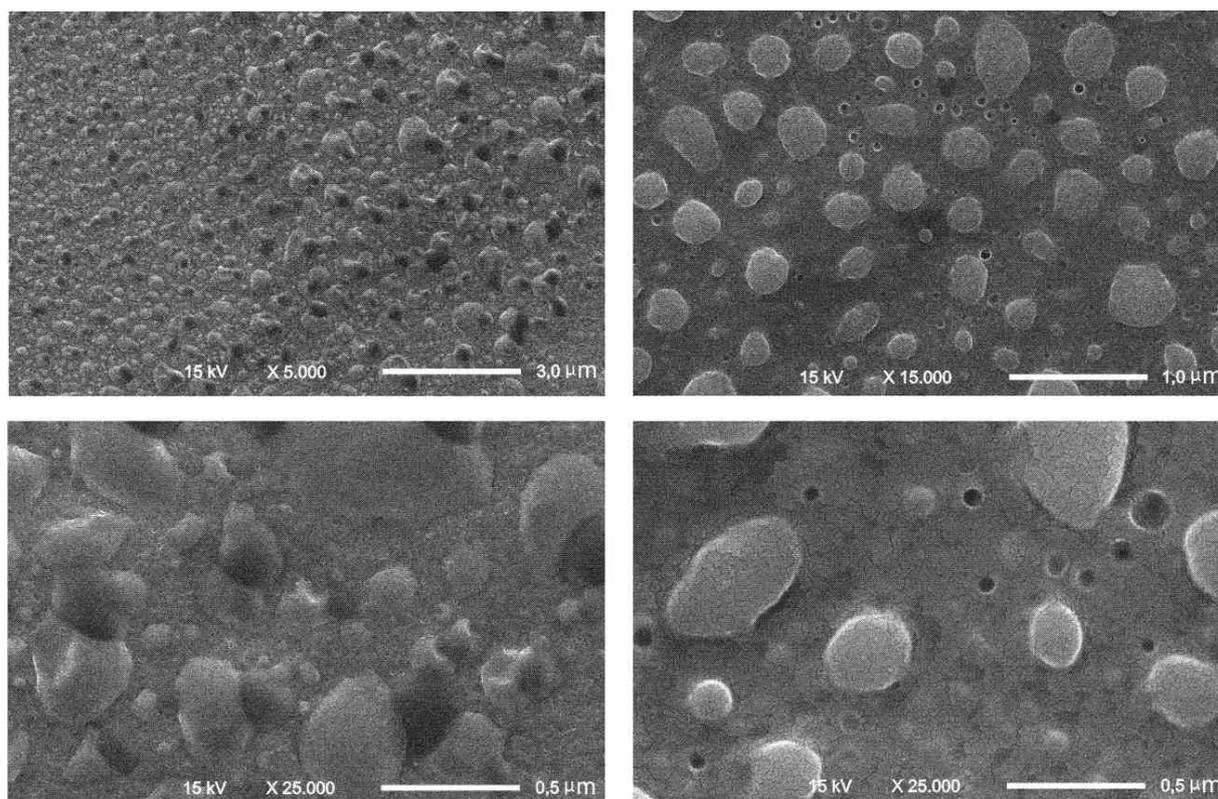


Figura 58 – Fotomicrografia da suspensão de nanopartículas sem crioprotetor.

As fotomicrografias da suspensão de nanopartículas com crioprotetor, figura 59, mostram que quando se emprega açúcar, no caso Trealose, que desempenha função de crioproteção para evitar agregações durante o congelamento da preparação e manter o tamanho das partículas, a matriz ao redor das nanopartículas apresenta estruturação amorfa, também relatado por outros pesquisadores (ABDELWAHED, *et. al.*, 2006; CROWE, *et. al.*, 1996; SCHAFFAZICK, *et. al.*, 2003). Devido a esse efeito, é possível ressuspender a preparação sem drásticas alterações do tamanho médio das nanopartículas, de acordo com o resultado do item 4.6, porém conforme observado na referida figura, não é possível visualizar as nanopartículas em meio à matriz amorfa formada. Efeito esse, também descrito por Konan e colaboradores. (KONAN, *et. al.*, 2002).

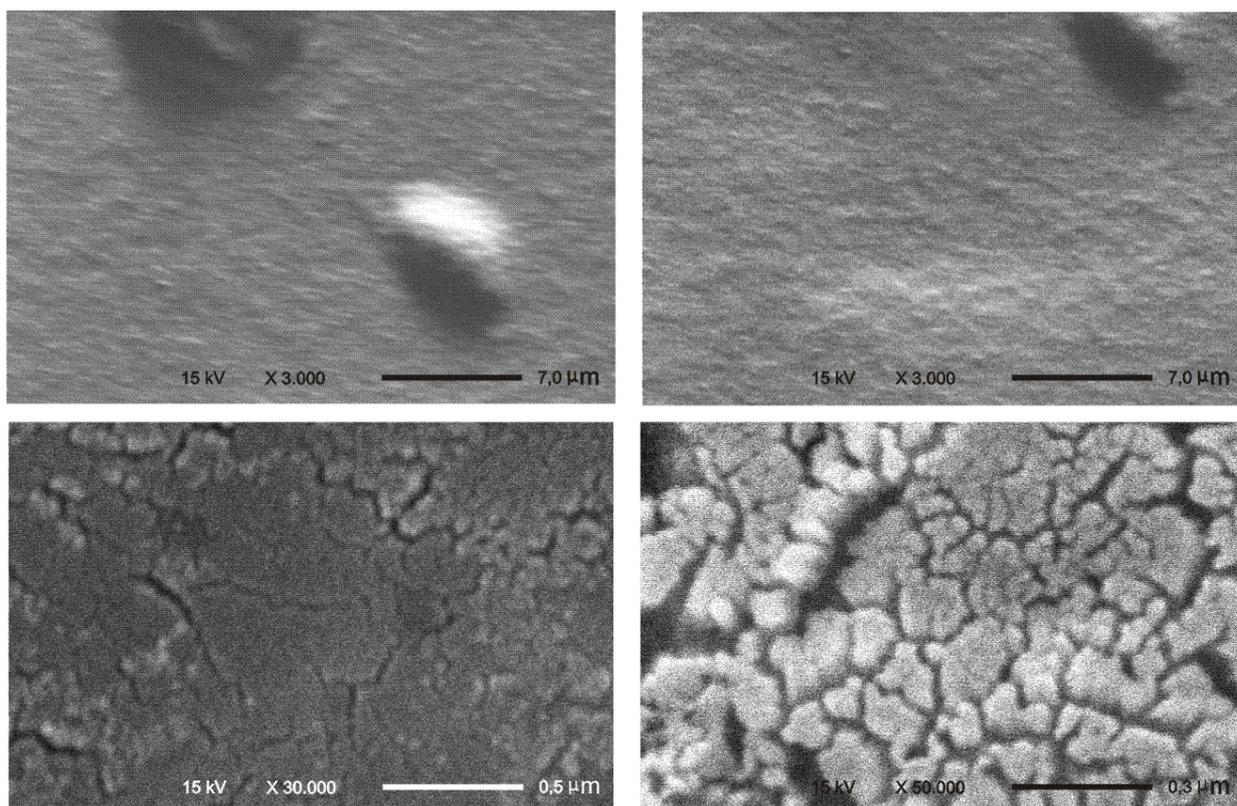


Figura 59 – Fotomicrografias da suspensão de nanopartículas com crioprotetor.

4.11. Ensaio de citotoxicidade celular das nanopartículas

O ensaio de citotoxicidade celular foi executado para avaliar o efeito dos componentes de formulação e das nanopartículas sob a viabilidade celular em células renais de embrião humano. As substâncias que compõem a formulação foram preparadas e testadas isoladamente em 5 diferentes concentrações, conforme identificação do grupos na tabela 30.

Tabela 30- Componentes avaliados no ensaio de citotoxicidade com as respectivas concentrações testadas.

Grupos	Componentes da formulação testados isoladamente	Concentrações
1	Trealose	10 mg/mL; 2 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL e 0,2 mg/mL
2	BSA	0,45 mg/mL; 0,09 mg/mL; 0,045 mg/mL; 0,0225 mg/mL e 0,009 mg/mL
3	Poloxamer	9 mg/mL; 1,8 mg/mL; 0,9 mg/mL; 0,45 mg/mL e 0,18 mg/mL.

As nanopartículas foram preparadas em 3 diferentes formulações, de acordo com os grupos demonstrados na tabela 31, e cada uma delas testadas em 5 concentrações distintas.

Tabela 31: Nanopartículas avaliadas no ensaio de citotoxicidade com as respectivas concentrações testadas.

Grupos	Formulações de nanopartículas	Concentrações
4	PLGA em forma de nanopartículas sem Poloxamer, BSA e Trealose	5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL e 0.1 mg/mL
5	Nanopartículas sem BSA	
6	Nanopartículas completas e carregadas com BSA	

Para o grupo 4, que identifica a preparação que foi utilizada para determinar a influência de um dos componentes da formulação, PLGA, isoladamente sobre a viabilidade celular foi necessário proceder à formulação de nanopartículas sem utilização de nenhum outro excipiente. O PLGA é um polímero pouco solúvel em água e devido a isso não seria possível executar o ensaio de citotoxicidade dessa substância, utilizando solvente orgânico, já que os solventes orgânicos apresentam altos índices de citotoxicidade. Diante do exposto e para solucionar essa adversidade, o PLGA foi solubilizado na fase orgânica e submetido ao processo de preparação de nanopartículas com extração do solvente. Assim, foi possível avaliar a citotoxicidade desta substância na forma de nanopartículas. O grupo 5 foi formulado com o polímero, tensoativo e crioprotetor sem a presença de proteína e o grupo 6 foi formulado com todos os itens da formulação, inclusive BSA. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

Inicialmente, a distribuição de diâmetro das nanopartículas foi medida e nesta avaliação foi observado uma expressiva diferença entre a distribuição de tamanho, verificado na figura 60, e entre os diâmetros médios das nanopartículas preparadas sem e com tensoativo, grupos 4 e 6, respectivamente. O grupo 4 apresentou diâmetro médio de 210 nm e o grupo 6 de 155 nm, uma diferença de tamanho médio de 35,5 %. O grupo 5 apresentou distribuição similar ao grupo 6, com resultado médio de 148 nm.

Concomitantemente, a carga superficial dos grupos de formulações das nanopartículas foi medida, verificando que há diferença de distribuição de carga das nanopartículas entre os grupos e que a carga avaliada para o grupo 4 possui menor intensidade negativa comparado aos outros grupos. Os grupos 4, 5 e 6 apresentaram potencial zeta médio de -37,95 mV, -48,50 mV e -43,80 mV, respectivamente. As distribuições de carga superficial dos grupos 4 e 6 estão apresentadas na figura 60.

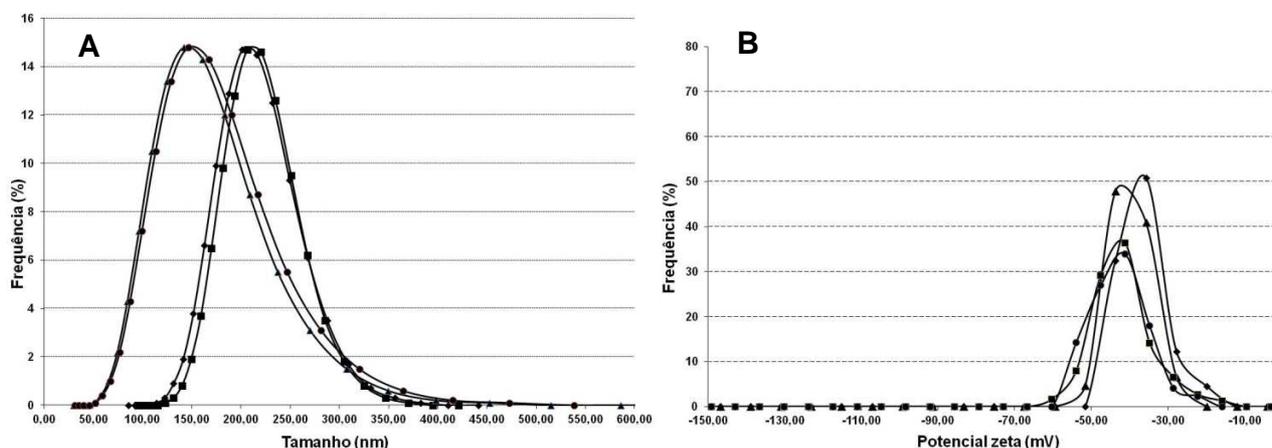


Figura 60 – Perfis de distribuição de tamanho e de potencial zeta.

Legenda: A- Perfil de distribuição de tamanho e B- Perfil de distribuição de potencial zeta. (▲,◆ - representa duplicata do grupo 4 e ■,● – representa duplicata do grupo 6)

Além disso, as formulações contendo tensoativo são mais estáveis e por sua vez as formulações sem tensoativo são consideravelmente instáveis do ponto de vista de sedimentação e deposição. Portanto, para evitar a deposição, as suspensões foram preparadas no dia do uso para o ensaio de citotoxicidade e medições de tamanho e potencial zeta. Após 2 dias em repouso a 4 °C, as suspensões do grupo 4 sedimentaram e as do grupo 6 continuaram suspensas e estáveis, conforme pode ser visualizado na figura 61.

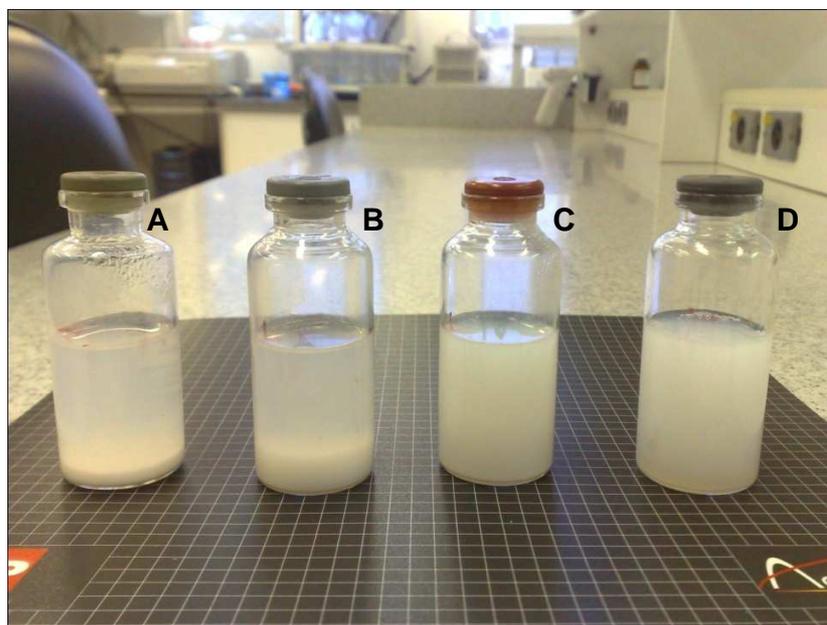


Figura 61 – Fotografia das suspensões de nanopartículas.

Legenda: A e B- Sedimentação das nanopartículas do grupo 4; C e D- Nanopartículas do grupo 6 em suspensão.

Após caracterização, o ensaio de MTT foi realizado para todos os grupos citados, demonstrando que nem os componentes da formulação nem as preparações de nanopartículas apresentaram citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas, conforme exposto na figura 62, porém houve uma diminuição da viabilidade celular para as duas suspensões com maior concentração do grupo 4. Essa diminuição não pode ser considerada como toxicidade da suspensão, porém indica que a linhagem celular foi sensível ao PLGA na forma de nanopartículas e, conseqüentemente, não ocorreu o crescimento celular esperado, comparado com o grupo controle de vida. Isso pode ser explicado, pelas observações realizadas nos resultados da caracterização, que sugere que devido ao maior tamanho da nanopartículas do grupo 4, baixa estabilidade da formulação, conforme figura 61, induzindo uma deposição das nanopartículas com possível oclusão celular, aumentando a morte das células. O efeito do potencial zeta não pode ser atribuído ao menor crescimento das células, pois o grupo 4 apresentou valores de carga superficial menos exacerbados que o grupo 6,

logo, o grupo 6 teria uma maior tendência a citotoxicidade se fosse considerado esse parâmetro.

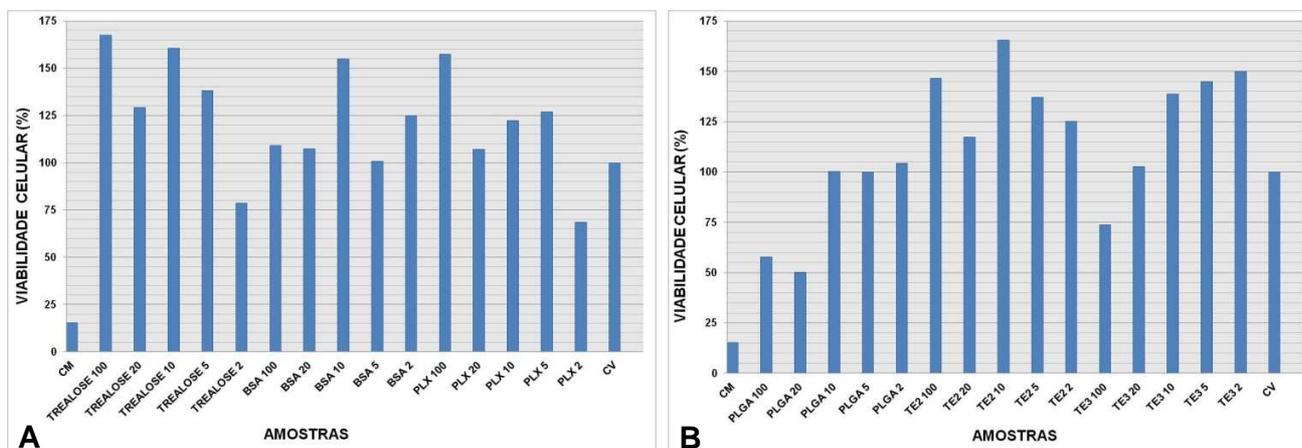


Figura 62 – Viabilidade celular de células renais de embrião humano (HEK) expostas a diferentes concentrações de componentes da formulação e de suspensões de nanopartículas.

Legenda: A- Componentes da formulação. Grupo 1: Trealose 100 (10 mg/mL), 20 (2 mg/mL), 10 (1 mg/mL), 5 (0,5 mg/mL) and 2 (0,2 mg/mL); Grupo 2: BSA 100 (0,45 mg/mL), 20 (0,09 mg/mL), 10 (0,045 mg/mL), 5 (0,0225 mg/mL) and 2 (0,009 mg/mL); Grupo 3: PLX 100 (9 mg/mL), 20 (1,8 mg/mL), 10 (0,9 mg/mL), 5 (0,45 mg/mL) and 2 (0,18 mg/mL)]. B- Nanopartículas. Grupo 4: PLGA, nanopartículas apenas com PLGA; Grupo 5: TE2 - Nanopartículas com PLGA, PLX e Trealose; Grupo 6: TE3 - Nanopartículas com PLGA, PLX, Trealose e BSA. A mesma concentração foi usada para o grupo 4, 5 e 6, 100 (5 mg/mL), 20 (1 mg/mL), 10 (0,5 mg/mL), 5 (0,25 mg/mL) e 2 (0,1 mg/mL). CM- Controle de morte celular; CV- Controle de vida celular;

Diante do exposto, pode ser inferido que os componentes da formulação e as suspensões não apresentaram toxicidade para as células e que preparações de nanopartículas com maior distribuição de tamanho induzem menor viabilidade celular do que nanopartículas com menor distribuição de tamanho.

4.12. Ensaio de citotoxicidade das substâncias de degradação acelerada das nanopartículas

O ensaio de citotoxicidade celular foi realizado para avaliar o efeito das substâncias de degradação das nanopartículas sob a viabilidade celular em osteoblastos. A execução do teste foi realizada em parceria com o Laboratório de Biomateriais da Escola de Engenharia da UFMG. Dois grupo de nanopartículas foram preparados, conforme tabela 32, forçados a degradação e testados com intuito de se avaliar a citotoxicidade das substâncias de degradação.

Tabela 32- Grupos das formulações de nanopartículas liofilizadas submetidas à degradação e ao ensaio de citotoxicidade com a respectiva concentração testada.

Grupos	Nanopartículas	Concentração
1	Nanopartículas brancas	0,1 mg/mL
2	Nanopartículas contendo BSA	

O ensaio de MTT foi realizado para todos os grupos citados, demonstrando que nenhum dos grupos submetidos à degradação apresentou redução na viabilidade celular, indicando que não houve citotoxicidade para as substâncias de degradação de nanopartículas na concentração testada, conforme exposto na figura 63.

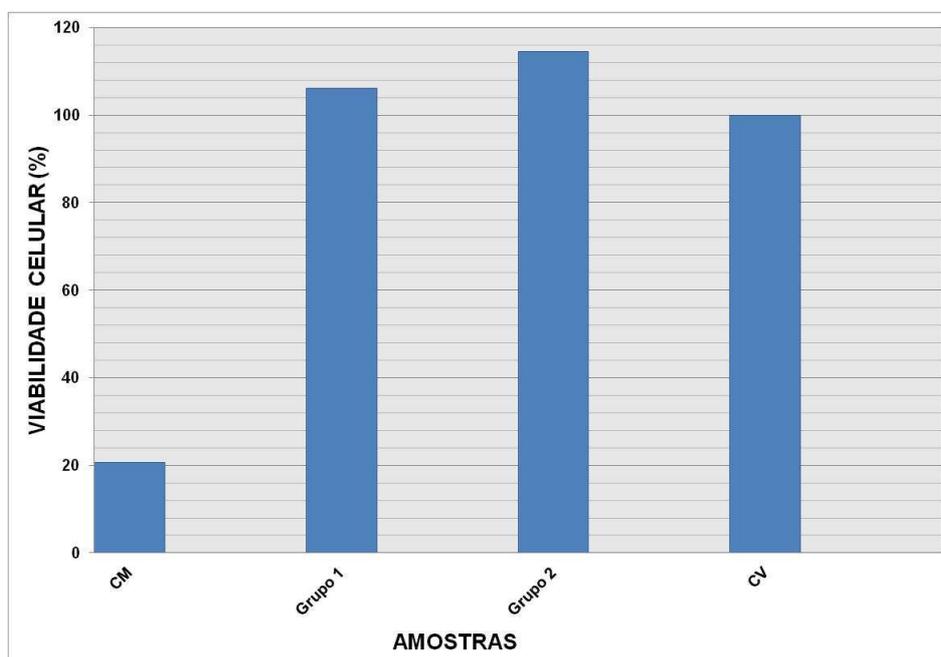


Figura 63 – Viabilidade celular de osteoblastos submetida a substâncias de degradação de nanopartículas liofilizadas.

Legenda - Grupo 1: Nanopartículas brancas; Grupo 2: Nanopartículas contendo BSA; CM- Controle de morte celular e CV- Controle de vida celular;

5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que o processo desenvolvido, bem como a formulação, foram eficientes e são adequados para produção de partículas na escala nanométrica, elaboradas a base de ácido poli-lático-co-glicólico. Essa afirmativa foi verificada pela caracterização das nanopartículas formadas, avaliando o diâmetro das partículas, índice de polidispersão, carga elétrica superficial, e taxa de encapsulamento. Foi possível visualizar durante a otimização do processo com o estudo das variações do volume de fase aquosa interna, do tempo de agitação, das concentrações de polímero, tensoativo e crioprotetor, a influência destes fatores sob os parâmetros analisados e sua importância na qualidade do produto obtido.

Os ensaios na variação da concentração de proteínas sugerem que exista uma capacidade média de saturação da formulação para encapsulamento de BSA e que essa capacidade foi ainda maior para o Citocromo C, com menor massa molar. A formulação é adequada para produção de nanopartículas com alta taxa de encapsulamento de proteínas, inclusive analisando os ensaios realizados com proteínas extraídas de câncer de ovário, apresentando resultados homogêneos e baixa amplitude de dispersão. Verificou-se, também, a possibilidade de se executar filtração esterilizante devido ao alto rendimento de tamanhos de nanopartículas menores que 220 nm nas preparações. O efeito de diferentes pontos isoelétricos apresentados por proteínas distintas em meio neutro foi impactante na carga superficial das nanopartículas, produzindo efeitos sob o potencial zeta da suspensão.

Além disso, os componentes utilizados para obtenção das nanopartículas e as próprias nanopartículas não apresentaram resposta citotóxica para a linhagem celular renal, bem como, as substâncias de degradação das nanopartículas não apresentaram respostas citotóxicas para osteoblastos. Para confirmar a não toxicidade

da formulação e seus componentes de degradação outros testes em outras linhagens celulares serão executados.

Estudos de imunização em camundongos, utilizando as nanopartículas poliméricas contendo proteínas extraídas de câncer de ovário estão sendo realizados. Os resultados satisfatórios deste estudo indicarão que as nanopartículas desenvolvidas podem constituir um importante adjuvante para utilização em vacinas. Diante do exposto, a concepção do modelo de produção de nanopartículas poderá tornar viável a implementação de uma plataforma para desenvolvimento de adjuvantes com possibilidade de aplicação em terapias imunológicas, como por exemplo, para o câncer.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, W. *et al.* A pilot study of freeze drying of poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules stabilized by poly (vinyl alcohol): formulation and process optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 309, n. 1-2, p. 178-188, 2006.

ALMEIDA, A. J. *et al.* Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, n. 6, p. 478-490, 2007.

ATHANASIOU, K. A. *et al.* Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, v. 17, n. 2, p. 93-102, 1996.

BILATI, U. *et al.* 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.

BORGES, O. *et al.* Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 299, n. 1-2, p. 155-166, 2005.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. Cartilha sobre Nanotecnologia. Brasília, 2010a.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. Panorama Nanotecnologia. Brasília, 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. Secretaria de Atenção a Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Farmacopeia Brasileira, 4ª edição, parte I. São Paulo, 1988.

BRIGGER, I. *et al.* Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, n. 5, p. 631-651, 2002.

CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum albumin. *Advances in protein chemistry*, v. 45, p. 153-203, 1994.

CEGNAR, M. *et al.* Cystatin incorporated in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: development and fundamental studies on preservation of its activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 22, n. 5, p. 357-364, 2004a.

CEGNAR, M. *et al.* Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles as a Carrier system for delivering cyteine protease inhibitor cystatin into tumor cells. *Experimental Cell Research*, v. 301, n. 2, p. 223-231, 2004b.

CHALASANI, K. B. Effective oral delivery of insulin in animal models using vitamin B12-coated dextran nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 122, n. 2, p. 141-150, 2007.

CHASTEIGNER, S. *et al.* Freeze-drying of itraconazole-loaded nanosphere suspensions: a feasibility study. *Drug Development Research*, v. 38, n. 2, p. 116-124, 1996.

CIENTIFICA LTD. The nanotechnology opportunity report. Executive summary. Terceira edição. 49 p. 2008.

CONWAY, M. A. *et al.* Protection against *Bordetella pertussis* infection following parenteral or oral immunization with antigens entrapped in biodegradable particles: effect of formulation and route of immunization on induction of Th1 and Th2 cells. *Vaccine*, v. 19, n. 15-16, p. 1940-50, 2001.

CORRIGAN, O. I.; LI, X. Quantifying drug release from PLGA nanoparticulates. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, n. 3-4, p. 477-485, 2009.

COSTA, M. C. C. D. *et al.* Atividade citotóxica de extratos brutos de *Lippia Alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). *Acta Farm. Bonaerense*, v. 23, n. 3, p. 349-352, 2004.

COTTON, F. *et al.* Assesment of a Biuret Method Without Concentration Step for Total Protein Determination in Cerebrospinal Fluid. *Clinical Biochemistry*, v. 30, n. 4, p. 313-314, 1997.

COURANT, T. *et al.* Development and physicochemical characterization of copper complexes-loaded PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 379, n. 2, p. 226-234, 2009.

COX, J. C.; COULTER, A. R. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, v. 15, n. 3, p. 248-256, 1997.

CROWE, L. M. *et al.* Is Trehalose Special for Preserving Dry Biomaterials? *Biophysical Journal*, v. 71, n. 4, p. 2087-2093, 1996.

DASH, A. K.; CUDWORTH II, G. C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, v. 40, n. 1, p. 1-12, 1998.

DEMENTO, S. L. *et al.* Inflammasome-activating nanoparticles as modular systems for optimizing vaccine efficacy. *Vaccine*, v. 27, n. 23, p. 3013-3021, 2009.

DOMINGUEZ, A. L.; LUSTGARTEN, J. Targeting the tumor microenvironment with anti-neu/anti-CD40 conjugated nanoparticles for induction of antitumor immune responses. *Vaccine*, v. 28, n. 5, p. 1383-1390, 2010.

EDELMAN, R. Na overview of adjuvant use. In: O`Hagan, D.T., ed. *Methods in molecular medicine*, 42: vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols, Totowa: humana press inc., 2002.

EMERSON JR, T. E. Unique features of albumin: A brief review. *Critical Care Medicine*, v. 17, n. 7, p. 690-694, 1989.

FATTAL, E. *et al.* Nanoparticle as Drug Delivery Systems. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, p.1864 – 1881, 2002.

FECZKÓ, T. *et al.* Comparison of the preparation of PLGA-BSA nano-and microparticles by PVA, poloxamer and PVP. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 319, n. 1-3, p. 188-195, 2008.

FLORENCE, A. T. The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. *Pharmaceutical Research*, v. 14, n. 3, p. 259-266, 1997.

GAO, X. *et al.* Brain delivery of vasoactive intestinal peptide enhanced with the nanoparticles conjugated with wheat germ agglutinin following intranasal administration. *Journal of Controlled Release*, v. 121, n. 3, p. 156-167, 2007.

GARINOT, M. *et al.* PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *Journal of Controlled Release*, v. 120, n. 3, p. 195-204, 2007.

GORNALL, A. G. *et al.* Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 177, n. 2, p. 751-766, 1949.

GOODMAN, M.G. A new approach to vaccine adjuvants. Plenum Press, p. 581-609,1995.

GUPTA, P. N. *et al.* M-cell targeted biodegradable PLGA nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *Journal of Drug Targeting*, v. 15, n. 10, p. 701-713, 2007.

GUPTA, R. K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 32, n. 3, p. 155-172, 1998.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v.6, n. 4, p. 319-327, 2002.

HIRAYAMA, K. *et al.* Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 173, n. 2, p. 639-646, 1990.

HOLZER, M. *et al.* Physico-chemical characterization of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.72, n. 2, p. 428-437, 2009.

HORTON, M. A.; KHAN, A. Medical nanotechnology in the UK: a perspective from the London Centre for Nanotechnology. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 2, n. 1, p. 42-48, 2006.

JAIN, R. *et al.* Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. *Drug development and industrial pharmacy*, v. 24, n. 8, p. 703-727, 1998.

JAIN, R. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, v. 21, n. 23, p. 2475-90, 2000.

JEMAL, A. *et al.* Cancer statistics 2010. *CA Cancer J. Clin.*, v. 60, p. 277-300, 2010.

JIN, C. *et al.* Cytotoxicity of Paclitaxel Incorporated in PLGA Nanoparticles on Hypoxic Human Tumor Cells. *Pharmaceutical Research*, v. 26, n. 7, p. 1776-1784, 2009.

KANCHAN, V.; PANDA, A. K. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterial*, v. 28, n. 35, p. 5344-5357, 2007.

KINGSLEY, J. D. *et al.* Nanotechnology: A focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 1, n. 3, p. 340-350, 2006.

KONAN, Y. *et al.* Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 233, n. 1-2, p. 239-252, 2002.

KUMARI, A. *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2009.

KUMARI, A. P. *et al.* Nanoscale particles for polymer degradation and stabilization – Trends and future perspectives. *Progress in Polymer Science*, v.34, n. 6, p.479-515, 2009.

LAMPRECHT, A. *et al.* Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 184, n. 1, p. 97-105, 1999.

LEE, K. Y.; YUK, S. H. Polymeric protein delivery systems. *Progress in Polymer Science*, v. 32, n. 7, p. 669–697, 2007.

LEMOINE, D.; PREAT, V. Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins. *Journal of Controlled Release*, v. 54, n. 1, p. 15-27, 1998.

LEROUX, J. C. *et al.* New approach for preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 41, n. 1, p. 14-18, 1995.

LU, Z. *et al.* A method for the preparation of polymeric nanocapsules without stabilizer. *Journal of Controlled Release*, v. 61, n. 1-2, p. 107-112, 1999.

LUX RESEARCH INC. Statement of findings: sizing nanotechnology's value chain Executive summary. 31 p. 2004.

MALVERN, Malvern Instruments. Operators guide for Mastersize MS2000, MAN0247, 1999.

MALVERN, Malvern Instruments. Zetasizer nano series user manual. MAN0317, n. 11, 2004.

MALVERN. Zeta potential measurement using laser Doppler electrophoresis. Disponível em <http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.htm>. Acesso em 11 de janeiro 2011.

MEY, M. *et al.* Comparison of protein quantification and extraction methods suitable for *E. coli* cultures. *Biologicals*, v. 36, n. 3, p. 198-202, 2008.

MONTASSER, I. *et al.* Méthodes d'obtention et mécanismes de formation de nanoparticules polymériques. *Journal de Pharmacie de Belgique*, v. 55, n. 6, p. 155-167, 2000.

MU, L.; FENG, S. PLGA/TPGS Nanoparticles for Controlled Release of Paclitaxel: Effects of the Emulsifier and Drug Loading Ratio. *Pharmaceutical Research*, v. 20, n. 11, p. 1864-1872, 2003.

MUNDARGI, R. C. *et al.* Development and evaluation of novel biodegradable microspheres based on poly(D,L-lactide-co-glycolide) and poly(ϵ -caprolactone) for controlled delivery of doxycycline in the treatment of human periodontal pocket: *in vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Controlled Release*, v. 119, n. 1, p. 59-68, 2007.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, v.32, n. 8-9, p.762-798, 2007.

OKUTUCU, B. *et al.* Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v.70, n. 5, p. 709-711, 2007.

Panyam J, *et al.*, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Delivery*, v. 55, p. 329-347, 2003a.

PANYAM, J. *et al.* Polymer degradation and *in vitro* release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 92, n. 1-2, p. 173-187, 2003b.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 55, n. 3, p. 329-347, 2003c.

PARKIN, D. M. *et al.* Global cancer statistics, 2002. *ACA Cancer J. Clin.*, v.55, n. 2, p. 74-108, 2005.

PARVIN, R. *et al.* On the colorimetric biuret method of protein determination. *Analytical Biochemistry*, v.12, n. 2, p. 219-229, 1965.

PERES, L. A. B. *et al.* Padronização do teste do MTT em modelo de preservação a frio como instrument de avaliação da viabilidade celular. *J. Bras. Nefrologia*, v.30, n. 1, p. 48-53, 2008.

POHJALA, L. *et al.* Assessing the data quality in predictive toxicology using a panel of cell lines and cytotoxicity assays. *Analytical Biochemistry*, v.362, p. 221-228, 2007.

QUINTILIO, W. Apresentação de antígenos e liberação controlada como ferramenta para melhoramento de vacinas de segunda geração. *Instituto de Química. Universidade de São Paulo*. 85 p. 2005.

RAGHUVANSHI, R. S. *et al.* Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *International Journal of Pharmaceutical*, v. 245, n.1-2, p. 109-121, 2002.

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

REIS, C. P. *et al.* Nanoparticulate delivery system for insulin: design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 30, n.5, p. 392-397, 2007.

REIBOLD, M. Structure of several historic blades at nanoscale. *Crystal research and technology*, v. 44, n. 10, p. 1139-1146, 2009.

RIEUX, A. *et al.* Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*, v. 116, n. 1, p. 1-27, 2006.

SÁNCHEZ, A. *et al.* Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 18, n. 3-4, p. 221-229, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SILVA, E. Z. Nanociência: a próxima grande idéia? *REVISTA USP*, n.76, p. 78-87, 2007.

SILVA, M. S. *et al.* Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. *Química Nova*, v. 33, n. 9, p. 1868-1873, 2010.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. Advances in vaccines adjuvants. *Nature Biotechnology*, v. 17, n. 11, p. 1075-1081, 1999.

SINGH, R.; LILLARD, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Nature Biotechnology*, v. 86, p. 215-223, 2009.

TEIXEIRA, M. *et al.* Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 59, n. 3, p. 491-500, 2005.

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

TRIERWEILER, L. F. Nanopartículas: Como produzi-las em escala industrial. 2009. 178 p. (Tese de doutorado em Engenharia Química). Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

TSUKADA, Y. *et al.* Particle size control of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres *International Journal of Pharmaceutics*, v. 370, n. 1-2, p. 196-201, 2009.

USKOKOVIC, V. Nanotechnologies: What we do not know. *Technology in Society*, v. 29, n. 1, p. 43-61, 2007.

WAECKERLE-MEN, Y. *et al.* Encapsulation of proteins and peptides into biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres prolongs and enhances antigen presentation by human dendritic cells. *Vaccine*, v. 24, n. 11, p. 1847-1857, 2006.

WEINBERG, R. A. A biologia do câncer. São Paulo: Artmed, 2008.

WILLIAMS, K. M. *et al.* An evaluation of protein assays for quantitative determination of drugs. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 57, n. 1, p. 45-55, 2003.

ZAIA, D. A. M. *et al.* Determination of total proteins in several tissues of rat: a comparative study among spectrophotometric methods. *Microchemical Journal*, v.64, n. 3, p.235-239, 2000.

ZAIA, D. A. M. *et al.* Determination of total proteins: a study of reaction between quinones and proteins. *Talanta*, v. 49, n. 2, p. 373-376, 1999.

ZAIA, D. A. M. *et al.* Determinação de Proteínas Totais Via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes. *Química Nova*, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZHANG, L.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nanotoday*, v.4, n. 1, p. 66-80, 2009.