

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nanocápsulas de núcleo lipídico: Avaliação da influência da estrutura supramolecular e área de superfície do carreador na resposta biológica *in vitro*

LUANA ALMEIDA FIEL

PORTO ALEGRE, 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nanocápsulas de núcleo lipídico: Avaliação da influência da estrutura supramolecular e área de superfície do carreador na resposta biológica *in vitro*

Tese apresentada por **Luana Almeida Fiel** para
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas

Orientador(a): Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Porto Alegre, 2013

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 06.12.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

Universidade do Estado de São Paulo (UNESP) – Faculdade de Farmácia

Profa. Dra. Leandra Franciscato Campo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Instituto de Química

Profa. Dra. Andreia Buffon

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Faculdade de Farmácia

Prof. Dr. Alexandre Jose Macedo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Faculdade de Farmácia

Fiel, Luana Almeida

Nanocápsulas de núcleo lipídico: Avaliação da influência da estrutura supramolecular e área de superfície do carreador na resposta biológica in vitro / Luana Almeida Fiel. -- 2013.
251 f.

Orientadora: Adriana Raffin Pohlmann.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Tecnologia Farmacêutica . 2. Nanotecnologia.
I. Pohlmann, Adriana Raffin, orient. II. Título.

Descrição

Este trabalho foi realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul nos laboratórios de Micro e Nanopartículas Aplicadas na Terapêutica (Instituto de Química/UFRGS), de Sistemas Nanoestruturados para a Administração de Fármacos (Faculdade de Farmácia/UFRGS) (Colaboração da Professora Dra. Sílvia S. Guterres, das alunas de doutorado Renata V. Contri e Karina Paese e da PhD Andressa Bernardi) e de Sinalização purinérgica e Câncer (Departamento de Bioquímica/UFRGS) (Colaboração da Professora Ana Maria O. Battastini e do aluno de doutorado Fabrício Figueiró). Laboratórios multiusuários situados nas dependências da UFRGS foram utilizados para uso de equipamentos. A aluna recebeu bolsa CNPq.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Adriana Pohlmann, que me orientou desde a iniciação científica, agradeço pelas oportunidades concedidas e por seus preciosos ensinamentos. À Profa. Dra. Sílvia Guterres pela colaboração durante o decorrer desses anos, pela ajuda e por disponibilizar seu laboratório. Ao Prof. Dr. Ruy Beck, pelas contribuições durante as discussões de trabalhos. Agradeço aos colaboradores da Bioquímica, à Profa. Dra. Ana Maria Battastini por disponibilizar seu laboratório, materiais e sua equipe de alunos, em especial ao Doutorando Fabrício Figueiró pelo acompanhamento direto. À Dra. Andressa Bernardi, pelo acompanhamento no início dos experimentos na Bioquímica.

Agradeço a todos atuais e antigos colegas dos laboratórios K204 e 405 pela receptividade, ajuda e amizade. À Juliane Freitas Bica, aluna de iniciação científica, um agradecimento especial pela enorme ajuda a partir do segundo ano deste trabalho. Agradeço à Renata Contri, colega de Faculdade, grande amiga e também colega de trabalho. Ao Tiago Irolin, pela amizade e discussões sobre química. Agradeço a toda minha família, à minha Mãe Leonor, ao meu Irmão Edmilson, ao meu Pai Édson (*in memoriam*) e ao meu marido Cristian pelo incentivo constante, pelo festejo por cada conquista, pelo carinho e porto de repouso fornecido.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela infraestrutura e ensino de qualidade. Ao CNPq pela bolsa concedida. Agradeço aos membros da banca examinadora, por aceitarem avaliar o trabalho e certamente contribuir para o enriquecimento do mesmo. Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento e conclusão desta tese.

Resumo

O presente trabalho de tese avaliou a influência da estrutura supramolecular e da área de superfície de nanopartículas (A_s) sobre a resposta biológica. A resposta biológica foi investigada *in vitro* segundo alterações de viabilidade celular de linhagem de glioblastoma. Formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico, formadas por poli(épsilon-caprolactona), monoestearato de sorbitano, triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico e polissorbato 80, contendo ou não indometacina ou acetileugenol foram utilizadas como modelo de nanocarreador. Materiais fluorescentes, polímero ou triglicerídeo, foram obtidos pelo acoplamento a uma sonda fluorescente (rodamina B) e utilizados para preparar nanopartículas fluorescentes as quais foram avaliadas quanto à captação celular. Os resultados obtidos demonstraram que a estrutura supramolecular do nanocarreador e a A_s contida no tratamento afetam a resposta biológica. A presença da parede polimérica, a integridade desta e a homogeneidade do sistema parecem resultar em uma maior interação com a superfície celular e captação do carreador de forma íntegra assim como uma maior A_s leva a potencialização da resposta biológica por ocasionar maior captação celular.

Palavras-chave: nanocápsulas de núcleo lipídico, estrutura supramolecular, área de superfície, resposta biológica, nanocápsulas fluorescentes, captação celular.

Lipid core nanocapsules: The influence of the nanostructure and surface area to the biological response *in vitro*

ABSTRACT

The influence of the supramolecular structure and surface area of nanoparticles (S_{area}) on the biological response was evaluated. The biological response was investigated *in vitro* by means of cell viability changes of a glioblastoma cell line. Lipid core nanocapsules aqueous formulations, composed with poly(ϵ -caprolactone), sorbitan monostearate, caprylic/capric triglyceride and polysorbate 80, containing or not indomethacin or acetylenol were used as models of nanocarrier. Fluorescent materials, a polymer or a triglyceride, were obtained by coupling with a fluorescent probe (rhodamine B) and used to prepare fluorescent nanoparticles which were evaluated for cellular uptake. The results showed that the supramolecular structure of the nanocarrier and the S_{area} presented in the treatment affect the biological response. The presence of the polymer wall, its integrity and the homogeneity of the system appear to result in greater interaction with the cell surface and affect the carrier uptake as well as a higher S_{area} potentializes the biological response probably due increased cellular uptake.

Keywords: lipid-core nanocapsules, supramolecular structure, surface area, biological response, fluorescent nanocapsules, cellular uptake.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AcEUG: Acetileugenol

ACN: acetonitrila

ANOVA: Análise de variância

A_s : área de superfície de carreador por cm^3 da formulação

A_{se} : área de superfície específica

A_s^t : área de superfície de carreador presente por cm^3 nos tratamentos celulares

BS: retroespalhamento de luz

BZ3: benzofenona-3

$^{\circ}\text{C}$: Celsius

CCD: cromatografia em camada delgada

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

COX: enzima cicloxigenase

$D_{[4,3]}$: diâmetro médio de esfera equivalente, obtido por difração de laser

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DEMEN: meio de cultura para as células C6 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMAP: dimetilaminopiridina

DMSO: Dimetil sulfoxido

DSC: calorimetria exploratória diferencial

EDCI: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EMLTV: espalhamento múltiplo de luz em temperatura variada ()

EUG: eugenol

GPC: cromatografia de permeação em gel

IC50: é a concentração de uma substância em cuja resposta é reduzida pela metade

IndOH: Indometacina

MFI: intensidade de fluorescência média

Mn: massa molar numérica média

MS: monoestearato de sorbitano

MSC: critério de seleção do modelo

MTT: 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-brometo de difeniltetrazolium

Mw: massa molar ponderal média

NC: Nanocápsulas

NCL: Nanocápsulas de núcleo lipídico

NCL³: Nanocápsulas de núcleo lipídico sendo 3% a fração mássica da fase dispersa

NCL⁶: Nanocápsulas de núcleo lipídico sendo 6% a fração mássica da fase dispersa

NEL: nanoemulsão

NF- κ B: complexo proteico que desempenha funções de fator de transcrição

O/A: óleo/água

OM: óleo mineral

OR: óleo de rícino

OR-Ro: óleo de rícino contendo ricinoleína quimicamente acoplada a rodamina

P: nível descritivo da significância estatística

P80: polissorbato 80

PBS: tampão fosfato salino

PCL: poli(epsilon-caprolactona)

PCL-Ro: poli(epsilon-caprolactona) acoplada à rodamina

PCS: espectroscopia de correlação de fótons

PDI: índice de polidispersão

PI: iodeto de propídeo

PMA: acetato miristato de forbol

ppt: precipitado

r: coeficiente de correlação

RMN-H1: ressonância magnética nuclear de próton

Ro: Rodamina

RoB: rodamina B

RPMI: meio de cultura desenvolvido pelo Roswell Park Memorial Institute

SFB: Soro fetal bovino

Sol: solução

SPAN: polidispersão

TCC: triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico

THF: tetrahidrofurano

TNF- α : citocina envolvida na resposta inflamatória sistêmica

UV-Vis: Ultravioleta visível

z-average: diâmetro médio obtido por espectroscopia de correlação de fótons

Φ : proporção de solvente orgânico considerando a quantidade total de meio

ΔH° : parâmetro termodinâmico entálpico

ΔBS : variação de BS (DeltaBackscattering)

α : nível de significância

λ_{em} : comprimento de onda de emissão

λ_{exc} : comprimento de onda de excitação

J_0 : fluxo Intrínseco

J_{app} : fluxo aparente

logD: logaritmo do coeficiente de distribuição, D, ([espécies, neutras ou ionizadas, em octanol]/[espécies de água]).

Rf: fator de retenção

d: diâmetro

DP: desvio padrão

AINEs: anti-inflamatórios não esteroides

NTA: análise de rastreamento de partículas

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição quali e quantitativa das formulações brancas contendo ou não PCL-Ro.....	40
Tabela 2. Composição quali-quantitativa das nanocápsulas fluorescentes (NC) e nanocápsulas de núcleo lipídico fluorescentes (NCL) preparadas com o produto OR-Ro.....	44
Tabela 3. Composição quali e quantitativa utilizada para preparar as formulações de NCL contendo indometacina e as respectivas formulações brancas (sem indometacina).....	48
Tabela 4. Composição quali e quantitativa das formulações de NCL contendo essência oleosa de cravo-da-índia ou acetileugenol.....	52
Tabela 5. Valores de constantes de velocidade (h^{-1}), coeficientes de correlação e MSC obtidos pelo ajuste dos dados de BZ3 quando em solução ou encapsulada nas NCL.....	78
Tabela 6. Valores de fluxo (J) obtidos pelos coeficientes angulares da região linear após ajuste dos perfis de dissolução nas soluções hidroetanólicas à primeira lei de Fick e os respectivos valores de coeficiente de correlação. $n=3$	81
Tabela 7. Concentração de partículas por mL de formulação para as formulações preparadas com 10% da massa total polimérica sendo polímero PCL16 (NCL ³) ou polímero fluorescente (NCL ³ _{PCL-Ro}).....	91
Tabela 8. Valores de pH, $D_{[4,3]}$, $D_{0.5n}$ e SPAN, obtidos por difração de laser, valores de z-average e PDI, obtidos por espectroscopia de correlação de fótons, e valores de potencial zeta, obtidos por mobilidade eletroforética, para as formulações NCL ³ _{OR-Ro(10%)-PCL} , NC ^{5.1} _{OR-Ro(10%)-S100} e NC ^{4.3} _{OR-Ro(10%)-RS100} (média±DP, $n=3$).....	104
Tabela 9. Concentração de partículas por mL de formulação.....	119
Tabela 10. Valores de tamanho médio de partícula ($D_{[4,3]}$), polidispersão (SPAN), área de superfície específica (A_{se}) e área de superfície de carreador por mL de formulação (A_s) obtidos para as formulações NCL ³ e NCL ⁶ contendo ou não indometacina (média±DP, $n=3$).....	121

Tabela 11. Valores de diâmetro médio (z-average), largura do pico e PDI obtidos por espectroscopia de correlação de fótons, potencial zeta, obtidos por mobilidade eletroforética e concentração de partículas, obtidos por NTA (média \pm DP, n=3).	129
Tabela 12. Valores de ΔH° (J mol ⁻¹) para as formulações NCL-Br, NCL ³ -AcEUG ^{8,33} e NCL ³ -EUG ^{10,35}	136
Tabela 13. Valores de temperatura de fusão (T_f), entalpia de fusão (ΔH_f) obtidos por calorimetria exploratória diferencial após um ciclo de aquecimento.....	139
Tabela 14. Valores de constantes de velocidade, coeficientes de correlação e MSC obtidos pelo ajuste dos dados de AcEUG quando em solução ou encapsulado nas NCL.	143
Tabela 15. Valores de fluxo obtidos para o AcEUG em solução ou em NCL nos diferentes meios hidroetanólicos. n=3	145
Tabela 16. Valores de teor de IndOH (mmol L ⁻¹ = mM) e área de superfície de carreador nas formulações (A_s) assim como de volume de tratamento (μ L), teor de IndOH, área de superfície de carreador (A_s^t), número de partículas e razão entre teor de IndOH no tratamento e A_s^t	155
Tabela 17. Volumes (V_t) (μ L) e área de superfície de NCL presente em cada tratamento (A_s^t) (cm ² /cm ³) para os estudos realizados com as formulações NCL ³ -AcEUG ^{8,33} e NCL ³ -AcEUG ^{20,84} considerando tratamentos nos teores ($Teor_t$) de 50, 100, 300, 500 e 700 μ M de AcEUG.	169

Lista de Figuras

- Figura 1. (a) Representação do modelo de estrutura supramolecular das nanocápsulas de núcleo lipídico estabilizadas por polissorbato 80 dispersas em água e localização das substâncias ativas quando veiculadas a estas. (b) substância adsorvida à parede polimérica, (c) substância ativa retida no núcleo oleoso da partícula e (d) substância ativa compondo o núcleo da partícula. 15
- Figura 2. Estruturas dos componentes utilizados neste trabalho. (a) monoestearato de sorbitano, (b) triglicérides dos ácidos cáprico e caprílico, (c) polissorbato 80 e (d) poli(épsilon-caprolactona) (representação de PCL dihidroxilada, embora uma blenda polimérica tenha sido utilizada)..... 17
- Figura 3. Estruturas químicas de (a) Indometacina, (b) Eugenol e (c) Acetileugenol. 20
- Figura 4. Reação geral de obtenção do polímero fluorescente (PCL-Ro)..... 36
- Figura 5. Reação representativa geral de obtenção do óleo de rícino (ricinoleína) fluorescente (OR-Ro). 38
- Figura 6. Reação geral de obtenção do acetileugenol. 50
- Figura 7. Perfil de distribuição de tamanho por volume obtido por difração de laser. n=3. 74
- Figura 8. Micrografias de membranas de celulose deixadas em contato etanol (55, 90 ou 100 %). Magnitude de 500, 5000 e 15000x (esquerda para direita). 75
- Figura 9. Gráfico de quantidade cumulativa de BZ3 (%) resultante da diálise de três soluções hidroetanólicas de BZ3 através da área da membrana contra meio hidroetanólico em função do tempo. Sol1= sol-hidroetanólica de BZ3 (ϕ etanol=0,65) dialisada contra meio hidroetanólico (ϕ etanol=0,65), Sol2= sol-hidroetanólica de BZ3 (ϕ etanol=0,75) dialisada contra meio hidroetanólico (ϕ etanol=0,75), Sol3= sol-hidroetanólica de BZ3 (ϕ etanol=0,85) dialisada contra meio hidroetanólico (ϕ etanol=0,85) (média \pm DP, n = 3). 76

Figura 10. (a) Perfis de diálise da liberação de BZ3 a partir das NCL e da BZ3 em solução hidroalcoólica (75% de etanol)) em função do tempo frente meio acceptor aquoso (as linhas correspondem ao ajuste à equação monoexponencial) (média ± DP, n = 3). (b) Região linear ($r > 0,98$) do gráfico de quantidade cumulativa ($\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2}$) de BZ3 dialisada a partir de NCL-BZ3 e a partir de BZ3-solução hidroetanólica (75 %etanol) em função do tempo frente meio aquoso (a plotagem de dados foi montada usando a primeira lei de Fick, e que corresponde as primeiras 3,5 h do experimento) (média ± DP, n = 3)..... 80

Figura 11. (a) Gráfico que mostra a quantidade cumulativa de BZ3 ($\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2}$) dialisada através da área da membrana a partir das soluções hidroetanólicas frente os respectivos meios aceptores hidroetanólicos em função do tempo. Sol1 = solução hidroetanólica de BZ3 (ϕ etanol = 0,65) dialisada frente meio acceptor hidroetanólico (ϕ etanol = 0,65); Sol2 = solução hidroetanólica de BZ3 (ϕ etanol = 0,70) dialisada frente meio acceptor hidroetanólico (ϕ etanol = 0,70); Sol3 = solução hidroetanólica de BZ3 (ϕ etanol = 0,75) dialisada frente meio acceptor hidroetanólico (ϕ etanol = 0,75); Sol4 = solução hidroetanólica de BZ3 (ϕ etanol = 0,80) dialisada frente meio acceptor hidroetanólico (ϕ etanol = 0,80), Sol5 = solução hidroetanólica de BZ3 (ϕ etanol = 1,00) dialisada frente meio acceptor hidroetanólico (ϕ etanol = 1,00) (média ± DP, n = 3). (b) Gráfico de correlação entre valores de fluxo aparente (J_{app}) ($\text{mmol} \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) de BZ3 em função da ϕ de etanol. A linha a tracejado representa a extrapolação da curva de correlação para obter o valor do fluxo intrínseco (J_0) para BZ3 em meio aquoso (etanol, 0%) (média ± DP, n = 3). 82

Figura 12. Fotografias do saco de diálise feita após diálise de (a) solução hidroetanólica de BZ3 (65% de etanol) dialisado frente meio acceptor hidroetanólico (65% de etanol) e de (b) solução hidroetanólica de BZ3 (75% de etanol) dialisado frente meio acceptor aquoso..... 84

Figura 13. CCD após revelação sob luz UV. (a) PCL ₁₆ , (b) RoB, (c) PCL ₁₆ -Ro bruto, (d) PCL ₁₆ -Ro purificado + RoB e (e) PCL ₁₆ -Ro purificado.....	87
Figura 14. Espectro de Fluorescência do produto PCL-Ro em clorofórmio (0,1 mg de PCL-Ro por mL de amostra).....	89
Figura 15. Distribuições de tamanho de partícula (por volume %) obtidas por difração de laser. Em (a) NCL ³ _{PCL(10%)} -Br e em (b) NCL ³ _{PCL-Ro(10%)} -Br.	90
Figura 16. Distribuições de tamanho de partícula obtidas por rastreamento de partículas (nanosight) para as formulações brancas marcadas com o produto PCL-Ro ou não. (1) gráficos de tamanho versus concentração de partículas e (2) gráficos de tamanho de partícula versus intensidade de luz para (a) NCL ³ _{PCL(10%)} -Br, (b) NCL ³ _{PCL-Ro(10%)} -Br.	91
Figura 17. (a) Fluorescência do produto PCL-Ro recuperado da formulação NCL ³ _{PCL-Ro(10%)} -Br (0,035 nmol de RoB por mL de amostra – 0,1 mg de PCL-Ro por mL de amostra) e (b) Fluorescência da formulação NCL ³ _{PCL-Ro(10%)} -Br (0,350 nmol de RoB por mL de amostra – 1 mg de PCL-Ro por mL de amostra) obtida sem diluição em cubeta triangular.	93
Figura 18. Espectros de absorvância: (a) sobrenadante da extração de NCL ³ _{PCL(10%)} -Br realizada em presença de rodamina B (0,033 μmol L ⁻¹) e soluções de RoB (0,055 μmol L ⁻¹) em etanol - varredura de 250-400 nm, (b) sobrenadante da extração de NCL ³ _{PCL(10%)} -Br realizada em presença de rodamina B (0,033 μmol L ⁻¹) e soluções de RoB (0,055 μmol L ⁻¹) em etanol - varredura de 400-800 nm, (c) precipitado da extração de NCL ³ _{PCL(10%)} -Br realizada em presença de rodamina B (0,033 μmol L ⁻¹) e soluções de RoB (0,055 μmol L ⁻¹) em clorofórmio - varredura de 250-400 nm e (d) precipitado da extração de NCL ³ _{PCL(10%)} -Br realizada em presença de rodamina B (0,033 μmol L ⁻¹) e soluções de RoB (0,055 μmol L ⁻¹) em clorofórmio - varredura de 400-800 nm.	95
Figura 19. Equilíbrio químico entre as formas lactônica e zwitteriônica da rodamina B não protonada (acima) e formas protonadas da rodamina B em função da concentração de íons hidrogênio (abaixo).	97

Figura 20. Espectros de emissão de Fluorescência das amostras de precipitado obtidos a partir das formulações $NCL^3_{PCL-Ro(10\%)-Br}$ e $NCL^3_{PCL(10\%)-Br}$ no dia seguinte do preparo e após 30 dias do preparo.	98
Figura 21. Quantidade de Ro por mg de polímero (PCL-Ro) no tempo zero e 4 h após incubação nos diferentes meios biológico.	100
Figura 22. CCD (a) óleo de rícino (OR), (b) rodamina B (RoB), (c) produto oleoso fluorescente bruto (OR-Ro-bruto) e (d) fração purificada do produto oleoso fluorescente (OR-Ro-P) em $CH_2Cl_2:MeOH$ (9:1).....	100
Figura 23. IR: OR-Ro, OR e RoB.	101
Figura 24. Espectro de fluorescência do produto OR-Ro ($1,52 \text{ mg mL}^{-1}$), e do óleo de rícino sem marcação com RoB.....	102
Figura 25. Distribuições de tamanho de partícula, (a) por volume (%) e (b) por número (%), obtidas por difração de laser para as formulações $NCL^3_{OR-Ro(10\%)-PCL}$, $NC^{5.1}_{OR-Ro(10\%)-S100}$ e $NC^{4.3}_{OR-Ro(10\%)-RS100}$	106
Figura 26. Espectros de emissão de fluorescência (a) amostras não diluídas de suspensões de $NCL^3_{OR-Ro(10\%)-PCL}$, $NC^{5.1}_{OR-Ro(10\%)-S100}$ e $NC^{4.3}_{OR-Ro(10\%)-RS100}$ em comparação com amostras contendo $160 \mu\text{L}$ (1) ou $333 \mu\text{L}$ (2) da mistura TCC: produto fluorescente em 10 mL de acetonitrila. Onde $160 \mu\text{L}$ e $333 \mu\text{L}$ são as quantidades de mistura de TCC:produto fluorescente usada para preparar as formulações $NCL^3_{OR-Ro(10\%)-PCL}$ ou $NC^{5.1}_{OR-Ro(10\%)-S100}$ e $NC^{4.3}_{OR-Ro(10\%)-RS100}$, respectivamente. (b) Amostras diluídas (10 vezes em acetonitrila) das suspensões de $NCL^3_{OR-Ro(10\%)-PCL}$, $NC^{5.1}_{OR-Ro(10\%)-S100}$ e $NC^{4.3}_{OR-Ro(10\%)-RS100}$ em comparação com as amostras diluídas (1d e 2d) das amostras (1) e (2).	109
Figura 27. Varreduras xy obtidas por microscopia confocal das formulações (a) $NCL^3_{PCL-Ro(10\%)-Br}$, (b) $NCL^3_{PCL(10\%)-Br}$, (c) $NCL^3_{OR-Ro(10\%)-Br}$ e (d) $NCL^3_{OR(10\%)-Br}$. Barra= $20 \mu\text{m}$	110
Figura 28. Imagens de microscopia de fluorescência (ampliação de 200x) após estudo de captação celular onde o tratamento das células de macrófagos foi realizado com (A) sem tratamento, (B) $NC^{4.3}_{OR-Ro(10\%)-$	

RS100, (C) $NCL^3_{OR-R\alpha(10\%)}-PCL$ e (D) $NC^{5.1}_{OR-R\alpha(10\%)}-S100$. (1) canal azul (2), canal vermelho e (3) sobreposição canais azul-vermelho. Barra de escala de tamanho em branco na figura $D3= 80 \mu m$	113
Figura 29. Perfil de distribuição de tamanho obtido por difração de laser (média de 3 medidas de um mesmo lote de formulação), em volume, para as formulações $NCL^3-IndOH^{1,39}$, $NCL^6-IndOH^{1,39}$ e $NCL^6-IndOH^{2,79}$. (a) após a preparação e (b) após 7 dias.	118
Figura 30. Perfil de distribuição de tamanho, em volume, para a formulações de indometacina ($NCL^3-IndOH^{1,39}$, $NCL^6-IndOH^{1,39}$, $NCL^6-IndOH^{2,24}$, e suas respectivas formulações brancas (NCL^3-Br e NCL^6-Br) (a) logo após a preparação e (b) 7 dias após a preparação.	120
Figura 31. Espectro de Infravermelho do Acetileugenol (AcEUG) e comparação com o do produto de partida [essência oleosa de cravo-da-índia, componente majoritário= Eugenol (EUG)].	123
Figura 32. Perfis de inchamento dos filmes poliméricos em função do tempo. (a) TCC:EUG (1:1), (b) TCC:AcEUG (1:1), (c) TCC:EUG (9:1) e (d) TCC:AcEUG (9:1) (média \pm DP, n=3).	124
Figura 33. Perfil de distribuição de tamanho para 3 medidas de um mesmo lote de formulação (a) $NCL^3-EUG^{10,35}$ e (b) $NCL^3-AcEUG^{8,33}$, em volume (esquerda) e número (direita).	126
Figura 34 Perfil de distribuição de tamanho para diferentes lotes de formulação (a) $NCL^3-EUG^{10,35}$ e (b) $NCL^3-AcEUG^{8,33}$, em volume (esquerda) e número (direita). n=3.	127
Figura 35. Análise dos perfis de distribuição de tamanho durante 7 dias para as formulações (a) $NCL^3-EUG^{10,35}$ e (b) $NCL^3-AcEUG^{8,33}$	128
Figura 36. Perfis de distribuição de tamanho obtidos por PCS por intensidade, volume e número para as formulações (a) $NCL^3-EUG^{10,35}$ e (b) $NCL^3-AcEUG^{8,33}$	129
Figura 37. Perfis de DeltaBS em função do tempo (1 h) para as formulações de NCL. (a) NCL^3-Br , (b) $NCL^3-EUG^{10,35}$ e (c) $NCL^3-AcEUG^{8,33}$	134

Figura 38. Gráficos de EML-TV obtidos para as formulações (a) NCL-Br de 29-56 °C, (b) NCL ³ -AcEUG ^{8,33} de 29-56 °C, (c) NCL ³ -EUG ^{10,35} de 29-56 °C e (d) NCL ³ -EUG ^{10,35} de 29-35 °C.....	136
Figura 39. Gráficos de calorimetria exploratória diferencial (DSC), fluxo de aquecimento (W/g) em função da temperatura (°C) obtidos para amostra de filme polimérico (PCL) e amostras de filme polimérico mantidas em contato (15 dias) com TCC (PCL-TCC) ou AcEUG (PCL-AcEUG).	139
Figura 40. Perfis de diálise da liberação do AcEUG a partir das NCL em meio hidroetanólico (ϕ = 0.3, 0.2 e 0.1) e do AcEUG a partir de soluções hidroetanólicas (ϕ = 0.3, 0.2 e 0.1) em meios aceptores hidroetanólicos (ϕ = 0.3, 0.2 e 0.1) (média±DP, n=3). As linhas correspondem ao ajuste aos modelos mono- (soluções) ou bi-exponencial (NCL).	142
Figura 41. Região linear ($r > 0,95$) dos gráficos de quantidade cumulativa (mmol · m ⁻²) de AcEUG dialisada a partir das soluções hidroetanólicas e a partir das NCL em função do tempo nos meios aceptores hidroetanólicos (a plotagem de dados foi ajustada à primeira lei de Fick e corresponde as primeiras 2 h do experimento) (média ± DP, n = 3).	145
Figura 42. Análise do perfil de distribuição de tamanho, por volume, para a formulação NCL ³ -AcEUG ^{8,33} . Após experimento de diálise em meio acceptor hidroetanólico. (a) ϕ etanol 0.1, (b) ϕ etanol 0.2 e (c) ϕ etanol 0.3.	146
Figura 43. Correlação entre fluxo (mmol m ⁻² h ⁻¹) de AcEUG em função da ϕ de etanol. n=3.....	147
Figura 44. (a) Perfil de distribuição de tamanho, por volume, para 3 lotes da formulação NCL ³ -AcEUG ^{20,84} , obtido por difração de laser e (b) perfil de distribuição de tamanho, por intensidade, obtido por PCS (média±DP, n=3).....	149
Figura 45. Perfil de DeltaBS em função do tempo (1 h) para a formulação NCL ³ -AcEUG ^{20,84}	149

- Figura 46. Cromatogramas obtidos por CLAE para as amostras de EUG, AcEUG e NCL³-AcEUG^{20,84} após 4 horas em incubação nos diferentes meios biológicos simulados. Em (a) comparação entre os espectros da amostra de EUG e de AcEUG, em (b) comparação entre os espectros das amostras de EUG e NCL³-AcEUG^{20,84} (n=1). 150
- Figura 47. Gráfico de barras mostrando a viabilidade celular (%) após tratamento com formulações de NCL³ e NCL⁶ contendo mesmo teor de indometacina ou com formulação NCL⁶ contendo maior teor de indometacina, na mesma concentração de substância ativa no tratamento (NCL³-IndOH^{1,39}, NCL⁶-IndOH^{1,39} e NCL⁶-IndOH^{2,24} em teor de 25 µM no tratamento) ou em maior concentração de substância ativa no tratamento (NCL⁶-IndOH^{2,24} em teor de 40 µM no tratamento). (n=3). 156
- Figura 48. (a) figura representativa do tratamento realizados com as formulações contendo diferentes áreas de superfície de carreador (NCL³-IndOH^{1,39} e NCL⁶-IndOH^{1,39}), onde as caixas de igual tamanho representam mesmo volume de formulação, esferas representam as NCL e pontos em amarelo representam moléculas de indometacina. Gráficos de viabilidade celular em função de (b) teor de indometacina, (c) área de superfície de carreador (A_s^t), (d) número de partículas e (e) razão entre teor de indometacina e A_s^t após 24 h deste (média±DP, n=3). Diferença significativa (P<0,05, teste-t, $\alpha=0,05$) entre os valores de área de carreador (eixo x do gráfico b). Sem diferença significativa (P>0,05, teste-t, $\alpha=0,05$) entre os valores de viabilidade celular (eixo y de todos os gráficos). 158
- Figura 49. (a) figura representativa do tratamento realizados com as formulações contendo mesma área de superfície de carreador (NCL⁶-IndOH^{1,39} e NCL⁶-IndOH^{2,24}) onde as caixas de igual tamanho representam mesmo volume de formulação, esferas representam as NCL e pontos em amarelo representam moléculas de indometacina. Gráficos de viabilidade celular em função de (b) teor de indometacina, (c) área de

superfície de carreador (A_s^t), (d) número de partículas e (e) razão entre teor de indometacina e A_s^t após 24 h deste (média±DP, n=3). Sem diferença significativa ($P>0,05$, teste-t, $\alpha=0,05$) entre os valores de área de carreador (eixo x do gráfico b) e entre os valores de viabilidade celular (eixo y de todos os gráficos). 160

Figura 50. Imagem de microscopia de fluorescência após tratamento realizados com as formulações de IndOH preparadas com o polímero fluorescente. (a) esquema de tratamento, (b) controle, (c) $NCL^3_{PCL-Ro(10\%)}-IndOH^{1,39}$ (teor 25 μM - $A_s^t \sim 2,0 \times 10^2 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$), e (d) $NCL^6_{PCL-Ro(10\%)}-IndOH^{1,39}$ (teor 25 μM - $A_s^t \sim 3,6 \times 10^2 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$). 200x de magnificação. Campo claro-lado esquerdo e canal vermelho-lado direito. Barra: 50 μm 162

Figura 51. (a) Gráfico de barras de intensidade de fluorescência média (MFI) obtida após análise por citometro de fluxo de células de glioblastoma que receberam tratamento com formulacoes marcadas com OR-Ro contendo [$NCL^6_{OR-Ro(25\%)}-IndOH^{1,39}$ (25 μM) e $NCL^6_{OR-Ro(25\%)}-IndOH^{2,24}$ (40 μM)] ou não IndOH ($NCL^6_{OR-Ro(25\%)}-Br$). (média±DP, n=3). 164

Figura 52. Relação entre o número de células no final do tratamento com AcEUG em solução e a concentração de tratamento (média \pm DP, n=3). * diferença significativa ($P<0.05$), ANOVA One-way (pós-teste Tukey, $\alpha=0.05$). 165

Figura 53. Gráfico de barras mostrando a relação entre a viabilidade celular (%) *in vitro* e a concentração de AcEUG (μM) após tratamento com AcEUG em solução e a concentração de AcEUG (μM) e área de superfície de carreador (A_s^t) após tratamentos realizados com as formulações de nanocápsulas (NCL^3-Br ou $NCL^3-AcEUG^{8,33}$) (média \pm DP, n=3). *Diferença significativa em relação ao controle ($P<0.05$) - # Diferença significativa em relação à solução ($P<0.05$) - ANOVA One-way (Teste Tukey, $\alpha=0.05$). 167

Figura 54. Gráfico de barras mostrando a relação entre a viabilidade celular (%) *in vitro* e o teor de AcEUG (μM) após tratamento com AcEUG em solução

e o teor de AcEUG (μM) e área de superfície de carreador (A_s^t) após tratamentos realizados com as formulações $\text{NCL}^3\text{-Br}$ ou $\text{NCL}^3\text{-AcEUG}^{20,84}$ (média \pm DP, $n=3$). *Diferença significativa em relação ao controle ($P<0.05$) - ANOVA One-way (Teste Tukey, $\alpha=0.05$)..... 168

Figura 55. Relação entre a viabilidade celular (%) e a área de superfície de carreador presente no tratamento (A_s^t) (cm^2/cm^3). (a) $\text{NCL}^3\text{-Br}$ versus $\text{NCL}^3\text{-AcEUG}^{8,33}$ e (b) $\text{NCL}^3\text{-Br}$ versus $\text{NCL}^3\text{-AcEUG}^{20,84}$ (média \pm DP, $n=3$). Em negrito estão as equações de reta relativas aos tratamentos com as formulações de $\text{NCL}\text{-AcEUG}$ 170

Figura 56. Fotografia obtida após realização da centrifugação sob sílica coloidal (gradiente de densidade) das formulações (a) $\text{NCL}^3\text{-Br}$, (b) $\text{NCL}^3\text{-AcEUG}^{8,33}$, (c) $\text{NCL}^3\text{-AcEUG}^{20,84}$, (d) $\text{NEL}\text{-AcEUG}^{8,33}$, (e) $\text{NEL}\text{-AcEUG}^{20,84}$ e (f) nanoesferas..... 173

Figura 57. Imagem de microscopia de fluorescência após tratamento realizados com as formulações de AcEUG preparadas com o PCL-Ro. (a) controle, (b) $\text{NCL}^3_{\text{PCL-Ro}(10\%)\text{-AcEUG}^{8,33}}$ (teor $700 \mu\text{M}$, $A_s^t \sim 10 \times 10^2 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$), (c) $\text{NCL}^3_{\text{PCL-Ro}(10\%)\text{-AcEUG}^{8,33}}$ (teor $300 \mu\text{M}$, $A_s^t \sim 5 \times 10^2 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$), (d) $\text{NCL}^3_{\text{PCL-Ro}(10\%)\text{-AcEUG}^{20,84}}$ (teor $700 \mu\text{M}$, $A_s^t \sim 5 \times 10^2 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$) e (e) $\text{NCL}^3_{\text{PCL-Ro}(10\%)\text{-AcEUG}^{20,84}}$ (teor $300 \mu\text{M}$, $A_s^t \sim 2 \times 10^2 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$). 200x de magnificação. Campo claro-lado esquerdo e canal vermelho-lado direito. Barra: $50 \mu\text{m}$ 174

Figura 58. Gráfico de barras de MFI obtida após citometro de fluxo de células de glioblastoma que receberam tratamento com formulações (a) PCL-Ro ($\text{NCL}^3_{\text{PCL-Ro}(20\%)\text{-Br}}$, $\text{NCL}^3_{\text{PCL-Ro}(20\%)\text{-AcEUG}^{8,33}}$ e $\text{NCL}^3_{\text{PCL-Ro}(20\%)\text{-AcEUG}^{20,84}}$) ou (b) OR-Ro ($\text{NCL}^3_{\text{OR-Ro}(25\%)\text{-Br}}$, $\text{NCL}^3_{\text{OR-Ro}(25\%)\text{-AcEUG}^{8,33}}$ e $\text{NCL}^3_{\text{OR-Ro}(25\%)\text{-AcEUG}^{20,84}}$). Tratamento realizado com $A_s^t \sim 5 \times 10^2 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$; teor de AcEUG= $300 \mu\text{M}$ ($\text{NCL}^3\text{-AcEUG}^{8,33}$) ou $700 \mu\text{M}$ ($\text{NCL}^3\text{-AcEUG}^{20,84}$)(média \pm DP, $n=3$). * $P<0.05$ (ANOVA One-way, pos-teste tukey, $\alpha=0.05$). 176

Figura 59. Imagens, em sobreposição dos canais azul e vermelho, obtidas após microscopia confocal das amostras contendo as células tratadas com

as formulações fluorescentes. (a) controle de células, (b) controle $NCL^3_{PCL(10\%)}-Br$, (c) amostra 1 $NCL^3_{PCL-Ro(10\%)}-Br$ (d) amostra 2 $NCL^3_{PCL-Ro(10\%)}-Br$, (e) zoom amostra 1 $NCL^3_{PCL-Ro(10\%)}-Br$ e (f) zoom amostra 2 $NCL^3_{PCL-Ro(10\%)}-Br$. Azul: núcleo das células. Vermelho: partículas $NCL^3_{PCL-Ro(10\%)}-Br$. Aumento de 400x. Nas imagens a, b, c e d: barra= 50 μm . Nas imagens e e f: barra= 25 μm 179

Figura 60. Imagens obtidas após microscopia confocal das amostras contendo as células tratadas com a formulação fluorescente ($NCL^3_{PCL-Ro(10\%)}-Br$). Imagens ortogonais mostrando os eixos xy, xz e yz. (a) amostra 1 e (b) amostra 2. Os círculos indicam o aparecimento das partículas no eixo YZ..... 180

Figura 61. Histograma de % de células em cada fase do ciclo celular obtido após tratamento de 24 h com acetileugenol em solução (SOL-AcEUG), nanoencapsulado ($NCL^3-AcEUG^{8,33}$ e $NCL^3-AcEUG^{20,84}$) nos teores de 300 e 700 μM e com a formulação branca em área de superfície de carreador equivalente a maior área de superfície de carreador utilizada das formulações contendo a substância ativa ($A_s^t \sim 11 \times 10^2 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$) (média \pm DP, n=3). 181

Figura 62. Histograma de viabilidade celular (%) de macrófagos após tratamento de 24 h com acetileugenol em solução (SOL-AcEUG), nanoencapsulado ($NCL^3-AcEUG^{8,33}$ e $NCL^3-AcEUG^{20,84}$) nas doses de 300 e 700 μM e com a formulação branca em área de superfície de carreador equivalente a maior área de superfície de carreador utilizada nos tratamentos (A_s^t) com as formulações contendo a substância ativa [$A_s^t \sim 5 \times 10^2 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ (equivalendo à área de superfície da $NCL^3-AcEUG^{20,84}$) e $\sim 11 \times 10^2 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ (equivalendo à área de superfície da $NCL^3-AcEUG^{8,33}$)] (média \pm DP, n=3). *Diferença significativa em relação ao controle (P<0.05) - ANOVA One-way (Teste Tukey, $\alpha=0.05$). 182

Figura 63. Distribuição de tamanho de partícula obtida por análise de difração de laser para as formulações contendo TCC, TCC:OM ou OM como

componente líquido para compor o núcleo oleoso das formulações NCL.

..... 185

Figura 64. Histogramas de viabilidade celular (%) de linhagem de glioblastoma de rato (C6) após tratamento (24 h) com formulações de NCL contendo diferentes concentrações de triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (TCC) e óleo mineral (OM) (NCL³-OM, NCL³:TCC:OM e NCL³-TCC) em área de superfície de carreador (A_s[†]) de 7,22E+02 e 10,12E+02 cm²/cm³ poço equivalendo, para cada formulação em concentração de TCC no tratamento de 0 µg/mL (NCL³-OM), 16,46 e 22,86 µg/mL (NCL³-TCC:OM) e 1088,60 e 1512,00 µg/mL (NCL³-TCC) (média±DP, n=3).*, **, #, γ = diferença significativa (P<0.05, ANOVA One-way, α=0.05). 186

Figura 65. (a) Histogramas de viabilidade celular (%) de linhagem C6 após tratamento (24 h) com formulações de NCL, nanoemulsão (NEL), solução de DMSO contendo diferentes concentrações de TCC e OM (NCL³:TCC:OM e NCL³-TCC) em A_s[†] de 7,22E+02 cm²/cm³ poço equivalendo em concentração de TCC no tratamento de 16,46 µg/mL (Sol-TCC:OM, NE-TCC:OM e NCL³-TCC:OM) e 1088,60 µg/mL (Sol-TCC, NE-TCC e NCL³-TCC), solução de DMSO contendo 1088,60 µg/mL TCC e quantidade de P80 equivalente a encontrada no maior volume aplicado de formulação (0,6 mg mL⁻¹) (sol-TCCP80) e com a fase aquosa (FA) da formulação em volume equivalente ao do maior tratamento com as formulações de NCL (0,8 mg mL⁻¹ de P80) (média±DP, n=3). Imagens de microscopia óptica (400x de magnificação) de poços de placa de cultura 24 h após experimento (b) sem tratamento e (c) tratamento com volume de FA, composta de P80, equivalente ao maior volume de suspensão aquosa de NCL utilizado nos experimentos de avaliação da viabilidade celular. *, **, #, &, α, ω, v = diferença significativa (P<0.05, ANOVA One-way, α=0.05). 189

Figura 66. Distribuições de tamanho de partícula obtidas por PCS, três medidas da mesma amostra, (1) por intensidade (%) e (2) por volume (%) onde: (a) NCL³-TCC, (b) NEL-TCC, (c) Sol TCCP80 e (d) Sol TCC (DMSO)

diluída em água simulando diluição do tratamento em experimento celular.....	190
Figura 67. Fotografia obtida após realização da centrifugação sob sílica coloidal (gradiente de densidade) das formulações (a) NCL ³ -TCC e (b) NEL-TCC.....	192
Figura 68. Esquema representativo proposto das possíveis estruturas de partícula presentes nas formulações (a) NCL ³ -Br, (b) NCL ³ -AcEUG ^{8,33} e (c) NCL ³ -AcEUG ^{20,84} . Do lado esquerdo e direito da linha preta seriam partículas marcadas com o produto OR-Ro e PCL-Ro, respectivamente. A área retangular tracejada representaria as partículas captadas pelas células. O revestimento de polissorbato 80, semelhante em todas as formulações, não foi representado.	195

Sumário

1. INTRODUÇÃO	31
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos:.....	34
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	36
3.1 A Nanotecnologia e sua interface com o sistema biológico.....	36
3.2 Aspectos gerais sobre nanocápsulas poliméricas	40
3.3. Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico	43
3.4 Indometacina e eugenol ou acetileugenol como substâncias ativas modelo.....	46
3.5 Rastreamento de nanosistemas em meio biológico	49
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	25
4.1 Materiais.....	25
4.2 Equipamentos	26
4.3 Métodos gerais.....	27
4.3.1 Preparação das nanopartículas.....	27
4.3.2 Medidas de pH	28
4.3.3 Difração de laser	28
4.3.4 Espectroscopia de correlação de fótons (PCS).....	29
4.3.5 Mobilidade eletroforética	30
4.3.6 Rastreamento de partículas	30
4.4 Preparação e caracterização das nanocápsulas de núcleo lipídico utilizadas para obter os resultados descritos na seção 5.1	30
4.5 Experimento de diálise	31
4.6 Modelagem de dados	33
4.7 Cromatografia de permeação em gel	35
4.8 Obtenção do polímero fluorescente.....	35
4.9 Obtenção do triglicerídeo fluorescente	37
4.10 Determinação da quantidade de rodamina B por g de produto	38
4.11 Preparação e caracterização das NCL contendo PCL-Ro:	39
4.12 Avaliação da estabilidade química do produto PCL-Ro.....	40

4.13	Preparação e caracterização das partículas contendo triglicerídeo fluorescente.....	42
4.14	Avaliação da captação celular das partículas de NC e NCL preparadas com o triglicerídeo fluorescente	45
4.15	Microscopia confocal de fluorescência das formulações NCL brancas preparadas com os materiais fluorescentes (PCL-Ro ou OR-Ro).....	46
4.16	Preparação e caracterização das formulações de NCL contendo indometacina	47
4.17	Obtenção do Acetileugenol	49
4.18	Teste de inchamento do polímero	50
4.19	Preparação e caracterização das formulações de NCL contendo essência oleosa de cravo-da-índia (eugenol) ou acetileugenol.....	50
4.20	Avaliação da estabilidade física das formulações NCL-EUG ^{10,35} e NCL-AcEUG ^{8,33}	54
4.21	Cromatografia de permeação em gel (GPC) das formulações das NCL ³ -AcEUG ^{8,33} e NCL ³ -Br.....	55
4.22	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	55
4.23	Avaliação do perfil de Liberação do AcEUG a partir das NCL ³ -AcEUG ^{8,33}	56
4.24	Preparação e caracterização de formulações de NCL ³ contendo maior teor de AcEUG (NCL ³ -AcEUG ^{20,84})	57
4.25	Avaliação <i>in vitro</i> da estabilidade da formulação NCL ³ -AcEUG ^{20,84} em meios biológicos	58
4.26	Formulações NCL marcadas com polímero ou triglicerídeo fluorescente e contendo as substâncias ativas Indometacina ou Acetileugenol.....	58
4.27	Determinação da viabilidade celular (glioblastoma) pelo método MTT Erro! Indicador não defini	
4.28	Contagem de células viáveis por azul de tripan	60
4.29	Ciclo celular	61
4.30	Determinação da viabilidade celular (macrófagos) pelo método MTT.....	61
4.31	Avaliação da influência da área de superfície de carreador e teor de substância ativa presentes no tratamento sobre a resposta biológica das formulações.....	62

4.32 Estudos de captação celular utilizando linhagem tumoral (glioblastoma)	64
4.33 Avaliação da influência da concentração de triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico contido no carreador e da estrutura supramolecular deste sobre a resposta biológica	67
4.34 Gradiente de densidade	68
4.35 Análise estatística.....	68
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	71
5.1. Desenvolvimento de estratégia para determinação do fluxo intrínseco de espécie com baixa solubilidade em água em solução aquosa	71
5.1.1 Motivação	71
5.1.2. Resultados e discussão da seção 5.1	73
5.2 Formulações contendo parede polimérica ou núcleo fluorescente.....	73
5.2.1 Motivação	85
5.2.2 Resultados e discussão da seção 5.2	75
5.3 Formulações contendo indometacina ou essência oleosa de cravo-da-índia (eugenol) ou acetileugenol	76
5.3.1 Motivação	115
5.3.2 Resultados e discussão da seção 5.3	116
5.4 Avaliação da influência da estrutura supramolecular e da área de superfície de carreador e teor contidos na formulação/tratamento na resposta biológica	78
5.4.1 Motivação	152
5.4.2 Resultados e discussão da seção 5.4	153
6. CONCLUSÃO.....	197
7. APÊNDICES.....	199
8. REFERÊNCIAS	205

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia vem despertando interesse crescente nos últimos anos sendo considerada como ciência do futuro. Isto porque, nesta escala de tamanho, o sistema apresenta propriedades e funções únicas como, por exemplo, alta capacidade de interação com tecidos e células (DAVIS e col., 2008; HOLBACK e YEO, 2011). O benefício terapêutico desses sistemas é que, devido ao potencial de transportar substâncias a locais específicos, alteraram-se os perfis farmacocinéticos e os farmacodinâmicos das substâncias, potencializando a ação, minimizando efeitos adversos, reduzindo a dose necessária para ação ou aumentando o tempo entre as administrações, entre outras modificações (WANG e col., 2012).

Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (NCL) são sistemas nanoestruturados que possuem alta capacidade de encapsular substâncias lipofílicas. A estrutura supramolecular proposta para este nanocarreador compreende um núcleo oleoso, composto por uma dispersão de monoestearato de sorbitano em triglicerídeos, envolvido por uma parede polimérica, existindo uma pseudo-interface óleo-água que interage com a parede polimérica (MÜLLER e col., 2001; CRUZ e col., 2006a; POLETTO e col., 2008; JÄGER e col., 2007; JÄGER e col., 2009; POLETTO, 2012). Entre as principais potenciais aplicações já apontadas utilizando NCLs como carreador de substâncias pode-se citar o efeito farmacológico contra câncer (BERNARDI e col., 2008; BERNARDI e col., 2009a; OURIQUE e col., 2010), doenças inflamatórias (CRUZ e col., 2006a; BERNARDI e col., 2009b) e Alzheimer (FROZZA e col., 2010) assim como o potencial como produto dermatológico com aplicação terapêutica (ALVES e col., 2007) e cosmecêutica (PAESE e col., 2009). Recentemente foi demonstrado que as NCL possuem capacidade de direcionamento e acúmulo no tecido cerebral (BERNARDI e col., 2009a; FROZZA e col., 2010). Entretanto, o rastreamento das NCL no tecido cerebral e sua interação com células deste ambiente ainda não foram demonstrados. Para a localização das partículas em ambiente biológico,

técnicas de imagem como microscopia de fluorescência vêm sendo empregadas (GUMBLETON e STEPHENS, 2005; WATSON e col., 2005). No entanto, resultados referentes ao rastreamento da sonda fluorescente e não do carreador não podem ser descartados se a sonda não estiver interagindo quimicamente com este.

Entre as principais influências fisicoquímicas, relacionadas às nanopartículas, presentes na interface entre estas e sistemas biológicos estão: a composição da partícula, cristalinidade, hidrofobicidade e molhabilidade, as quais têm relação com a estrutura supramolecular do colóide, assim como tamanho, forma, área de superfície e carga de superfície do carreador, os quais são consequência da composição quali-quantitativa e/ou método de preparação (NEL e col., 2009; VERMA e STELLACCI, 2010; MORA-HUERTAS e col., 2010). Quando encapsulada em um sistema coloidal, a interação da substância ativa com a superfície celular dependerá não mais unicamente das propriedades da substância, mas também, e em maior grau, da interação das partículas com aquela. Tem sido crescente a demonstração de que quando se utilizam experimentos *in vitro* para avaliar a interação de sistemas complexos como as nanopartículas com as células, a relação entre resposta biológica e concentração de substância ativa não deve levar em consideração apenas a concentração desta no sistema, uma vez que o comportamento da partícula no meio vai influenciar na resposta final (TEEGUARDEN e col., 2006; NEL e col., 2009; KHANBEIGI e col., 2012). Estudos indicam que a grande área de superfície de partículas submicrométricas faz com que a interação com o meio biológico seja bastante alta e isto pode contribuir independentemente para a toxicidade do sistema (NEL e col., 2009). Considerando partículas com tamanho, forma e mesma carga de superfície, acredita-se que os fatores mais importantes que podem afetar a interação do carreador com o meio biológico são sua estrutura supramolecular e área de superfície do mesmo (NEL e col., 2009; PETERSEN e col., 2011; KHANBEIGI e col., 2012). Considerando o exposto, este trabalho de tese procurou demonstrar que a supraestrutura/estrutura supramolecular do carreador é importante para a resposta biológica e que esta resposta pode variar com

mudanças de área de superfície de carreador na formulação inicial/tratamento e do teor de substância ativa contido no carreador. Para isso, formulações de NCL, compostas por poli(épsilon-caprolactona), monoestearato de sorbitano, triglicérido dos ácidos cáprico e caprílico e polissorbato 80, contendo ou não indometacina (IndOH) ou acetileugenol (AcEUG) em diferente teor de substância ativa ou diferente área de superfície de carreador na formulação foram utilizadas como modelo de nanocarreador e avaliadas quanto à influência na resposta biológica. Nanoemulsões (NEL), preparadas sem as substâncias IndOH e AcEUG também foram avaliadas. Linhagem tumoral (glioblastoma de rato) foi utilizada como modelo para avaliação da resposta biológica. Materiais fluorescentes foram sintetizados para fazer parte da supraestrutura da partícula e utilizados para demonstrar a captação celular das NCL. Como o trabalho envolveu o encapsulamento de uma substância lipofílica (AcEUG) cujo aspecto físico é óleo, fato que poderia resultar em uma taxa de liberação bastante lenta, e que esta ainda não possui relato de encapsulamento à NCL, a parte inicial do trabalho teve caráter mais fundamental e envolveu o desenvolvimento de uma estratégia para determinar o fluxo intrínseco de substância lipofílica em solução aquosa para posterior aplicação em estudo de liberação do AcEUG a partir das NCL. Nesta etapa inicial, uma formulação de NCL já descrita, contendo substância lipofílica encapsulada (benzofenona-3) foi utilizada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da supraestrutura e da área de superfície do carreador sobre a resposta biológica utilizando como modelo de carreador e de avaliação biológica as nanocápsulas de núcleo lipídico (NCL), contendo ou não substância ativa ou adsorvida ao carreador ou fazendo parte da sua estrutura supramolecular, e linhagem celular tumoral (glioblastoma), respectivamente.

2.2 Objetivos específicos:

- Desenvolver estratégia para determinar o fluxo intrínseco de espécie lipofílica em solução aquosa e aplicá-la para avaliar a liberação *in vitro* de substância de baixa solubilidade em água a partir das NCL;

- Obter materiais fluorescentes, polímero (PCL-Ro) e triglicerídeo (OR-Ro), quimicamente acoplados à sonda fluorescente, capazes de serem utilizados para rastrear as nanopartículas contendo estes materiais em meio biológico assim como avaliar a estabilidade química do produto PCL-Ro;

- Obter formulações de NCL, físico-quimicamente estáveis, apresentando, entre si, diferente área de superfície total de carreador na formulação final e/ou diferente teor de substância ativa (indometacina ou essência oleosa de cravo-da-índia ou derivado, acetileugenol);

- Avaliar a liberação do acetileugenol a partir das NCL empregando a estratégia desenvolvida para determinação do fluxo da substância de baixa solubilidade em água em um meio aquoso;

- Verificar a citotoxicidade do Acetileugenol e de NCL contendo Acetileugenol em linhagem de glioblastoma e em linhagem de macrófagos;

- Avaliar a influência da estrutura supramolecular, área de superfície de carreador e teor de substância ativa contidos no tratamento sobre a resposta biológica;
- Realizar estudos de captação celular das partículas de NCL contendo ou não indometacina ou acetileugenol preparadas com os materiais fluorescentes sintetizados;
- Verificar a influência da concentração de triglicérido dos ácidos cáprico e caprílico contido na formulação NCL na resposta biológica *in vitro*;
- Avaliar a influência da supraestrutura do sistema coloidal, na forma de nanopartículas, na resposta biológica *in vitro*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A Nanotecnologia e sua interface com o sistema biológico

Os avanços da nanotecnologia para aplicação na terapêutica apontam para que questões relacionadas ao impacto da interação das nanopartículas com o ambiente biológico sejam investigadas (NEL e col, 2009; PELAZ e col., 2013). As interações das partículas com proteínas, células, organelas ou DNA tornam-se de importância fundamental quando materiais nanoestruturados são utilizados (NEL e col, 2009). Não podemos deixar de considerar que o controle dos materiais na escala nanométrica acarreta em mudanças das propriedades fundamentais da matéria que, geralmente, são diferentes em comparação àquelas exibidas pela matéria *bulk*.

As interfaces entre esses materiais e o ambiente biológico podem ser bastante influenciadas por características químicas e físicas do nanocarreador. Neste âmbito estão não apenas a questão da nanoestrutura, mas a estrutura supramolecular vinculada a características como tamanho, forma, homogeneidade, química de superfície e área superficial (NEL e col, 2009; PETERSEN e col., 2011; PELAZ e col., 2013). O estudo das interfaces diversas entre nanopartículas e ambiente biológico permitiria, por exemplo, determinar relações estrutura *versus* atividade (NEL e col., 2009). Os estudos de revisão de NEL e colaboradores (2009), KOEGLER e colaboradores (2012) e PELAZ e colaboradores (2013) trazem um compilado de informações sobre as interfaces entre o “nano-bio mundo”, as quais são expostas a seguir.

No momento de interação entre as nanopartículas e os substratos biológicos, em um determinado meio, forma-se uma zona de contato metaestável que vai envolver a superfície da nanopartícula e a superfície celular e determinar o grau de interação entre estas. No que se refere à nanopartícula, a composição química do material, forma, funcionalização da superfície, ângulo de curvatura, porosidade, cristalinidade, heterogeneidade e hidrofobicidade ou hidrofiliçidade,

são as principais características envolvidas com as propriedades de superfície. Com relação à superfície celular, as interações vão depender de forças específicas e não específicas, de condição de solvatação e dessolvatação na zona de contato, interações hidrofílicas e hidrofóbicas, forças resistivas ou de promoção, mudanças conformacionais das biomoléculas, dano mitocondrial ou lisossomal e liberação ou transferência de energia causada por mudanças conformacionais ou lesão oxidante.

Considerando especificamente como exemplo de interação entre os nanomateriais e o ambiente biológico a adesão de partículas à bicamada lipídica celular com objetivo de entrega de fármacos, deve-se considerar que a célula possui uma membrana que se deforma em função da fluidez e questões termodinâmicas e que o envolvimento das partículas pode ocorrer levando a captação destas e expondo-as a novas interfaces. Fator que pode favorecer esta adesão e captação é a ligação não específica, dependente de características de superfície, tamanho e forma ótimos. Além disso, forças resistivas como flutuações térmicas da membrana e exclusão de superfícies polares devem ser sobrepostas. A captação ou não por fagocitose envolve interações receptor-ligante específicas e forças eletrostáticas, estéricas repulsivas e de Van der Waals atrativas entre a partícula e a membrana celular (CHEN e col., 1997). Está sugerido que partículas mais hidrofóbicas que a membrana celular são mais captadas do que outras que seriam menos hidrofóbicas (CHEN e col., 1997; SAHAY e col., 2010). Outras rotas de endocitose que podem ser citadas estão a pinocitose ou macropinocitose, a captação dependente de clatrina ou mediada por formação de calvéola e endocitose independente de clatrina e calvéolas (SAHAY e col., 2010). A rota de captação vai depender, além de características da partícula, de questões experimentais, do tipo e estágio celular (SAHAY e col., 2010).

A maior captação tem se mostrado ser dependente da concentração de partículas e do tempo de contato, sendo maior quanto maior estes fatores (PANYAM e LABHASETWAR, 2003; KHANBEIGI e col., 2012). Além disso, a retenção das partículas no compartimento celular aumenta quanto maior a

concentração de partículas no ambiente (PANYAM e LABHASETWAR, 2003) e pode ter relação com a maior citotoxicidade de um sistema (YORDANOVA e col., 2012). O tamanho de partícula influencia no grau de captação. Isto foi demonstrado por KHANBEIGI e colaboradores (2012) que verificaram que partículas de 50 e 1000 nm tiveram maiores valores de associação celular (entre 14-63 %) do que partículas com diâmetros de 100, 200 e 700 nm (entre 11-32 %) e que isso estaria atrelado ao mecanismo de captação. É importante mencionar que não só a interação das partículas com as células deve ser considerada, mas a distribuição destas no organismo. Desta forma, uma vez que partículas menores que 8 nm podem ser excretadas pelos rins enquanto partículas maiores que 200 nm podem ser retidas pelo fígado e baço (NEL e col., 2009), podemos sugerir que o tamanho ótimo de partícula para entrega de fármacos estaria próximo a 200 nm. Mesmo este não sendo o tamanho ótimo de captação celular, esta redução da captação celular pode ser vantajosa quando se deseja manter as partículas por mais tempo no organismo sem serem captadas pelo sistema imune. O estudo do mecanismo de captação das partículas e do tráfego intracelular não foram abordados nesta tese, porém as informações acima relatadas foram consideradas relevantes para que se tenha compreensão das características que afetam a interação partícula-célula e a captação celular.

Não apenas o tamanho de partícula, mas também a área de superfície são parâmetros importantes na reatividade do carreador *in vivo*. Se essas características não forem levadas em consideração, mas somente a igualdade de dose mássica, partículas ultrafinas causam maior inflamação pulmonar em modelos de rato do que partículas não tão finas e de mesma composição conforme demonstrado pelo estudo de SAGER e colaboradores (2007). Entretanto, se a dose é normalizada pela área de superfície de partícula equivalente total, diferenças não são encontradas entre os dois sistemas (SAGER e col., 2007). Estudos *in vitro* também têm demonstrado a importância do tamanho e área de superfície na resposta biológica e apontam para a dosimétrica que melhor representa o sistema: a área de superfície (MONTEILLER e col., 2007; KHANBEIGI e col., 2012).

No âmbito das nanopartículas orgânicas (não considerando nanotubos de carbono e fulerenos, mas lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas e nanopartículas poliméricas), são encontrados na literatura diversos estudos que relacionam características como carga de superfície e tamanho de partícula com a resposta biológica (ERNI e col., 2002; GUENOUN e col., 2012; JANGA e col., 2012; BHATTACHARJEE e col., 2013; ZHOU e col., 2013; LERCH e col., 2013; KULKARNI e FENG, 2013). Tendo as partículas catiônicas mais interação celular, captação e podendo levar a uma maior citotoxicidade quando comparadas a partículas neutras ou aniônicas (ZHOU e col., 2013; BHATTACHARJEE e col., 2013).

Com relação à estrutura supramolecular do carreador, mais propriamente o estado físico da partícula, um estudo interessante encontrado foi o de PETERSEN e colaboradores (2011). Neste estudo os autores investigaram o efeito de diferentes nanopartículas lipídicas (cristalinas, líquido cristalinas e líquidas) (NPLs) na viabilidade celular de fibroblastos (L929-camundongo). O estado físico da matriz das nanopartículas teve bastante influência na viabilidade celular sendo que as partículas de matriz cristalina causaram maior redução desta do que partículas líquido cristalinas ou líquidas, e estas primeiras mais do que as segundas. O tamanho destas partículas foi similar (~ 150 nm). O tipo de matriz lipídica, de estabilizante e a forma das partículas também foram investigados quanto à influência na viabilidade celular. Grandes alterações desta não foram observadas após tratamento com partículas de forma esférica ou forma tipo-plaqueta mais angular. Os resultados também indicam que suaves modificações da matriz lipídica, com relação ao comprimento da cadeia de carbonos, causaram nenhum ou apenas efeitos marginais sobre a viabilidade celular. Foi verificado também que os estabilizantes poloxamer 188, fosfolipídios de soja+glicolato de sódio e polissorbato 80 (P80), quando puros, causaram redução da viabilidade celular na ordem poloxamer 188 < fosfolipídios de soja+glicolato de sódio < P80. Entretanto, quando as NPLs estabilizadas por estes componentes foram avaliadas quanto a influencia sobre a viabilidade celular, as partículas estabilizadas por poloxamer 188 apresentaram maior redução desta, enquanto que as estabilizadas por P80

mostraram altos valores de IC50. Os resultados do estudo demonstraram também que as NPLs de matriz cristalina foram mais captadas do que aquelas de matriz líquida. Entretanto, é importante mencionar que ainda são escassos os estudos que relacionam a estrutura supramolecular do carreador com a resposta biológica, principalmente *in vitro*, e que usem a área de superfície como dosimétrica e investiguem a influência desta sobre aquela objetivando não apenas estudar o sistema, mas modificar a formulação inicial (em quesitos teor e área de superfície) para obter melhor resultado terapêutico.

3.2 Aspectos gerais sobre nanocápsulas poliméricas

Nanocápsulas (NC) poliméricas são sistemas vesiculares desenvolvidos desde a década de 1980 (FESSI e col., 1989), formados por uma gotícula de óleo envolta por uma parede polimérica (COUVREUR e col., 2002). O confinamento da substância ativa no núcleo da partícula reduz a irritação, algumas vezes causada pela substância ativa, no local de administração. Ainda, este sistema, por ser heterogêneo (núcleo-parede), permite que substâncias ativas com diferentes coeficientes de partição água-óleo estejam altamente associadas a ele (COUVREUR e col., 2002).

A composição qualitativa e quantitativa dos componentes utilizados para a preparação de dispersões coloidais submicrométricas tem influência sobre a estabilidade física e, assim, na “sobrevida” das formulações (CALVO e col., 1996; MOSQUEIRA e col., 2000). Sabe-se que, ao preparar formulações de nanocápsulas poliméricas, o balanço quantitativo da formulação é essencial para se evitar a formação de outras nanoestruturas como nanoesferas, nanoemulsões, lipossomas ou nanocristais de fármacos (MOSQUEIRA e col., 2000; POHLMANN e col., 2008; JÄGER e col., 2009; VENTURINI e col., 2011).

A obtenção de suspensões aquosas de NC pode ocorrer por polimerização interfacial de monômeros (*in situ*) ou a partir de polímeros pré-formados [por deslocamento de solvente (deposição interfacial de polímero pré-formado) ou envolvendo etapa de emulsificação (emulsificação-difusão)] (COUVREUR e col.,

2002). Independente do método utilizado existe a mistura de duas fases: orgânica (contendo polímero, o componente oleoso, e, quando presente, a substância ativa solubilizados em um solvente orgânico) e aquosa (COUVREUR e col., 2002). Como neste trabalho, as formulações de NC foram preparadas a partir de polímero pré-formado empregando método de deslocamento de solvente (deposição interfacial de polímero pré-formado) apenas este está mais detalhadamente abordado a seguir.

No método de deposição interfacial de polímero pré-formado, uma fase orgânica, cujo solvente é miscível em água, é injetada, sob agitação moderada, em uma fase aquosa contendo tensoativo hidrossolúvel. Quando as fases entram em contato, o solvente orgânico difunde para a água causando a redução da solubilidade do polímero e do óleo no sistema e, por consequência, a deposição do componente polimérico na pseudo-interface óleo-água o que resulta na auto-formação das partículas (JORNADA e col., 2012). O tensoativo ficará localizado na interface partícula-água e ao redor do sistema visando estabilizá-lo. A remoção do solvente orgânico é necessária não só para fins de administração, mas também para aumentar a estabilidade físico-química do sistema. Com a remoção deste solvente, a viscosidade da fase externa será aumentada o que diminui o número de colisões entre as partículas. A molhabilidade das cadeias poliméricas pela fase externa reduz, aumentando o empacotamento destas na pseudo-interface óleo-água e, por consequência, aumentando o confinamento da substância ativa na partícula (MORA-HUERTAS e col., 2011). O diâmetro das partículas formadas por este método de preparação geralmente está em torno de 200 nm.

Entre os polímeros utilizados para a preparação desses sistemas destacam-se, por poderem ser aplicados inclusive por via parenteral, poliésteres biocompatíveis e biodegradáveis como poli(lactídeo) (PLA), poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) ou poliacrilatos, como os Eudragit (MORA-HUERTAS e col., 2010). A utilização de blendas (misturas) desses polímeros ou do mesmo polímero com diferentes massas molares (M_w) também é relatada. Como componente oleoso geralmente emprega-se o triglicerídeo dos

ácidos cáprico e caprílico (TCC), que apresentam baixo risco de degradação e solubilização do polímero e solubilizam ampla variedade de substâncias ativas (MORA-HUERTAS e col., 2010). Um surfactante lipofílico pode ou não estar presente. Quando utilizado, este pode ser ésteres de sorbitano ou fosfolipídios e é adicionado na fase orgânica empregada para o preparo do sistema. Como agente estabilizante de características hidrofílicas os mais utilizados são poloxamer 188 e P80 (MORA-HUERTAS e col., 2010).

A pesar de o TCC ser amplamente empregado como componente oleoso por este ser inerte (MORA-HUERTAS e col., 2010), existem relatos que uma dieta rica em ácidos graxos saturados, como os que compõem o TCC, reverte efetivamente necrose induzida por álcool, inflamação e fibrose após consumo contínuo de álcool (NANJI e col., 1997; NANJI e col., 2001). Os estudos encontrados relacionam os efeitos terapêuticos dos ácidos graxos saturados à reduzida endotoxemia e peroxidação lipídica, que por sua vez, resultam em diminuição da ativação de NF- κ B e redução dos níveis de TNF- α e Cox-2, os quais desempenham função importante na regulação da resposta imunitária à infecção (NANJI e col., 1997; NANJI e col., 2001). A velocidade de degradação química do sistema em meio biológico envolve duas fases: não enzimática e enzimática (DASH e KONKIMALLA, 2012). Na degradação não enzimática, a “quebra” dos segmentos da molecular inicia na porção amorfa, sendo autocatalisada pelos grupos carbonílicos terminais. A permeabilidade da parede quanto à “entrada” de água é a etapa limitante desta fragmentação. A perda de peso da partícula inicia quando o comprimento dos fragmentos gerados se tornarem pequenos o suficiente para difundirem para o meio. Entretanto, esse processo é lento em meio não biológico (geralmente maior que três meses). Por outro lado, na degradação enzimática, a fragmentação ocorre mais rapidamente (semanas). Assim, deve-se considerar que, no caso da utilização de polímero de menor massa molar, existe um número maior de cadeias poliméricas formando a parede o que aumenta quantidade de porções amorfas na mesma aumentando, assim, a permeabilidade á água além de ocorrer formação de fragmentos menores mais rapidamente. Considerando este tempo de degradação, pode-se dizer que

substâncias hidrofílicas veiculadas nesses sistemas tendem a ser liberadas, *in vivo*, em maior parte por difusão enquanto que substâncias lipofílicas tendem a ser liberadas após erosão enzimática do sistema (DASH e KONKIMALLA, 2012).

3.3. Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico

As nanocápsulas de núcleo lipídico (NCL) surgiram em meados do ano 2000 quando o componente monoestearato de sorbitano (MS), um lipídio sólido, foi introduzido na composição de formulação de nanocápsulas formadas por polímero, componente lipídico líquido (óleo), sendo este o TCC, e tensoativo hidrofílico (MÜLLER e col., 2001). Estudos posteriores mostraram por análises espectroscópicas, cromatográficas, de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), que a adição deste novo componente alterou a organização supramolecular das partículas formadas estando molecularmente disperso no lipídio líquido contido no interior destas (CRUZ e col., 2006a; JÄGER e col., 2007; POHLMANN e col., 2008). JÄGER e colaboradores (2007) demonstraram que a parede polimérica interage com ambas as fases, oleosa e aquosa, indicando que existe uma pseudo-interface óleo-água na superfície das partículas. As NCL apresentam maior viscosidade do núcleo oleoso o que mostrou alterar, podendo controlar, a velocidade de liberação de uma substância encapsulada na partícula (JÄGER e col., 2009), a rigidez particular (FIEL e col., 2011) e a capacidade de penetração em tecido biológico (p.e. tecido cutâneo) (DE BRUM, FIEL e col., 2013). A dispersão de MS em TCC possui propriedades de organogel, sendo as características de rede do organogel alteradas pela interação com as substâncias ativas encapsuladas (POLETTTO e col., 2013). Desta forma, a estrutura supramolecular proposta até o momento para as NCL consiste de um núcleo lipídico, com características de organogel, e uma parede polimérica, a qual está situada na pseudo-interface óleo-água (**Figura 1a**). Foi relatado que, em formulações de nanocápsulas de NCL, a substância ativa, de acordo com suas características físico-químicas, poderá localizar-se na fase dispersante, adsorvida na parede polimérica, particionada entre a fase dispersante e o nanocarreador ou ainda confinada no interior lipofílico da partícula (OLIVEIRA

e col., 2013). A **Figura 1** mostra, possíveis formas de associação das substâncias ativas às NCL, de modo geral, não excluindo misturas e partição na fase dispersante, sendo **1b**- adsorção à parede polimérica, **1c**- confinamento no núcleo lipídico e **1d**- sendo parte do núcleo lipídico (como componente).

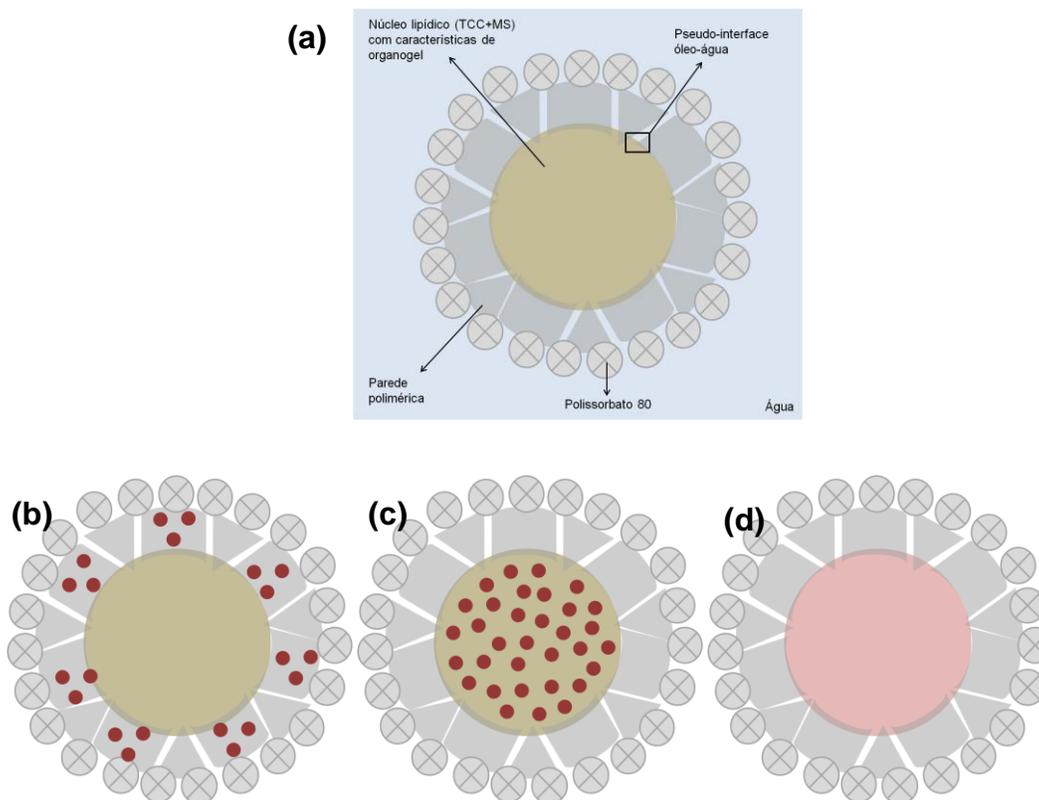


Figura 1. (a) Representação do modelo de estrutura supramolecular das nanocápsulas de núcleo lipídico estabilizadas por polissorbato 80 dispersas em água e localização das substâncias ativas quando veiculadas a estas. (b) substância adsorvida à parede polimérica, (c) substância ativa retida no núcleo oleoso da partícula e (d) substância ativa compondo o núcleo da partícula.

Recentemente essas NCL foram preparadas com diferentes proporções de lipídeos [líquido (TCC) e sólido (MS)], demonstrando, por estudos de gradiente de densidade e espectroscopia de correlação de fótons (PCS), que o excesso de óleo leva à formação concomitante de nanocápsulas e de nanoemulsão, assim como o excesso de lipídeo sólido produz suspensões de nanocápsulas e nanodispersão de lipídeo sólido (JÄGER e col., 2009). Com o objetivo de formular um sistema

aquoso contendo apenas NCL, VENTURINI e colaboradores (2011) investigaram a influência da concentração de óleo (TCC) e de MS na qualidade da formulação avaliando o perfil de distribuição de tamanho (difração de laser e PCS), tendência a fenômenos de instabilidade (espalhamento múltiplo de luz) e tipo de estrutura formada (gradiente de densidade). A combinação dos resultados indicou que formulações preparadas usando relação 1:4,1:2,6 (m/m) de MS, TCC e poliéster, respectivamente, apresentavam apenas NCL como sistema final. Mais recentemente (JORNADA e col., 2012) verificou que utilizando um regime diluído na fase orgânica (abaixo da concentração crítica de agregação), pelo aumento do volume de solvente durante a formulação do sistema, é possível controlar o perfil granulométrico de partículas preparadas por deposição interfacial de polímero pré-formado. Adicionalmente, utilizando indometacina como modelo de substância ativa, este estudo demonstrou que formulações contendo maior teor de substância ativa podem ser obtidas pelo aumento da concentração de partículas na formulação.

As principais aplicações terapêuticas já investigadas para esses sistemas foram como carreadores de substâncias para tratamento do câncer (BERNARDI e col., 2009a; OURIQUE e col., 2010), doenças inflamatórias (CRUZ e col., 2006a; BERNARDI e col., 2009b) e Alzheimer (FROZZA e col., 2010). No presente trabalho, para formar a matriz base de NCL, foram utilizados os seguintes componentes: poli(épsilon-caprolactona), monoestearato de sorbitano, TCC e P80. As estruturas destes compostos são apresentadas na **Figura 2**.

Nas células de glioma, alterações genéticas afetam a expressão de vários genes inflamatórios e levam ao recrutamento de células inflamatórias. O microambiente tumoral está amplamente envolvido com mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, COX-2 e NF- κ B (um fator de transcrição) que podem criar condições celulares favoráveis para a promoção do tumor (CONTI e col., 2010).

Uma das potenciais aplicações terapêuticas das nanocápsulas de núcleo lipídico foi estudada avaliando-se o efeito do nanoencapsulamento de indometacina (IndOH) e/ou éster etílico de indometacina (IndOEt) em linhagens de glioblastoma (U138-MG e C6) (BERNARDI e col., 2008). O principal achado desse estudo foi que a formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo IndOH foi mais potente na diminuição da viabilidade e proliferação celular das células tumorais do que a solução do fármaco livre. Adicionalmente, o efeito citotóxico foi verificado apenas contra as linhagens de glioma, sendo que culturas organotípicas mantiveram-se viáveis. Em estudo subsequente em ratos, após injeção intraperitoneal as NCLs contendo IndOH foram capazes de aumentar a concentração do fármaco no tecido cerebral reduzindo o tumor implantado (linhagem C6) (BERNARDI e col., 2009a).

O Eugenol (4-Alil-2-metoxifenol) é um componente fenólico natural e é o componente majoritário do óleo de cravo. É um óleo essencial utilizado na medicina tradicional como antisséptico, analgésico e antimicrobiano (BURT, 2004). Na maioria das células cancerosas, o excesso de espécies oxidativas e radicalares leva à apoptose (WENZEL e col., 2005). Moléculas do tipo metoxifenóis, como o eugenol (EUG) e seus derivados, apresentam efeitos biológicos cujo mecanismo envolve vias pró- e anti-oxidantes (FUJISAWA e col., 2002). O EUG, um metoxifenol, apresentou supressão do crescimento de melanoma pela inibição de um fator de transcrição (GHOSH e col., 2005). Essa substância ativa também tem demonstrado atividade em outras linhagens de tumores sólidos como câncer de próstata, carcinoma escamoso oral, câncer de mama e de fígado (CARRASCO e col., 2008; SLAMENOVÁ e col., 2009; ABDEL

BAR e col., 2010). CARRASCO e colaboradores 2008 mostraram atividade similar do EUG e um derivado mais lipofílico, o Acetileugenol (AcEUG), em linhagem de células de câncer de próstata e em células de carcinoma escamoso oral. Além disso, o Eugenol tem demonstrado inibir a biosíntese de prostaglandinas (RASHEED e col., 1984; DANIEL e col., 2008) e bloquear a atividade de COX-1 e COX-2 (HUSS e col., 2002; DANIEL e col., 2008).

Na indústria, esse componente tem sido aplicado em produtos aromatizantes e fragrâncias (BURT, 2004; BAKKALI e col., 2008). Os óleos essenciais, em geral, costumam apresentar alta volatilidade, baixa solubilidade em água e algum efeito irritante (BURT, 2004; BAKKALI e col., 2008). Por isso, o preparo de formulações contendo óleo essencial é bastante difícil. Apenas dois relatos de desenvolvimento de sistema nanoestruturado contendo eugenol foram encontrados (CHOI e col., 2009; GOMES e col., 2011). CHOI e colaboradores (2009) prepararam nanopartículas de poli(epsilon-caprolactona) (PCL) contendo eugenol pelo método de emulsificação-difusão. Por análise termogravimétrica os autores consideraram que uma eficiência de encapsulação de 100 % foi atingida. GOMES e colaboradores (2011) sintetizaram nanopartículas de poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) contendo eugenol e estabilizadas por álcool polivinílico (PVA) pelo método de emulsificação-evaporação seguido de ultrafiltração-centrifugação (para remoção do excesso de PVA e de eugenol não encapsulado) e liofilização. Os autores observaram alta eficiência de encapsulação (98 %) e um controle da liberação do eugenol (45 % em 5 h e não foi totalmente liberado em 72 h - utilizando técnica de ultrafiltração). Porém, nenhum destes estudos avaliou o efeito da nanoencapsulação deste componente no tratamento de tumores sólidos.

Conforme exposto as substâncias indometacina e eugenol/acetileugenol (**Figura 3**) apresentam relatado efeito antiinflamatório e antitumoral. Além disso, estas substâncias poderiam ser associadas às NCLs por diferentes formas de associação, onde a indometacina estaria adsorvida a parede polimérica e o eugenol ou acetileugenol fariam parte do núcleo oleoso da partícula. Portanto, essas foram escolhidas como substâncias ativas modelo para os estudos desta

tese. Considerando também as informações colocadas acima, os gliomas parecem ser bons modelos para o estudo da resposta biológica de substâncias ativas, que apresentem efeitos antiinflamatórios e antitumorais relatados, encapsuladas à NCLs.

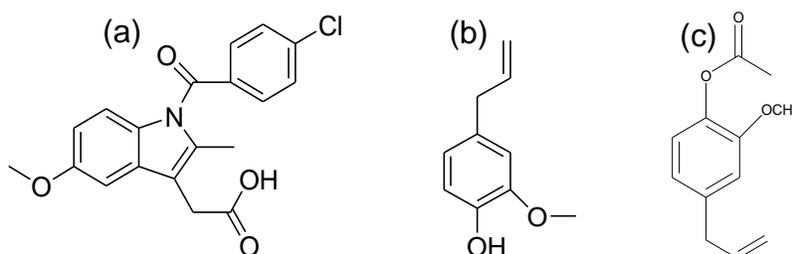


Figura 3. Estruturas químicas de (a) Indometacina, (b) Eugenol e (c) Acetileugenol.

3.5 Rastreamento de nanosistemas em meio biológico

O direcionamento das nanopartículas para o sítio alvo pode ser ativo ou passivo (DANQUAH e col., 2011). A vetorização ativa pode ocorrer quando a partícula contém em sua superfície alguma molécula de reconhecimento específico pelo sítio alvo (DANQUAH e col., 2011; MAHAPATRO e SINGH, 2011). Por outro lado, vetorização passiva pode ocorrer devido ao extravasamento das nanopartículas no sítio alvo quando a microvasculatura deste estiver fraca como, por exemplo, ocorre em tecidos tumorais ou de uma inflamação (DANQUAH e col., 2011). O enfraquecimento da microvasculatura nestes tecidos é resultado de elevada angiogênese e presença de citocinas e outros fatores vasoativos que aumentam a permeabilidade dos vasos (KOO e col., 2005). Sabe-se que os menores capilares do corpo humano possuem diâmetro ao redor de 5 μm . Ainda, grande parte dos tumores sólidos apresenta vasculatura com tamanho corte entre 380 e 780 nm (KOO e col., 2005). Portanto, o ideal é que as partículas apresentem distribuição de tamanho bem abaixo destes valores de referência para garantir que estas atinjam o sítio alvo e não causem nenhuma obstrução de vasos (KOO e col., 2005).

Sabe-se que o transporte pela membrana celular ou membranas intracelulares está relacionado com processos celulares. Por isso, o conhecimento da localização dos dispositivos carreadores de substâncias ativas e de sua interação com tecidos e células é de extrema importância para o entendimento completo da ação dos mesmos. A localização do dispositivo poderia ajudar a elucidar se, por exemplo, a liberação da substância ativa ocorre antes ou após a passagem do dispositivo por determinada barreira biológica, se é intracelular ou não, ou, ainda, se as características físico-químicas do carreador influenciam no seu grau de interação com as barreiras biológicas (KOO e col., 2005; REIMOLD e col., 2008; HE e col., 2010).

Quando uma substância ativa está veiculada a um carreador, o mecanismo de ação não dependerá apenas de suas interações com células e/ou tecidos, mas também do comportamento do carreador no organismo e as interações deste com células/tecidos (GUMBLETON e STEPHENS, 2005). O estudo deste comportamento pode ser avaliado empregando técnicas de imagem como microscopia eletrônica e microscopia de fluorescência, por exemplo (GUMBLETON e STEPHENS, 2005). Porém, devido ao diâmetro extremamente reduzido dos nanocarreadores e ausência de contraste torna-se difícil sua visualização sem o uso de substâncias que apresentem propriedades diferenciadas que permitam a localização no organismo. Ainda, no caso da microscopia eletrônica, o preparo da amostra para visualização impede que imagens sejam realizadas em amostras vivas.

O fenômeno de fluorescência envolve a absorção de luz em um determinado comprimento de onda e emissão de radiação eletromagnética em comprimentos de onda maiores na região do ultravioleta próximo-visível o que a torna uma técnica de alta sensibilidade onde concentrações muito baixas de sonda podem ser detectadas (GUMBLETON e STEPHENS, 2005). A aplicação de tecnologias de imagem de amostras fluorescentes no âmbito biológico tem auxiliado a desvendar o que ocorre com os dispositivos de liberação de fármacos após a entrada no organismo e, desta forma, compreender a ação dos mesmos

(GUMBLETON e STEPHENS, 2005; WATSON e col., 2005). Para isso, uma sonda fluorescente deve estar interagindo física- (PANYAM E LABHASETWAR, 2003) ou quimicamente (LI e col., 2011) com as partículas. Neste último caso, a sonda seria dificilmente liberada da partícula, reduzindo resultados referentes, por exemplo, ao rastreamento da sonda ao invés do carreador.

Apesar deste risco, alguns pesquisadores utilizam sonda fluorescente apenas encapsulada para rastrear o carreador. Este é o caso de DESAI e colaboradores (2008), que avaliaram a atividade terapêutica da combinação de paclitaxel e C6-ceramida, uma molécula sinalizadora de apoptose, quando administradas em nanoemulsões O/A em células de glioblastoma. A captação e biodistribuição destas partículas em células de glioblastoma foram avaliadas por microscopia epifluorescente em que foram utilizadas nanoemulsões encapsuladas com paclitaxel, fármaco, conjugado a rodamina e nanoemulsões contendo C6-ceramida (usada como sonda fluorescente para avaliar a atividade da UPD-glicose:glicosiltransferase ceramida especifica e para demonstrar a translocação de glucocerebrósido e esfingomiéline a partir do Golgi para a membrana plasmática). Os autores verificaram um aumento da citotoxicidade pela combinação das duas substâncias em relação à verificada com cada agente e pelas imagens obtidas, os autores sugerem que ambas as substâncias são simultaneamente entregadas às células permanecendo encapsuladas nas nanoemulsões durante este período. Outro estudo utilizando sonda que não faz parte da estrutura do carreador é o de YORDANOVA e colaboradores (2012), por exemplo, que avaliaram a captação e citotoxicidade de nanoesferas de poli(butil cianoacrilato) (PBCA) contendo epirrubicina, substância ativa utilizada para câncer de mama que apresenta fluorescência. Neste estudo, a Epirrubicina (EPI) foi mais citotóxica quando veiculada as nanoesferas. Os estudos de citotoxicidade e captação celular foram realizados em células HeLa e A549 utilizando microscopia de fluorescência para detecção. A citotoxicidade das partículas de EPI-PBCA foi maior do que a da substância livre, o que poderia estar relacionado com uma maior captação da EPI quando encapsulada comparado com a substância livre. Os resultados demonstraram que a combinação de polissorbato 80 com EPI ou

com EPI-PBCA possui citotoxicidade ao contrário de P80 sozinho. Ainda, partículas de EPI-PBCA-P80 tiveram maior captação do que partículas de EPI-PBCA. Assim, a citotoxicidade mostrou ter correlação com a captação da substância pelas células.

Utilizando sonda fluorescente encapsulada, podemos citar também os estudo de LING e colaboradores (2012), MO e colaboradores (2012) e GAO e colaboradores (2012), que prepararam nanopartículas contendo sondas fluorescentes como cumarina e rodamina encapsuladas às nanopartículas para estudar a captação celular destas. Em um destes estudos, os autores sugeriram que as nanopartículas foram mais internalizadas pelas células em comparação com as sondas fluorescentes livres (LING e col., 2012). Estudos *in vitro* de captação celular e de penetração tumoral mostraram que o sistema é capaz de vetorizar para células endoteliais e tumorais e também penetrar as monocamadas do endotélio e as células tumorais. Além disso, os estudos *in vivo* indicaram que as nanopartículas de vetorização ativa preparadas resultaram em maior distribuição tumoral e maior razão tumor/cérebro normal (GAO e col., 2012). A utilização de sonda para rastrear partículas levou MO e colaboradores (2012) a sugerir que endocitose mediada por clatrina e macropinocitose foram os principais mecanismos envolvidos com a internalização celular das nanopartículas por eles estudadas e que estas são degradadas nos lisossomos.

Por outro lado, muitos pesquisadores já vêm utilizando materiais, em sua totalidade materiais poliméricos, conjugados a uma sonda fluorescente para preparar os nanocarreadores e assim poder realizar o rastreamento destes no ambiente biológico. LUTSIK e colaboradores (2002) prepararam nanoesferas de PLGA e dextran, o qual estava conjugado à tetrametilrodamina, e avaliaram a captação destas por células dendríticas humanas. Microscopia confocal foi utilizada para localizar as partículas e citometria de fluxo para avaliar a fração de partículas captadas por célula. Os resultados indicaram a capacidade das células dendríticas em captar as nanopartículas de PLGA. Outro exemplo de estudo empregando sonda fluorescente conjugada à partícula é o de HE e colaboradores

(2010) que, para avaliar a influência de características físico-químicas como tamanho e carga de superfície sob a captação celular e biodistribuição de nanopartículas poliméricas, desenvolveram nanopartículas de carboximetil-quitosana (RoBCMCNP) (carga negativa) e de hidrocloreto de quitosana (RoB-CHNP) (carga positiva) via polimerização *in situ* marcadas covalentemente com rodamina B (RoB). CMCNP e CHNP foram covalentemente ligadas à rodamina B pela formação de ligação amida entre NH_2 em CMCNP ou CHNP e COOH da RoB na presença de EDCI em pH 4. As nanopartículas apresentaram diâmetros bem definidos entre 150-500 nm e potencial zeta entre -40 - +35 mV. As amostras apresentaram estabilidade quanto à fluorescência *in vitro* em plasma. As nanopartículas com maior carga superficial e maior tamanho foram mais captadas por macrófagos murinos. Porém, para outros tipos celulares (células de fígado humano ou de carcinoma de fígado humano), as partículas com menores tamanhos, menor carga negativa ou maior carga positiva foram mais captadas. A biodistribuição *in vivo* demonstrou que nanopartículas com carga levemente negativa e com diâmetro de 150 nm tiveram maior tendência em relação às outras de acumular no tumor (tumor de fígado de camundongos).

Por fim, no âmbito de sondas conjugadas citamos ainda o recente estudo de POLETTO e colaboradores (2012). Neste estudo os autores prepararam nanopartículas de núcleo lipídico de poli(épsilon caprolactona) conjugada à RoB e avaliaram a captação por macrófagos destas partículas utilizando técnica de epifluorescência em células vivas.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

Rodamina B, 4-(*N,N*-dimetil)aminopiridina (DMAP), hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI.HCl), Poli(epsilon-caprolactona) (PCL) (polímero com duas funções hidroxilas) ($M_w = 16000 \text{ g mol}^{-1}$), monoestearato de sorbitano (Span[®] 60), RNase, Iodeto de propídeo (PI) e acetato miristato de forbol (PMA) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Sao Paulo, Brasil). Triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (TCC) foram fornecidos pela Alpha Quimica (Porto Alegre, Brasil). Indometacina foi adquirida da DEG (Brasil). Polissorbato 80 e Benzofenona-3 foram adquiridos na Delaware (Porto Alegre, Brasil). Poli(epsilon-caprolactona) ($M_w = 114000 \text{ g mol}^{-1}$) Capa6500TM foi doado pela empresa Perstorp (Toledo, Ohio, EUA). Óleo de rícino/mamona (Campestre, São Bernardo do Campo, Brasil). Membrana de celulose (Membra-Cel MC18x100 CLR). Todos os solventes utilizados apresentavam grau analítico ou farmacêutico. As cubetas de espectrofotometria foram retangulares (Hellma Quartz suprasil[®], 10 mm). Cubetas de fluorimetria: retangular ou triangular (Hellma Quartz Suprasil[®], 10 mm). Percoll[®] (GE Healthcare Life Sciences). Coluna de cromatografia CLAE: coluna RP-18 LiChrospher[®] 100 (Merck, Alemanha). Eudragit S 100[®] e Eudragit RS 100[®] foram obtidos da Almapal (São Paulo, Brasil). RPMI-1640, penicilina/streptomicina, Fungizona[®] e solução de tripsina/EDTA 0.5% foram obtidos da Gibco (Gibco BRL, Carlsbad, CA, EUA). Soro fetal bovino (FBS) foi adquirido da Cultilab (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). Meio de montagem para fluorescência UltraCruz[®] com DAPI foi fornecido por Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA). Dimetil sulfoxido (DMSO) foi obtido da Sigma (St. Louis, EUA). As células utilizadas foram provenientes do banco de células ATCC (Rockville, Maryland, EUA). O clorofórmio utilizado para as medidas de fluorescência, acetonitrila e metanol utilizados nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram de grau espectroscópico. Todos os outros reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico e manipulados conforme recebidos, exceto o diclorometano utilizado nas reações de síntese, o qual foi destilado após secagem com hidreto de cálcio sob refluxo.

4.2 Equipamentos

- Evaporação a pressão reduzida: Evaporador rotatório (BUCHI) – *K204 IQ/UFRGS*
- Difração de Laser: Mastersizer[®] Mastersizer2000 (Malvern, Reino Unido). – *Fac. Farmácia/UFRGS*
- Espalhamento dinâmico de luz: Zetasizer[®] nano-ZS modelo ZEN 3600 (Malvern, Reino Unido). – *Fac. Farmácia/UFRGS*
- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) [bomba e autoinjeter S200 Perkin-Elmer (Reino Unido). – *K204 IQ/UFRGS ou Fac. Farmácia/UFRGS*
- Infravermelho: equipamento Varian[®] 640-IR de 4000 a 400 cm^{-1} (100 varreduras, 2 cm^{-1} de resolução). – *IQ/UFRGS*
- RMN de próton: equipamento Espectrômetro Varian (VXR-200 ou VXR-300). As amostras (~10 mg) foram previamente dissolvidas em clorofórmio deuterado. O espectrômetro foi operado a 400 MHz a 20 °C. O sinal do próton do CHCl_3 residual (7.27 ppm) foi utilizado como referência interna. – *IQ/UFRGS*
- Microscopia eletrônica de varredura: Microscópio Jeol Scanning Microscope, JSM-5800 (Tokio, Japão). – *CME/UFRGS*
- Análise de GPC: equipamento Viscotek[®] VE 2001 com detector triplo Viscotek[®] TDA 302 e coluna PS/DVB. – *IQ/UFRGS*
- Análise de DSC: equipamento DSC Q20, TA[®] Instruments (EUA) – *LAMAT, IQ/UFRGS*.
- Potenciometria: potenciômetro B474 (Micronal, Brazil). – *K204 IQ/UFRGS*
- Mobilidade eletroforética: Zetasizer[®] nano-ZS modelo ZEN 3600 (Malvern, EUA). – *Fac. Farmácia/UFRGS*
- Análise de rastreamento de partículas: Nanosight LM10 (NanoSight, Amesbury, Reino Unido). – *K204 IQ/UFRGS*
- Espalhamento múltiplo de luz: equipamento TurbiscanLab (Formulation, França). – *K204 IQ/UFRGS*
- Leitor de placas: SpectraMax[®] M5 (Molecular Devices, E.U.A.) – *Dep. Bioquímica/UFRGS*

- Lâmpada de luz ultravioleta - 365 nm- (BOIT-LUB01, Boitton, Brasil). – *K204 IQ/UFRGS*
- Análises de UV-Vis: Espectrofotometro Shimadzu® UV-1601PC. – *IQ/UFRGS*
- Análises de fluorescência: Fluorímetro Varian (Cary® 100, Agilent). – *IQ/UFRGS*
- Microscopia de fluorescência: microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TE300 (Nikon, Tokyo, Japão) equipado com a câmara digital. – *Dep. Bioquímica/UFRGS*
- Citometria de fluxo:
 - 1- FACS Calibur sistema de citometria, BD Bioscience, Mountain View, CA, EUA. – *Dep. Bioquímica/UFRGS*
 - 2- BD Accuri™ C6 sistema de citometria, BD Bioscience, Mountain View, CA, EUA. – *Dep. Bioquímica/UFRGS*
- Microscopia confocal: das partículas [Microscópio: Zeiss (LSM 700 AxioObserver); Objetiva de 20x], das células [Olympus FluoView™ 1000, Objetiva de 40x]. – *CME/UFRGS*

4.3 Métodos gerais

4.3.1 Preparação das nanopartículas

As formulações de nanocápsulas utilizadas neste trabalho [nanocápsulas (NC) ou nanocápsulas de núcleo lipídico (NCL)] foram preparadas por deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI e col., 1989). De forma geral, preparou-se uma fase orgânica, sendo acetona o solvente, contendo: o componente oleoso, polímero e/ou não tensoativo lipofílico, (NC), ou componente oleoso, polímero e lipídeo sólido, sendo este o monoestearato de sorbitano (MS), (NCL). Em um frasco separado, polissorbato 80 (tensoativo de caráter hidrofílico) foi disperso em água milliq. Após completa dissolução dos componentes de ambas as fases (40 °C), a fase orgânica foi injetada, sob agitação magnética moderada, na fase aquosa. A suspensão resultante foi mantida sob agitação

moderada por 10 minutos (40 °C). A suspensão foi concentrada a um volume final de 10 mL em evaporador rotatório. A quantidade de cada componente e a proporção mássica representada por estes na formulação final variou dependendo da formulação e será mencionada em cada seção. Para a preparação de nanoemulsões (NEL), o polímero foi omitido da fase orgânica utilizada para preparar as NCL. A substância ativa ou fármaco, quando presentes, foram adicionados na fase orgânica utilizada para a preparação das formulações.

4.3.2 Medidas de pH

O pH da formulação, quando determinado, foi avaliado sem diluição prévia desta por potenciometria.

4.3.3 Difração de laser

As determinações de perfil granulométrico/distribuição de tamanho (por volume ou número), diâmetro médio de esfera equivalente ($D_{[4,3]}$), polidispersão (Span) e área de superfície específica foram obtidas por difração de laser. Para isso, as formulações foram inseridas separadamente na unidade úmida dispersante do equipamento Malvern Mastersizer® 2000, sendo água destilada o meio dispersante, sem qualquer tratamento prévio, até que obscuração adequada fosse obtida (~3 %). Os valores de índices de refração utilizados para as fases dispersa e dispersante foram o do poliestireno e água, respectivamente. A área de superfície específica (A_{se}), fornecida pelo software do equipamento (m^2/g), foi utilizada para o cálculo da área de superfície de carreador por cm^3 da formulação (A_s) (cm^2/cm^3) e esta foi empregada para a determinação da área de superfície de carreador presente por cm^3 nos tratamentos celulares (A_s^t) (cm^2/cm^3). Para o cálculo da A_s , considerou-se a massa total m (g) de componentes da fase dispersa contida em um cm^3 da formulação (**Equação 1**). Para o cálculo da A_s^t , considerou-se o valor de A_s (cm^2/cm^3) da formulação, o volume da alíquota da formulação utilizado para o tratamento (V_a) (mL) e o volume total do meio de cultura contido no poço da placa de cultura (V_t) (mL) (**Equação 2**). O valor de SPAN, fornecido também pelo software do equipamento, é obtido conforme a **Equação 3**.

$$A_s = \{[(\sum m) * 0.1] * A_{se}\} * 10^4 \text{ (Equação 1)}$$

$$A_s^t = \frac{(V_a * A_s)}{V_t} \text{ (Equação 2)}$$

$$SPAN = \frac{(D_{0.9} - D_{0.1})}{D_{0.5}} \text{ (Equação 3)}$$

Em que: D0.9 é o tamanho que abrange 90 % da curva de distribuição, D0.1 é o tamanho que abrange 10 % das partículas de menor tamanho sob a curva de distribuição e D0.5 é o tamanho que representa a mediana da curva de distribuição de tamanhos.

4.3.4 Espectroscopia de correlação de fótons (PCS)

As distribuições de tamanho de partícula em escala nanométrica, o diâmetro médio (z-average) e o índice de polidispersão (PDI, **Equação 4**) foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons através do equipamento Malvern ZetaSizer ZS após diluição das formulações em água MilliQ® (500x) previamente filtrada (0,45 µm Millipore®). As medidas foram determinadas com ângulo de detecção de 173° (25°C). Os valores de índices de refração utilizados para as fases dispersa e dispersante foram o do poliestireno e água, respectivamente. A técnica considera a variação do padrão temporal de luz espalhada pelas partículas, sob movimento browniano, para obter, utilizando função de autocorrelação, o coeficiente de difusão translacional das mesmas. A equação de Stokes Einstein é utilizada para relacionar o coeficiente de difusão com o tamanho hidrodinâmico das partículas. Distribuição de tamanho considerando o volume ou número de partículas pode ser obtida pelo software do equipamento a partir de transformação matemática das funções de correlação obtidas pelo padrão de intensidade de luz espalhada.

$$PDI = \frac{\mu_2}{I^2} \text{ (Equação 4)}$$

Em que: Γ e μ_2 representam a taxa de decaimento médio da função de autocorrelação e sua variância, respectivamente.

4.3.5 Mobilidade eletroforética

A técnica de mobilidade eletroforética foi utilizada para determinar o potencial zeta das formulações, o qual dá referência à carga de superfície das partículas. As análises foram realizadas em equipamento Malvern ZetaSizer ZS, utilizando célula capilar de policarbonato com eletrodos de berílio-cobre recoberto com ouro, após diluição (500 x) das dispersões em solução salina (NaCl 10 mM) filtrada (Millipore® 0,45 μm).

4.3.6 Rastreamento de partículas

O número de nanopartículas por mL de formulação foi avaliado por análise de rastreamento de partículas em equipamento Nanosight. Para a análise, as formulações foram diluídas com água MilliQ® filtrada (Millipore® 0,45 μm), 5 000 x ou 10 000 x, para obter amostras com cerca de 10^8 partículas por mL. A diluição individual de cada amostra será indicada nas seções específicas. Os vídeos foram adquiridos com abertura do obturador da câmera de 207 e ganho de 177 por 60 s. Um termômetro acoplado a câmara contendo a amostra permitiu a coleta da temperatura de cada análise. Os vídeos foram processados em software NTA 2.3 Build 0011 RC1 com ganho de 1,56 x, borrão de 3 x 3, limite de detecção considerando a faixa de 70-120 partículas por quadro e tamanho mínimo da amostra de 50 nm. As partículas que se deslocam em movimento Browniano são identificados e rastreadas individualmente pelo software, o qual fornece a concentração de partículas da amostra como resultado.

OS ITENS SUBSEQUENTES DA PARTE EXPERIMENTAL (PÁG 31-70) FORAM SUPRIMIDOS DESTA VERSÃO POR TRATAR-SE DE MATERIAL OU PRESENTE EM PUBLICAÇÃO (QUE SERÁ CITADO NO RESUMO ESPECÍFICO A SEGUIR) OU QUE SERÁ SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

RESUMO DA SEÇÃO 5.1:

Desenvolvimento de estratégia para determinação do fluxo intrínseco de espécie com baixa solubilidade em água em solução aquosa

A incorporação de fármacos, antioxidantes, vitaminas, etc., em formulações pode modificar o seu comportamento de ambiente biológico (FLORENCE, 2012). Portanto, quando se utiliza um carreador/veículo, é de grande importância o estudo da taxa de liberação daquelas substâncias a partir desta matriz. Em estudos sobre a liberação de substâncias a partir de partículas submicrométricas, a porção liberada não pode ser separada da que permanece aprisionada no carreador utilizando métodos convencionais de filtração, devido ao cut-off (“tamanho de corte”) da membrana. Assim, métodos, como por exemplo, a ultrafiltração-centrifugação ou a diálise com os sacos de diálise, os quais permitem esta separação, são utilizados (MICHALOWSKI e col., 2004; CONTRI e col., 2011). No entanto, como as substâncias veiculadas em soluções coloidais aquosas são geralmente substâncias de baixa solubilidade em água, não é fácil obter o valor do fluxo intrínseco (J_0) destas substâncias em solução aquosa. Neste contexto, o nosso objetivo foi desenvolver uma estratégia para obter o valor J_0 de substância de baixa solubilidade em água dialisada a partir de uma solução aquosa para comparar com o seu fluxo aparente (J_{app}) a partir de um sistema coloidal aquoso e conseguir, assim, avaliar o efeito da nanoencapsulação sobre a taxa de liberação de uma substância lipofílica. Diferentes soluções hidroetanólicas (razão etanol/água (ϕ) = 0,65, 0,70, 0,75, 0,80 e 1,00) de uma substância de baixa solubilidade em água (benzofenona-3 (BZ3)) (5 mg mL⁻¹) foram dialisadas contra meios aceptores hidroetanólicos (ϕ = 0,65, 0,70, 0,75, 0,80 e 1,00), utilizando diálise dinâmica com sacos. Suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico de poli(épsilon-caprolactona) contendo BZ3 (NCL -BZ3) (5 mg mL⁻¹) foram utilizadas como modelo de nanocarreador. As formulações NCL-BZ3 foram dialisadas contra meioceptor aquoso. O valor de J_{app} de diálise de BZ3 em

cada meio hidroetanólico foi plotado em função da proporção de solvente orgânico e a equação matemática exponencial desta relação foi usada para calcular o valor J_0 da substância em solução aquosa. O valor obtido para o Japp referente a liberação da BZ3 a partir da suspensão NCL -BZ3 foi de cerca de 14 vezes menor do que o seu valor de J_0 , indicando que o encapsulamento de BZ3 na NCL foi capaz de retardar a sua liberação. Portanto, a estratégia desenvolvida permite a utilização dos valores de J_0 de substâncias pouco solúveis em água, em soluções aquosas para verificar se o nanoencapsulamento pode prolongar, por exemplo, a distribuição de substâncias no ambiente biológico.

Artigo publicado: Luana A. Fiel, Karina Paese, Marília Rizzi, Sílvia S. Guterres, Adriana R. Pohlmann. A strategy to estimate the intrinsic flux of a poorly water soluble substance for comparison with its release from lipid-core nanocapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. Volume 441, 20 January 2014, Pages 716–724. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.10.036>

RESUMO DA SEÇÃO 5.2:

Formulações contendo parede polimérica ou núcleo fluorescente

Visando a possibilidade de rastreamento das partículas de NCL tanto para o estudo de avaliação da influência do teor de substância ativa e área de superfície de carreador sobre a resposta biológica quanto para demonstração da interação das NCL com as células de glioblastoma, os quais serão apresentados na **seção 5.4**, almejou-se obter formulações de NCL contendo parede polimérica ou núcleo oleoso fluorescente. Sabe-se que trabalhos usando marcadores fluorescentes apenas encapsulados/associados são encontrados na literatura. Entretanto a utilização destes marcadores ligados covalentemente a algum material que compõe a estrutura supramolecular da partícula se mostra mais confiável, tendo menores chances de interpretações relacionadas ao rastreamento da sonda e não do carreador, e é a estratégia mais adequada para as investigações por técnicas de fluorescência da vetorização biológica dos nanocarreadores (SUH e col., 1998; WATSON e col., 2005). Neste caso, porém, a síntese de materiais fluorescentes, a formulação do sistema com o novo material e a avaliação da manutenção de sua qualidade se tornam mais uma etapa além de sua avaliação de seu comportamento biológico. Até o momento, não foram encontrados estudos utilizando um material fluorescente compondo o núcleo oleoso das nanocápsulas. Os estudos encontrados que usam interação química entre uma sonda fluorescente e a partícula estão relacionados à ligação ao polímero usado para formar as partículas (SUH e col., 1998; JÄGER e col., 2007; CATTANI, FIEL e col., 2010; LI e col., 2011; POLETTO e col., 2012). A obtenção deste material, um triglicerídeo, apresenta como vantagem em relação ao uso de polímeros marcados a possibilidade de diversidade de estudos como, por exemplo: localização de partículas contendo diferentes estruturas supramoleculares ou revestimentos para avaliação da influência da modificação da superfície do carreador sob sua interação com tecidos/células.

Desta forma, os materiais fluorescentes utilizados no presente trabalho foram marcados por ligação covalente a uma sonda fluorescente. A RoB foi escolhida como sonda fluorescente devido à alta eficiência quântica de fluorescência e baixo custo. A RoB apresenta um grupamento carboxílico disponível para ataque nucleofílico. As partículas contendo parede polimérica fluorescente ($NCL_{PCL-Ro-Br}$) foram preparadas com PCL di-hidroxilada acoplada a rodamina B (PCL-Ro). A obtenção deste produto e sua utilização na síntese de NCL foi recentemente descrita por POLETTO e colaboradores (2012). Os autores realizaram imagens por microscopia de fluorescência multifotônica que permitiu visualização das partículas fluorescentes no interior de macrófagos. Nesta tese, na presente seção, o objetivo foi obter o material, preparar as partículas fluorescentes, avaliar a estabilidade química do mesmo, a qual ainda não havia sido avaliada, para serem utilizadas na seção 5.4 para demonstrar a interação das NCL com as células de glioblastoma. As formulações preparadas apresentaram caráter nanotecnológico e a estabilidade química da ligação entre o polímero e a sonda fluorescente em meio biológicos simulados foi confirmada. Para preparar as nanopartículas contendo núcleo fluorescente, realizou-se a marcação do óleo de rícino com rodamina B (RoB). O óleo de rícino (OR) foi escolhido, pois é um triglicerídeo cujo componente majoritário, a ricinoleína, apresenta três grupamentos hidroxílicos em sua molécula que poderiam reagir com a carboxila da rodamina B. A caracterização do novo material foi feita por CCD, GPC, 1H -RMN, infravermelho, espectroscopia e fluorimetria. O triglicerídeo fluorescente foi utilizado para preparar formulações de nanocápsulas (NCs) de Eudragit RS100, polímero catiônico, ou Eudragit S100, polímero aniônico, assim como formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico de PCL (NCLs). A verificação do emprego deste material para a localização celular das partículas (NCs e NCLs) foi inicialmente realizada por experimento de captação celular em macrófagos com análise de microscopia de fluorescência. Quando as células foram tratadas com as nanocápsulas fluorescentes, fluorescência vermelha foi visível no interior das células, indicando captação. A marcação do triglicerídeo fluorescente demonstrou

a possibilidade de se obter nanocarreadores poliméricos vesiculares, de natureza química versátil, marcados com o mesmo corante fluorescente.

RESUMO DA SEÇÃO 5.3:**Formulações contendo indometacina ou essência oleosa de cravo-da-índia (eugenol) ou acetileugenol**

Nesta seção, formulações de NCL contendo substâncias ativas com diferentes mecanismos de associação foram preparadas com objetivo de serem utilizadas no estudo da avaliação da influência da área de superfície de carreador (A_s^{\dagger}) e do teor de substância ativa presente em um tratamento sobre a resposta biológica final, o qual é apresentado na seção seguinte. Para isso, substâncias ativas que tivessem relatada atividade biológica e apresentassem mecanismo de associação às NCL diferenciados entre si, uma delas por adsorção e outra por internalização, fazendo parte da estrutura supramolecular do carreador, foram escolhidas. Fármacos antiinflamatórios não esteróides (AINEs) são amplamente utilizados para o tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas (BAEK e col., 2002). Diversos estudos sugerem que os AINEs são promissores agentes anticancerígenos sendo, provavelmente, os mecanismos envolvidos nesta atividade antitumoral particular em cada tumor (THUN e col., 2002). Foi demonstrado que a IndOH tem poder antiproliferativo em linhagem de células de glioma (BERNARDI e col., 2006). A associação deste fármaco às NCLs demonstrou potencializar sua ação de reduzir a viabilidade celular de linhagens de glioblastoma (BERNARDI e col., 2008), aumentar a biodisponibilidade intratumoral da IndOH e reduzir o crescimento de tumores implantados (BERNARDI e col., 2009a) por efeito antiproliferativo mediado pela regulação do ciclo celular, diferenciação e inibição das rotas de sobrevivência (BERNARDI e col., 2013). O Eugenol, componente majoritário da essência oleosa de cravo-da-índia, apresenta atividade relatada em alguns tumores sólidos como melanoma (*in vitro* e *in vivo*) (GHOSH e col., 2005), câncer de mama (*in vitro*) (ABDEL BAR e col., 2010) e hepatoma (*in vitro*) (SLAMENOVÁ e col., 2009). Ainda, um estudo demonstrou que o AcEUG apresenta atividade similar a do EUG em células de câncer de próstata insensíveis a andrógeno e em células de carcinoma escamoso oral (CARRASCO e col., 2008).

Está relatado que a IndOH, quando associada em NCLs, se encontra majoritariamente adsorvida na superfície polimérica da partícula (OLIVEIRA e col., 2013). O eugenol ou o acetileugenol, por serem componentes oleosos, teriam mais afinidade pelo interior da partícula podendo fazer parte da supraestrutura do carreador. Foram formuladas e caracterizadas suspensões de NCL contendo diferentes teores de IndOH e mesma concentração de partículas por mL de formulação assim como formulações contendo o mesmo teor de IndOH e diferentes concentrações de partículas por mL de formulação. O EUG mostrou potencial em solubilizar o polímero poli(épsilon-caprolactona), o qual foi reduzido quando em mistura com triglicerídeo de cadeia média (TCC). AcEUG foi derivatizado a partir do EUG contido em essência oleosa de cravo-da-índia. Formulações contendo essência oleosa de cravo-da-índia ou AcEUG, em mistura com TCC como núcleo oleoso, foram preparadas e caracterizadas. As formulações contendo EUG demonstraram instabilidades físico-químicas e apontaram para um sistema com estrutura supramolecular de nanoemulsão contendo polímero disperso no interior. O AcEUG foi escolhido como substância ativa que fizesse parte da estrutura do carreador para dar seguimento aos estudos. Análises físico-químicas mais minuciosas demonstraram que a pensar de o teste de inchamento de filme polimérico não ter indicado interação entre AcEUG e PCL, estes apresentam certa interação, estando a cristalinidade do polímero reduzida. Entretanto, estudos de liberação por sacos de diálise, empregando a estratégia desenvolvida na seção 5.1, indicaram que a pesar de existir certa interação entre AcEUG e PCL, a parede polimérica ainda confere contribui para o confinamento da substância. A formulação contendo substância ativa fazendo parte da estrutura da partícula foi preparada com duas concentrações desta substância, para isso, a concentração de TCC foi reduzida para que a concentração total de componente oleoso fosse mantida e a quantidade de partículas final não fosse alterada.

RESUMO DA SEÇÃO 5.4:**Avaliação da influência da estrutura supramolecular e da área de superfície de carreador e teor contidos na formulação/tratamento na resposta biológica**

Considerando partículas com tamanho, forma e mesma carga de superfície, os fatores mais importantes que podem afetar a interação do carreador com o meio biológico são a estrutura supramolecular do nanocarreador e área de superfície (A_s) do mesmo (NEL e col., 2009; PETERSEN e col., 2011; PELAZ e col., 2013). Estudos indicam que a grande A_s dos sistemas submicrométricos faz com que a interação com o meio biológico seja bastante alta e isto pode contribuir independentemente para a toxicidade do sistema (NEL e col., 2009). Estudos apontam que o AcEUG exerce atividade similar ao eugenol em linhagem de células de câncer de próstata e de carcinoma escamoso oral (CARRASCO e col., 2008). A IndOH assim como formulações de NCL contendo IndOH (NCL-IndOH) previamente demonstraram potencial atividade de redução da viabilidade celular em linhagem de glioblastoma de rato e humano (BERNARDI e col., 2006; BERNARDI e col., 2008). Neste trabalho de tese verificamos que o EUG apresenta potencial em solubilizar o polímero formador da parede polimérica enquanto que o AcEUG foi capaz de reduzir esta interação. Entretanto, a estrutura supramolecular de formulações de NCL contendo diferentes concentrações de AcEUG pode apresentar-se variada devido à solubilização parcial da parede polimérica. Além disso, formulações de NCL e NEL poderiam ser comparadas quanto à influência sobre a resposta biológica uma vez que o triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico possui relatada influência em rotas antiinflamatórias (NANJI e col., 1997; NANJI e col., 2001). Dessa forma, formulações de NCL contendo ou não IndOH ou AcEUG, com diferentes A_s de carreador e/ou teor de substância ativa, foram utilizadas como formulações de NCL contendo ou não substâncias ativas com diferentes mecanismos de associação. Estas, juntamente com formulação de NEL, foram empregadas para investigar a influência da estrutura supramolecular, do teor de substância ativa e da A_s de carreador contidos na formulação inicial e, conseqüentemente, em um tratamento sobre a

resposta biológica. Considerando a atividade já demonstrada pelas NCL-IndOH em linhagem de glioblastoma, a avaliação da resposta biológica foi realizada *in vitro* utilizando linhagem de glioblastoma de rato como modelo celular. Os materiais fluorescentes sintetizados neste trabalho foram utilizados para preparar NCLs fluorescentes contendo ou não IndOH ou AcEUG para investigar a captação celular das nanopartículas. Utilizando formulações de NCL contendo IndOH foi possível verificar que houve uma tendência de maior redução de viabilidade celular quanto maior a A_s de carreador presente no tratamento, porém esta não foi significativa. Não houve alterações de viabilidade celular por modificações de teor de substância na partícula. Os estudos de captação celular indicaram que a A_s está influenciando na captação celular, sendo esta maior, quanto maior a A_s de carreador presente no tratamento. Desta forma, as formulações de NCL-IndOH, onde a substância ativa está adsorvida, não foram um bom modelo de carreador para investigar a influência da A_s e teor sobre a resposta biológica. O AcEUG foi então avaliado quanto sua atividade em linhagem de glioblastoma, uma vez que esta nunca havia sido investigada. A substância mostrou potencialidade em reduzir o número de células. O nanoencapsulamento apresentou leve potencial de reduzir a dose necessária para reduzir esta viabilidade celular. Quando as NCL-AcEUG foram avaliadas quanto a influência de teor e área de superfície de carreador sobre a resposta biológica observou-se uma relação direta. Entretanto, o próprio carreador apresentou potencial de reduzir a viabilidade celular acima de determinados valores de A_s de carreador. Isto estaria atrelado à possível atividade dos triglicerídeos de cadeia média, constituintes do núcleo oleoso da formulação. Estudo dose resposta com formulações contendo diferentes concentrações desta substância confirmaram esta hipótese. Estudos de captação celular, com partículas contendo diferentes concentrações de AcEUG, marcadas com polímero ou triglicerídeo fluorescente, demonstraram que presença da parede polimérica, a integridade desta e a homogeneidade do sistema provavelmente levam a maior interação com a superfície celular e captação do carreador de forma íntegra. Em suma, foi possível verificar que a estrutura supramolecular do nanocarreador e a A_s contida no tratamento afetam a resposta biológica.

OS RESULTADOS DAS SEÇÕES ESTÃO, NESTA VERSÃO ONLINE, APRESENTADOS NA FORMA DE RESUMO POR SE TRATAREM DE MATERIAL JÁ PUBLICADO (SEÇÃO 5.1) OU QUE SERÃO SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO, DE FORMA SEGMENTADA OU NÃO (SEÇÕES 5.2, 5.3 E 5.4). DESTA FORMA, AS PÁG 71-196 FORAM SUPRIMIDAS.

6. CONCLUSÃO

A partir do conjunto de resultados gerados nesta tese demonstrou-se que a supraestrutura do nanocarreador e a área de superfície do mesmo contida em um tratamento (A_s^t) influenciam na resposta biológica *in vitro*. A presença da parede polimérica, a integridade desta e a homogeneidade do sistema parecem levar a uma maior interação com a superfície celular e captação do carreador, provavelmente de forma de forma íntegra. Uma maior A_s^t leva a potencialização da resposta biológica e isto está atrelado a maior captação celular favorecida, provavelmente, pelo maior gradiente de partículas. O teor de substância ativa contido na formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico (NCL) e, por consequência, no tratamento também mostrou ter influencia na resposta biológica, porém esta constatação só foi confirmada quando formulações contendo diferentes concentrações de triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (TCC) foram avaliadas demonstrando a atividade do mesmo.

As formulações de NCL contendo indometacina, obtidas com diferentes área de superfície de carreador e teor de substância ativa, não foram um bom modelo de avaliação da influencia da A_s^t e do teor de substância contido na partícula provavelmente por fração desta substância ter liberação instantânea no tratamento. O acetileugenol (AcEUG) se mostrou melhor candidato para compor as formulações de NCL contendo substância ativa fazendo parte da estrutura supramolecular do carreador em comparação ao eugenol devido ao menor potencial do AcEUG em solubilizar a parede polimérica. As formulações contendo AcEUG, obtidas com dois diferentes teores de substância ativa, demonstraram a influência da A_s^t e da supraestrutura do mesmo na resposta biológica e captação celular. Porém, a avaliação da influência do teor de substância ativa contido na partícula também não foi possível com esta formulação uma vez que a supraestrutura do carreador parece ter sido modificada com o aumento do teor de substância na partícula e o efeito aditivo da presença do TCC na formulação contendo maior teor de AcEUG pode ter reduzido devido a redução da concentração deste nesta formulação.

Os materiais fluorescentes sintetizados para preparar as partículas fluorescentes, poli(epsilon-caprolactona) ou ricinoleína presente no óleo de rícino acoplados quimicamente à rodamina B, tendo sido este último descrito pela primeira vez neste trabalho, se mostraram materiais potenciais para preparar nanopartículas fluorescentes possibilitando o rastreamento das mesmas em ambiente biológico. A poli(epsilon-caprolactona) acoplada a rodamina B, reproduzida conforme literatura, foi utilizada para preparar NCL fluorescentes e a estabilidade química do produto fluorescente contido na formulação foi avaliada em diferentes meios biológicos neste trabalho mostrando-se estável. Além disso, essas formulações foram utilizadas para avaliar a captação celular de NCL por células de glioblastoma e indicaram que as NCL são internalizadas por células de astrocitoma (C6 de rato) demonstrando assim a interação com as células do tecido cerebral.

Neste trabalho foi demonstrado pela primeira vez a obtenção de formulações de NCL contendo AcEUG e a atividade desta substância sobre linhagem de glioblastoma, tendo o nanoencapsulamento potencializado levemente esta atividade. A substância não mostrou efeito antiproliferativo, o que pode ser vantajoso, uma vez que se a substância é retirada após o tratamento, se sua ação não for por efeito antiproliferativo, as chances de as células voltarem a proliferar diminuem. A liberação desta substância a partir das NCL demonstrou que a parede polimérica, embora parcialmente solubilizada, confere confinamento ao AcEUG. O estudo de liberação foi conduzido empregando estratégia desenvolvida no início do trabalho para determinação do fluxo intrínseco de espécie lipofílica em solução aquosa, a qual consistiu de realização de experimentos de dissolução de uma espécie lipofílica [benzofenona-3 (BZ3)] em meios hidroalcoólicos com diferentes proporções de etanol. A relação entre o fluxo da BZ3 e a razão de co-solvente utilizada permitiu a obtenção do valor correspondente ao fluxo intrínseco desta substância em uma solução aquosa verdadeira, ou seja, sem a presença de cosolvente.

7. APÊNDICES

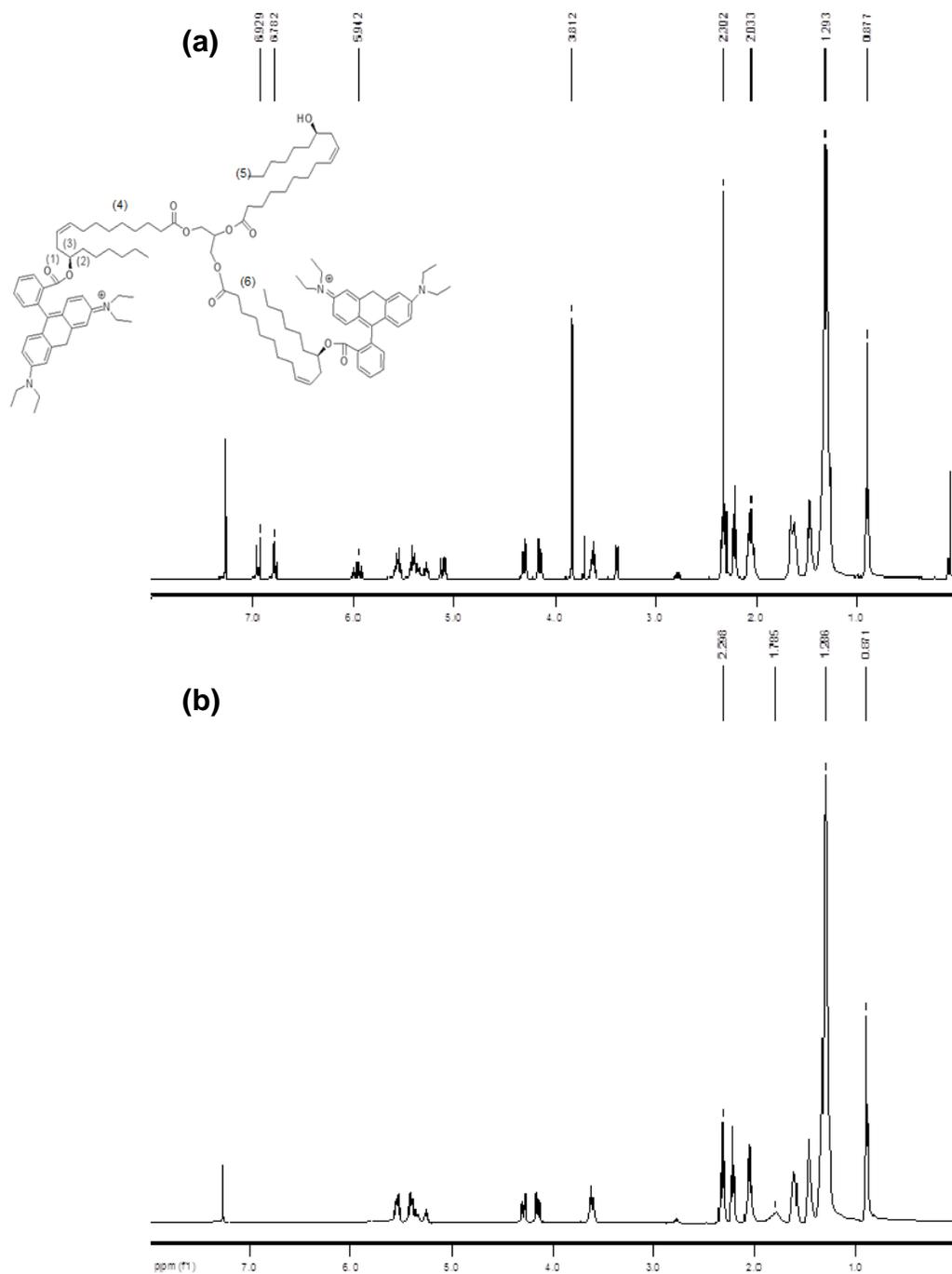


Figura A1. (a) Espectro de RMN-H1 do produto OR-Ro. (b) Espectro de RMN-H1 do óleo de rícino. A Figura no canto superior esquerdo é representativa do produto considerando duas hidroxilas da ricinoleína substituídas por moléculas de rodamina.

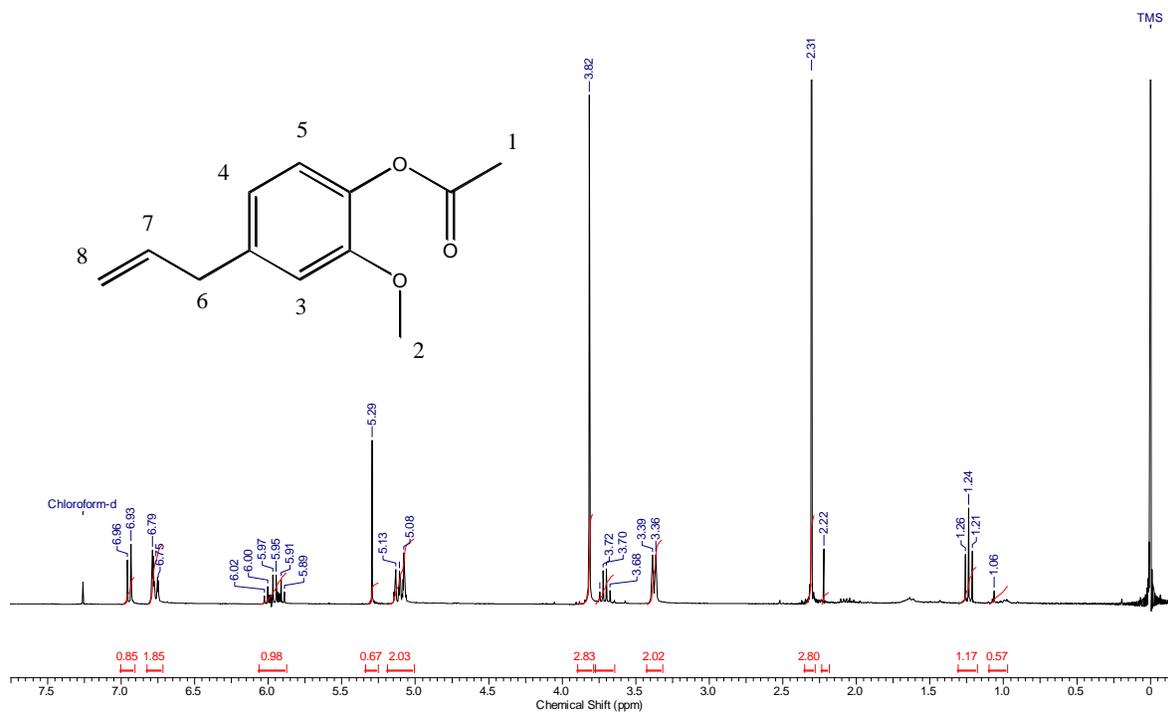


Figura A2. Espectro de RMN-H1 do produto Acetileugenol. No canto superior esquerdo posições dos átomos na molécula de AcEUG (acetato de 4-alil-2-metoxifenilo) para identificação dos átomos de hidrogênios no RMN-H1.

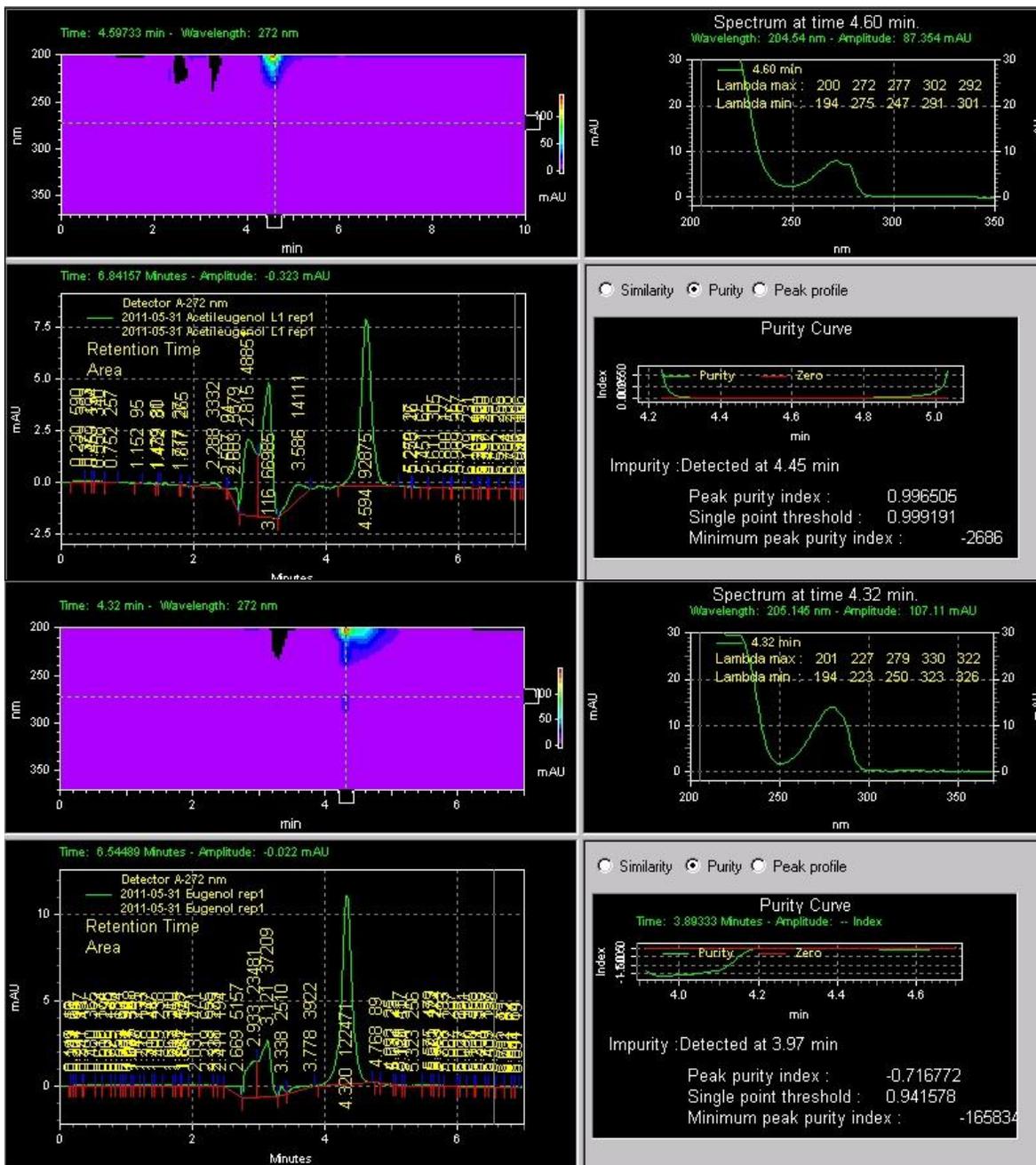


Figura A3. Cromatogramas obtidos por CLAE com detector de arranjo de fotodiodos. (a) essência oleosa de cravo-da-índia e (b) acetilleugenol.

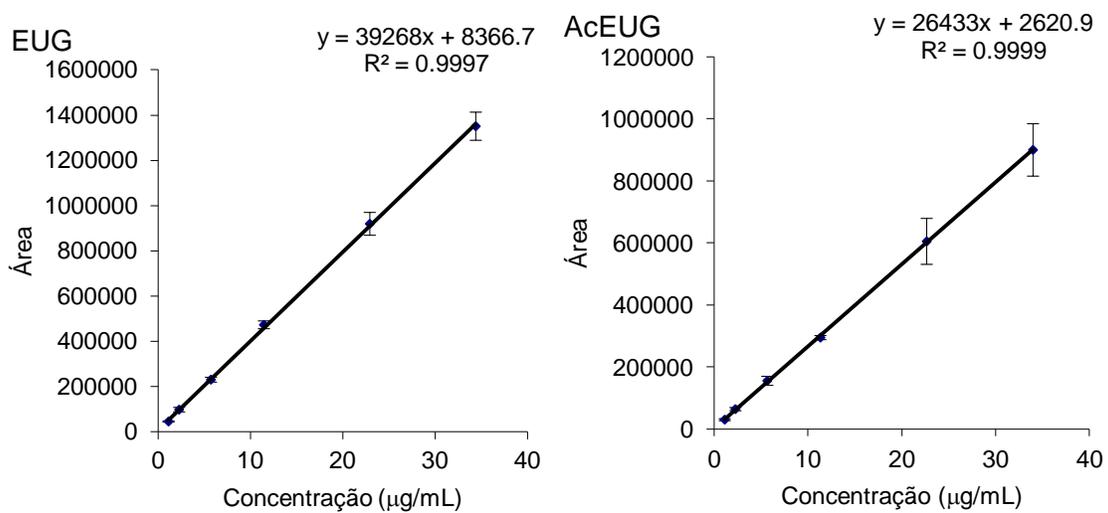


Figura A4. Média das curvas de calibração de (a) EUG e (b) AcEUG.

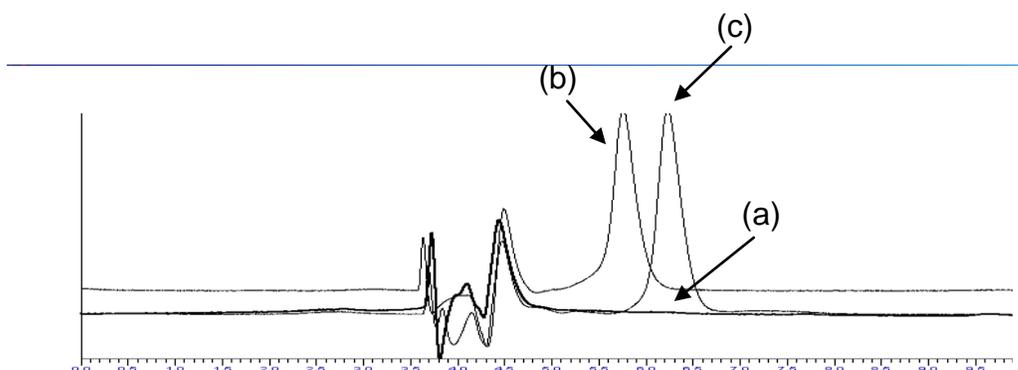


Figura A5. Cromatogramas obtidos para as formulações (a) NCL-Br, (b) NCL-EUG10% e (c) NCL-AcEUG10% após dissolução em ACN, filtração e análise por CLAE.

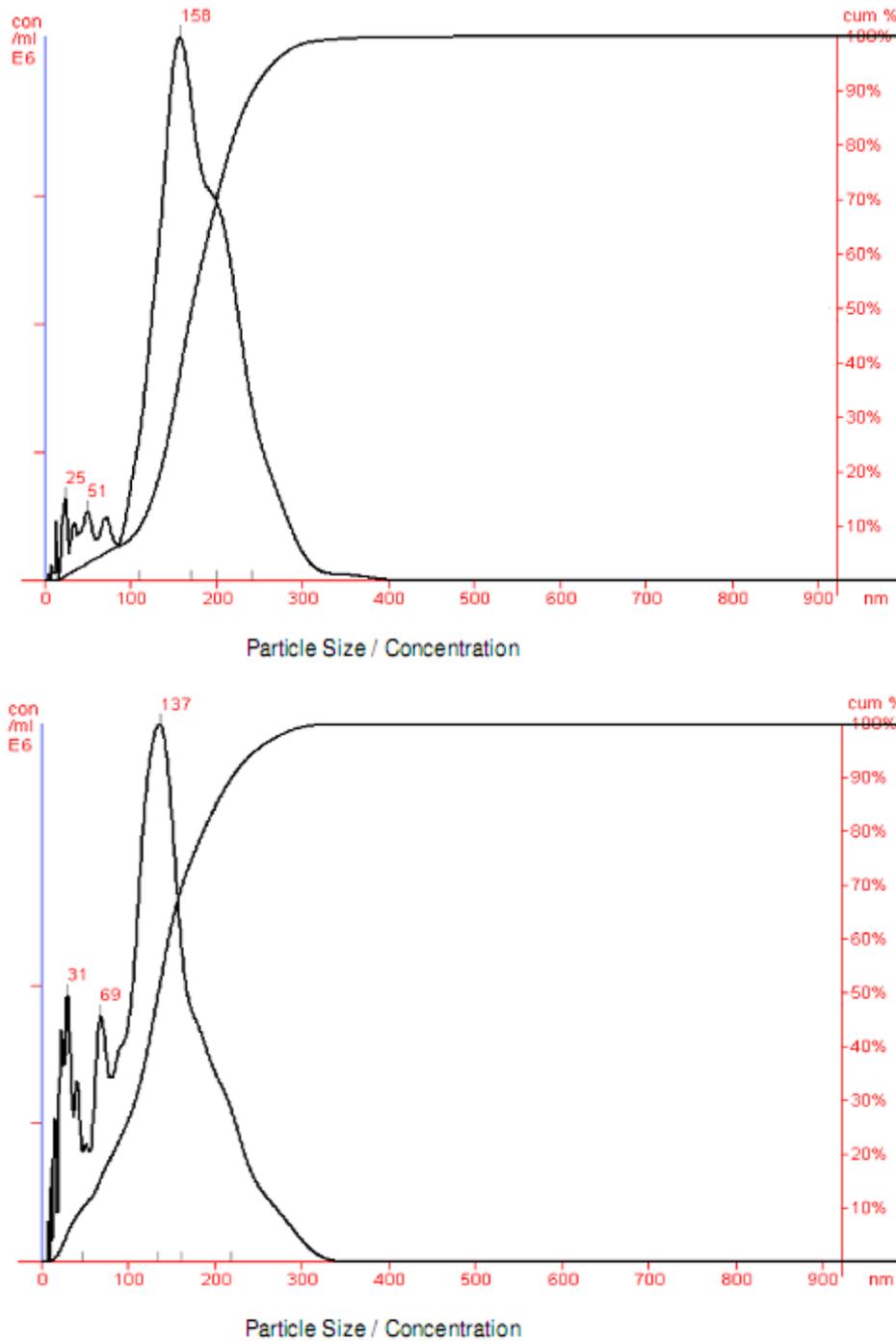


Figura A6. Curvas de distribuição de tamanho de partícula obtidas por análise de rastreamento de partículas para a formulação NCL-Br antes e após contanto com o meio de cultura celular (a) antes e (b) depois.

8. REFERÊNCIAS

ABDEL BAR, F. M.; KHANFAR, M. A.; ELNAGAR, A. Y.; BADRIA, F. A.; ZAGHLOUL, A. M.; AHMAD, K. F.; SYLVESTER, P. W.; EL SAYED, K. A. Design and pharmacophore modeling of biaryl methyl eugenol analogs as breast cancer invasion inhibitors. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, v. 18(2), p. 496-507, 2010.

ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L. K.; FAROKHZAD, O. C. factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, v. 5(4), p. 505–515, 2008.

ALLÉMANN, E.; LEROUX, J-C.; GURNY, R.; DOELKER, E. In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharmaceutical Research*, v. 10, p. 1732-1737, 1993.

ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 341, p. 215-220, 2007.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446–475, 2008.

BARRA, M.; COSA, J. J.; DE ROSSI, R. H. Erythromycin A as a supramolecular catalyst: effect on rhodamine B lactonization. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 55(23), p. 5850-5853, 1990.

BERNARDI, A. BRAGANHOL, E.; JÄGER, E.; FIGUEIRO, F.; EDELWEISS, M. I.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. O. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces *in vivo* glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Letters*, v. 281, p. 53-63, 2009a.

BERNARDI, A.; BAVARESCO, L.; WINK, M.R.; JACQUES-SILVA, M.C.; DELGADO-CAÑEDO, A.; LENZ, G.; BATTASTINI, A.M.O. Indomethacin stimulates activity and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell lines. *European Journal of Pharmacology*, v. 569(1-2), p. 8–15, 2007.

BERNARDI, A.; FROZZA, R. L.; HOPPE, J. B.; SALBEGO, C.; POHLMANN, A. R.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways. *International journal of nanomedicine*. v. 8, p. 711–28, 2013.

BERNARDI, A.; FROZZA, R. L.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, F.; BAVARESCO, L.; SALBEGO, C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. O. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded

nanocapsules against glioma cell lines: An *in vitro* study. *European Journal of Pharmacology*, v. 586, p. 24–34, 2008.

BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M.C.; DELGADO-CAÑEDO, A.; LENZ, G.; BATTASTINI, A.M.O. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of C6 and U138-MG glioma cell line. *European Journal of Pharmacology*, v. 532, p. 214–222, 2006.

BERNARDI, A.; ZILBERSTEIN, A.; JÄGER, E.; CAMPOS, M. M.; MORRONE, F. B.; CALIXTO, J.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. O. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. *British Journal of Pharmacology*, v. 158, p. 1104-1111, 2009b.

BEXIGA, C. G.; DREWES, C. C.; DE PAULA, V. F.; FIEL, L. A.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S. S.; FOCK, R. A.; FARSKY, S. H. P. Therapeutical effectiveness of acetyleugenol nanocapsules in an experimental model of melanoma *in vivo*. Resumo apresentado por Celina G. Bexiga no I Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas – 06 a 09 de Outubro de 2012. Hotel Armação – Porto de Galinhas – PE.

BHATTACHARJEE, S.; VAN OPSTAL, E. J.; ALINK, G. M.; MARCELIS, A. T. M.; ZUILHOF, H.; RIETJENS, I. M. C. M. Surface charge-specific interactions between polymer nanoparticles and ABC transporters in Caco-2 cells. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 15, p. 1695, 2013.

BRUM, T.; FIEL, L. A.; CONTRI, R. V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules have diverse skin penetration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology (Print)*, Artigo aceito, 2013.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94(3), p. 223-253, 2004.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions, as ocular drug carrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, p. 530-536, 1996.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J., 5a Ed. *Advanced Organic Chemistry: Structure and Mechanisms (Part A) (Advanced Organic Chemistry/Part A: Structure and Mechanisms)*. New York. (2000).

CARRASCO, H.; ESPINOZA, L. C.; CARDILE, V.; CARDILE, V.; GALLARDO, C.; CARDONA, W.; LOMBARDO, L.; CATALÁN, K. M.; CUELLAR, M. F.; RUSSO, A. Eugenol and its Synthetic Analogues Inhibit Cell Growth of Human Cancer Cells (Part I). *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, v. 19(3), p. 543-548, 2008.

- CATTANI, V. B.; FIEL, L. A.; JÄGER, A.; JÄGER, E.; COLOMÉ, L.M.; UCHOA, F.; STEFANI, V.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. *European journal of pharmaceutical sciences*, v. 39, p. 116–124, 2010.
- CHEN, H.; LANGER, R.; EDWARDS, D. A. A film tension theory of phagocytosis. *Journal of Colloid and Interface Science*. v. 190, p. 118–133, 1997.
- CHOI, M-J.; SOOTTITANTAWAT, A.; NUCHUCHUA, O.; MIN, S-G.; RUKTANONCHAI, U. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion–diffusion method. *Food Research International*, v. 42(1), p. 148–156, 2009.
- CONTI, A.; GULI, C.; LA TORRE, D.; TOMASELLO, C.; ANGILERI, F. F.; AGUENNOUZ, M. H. Role of Inflammation and Oxidative Stress Mediators in Gliomas. *Cancers*, v. 2, p. 693-712, 2010.
- CONTRI, R. V.; KAISER, M.; POLETTO, F.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Simultaneous control of capsaicinoids release from polymeric nanocapsules. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 11, p. 2398–2406, 2011.
- COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER C. Nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. v. 19(2), p. 99-134, 2002.
- CRUZ, L.; SOARES, L. U.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; DA SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 313, p. 198-205, 2006b.
- CRUZ, L.; SCHAFFAZICK, S. R.; DALLA COSTA, T.; SOARES, L. U.; MEZZALIRA, G.; DA SILVEIRA, N. P.; SCHAPOVAL, E. E.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Physico-chemical characterization and *in vivo* evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, interfacial alkaline hydrolysis and antiedematogenic activity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 6(9-10), p. 3154-3162, 2006a.
- DANIEL, A. N.; SARTORETTO, S. M.; SCHMIDT, G.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. N. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19(1B), p. 212-217, 2009.
- DANQUAH, M. K.; ZHANG, X. A.; MAHATO, R. I. Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature. *Advanced drug delivery reviews*, v. 63(8), p. 623-639, 2011.

DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release*, v. 158(1): 15-33, 2012.

DAVIS, M. E.; CHEN, Z. G.; SHIN, D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 7(9), p. 771-782, 2008.

DESAI, A.; VYAS, T.; AMIJI, M. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97(7), p. 2745-2756, 2008.

DREWES, C.C.; FIEL, L.A.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; FARSKY, S.H.P. Mechanisms of toxicity of acetyeugenol nanocapsules in melanoma cells. Resumo apresentado por Carine C. Drewes no I Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas – 06 a 09 de Outubro de 2012. Hotel Armação – Porto de Galinhas – PE.

ERNI, C.; SUARD, C.; FREITAS, S.; DREHER, D.; MERKLE, H. P.; WALTER, E. Evaluation of cationic solid lipid microparticles as synthetic carriers for the targeted delivery of macromolecules to phagocytic antigen-presenting cells. *Biomaterials*, v. 23, p. 4667–4676, 2002.

FERRONATO, K.; BRUXEL, F.; ARAÚJO, F. A.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Emprego do Método da Bolsa de Diálise na Avaliação da Liberação de Fármacos a Partir de Emulsões Submicrométricas. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 29(2), p. 313-320, 2010.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, p. r1-r4, 1989.

FIEL, L. A.; ADORNE, M. D.; GUTERRES, S. S.; NETZ, P. A.; POHLMANN, A. R... Variable temperature multiple light scattering analysis to determine the enthalpic term of a reversible agglomeration in submicrometric colloidal formulations: A quick quantitative comparison of the relative physical stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 431, p. 93–104, 2013a.

FIEL, L. A.; PAESE, K.; RIZZI, M.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. A strategy to estimate the intrinsic flux of a poorly-water soluble substance for comparison with its release from lipid-core nanocapsules. *Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects* (Print), Artigo aceito, 2013b.

FIEL, L. A.; REBÊLO, L. M.; SANTIAGO, T. M.; ADORNE, M. D.; GUTERRES, S. S.; DE SOUSA, J. S. POHLMANN, A.R. Diverse deformation properties of

polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules. *Soft Matter*, v. 7, 7240-7247, 2011.

FIGUEIRO, F.; BERNARDI, A.; FROZZA, R. L.; JANDREY, E.; TERROSO, T. F.; SALBEGO, C.; EDELWEISS, M. I.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M.O. Resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules treatment reduces *in vitro* and *in vivo* glioma growth. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 9, p. 516-526, 2013.

FLORENCE, A. T. "Targeting" nanoparticles: The constraints of physical laws and physical barriers. *Journal of Controlled Release*, v. 164, p. 115-124, 2012.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 5, p. 1–10, 2009

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: effect on the physicochemical characteristics, drug release, and photostability. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10(5), p. 3091-9, 2010.

FRENCH, S. A.; TERRITO, P. R.; BALABAN, R. S. Correction for inner filter effects in turbid samples: fluorescence assays of mitochondrial NADH. *The American journal of physiology*, v. 275(3 Pt 1), p. C900–9, 1998.

FROZZA, R. L.; BERNARDI, A.; PAESE, K.; HOPPE, J. B.; DA SILVA, T.; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; SALBEGO, C. characterization of *trans*-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 6(6), p. 694–703, 2010.

FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; KADOMA, Y.; SAKAGAMI, H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology*, v. 177(1), p. 39-54, 2002.

GAO, H.; QIAN, J.; CAO, S.; YANG, Z.; PANG, Z.; PAN, S.; FAN, L.; XI, Z.; JIANG, X.; ZHANG, Q. Precise glioma targeting of and penetration by aptamer and peptide dual-functioned nanoparticles. *Biomaterials*, v. 33(20), p. 5115-5123, 2012.

GHOSH, R.; NADIMINTY, N.; FITZPATRICK, J. E.; ALWORTH, W. L.; SLAGA, T. J.; KUMAR, A. P. Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry*, v. 280(7), p. 5812-5820, 2005.

GOMES, C.; MOREIRA, R. G.; CASTELL-PEREZ, E. Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped trans-Cinnamaldehyde and Eugenol for Antimicrobial Delivery Applications. *Journal of Food Science*, v. 76(2), p. N16-N24, 2011.

GUENOUN, J.; KONING, G. A.; DOESWIJK, G.; BOSMAN, L.; WIELOPOLSKI, P. A.; KRESTIN, G. P.; BERNSEN, M. R. Cationic Gd-DTPA liposomes for highly efficient labeling of mesenchymal stem cells and cell tracking with MRI. *Cell Transplant.* v. 21(1), p.191-205, 2012.

GUMBLETON, M.; STEPHENS, D. J. Coming out of the dark: the evolving role of fluorescence imaging in drug delivery research. *Advanced drug delivery reviews*, v. 57(1), p. 5-15, 2005.

HE, C.; HU, Y.; YIN, L.; TANG, C.; YIN, C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, v. 31, p. 3657–3666, 2010.

HELTUNEN, K.; PRUS, P.; LUOSTARINEN, M.; NISSINEN, M. Interaction of aminomethylated resorcinarenes with rhodamine B. *New Journal of Chemistry*, v. 33(5), p. 1148-1154, 2009.

HINCKLEY, D. A.; SEYBOLD, P. G. A spectroscopic/thermodynamic study of the rhodamine B lactone \rightleftharpoons zwitterion equilibrium. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, v. 44(10), p. 1053-1059, 1988.

HINCKLEY, D. A.; SEYBOLD, P. G.; BORRIS, D. P. Solvatochromism and thermochromism of rhodamine solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, v. 42(6), p. 747-754, 1986.

HOFFMEISTER, C. R. D.; DURLI, T. L.; SCHAFFAZICK, S. R.; RAFFIN, R. P.; BENDER, E. A.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. *Nanoscale research letters*, v. 7(1), p. 251, 2012.

HOLBACK, H. E.; YEO, Y. Intratumoral Drug Delivery with Nanoparticulate Carriers. *Pharmaceutical Research*, v. 28(8), p. 1819-1830, 2011.

HUSS, U.; RINGBOM, T.; PERERA, P.; BOHLIN, L.; VASÄNGE, M. Screening of ubiquitous plant constituents for COX-2 inhibition with a scintillation proximity based assay. *Journal of Natural Products*, v. 65(11), p. 1517-1521, 2002.

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE - GUIDELINE FOR GOOD CLINICAL PRACTICE - E6(R1). Current Step 4 version. 10 de Junho de 1996.

- JÄGER, A.; STEFANI, V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 338(1–2), p. 297-305, 2007.
- JÄGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETTO, F. S.; COLOME, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Sustained Release from Lipid-Core Nanocapsules by Varying the Core Viscosity and the Particle Surface Area. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 5, p. 130–140, 2009.
- JANG, M-K.; JEONG, Y-I.; NAH J-W. Characterization and preparation of core-shell type nanoparticle for encapsulation of anticancer drug. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces.*, v. 81, p. 530-536, 2010.
- JANGA, K. Y.; JUKANTI, R.; VELPULA, A.; SUNKAVALLI, S.; BANDARI, S.; KANDADI, P.; VEERAREDDY, P. R. Bioavailability enhancement of zaleplon via proliposomes: Role of surface charge. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 80, p. 347–357, 2012.
- JORNADA, D. S.; FIEL, L.A.; BUENO, K.; GERENT, J. F.;PETZHOLD, C. L.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A.R. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. *Soft Matter*, v. 8(24), p. 6646-6655, 2012.
- KHANBEIGI, R.A.; KUMAR, A.; SADOUKI, F.; LORENZ, C.; FORBES, B.; DAILEY, L. A.; COLLINS, H. The delivered dose: Applying particokinetics to *in vitro* investigations of nanoparticle internalization by macrophages. *Journal of Controlled Release*, v. 162, p. 259–266, 2012.
- KIM, S. Y., LEE, Y. M., BAIK, D. J., AND KANG, J. S. Toxic characteristics of methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) nanospheres; *in vitro* and *in vivo* studies in the normal mice. *Biomaterials*, v. 24, p. 55–63, 2003.
- KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine*, v. 1(3), p. 193-212, 2005.
- KRIEGEL, C.; KIT, K. M.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Nanofibers as Carrier Systems for Antimicrobial Microemulsions. II. Release Characteristics and Antimicrobial Activity. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 118, p. 2859–2868, 2010.
- KULKARNI, S. A.; FENG, S-S. Effects of Particle Size and Surface Modification on Cellular Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*, v. 30, p. 2512–2522, 2013.

- LEO, E.; CAMERONI, R.; FORNI, F. Dynamic dialysis for the drug release evaluation from doxorubicin-gelatin nanoparticle conjugates. *International journal of pharmaceutics*, v. 180(1), p. 23–30, 1999.
- LERCH, S.; DASS, M.; MUSYANOVYCH, A.; LANDFESTER, K.; MAILÄNDER, V. Polymeric nanoparticles of different sizes overcome the cell membrane Barrier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 84, p. (2013) 265–274, 2013.
- LI, W.; LI, J.; GAO, J.; LI, B.; XIA, Y.; MENG, Y.; YU, Y.; CHEN, H.; DAÍ, J.; WANG, H.; GUO, Y. The fine-tuning of thermosensitive and degradable polymer micelles for enhancing intracellular uptake and drug release in tumors. *Biomaterials*, v. 32(15), p. 3832-3844, 2011.
- LI, Y-H.; SUN, Z-H.; ZHENG, P. Determination of Vanillin, Eugenol and Isoeugenol by RP-HPLC. *Chromatographia*, v. 60(11/12), p. 709-713, 2004.
- LING, Y.; WEI, K.; ZOU, F.; ZHONG, S. Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 430(1–2), p. 266-275, 2012.
- LIU, J-F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cancer with an especial focus on esophageal cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, v. 12, p. 3159-3168, 2011.
- LOPES, E.; POHLMANN, A. R.; BASSANI, V.; GUTERRES, S. S. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. *Pharmazie*, v. 55, p. 527-530, 2000.
- LUTSIK, M. E. C.; ROBINSON, D. R.; COESTER, C.; KWON, G. S.; SAMUEL, J. Analysis of Poly(D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanosphere Uptake by Human Dendritic Cells and Macrophages *In Vitro*. *Pharmaceutical Research*, v. 19(10), p. 1480-1487, 2002.
- MAHAPATRO, A.; SINGH, D. K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 9, p. 55-66, 2011.
- MARTINS, S.; COSTA-LIMA, S.; CARNEIRO, T.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; SOUTO, E. B.; FERREIRA, D. C. Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *International journal of pharmaceutics*, v. 430(1-2), p. 216–27, 2012.
- MICHALOWSKI, C. B.; GUTERRES, S. S.; DALLA COSTA, T. Microdialysis for evaluating the entrapment and release of a lipophilic drug from nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 35(5), p. 1093-100, 2004.

- MO, L.; HOU, L.; GUO, D.; XIAO, X.; MAO, P.; YANG, X. Preparation and characterization of teniposide PLGA nanoparticles and their uptake in human glioblastoma U87MG cells. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 436(1–2), p. 815-824, 2012.
- MONTEILLER, C.; TRAN, L.; MACNEE, W.; FAUX, S.; JONES, A.; MILLER, B.; DONALDSON, K. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells *in vitro*: The role of surface area. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. v. 64, p. 609–615, 2007.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A.. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, v. 385(1-2), p. 113–42, 2010.
- MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods: critical comparison. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 163(2), p. 90–122, 2011.
- MOSQUEIRA, V. C.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 89(5), p. 614-626, 2000.
- MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DE LUCCA FREITAS, L.; PESCE DA SILVEIRA, N.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S. S.. "Spray-dried diclofenac poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization." *Die Pharmazie (Berlin)*, v. 56 (11), p. 864-867, 2001.
- MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. v. 58(2), p. 343–56, 2004.
- NANJI, A.A.; ZAKIM, D.; RAHEMTULLA, A.; DALY, T.; MIAO, L.; ZHAO, S.; KHWAJA, S.; TAHAN, S.R.; DANNENBERG, A.J. Dietary saturated fatty acids downregulate cyclooxygenase-2 and tumor necrosis faktor α and reverse fibrosis in alcoholic liver disease in rat. *Hepatology*, v. 26, p. 1538-1545, 1997.
- NANJI, A.A.; JOKELAINEN, K.; TIPOE, G. L.; RAHEMTULLA, A.; DANNENBERG, A.J. Dietary fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 299(2), p. 638-644, 2001.

NEL, A. E.; MÄDLER, L.; VELEGOL, D.; XIA, T.; HOEK, E. M. V.; SOMASUNDARAN, P.; KLAESSIG, F.; CASTRANOVA, V.; THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials*, v. 8(7), p. 543–57, 2009.

OLIVEIRA, C. P.; VENTURINI, C. G.; DONIDA, B.; POLETTO, F. S.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. *Soft Matter*, v. 9(4), p. 1141-1150, 2013.

ORLANDINI, L. F.; RODEMBUSCH, F. S.; DE LUCA, M. A.; JACOBI, M. M.; STEFANI, V. New fluorescent elastomeric materials based on synthetic and natural epoxidized rubbers. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 109, 282-287, 2008.

OURIQUE, A. F.; AZOUBEL, S.; FERREIRA, C. V.; SILVA, C. B.; MARCHIORI, M.C.L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Lipid-Core Nanocapsules as a Nanomedicine for Parenteral Administration of Tretinoin: Development and *In Vitro* Antitumor Activity on Human Myeloid Leukaemia Cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 6(3), p. 214-223, 2010.

PAESE, K.; JÄGER, A.; POLETTO, F. S.; PINTO, E. F.; ROSSI-BERGMANN, B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid formulation containing a nanoencapsulated sunscreen: effectiveness, *in vitro* photostability and immune response. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 5(3), p. 240-246, 2009.

PANYAM, J. e LABHASETWAR, V. "Dynamics of Endocytosis and Exocytosis of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Nanoparticles in Vascular Smooth Muscle Cells." *Pharmaceutical Research*, v. 20(2), p. 212-220, 2003.

PEPPAS N. A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. v. 60, p. 110-111, 1985.

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll." *Journal of biochemical and biophysical methods*, v. 44(1-2), p. 1–30, 2000.

PETERSEN, S.; STEINIGER, F.; FISCHER, D.; FAHR, A.; BUNJES, H. The physical state of lipid nanoparticles influences their effect on *in vitro* cell viability. / *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 79, p. 150–161, 2011.

POHLMANN, A. R.; SOARES, L. U.; CRUZ, L.; SILVEIRA, N.P.; GUTERRES, S. S. Alkaline hydrolysis as a tool to determine the association form of indomethacin in nanocapsules prepared with poly(epsilon-caprolactone). *Current Drug Delivery*, v. 1, n. 2, p. 103-110, 2004.

POHLMANN, A. R.; CRUZ, L.; MEZZALIRA, G.; SOARES, L. U.; PESCE DA SILVEIRA, N.; GUTERRES, S. S. Structural model of polymeric nanospheres containing indomethacin ethyl ester and *in vivo* antiedematogenic activity. *International Journal of Nanotechnology*, v. 4, p. 454-467, 2007.

POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; VENTURINI, C. G.; CRUZ, L.; BERNARDI, A.; JÄGER, E.; BATTASTINI, A.M.; DA SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A relation between light scattering and drug content. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 359(1-2), p. 288-293, 2008.

POLETTI, F. S.; FIEL, L. A.; LOPES, M. V.; SCHAAB, G.; GOMES, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; ROSSI-BERGMANN, B.; POHLMANN, A. R. Fluorescent-Labeled Poly(epsilon-caprolactone) Lipid-Core Nanocapsules: Synthesis, Physicochemical Properties and Macrophage Uptake. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, v. 1, p. 89-98, 2012.

POLETTI, F. S.; JÄGER, E.; CRUZ, L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. *Materials Science and Engineering C*, v. 28, p. 472-478, 2008.

POLETTI, F. S.; OLIVEIRA, C. P.; WENDER, H.; REGENT, D.; TEIXEIRA, S. R.; GUTERRES, S. S.; ROSSI-BERGMANN, B.; POHLMANN, A. R. How sorbitan monostearate can increase drug-loading capacity of lipid-core polymeric nanocapsules. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology (Print)*. Artigo aceito, 2013.

RASHEED, A.; LAEKEMAN, G.; TOTTE, J.; VLIETINCK, A. J.; HERMAN, A. G. Eugenol and prostaglandin biosynthesis. *The New England Journal of Medicine*, v. 310(1), p. 50-51, 1984.

REIMOLD, I.; DOMKE, D.; BENDER, J.; SEYFRIED, C. A.; RADUNZ, H. E.; FRICKER, G. Delivery of nanoparticles to the brain detected by fluorescence microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 70(2), p. 627-632, 2008.

ROSENTHAL, I.; PERETZ, P.; MUSZKAT, K. A. Thermochromic and hyperchromic effects in Rhodamine B solutions. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 83(3), p. 350-353, 1979.

RÜEGG, C.; ZARIC, J.; STUPP, R. Non steroidal anti-inflammatory drugs and COX-2 inhibitors as anti-cancer therapeutics: hypes, hopes and reality. *Annals of Medicine*, v. 35(7), p 476-487, 2003.

SAGER, T. M.; PORTER, D. W.; ROBINSON, V. A.; LINDSLEY, W. G.; SCHWEGLER-BERRY, D. E.; CASTRANOVA, V. Improved method to disperse

nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* investigation of toxicity. *Nanotoxicology*, v. 1, p. 118–129, 2007.

SAHAY G.; ALAKHOVA, D. Y.; KABANOV, A. V. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release*, v. 145(3), p. 182–95, 2010.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S. S. Development of Nanocapsule Suspensions and Nanocapsule Spray-Dried Powders Containing Melatonin. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, v. 17(3), p. 562–569, 2006.

SLAMENOVÁ, D.; HORVÁTHOVÁ, E.; WSÓLOVÁ, L.; SRAMKOVÁ, M.; NAVAROVÁ, J. Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. *Mutation Research*, v. 677, p. 46–52, 2009.

SOMASUNDARAN, P.; MEHTA, S. C.; YU, X.; KRISHNAKUMAR, S. Colloid systems and interfaces stability of dispersions through polymer and surfactant adsorption, *Handbook of Surface and Colloid Chemistry*. K. S. Birdi, CRC Press, p. 155-194, 2008.

SUH, H.; JEONG, B.; LIU, F.; KIM, S. W. Cellular Uptake Study of Biodegradable Nanoparticles in Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharmaceutical Research*, v. 15(9), p. 1495-1498, 1998.

TEEGUARDEN, J. G.; HINDERLITER, P. M.; ORR, G.; THRALL, B. D.; POUNDS, J. G. Particokinetics *in vitro*: dosimetry considerations for *in vitro* nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological Sciences*, v. 95(2), p. 300–12, 2007.

THE MERCK INDEX- An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., O'Neil, M.J. (ed.). 2006, p. 1530.

THUN, M. J.; HENLEY, S. J.; PATRONO, C. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Anticancer. *The Journal of the National Cancer Institute*, v. 94(4), p. 252-66, 2002.

VANDERHOFF, J. W. Em: Theory of colloids. *Pharmaceutical dosage forms: disperse systems*. H. A. R. Lieberman, M. M.; Banke, G. S.. New York, Marcel Dekker. v. 1, p. 91-142, 1996.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; DE OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A.M.O.; POHLMANN, A. R. Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 375, p. 200–208, 2011.

- VERMA, A.; STELLACCI, F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*, v. 6(1), p. 12–21, 2010.
- WANG, A. Z.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O.C. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. *Annual Review of Medicine*, v. 63, p. 185-198. 2012.
- WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 58(1), p. 1–12, 1990.
- WATSON, P.; JONES, A. T.; STEPHENS, D. J. Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57(1), p. 43-61, 2005.
- WENZEL, U.; NICKEL, A.; DANIEL, H. Alpha-Lipoic acid induces apoptosis in human colon cancer cells by increasing mitochondrial respiration with a concomitant O₂-*⁻generation. *Apoptosis*, v. 10(2), p. 359-368, 2005.
- YORDANOV, G.; SKROBANSKA, R.; EVANGELATOV, A. Entrapment of epirubicin in poly(butyl cyanoacrylate) colloidal nanospheres by nanoprecipitation: formulation development and *in vitro* studies on cancer cell lines. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 92, p. 98-105, 2012.
- ZHANG, C. LIU, M-S HAN, B. XING, X-H. Correcting for the inner filter effect in measurements of fluorescent proteins in high-cell-density cultures. *Analytical Biochemistry*. v. 390, p. 197–202, 2009.
- ZHANG, C.; LIU, M-S.; HAN, B.; XING, X-H. Correcting for the inner filter effect in measurements of fluorescent proteins in high-cell-density cultures. *Analytical biochemistry*, v. 390(2), p. 197–202, 2009.
- ZHANG, Q.; LIAO, G.; WEI, D.; NAGAI, T. Increase in gentamicin uptake by cultured mouse peritoneal macrophages and rat hepatocytes by its binding to polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 164, p. 21–27, 1998.
- ZHOU, D-H.; ZHANG, J.; ZHANG, G.; GAN, Z-H. Effect of surface charge of polymeric micelles on *in vitro* cellular uptake. *Chinese Journal of Polymer Science*, v. 31(9), p. 1299–1309, 2013.