



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA QUÍMICA**

**ENCAPSULAMENTO SIMULTÂNEO DE NANOPARTÍCULAS  
MAGNÉTICAS (NPMS) COM FTALOCIANINA DE ZINCO  
(ZNPC) VIA POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO**

**PAULO EMILIO FEUSER**

Florianópolis

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA QUÍMICA**

**Paulo Emilio Feuser**

**ENCAPSULAMENTO SIMULTÂNEO DE NANOPARTÍCULAS  
MAGNÉTICAS (NPMS) COM FTALOCIANINA DE ZINCO  
(ZNPC) VIA POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Claudia Sayer;

Co-orientador: Prof. Dr. Marcio Nele de Souza

Florianópolis

2012



**Paulo Emilio Feuser**

**ENCAPSULAMENTO SIMULTÂNEO DE  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (NPMS) COM  
FTALOCIANINA DE ZINCO (ZNPC) VIA POLIMERIZAÇÃO  
EM MINIEMULSÃO**

Dissertação julgada para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração de Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 15 de março de 2012.

Prof. Leonel Teixeira Pinto, Dr.  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

Prof. Pedro Henrique Hermes de Araújo, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC  
Orientador

Prof. Claudia Sayer, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC  
Co-Orientadora

Marcio Nele Souza, Dr.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ  
Co-Orientador

Eduardo Ricci Júnior, Dr.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Alexandre Cas Viegas, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Débora de Oliveira, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC



*A minha família,  
minhas maiores referências.*





## AGRADECIMENTOS

Primeiramente queria agradecer meus pais e irmãs pelo carinho e apoio em todos os momentos, obrigado por tudo, hoje e sempre. Agradeço também minha esposa, Karla pelo apoio incondicional, carinho, atenção e mesmo estando longe em alguns momentos, obrigado por tudo. Obrigado também por ter me dado a coisa mais preciosa da minha vida, meu filho Vitor. Filhão este trabalho é pra você, o pai Te ama muito!!!

Ao meu orientador, Pedro Henrique Hermes de Araújo, por todo apoio, compreensão e amizade. A minha co-orientadora, Claudia Sayer, carinho e atenção em todos os momentos. Ao Prof. Eduardo Ricci pelo apoio, amizade e atenção. Ao meu co-orientador Marcio Nele ao apoio e que mesmo a distância sempre me auxiliou e contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho. Tenho orgulho em ter vocês do meu lado.

Ao Prof. José Carlos Pinto pelo apoio e atenção.

Agradeço também à Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-Graduação Engenharia Química, e a Universidade Federal do Rio de Janeiro - COPPE, por todos os recursos que permitiram a elaboração deste trabalho. Em especial ao Laboratório de Controle de Processos da UFSC e o Laboratório de Modelagem, Simulação e Controle de Processos da UFRJ, pela disponibilidade dos recursos físicos e pela oportunidade do desenvolvimento das atividades necessárias para a realização deste trabalho. Aos todos do LCP e LMSCP que sempre me apoiaram e me ajudaram na construção deste trabalho.

Ao Prof. Alexandre Cas Viegas pela atenção e pela possibilidade de realizar análises de magnetização e de Raio-x.

Agradeço ainda ao LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica pela disponibilidade da estrutura física do laboratório e microscópios, que me propuseram a oportunidade do desenvolvimento das atividades necessárias para a realização deste trabalho

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível de Superior (CAPES).



“A mente que se abre a uma nova idéia jamais  
voltara ao seu tamanho original”

(Albert Einsten)



## RESUMO

Uma das alternativas mais promissoras para o tratamento do câncer é a Terapia Fotodinâmica (TFD). A Ftalocianina de Zinco (ZnPc) é um fotossensibilizante de segunda geração com caráter hidrofóbico e necessita ser incorporado em um sistema de liberação adequado para ser injetado sistemicamente. Nanopartículas magnéticas, NPMs, constituída principalmente de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) apresentam alto valor de magnetização com grande potencial de aplicação no tratamento do câncer por hipertermia. O encapsulamento simultâneo de fármacos com NPMs tem sido reconhecido como uma técnica promissora para o tratamento do câncer por possibilitar a ação sinérgica dos diferentes tipos de tratamento. O objetivo deste trabalho foi a síntese, caracterização e avaliação da toxicidade e fototoxicidade das NPMs, do encapsulamento da NPMs e ZnPc e o encapsulamento simultâneo de ZnPc com NPMs via polimerização em miniemulsão. As NPMs com ácido oléico (AO) foram preparadas pelo método de co-precipitação em meio aquoso e a análise de DRX mostrou picos característicos da magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) com diâmetro médio de nanopartículas de 13nm. As NPMs apresentaram um alto valor de magnetização de saturação ( $M_s$ ) (64 emu/g óxido de ferro). O encapsulamento das NPMs foi realizado via polimerização em miniemulsão com metacrilato de metila (MMA). As NPMs encapsuladas apresentaram um diâmetro aproximado de 100nm com valor de  $M_s$  de 34 emu/g de óxido de ferro. Para o encapsulamento da ZnPc utilizou-se duas técnicas de encapsulamento. A primeira foi a técnica de miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação (PMMA/ZnPc)(FA)) e a segunda utilizou-se apenas a técnica de miniemulsão direta (PMMA/ZnPc(FO)). O teor de ZnPc nas nanopartículas poliméricas foi um pouco superior na amostra PMMA/ZnPc(FA) (3,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) do que na amostra de PMMA/ZnPc(FO) (3,0  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Ambas as técnicas resultaram em um tamanho médio de aproximadamente 100nm. Ao encapsular a ZnPc simultaneamente com as NPMs (PMMA/ZnPc/NPMs) não alteração em relação ao tamanho das nanopartículas (100nm), concentração de ZnPc (3,6  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) e propriedades magnéticas (31 emu/g de óxido de ferro) em relação ao encapsulamento em separado da ZnPc e NPMs. A liberação da ZnPc das nanopartículas poliméricas foi sustentada e lenta. Nas primeiras 20 horas cerca de 5-10% do ZnPc contida nas nanopartículas poliméricas foi liberada em todas as amostras. No ensaio de toxicidade (ausência de luz), as nanopartículas encapsuladas mostraram baixa toxicidade. No

ensaio de atividade fotobiológica, observou-se, que a luz isoladamente (sem nanopartículas contendo ZnPc) não foi capaz de induzir efeito citotóxico sobre a cultura de células. Ao utilizar nanopartículas contendo ZnPc observou-se uma redução acentuada da viabilidade celular para 22% (PMMA/ZnPc(FA)) e 30% (PMMA/ZnPc/NPMs).

**Palavras-chave:** Ftalocianina de Zinco, nanopartículas magnéticas, magnetita, poli(metacriato de metila), Terapia Fotodinâmica.

## ABSTRACT

Photodynamic therapy (TFD) is one of the most promising alternatives for the treatment of the cancer. Zinc phthalocyanine (ZnPc) is a second generation photosensitizer with hydrophobic character that should be incorporated in a suitable delivery system to be injected systemically. Magnetics nanoparticles (NPMs) consisting mainly of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) present high value of magnetization with great potential of application in the treatment of the cancer by hyperthermia. The simultaneous encapsulation of drugs with NPMs has been recognized as one promising technique for the treatment of the cancer making possible a synergetic action of the different types of treatment. The objective of this work was the synthesis, characterization and evaluation of the toxicity and phototoxicity of the NPMs, the encapsulation of the NPMs and ZnPc and the simultaneous encapsulation of ZnPc with NPMs by miniemulsion polymerization. The NPMs with oleic acid (AO) had been prepared by the co-precipitation method in aqueous solution. DRX analysis showed characteristic peaks of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) with average particle diameter of 13nm. The NPMs had presented high value of magnetization of saturation ( $M_s$ ) (61 emu/g of iron oxide). The encapsulation of the NPMs was carried through methyl methacrylate (MMA) miniemulsion polymerization. The polymeric particles with NPMs encapsulated presented an average diameter of 100nm with value of  $M_s$  of 34 emu/g of iron oxide. Two techniques of encapsulation were employed for the encapsulation of ZnPc. The first one was the miniemulsion polymerization with the nanoprecipitation technique (PMMA/ZnPc (FAN)) and second one used only the miniemulsion polymerization technique (PMMA/ZnPc (FO)). The amount of ZnPc in polymeric nanoparticles was higher in PMMA/ZnPc(FA) sample (3,7  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) when compared to the sample of PMMA/ZnPc (FO) (3,0  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Both techniques resulted in polymeric nanoparticles with an average diameter of approximately 100nm. The simultaneous encapsulation of ZnPc with NPMs (PMMA/ZnPc/NPMs) presented very similar values of average particle size (100nm), concentration of ZnPc (3,6  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) and magnetic properties (31 emu/g of iron oxide) when compared to the single encapsulation of ZnPc and NPMs. The release of the encapsulated ZnPc was supported and slow. In the first 20 hours approximately 5-10% of the encapsulated ZnPc was released in all samples. In the toxicity assay (light absence), the encapsulated nanoparticles had shown low toxicity. In the assay of phototoxicity

activity, it was observed that the light (without polymeric nanoparticles containing ZnPc) was not able to induce cytotoxic effect on the culture of cells. When using polymeric nanoparticles with encapsulated ZnPc an accentuated reduction of the cellular viability of 22% (PMMA/ZnPc (FA)) and 30% (PMMA/ZnPc/NPMs) was observed.

**Keywords:** Zinc phthalocyanine, magnetic nanoparticles, magnetite, poly(methacrylate-methyl), Photodynamic Therapy.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Ilustração do tratamento do câncer por hipertermia.....	38
Figura 2.2 – Estrutura Cristalina da $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (a) e Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (b) (TEJA e KOHN, 2009) .....	39
Figura 2.3 – Comportamento magnético de nanopartículas ferromagnéticas e superparamagnética, quando expostos a um campo magnético externo (DAVE e GAO, 2009).....	40
Figura 2.4 – Representação de uma partícula multi-domínio e mono-domínio. (COUTO, 2006) .....	41
Figura 2.5 – Curva de histereses (RIBEIRO, 2000).....	41
Figura 2.6 – Curva de um material superparamagnético (SINNEKER, 2000) .....	42
Figura 2.7 – As Figuras a e b mostra um esquema de nanocapsulas. e as Figuras c e d apresentam um esquema de nanoesferas (SCHAFFAZICK e GUTERRES, 2003).....	45
Figura 2.8 – Métodos usuais para preparação de nanopartículas poliméricas (SCHAFFAZICK et al, 2003).....	46
Figura 2.9 – Esquema de uma polimerização interfacial (ODIAN, 2004) .....	47
Figura 2.10 – Etapas da Polimerização em emulsão (SAYER, 1999) ..	49
Figura 2.11 – Etapas da Polimerização em miniemulsão (ASUA, 2002) .....	49
Figura 2.12 – Ftalocianina de Zinco (KOVALSKAYA et al, 2000).....	52
Figura 2.13 – Principais etapas da TFD (Henderson et al, 1992).....	53
Figura 2.14 – Mecanismos da TFD (RICCI-JÚNIOR, 2005) .....	54
Figura 2.15 – Mecanismos de ação nos tumores na TFD (Adaptado de CASTANO et al, 2006). .....	56
Figura 3.1 – Homogeneizador Fisher Scientific, Sonic Dismembrator Model 500, utilizado no processo de ultrasonificação ..	60
Figura 3.2 – Preparação das NPMs estabilizadas com AO por co-precipitação em meio aquoso .....	61
Figura 3.3 – Encapsulamento simultâneo da ZnPc e NPMs com PMMA via polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação (PMMA/ZnPc/NPMs) .....	63

Figura 3.4 – Encapsulamento da ZnPc com MMA via polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação (PMMA/ZnPc(FA)) .....	64
Figura 3.5 – Encapsulamento da ZnPc com MMA via miniemulsão (PMMA/ZnPc(FO)) .....	65
Figura 4.1 – Difratoograma de raio-X das NPMs com AO .....	74
Figura 4.2 – Microscopia Eletrônica de transmissão das NPMs revestidas com ácido oléico (A) e NPMs puras (B).....	75
Figura 4.3 – Análise termogravimétrica das NPMs com AO.....	76
Figura 4.4 – Curva de magnetização obtida por MAV das NPMs com AO, campo magnético de 20KOe (A) e campo magnético em maior escala 1,2KOe (B).....	78
Figura 4.5 – MET das nanopartículas poliméricas com NPMs.....	79
Figura 4.6 – Difratoograma de raio-X das nanopartículas polimérica de PMMA (A) e PMMA/NPMs (B) .....	81
Figura 4.7 – Análise de TGA das nanopartículas poliméricas de PMMA/NPMs.....	81
Figura 4.8 – Propriedades magnéticas das NPMs com AO e das NPMs encapsuladas com PMMA, campo magnético de 20KOe (A) e campo magnético em maior escala 4KOe (B).....	83
Figura 4.9 – Propriedades magnéticas obtidas das NPMs com AO e para as nanopartículas poliméricas com diferentes concentrações de óxido de ferro (7% e 13,6%), campo magnético de 20KOe (A) e campo magnético em maior escala 4KOe (B).....	84
Figura 4.10 – Encapsulamento da ZnPc via polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação (PMMA/ZnPc(FA)).....	86
Figura 4.11 – Identificação da ZnPc utilizando a técnica de UV-Vis... ..	87
Figura 4.12 – MET das nanopartículas poliméricas com ZnPc A) PMMA/ZnPc(FA) e B) PMMA/ZnPc(FO).....	88
Figura 4.13 – Espectros de absorção do UV-Vis da Sol.1, PMMA/ZnPc(FO) e PMMA/ZnPc(FA).....	89
Figura 4.14 – Difratoograma de Raio-X das nanopartículas poliméricas contendo aproximadamente 0,3% em massa de ZnPc. As amostras analisadas foram ZnPc livre (A), mistura física da ZnPc com PMMA (B), PMMA sem ZnPc (C), PMMA/ZnPc(FA) (D) e PMMA/ZnPc(FO) (E). .....	91

Figura 4.15 – Difratoograma de Raio-x da mistura física de PMMA com ZnPc na razão mássica de 1:1.....	92
Figura 4.16 – MET das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs (PMMA/ZnPc/NPMs).....	93
Figura 4.17 – Espectros de absorção no UV-Vis da Sol.1 e PMMA/ZnPc/NPMs.....	94
Figura 4.18 – Comparação dos espectros de absorção no UV-Vis da PMMA/ZnPc (FA), PMMA/ZnPc (FO) e PMMA/ZnPc/NPMs .....	94
Figura 4.19 – Difratoograma de Raio-X das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc. As amostras analisadas foram PMMA (A), PMMA/NPMs (B), PMMA/ZnPc/NPMs (C). .....	95
Figura 4.20 – Análise de TGA das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs.....	96
Figura 4.21 – Propriedades magnéticas obtidas das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs, campo magnético de 20KOe (A) e campo magnético em maior escala 4KOe (B).....	97
Figura 4.22 – Conversão gravimétrica das amostras de PMMA/NPMs, PMMA/ZnPc/NPMs (A) e PMMA/ZnPc(FA), PMMA/ZnPc(FO) (B).....	99
Figura 4.23 – Perfil de liberação do encapsulamento da PMMA/ZnPc(FO), PMMA/ZnPc(FA) e PMMA/ZnPc/NPMs .....	101
Figura 4.24 – Modelos matemáticos que descrevem a cinética de liberação do fármaco: ordem zero (A) e Higuchi (B).....	103
Figura 4.25 – Estudos de toxicidade (ausência de luz) e de atividade fotobiológica (irradiação de luz: 40 J/cm <sup>2</sup> ) em cultura de células A549 das nanopartículas de PMMA contendo ou não ZnPc. Dose por poço: 5 µg ZnPc e tempo de incubação de 4 horas. Média ± desvio padrão de seis experimentos independentes. *Significativamente menor do que o controle na ausência de luz (p < 0,05 ANOVA).....	105



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fármacos encapsulados com materiais poliméricos disponíveis no mercado.....	45
Tabela 2 – Síntese das NPMs estabilizada com AO.....	61
Tabela 3 – Preparação das soluções 1 e 2 .....	62
Tabela 4 – Formulações utilizadas para a preparação das miniemulsões.....	63
Tabela 5 – Propriedades magnéticas das NPMs com AO .....	77
Tabela 6 – Distribuição de tamanho de partículas e índice de polidispersidade das nanopartículas poliméricas com NPMs.....	80
Tabela 7 – Propriedades magnéticas das NPMs revestidas com ácido oléico e das NPMs encapsuladas com MMA .....	82
Tabela 8 – Distribuição de tamanho de gotas e partículas e índice de polidispersidade das nanopartículas poliméricas com ZnPc .....	88
Tabela 9 – Rendimento do processo e concentração mássica de ZnPc nas nanopartículas poliméricas .....	90
Tabela 10 – Rendimento do processo e concentração mássica de ZnPc nas nanopartículas poliméricas com NPMs .....	95
Tabela 11 – Propriedades magnéticas das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs.....	98
Tabela 12 – Estudo da cinética de liberação das amostras de PMMA/ZnPc(FO), PMMA/ZnPc(FA) e PMMA/ZnPc/NPMs. ....	104



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIBN - azobisisobutironitrilo  
ANOVA – análise estatística  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AO – Ácido oléico  
DHE – hematóporfirina  
DMEN – Meio Dulbeco's Modificado  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DRX – Difrátômetro de Raio-X  
INCA – Instituto Nacional do Câncer  
IPD – Índice de Polidispersividade  
LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica  
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão  
MMA – Metacrilato de metila  
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio  
NPMs – Nanopartículas Magnéticas  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PLGA – poli(ácido lactico-co-glicólico)  
PMMA – poli (metacrilato de metila)  
R – Rendimento de Processo  
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio  
TFD – Terapia Fotodinâmica  
TFS – SDS – Tampão fosfato Salino contendo 2% de Dodecil sulfato de Sódio  
TFS – Tampão Fosfato Salino  
TGA – Termogravimetria  
TV – Temperatura de Verwey  
UV – Ultravioleta  
Vis – Visível  
MAV – Magnetometria de Amostra Vibrante  
ZnPc – Ftalocianina de Zinco





## LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{ClFe}_3$  – Cloreto Férrico  
 $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$  – Ácido Oléico  
DPG – Diâmetro médio das gotas  
DPT – Diâmetro médio das partículas  
 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – Magnetita  
 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  – Hematita  
 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  – Maghemita  
 $\text{H}_2\text{O}$  – Água  
 $\text{H}_2\text{SO}_4$  – Sulfato Ferroso  
 $H_c$  – Campo coercivo ou coercividade  
 $K_H$  – constante de liberação de Higuchi  
 $\log$  – logaritmo  
 $M_r$  – Magnetização remanescente  
 $M_s$  – Magnetização de saturação  
 $\text{NH}_4\text{OH}$  – Hidróxido de Amônia  
 $P_c$  – Ftalocianina  
 $Q_t$  – quantidade de fármaco liberado no tempo  
 $Q_0$  – quantidade inicial do fármaco na solução  
 $K_t$  – constante de liberação de primeira ordem  
 $\text{Zn}$  – Zinco



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>31</b>
1.1 OBJETIVOS .....	32
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>35</b>
2.1 CÂNCER .....	35
2.1.1 Tratamento do Câncer.....	36
2.2 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (NPMs) .....	36
2.2.1 Estudo das NPMs.....	36
2.2.2 Aplicações das NPMs .....	37
2.2.3 Estabilidades das NPMs .....	38
2.2.4 Propriedades Magnéticas das NPMs.....	39
2.2.5 Métodos de preparação das NPMs.....	43
2.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	44
2.4 MÉTODOS MAIS UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS .....	46
2.4.1 Polimerização Interfacial ( <i>in situ</i> ).....	47
2.4.2 Polimerização em miniemulsão ( <i>in situ</i> ) .....	48
2.4.3 Nanoprecipitação ( <i>polímero pronto</i> ) .....	50
2.5 POLÍMEROS UTILIZADOS NO NANOENCAPSULAMENTO DE FÁRMACOS .....	51
2.6 FTALOCIANINA DE ZINCO (ZNPC) PARA O TRATAMENTO FOTODINÂMICA .....	52
2.7 ATIVIDADE FOTOBIOLOGICA .....	54
2.8 ENCAPSULAMENTO SIMULTÂNEO DE MEDICAMENTOS ANTICÂNCER E NPMS .....	56
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>59</b>
3.1 REAGENTES .....	59
3.2 UNIDADES EXPERIMENTAIS .....	59

3.2.1	Preparo da NPMs estabilizadas com AO.....	59
3.2.2	Preparação das Miniemulsões .....	60
3.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	60
3.3.1	Síntese das NPMs estabilizadas com AO.....	60
3.3.2	Encapsulamento simultâneo da ZnPc com NPMs via polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação .....	61
3.3.3	Encapsulamento da ZnPc via polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação ..	64
3.3.4	Encapsulamento das NPMs via polimerização em miniemulsão .....	65
3.4	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO .....	66
3.4.1	Diâmetro Médio das Nanopartículas .....	66
3.4.2	Cálculo do Rendimento do Processo (R%) .....	66
3.4.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	67
3.4.4	Termogravimetria (TGA).....	67
3.4.5	Cromatografia Gasosa (CG).....	68
3.4.6	Gravimetria.....	68
3.4.7	Difração de Raio – X.....	68
3.4.8	Magnetometria de Amostra Vibrante (MAV) .....	69
3.4.9	Espectrofotômetro UV/Vis.....	69
3.4.10	Perfil de Liberação in vitro.....	70
3.4.11	Avaliação da Toxicidade e atividade Fotobiológica das nanopartículas poliméricas em cultura de células tumerais.....	71
<b>4.</b>	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
4.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NPMS ESTABILIZADAS COM AO .....	73
4.1.1	Difração de Raio–X - DRX .....	73
4.1.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET .....	74
4.1.3	Análise termogravimétrica – TGA .....	76
4.1.4	Propriedade Magnéticas das NPMs – MAV.....	76

4.2	ENCAPSULAMENTO DAS NPMS VIA POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO COM MMA.....	79
4.2.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET e Distribuição de tamanho por espalhamento de luz .....	79
4.2.2	Difração de Raio-X.....	80
4.2.3	Análise Termogravimétrica – TGA .....	81
4.2.4	Propriedades Magnéticas – MAV.....	82
4.3	ENCAPSULAMENTO DA ZnPc VIA POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO .....	85
4.3.1	Caracterização da ZnPc pela técnica do UV-Vis.....	86
4.3.2	Morfologia e distribuição de tamanho de partículas.....	87
4.3.3	Caracterização espectrométrica e rendimento do processos das nanopartículas poliméricas com ZnPc .....	89
4.3.4	Difração de Raio-X.....	90
4.4	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS MAGNÉTICAS COM ZNPC .....	92
4.4.1	Morfologia e distribuição de tamanho das nanopartículas... ..	92
4.4.2	Caracterização espectrométricas e rendimento do processo das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs.....	93
4.4.3	Difração de Raio-X.....	95
4.4.4	Análise Termogravimétrica – TGA .....	96
4.4.5	Propriedades magnéticas das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs.....	96
4.5	CONVERSÃO GRAVIMÉTRICA.....	98
4.6	TESTE <i>IN VITRO</i> .....	100
4.6.1	Perfil de dissolução.....	100
4.6.2	Avaliação da toxicidade e da atividade fotobiológica das nanopartículas poliméricas em cultura de células tumorais.....	104
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>109</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>111</b>



A liberação controlada (prolongada e/ou modulada) de fármacos vem sendo alvo de estudos há algumas décadas, sendo que estes estudos ganharam impulso na década passada com o aprimoramento das técnicas de micro e nanoencapsulamento. Uma das áreas mais promissoras é de vetorização de fármacos. Dentre os vetores, incluem-se as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas poliméricas). Há algumas décadas atrás o uso de lipossomas como carreadores de fármacos era muito utilizado, devido suas propriedades de elevada área superficial (SOPPIMATH et al, 2000; KONERACKA et al, 2008). No entanto, o uso de lipossomas vem se tornando cada vez mais escasso devido a sua baixa eficiência de encapsulamento, sua rápida liberação de drogas solúveis em água na presença de componentes de sangue e também pela sua baixa estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento (SCHAFFAZICK et al, 2003). O encapsulamento do fármaco em nanopartículas poliméricas ajuda a aumentar a estabilidade e melhora o controle de liberação do fármaco, apresentando assim vantagens acentuadas em relação aos lipossomas (SOPPIMATH et al, 2000).

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo e hoje existem muitas pesquisas para o desenvolvimento de novos tratamentos para câncer, sendo estes mais seletivos e menos agressivos ao paciente, diminuindo assim os efeitos colaterais dos tratamentos convencionais (ZAVISOVÁ et al, 2008). Uma das alternativas mais promissoras para o tratamento do câncer é a Terapia Fotodinâmica (TFD). A TFD está baseada na administração de fármacos conhecidos como fotossensibilizadores, que são preferencialmente absorvidos e/ou retidos pelos tecidos neoplásicos (SOARES et al, 2010). A ftalocianina de zinco (ZnPc) é um fotossensibilizador de segunda geração, que apresenta uma elevada absorvidade molar na região do espectro eletromagnético correspondente a luz vermelha, sendo esta a região que apresenta a máxima transmitância de luz através dos tecidos, e portanto, a mais utilizado no tratamento de tumores. Entretanto, assim como a ZnPc, a maior parte dos fotossensibilizantes possui características

hidrofóbicas, o que constitui outro desafio. Pois, sendo pouco solúveis em água são difíceis de serem administradas em veículos fisiologicamente aceitáveis, podendo também ter a tendência de se agregar sendo este outro efeito negativo (STORPIRTIS et al, 2009). A baixa seletividade e a baixa solubilidade em água podem ser resolvidas com o desenvolvimento de técnicas de liberação apropriadas e com o encapsulamento do fármaco.

Nanopartículas de óxidos de ferro são estudados há algumas décadas. Desde o primeiro trabalho publicado por STONER e WOLFHARTH (1948) muitos outros foram desenvolvidos. O interesse nestas nanopartículas magnéticas (NPMs) aumentou quando na década de 60 evidenciou-se que estes óxidos de ferro poderiam ser muito úteis para aplicações biomédicas. Hoje as NPMs são usadas na ressonância magnética por Imagem (MRI), que tem aplicações bem conhecidas na área de diagnósticos (ZHANG et al, 2003); na liberação de drogas (GUPTA, 2004); e na hipertermia, que é utilizada para “queimar” células cancerosas muitas vezes em combinação com a quimioterapia (LANDFESTER e RAMÍRES, 2003). O encapsulamento simultâneo de NPMs com um fármaco específico desperta grande interesse pelo potencial de um efeito sinérgico de atuação. Pode-se mencionar o trabalho de ZAVISOVA et al (2007) que encapsularam a Indometacina, um agente antiinflamatório, e nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) com poli (ácido - lático) (PLA) via nanoprecipitação e KONERACKÁ et al (2008) que encapsularam o taxol, um agente quimioterápico, e nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com poli(ácido-lático-co-glicólico) (PLGA) via nanoprecipitação. Vale destacar que não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que tenha realizado o encapsulamento simultâneo de fármacos e NPMs via a técnica de polimerização em miniemulsão.

Sabendo que ZnPc é um fármaco eficaz no tratamento de células cancerígenas e as NPMs podem ser utilizadas para destruir as células cancerígenas por hipertemia, há uma grande possibilidade que o encapsulamento simultâneo destes compostos apresente um efeito sinérgico no tratamento do câncer, que possa representar um grande avanço terapêutico.

## 1.1 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal o encapsulamento simultâneo de NPMs (nanopartículas de magnetita) e ftalocianina de zinco (ZnPc) via polimerização do metacrilato de metila (MMA) em



miniemulsão permitindo a obtenção de nanopartículas de PMMA contendo ZnPc e NPMs.

Como objetivos secundários pode-se destacar a:

- Síntese e caracterização das NPMs (nanopartículas de magnetita), bem como o encapsulamento destas nanopartículas via a técnica de polimerização em miniemulsão com a conseqüente caracterização das nanopartículas após a encapsulamento.
- Encapsulamento da ZnPc via polimerização do MMA em miniemulsão. Esta etapa tem o desafio adicional da baixa solubilidade da ZnPc em água e também no monômero, MMA, utilizado nas reações de polimerização. Esta etapa inclui a determinação de teor de ZnPc encapsulado.
- Encapsulamento simultâneo da ZnPC e NPMs via polimerização de MMA em miniemulsão. Caracterização das nanopartículas de PMMA contendo ZnPC e NPMs.
- Realização de testes *in vitro* para avaliar a toxicidade das nanopartículas, fototoxicidade das nanopartículas em células tumorais A549 e ensaios de liberação do fármaco.



Neste capítulo será apresentada uma breve revisão de literatura acerca dos assuntos tratados neste trabalho. Primeiramente será apresentada uma breve introdução referente ao câncer e seus tratamentos disponíveis. Na sequência irá ser comentado um pouco sobre as NPMs, suas propriedades químicas e físicas e suas aplicações na área biomédica. Em seguida serão apresentadas algumas técnicas para preparação das nanopartículas poliméricas e por fim será apresentada uma revisão da ftalocianina de zinco (ZnPc) e da terapia fotodinâmica (TFD).

#### 2.1 CÂNCER

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo.

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), mostram que o câncer é a segunda principal causa de mortes em todo o mundo, perdendo apenas para doenças cardiovasculares. Segundo o relatório, os casos de câncer dobraram entre 1975 e 2000, e devem duplicar novamente entre 2000 e 2020. Em 2030, o câncer poderá matar 17 milhões de pessoas, contra os 7,6 milhões de óbitos que provocou em 2007, adverte o relatório. Os maiores índices de óbito ocorrem nos casos de câncer de pulmão, estômago fígado, cólon e mama. O câncer de pulmão é o mais comum de todos os tumores malignos e permanece como uma doença altamente letal. No Brasil, o INCA estima 500 mil novos casos de câncer neste ano de 2011.

### 2.1.1 Tratamento do Câncer

O tratamento clássico do câncer envolve diversas terapias como a quimioterapia, a cirurgia e a radioterapia. Os objetivos da quimioterapia e da radioterapia são impedir a proliferação celular e promover a destruição das células tumorais, que são mais susceptíveis à morte por possuírem uma maior velocidade de crescimento do que as células saudáveis (SOARES, 2009). No entanto estes tratamentos convencionais também interferem nas células saudáveis e por isso existe um grande esforço para o desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer, sendo estes mais seletivos que os tratamentos convencionais. O Tratamento com NPMs e a TFD são considerados tratamentos promissores para o combate do câncer por apresentar alta seletividade, ou seja, a droga atua diretamente nas células tumorais não danificando assim as células saudáveis.

Nos próximos capítulos será discutido um pouco mais sobre estas novas tecnologias para o combate do câncer, tendo como ênfase o tratamento com NPMs e o tratamento com fármaco fotodinâmico (ZnPc).

## 2.2 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (NPMs)

### 2.2.1 Estudo das NPMs

Óxidos de Ferro vêm sendo alvo de estudos na escala nano mais do que qualquer outro material há algumas décadas. Óxidos de ferro existem em muitas formas na natureza como magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), e hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), sendo esta provavelmente a mais comum (TEJA e KOHN, 2009).

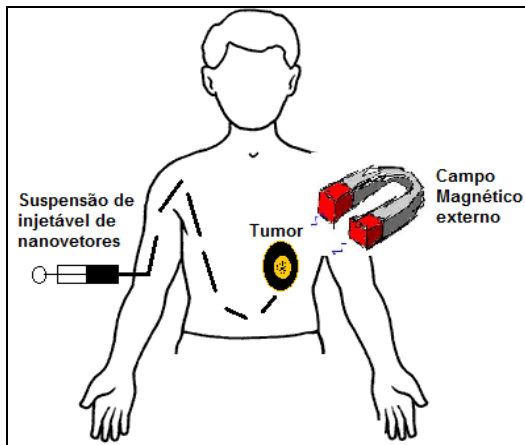
O primeiro trabalho publicado foi por Stoner e Woltharth (1948) e logo em seguida muitos outros trabalhos envolvendo NPMs foram publicados. Até os anos 60, muitas técnicas de preparação de óxido de ferro na escala nanométrica tinham sido desenvolvidas. Com este grande interesse neste material, levou-se a especulação que estes óxidos de ferro poderiam ter aplicações também na área de biologia e médica (GRADY, 2002). A partir destes trabalhos muito outros foram desenvolvidos e muitos métodos para a preparação de óxidos de ferro foram descritos. Para uma determinada aplicação, sendo ela tecnológica ou biomédica, os métodos de preparação podem influenciar na

característica final do material, sendo assim, cada método de preparação pode ser específico para uma determinada aplicação (GRADY, 2002).

### 2.2.2 Aplicações das NPMs

As propriedades magnéticas dos óxidos de ferro têm sido exploradas em uma ampla gama de aplicações incluindo selos magnéticos, tintas, gravação magnética, catalisadores e ferrofluidos, mostrando assim o grande interesse neste material, como comentado anteriormente (TEJA e KOHN, 2009). Para determinadas aplicações como nas aplicações biomédica é importante sempre lembrar que as NPMs têm que apresentar características bem definidas.

As NPMs para aplicações na área biomédica se enquadram em duas categorias: as que envolvem o uso *in vivo* e o uso *in vitro*. Como exemplo de aplicações biomédicas *in vitro* e *in vivo* pode-se citar a Ressonância Magnética por Imagem (MRI), que tem aplicações bem conhecidas na área de diagnósticos, como contrataste para MRI (ZHANG et al, 2003); liberação de drogas, que além de seu tamanho reduzido e baixa toxicidade para o homem, as NPMs podem ser transportadas através de um campo magnético, penetrando profundamente no tecido humano (GUPTA, 2004); A Hipertermia (Figura 2.1) é utilizada para “queimar” células cancerosas, muitas vezes em combinação com quimioterapia (LANDFESTER e RAMÍRES, 2003), sendo que é fato conhecido que as células cancerígenas são mais sensíveis a temperaturas superiores a 41° C do que os seus homólogos normais. Isolamento Celular onde NPMs quando exposta a um campo magnético externo permite a separação de uma grande variedade de entidades biológicas, como exemplos pode-se citar, o isolamento das células cancerosas em amostras de sangue ou de células estaminais de medula óssea para permitir a melhoria do diagnóstico e eliminação de toxinas do corpo humano (GRADY, 2002).



**Figura 2.1 – Ilustração do tratamento do câncer por hipertermia**

Apesar deste vasto leque de aplicações na área biomédica algumas destas aplicações podem apresentar riscos, sendo de fundamental importância a compreensão de suas propriedades e interações com células, tecidos e órgãos do homem, sendo este, considerado mais um desafio científico que deve ser abordado para verificar a viabilidade da utilização da nanobiotecnologia em aplicações biomédicas (LANDFEST e RAMIRES, 2003).

### **2.2.3 Estabilidades das NPMs**

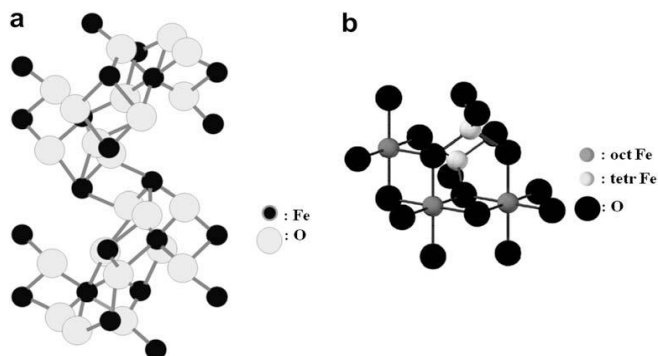
Nanopartículas dispersas em fluidos magnéticos tendem a se aglomerar espontaneamente para reduzir a grande energia livre de superfície. Como essa agregação ocorre por meio de processos lentos, o fluido pode apresentar propriedades inalteradas por longos períodos de tempo. No entanto não se trata de uma situação de estabilidade termodinâmica, mas apenas de uma transformação muito lenta. Este tipo de situação recebe o nome de estabilidade coloidal que é, portanto, uma estabilidade cinética (DURÁN et al, 2006).

Para promover a estabilidade coloidal é necessária a introdução de fatores que se contraponham as interações atrativas de Van de Waals, que, embora sejam de curto alcance, são suficientemente fortes para provocar a agregação irreversível das nanopartículas (ROSENSWEIG, 1985). Entender as propriedades magnéticas é um tema central no estudo de colóides magnéticos. As propriedades de NPMs resultam

tanto de características intrínsecas quanto das interações entre as nanopartículas. Assim as propriedades macroscópicas são largamente afetadas pela sua estrutura microscópica.

A  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  apresenta uma estrutura octaédrica e tetraédrica com os íons de  $\text{Fe(III)}$  ligados às duas estruturas. Desta forma a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  apresenta uma forma cristalina de maior qualidade quando comparado a outros óxidos de ferro como, por exemplo, a  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  que apresenta os íons de  $\text{Fe(III)}$  apenas na estrutura octaédrica (Figura 2.2) (ZHANG e KOHLER, 2002).

Os íons de  $\text{Fe(II)}$  na  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estão ligados na estrutura Octaédrica tendo o sítio todo preenchido e organizado. Enquanto que na  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  dois terços (2/3) dos sítios esta preenchidos e os outros vagos. Haneda e Morrish (1977), afirmam que partículas menores que 20 nanômetros (nm) apresentam em sua estrutura, sítios cada vez mais vagos, diminuindo ainda mais sua qualidade cristalina (TEJA e KOHN, 2009).



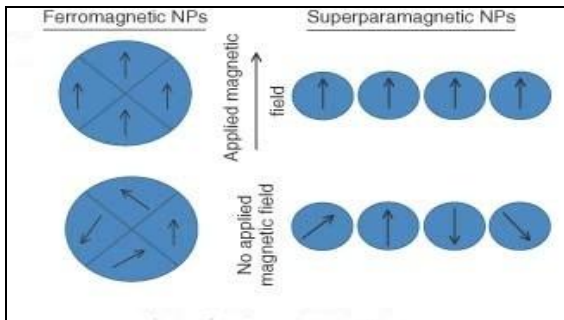
**Figura 2.2 – Estrutura Cristalina da  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (a) e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (b) (TEJA e KOHN, 2009)**

## 2.2.4 Propriedades Magnéticas das NPMs

Segundo Rezende (1996), dependendo da origem microscópica de sua magnetização e das interações internas, os materiais são comumente classificados em uma das seguintes categorias:

- Diamagnetismo
- Paramagnetismo
- Ferromagnetismo
- Ferrimagnetismo
- Antiferromagnetismo

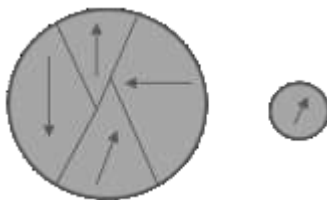
Quando se fala em propriedades magnéticas de óxidos de ferro dependendo da temperatura e volume, estas podem apresentar-se com propriedades paramagnético, ferromagnético, ferrimagnético e superparamagnético. Como um exemplo de um óxido de ferro podemos citar a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , que apresenta propriedades ferromagnéticas na escala micrométrica e propriedades superparamagnética na escala nanométrica (10-20nm) (DAVE, GAO, 2009; ROSENSWEIG, 1985). Na Figura 2.3 pode-se observar o comportamento magnético de um material ferromagnético e superparamagnético.



**Figura 2.3 – Comportamento magnético de nanopartículas ferromagnéticas e superparamagnética, quando expostas a um campo magnético externo (DAVE e GAO, 2009)**

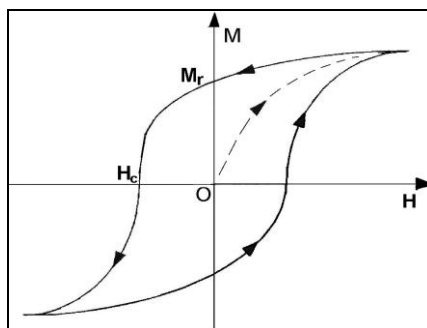
Materiais ferromagnéticos quando desmagnetizadas são divididos em pequenas regiões, denominadas domínios onde todos os momentos magnéticos estão ordenados. Quando a amostra é colocada em um campo magnético externo os domínios tendem a se alinhar com o campo (Figura 2.3) alcançando um valor de magnetização máximo (Grau de Saturação) (SINNERKER, 2000). Quando o material apresenta um tamanho bastante reduzido os domínios se fundem em um único, gerando uma partícula mono-domínio. O tamanho para o qual um material nanoestruturado passa de multi-domínio para mono-domínio depende de cada material, sendo conhecido como tamanho crítico. Caso a partícula formada seja esférica, chama-se diâmetro crítico. Quando o material apresenta o diâmetro maior que o diâmetro crítico, este se apresenta como multi-domínio; se o diâmetro for menor que o crítico a partícula se apresenta mono-domínio. A Figura 2.4 traz a representação de partículas multi e mono-domínio dependentes do diâmetro crítico que o material apresenta (COUTO, 2006).





**Figura 2.4 – Representação de uma partícula multi-domínio e mono-domínio. (COUTO, 2006)**

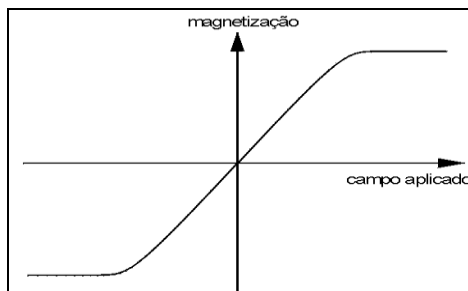
Na Figura 2.5 pode-se observar o comportamento da magnetização ( $M$ ) em função do campo magnético ( $H$ ) sendo este característico de um material magneticamente duro como o aço temperado (preparado por aquecimento, seguido de resfriamento brusco). Aplicando-se um campo no material inicialmente desmagnetizado, este seguirá uma curva até atingir um patamar constante chamado de magnetização de saturação ( $M_s$ ). Diminuindo o campo a partir deste valor a  $M_s$  decresce mais lentamente seguindo o sentido dado pela seta, até um valor residual da magnetização para um campo nulo chamado de magnetização remanescente ( $M_r$ ). O material permanece magnetizado sem aplicação de campo como os ímãs de geladeira. Invertendo o sentido do campo seguindo no mesmo sentido da curva para valores de  $M$  menores que  $M_r$  até que a magnetização se anule para um determinado valor de campo chamado de campo coercivo ( $H_c$ ) (SINNEKER, 2000).



**Figura 2.5 – Curva de histereses (RIBEIRO, 2000)**

Neste caso se continuar a variar o módulo de campo, chega-se novamente a uma região de saturação e repetindo o ciclo no sentido inverso obtemos uma curva fechada que é chamada de ciclo de histerese. No entanto materiais com dimensões extremamente pequenas como as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  apresentam um único domínio, também denominado de mono domínio magnético. Neste contexto cada átomo de uma partícula faz parte de um arranjo magneticamente alinhado em uma única direção e portanto, o momento magnético total é a soma de todos os momentos atômicos da partícula (CULLITY, 1972).

Quando uma partícula de mono-dominio é uniformemente magnetizada com spins apontados em uma única direção, a magnetização vai ser revertida por rotações dos spins, já que não tem parede para impedi-la. Assim como o  $H_c$  necessário para reduzir a magnetização para zero, será alto, as nanopartículas de mono-dominio apresentarão alta  $H_c$ . Esse efeito inicia quando as partículas começam a diminuir e a energia térmica começa a se equiparar a energia necessária para reverter a direção do spin e formando um estado superparamagnético. Diz-se que uma partícula é superparamagnética a uma dada temperatura se o seu tempo característico, ou tempo de relaxação, for menor que o tempo necessário para realizar a medida. É importante destacar aqui que então a definição se uma partícula é superparamagnética ou não vai depender do tempo necessário para realizar as medidas. A figura 2.6 ilustra uma curva de um material que não manifesta histerese no processo de magnetização, típico de um material superparamagnético. (KNOBEL, 2000)



**Figura 2.6 – Curva de um material superparamagnético (SINNEKER, 2000)**

A  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  apresenta uma magnetização de saturação  $M_S = 480$  kA/m na temperatura ambiente e sua variação com a temperatura ( $M_s \times T$ ), que define a temperatura de Curie da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  como sendo de aproximadamente  $580^\circ\text{C}$ . A  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  apresenta uma transição quando submetida às baixas temperaturas. Abaixo de 120 K há um ordenamento dos íons de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  na sub-rede octaédrica e a unidade de cela é ligeiramente distorcida da simetria cúbica para monoclinica (DUNLOP e OSDEMIR, 1997).

Acima de 120 K o ordenamento se quebra, havendo um pulso contínuo de um elétron de um  $\text{Fe}^{2+}$  para o seu vizinho  $\text{Fe}^{3+}$ , convertendo o  $\text{Fe}^{2+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$  e vice-versa. Todas as direções serão equivalentes e a rede é perfeitamente cúbica. Esta transição é denominada de Transição de Verwey (TV) e a mobilidade do elétron converte a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de um isolante elétrico a um semicondutor. Acima da TV quebra-se a ordenação do  $\text{Fe}^{3+}$ , de tal modo que podem associá-la a uma população  $\text{Fe}^{2,5+}$ , isto é, cada sítio é ocupado pela metade do tempo por  $\text{Fe}^{2+}$  e outra metade do tempo, por  $\text{Fe}^{3+}$ . A constante de anisotropia magnetocristalina da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  é negativa e tem o valor de  $1,35 \times 10^4 \text{J/m}^3$  a temperatura ambiente. Durante o resfriamento em baixas temperaturas, a constante anisotrópica aumenta e é zero a 135 K. A temperatura onde isto ocorre ( $15^\circ\text{C}$  acima da temperatura de Verwey) é chamada de ponto isotrópico. As propriedades magnéticas dependentes da anisotropia magnetocristalina (magnetização remanente, suscetibilidade magnética, coercividade) mudam abruptamente em torno da TV (DUNLOP; OSDEMIR, 1997).

O desenvolvimento de uma grande variedade de dispersões coloidais de NPMs de óxidos de ferro superparamagnéticos, é devido às posições de seus SPINs (Figura 2.3), que são capazes de atravessar a barreira por um transporte direto ou até mesmo utilizando uma via indireta e também para documentar lesões ativas no cérebro, como por exemplo, a IMR como comentado anteriormente (CENGELLI et al, 2006).

## 2.2.5 Métodos de preparação das NPMs

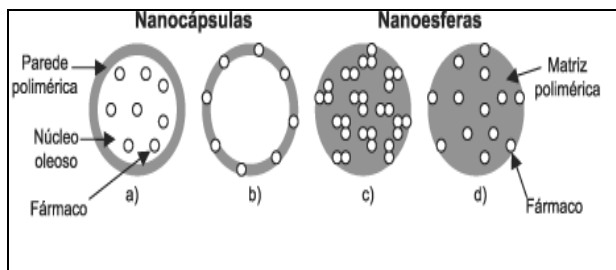
O Avanço no uso de NPMs para aplicações biomédicas depende do método de síntese com um controle da distribuição do tamanho das nanopartículas, propriedades magnéticas e as características superficiais das nanopartículas (GUPTA, 2004). Nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  podem ser preparadas por uma variedade de métodos físicos e químicos. Entre os métodos físicos destacam-se o método de sós coloidais por

desagregação, por deposição por vapor e do arco de Carbono (DURÁN et al, 2006). Entre os procedimentos químicos destacam-se o método por Co-precipitação em microemulsão (micela reversa); decomposição de compostos por coordenação; Decomposição por sonificação; Redução de íons metálicos e Co-precipitação em meio aquoso (TARTAJ et al, 2003).

O método por co-precipitação em meio aquoso é o mais utilizado para preparação das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Com este método é fácil regular o valor do pH e o tamanho das nanopartículas, fatores que são de extrema importância para a qualidade final das NPMs (ZHU e WU, 2003). A preparação das NPMs consiste na co-precipitação dos íons metálicos em soluções aquosas através de reações de hidrólise alcalina (DURÁN et al, 2006). A partir deste método é possível produzir nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com a adição de ácido oléico que permite a suspensão e a estabilização das mesmas como comentado anteriormente (ZHANG et al, 2003).

### 2.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a  $1 \mu\text{m}$ , podendo variar de tamanho dependendo do campo de aplicação (SCHAFFAZICK e GUTERRES, 2003). Quando se fala em nanopartículas pode-se falar de nanoesferas ou nanocapsulas como mostra a Figura 2.7. Nas nanoesferas o fármaco esta homogeneamente disperso ou solubilizado na matriz polimérica, obtendo assim um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Nanocapsulas são sistemas vesiculares na qual o fármaco esta confinado em uma cavidade, consistindo em um interior núcleo-liquido rodeado por uma matriz polimérica (REIS et al, 2005).



**Figura 2.7 – As Figuras a e b mostra um esquema de nanocápsulas. e as Figuras c e d apresentam um esquema de nanoesferas (SCHAFFAZICK e GUTERRES, 2003)**

A vetorização de fármacos é uma operação que visa modular e, se possível, direcionar totalmente a distribuição de uma substância, associando-a a um sistema apropriado, denominado vetor. Os vetores podem ser classificados em três grupos principais: primeira geração (é necessária empregar um modo de administração especial, exemplo: Quimiembolização), segunda geração (não é necessário empregar um modo de administração, exemplo: nanoesferas e nanocápsulas), terceira geração (são capazes de reconhecer o alvo visado, exemplo: anticorpos) (PUISIEUX e TREUTEL, 1988).

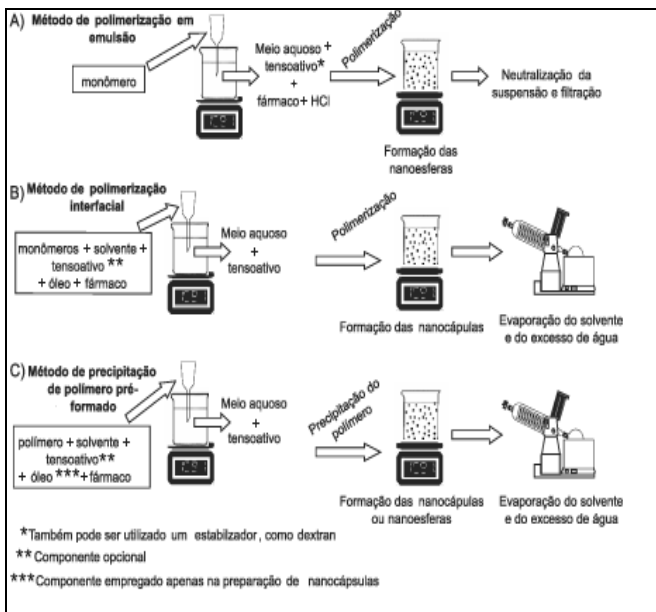
Uma das aplicações mais promissoras para a utilização de nanopartículas poliméricas quando falamos em vetorização de fármacos é o tratamento de câncer, onde podemos encontrar muitos estudos relacionados ha vetorização de fármacos anticancerígenos. A Tabela 1 mostra alguns fármacos disponíveis no mercado, encapsulados com materiais poliméricos.

**Tabela 1 – Fármacos encapsulados com materiais poliméricos disponíveis no mercado**

Medicamentos	Disponibilidade	Tratamento
<b>Adagen</b>	No mercado	SCDI Síndrome
<b>Zinostatin Stimaler</b>	No mercado	Câncer
<b>Oncaspar</b>	No mercado	Câncer
<b>PEG-INTRON™</b>	No mercado	Câncer
<b>PEGASYS</b>	No mercado	Hepatite C
<b>PEGvisomant</b>	No mercado	Acromegalia

## 2.4 MÉTODOS MAIS UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser, de uma forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados como mostra a Figura 2.8. (SCHAFFAZICK et al 2003). Entre os principais métodos para preparação nanopartículas polimérica *in situ* podemos destacar a polimerização interfacial, polimerização em emulsão e miniemulsão. Já na técnica de polimerização com polímero pré-formados pode-se destacar o método de nanoprecipitação e emulsificação e evaporação de solvente.



**Figura 2.8 – Métodos usuais para preparação de nanopartículas poliméricas (SCHAFFAZICK et al, 2003)**

Muitos dos monômeros adequados para um processo de polimerização micelar em uma fase aquosa, podem apresentar uma baixa biodegradação ou não serem polímeros biodegradáveis. Além

disso, as moléculas residuais no meio da polimerização (monômero, oligômero, surfactante etc) podem ser tóxicas, necessitando de purificação meticulosa do material coloidal. Para evitar essas limitações, métodos que utilizam polímeros pré-formados, em vez de monômeros, polímeros prontos têm sido propostos na literatura (REIS et al, 2005). A partir de agora será apresentado os principais métodos aplicados na preparação de nanopartículas poliméricas.

### 2.4.1 Polimerização Interfacial (*in situ*)

Muitos dos polímeros produzidos comercialmente a altas temperaturas podem ser obtidos também a baixas temperaturas utilizando-se as reações de *Schotten-Baumann* a partir do uso de ácido clorídrico (ODIAN, 2004). A técnica de utilização destes reagentes a baixas temperaturas denomina-se polimerização interfacial. Na técnica da polimerização interfacial (Figura 2.9), como o próprio nome sugere a reação de polimerização entre dois reagentes é realizada na interface entre duas fases líquidas, cada uma contendo um dos reagentes. A reação de poliamidação é realizada em temperatura ambiente utilizando-se uma solução aquosa de diamina no topo de uma fase orgânica contendo o ácido clorídrico. O mecanismo desta técnica é composto pela etapa de difusão dos reagentes até a interface das fases, seguida pela reação de polimerização. O polímero formado na interface é continuamente removido na forma de um filme ou filamento, conforme a Figura abaixo. Se o sistema for agitado, o polímero produzido apresenta a forma de partículas fibrosas (NOGUEIRA et al, 2002).

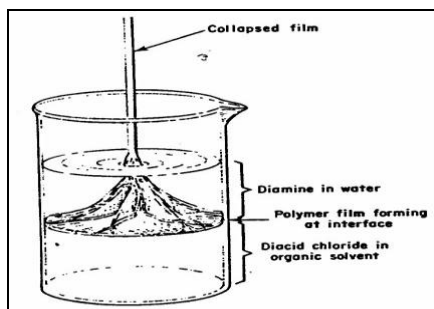


Figura 2.9 – Esquema de uma polimerização interfacial (ODIAN, 2004)

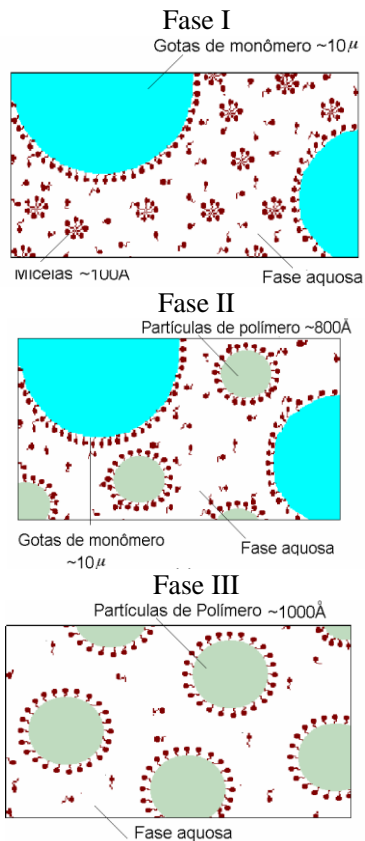
### 2.4.2 Polimerização em miniemulsão (*in situ*)

Miniemulsões são classicamente definidas como dispersões aquosas de gotículas de óleo relativamente estáveis, dentro de uma faixa de tamanhos de 50-500 nm, preparadas por um sistema contendo óleo, água, surfactante e um co-estabilizador (LANDFESTER et al, 2009). Nos últimos 25 anos, a técnica de polimerização em miniemulsão tem crescido muito e vem sendo o foco de uma grande quantidade de trabalhos acadêmicos. Durante este tempo alguns produtos baseados nesta tecnologia foram comercializados e, nos próximos anos uma série de novos produtos será comercializado utilizando esta técnica de polimerização (SCHORK et al, 2005).

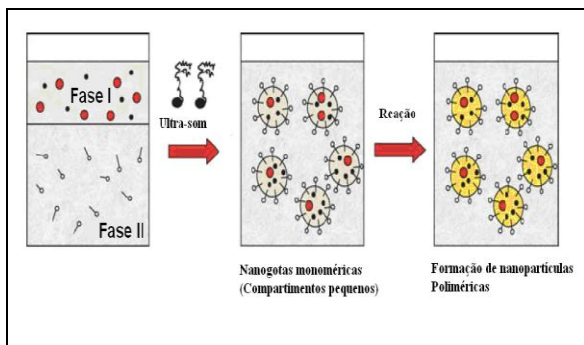
A técnica de polimerização convencional em emulsão e a técnica de polimerização em miniemulsão são diferentes. Na polimerização em emulsão o monômero sai das gotas, e vai formando oligômero na fase aquosa pela reação com radicais oriundas da decomposição do iniciador hidrofílico, e quando se torna hidrofóbico pelo aumento da cadeia apolar, entra nas micelas, como mostra a Figura 2.10. Na polimerização em miniemulsão (Figura 2.11) as gotas são sub-micrométricas. Na primeira etapa do processo de polimerização, pequenas gotas de 50-500 nm são formadas pela dispersão de um sistema contendo a fase dispersa (monômero, co-estabilizador) sendo que o iniciador pode ser hidrofílico ou hidrofóbico, a fase contínua (água e surfactante). O sistema é obtido através de um equipamento de alto cisalhamento, como por exemplo, sonda de ultra-som. Na segunda etapa, estas gotas são polimerizadas pela adição de iniciador e/ou aumento da temperatura. O tamanho das gotas, diretamente depois do preparo da miniemulsão, depende principalmente das quantidades e tipos de surfactante e co-estabilizador e das condições de dispersão (LANDFESTER, 2006).

A degradação difusional (Ostwald ripening) e a coalescência podem levar a desestabilização e subsequente perda da miniemulsão (CAPEK, 2004). Para criar uma miniemulsão estável, as gotas devem ser estabilizadas contra a degradação de Ostwald causada por processos difusionais e contra a coalescência por colisões (ASUA, 2002). O co-estabilizador aumenta a estabilidade da miniemulsão consideravelmente, pois este impede eficientemente a degradação das gotas menores.





**Figura 2.10 – Etapas da Polimerização em emulsão (SAYER, 1999)**



**Figura 2.11 – Etapas da Polimerização em miniemulsão (ASUA, 2002)**

A miniemulsão pode apresentar algumas vantagens sobre a emulsão convencional. Por exemplo, se a polimerização envolve um ingrediente muito insolúvel, este apresenta dificuldade para passar pela fase aquosa em emulsão convencional, mas pode ser posto diretamente nas gotas da miniemulsão que são o lócus de polimerização. O látex formado por miniemulsão também pode apresentar uma viscosidade e estabilidade coloidal diferente da emulsão convencional. O diâmetro típico de uma partícula polimérica formada por miniemulsão está entre 30 à 660 nm. Um problema da polimerização em miniemulsão é que o co-estabilizador permanece nas nanopartículas poliméricas depois da polimerização e pode ter um efeito negativo nas propriedades do polímero (ASUA, 2002).

### **2.4.3 Nanoprecipitação (*polímero pronto*)**

A técnica de nanoprecipitação para a preparação de nanopartículas poliméricas, foi desenvolvida e patenteada por Fessi et al (1989). Esta técnica apresenta inúmeras vantagens quando comparadas a outras técnicas, sendo uma técnica simples, rápida e fácil de executar.

A nanoprecipitação ocorre por uma rápida dessolvatação do polímero quando a fase orgânica é adicionada, sob agitação, à fase aquosa (não-solvente) contendo surfactante. A precipitação do polímero é resultado de uma rápida difusão do solvente para o meio aquoso. O fármaco é imediatamente aprisionado ao polímero durante a precipitação. Esta técnica de nanoprecipitação nos permite a produção de nanopartículas pequenas (100-300 nm) com distribuição unimodal estreitas e uma grande variedade de polímeros pré-formados podem ser utilizados, dependendo da aplicação de cada material preparado. Este método não necessita de um alto cisalhamento e nem de altas temperaturas. Além disso, os surfactantes muitas vezes nem são necessário e os solventes tóxicos geralmente são excluídos deste processo (BILATI et al, 2004; FESSI et al, 1989; REIS et al, 2006). YOO et al (2001) realizou experimento para encapsular lisozima. Resumidamente YOO et al 2001, realizaram com sucesso a difusão de uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO), contendo ambas proteínas e o polímero (PLGA) em uma solução aquosa com poloxamer 407. Este trabalho evidenciou que a técnica de nanoprecipitação pode ocorrer mesmo com outros solventes, e pode levar a formação de nanopartículas, utilizando fármacos hidrofílicas.

## 2.5 POLÍMEROS UTILIZADOS NO NANOENCAPSULAMENTO DE FÁRMACOS

Polímeros são a classe mais versátil de biomateriais, sendo amplamente aplicada nas diversas áreas médicas tais como a engenharia de tecidos, implantes artificiais órgãos, aparelhos médicos, próteses, lentes de contato, materiais odontológicos e farmacêuticos. Os recentes progressos no domínio das nanotecnologias, bem como a investigação activa na interface da química dos polímeros e da biomedicina abriu oportunidades de usar novos sistemas poliméricos nanométricos em biologia, engenharia biológica molecular, diagnóstico e terapêutica (BRIEN et al, 2010). Polímeros naturais são abundantes, geralmente biodegradável e oferecem boa biocompatibilidade. A maioria dos sistemas de distribuição de drogas têm sido base de proteínas (por exemplo, colágeno, gelatina e albumina) e polissacarídeos. Por exemplo, a quitosana e seus derivados têm mostrado excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa imunogenicidade e atividades biológicas. No entanto a principal desvantagem de polímeros naturais está associada à sua complexidade estrutura. Já os polímeros sintéticos vem ganhando espaço em função de sua estabilidade, solubilidade e biocompatibilidade permitindo direcionamento seletivo de drogas com um adequado perfil de liberação de farmacos (BRIEN et al, 2010).

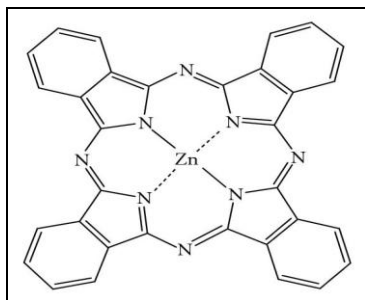
Muitos polímeros sintéticos vêm sendo testados para uso em humanos. Alguns dos materiais que estão sendo usados comercialmente em sistemas de liberação controlada de fármacos são: Poli (2-hidroxi etil metacrilato), poli(N-vinil pirrolidona), poli(metil methacrilato), poliacrilamida, polilactídeos (PLA), poliglicosídeos (PGA), poli(lactato-co-glicolato) (PLGA), poli(anidridos). (SOPPIMATH et al, 2000). No entanto outros polímeros vêm sendo testados como o poli(metacrilato de metila) (PMMA), poli-(acetato de vinila) (PVAc), poli(uretano) (PU) entre outros. É importante sempre lembrar que para determinadas aplicações o polímero deve que apresentar biocompatibilidade, ser biodegradável e ainda apresenta baixa toxicidade (MUSYANOVYCH et al, 2008).

Os polímeros, por décadas, desempenharam uma função importante como excipientes em comprimidos e formulações em cápsula, agiram na area parenteral como potencializadores do tempo de circulação no sangue, e agora são capazes de oferecer funções sofisticadas (como liberação de fármacos no sitio específico) aos medicamentos. Os polímeros possuem propriedades únicas que não são

encontrados em compostos de baixo peso molecular gerando materiais ricos com amplo espectro de aplicações tanto na área tecnologia como na área biomédica (UCHEGBU e SHALTZLEIN, 2006).

## 2.6 FTALOCIANINA DE ZINCO (ZNPC) PARA O TRATAMENTO FOTODINÂMICA

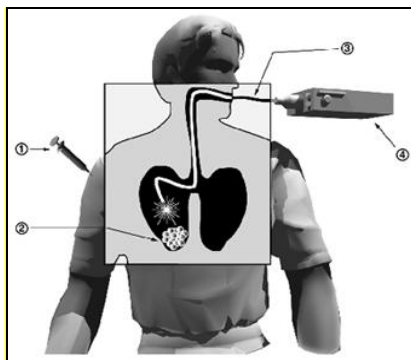
Ftalocianinas são compostos macrocíclicos altamente conjugados que apresentam propriedades como alta estabilidade térmica e química, propriedades semicondutoras, reatividade fotoquímica, entre outras, despertando assim o interesse para aplicações em diversas áreas (PERES et al 2006). A ZnPc (Figura 2.12) é um fotossensibilizador de segunda geração, que apresenta uma elevada absorvidade molar na região do espectro eletromagnético correspondente à luz vermelha, sendo esta a região que apresenta a máxima transmitância de luz através dos tecidos, e portanto, a mais utilizada no tratamento de tumores. Sua lipofilicidade contribui para sua localização nas membranas plasmáticas, nos microsomas e nas mitocôndrias.



**Figura 2.12 – Ftalocianina de Zinco (KOVALSKAYA et al, 2000)**

Para quem não conhece o procedimento, TFD parece ter elementos “mágicos”. Um fármaco é administrado sistêmica ou topicamente, acumula-se nos tecidos neoplásicos e, quando estes tecidos são irradiados com uma luz no comprimento de onda visível ocorre à erradicação do tumor. A Figura 2.13 traz as principais etapas da TFD administrada intravenosa. A ZnPc tem sido muito estudada, entre outras coisas, pelo fato de apresentar espectro de absorção muito menos

complexo que ftalocianinas com outros metais de transição (OLIVEIRA et al 2004). A TFD consiste em modalidade terapêutica que envolve a ativação de substâncias fotossensíveis, fonte de luz e a geração de espécies citotóxicas de oxigênio e de radicais livres para promover a destruição seletiva dos tecidos-alvos (RICCI-JÚNIOR e MARCHETTI, 2006; SOARES, 2009).



- 1- O Fotossensibilizante é injetado na corrente sanguínea;
- 2- Acumula-se preferencialmente no tumor;
- 3- Uma sonda de fibra óptica conduz luz até o tumor;
- 4- A luz ativa o fármaco, liberando espécies tóxicas que destroem as células.

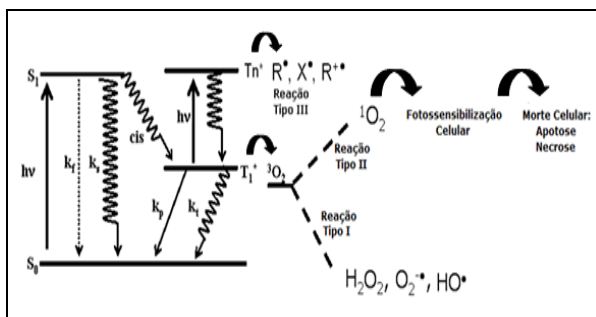
**Figura 2.13 – Principais etapas da TFD (Henderson et al, 1992)**

Os trabalhos clínicos pioneiros de Dougherty et al (1978), com o uso sistêmico do derivado de hematoporfirina (DHE) em TFD e a posterior aprovação de seu derivado purificado (*porfimer sodium*) para tratamento de certos tipos de tumores consistiram em avanços e ampliaram as perspectivas da inclusão da TFD no arsenal da terapêutica oncológica (TOMAZINI et al, 2007). As nanopartículas de polímeros biodegradáveis podem oferecer uma solução ideal para liberação sustentada de agentes anti-câncer, porque eles são facilmente fabricados e representam uma alternativa atraente que melhora a modulação da entrega da droga, devido ao seu pequeno diâmetro ( $< 1000$  nn), podendo ser usadas como transportadoras de drogas injetáveis (TOMAZINI et al, 2007).

Estudos mais recentes têm comprovado a eficiência das ftalocianinas como agentes fotossensíveis para uso em TFD que já tem seu emprego clínico aprovado na Rússia.

## 2.7 ATIVIDADE FOTOBIOLOGICA

A atividade fotodinâmica inicia-se quando o fotossensibilizante absorve um fóton de luz e sofre decaimentos que resultam em reações de transferência de energia intramolecular. As principais classes de reações são foto-oxidação por radicais (Tipo I), foto-oxidação por oxigênio singlete (Tipo II) e fotorreação sem envolvimento do oxigênio (Tipo III) (SIBATA et al, 2000). As principais reações estão representadas na Figura 2.14 e a explicação de cada etapa está descrita a seguir.



**Figura 2.14 – Mecanismos da TFD (RICCI-JÚNIOR, 2005)**

$h\nu$  – absorção de luz

$S_0$  – estado singlete fundamental

$S_1$  – estado singlete excitado

$T_n$  – segundo estado triplete excitado

$T_1$  – primeiro estado triplete excitado

$K_f$  – constante de velocidade de fluorescência

$K_p$  – constante de velocidade de fosforescência

ic – conversão intersistema

cis – cruzamento intersistema

$k_e$  e  $k_t$  – constantes de decaimento não radioativo

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

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

$^1O_2$  – oxigênio no estado excitado singlete

$^3O_2$  – oxigênio no estado fundamental (estado triplete)

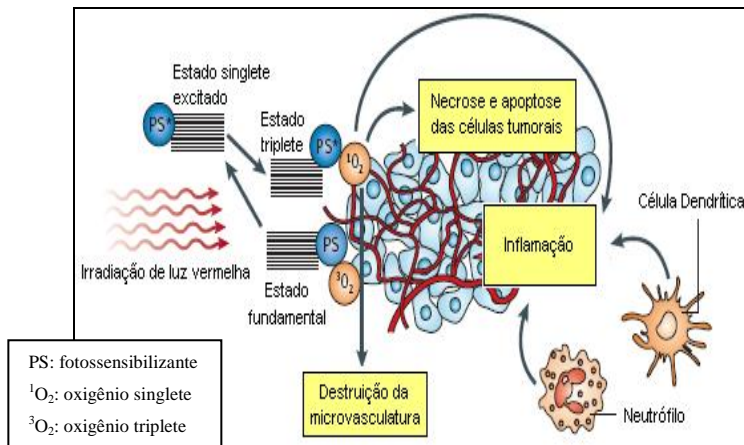
Após a absorção de um fóton de luz, o fotossensibilizante no estado fundamental ( $S_0$ ) é ativado para um estado singlete excitado ( $S_1$ ). Moléculas nesse estado decaem rapidamente de volta ao estado fundamental ( $S_0$ ) com a emissão de luz (fluorescência) ( $K_f$ ) ou calor

( $K_s$ ), ou podem ir ao estado triplete por cruzamento intersistema (cis). O fotossensibilizante no estado triplete excitado ( $T_1$ ) pode decair para o estado fundamental por fosforescência ( $K_p$ ) ou reagir de três formas (RICCI-JÚNIOR 2005): *Reação de Tipo I*: o fotossensibilizante no estado triplete excitado ( $T_1$ ) reage diretamente com o substrato ( $^3O_2$ ) e transfere o átomo de hidrogênio ou elétrons para gerar radicais livres ( $R^*$ ,  $X^*$ ,  $R^{+*}$ ). Essas espécies de radicais livres são geralmente altamente reativas e podem rapidamente interagir com o oxigênio molecular para gerar espécies reativas do oxigênio, como ânions superóxidos ou radicais hidroxila, causando dano biológico irreparável; *Reação de Tipo II*: o fotossensibilizante no estado triplete excitado ( $T_1$ ) transfere energia diretamente para o oxigênio molecular ( $^3O_2$ ) para formar oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). O oxigênio singlete é extremamente reativo e pode interagir com um largo número de substratos biológicos, induzindo dano oxidativo e morte celular; *Reação de Tipo III*: o fotossensibilizante no estado triplete ( $T_1$ ) excitado absorve luz e gera radicais livres (RICCI-JÚNIOR, 2005).

A reação de tipo II é predominante no caso da ftalocianina de zinco. A TFD induz a produção de agentes citotóxicos que rapidamente destroem as células neoplásicas; esta resposta é afetada *in vivo* pela complexidade dos sistemas biológicos. Diversos alvos celulares podem ser afetados durante a TFD, incluindo mitocôndria, lisossomos, membranas plasmáticas, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e núcleo, e a morte celular pode ocorrer por necrose ou apoptose (RICCI-JÚNIOR, 2005). A eficácia da TFD depende do tipo e concentração do fotossensibilizante, da sua localização intra- e extracelular, da dose de luz, do tempo entre a administração do fármaco e a exposição à luz e da disponibilidade de oxigênio (TRIESSCHEIJN et al., 2006).

Esses fatores podem modular três processos independentes, mas possivelmente relacionados, que contribuem para a eficiência da destruição do tumor pela TFD: morte celular tumoral direta por necrose ou apoptose; destruição da vasculatura no tumor e ativação da resposta imune contra as células tumorais remanescentes (Figura 2.15) (CASTANO et al, 2006). Inicialmente, a combinação de fotossensibilizante e luz gera as espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), responsáveis pela morte celular direta das células tumorais, que pode ocorrer por necrose ou apoptose. O colapso da microvasculatura também é observado logo após a TFD. A destruição da vasculatura associada ao tumor faz com que haja a privação local de oxigênio e nutrientes, resultando em hipóxia severa e persistente, que culmina com o infarto do tumor. Além disso, a TFD é capaz de ativar a

resposta imune contra as células tumorais. Essa resposta envolve a atividade antitumoral das células inflamatórias induzidas pela TFD e a geração de uma resposta imunológica antitumoral prolongada (CASTANO et al, 2005a e 2005b).



**Figura 2.15 – Mecanismos de ação nos tumores na TFD (Adaptado de CASTANO et al, 2006).**

## 2.8 ENCAPSULAMENTO SIMULTÂNEO DE MEDICAMENTOS ANTICÂNCER E NPMS

Nos últimos anos a nanotecnologia vem estimulando o desenvolvimento de novos medicamentos e tratamentos clínicos. Hoje é possível sintetizar, caracterizar de modo específico as propriedades funcionais de nanopartículas, para aplicações diversas, bem como de diagnóstico. Além disso, nanoformulações de drogas pequenas entregues sistemicamente são mais eficazes e menos tóxicas do que o mesmo medicamento entregue na forma livre. Esta eficácia de nanopartículas com sistemas de liberação de drogas é atribuída ao seu pequeno tamanho, à modificação da farmacocinética e sua biodistribuição (SAIYED et al, 2010).

Nanopartículas poliméricas magnéticas tem sido consideradas um sistema eficaz para o tratamento do câncer. Nanopartículas magnéticas contribuem para a entrega precisa do fármaco no sítio desejado. A possibilidade de entregar a droga com uma alta concentração no sítio



específico por influência de um campo magnético pode reduzir sensivelmente os efeitos colaterais e aumentar a eficácia terapêutica (KONERACKA et al, 2008). Alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o encapsulamento simultâneo de fármacos e NPMs onde pode-se citar o encapsulamento da indometacina com NPMs (ZAVISOVA et al, 2006) e o encapsulamento do Taxol com NPMs (agente anticâncer) (KONERACKA et al, 2008), sendo que ambos utilizam a técnica de nanoprecipitação.

Não foi encontrado nenhum trabalho na literatura referente ao encapsulamento simultâneo de fármacos anticâncer com NPMs, utilizando a técnica de polimerização *in situ*. O presente estudo introduz uma nova classe de material que permite combinar o tratamento do câncer com a ação da TFD e Hipertemia, funcionando de forma sinérgica.



Com o objetivo de facilitar a compreensão da metodologia serão descritos a seguir os equipamentos, reagentes e procedimentos experimentais utilizados neste trabalho.

#### 3.1 REAGENTES

Para a preparação das NPMs utilizou-se os seguintes reagentes: água destilada ( $H_2O$ ) cloreto férrico ( $ClFe_3 \cdot 5H_2O$ ), sulfato ferroso ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ), hidróxido de amônia ( $NH_4OH$ ), ácido oléico ( $C_{18}H_{34}O_2$ ) e acetona todos provenientes da VETEC Química. No encapsulamento simultâneo utilizou-se os seguintes reagentes: como monômero o metacrilato de metila (MMA) da ARINOS Química, como iniciador o AIBN (2,2'azo bis-isobutironitrila) (VETEC química), como surfactante a lecitina (Alfa Aesar), como co-surfactante o miglyol 82 (Sazol), como fármaco a ftolacianina de zinco (ZnPc), como solvente a N-metil-pirrolidona, ambos provenientes da Sigma Aldrich e água destilada.

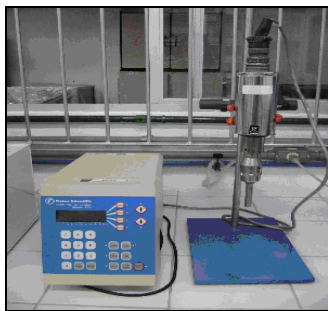
#### 3.2 UNIDADES EXPERIMENTAIS

##### 3.2.1 Preparo da NPMs estabilizadas com AO

Para o preparo das NPMs estabilizadas com AO utilizou-se um agitador mecânico da marca IKA RW20 Digital, com um impelidor tipo hélice com quatro pás constituindo um sistema de cisalhamento produzindo um fluxo turbulento com uma velocidade de rotação de aproximadamente 700 rpm. Também foi necessário a utilização de um pHmetro da marca Hanna e de uma ultracentrífuga da marca Beckmam-Coulter.

### 3.2.2 Preparação das Miniemulsões

Para o preparo da miniemulsão utilizou-se o homogeneizador Fisher Scientific, Sonic Dismembrator Model 500. Este equipamento é constituído de um gerador, um conversor e uma sonda, através da qual são emitidos ondas produzindo uma cavitação no sistema que resulta no rompimento das gotas. A Figura 3.1 mostra o equipamento utilizado para o processo de ultrasonificação antes das reações de polimerização em miniemulsão.



**Figura 3.1 – Homogeneizador Fisher Scientific, Sonic Dismembrator Model 500, utilizado no processo de ultrasonificação**

## 3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 3.3.1 Síntese das NPMs estabilizadas com AO

Para a preparação das NPMs utilizou-se o método de co-precipitação em meio aquoso com a adição de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{ClFe}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  na proporção molar 1:1 e logo em seguida adicionou-se  $\text{NH}_4\text{OH}$  controlando o pH inicial (1) e final (10) da reação, utilizando uma temperatura ambiente e uma velocidade de agitação de 700 rpm. Na segunda etapa adicionou-se o AO para estabilizar as NPMs. Depois de estabilizadas o material foi lavado com acetona para retirar o excesso de AO e logo em seguida a amostra é centrifugada e lavada várias vezes, até que o excesso de AO seja removido totalmente. Na Tabela 2 pode-se verificar o método de preparação das NPMs estabilizadas com AO e a Figura 3.2 ilustra o método utilizado para a preparação das NPMs.

Tabela 2 – Síntese das NPMs estabilizada com AO

Síntese	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mol)	$\text{ClFe}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (mol)	$\text{NH}_4\text{OH}$ (ml)	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ (ml)
NPMs com AO	0,030	0,031	10	25

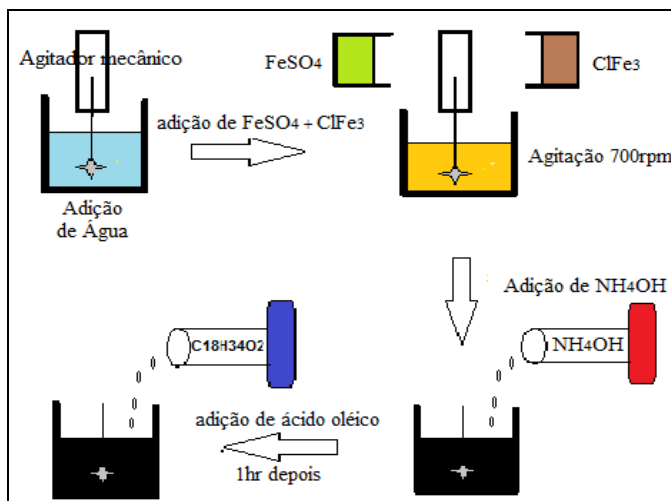


Figura 3.2 – Preparação das NPMs estabilizadas com AO por coprecipitação em meio aquoso

### 3.3.2 Encapsulamento simultâneo da ZnPc com NPMs via polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação

Para o encapsulamento simultâneo da ZnPc com as NPMs foram preparadas duas soluções (Tabela 3). A primeira solução contendo o ZnPc com a N-metil-pirrolidona (NMP) numa concentração de 0,3% de massa da ZnPc em relação a NMP (RICCI-JÚNIOR e MARCHETTI, 2006) e a segunda solução contendo as NPMs com o monômero (MMA) com concentração de 13,6% em massa das NPMs em relação ao monômero. Enfatiza-se que quando se utiliza concentrações diferentes, esta será mencionada no decorrer do texto.

**Tabela 3 – Preparação das soluções 1 e 2**

<b>Soluções</b>	<b>NMP*</b>	<b>NPMs**</b>	<b>ZnPc***</b>	<b>MMA****</b>
<b>1 (0,3%)</b>	2g	X	0,006g	X
<b>2 (13,6%)</b>	X	0,6g	X	2,2ml

\* N-metil-Pirrolidona

\*\* Nanopartículas Magnéticas

\*\*\* Ftalocianina de Zinco

\*\*\*\* Metacrilato de Metila

A preparação destas soluções é importante para a seqüência da reação, sendo que, a ZnPc como as NPMs precisam estar bem dispersas. Para obter uma dispersão homogênea da solução 1 e 2 utiliza-se um banho de ultrassom até sua completa homogenização. Na primeira etapa em um béquer de 100 mL adiciona-se a fase aquosa (apenas a água). O dispersor é ligado (etapa 1) e adiciona-se com um conta gotas a solução 1 bem lentamente (ZnPc/N-metil-pirrolidona) (etapa 2). Na seqüência adiciona-se a fase orgânica (solução 2, MMA, lecitina, miglyol e AIBN) (etapa 3) bem lentamente, com o auxílio de um conta gotas. O tempo de sonicação é de 5 minutos sem pausa com uma amplitude de 70%. O dispersor ultrassônico emite ondas ultrassônicas de alta energia e para evitar o aumento da temperatura e conseqüentemente o início precoce da reação, utiliza-se um banho de gelo.

A próxima etapa do encapsulamento é o processo de homopolimerização, onde utilizou-se um banho termocriostático à uma temperatura de 75 °C por um período de 4hrs aproximadamente até a sua completa polimerização (etapa 4). Em seguida o material é resfriado, centrifugado e lavado várias vezes com água destilada (etapa 5). Na próxima etapa o material é seco e nesta etapa utiliza-se uma estufa com uma temperatura pré-definida (60 °C) por 24hrs aproximadamente (etapa 6). Na Tabela 4 estão às formulações utilizadas para a preparação das miniemulsões (ROMIO, 2007) e na Figura 3.3 pode-se observar uma ilustração da preparação das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs. Para o encapsulamento simultâneo da ZnPc e NPMs a concentração mássica de óxido de ferro foi de ~8%.

**Tabela 4 – Formulações utilizadas para a preparação das miniemulsões**

Reagentes	A1	A2	A3	A4	A5
<b>Solução 1 0,3% (g)</b>	-	2,006	2,006	-	2,006
<b>Solução 2 13,6% (g)</b>	-	-	-	2,2	1,2
<b>MMA(g)</b>	2	2	2	-	1
<b>Lecitina (g)</b>	0,080	0,081	0,080	0,082	0,081
<b>Miglyol (g)</b>	0,090	0,091	0,090	0,090	0,091
<b>AIBN (g)</b>	0,041	0,041	0,042	0,042	0,041
<b>Água destilada (g)</b>	20,02	20,01	20,01	20,02	20,016

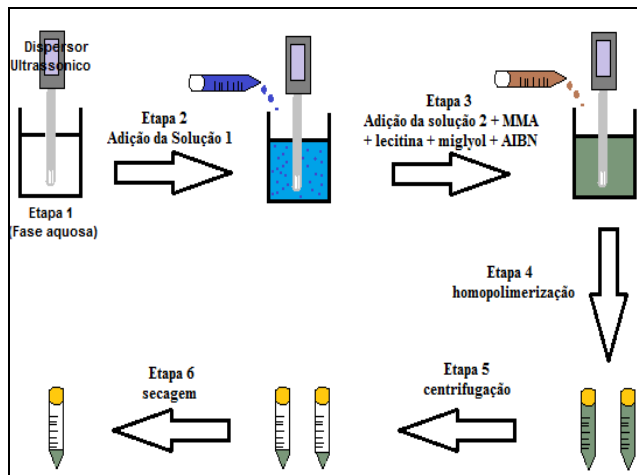
A1 – PMMA

A2 – PMMA/ZnPc(FA) polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação

A3 – PMMA/ZnPc(FO) polimerização em miniemulsão

A4 – PMMA/NPMs polimerização em miniemulsão

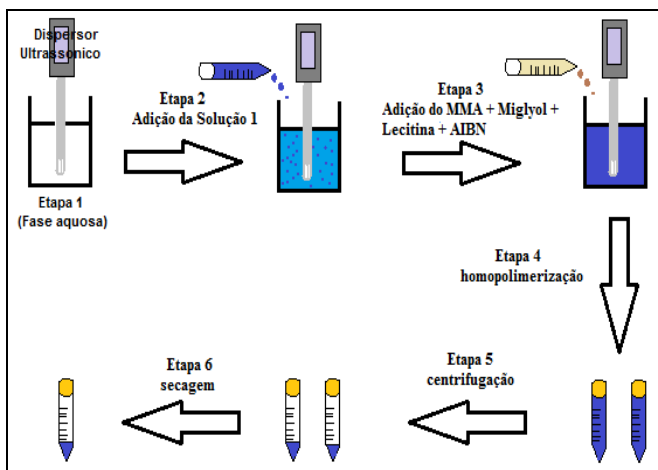
A5 – PMMA/ZnPc/NPMs polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação



**Figura 3.3 – Encapsulamento simultâneo da ZnPc e NPMs com PMMA via polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação (PMMA/ZnPc/NPMs)**

### 3.3.3 Encapsulamento da ZnPc via polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação

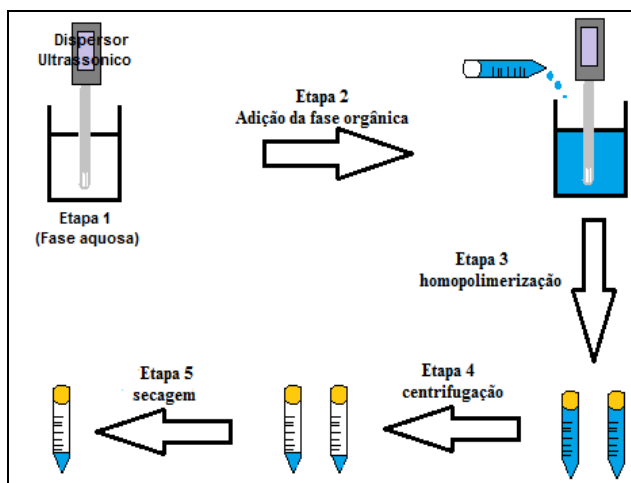
Para o encapsulamento da ZnPc com MMA via polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação utiliza-se apenas a solução 1. Em um béquer de 100 mL adiciona-se a fase aquosa (apenas a água). O dispersor é ligado (etapa 1) e adicionamos com um conta gotas a solução 1 bem lentamente (ZnPc/N-metil-pirrolidona) (etapa 2). Na seqüência adiciona-se a fase orgânica (MMA, lecitina, miglyol e AIBN) bem lentamente com auxílio de um conta gotas, preparando assim uma miniemulsão (etapa 3). Para o encapsulamento da ZnPc o tempo de sonicação é de 5 minutos sem pausa com uma amplitude de 70%. A próxima etapa do encapsulamento é o processo de homopolimerização, onde utilizou-se um banho termocriostático a uma temperatura de 75 °C por 4hrs, ou seja, até a sua completa polimerização (etapa 4). Em seguida, o material é resfriado, centrifugado e lavado várias vezes com água destilada (etapa 5). Na próxima etapa o material é seco e nesta etapa utiliza-se uma estufa com uma temperatura pré-definida (60 °C) por 24hrs aproximadamente (etapa 6). A Figura 3.4 ilustra o procedimento de encapsulamento da ZnPc.



**Figura 3.4 – Encapsulamento da ZnPc com MMA via polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação (PMMA/ZnPc(FA))**



Outro procedimento utilizado para o encapsulamento da ZnPc com MMA é a técnica de miniemulsão direta sem o auxílio da técnica de nanoprecipitação (Figura 3.5). Neste método de encapsulamento a solução 1 é dispersa na fase orgânica (MMA, lecitina, miglyol e AIBN). A etapa de homopolimerização, centrifugação e secagem é a mesma comentada anteriormente.



**Figura 3.5 – Encapsulamento da ZnPc com MMA via miniemulsão (PMMA/ZnPc(FO))**

### 3.3.4 Encapsulamento das NPMs via polimerização em miniemulsão

No encapsulamento das NPMs via polimerização em miniemulsão com MMA, utiliza-se apenas a solução 2. Em um béquer de 100 mL adiciona-se a fase aquosa (apenas a água) e o dispersor ultrassônico é ligado (etapa 1) e adiciona-se a fase orgânica (solução 2, lecitina, miglyol e AIBN) bem lentamente com o auxílio de um conta gotas (etapa 3). O tempo de sonicação é de 5 minutos sem pausa, utiliza-se uma amplitude de 70%. A próxima etapa do encapsulamento das NPMs é o processo de homopolimerização, onde o material é colocado dentro de um banho termocriostático a uma temperatura de 75 °C por um período de 4hrs aproximadamente, até a sua completa polimerização (etapa 4). Em seguida o material é resfriado, centrifugado e lavado várias vezes (etapa 5). Depois o material é seco utilizando uma estufa a vácuo com uma temperatura pré-definida (60 °C) por 24hrs (etapa 6).

## 3.4 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

### 3.4.1 Diâmetro Médio das Nanopartículas

O tamanho médio das nanopartículas poliméricas foram determinados utilizando o equipamento Malvern Instruments Zeta Sizer Nano S, que utiliza a técnica de espalhamento dinâmico de luz. Conforme descrito no trabalho de Romio (2006), a amostra é iluminada por um feixe de laser e a luz espalhada pelas nanopartículas é captada por um cabo de fibra ótica colocado em um determinado ângulo e transmitida para o tubo fotomultiplicador e pulso amplificador/discriminador, onde é transformada em um sinal elétrico. Como as partículas mudam de posição no fluido e em respeito às demais devido ao movimento Browniano, estas interferem na intensidade de luz captada pelo detector. As partículas maiores mudam de posição mais devagar, e causam uma lenta flutuação de intensidade, ao contrário das menores, que se movem mais rapidamente e causam rápidas flutuações de intensidade. Estas flutuações na intensidade contêm informações sobre a taxa de difusão das partículas. Conhecendo-se o coeficiente de difusão com a equação de Stokes-Einstein, obtém-se o tamanho de partícula.

As amostras de látex das reações de MMA com ZnPc e NPMs para a análise do diâmetro médio das gotas e das partículas, foram diluídas em água (3g/L) e desta forma evitar a difusão do monômero das gotas para o meio. Após cada análise foi verificada a qualidade da medida através do “critério de qualidade” do equipamento. As amostras com tamanhos fora da faixa de medida do equipamento (0,6 nm a 6  $\mu\text{m}$ ) e amostras muito polidispersas não apresentam critério de qualidade.

### 3.4.2 Cálculo do Rendimento do Processo (R%)

As nanopartículas poliméricas depois de secas foram pesadas para o cálculo do rendimento do processo, avaliando assim o rendimento final do processo de preparação das nanopartículas poliméricas. O cálculo de rendimento do processo (R) podem ser realizados através da Eq. 3.1.

$$R(\%) = \frac{\text{Massa das nanopartículas rec. após a secagem} \times 100\%}{\text{Massa de MMA} + \text{Massa de ZnPc da formulação}} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

### 3.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Para análise da morfologia das NPMs e das nanopartículas poliméricas utilizou-se a técnica Microscopia Eletrônica Transmissão utilizando um equipamento da marca JEOL, modelo JEM 2100F de 100kV, que se encontra alocado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Na preparação das nanopartículas poliméricas foi colocada uma gota de látex diluído em água destilada (1 g de látex para 10g de água destilada) em uma grade contendo parlódio. Depois de 24hrs as grades foram recobertas com carbono. O mesmo procedimento foi realizado para as análises do material magnético.

### 3.4.4 Termogravimetria (TGA)

A termogravimetria baseia-se no acompanhamento da mudança de massa em função da variação de temperatura de programação controlada. A amostra sólida pode sofrer uma taxa de aquecimento em geral, na faixa de 1 a 50°C/min. O equipamento é composto basicamente de uma micro-balança, um forno, termopares e um sistema de fluxo de gás (inerte ou oxidante) (WENDHAUSEN et al, 2002).

As análises termogravimétricas nos permitem obter informação térmica sobre a estabilidade do material inicial e de qualquer material intermediário que possa ser formado até o composto químico residual, obtido até o final do processo de aquecimento. Estas análises podem ser usadas em uma variedade de investigações como decomposição de argilas a altas temperaturas e identificação de polímeros através de seus parâmetros de degradação (temperatura, resíduos carbonáceos, gases envolvidos). Para a análise utilizou-se um equipamento da marca Perkin Elmer, Modelo é TGA Pyris 1, utilizando 5mg de amostra seca, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

### 3.4.5 Cromatografia Gasosa (CG)

A determinação da concentração de monômero residual após a reação de polimerização em miniemulsão foi feita por Cromatografia Gasosa (CG, Shimadzu GC2010AF), sendo elaborada uma curva de calibração com diferentes concentrações de metacrilato de metila (MMA) em função da área do pico referente ao mesmo.

### 3.4.6 Gravimetria

A conversão foi obtida através de dados gravimétricos, onde uma alíquota da amostra é retirada periodicamente e a reação é interrompida imediatamente com a adição de uma solução de 1% em massa de hidroquinona em cápsulas previamente pesadas de alumínio.

A conversão obtida por gravimetria ( $X_{grav}$ ) é a razão entre a massa do polímero presente no reator e a massa de monômero alimentada. A massa de polímero é calculada a partir do resíduo seco obtido pela evaporação de uma amostra de látex em uma estufa com convecção forçada que se encontra a temperatura constante de 70°C. Para calcular a massa de polímero é necessário subtrair a massa de hidroquinona adicionada e a fração de sólidos não poliméricos, tais como iniciador, surfactante e co-estabilizador, presentes no resíduo seco.

### 3.4.7 Difração de Raio – X

A difração de raios-X (DRX) é uma ferramenta útil para a medida do grau de cristalinidade de polímeros e outros materiais. A informação primária geralmente obtida das análises é a estrutura de polímeros semicristalinos. A cristalinidade do polímero pode ser obtida através da medida de intensidade relativa dos picos de difração nas partes cristalina e amorfa. Quando a estrutura é ordenada, a interferência das radiações com os segmentos da cadeia polimérica é mais acentuada, permitindo distinguir essas estruturas das regiões amorfas, desordenadas. A intensidade de tais interferências é suscetível de determinação experimental, uma vez que os comprimentos de onda dessas radiações têm dimensões comparáveis às distâncias interatômicas encontradas nos cristais (0.5-2.5 Å) (MANO e MENDES, 1999; SANDLER et al, 1998).

A fase cristalina das nanopartículas poliméricas foi identificada por medidas de difração de Raios-X utilizando uma radiação cobre  $K\alpha$  (1,54056 Å) a 45 kV/40 mA em um difratômetro de Raios-X, modelo

Xpert-Pro, numa velocidade de varredura angular de  $2\theta$  e com um tempo de passo de 1 segundo. Esta análise foi realizada no Departamento de Física (LFFS) da Universidade Federal de Santa Catarina.

### **3.4.8 Magnetometria de Amostra Vibrante (MAV)**

O MAV nos permite obter informações a respeito das propriedades magnéticas de um determinado material e classificá-lo de acordo com sua propriedade magnéticas, seja ela, ferrimagnética, ferromagnética ou superparamagnética. As medidas de magnetização foram realizadas utilizando um magnetômetro de amostra vibrante (MAV), modelo EV9 da marca microsense,.

As análises das propriedades magnéticas das nanopartículas foi realizado com a cooperação do Prof. Alexandre Cas Viegas do Instituto de Física, do Laboratório Multiusuário de Caracterização Magnética de Materiais, da Universidade Federal de Santa Catarina. As amostras analisadas no MAV foram preparadas colocando-se uma pequena quantidade de amostra com uma massa conhecida no interior de uma cápsula de vidro e esta cápsula foi presa por um tubo de quartzo e fixada verticalmente sobre duas bobinas. O campo magnético aplicado foi variado entre 20 a -20 KOe e as medidas realizadas a temperatura ambiente.

### **3.4.9 Espectrofotômetro UV/Vis**

As análises de espectrofotometria de absorção na faixa do Visível foram utilizada para identificação e quantificação da ZnPc puro e no material polimérico.

#### **3.4.9.1 Determinação dos espectros de absorção na faixa do UV/Vis**

Na determinação do comprimento de onda de excitação da ZnPc, efetuou-se uma varredura em espectrofotômetro da marca Hitachi modelo 1900, na faixa de 500 a 800 nm (solução de 1  $\mu\text{g/ml}$  de ZnPc em N-metil-pirrolidona). O espectro de absorção obtido auxiliou na fixação do comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{ex}$ ) do fotossensibilizante. Esses experimentos foram efetuados utilizando-se cubeta de vidro de 1 cm de caminho óptico. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente.

### 3.4.9.2 Obtenção da Curva de analítica da ZnPc

Para quantificar a concentração da ZnPc na amostra, uma curva de calibração foi previamente elaborada, onde soluções padrões de N-metil-pirrolidona contendo concentrações conhecidas de ZnPc, foram analisadas no comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{ex}$ ) de 670nm. A curva analítica foi obtida relacionando-se os valores da concentração da ZnPc ( $\mu\text{g/ml}$ ), no eixo das abscissas (x), com os valores de emissão de fluorescência obtidos para cada concentração, no eixo das ordenadas (y). Os dados estão apresentados na Eq. 3.2.

$$\begin{aligned} \text{Abs} &= 0,491x[\text{ZnPC}] + 0,099 \\ R^2 &= 0,999 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

A partir da Eq 3.3 pode-se determinar o teor de ZnPc nas nanopartículas poliméricas. Alguns autores determinam o conteúdo de fármaco nas nanopartículas, como a relação da quantidade de fármaco encapsulado com o rendimento de nanopartículas obtido no processo (SOARES, 2009). A concentração de ZnPc nas nanopartículas foi calculado de acordo com a equação:

$$[\text{ZnPc}(\mu\text{g/mg})] = \frac{\text{Massa da ZnPc obtida nas nanopartículas} \times 100\%}{\text{Massa de rendimento das nanopartículas}} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

### 3.4.10 Perfil de Liberação in vitro

O estudo do perfil de liberação foi realizado de acordo com as condições experimentais descritas por Feng & Huang (2001), Chawla & Amiji (2002) e Ricci Junior & Marchetti (2006a, 2006b). Para a realização das análises de liberação da ZnPc, foi utilizado um banho termostaticado com temperatura controlada a 37°C, onde foram imersos béqueres contendo o meio receptor e o sistema de liberação estudado sob agitação magnética. Foram utilizados 40 ml de tampão fosfato salino, pH 7,4, contendo 2% de dodecil sulfato de sódio (TFS-SDS) como meio receptor e amostras de 5mg de nanopartículas liofilizadas foram adicionadas a essa solução receptora. O sistema foi mantido sob proteção da luz. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, alíquotas de

3 ml foram retiradas e transferidas para o béquer para a continuação do teste de liberação. O sobrenadante foi analisado pelo método de emissão de fluorescência anteriormente padronizado para a quantificação de ZnPc liberada. As concentrações obtidas foram utilizadas para a elaboração do gráfico do perfil de liberação *in vitro* da ZnPc das nanopartículas. O experimento foi realizado em triplicata para cada método de encapsulamento.

### **3.4.11 Avaliação da Toxicidade e atividade Fotobiológica das nanopartículas poliméricas em cultura de células tumorais**

A linhagem de células escolhida para a realização dos ensaios de toxicidade e atividade fotobiológica foi a A549 (células de carcinoma de pulmão humano) (LIEBER *et al.*, 1976). Para a utilização das células, a linhagem foi descongelada até atingir a temperatura de 37°C e acondicionada em frasco de cultura de 25 ml contendo 7 ml de meio (Meio Dulbecco's Modificado) DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. A este meio foram acrescidos 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. O frasco de cultura foi mantido em estufa à temperatura de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h. A concentração de células foi medida pelo método de azul de tripan baseado na capacidade das células viáveis em eliminar o corante. As células não coradas são contadas utilizando uma câmara de Neubauer. A suspensão celular foi distribuída na concentração de  $1 \times 10^5$  células/ml em placa de 96 poços (250 µL) contendo meio de cultura DMEM enriquecido. As placas foram incubadas em estufa por 24 h para a adesão das células. A avaliação de toxicidade e da atividade fotobiológica das nanopartículas poliméricas em cultura de células foi realizada com base em estudos já descritos na literatura (RICCI-JÚNIOR e MARCHETTI, 2006).

O fotossensibilizante livre e o encapsulado em nanopartículas poliméricas foram incubados com as células na presença e ausência de luz para avaliar a toxicidade no escuro e atividade fotobiológica. Em todos os ensaios a concentração da ftalocianina de zinco livre (solução em meio de cultura) e da encapsulada em nanopartículas poliméricas (suspensão meio de cultura) foi de 5 µg. As amostras foram incubadas juntamente com aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/ml. Após 4 horas de incubação em estufa a 37°C, o meio foi removido, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (TFS) e acrescidas de novo meio de cultura. As células submetidas ao ensaio de toxicidade na ausência de luz foram novamente mantidas na estufa a 37°C por 24 horas. As células correspondentes ao ensaio de atividade fotofiológica foram submetidas à

irradiação com luz vermelha ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ ) na dose de  $40 \text{ J/cm}^2$  (Photon Laser I, DMC), posteriormente, mantidas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a viabilidade celular pelo teste do MTT.

A viabilidade das células foi avaliada pelo método MTT. Este é um método rápido e preciso que pode ser utilizado para medir a citotoxicidade, a proliferação e a atividade das células. Trata-se de um ensaio colorimétrico, cujo componente principal é o sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolium (MTT). O MTT é reduzido pela enzima desidrogenase mitocondrial presente nas células viáveis formando cristais de formazan de cor púrpura. A absorção do formazan dissolvido na região do visível correlaciona-se com o número de células viáveis. Assim, alterações na atividade mitocondrial celular resultam em mudanças na quantidade de formazan produzido e, conseqüentemente, na absorbância, o que permite quantificar a citotoxicidade do tratamento de maneira indireta (MOSMANN, 1983). Os compostos citotóxicos são capazes de danificar ou destruir as células, o que diminui a redução do MTT.

Na determinação da viabilidade das células, as células foram incubadas com  $230 \mu\text{l}$  de meio DMEM e  $20 \mu\text{l}$  de solução de MTT ( $5 \text{ mg/ml}$  em TFS) por 3 horas em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , na ausência de luz. Em seguida, a placa foi centrifugada por 3 minutos, o meio contendo o MTT foi retirado, e os cristais de formazan ressuspensos em  $200 \mu\text{l}$  de DMSO para solubilização.

A absorbância foi medida em uma leitora de placas do tipo ELISA (THERMOPLATE) nos comprimentos de onda de  $540 \text{ nm}$  e  $630 \text{ nm}$  e comparada com aquela obtida com as células sem tratamento (controle) por meio de análise estatística (ANOVA) utilizando com significância  $p < 0,05$ .



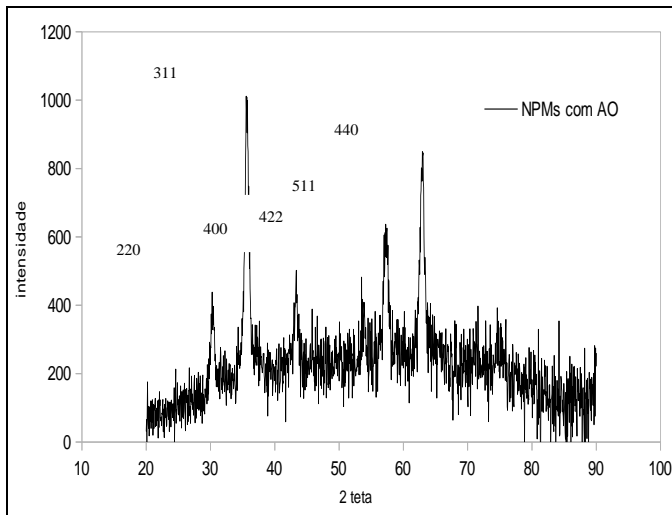
#### 4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NPMs ESTABILIZADAS COM AO

##### 4.1.1 Difração de Raio-X - DRX

A identificação das NPMs pode ser feita utilizando a técnica de difração de raio-X, comparando seu espectro com os dados já conhecidos. As análises dos espectros obtidos por esta técnica nos fornece informações sobre a sua estrutura e o diâmetro médio das nanopartículas. O diâmetro médio das nanopartículas pode ser calculado a partir da largura a meia altura do pico de difração, através da equação de Scherrer:

$$\tau = \frac{\kappa\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

onde  $\kappa$  é a constante de apartículas esferica (0,9),  $\lambda$  é o comprimento de onda do raio-x incidente (1,54 Å),  $\beta$  é a largura a meia altura em radiano e  $\theta$  o ângulo do pico mais intenso, que neste caso refere-se ao 311. A Figura 4.1 mostra o difratograma das NPMs com AO. Os picos indicam a formação de uma estrutura cristalina, característica da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Os picos observados para a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  são (220), (311), (400), (422), (511) e (440) (GNANAPRAKASH et al, 2006 e HONG et al, 2008). O diâmetro médio estimado das nanopartículas foi de 13 nm, calculado a partir da largura a meia altura do pico de difração (311), através da equação de Scherrer como comentado anteriormente.

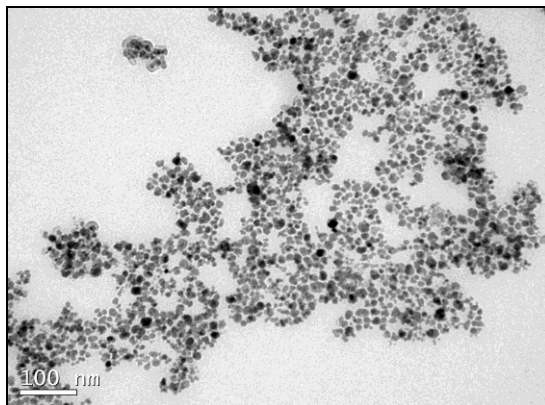


**Figura 4.1 – Difratoograma de raio-X das NPMs com AO**

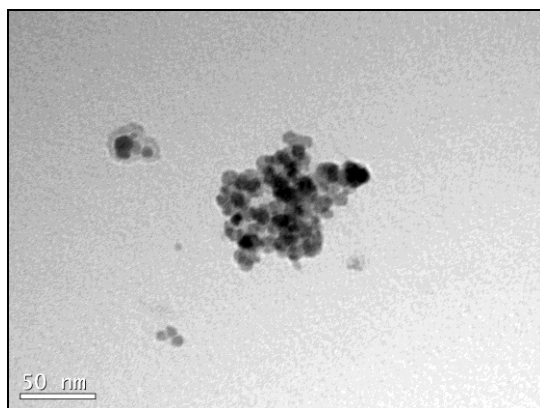
A identificação exata da estrutura das nanopartículas é possível a partir de espectroscopia Mossbauer, no entanto, em misturas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , o espectroscopia Mossbauer ainda é apenas semi-quantitativa (TEJA; KOH, 2009). Quando se trata de aplicações tecnológicas de nanopartículas de óxidos de ferro tanto a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  quanto a  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  são adequadas. Entretanto, quando comparadas em relação à saturação de magnetização, a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  é ligeiramente superior a outros óxidos de ferro (TEJA e KOH, 2009).

#### **4.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET**

Utilizando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão pode-se obter com clareza o tamanho e a morfologia das NPMs. A Figura 4.2 mostra as NPMs com um tamanho médio de aproximadamente 10 nm, o que corrobora o resultado de DRX. A adição do ácido oléico, além de hidrofobizar a superfície das NPMs, previne a aglomeração destas nanopartículas, aumentando a estabilidade das mesmas mantendo assim um alto grau de saturação da magnetização, como pode-se observar mais adiante (Figura 4.4).



(A)



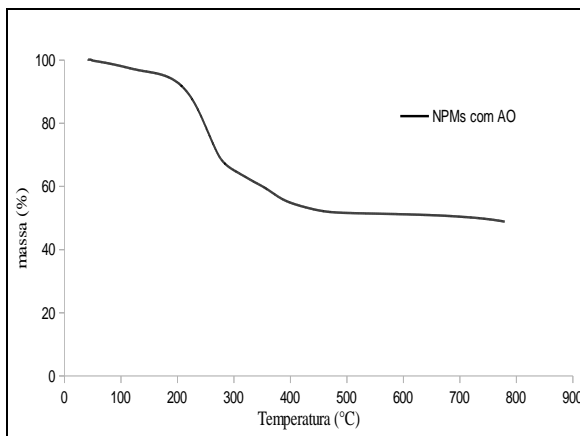
(B)

**Figura 4.2 – Microscopia Eletrônica de transmissão das NPMs revestidas com ácido oléico (A) e NPMs puras (B)**

Quando o material magnético é sintetizado, é essencial que este apresente um tamanho de partícula na faixa de 5-18 nm, pois é nesta faixa de tamanho que o material apresenta propriedade superparamagnética (LANDFESTER; RAMIRES, 2003; GNANAPRAKASH et al, 2006; TEJA; KOH, 2009 ).

### 4.1.3 Análise termogravimétrica – TGA

Na análise termogravimétrica pode-se quantificar a água e o ácido oléico presente nas NPMs. A Figura 4.3 mostra a presença de água (20 – 150°C) e dois picos referentes ao AO. A massa residual corresponde ao óxido de ferro puro. O primeiro pico está localizado entre 200 e 280°C (AO livre) e o segundo pico está localizado entre 290 e 380°C (AO ligado as NPMs). A presença destes dois picos indica duas espécies de AO presente na amostra (LANDFESTER; RAMIRES, 2003 e ZHANG; HE; GU, (2006), o que significa um provável excesso de AO.



**Figura 4.3 – Análise termogravimétrica das NPMs com AO**

A concentração mássica de óxido de ferro foi de 48% sendo o teor de água residual de 2% e de AO de 40%. Esta análise é importante para quantificar o AO e também para determinar as propriedades magnéticas das nanopartículas poliméricas.

### 4.1.4 Propriedade Magnéticas das NPMs – MAV

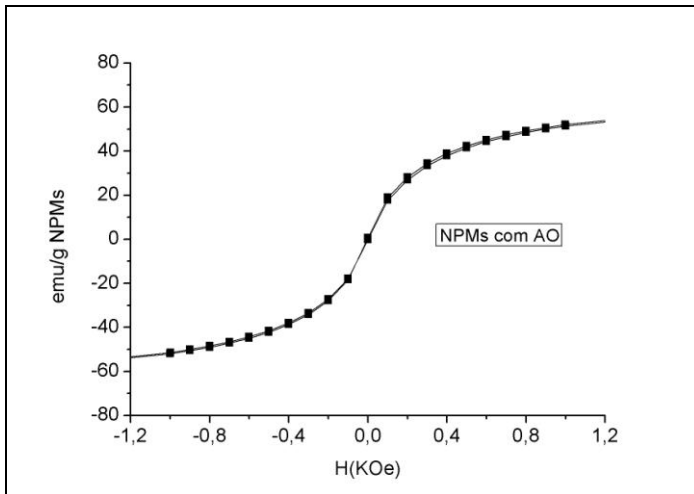
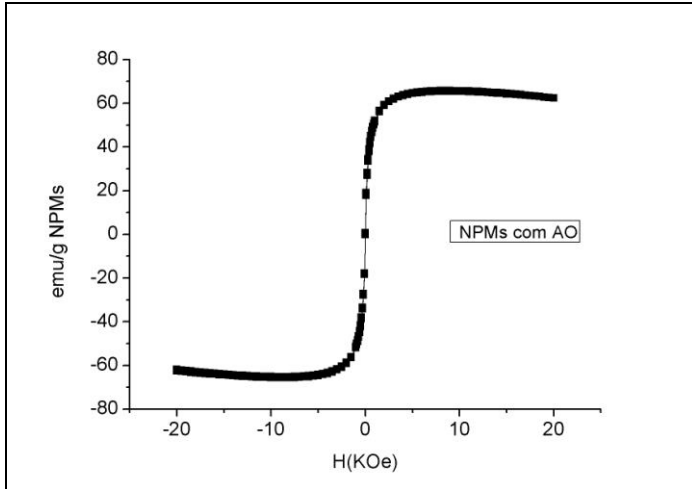
As propriedades magnéticas das NPMs foram medidas utilizando o MAV. A magnetização de saturação ( $M_s$ ) por grama da amostra, magnetização remanescente ( $m_r = M_r/M_s$ ), e a coercividade ( $H_c$ ), são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5 – Propriedades magnéticas das NPMs com AO**

<b>Amostras</b>	<b>Ms (emu/g)</b>	<b><math>mr=Mr/Ms</math> (<math>\times 10^{-6}</math>)</b>	<b>Hc (Oe)</b>
<b>NPMs com AO</b>	<b>64</b>	<b>5,8</b>	<b>2,0</b>

As NPMs mostraram comportamento superparamagnético (Figura 4.4), quando expostos há temperatura ambiente, ou seja, sem a presença da curva de histereses e com um alto valor de Ms. Pode-se observar que a amostra não esta totalmente saturada, por isso pode haver um erro no valor de Ms de aproximadamente 5%. Segundo ZHENG et al (2005), o comportamento superparamagnético das NPMs também esta relacionado com o baixo valor da Mr e Hc, como vimos na Tabela 5.

Este comportamento predominante de NPMs com propriedades superparamagnética já era esperado devido às dimensões das NPMs inferiores a 18nm, como mostrado anteriormente nas análises do TEM. As NPMs revestidas com ácido oléico apresentaram um valor de Ms de 84emu/g, sendo que este valor esta muito próximo do valor de Ms da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> pura que é de 89emu/g (HOLZAPFEL et al, 2006 e LANDFESTER; RAMIRES, 2003). A partir desses valores pode-se determinar que as NPMs revestidas com ácido oléico sejam compostas basicamente por Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.



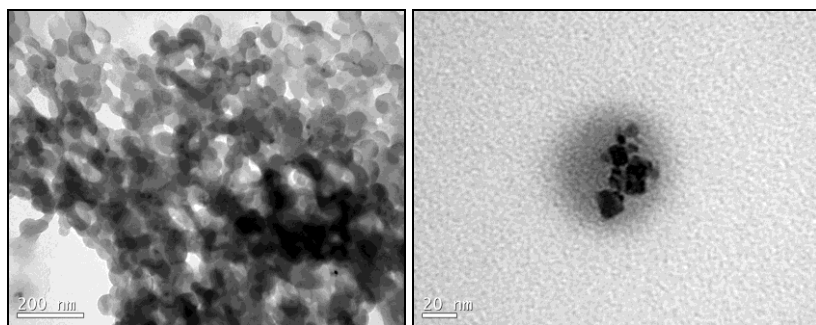
**Figura 4.4 – Curva de magnetização obtida por MAV das NPMs com AO, campo magnético de 20KOe (A) e campo magnético em maior escala 1,2KOe (B).**

## 4.2 ENCAPSULAMENTO DAS NPMS VIA POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO COM MMA

Para a obtenção de nanopartículas poliméricas magnéticas utilizou-se a técnica de miniemulsão direta. Como comentado anteriormente as NPMS revestidas com AO foram preparadas pelo método de co-precipitação em meio aquoso. Neste processo de encapsulamento as NPMS com AO foram dispersas diretamente no monômero, ou seja, não foi utilizada qualquer solvente para dispersar o material magnético.

### 4.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET e Distribuição de tamanho por espalhamento de luz

As nanopartículas poliméricas magnéticas obtidas pelo processo de miniemulsão direta sem a adição de qualquer solvente foram caracterizadas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão com o intuito de avaliar o tipo de estrutura e as características morfológicas das mesmas. Esta análise é muito importante para verificar a presença de nucleações secundárias e mecanismos de degradação, principalmente quando o material final é utilizado na área biomédica. A Figura 4.5 apresenta as imagens obtidas das nanopartículas poliméricas com NPMS.



**Figura 4.5 – MET das nanopartículas poliméricas com NPMS**

É possível observar algumas regiões mais escuras, a qual é atribuída ao núcleo formado pelas NPMS. A partir da Figura 4.5 podem-se estimar o tamanho das nanopartículas poliméricas com NPMS num

valor aproximado de 100 nm apresentando uma forma esférica com uma distribuição de tamanho de partículas relativamente estreito, como pode ser observado na Tabela 6.

**Tabela 6 – Distribuição de tamanho de partículas e índice de polidispersidade das nanopartículas poliméricas com NPMs**

Amostras	DTG* (nm)	IPD	DTP*** (nm)	IPD
PMMA	74	0,142	76	0,186
PMMA/NPMs (13,6%)	91	0,162	98	0,198

\*DTG – Distribuição de tamanho de gotas (antes da homopolimerização)

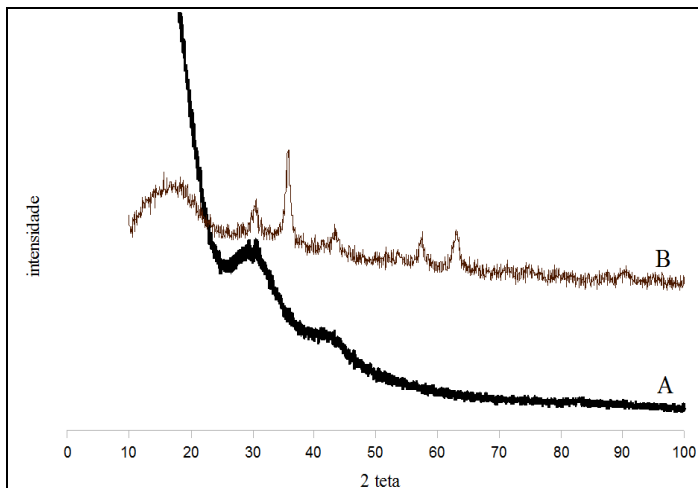
\*\*DTP - Distribuição de tamanho de partículas (final)

IPD – Índice de polidispersidade

#### 4.2.2 Difração de Raio-X

A Figura 4.6 mostra o difratograma de raio-X do PMMA e das nanopartículas poliméricas magnéticas. Como vimos anteriormente as NPMs com AO apresentam alguns picos característicos de uma estrutura cristalina, quando sintetizados pelo método de co-precipitação em meio aquoso. Segundo LANDFESTER; RAMIRES, (2006) e ZHENG; GAO; GU, (2005) o material magnético pode perder algumas de suas propriedades quando exposto a alta temperatura por um longo período de tempo, neste caso a homopolimerização, sendo assim, esta análise é de extrema importância para a identificação das nanopartículas poliméricas. Como pode-se observar na Figura 4.6 o difratograma de raio-x mostrou uma estrutura cristalina das NPMs encapsuladas com PMMA, no entanto, a perda das intensidades de picos pode ser referente a baixa concentração de NPMs, quando comparado com a Figura 4.1 que nos mostra o difratograma de raio-x das NPMs com AO puro (HONG et al, 2008). Sendo assim pode-se afirmar que a síntese não alterou a cristalinidade das NPMs, mostrando-se um método eficiente para o encapsulamento das NPMs com AO, como já confirmado por outros trabalhos citados anteriormente.

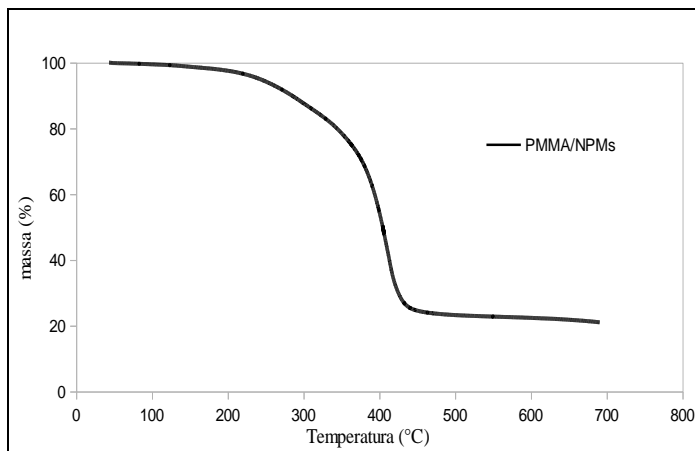




**Figura 4.6 – Difratograma de raio-X das nanopartículas polimérica de PMMA (A) e PMMA/NPMs (B)**

#### 4.2.3 Análise Termogravimétrica – TGA

A análise termogravimétrica mostra a interação das NPMs com o polímero (PMMA). Na Figura 4.7 pode-se observar que a quantidade de NPMs é de aproximadamente 22% em massa.



**Figura 4.7 – Análise de TGA das nanopartículas poliméricas de PMMA/NPMs**

Como visto na Figura 4.3 o AO tem sua decomposição total a 400°C. Na Figura 4.7 pode-se observar que não há nenhuma perda de massa no intervalo de temperatura de 0 a 150°C, sendo assim, pode-se dizer que o material está ausente de impurezas (HONG et al; ZHENG, GAO; GU, 2008; 2004). No caso das NPMs encapsuladas com PMMA a perda de massa é gradual e é claramente observado que o PMMA se degrada totalmente a aproximadamente 410°C. A concentração residual é de 22% e corresponde ao óxido de ferro presente nas NPMs. Os outros 78% correspondem ao polímero, ou seja, PMMA e AO presentes nas NPMs (HONG et al, 2008). A concentração final de óxido de ferro é maior do que seria esperado pela formulação original. Isto se deve a evaporação parcial do AO na estufa, além da possível evaporação de parte do monômero durante a própria reação.

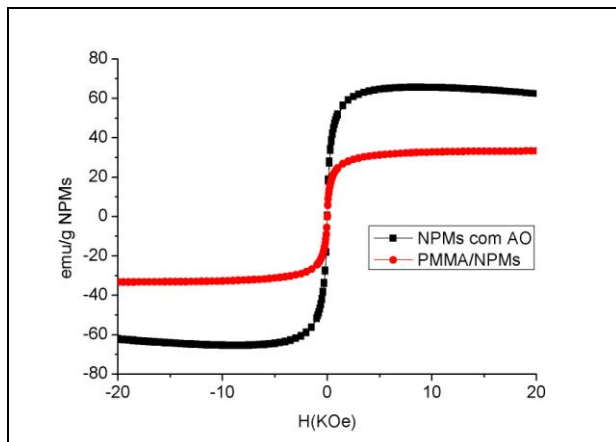
#### 4.2.4 Propriedades Magnéticas – MAV

As propriedades magnéticas do material foram medidas utilizando o MAV. A magnetização de saturação ( $M_s$ ) por grama da amostra, magnetização remanescente ( $m_r = M_r/M_s$ ), e a coercividade ( $H_c$ ), são dados na Tabela abaixo.

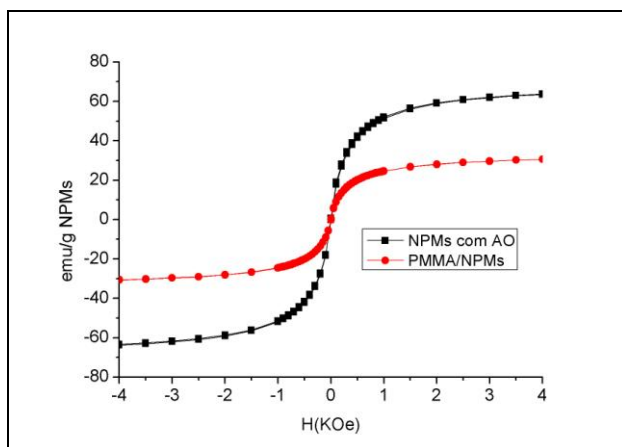
**Tabela 7 – Propriedades magnéticas das NPMs revestidas com ácido oléico e das NPMs encapsuladas com MMA**

Amostras	$M_s$ (emu/g)	$M_r$ ( $\times 10^{-6}$ )	$H_c$ (Oe)
NPMs com ácido oléico	64	5,8	2,0
NPMs encapsuladas	34	1,3	0,1

As NPMs predominantemente encapsuladas com PMMA mostraram comportamento superparamagnético, ou seja, sem a presença da curva de histereses (Figura 4.8), quando expostos a temperatura ambiente. O comportamento superparamagnético também se equivale no baixo valor da magnetização remanescente e nos pequenos valores de  $H_c$ , como visto anteriormente. Ao analisar a Tabela acima, verifica-se um decréscimo no valor de  $M_s$ , sendo que este decréscimo pode estar relacionado com a oxidação do material magnético ou seja, a conversão de outros óxidos de ferros não magnéticos durante o processo de sonicação e homopolimerização (LANDFESTER; RAMIRES, 2006 e HONG et al, 2008).



(A)

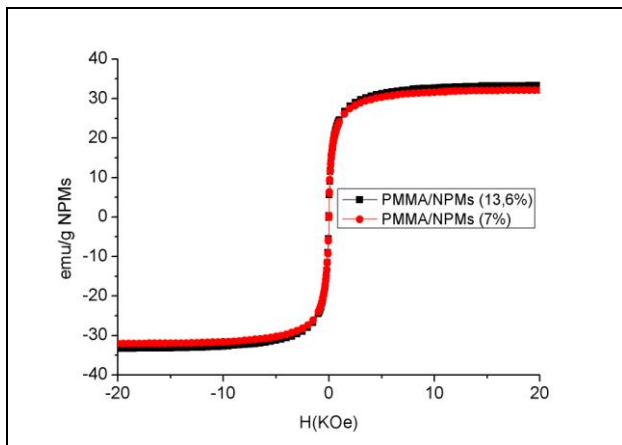


(B)

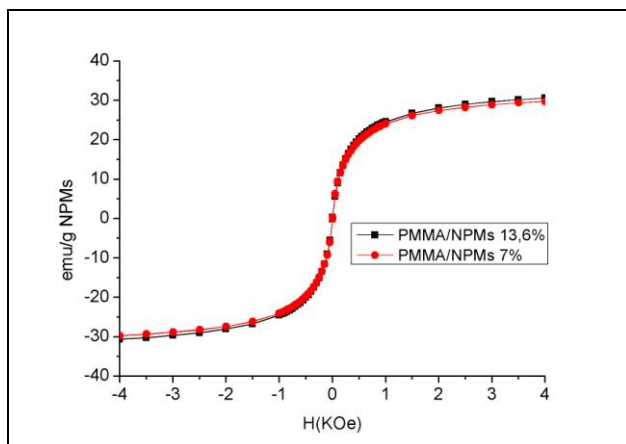
**Figura 4.8 – Propriedades magnéticas das NPMs com AO e das NPMs encapsuladas com PMMA, campo magnético de 20KOe (A) e campo magnético em maior escala 4KOe (B).**

Outro ponto importante a ser observado no encapsulamento de NPMs utilizando a técnica de polimerização *in situ*, é o fato de que a quantidade de NPMs com AO não interfere no valor de  $M_s$  como mostrado na Figura 4.9. Nos dois casos de PMMA/NPMs com diferentes concentrações de óxido de ferro, 7% e 13,6% em massa, o valor de  $M_s$  é praticamente o mesmo. Sendo assim, quando exposto ao

um campo magnético externo, as NPMs encapsuladas podem se mover com a mesma velocidade. Este valor de  $M_s$  é suficiente para que a nanopartículas encapsuladas se movam com rapidez, e possam ser separadas da fase aquosa facilmente pela ação de um gradiente de campo magnético externo (ZHENG, GAO; GU, 2005).



(A)



(B)

**Figura 4.9 – Propriedades magnéticas obtidas das NPMs com AO e para as nanopartículas poliméricas com diferentes concentrações de óxido de ferro (7% e 13,6%), campo magnético de 20KOe (A) e campo magnético em maior escala 4KOe (B).**

### 4.3 ENCAPSULAMENTO DA ZNPC VIA POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO

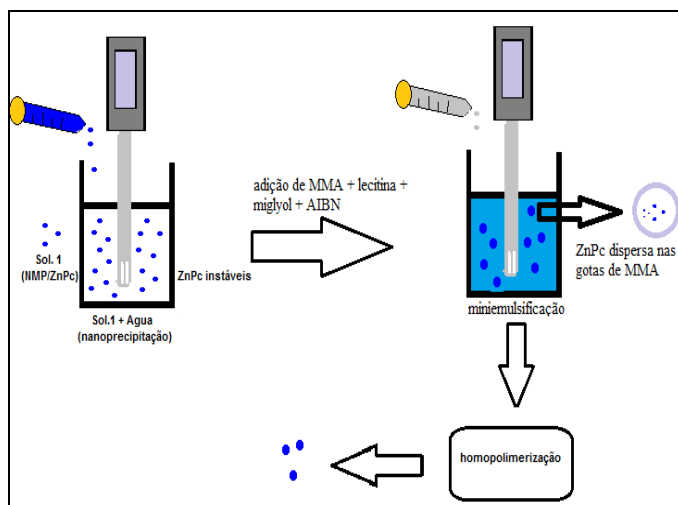
Nesta parte do trabalho serão discutido os métodos utilizados para o encapsulamento da ZnPC, utilizando a técnica de miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação.

A ZnPC é um fármaco que apresenta características hidrofílicas intermediárias, ou seja, tem baixa afinidade pela água e por compostos apolares. Isto cria uma dificuldade adicional ao se tentar a miniemulsão direta, pois o monômero é apolar e não consegue solubilizar a ZnPC diretamente na fase orgânica. A solubilidade da ZnPC em solventes orgânicos polares é relativamente elevada, o que torna possível a utilização da técnica de nanoprecipitação para dispersar este composto na fase aquosa sob a forma de nanopartículas. Para isso, é necessário que este solvente orgânico polar seja solúvel na fase aquosa, como, por exemplo, a n-metil pirrolidona, NMP (GOVENDER et al, 1998). Outros solventes podem ser utilizados, como o DMSO. No entanto, é importante que este solvente possa ser facilmente retirado do meio contínuo por evaporação, desta forma, dá-se a preferência pela utilização de solventes voláteis.

Na primeira etapa do processo de encapsulamento, a nanoprecipitação, utilizou-se a solução de ZnPC com solvente orgânico polar, como mencionado anteriormente. Ao adicionar esta solução na fase aquosa sob alto cisalhamento, o solvente, neste caso a NMP, tende a migrar para a fase aquosa, enquanto que a ZnPC (não estabilizada) ficará dispersa na fase aquosa sob a forma de nanopartículas. Rapidamente, passa-se à 2ª etapa do processo, que é a adição do monômero ao sistema. Ao adicionar a fase orgânica contendo monômero e surfactante de baixo HLB, a ZnPC tende a ir para interface das gotas de monômero e da fase aquosa e eventualmente entram nas gotas de monômeros estabilizadas com o surfactante. A Figura 4.10 ilustra a técnica citada para o encapsulamento da ZnPC.

A utilização de um surfactante na fase orgânica é essencial nesta técnica de polimerização. Se o surfactante estiver na fase aquosa, o fármaco ao ser disperso na água será estabilizado por este surfactante. Devido a diminuição da tensão interfacial com a água estas nanopartículas de fármaco se tornarão estáveis o que diminuirá a migração do fármaco para as gotas de monômero. Testes realizados no laboratório comprovaram que ao utilizar um surfactante de elevado HLB, como o SDS, disperso na fase aquosa não ocorreu a migração do fármaco para as gotas de monômero, não ocorrendo, portanto, a

encapsulação do fármaco pelo polímero formado durante a reação de polimerização.

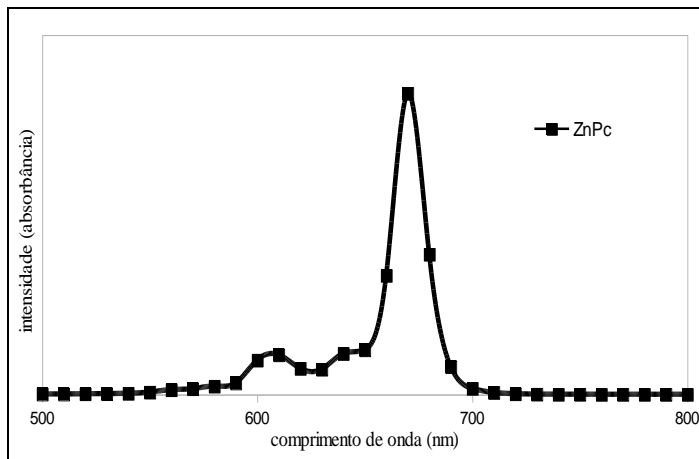


**Figura 4.10 – Encapsulamento da ZnPc via polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação (PMMA/ZnPc(FA))**

Outro método proposto neste trabalho para o encapsulamento da ZnPc, foi a polimerização em miniemulsão sem o auxílio da técnica de nanoprecipitação (PMMA/ZnPc(FO)). Neste método mistura-se a solução 1 (NMP e ZnPc) com MMA, lecitina, miglyol e AIBN. Como meio contínuo utiliza-se apenas a água.

### 4.3.1 Caracterização da ZnPc pela técnica do UV-Vis

A ZnPc apresenta uma elevada absorvidade molar na região do espectro eletromagnético correspondente à luz vermelha, o que possibilita a utilização da técnica de UV-Vis para a identificação da ZnPc. O espectro de absorção no UV-Vis foi registrado na faixa de 500 a 800nm, como pode ser observado na Figura 4.11.



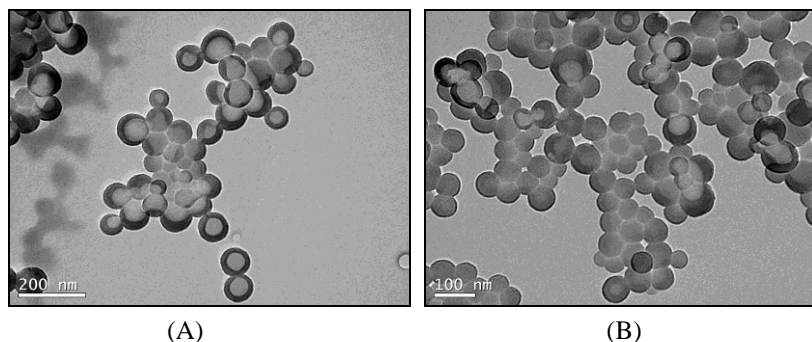
**Figura 4.11 – Identificação da ZnPc utilizando a técnica de UV-Vis**

Os espectros de absorção de UV-Vis apresentadas na Figura 4.11 foram os mesmos apresentados por RICCI-JÚNIOR e MARCHETTI (2006a, 2006b). O pico de maior absorbância foi observado no comprimento de onda de 670nm para a ZnPC solubilizada em NMP. O comprimento de onda onde ocorre absorção máxima no UV-Vis é usualmente utilizado como comprimento de onda de excitação nas análises de fluorimetria. Sendo este empregado para quantificar a concentração do fármaco em solução.

#### **4.3.2 Morfologia e distribuição de tamanho de partículas**

Para análise da morfologia e da distribuição de tamanho das partículas utilizou-se o MET. Esta análise é muito importante para verificar se a presença de nucleações secundárias, que poderia promover a formação de novas partículas sem a presença de fármaco, além de causar um alargamento da DTP que nem sempre pode ser evidenciada pela análise de DLS. A Figura 4.12 apresenta as micrografias das amostras PMMA/ZnPc(FA) e PMMA/ZnPc(FO), onde pode-se observar que o método de encapsulamento da ZnPc não afetou a morfologia e a distribuição de tamanho das partículas (DTP). Pelas micrografias pode-se dizer que a DTP é unimodal e estimar o tamanho médio em aproximadamente 100 nm. Como a DTP é unimodal, é provável que o mecanismo de nucleação predominante tenha sido o da polimerização

das gotas de monômero em detrimento a outros mecanismos de polimerização possíveis tais como nucleação micelar ou homogênea.



**Figura 4.12 – MET das nanopartículas poliméricas com ZnPc A) PMMA/ZnPc(FA) e B) PMMA/ZnPc(FO)**

Para as análises de tamanho médio de partícula e do índice de polidispersão utilizou-se a técnica de espalhamento dinâmico de luz, DLS. Os valores são apresentados na Tabela abaixo e apresentam valores próximos aos observados por MET.

**Tabela 8 – Distribuição de tamanho de gotas e partículas e índice de polidispersidade das nanopartículas poliméricas com ZnPc**

Amostras	DTG (nm)*	IPD	DTP (nm)**	IPD
PMMA/ZnPc(FA)	92 ±0,4	0,175	102 ±0,5	0,201
PMMA/ZnPc(FO)	93 ±0,6	0,177	101 ±0,4	0,211

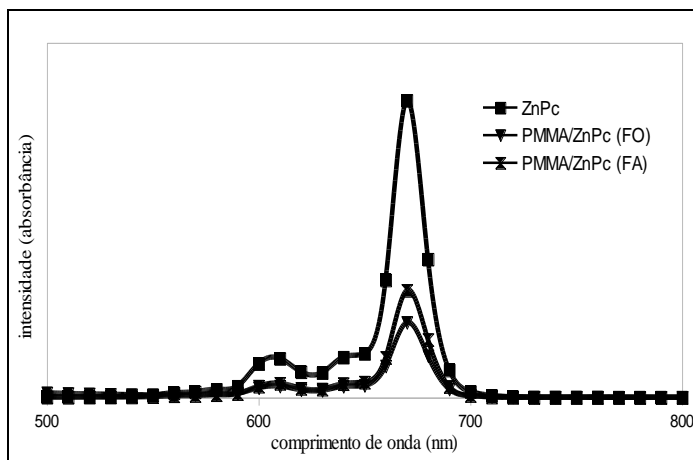
A análise da distribuição de tamanho das partículas é muito importante neste trabalho. As amostras obtidas apresentam tamanho nanométricos e, portanto podem ser aplicadas endovenosamente. Pode-se observar na Tabela 8 que ambos os métodos de encapsulamento da ZnPc levaram a tamanhos médios e distribuição de tamanho das partículas muito semelhantes, corroborando os dados das análises de DLS e MET. Ao comparar o tamanho médio das nanopartículas de PMMA sem ZnPc (Tabela 6) e com ZnPc, pode-se notar um aumento de



aproximadamente 20 nm. Esta diferença de tamanho pode ser devido a presença de parte do fármaco na interface das nanopartículas o que desloca o surfactante diminuindo ligeiramente a eficiência de estabilização das gotas de monômeros resultando em tamanhos de partícula maiores.

#### 4.3.3 Caracterização espectrométrica e rendimento do processos das nanopartículas poliméricas com ZnPc

Como apresentado anteriormente, a ZnPc solubilizada em NMP apresenta um pico de absorção no UV-vis no comprimento de onda de 670nm. A partir da Figura 4.13 pode-se observar que a ZnPc encapsulada com PMMA apresenta o pico de absorção no mesmo comprimento de onda, 670nm, que o ZnPc livre (sem polímero). A diferença na intensidade observada nas amostras de ZnPc encapsulada indica a diferença de concentração da ZnPc nas amostras, conforme mostrado na Tabela 9.



**Figura 4.13 – Espectros de absorção do UV-Vis da Sol.1, PMMA/ZnPc(FO) e PMMA/ZnPc(FA)**

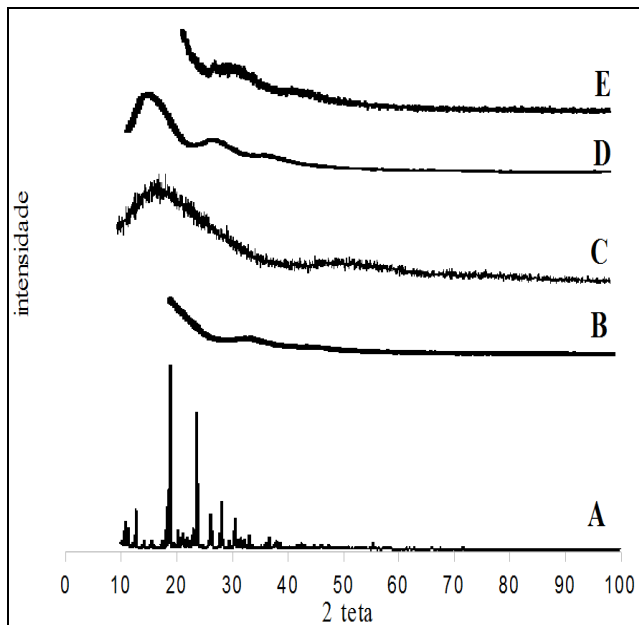
**Tabela 9 – Rendimento do processo e concentração mássica de ZnPc nas nanopartículas poliméricas**

<b>Amostras</b>	<b>Rendimento do Processo (%)</b>	<b>[ZnPc] (µg/mg)</b>
<b>PMMA/ZnPc(FO)</b>	82 ± 0,5	3,0
<b>PMMA/ZnPc(FA)</b>	84 ± 0,6	3,7

Na preparação das amostras de PMMA/ZnPc(FO) o rendimento do processo obtido foi de 82 ±0,5% e a concentração de ZnPc nas nanopartículas poliméricas foi de 3,0 µg/mg de partícula polimérica. Para a amostra PMMA/ZnPc(FA) o rendimento do processo foi de 84 ±0,6% e o teor de ZnPc foi de 3,7 µg/mg de partícula polimérica. Neste caso pode-se observar que o teor de ZnPc é maior na amostra PMMA/ZnPc(FA), quando comparada com a amostra PMMA/ZnPc(FO). Os dois métodos de encapsulamento da ZnPc podem ser adequados, sendo que ambos apresentaram valores satisfatório (ZHANG et al, 2004).

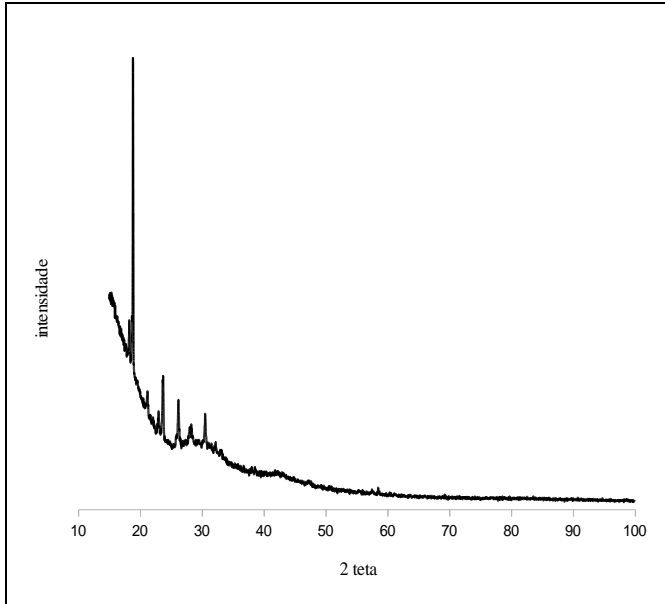
#### **4.3.4 Difração de Raio-X**

A determinação dessas características é importante não apenas por permitir o conhecimento da cristalinidade e das possíveis interações entre fármaco e polímero, mas também devido a influência das mesmas na liberação *in vitro* e *in vivo* do fármaco (VERGER et al, 1998). A Figura 4.14 apresenta os padrões de DRX da ZnPc livre (A), mistura física da ZnPc com PMMA (B) na concentração de 0,3% de fármaco em relação ao polímero, PMMA vazio (C), PMMA/ZnPc(FA) (D) e PMMA/ZnPc(FO) (E).



**Figura 4.14 – Difratoograma de Raio-X das nanopartículas poliméricas contendo aproximadamente 0,3% em massa de ZnPc. As amostras analisadas foram ZnPc livre (A), mistura física da ZnPc com PMMA (B), PMMA sem ZnPc (C), PMMA/ZnPc(FA) (D) e PMMA/ZnPc(FO) (E).**

O difratograma da ZnPc livre (A) mostrou picos correspondentes de uma estrutura cristalina do fármaco (PEREZ, 2006). O PMMA (C) apresentou difratograma típico de um material amorfo, mesmo comportamento observado para as demais amostras que continham uma baixa concentração de ZnPc (0,3% em massa). Esta baixa concentração de ZnPc impede a observação de qualquer interação do fármaco com o polímero por DRX devido à falta de sensibilidade desta análise para baixas concentrações. Como se pode observar na Figura 15, quando há um aumento na concentração de fármaco em relação ao polímero nota-se o aparecimento dos picos correspondentes da estrutura cristalina do fármaco.



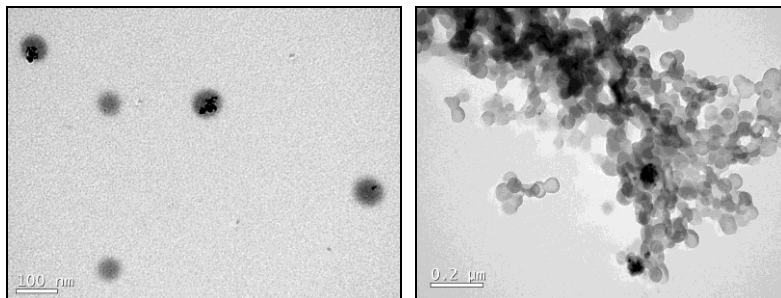
**Figura 4.15 – Difratograma de Raio-x da mistura física de PMMA com ZnPc na razão mássica de 1:1.**

#### 4.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS MAGNÉTICAS COM ZNPC

##### 4.4.1 Morfologia e distribuição de tamanho das nanopartículas

Na Figura 4.16 pode-se ver a morfologia e a distribuição de tamanho das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs, sendo possível observar que não houve alterações consideráveis na distribuição do tamanho das partículas e na morfologia quando comparado com as nanopartículas obtidas somente com ZnPc ou NPMs em separado. O tamanho médio das nanopartículas de PMMA/ZnPc/NPMs foi de aproximadamente 100nm. Cabe ressaltar que o percentual mássico de óxido ferro é de aproximadamente 8% nas nanopartículas poliméricas. Como o óxido de ferro possui uma massa específica em torno de  $5,2\text{g/cm}^3$ , muito superior, portanto, ao do polímero ( $\sim 1,1\text{ g/cm}^3$ ), a sua fração volumétrica nas nanopartículas é muito reduzida ( $\sim 3\%$  em volume). Desta forma, nem todas as

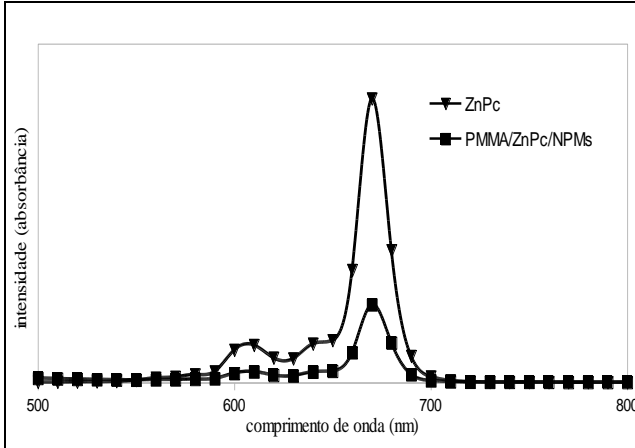
nanopartículas de polímero irão conter NPMs, mesmo porque as NPMs tendem a se agregar. Desta forma, algumas nanopartículas irão conter diversas NPMs enquanto outras não terão nenhuma NPM.



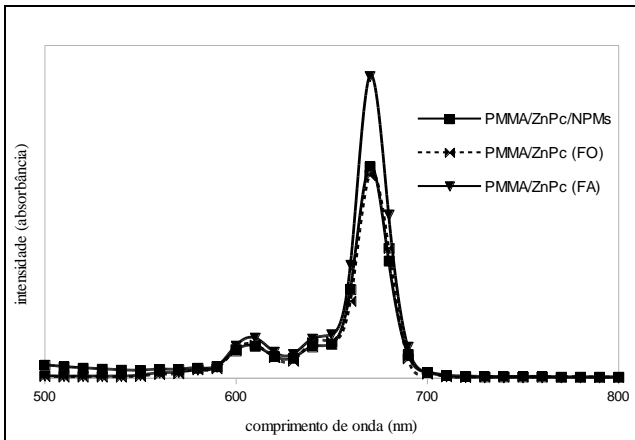
**Figura 4.16 – MET das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs (PMMA/ZnPc/NPMs)**

#### **4.4.2 Caracterização espectrométrica e rendimento do processo das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs**

A partir das Figuras 4.17 e 4.18 pode-se observar que a ZnPc encapsulada com NPMs e PMMA apresentou o pico de absorção no mesmo comprimento de onda, 670nm, que a ZnPC livre e encapsulada. Ou seja, a introdução de NPMs no encapsulamento da ZnPc não influenciou o comportamento espectroscópico das nanopartículas poliméricas. Segundo OLIVEIRA et al, (2004) este é um ponto muito importante para o desenvolvimento de uma nova estrutura contendo ZnPc e NPMs, pois indica que não há interação do fármaco com as NPMs.



**Figura 4.17 – Espectros de absorção no UV-Vis da Sol.1 e PMMA/ZnPc/NPMs**



**Figura 4.18 – Comparação dos espectros de absorção no UV-Vis da PMMA/ZnPc (FA), PMMA/ZnPc (FO) e PMMA/ZnPc/NPMs**

A partir das análises espectrométricas pode-se obter a concentração de ZnPc nas nanopartículas poliméricas, mostrada na Tabela abaixo.

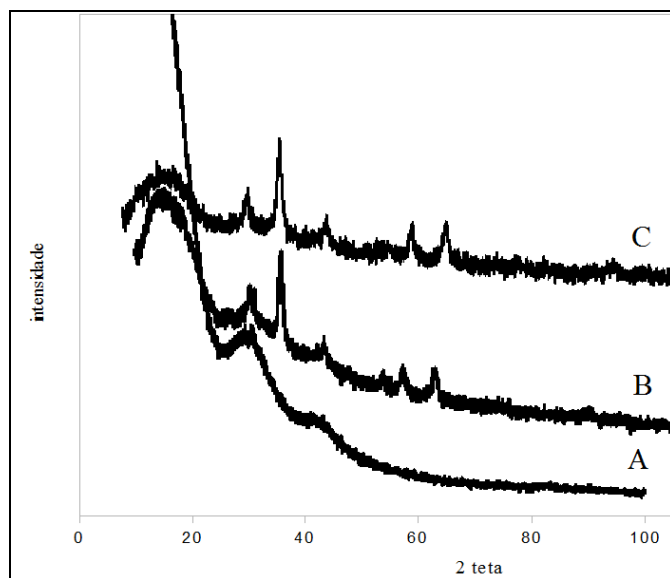
**Tabela 10 – Rendimento do processo e concentração mássica de ZnPc nas nanopartículas poliméricas com NPMs**

Amostras	Rendimento do Processo (%)	Teor de ZnPc ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
PMMA/ZnPc/NPMs	$79 \pm 0,5$	3,6

O rendimento do processo é ligeiramente inferior ao comparar as amostras de PMMA/ZnPc(FA) e PMMA/ZnPc(FO) com a amostra de fármaco encapsulada simultaneamente com as NPMs.

#### 4.4.3 Difração de Raio-X

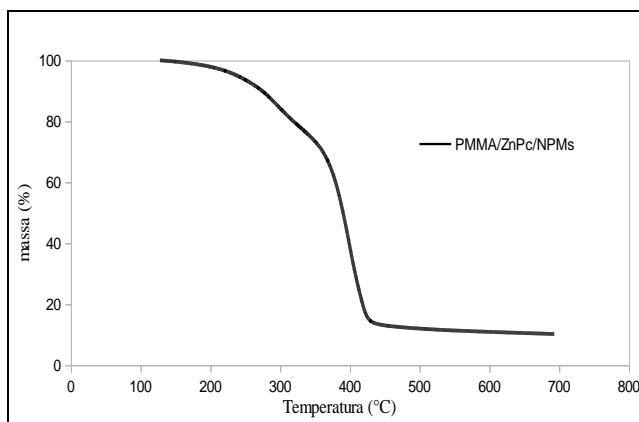
A partir da Figura 4.19 pode-se observar que a ZnPc não altera a estrutura cristalina das NPMs. Desta forma, pode-se afirmar que a estrutura cristalina das NPMs não foram afetadas pela presença da ZnPc.



**Figura 4.19 – Difratograma de Raio-X das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc. As amostras analisadas foram PMMA (A), PMMA/NPMs (B), PMMA/ZnPc/NPMs (C).**

#### 4.4.4 Análise Termogravimétrica – TGA

A Figura 4.20 apresenta o resultado de TGA da amostra de NPMs encapsuladas simultaneamente com ZnPc. Vale frisar que o teor de NPM nestas partículas é inferior ao teor de NPMs encapsuladas isoladamente, pois ao acrescentar a ZnPc acrescenta-se também NMP, o que promove uma certa desestabilização das NPMs no interior das nanogotas de monômero. A concentração residual é de 12% e corresponde ao óxido de ferro presente nas NPMs. Os outros 88% correspondem ao polímero, ou seja, PMMA e AO presente nas NPMs (HONG et al, 2008). Como comentado anteriormente, a concentração final de óxido de ferro é um pouco superior ao da formulação original. Isto se deve a evaporação parcial do AO na estufa, além da possível evaporação de parte do monômero durante a própria reação.

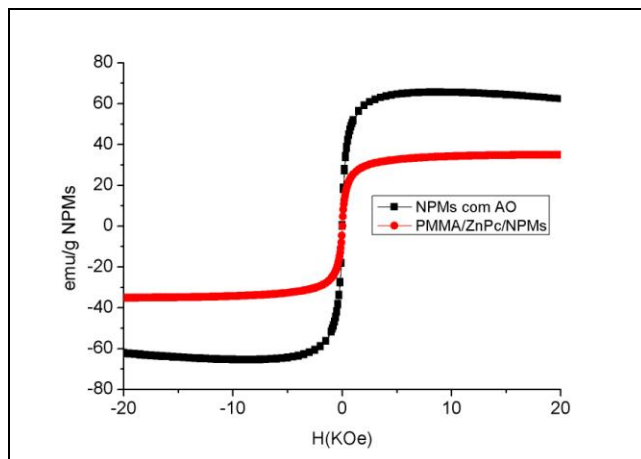


**Figura 4.20 – Análise de TGA das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs**

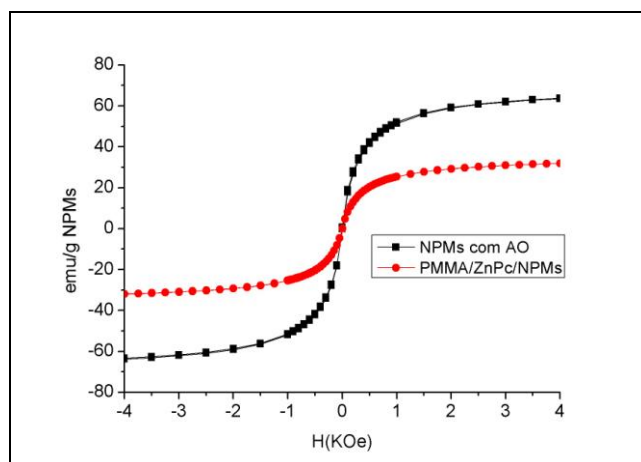
#### 4.4.5 Propriedades magnéticas das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs

Na Figura 4.21 pode-se observar o comportamento superparamagnético das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs quando expostas a uma temperatura ambiente. O comportamento superparamagnético também se equivale ao baixo valor da  $M_r$  e nos pequenos valores de  $H_c$  que pode ser visto na Tabela 11.





(A)



(B)

**Figura 4.21 – Propriedades magnéticas obtidas das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs, campo magnético de 20KOe (A) e campo magnético em maior escala 4KOe (B).**

Observa-se na Tabela abaixo que o valor de  $M_s$  quando comparado com os resultados obtidos no encapsulamento das NPMs sem a ZnPc é muito próximo. Por fim pode-se dizer que a adição de ZnPc não interfere nas propriedades magnéticas das NPMs e com isso

podemos obter nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs com alto valor de Ms e propriedades superparamagnética, possibilitando a liberação do fármaco num alvo específico quando se utiliza um campo magnético externo (ZAVISOVA et al 2007).

**Tabela 11 – Propriedades magnéticas das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs**

Amostras	Ms (emu/g)	$M_r$ ( $\times 10^{-6}$ )	Hc (Oe)
Encapsulamento de ZnPc com NPMs	31	1,3	0,1

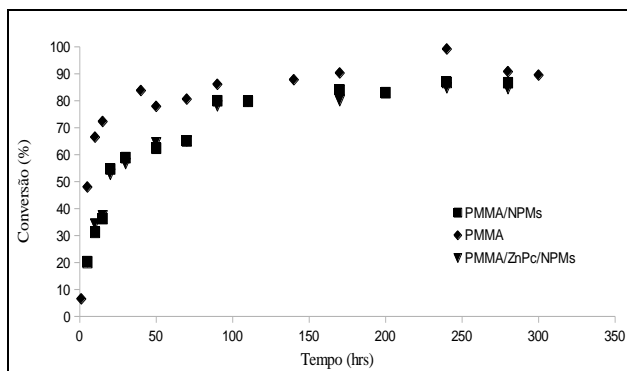
#### 4.5 CONVERSÃO GRAVIMÉTRICA

Os resultados das medidas de gravimetria durante as reações de polimerização indicam que a conversão atinge uma conversão limite com aproximadamente 2 horas de reação (Figuras 4.22 (A) e (B)). A conversão final ficou um pouco abaixo de 100% devido, provavelmente, a evaporação parcial do ácido oleico durante a etapa de secagem das amostras para gravimetria, que não foi considerada nos cálculos. Outro fator que pode ter levado a menor conversão gravimétrica é a perda de monômero (MMA) por evaporação durante a etapa de miniemulsificação e durante a etapa de reação. Esta evaporação do monômero pode ocorrer devido à elevada pressão de vapor do MMA e pela vedação deficiente do reator. De fato, a conversão final ficou sempre muito próxima a 100%, fato este comprovado por análises de monômero residual por cromatografia gasosa.

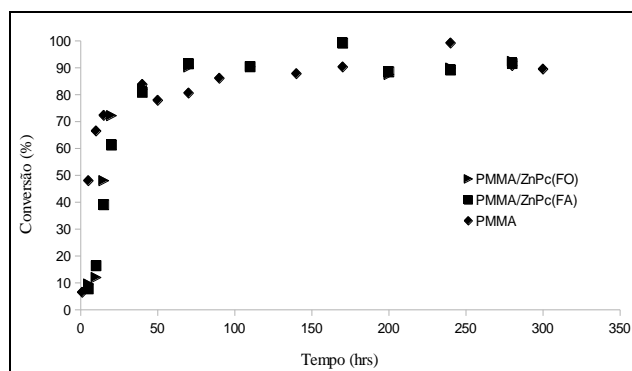
O estudo da cinética das reações é importante para analisar a conversão total do monômero em relação ao tempo e para saber se o material incorporado pode afetar a velocidade de reação. Adicionalmente, é importante frisar que para estudos com finalidade de aplicação na área biomédica é essencial a conversão total do monômero para evitar possíveis efeitos tóxicos do monômero residual.

Através das Figuras 4.22 (A) e (B) pode-se verificar que a evolução da conversão das reações apresentou um comportamento semelhante ao adicionar a ZnPC, indicando que este composto não afeta a cinética e provavelmente não reage com os radicais livre presentes no meio reacional.

Ao adicionar NPMs no meio reacional notou-se uma redução da velocidade de reação em relação às reações sem NPMs. Essa diminuição da taxa de reação pode ser devido à reação do iniciador com o ferro presente no meio reacional formando óxido de ferro, tal como  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , reduzindo a concentração de radicais livre do meio reacional (HONG et al, (2004). Outra possibilidade é a reação dos radicais livre com o ácido oleico que recobre as nanopartículas de óxido de ferro gerando radicais com baixa reatividade.



(A)



(B)

**Figura 4.22 – Conversão gravimétrica das amostras de PMMA/NPMs, PMMA/ZnPc/NPMs (A) e PMMA/ZnPc(FA), PMMA/ZnPc(FO) (B)**

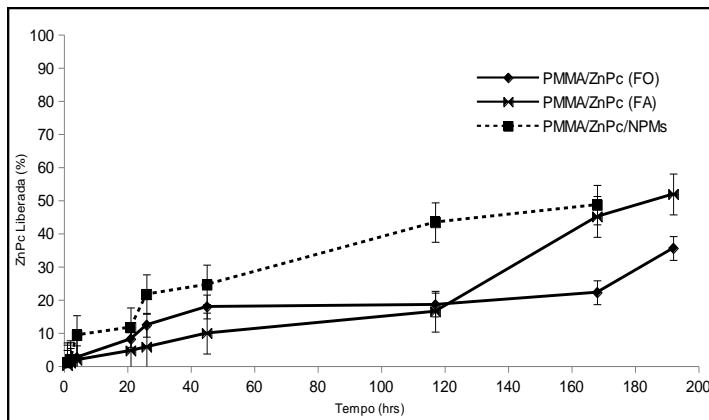
## 4.6 TESTE *IN VITRO*

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica, como os biomateriais que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente. A seguir serão mostrados alguns resultados relacionados ao perfil de dissolução e de fototoxicidade em células tumorais A549.

### 4.6.1 Perfil de dissolução

O teste de dissolução *in vitro* é um elemento importante no desenvolvimento de novas formulações (COSTA e LOBO, 2000). O perfil de dissolução de um fármaco avalia a quantidade de fármaco liberada ao longo do tempo. É necessário delinear ensaios de dissolução que possam prever, de forma mais eficaz, o comportamento *in vivo* das formas farmacêuticas. Para que o teste *in vitro* seja eficaz é necessário que este apresente as mesmas condições *in vivo*, como temperatura e o meio de dissolução (AMIDON et al, 2007; NERY et al, 2005). Para fármacos insolúveis em água, como a ZnPc, o meio de dissolução é um parâmetro relevante para a realização do estudo, já que pode ser necessário um grande volume de meio receptor. Nesses casos, a abordagem atual que parece mais apropriada é a utilização de surfactante. A escolha do surfactante é uma etapa importante e o dodecil sulfato de sódio (SDS), utilizado nesse estudo, é apropriado na maioria dos casos (AMIDON et al, 2005). O SDS foi utilizado para aumentar a solubilidade da ZnPc no meio aquoso e também preveniu a sua adsorção nas superfícies do sistema utilizado, motivos pelos quais Chawla e Amiji (2002) também utilizaram o SDS no estudo de liberação do tamoxifeno de nanopartículas.

O estudo do perfil de liberação das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc foi obtida para avaliar como ocorre a liberação do fotossensibilizante das nanopartículas poliméricas. Os perfis de liberação das nanopartículas poliméricas contendo ZnPc estão apresentados na Figura 4.23.



**Figura 4.23 – Perfil de liberação do encapsulamento da PMMA/ZnPc(FO), PMMA/ZnPc(FA) e PMMA/ZnPc/NPMs**

A liberação das nanopartículas contendo ZnPc foi de modo sustentado e lento como pode ser observado na Figura 21 A e B. Nas primeiras horas apenas 2% da ZnPc foi liberada, e em 20 horas cerca de 10% do ZnPc contido nas nanopartículas foram liberada nas amostras PMMA/ZnPc(FO) e PMMA/ZnPc/NPMs. Enquanto que na amostra de PMMA/ZnPc(FA) apenas 5-10% da ZnPc foi liberada. Depois de aproximadamente 7 dias de experimento as amostras PMMA/ZnPc(FO) e PMMA/ZnPc/NPMs liberaram cerca de 50% da ZnPc, enquanto que a amostra PMMA/ZnPc(FA) liberou cerca de 35% do fármaco. Nos perfis de liberação nenhuma das amostras apresentou efeito “burst”, ou seja, nenhuma das amostras apresentou altas taxas de fármacos liberadas rapidamente. Esta ausência do efeito “burst” pode ser um indicativo que a ZnPc esteja homoganeamente dispersa na matriz polimérica das nanopartículas e de que o processo seja por difusão (nanocapsulas) e não por desorção (nanoesferas) do fármaco. Outro ponto importante na liberação sustentada e lenta do fármaco se deve a utilização de um polímero que não se degrada rapidamente em meio aquoso.

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

aplicada a formas farmacêuticas que não sofrem desagregação e liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo; trata-se de um modo ideal de liberação de fármaco para atingir uma ação farmacológica prolongada, já que a liberação é lenta (COSTA e LOBO, 2001). Este modelo pode ser representado pela equação 4.2 a seguir:

$$Q_t = Q_0 + K_0t \quad (\text{Eq. 4.2})$$

onde:

$Q_t$  = quantidade de fármaco liberado no tempo  $t$ ;

$Q_0$  = quantidade inicial do fármaco na solução;

$K_0$  = constante cinética.

A cinética de primeira ordem, por sua vez, é característica de formas farmacêuticas cuja liberação do fármaco é proporcional a quantidade de fármaco que permanece no seu interior, de modo que a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui com o passar do tempo (COSTA e LOBO, 2001). A equação 4.3 representa esse modelo:

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1t \quad (\text{Eq. 4.3})$$

onde:

$Q_t$  = quantidade de fármaco liberado no tempo  $t$ ;

$Q_0$  = quantidade inicial do fármaco na solução;

$K_1$  = constante de liberação de primeira ordem.

Higuchi desenvolveu alguns modelos teóricos para estudar a liberação de fármacos hidrossolúveis e pouco solúveis em matrizes semi-sólidas e sólidas e descreveu a liberação de um fármaco como um processo de difusão baseado na Lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo (COSTA e LOBO, 2001). O modelo de Higuchi pode ser apresentado pela equação 4.4.

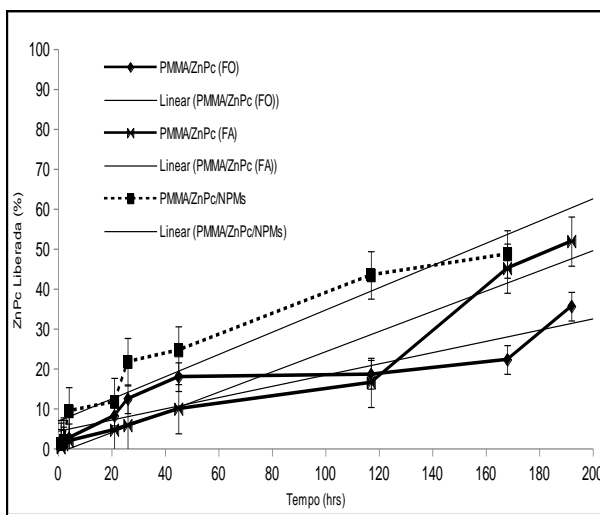
$$Q_t = K_H \times \sqrt{t} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

onde:

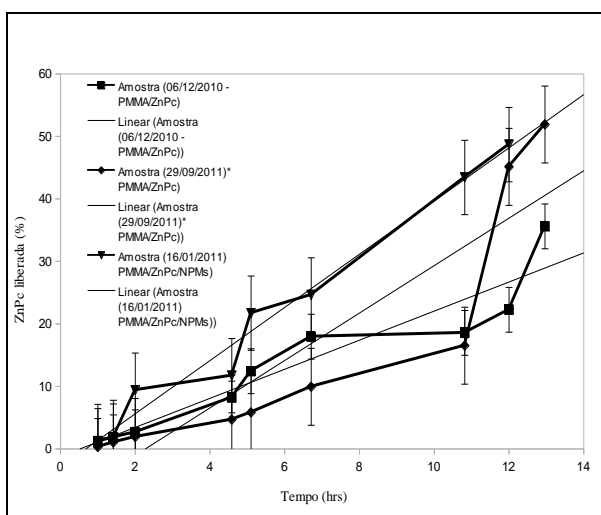
$Q_t$  = quantidade de fármaco liberado no tempo  $t$ ;

$K_H$  = constante de liberação de Higuchi.

A escolha do melhor modelo foi feito através da correlação linear ( $r$ ) obtido em cada perfil de liberação proposto neste trabalho (Figura 4.24). Os resultados estão apresentados na Tabela 12.



(A)



(B)

**Figura 4.24 – Modelos matemáticos que descrevem a cinética de liberação do fármaco: ordem zero (A) e Higuchi (B)**

**Tabela 12 – Estudo da cinética de liberação das amostras de PMMA/ZnPc(FO), PMMA/ZnPc(FA) e PMMA/ZnPc/NPMs.**

AMOSTRAS	Correlação linear (r)		
	Higuchi	Ordem zero	1ª Ordem
PMMA/ZnPc(FO)	0,893	0,854	0,648
PMMA/ZnPc(FA)	0,807	0,939	0,781
PMMA/ZnPc/NPMs	0,978	0,951	0,694

A partir da aplicação dos modelos matemáticos (Higuchi, ordem zero e primeira ordem) e da determinação dos valores de r, o modelo de Higuchi apresentou os maiores valores de r para as amostras PMMA/ZnPc(FO) e PMMA/ZnPc/NPMs, enquanto que o modelo de ordem zero apresentou o maior valor de r para amostra PMMA/ZnPc(FA). As amostras que apresentaram os maiores r no modelo de Higuchi é mais um forte indicativo que o fármaco foi liberado no meio pelo processo de difusão, como já comentando anteriormente. Para amostra que apresentou o maior valor de r no modelo de ordem zero é a nanopartícula que tem ação mais prolongada e sustentada como vimos na Figura 4.23 (A).

Os testes de perfil de dissolução e os modelos matemáticos aplicados neste trabalho foram úteis para mostrar que as nanopartículas poliméricas mostradas apresentam uma liberação sustentada e lenta, podendo assim ser aplicadas a TFD como um sistema de liberação desenvolvido.

#### **4.6.2 Avaliação da toxicidade e da atividade fotobiológica das nanopartículas poliméricas em cultura de células tumorais**

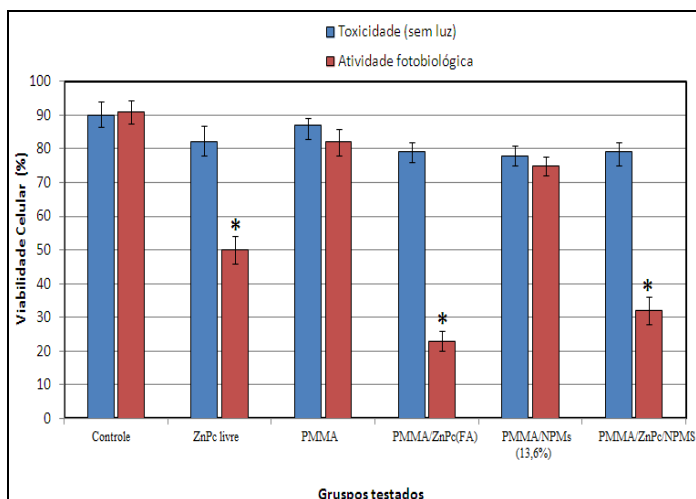
A avaliação da toxicidade e da fototoxicidade dos sistemas foram realizadas pelo método MTT, que determina a viabilidade celular por meio da análise da atividade mitocondrial. A viabilidade celular (%) de todos os grupos analisados (atividade fotobiológica com luz) foi comparada a do grupo controle (células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

Os ensaios independentes foram feitos em sextuplicata para cada grupo e a significância dos resultados ( $p < 0,05$ ) foi avaliada pelo teste ANOVA. Os estudos foram feitos com ZnPc livre solução e encapsulada em nanopartículas. A ZnPc foi dissolvida em DMSO 1 mg/ml e diluída com meio de cultura para ser adicionada as células (5 µg/poço). As



nanopartículas poliméricas contendo ZnPc e NPMs foram adicionadas ao meio de cultura para o preparo de uma suspensão.

Os resultados da toxicidade e atividade fotobiológica estão descritas na Figura 4.25.



**Figura 4.25 – Estudos de toxicidade (ausência de luz) e de atividade fotobiológica (irradiação de luz:  $40 \text{ J/cm}^2$ ) em cultura de células A549 das nanopartículas de PMMA contendo ou não ZnPc. Dose por poço:  $5 \mu\text{g}$  ZnPc e tempo de incubação de 4 horas. Média  $\pm$  desvio padrão de seis experimentos independentes. \*Significativamente menor do que o controle na ausência de luz ( $p < 0,05$  ANOVA)**

No ensaio de toxicidade (ausência de luz), as nanopartículas mostraram baixa toxicidade como pode ser visto nas barras em azul da Figura 4.25. Esse efeito citotóxico não foi estatisticamente significativo em relação ao controle ( $p > 0,05$ ), confirmando a baixa toxicidade dos sistemas de liberação estudados. O pequeno aumento na toxicidade das nanopartículas contendo ZnPc, em relação às nanopartículas vazias ( $p > 0,05$ ), pode ser atribuído à presença do fotossensibilizante, que apresenta baixa toxicidade na ausência de luz, mas pode causar a inativação de uma parte das células.

Esses resultados estão de acordo com resultados já descritos na literatura. Konan et al. (2003) analisaram a toxicidade e a atividade fotobiológica de nanopartículas vazias ou contendo porfirina meso-tetra(4-hidroxifenil) encapsulada após a incubação em cultura de células

EMT-6 (células tumorais mamárias de camundongos) e não observaram citotoxicidade significativa no escuro em nenhuma das condições analisadas. A ausência de efeito citotóxico significativo após a incubação com nanopartículas de PMMA vazias é consistente com a biocompatibilidade e segurança relatados na literatura. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária a ANVISA (2011), o PMMA é uma matéria-prima de implantes, inclusive ortopédicos, que são usados para fins de reparação médica. Além disso, a substância é utilizada nas técnicas de preenchimento estético, mais popularmente conhecidas como bioplastias.

No ensaio de atividade fotobiológica, observou-se, inicialmente, que a luz isoladamente não foi capaz de induzir efeito citotóxico sobre a cultura de células ( $p > 0,05$ ), uma vez que a viabilidade celular foi mantida em 90% após a irradiação das células com dose de  $40 \text{ J/cm}^2$ . Kolárová et al. (2003) irradiaram células de melanoma humano (G361) com luz visível e observaram que a viabilidade das células permanecia acima de 90% após irradiação de luz em doses de 0,5 a  $150 \text{ J/cm}^2$ . As nanopartículas de PMMA vazias também apresentaram baixa toxicidade na presença de luz ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, as nanopartículas contendo ZnPc induziram efeito citotóxico nas células A549 após a irradiação com luz. Houve uma redução significativa da viabilidade celular para 22% no caso das nanopartículas contendo ZnPc e ( $p < 0,05$ ; em relação o controle) e redução para 30% no caso das nanopartículas contendo ZnPc e NPMs encapsuladas com nanopartículas poliméricas ( $p < 0,05$ ; em relação ao grupo controle). Os estudos de toxicidade e de atividade fotobiológica foram importantes para confirmar que a toxicidade das nanopartículas vazias e contendo ZnPc é baixa na ausência de luz.

A localização do fotossensibilizante nas células tumorais pode influenciar a atividade fotodinâmica (RÜCK et al., 1996). O caminho pelo qual o fotossensibilizante será interiorizado pelas células tumorais será definido pelas suas propriedades químicas, tamanho, carga, caráter hidrofílico-lipofílico. Além disso, a distribuição celular é determinada pelo mecanismo de internalização, que pode ser influenciado pela composição do meio e pelo tipo de sistemas carreadores utilizados para a liberação do fotossensibilizante nas células (RÜCK et al., 1996; KONAN et al., 2003). Assim, comparando-se a atividade fotobiológica da ZnPc livre e encapsulada, a livre é menos citotóxica do que a encapsulada com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). A ZnPc livre em solução, por ser hidrofóbica, pode localizar-se no interior da membrana plasmática (bicamada de fosfolípidios) onde é menos citotóxica. As nanopartículas podem se adsorver na superfície celular ou

podem ser captadas pelas células por endocitose. Após internalização por endocitose, nanopartículas podem liberar a ZnPc no citoplasma da célula onde ela é mais citotóxica. A própria partícula contendo moléculas de ZnPc na sua superfície pode funcionar como um núcleo gerador de oxigênio singlete durante o processo de irradiação por TFD.



Foram sintetizadas nanopartículas magnéticas, NPMs, com ácido oleico, AO, com diâmetro médio de 13nm utilizando o método de coprecipitação em meio aquoso a temperatura ambiente. Estas NPMs são compostas majoritariamente de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) com alto valor de magnetização de saturação ( $M_s$ ) e propriedades superparamagnética. O encapsulamento destas NPMs via polimerização de MMA em miniemulsão foi eficaz como se pode observar nas análises de MET.

No encapsulamento da ZnPc via polimerização de MMA em miniemulsão com ou sem auxílio da técnica de nanoprecipitação pode-se obter resultados satisfatórios. Utilizando a técnica de UV-Vís verificou-se que as propriedades espectrométricas da ZnPc não foram alteradas e o rendimento do processo de encapsulação da ZnPc nas nanopartículas poliméricas foi superior a 80% em ambos os métodos. O método de encapsulamento com auxílio da técnica de nanoprecipitação se mostrou mais eficaz para encapsulamento da ZnPc resultando em uma concentração mais elevada de ZnPc nas nanopartículas poliméricas (3,7 contra 3,0  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ).

No encapsulamento simultâneo de NPMs com ZnPc não ocorreu alteração das propriedades espectrométricas da ZnPc e nem das propriedades magnéticas das NPMs. A incorporação das NPMs foi comprovada através das análises do MET.

Através do estudo de liberação *in vitro* pode-se verificar que o perfil de liberação da ZnPc foi lenta e sustentada em ambas nanopartículas poliméricas (com ou sem NPMs). O estudo de fototoxicidade mostrou que a ZnPc liberada das nanopartículas poliméricas sem e com NPMs foi capaz de reduzir em mais de 70% a viabilidade de células neoplásicas da linhagem A549 após exposição à luz com comprimento de onda de 660nm.

Como sugestões para trabalhos futuros, pode-se citar:

- ✓ Estudar o efeito das NPMs encapsuladas no tratamento por hipertermia de várias células tumorais;

- ✓ Estudar o efeito da terapia fotodinâmica com ZnPc encapsulada em nanopartículas poliméricas em células tumorais;
- ✓ Realizar o estudo do efeito do tratamento simultâneo por terapia fotodinâmica e hipertermia utilizando as nanopartículas poliméricas com NPM e ZnPc.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AMIDON, G.L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification of *in vitro* Drug Product Dissolution and *in vivo* Bioavailability. **Pharmaceutical Research**. v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ASUA, M. J. Miniemulsion Polymerization. **Prog. Polym. Sci**, v. 27, p. 1283 – 1346, 2002.

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

BRIEN, P.; KROTO, H.; CRAIGHEAT, H. **Polymer Based Nanostructures: Medical applications**. ed. RSC. p.372. 2010.

CAPEK, I. Degradation of Kinetically-Stable O/W Emulsions: **Adv. Colloid Interf. Science**. v.107, p. 125-155, 2004.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 2, p. 1 – 23, 2005a.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three – Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p.91–106, 2005b.

CASTANO, A.P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. **Nature Reviews**, v. 6, p. 535 – 545, 2006.

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

COUTO, G. G.; Nanopartículas de Níquel: Síntese, Caracterização e Propriedades e Estudo de sua Utilização como Catalisadores na Obtenção de Nanotubos de Carbono. 2006. **Tese de Doutorado** – Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR, 2006.

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

CULLITY, B.D. Introduction to Magnetic Materials. **Addison-Wesley**, Reading, 1972.

DAVE, S. R; GAO, X. Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology, You have free access to this content, Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 1, n.6, p.583-609, 2009.

DOUGHERTY, T.J; KAUFMAN, J.E; GOLDFARB, A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Res**, v.38, p.2628-263, 1978.

DUNLOP, D. J.; OSDEMIR, O. Rock Magnetism, Fundamentals and Frontiers. **Cambridge University Press**, p.565, 1997.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. Nanotecnologia: **Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicações**. São Paulo, Artiliber, 2006; p.175-183.

FESSI, H.; PUISEUX, F.; DEVISSAGET, J.; AMOOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int. J. Pharm**, v. 55, R1-R4, 1989.



GNANAPRAKASH, G.; MAHADEVAN, S.; JAYAKUMAR, T.; KALYANASUNDARAM, P.; PHILIP, J.; RAJ, B. Effect of initial pH and temperature of iron salt solutions on formation of magnetite nanoparticles: **Metallurgy and Materials Group, Indira Gandhi Centre for Atomic Research**, n.103, p.168-175, 2006.

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

GUPTA, A. K.; WELLS, S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. **IEEE Transactions on Nanobioscience**, v. 3, n. 1, p. 66-73, 2004.

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

GRADY, K. O.. Biomedical applications of magnetic nanoparticles. **Journal of Physics**, University of York. n. 1, p.12-13, 2002.

HARRIS, J.M.; CHESS, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature Rev. Drug Discov**, v.2, p. 214, 2003.

HENDERSON, B.; DOUGHERTY, T.J. How does photodynamic therapy work *Photochem. V.* 55. 14530. Hope, M. and Kitson, C. 1993. Liposomes; A perspective for dermatologists. **Review Dermatologic Clinics**, v. 11 p. 143-154, 1992.

HANEDA, K; MORRISH, A.H. **Solid State**. v. 22, p.779-782, 1977.

HONG, R.Y.; FENG, B.; CAI, X.; LIU, G.; LI, H. Z.; DING, J.; ZHENG, Y.; WEI, D. Z. Double-Miniemulsion Preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Poly(methyl methacrylate) Magnetic Latex. **Wiley InterScience**. DOI 10.1002/app.29403. 2008.

HOLZAPFEL, V.; LORENZ, M.; WEISS, C. K.; SCHEREZNEIHER, H.; LANDFESTER, K.; MAILANDER, V. Synthesis and biomedical applications of functionalized fluorescent and magnetic dual reporter nanoparticles as obtained in the miniemulsion process. **Journal of Physics**, n. 18, p.2581-2594, 2006.

KONAN, Y.N.; BERTON, M.; GURNY, R.; ALLEMANN, E. Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl) porphyrin by incorporation into sub-200nm nanoparticles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 18, p. 241-249, 2003.

KONERACKA, M.; MUCKOVA, M.; ZAVISOVA, V.; TOMASOVICOVA, V.; KOPCANSKI, P.; TIMKO, M.; JURIKOVA, A.; CSAK, K.; KAVECANSKY, V.; LANES, G. Encapsulation of anticancer drug and magnetic particles in biodegradable polymer nanospheres. **Journal of Physics**, n. 20, p.240-245, 2008.

KOLÁROVÁ, H.; MOSINGER, J.; LENOBEL, R.; KEJLOVA, K.; JIROVÁ, D. STRMAD, M. *In vitro* toxicity testing of supramolecular sensitizers for photodynamic therapy. **Toxicology in vitro**, v. 17, p. 775-778, 2003.

KOVALSKAYA, N. E.; KUSNETSOVA, N. A.; KALIYA, O. L.; GRETSOVA, N. S.; SOLKOLVA, I. V. Study of Spectral Properties of Zinc Phthalocyanines Used as Sensitizers in Photodynamic Therapy. **Optics and Spectroscopy**, vol. 89, n.5, p.724-726, 2000.

KNOBEL, M. Partículas finas: Superparamagnetismo e Magnetoresistência gigante. **Revista Brasileira de Ensino de Física**. vol. 22, n.03, p.387-395. 2000.

LANDFESTER, K. Structures in Miniemulsion: Miniemulsion Polymerization and the Structure of Polymer and Hybrid Nanoparticles. **Angew Chemical**, n.48, p. 4488-4507, 2009.

LANDFESTER, K. Synthesis of colloidal particles in miniemulsions: **Annual Review of Materials Research**, v. 36, p. 231-79, 2006.

LANDFESTER, K.; RAMIRES, L. P. Encapsulated magnetite particles for biomedical application. **Journal of Physics**, n. 15, p.1345-1361, 2003.

LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; EIST, L. V.; MULLER, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. **Chemical Review**, n. 108, p.2064-2010, 2008.

LIPP, R.; MULLER-FARHNOW, A. Use of X-ray crystallography for the characterization of single crystals grown in steroid containing transdermal drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 47, p.133-138, 1999.

MANO, E.B.; MENDES, L.C. **Introdução a Polímeros**, 2 ed, São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda, 1999.

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

MUSYANOVYCH, A.; WIENKE, J. Sc.; MAILANDER, V.; WALTHER, P.; LANDFESTER, K.. Preparation of Biodegradable Polymer Nanoparticles by Miniemulsion Technique and Their Cell Interactions, **Macromol. Biosci**, v.8, p.127-139, 2008.

NOGUEIRA, A. L.; MACHADO, R. A. F; SCHLISTING R.; ROMIO, A. P.; ARAÚJO, P. H. H. **Polímeros e Reações de Polimerizações**, UFSC. p.153, 2002.

ODIAN, G. **Principles of Polymerization**: A John Wiley & Sons. 4ed. p.812. 2004.

OLIVEIRA, D. M.; MACAROFF, P.P.; LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; LIMA, E. C. D.; MORAES, P. C.; TEDESCO, A. C. Studies of zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex as a bifunctional

agent for cancer treatment. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.289, p.476–479, 2006.

ORGANIZACAO MUNDIAL DE SAUDE. **Câncer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em: Nov. 2011.

PARRAS C.; GONZALES, G.; ALBANO, C. Synthesis of PMMA by high frequency ultrasound. **Microsc Microanal**, n.11, 2005.

PERES, A.P.G.; FREITAS, A.R.; GAFFO, L. Síntese e caracterização de ftalocianina de zinco com caráter semicondutor do tipo-n. **Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, 2006.

PUISIUEX, F.; ROBLLOT-TREUPEL, L. Vetorização e vetores de fármacos. **Caderno de Farmácia, Universidade Federal do Rio grande do Sul, UFRGS**. v. 4, n. ½, p.29-50, 1988.

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

REZENDE, S. M. A **física de materiais e dispositivos eletrônicos**, Recife, ed. UFPE. p.530, 1996.

RIBEIRO, G. A. Pavan. As Propriedades Magnéticas da Matéria: Um Primeiro Contato. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, p. 299-305, 2000.

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

RICCI-JÚNIOR, E. Nanopartículas de ácido poli (D,L láctico-co-glicólico) contendo zinco (II) ftalocianinapara uso na terapia fotodinâmica. **Tese** (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), 2005.

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

ROMIO, A. P. Obtenção de Nanopartículas Ocas via Polimerização em Miniemulsão **Dissertação. (Mestrado em Engenharia de Química)** – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, UFSC, Florianópolis, 2007.

ROSENSWEIG, E. R. Ferrohydrodynamics, **Cambridge Univ. Press**, Cambridge, 1985.

RÜCK, A.; BECK, G.; CACHOR, K.; AKGÜN, N.; GSCHWIND, M.H.; STAINER, R. Dynamic fluorescence changes during photodynamic therapy *in vivo* and *in vitro* of hydrophilic Al (II) phthalocyanine tetrasulphonated and lipophilic Zn (II) phthalocyanine administered in liposome. **J. Photochem. Photobiol**, v. 36, p. 127-133, 1996.

SAIYED, Zainulabedin M; GANDHI, Nimisha H; NAIR, Madhavan PN. Magnetic nanoformulation of azidothymidine 5'-triphosphate for targeted delivery across the blood-brain barrier. **International Journal of Nanomedicine**, n. 5, 2010.

SAMANEH, A.; MOHAMMED, R.V. Phase Transformation of Iron Oxide Nanoparticles by Varying the Molar Ratio of Fe<sup>2+</sup>:Fe<sup>3+</sup>. **Chem. Eng. Technology**, vol. 31, n.11. p. 1591-1596, 2008.

SANDLER, S.R.; KARO, W.; BONESTEEL, J.A. Polymer Synthesis and Characterization. **A Laboratory Manual**, New York, Academic Press

SAMPAIO, L. C.; GARCIA, F.; CERNICCHIARO, G. R. C.; TAKEUCHI, A. Y. Técnicas de Magnetometria. **Revista Brasileiro de ensino de física**, v. 22, n. 3, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUEREEZ, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade Físico-Química de sistemas Poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, Porto Alegre, v. 26, n. 5, p.726-737, 2003.

SINNECKER J. P. Materias magnéticos Doces e Materiais magnéticos Amorfos. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22. n. 3. Setembro, 2000.

SOARES, M. V. **Desenvolvimento e Avaliação de Nanopartículas de Poli-ε-caprolactona contendo Zinco(II)ftalocianina para Uso na Terapia Fotodinâmica do Câncer**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica) Programa de Pós Graduação em Farmácia, UFRJ, 2009.

SOARES, V. M.; LANZARINE, M. C.; OLIVEIRA S. D.; RAMOS-JUNIOR M. S. P.; SANTOS, P. E.; RICCI-JUNIOR, Eduardo. Improving the phototoxicity of the Zinc Phthalocyanine by encapsulation in nanoparticles: Preparation, characterization and phototherapy studies: **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29. P.5-12, 2010.

SOPPIMATH, K. S; AMINABHAVI, T. M; KULKARNI, A. R; RUDZINSKI, Walter E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**. v.70, p.1–20, 2001.

STONER, E. C; WOLHFARTH, E. P. A Mechanism of Magnetic Hysteresis in Heterogeneous Alloys. *Phil. Trans. R. Soc. London*, p.599-642, 1948.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E; CHIANN, C; GAI, M. N. **Biofarmacotécnica: Ciências Farmacêutica.** ed. Guanabara Koogan, p. 321, Rio de Janeiro, 2009.

TARTAJ, P.; MORALES, M. P.; VENTEMILLAS-VERDAGUER, S.; GONZALES-CARRENO, Teresita; SERNA, Carlos J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics**, n. 36, p.182-197, 2003.

TEJA, A. S.; KOH, P-Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. **School of Chemical & Biomolecular Engineering, Georgia Institute of Technology**, Atlanta. v.55, p. 45 - 55, 2009.

TOMAZINI, M. V.; SOUZA, C. S.; GARCIA, S. B.; TEDESCO, A. C.. Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tópica: avaliação da intensidade de fluorescência, absorção cutânea, alterações histológicas e imuno-histoquímicas na pele do modelo animal. **Associação Brasileira de Dermatologia**, n.82, p.535-541, 2007.

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

UCHEGBU, I. F.; SCHATZLEIN, A. G. **Polymer Drugs Delivery.** England: Kindle. p.201, 2006.

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

WENDHAUSEN P., RODRIGUES, G. V., MARCHETTO, O. **Análises Térmicas.** UFSC, 2002

WU, J. H.; KO, S. P. ; LIU, H.-L.; KIM, S.; JU, J.-S.; KIM, Y. K.. Sub 5 nm magnetite nanoparticles: Synthesis, microstructure, and magnetic properties. **Materials letters**, n. 61, p.3124-3129, 2006.

YOO, H.S., Choi, H.K., Park, T.G. Protein-fatty acid complex for enhanced loading and stability within biodegradable nanoparticles. **Journal. Pharm. Sci**, n.90, p.194–201, 2001.

ZASIVOVA, V.; KONERACKA, M.; STRBAK, O.; TOMASOVICOVA, N.; KOPCANSKY, P.; TIMKO, M.; VAVRA, I. Encapsulation of indomethacin in magnetic biodegradable polymer nanoparticles. **Journal Of Magnetism And Magnetic Materials**, Slovakia, n. 311, p.379-382, 2007.

ZANGH, L; HE, H.; GU, H. C. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 253, p.2611 – 2617, 2006.

ZHANG, Y.; KOHLER, N.; ZHANG, M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. **Biomaterials**, v. 23, p. 1553-1561, 2002.

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

ZHENG, W., GAO F, GU, H. Magnetic polymer nanospheres with high and uniform magnetite content. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.288, p.403-410, 2005.

ZHU, Y; WU, Q. Synthesis of magnetite nanoparticles by precipitation with forced mixing. **Journal of Nanoparticle Research**, v.1, p. 393-396, 1999.