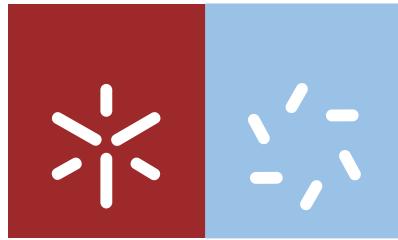


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Natália Sofia Brandão Vilaça

**Encapsulamento de fármacos em zeólitos
para utilização no tratamento do carcinoma
do colorretal**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Natália Sofia Brandão Vilaça

**Encapsulamento de fármacos em zeólitos
para utilização no tratamento do carcinoma
do colorretal**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação do
Professor Doutor António Maurício Fonseca
e da
Professora Doutora Fátima Baltazar

Maio de 2012

DECLARAÇÃO

Nome: Natália Sofia Brandão Vilaça

Endereço eletrónico: pg17907@alunos.uminho.pt

Título da tese de mestrado: Encapsulamento de fármacos em zeólitos para utilização no tratamento do carcinoma do colorretal

Orientador(es): Professor Doutor António Maurício Fonseca e Professora Doutora Fátima Baltazar

Ano de conclusão: 2012

Designação do Mestrado: Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Após o término deste projeto fica a necessidade de prestar o meu profundo agradecimento a todas as pessoas sem as quais não teria sido possível a concretização do mesmo.

Aos meus orientadores, Professor Doutor António Maurício Fonseca e Professora Doutora Fátima Baltazar, bem como à Professora Doutora Isabel Correia Neves, agradeço por terem acreditado em mim e por me terem dado a oportunidade de realizar este trabalho. Quero ainda agradecer por todo o empenho, disponibilidade, apoio, conhecimentos, simpatia e otimismo que me prestaram e transmitiram ao longo de todo o trabalho.

Ao Professor Doutor Pier Parpot pela sua disponibilidade, conhecimentos partilhados e prontidão para ajudar, especialmente nos estudos de libertação de fármaco.

Ao Ricardo Amorim, do Instituto de Ciências da Vida e Saúde, por toda a disponibilidade, conhecimentos partilhados, boa disposição e paciência ao longo dos ensaios de viabilidade celular.

À Mara Pinto e à Marta Ferreira, do Departamento de Química, pela disponibilidade, ajuda e boa disposição que me transmitiram e prestaram ao longo dos estudos de libertação de fármaco.

Ao Centro de Química/Departamento de Química e ao Instituto de Ciências da Vida e Saúde agradeço pelo espaço e por me terem facultado os materiais necessários à realização do trabalho.

Àqueles com quem tive o prazer de trabalhar no Departamento de Química e na Escola de Ciências da Saúde, pela ajuda prestada.

Aos meus amigos, que se mostraram sempre disponíveis para ajudar, por terem acreditado sempre em mim, por me incentivarem e pelos bons momentos proporcionados!

À minha família por estar sempre presente quer nos bons quer nos maus momentos, pelo apoio, incentivo e carinho que sempre me transmitiram e prestaram ao longo de todo o meu percurso académico!

A todos, um grande e sincero obrigado!

Resumo

Desde a antiguidade que o Homem tem desenvolvido estratégias terapêuticas que têm sido aperfeiçoadas ao longo do tempo.

A maioria das formulações terapêuticas apresenta uma ação rápida, de curta duração, atingindo um pico seguindo-se a diminuição rápida da sua ação. Tal levou à necessidade de se criarem formulações que permitam uma ação mais prolongada no tempo. Algumas destas novas formulações incluem os chamados sistemas *drug delivery* (DDSs), que podem ser direcionados para locais específicos do corpo. Estes sistemas, devido à sua capacidade de libertar os fármacos em locais específicos do corpo, apresentam inúmeras vantagens, como por exemplo, diminuição da toxicidade e maior tempo de permanência em circulação.

São diversos os materiais que, durante as últimas décadas, têm sido estudados para a criação de DDSs. Estes sistemas têm sido sujeitos a diferentes abordagens de forma a aumentar o benefício terapêutico do fármaco minimizando os seus efeitos colaterais e ainda de forma a melhorar as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

Neste trabalho foram preparados DDSs baseados em três zeólitos, NaY, NanoNa-Y e KLTL, através do método de adsorção do fármaco em fase líquida. O fármaco utilizado para o encapsulamento foi o 5-fluoro-1H,3H-pirimidina-2,4-diona, que é um fármaco muito utilizado no tratamento de câncros sólidos, como o cancro colorretal.

Os sistemas obtidos foram caracterizados para avaliar o efeito do encapsulamento do fármaco na estrutura dos zeólitos e para averiguar a presença do fármaco nos zeólitos. Os resultados obtidos mostram que o fármaco foi encapsulado com sucesso na estrutura zeolítica e que o mesmo não provoca alterações estruturais no zeólito.

Posteriormente foram realizados estudos de libertação de fármaco a partir dos sistemas *drug delivery* preparados utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. Os sistemas foram sujeitos a duas condições experimentais, repouso e agitação. A agitação proporciona a libertação de maior quantidade de fármaco dos sistemas para a meio onde se encontram.

Por fim, avaliou-se a eficácia dos sistemas *drug delivery* em duas linhas celulares do carcinoma colorretal, HCT-15 e RKO. O sistema que permitiu a obtenção de melhores resultados em ambas as linhas celulares foi o sistema preparado com o zeólito NaY. Verificou-se também que estes sistemas, para além de permitirem uma diminuição da viabilidade celular, permitem ainda uma potenciação do efeito do fármaco. Através de microscopia ótica e de microscopia de fluorescência, verificou-se que os zeólitos conseguem internalizar-se nas células.

Abstract

Since ancient times, man has developed therapeutic strategies that have been improved over time.

Most therapeutic formulations have quick action, with short duration, reaching a peak followed by rapid decrease in its action. This led to the need to create formulations that allow a more prolonged action in time. Some of these new formulations include the so-called drug delivery systems (DDSs), which maybe targeted to a specific site in the body. These systems, due to their ability to release drugs at specific locations of the body have numerous advantages, for example, reduced toxicity and increased time in circulation.

In last decades, several materials have been studied for the creation of DDSs. These systems have been subject to different approaches to increase the therapeutic benefit of the drug while minimizing the side effects and even to improve their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties.

In this work DDSs were prepared based on three zeolites, NaY, NanoNa-Y and KLTL, by the method of adsorption of the drug in liquid phase. The drug used for the encapsulation was the 5-Fluoro-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidinedione, that is a drug widely used in the treatment of solid tumors, such as colorectal cancer.

The systems were characterized to evaluate the effect of encapsulation of the drug in the zeolite structure and to determine the presence of the drug in the zeolites. The results show that the drug was successfully encapsulated in the zeolite structure and it did not cause structural changes in the zeolite.

After that, drug release studies were performed with the DDSs prepared using the technique of high performance liquid chromatography. Systems were subjected to two experimental conditions, rest and stirring. Stirring provided release of larger amounts of drug from the systems to the environment where they were.

Finally, the efficacy of the DDSs was evaluated in two colorectal carcinoma cell lines, HCT-15 and RKO. The drug delivery system that allowed to obtain the best results in both cell lines was the system prepared with zeolite NaY. It was also found that these systems in addition to reducing cell viability, still allowed important potentiation of the drug. By light microscopy and fluorescence microscopy, there was evidence that zeolites were internalized by the cells.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo.....	v
Abstract	vii
Lista de abreviaturas	xiii
Índice de figuras	xv
Índice de Tabelas.....	xix
Capítulo 1 - Introdução.....	1
1.1. Introdução	3
1.2. Estrutura da tese	5
Capítulo 2 - Estado da arte.....	7
2.1. Sistemas <i>drug delivery</i>	9
2.2. Materiais utilizados como DDSs.....	11
2.2.1. Materiais poliméricos.....	11
2.2.2. Materiais porosos.....	12
2.2.3. Zeólitos	13
2.2.3.1. Estrutura FAU	15
2.2.3.2. Estrutura LTL	16
2.4. Métodos de preparação de sistemas <i>drug delivery</i>	18
2.4.1. Sistemas poliméricos.....	18
2.4.2. Materiais porosos.....	19
2.5. O cancro	20
2.5.1. O carcinoma colorretal.....	22
2.6. Fármacos	25
2.6.1. 5-fluoro-1H,3H-pirimidina-2,4-diona	25
2.6.2. Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico	29

Capítulo 3 - Procedimento experimental.....	31
3.1. Estudos preliminares para a escolha do suporte dos DDSs	33
3.2. Materiais de suporte, fármacos e solventes utilizados.....	34
3.2.1. Materiais de suporte	34
3.2.2. Fármacos	35
3.2.3. Solventes	35
3.3. Preparação dos DDSs baseados em zeólitos	36
3.3.1. Preparação dos DDSs	36
3.3.2. Marcação do zeólito NaY com rodamina B	37
3.4. Estudos de libertação de fármaco.....	38
3.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	38
3.4.1.1. Princípios gerais da técnica	38
3.4.1.2. Libertação do 5-FU	39
3.5. Técnicas de caracterização.....	39
3.5.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR)	40
3.5.1.1. Princípios gerais da técnica	40
3.5.1.2. Condições experimentais da análise dos DDSs	42
3.5.2. Espectroscopia de absorção ultravioleta-visível (UV/Vis)	42
3.5.2.1. Princípios gerais da técnica	42
3.5.2.2. Condições experimentais da análise dos DDSs	43
3.5.3. Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)	43
3.5.3.1. Princípios gerais da técnica	43
3.5.3.2. Condições experimentais da análise dos DDSs	46
3.5.4 Análise química elementar.....	46
3.5.4.1. Condições experimentais da análise dos DDSs	46
3.5.5 Análises Térmicas	46
3.5.5.1. Termogravimetria	47
3.5.6. Dispersão de raio-X de baixo ângulo (SAXS)	49

3.5.6.1. Princípios gerais da técnica	49
3.5.6.2. Condições experimentais da análise dos DDSs	51
3.5.7 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de estado sólido (RMN de estado sólido)	52
3.5.7.1. Princípios gerais da técnica	52
3.5.7.2. Condições experimentais da análise dos DDSs	53
3.6. Testes de viabilidade celular	54
3.6.1. Culturas celulares	55
3.6.2. Aplicação dos DDSs nas linhas celulares	55
3.6.3 Ensaio de viabilidade celular	55
3.6.3.1. Ensaio baseado em sulforodamina B	56
3.6.3.2. Ensaio MTS	56
3.6.4. Ensaio de microscopia	57
3.6.4.1. Microscopia ótica com azul de tripano	57
3.6.4.2. Microscopia de fluorescência.....	58
Capítulo 4 - Resultados e discussão.....	59
4.1. Estudos preliminares para a escolha do suporte do DDSs.....	61
4.2. Preparação dos DDSs	64
4.2.1. Escolha do solvente.....	64
4.2.2. Coloração dos DDSs.....	68
4.3. Caracterização das amostras.....	69
4.3.1. Análise química elementar.....	69
4.3.2. Análise por UV/Vis.....	70
4.3.3. Análise por FTIR.....	72
4.3.4. Análise por SEM	76
4.3.5. Análise por termogravimetria	81
4.3.6. Análise por SAXS.....	84

4.3.7. Análise por RMN de estado sólido	84
4.4. Estudos de liberação do 5-FU	86
4.4.1. Liberação a partir do 5-FU@Na-Y sem agitação	87
4.4.2. Liberação a partir do 5-FU@LTL sem agitação	88
4.4.3. Liberação a partir do 5-FU@NanoNa-Y sem agitação	88
4.4.4. Liberação do 5-FU@LTL com agitação	89
4.4.5. Liberação do 5-FU@Na-Y e do NanoNa-Y com agitação	90
4.5. Testes de viabilidade celular	92
4.5.1. Concentrações de 5-FU nos DDSs	92
4.5.2. Efeito do sistema 5-FU@NaY na linha celular HCT-15	93
4.5.3. Efeito do sistema 5-FU@LTL na linha celular HCT-15	94
4.5.4. Efeito do sistema 5-FU@NanoNa-Y na linha celular HCT-15	95
4.5.5. Efeito do sistema 5-FU@NaY na linha celular RKO	96
4.5.6. Efeito do sistema 5-FU@LTL na linha celular RKO	98
4.5.7. Efeito do sistema 5-FU@NanoNa-Y na linha celular RKO	99
4.5.8. Ensaios de microscopia	100
4.5.8.1. Microscopia ótica com azul de tripano	100
4.5.8.2. Microscopia de fluorescência.....	103
Capítulo 5 - Considerações finais.....	107
Capítulo 6 - Perspetivas futuras.....	113
Capítulo 7 - Referências bibliográficas.....	117

Lista de abreviaturas

5-FdUDP: 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-difosfato

5-FdUMP: 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato

5-FdUTP: 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato

5-FU: 5-fluoro-1H,3H-pirimidina-2,4-diona (5-fluorouracilo)

5-FUDP: 5-fluorouridina-5'-difosfato

5-FUH₂: 5,6-dihidro-5-fluorouracilo

5-FUMP: 5-fluorouridina-5'-monofosfato

5-FUTP: 5-fluorouridina-5'-trifosfato

ATP: Adenosina trifosfato

CAN: Cancrinite

CHC: Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

CRC: Cancro colorretal

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

DDSs: Sistemas *Drug Delivery* (do inglês: *Drug Delivery Systems*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTG: Termogravimetria diferencial (do inglês: *Differential Thermogravimetry*)

EDS: Energia dispersiva de raios-X

FAU: Código de 3 letras da *International Zeolite Association* para a estrutura cristalina do tipo faujasite

FBAL: α -fluoro- β -alanina

FBS: Soro fetal bovino

FTIR: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (do inglês: *Fourier Transform Infrared Spectrometry*)

FUPA: Ácido α -fluoro- β -ureidopropiónico

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*)

IC₅₀: Metade da concentração inibitória máxima (do inglês: *half maximal inhibitory concentration*)

IZA: *International Zeolite Association*

LTA: Código de 3 letras da *International Zeolite Association* para a estrutura cristalina do tipo linde type A

LTL: Código de 3 letras da *International Zeolite Association* para a estrutura cristalina do tipo linde type L

LV: Leucoverina

MCTs: Transportadores de monocarboxilatos

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium

OXO: Oxonato de potássio

PBS: Tampão fosfato salino

PCA: Poli(cianoacrilato)

PGA: Ácido poliglicólico

PLA: Ácido polilático

PU: Poliuretano

RB: Rodamina B

RMN: Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (do inglês: *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*)

RNA: Ácido ribonucleico

SAXS: Dispersão de raio-X a baixo ângulo (do inglês: *Small-Angle X-ray Scattering*)

SEM: Microscopia eletrônica de varrimento (do inglês: *Scanning Electron Microscopy*)

SRB: Sulforodamina B

TCA: Ácido tricloroacético

TG: Termogravimetria

UTP: uridina-5'-trifosfato

UV/Vis: Espectroscopia de Ultravioleta-Visível

Índice de figuras

Figura 2.1: Representação esquemática de nanocápsula e nanoesferas.....	10
Figura 2.2: Estrutura do material mesoporoso MCM-41.....	13
Figura 2.3: Representação esquemática de um zeólito na forma-H.	14
Figura 2.4: Comparação do tamanho dos poros de diferentes estruturas.....	14
Figura 2.5: Estrutura FAU onde se observa o tamanho da supercavidade (1,12 nm) e do poro (0,73 nm), bem como uma cavidade sodalite e um duplo prisma hexagonal.	16
Figura 2.6: Cavidade sodalite	16
Figura 2.7: (A) Vista superior do zeólito LTL mostrando a estrutura hexagonal. (B) Vista lateral de um canal.	17
Figura 2.8: A) Cavidade cancrinite. (B) D6R.	17
Figura 2.9: As marcas do cancro.	21
Figura 2.10: Alterações na via supressora.	24
Figura 2.11: Estrutura do 5-fluoro-1H,3H-pirimidina-2,4-diona (5-FU).....	25
Figura 2.12: Via anabólica e via catabólica do 5-FU em humanos..	26
Figura 2.13: Anabolismo intracelular do 5-FU..	27
Figura 2.14: Via catabólica do 5-FU..	28
Figura 2.15: Estrutura do ácido α -Ciano-4-hidroxicinâmico (CHC).....	30
Figura 3.1: Representação do gradiente de temperatura utilizado para a calcinação do NaY..	34
Figura 3.2: Estrutura da rodamina B.....	37
Figura 3.3: Diagrama esquemático de um HPLC.....	39
Figura 3.4: Representação esquemática do interferómetro de Michelson.....	40
Figura 3.5: Componentes básicos de um espectrofotómetro de FTIR.....	41
Figura 3.6: Vibrações características do zeólito Y.....	42
Figura 3.7: Os dois componentes principais de um microscópio SEM: coluna e consola eletrónicas	44
Figura 3.8: Representação esquemática dos sinais gerados quando um feixe de eletrões atinge a amostra.	45
Figura 3.9: Curva de decomposição térmica de um material.....	48
Figura 3.10: Curva de decomposição térmica de um material.....	48
Figura 3.11: Fenómeno de dispersão.....	50
Figura 3.12: a) Representação esquemática da configuração de SAXS. (b) Direção do raio-X desde a fonte até ao detetor.	51

Figura 3.13: Intervalos de desvios químicos do ^{29}Si para unidades Si(nAl) em zeólitos. Si(4Al)-SOD refere-se a Si(4Al) em sodalites.....	53
Figura 3.14: Linha celulares de carcinoma colorretal. (A) Linha celular HCT-15. (B) Linha celular RKO	54
Figura 4.1: Efeito do NaA do CHC@A na viabilidade celular da linha HCT-15 do carcinoma colorretal.....	62
Figura 4.2: Efeito do NaY e do CHC@Y na viabilidade celular da linha HCT-15 do carcinoma colorretal.....	62
Figura 4.3: Espectro de FTIR do 5-FU, do 5-FU@NaY(M) e do NaY	64
Figura 4.4: Espectro de FTIR do 5-FU, do 5-FU@LTL (M) e do LTL	65
Figura 4.5: Espectro de FTIR do 5-FU, do 5-FU@NanoNa-Y (M) e do NanoNa-Y	65
Figura 4.6: Efeito do NaY tratado com metanol e do 5-FU@NaY preparado com metanol na viabilidade da linha celular RKO do carcinoma colorretal..	66
Figura 4.7: Efeito do LTL tratado com metanol e do 5-FU@LTL preparado com metanol na viabilidade da linha celular RKO do carcinoma colorretal..	67
Figura 4.8: Efeito do NanoNa-Y tratado com metanol e do 5-FU@NanoNa-Y (M) preparado com metanol na viabilidade da linha celular RKO do carcinoma colorretal..	68
Figura 4.9: Coloração do 5-FU.....	69
Figura 4.10: Coloração dos DDSs preparados. (A) 5-FU@NaY, (B) 5-FU@LTL, (C) 5-FU@NanoNa-Y	69
Figura 4.11: Espectro de UV/Vis do NaY, 5-FU@NaY e 5-FU obtidos em suspensões de Nujol.....	70
Figura 4.12: Espectro de UV/Vis do LTL, 5-FU@LTL e 5-FU obtidos em suspensões de Nujol.....	71
Figura 4.13: Espectro de UV/Vis do NanoNaY, 5-FU@NanoNa-Y e 5-FU obtidos em suspensões de Nujol.	72
Figura 4.14: Espectros de FTIR do NaY, 5-FU e 5-FU@NaY	73
Figura 4.15: Espectros de FTIR do LTL, 5-FU e 5-FU@LTL.....	74
Figura 4.16: Espectros de FTIR do NanoNa-Y, 5-FU e 5-FU@NanoNa-Y	75
Figura 4.17: (A) Espectros de FTIR dos três zeólitos utilizados; (B) Ampliação da região entre 600 e 570 cm^{-1} assinalada em (A). Na região assinalada em (B) estão as bandas características do zeólito NaY.	76
Figura 4.18: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (5000×).....	76
Figura 4.19: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (2000×).....	77
Figura 4.20: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (10000×).....	78
Figura 4.21: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (50000×).....	78

Figura 4.22: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (100000×).....	79
Figura 4.23: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (2000×).....	79
Figura 4.24: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (10000×).....	80
Figura 4.25: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (50000×).....	80
Figura 4.26: (A) Registo da curva de TG do 5-FU. (B) Registo da curva de DTG do 5-FU.....	81
Figura 4.27: Curvas de variação de massa para o NaY (azul), 5-FU (vermelho) e 5-FU@NaY (verde).	82
Figura 4.28: Curvas de variação de massa para o zeólito (azul), 5-FU (vermelho) e 5-FU@zeólito (verde). (A) NanoNa-Y e (B) LTL.....	82
Figura 4.29: Curvas de variação de massa para os diferentes DDSs preparados	83
Figura 4.30: Espectros de ²⁷ Al CP/MAS RMN. (A) NaY; (B) NaA. Acetona@zeólito (verde), zeólito padrão (azul) e fármaco@zeólito (vermelho).	84
Figura 4.31: Espectros de ²³ Na CP/MAS RMN. (A) NaY; (B) NaA. Acetona@zeólito (verde), zeólito padrão (azul) e fármaco@zeólito (vermelho).	85
Figura 4.32: Espectro de ¹³ C CP/MAS RMN do CHC (vermelho), CHC@Y (verde) e CHC@A (azul). .	86
Figura 4.33: Cromatograma do padrão 5-FU em PBS.	87
Figura 4.34: (A) Cromatograma da libertação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@NaY durante 48 h sem agitação. (B) Perfil da libertação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@NaY durante 48 h sem agitação.	87
Figura 4.35: (A) Cromatograma da libertação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@LTL durante 48 h sem agitação. (B) Perfil da libertação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@LTL durante 48 h sem agitação.	88
Figura 4.36: (A) Cromatograma da libertação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@NanoNa-Y durante 48 h sem agitação. (B) Perfil da libertação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@NanoNa-Y durante 48 h sem agitação.	89
Figura 4.37: (A) Cromatograma da libertação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@LTL durante 48 h. (B) Perfil da libertação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@LTL durante 48 h.	90
Figura 4.38: (A) Perfil da libertação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@NaY durante 48 h com agitação. (B) Perfil da libertação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@NanoNa-Y durante 48 h.	90
Figura 4.39: Comparação dos perfis de libertação do 5-FU a partir dos DDSs estudados durante 48 h quando sujeitos a agitação.....	91
Figura 4.40: Comparação dos perfis de libertação do 5-FU a partir dos DDSs estudados durante 48 h em condições de repouso.	92
Figura 4.41: Efeito do NaY e do 5-FU@NaY preparado na viabilidade da linha celular HCT-15 do carcinoma colorretal.	93

Figura 4.42: Efeito do LTL e do 5-FU@LTL preparado na viabilidade da linha celular HCT-15 do carcinoma colorretal..	94
Figura 4.43: Efeito do NanoNa-Y e do 5-FU@NanoNa-Y preparado na viabilidade da linha celular HCT-15 do carcinoma colorretal..	95
Figura 4.44: Efeito do NaY e do 5-FU@NaY preparado na viabilidade da linha celular RKO do carcinoma colorretal..	97
Figura 4.45: Efeito do LTL e do 5-FU@LTL preparado na viabilidade da linha celular RKO do carcinoma colorretal..	98
Figura 4.46: Efeito do NanoNa-Y e do 5-FU@NanoNa-Y preparado na viabilidade da linha celular RKO do carcinoma colorretal..	99
Figura 4.47: Imagem de microscopia ótica de células da linha HCT-15 (controle) obtida na ampliação de 1000x.	101
Figura 4.48: Imagens de microscopia ótica da interação dos zeólitos com as células da linha HCT-15 (setas) obtidas na ampliação de 1000x. (A) NaY; (B) LTL; (C) NanoNa-Y.	101
Figura 4.49: Imagens de microscopia ótica da interação dos DDSs com as células da linha HCT-15 (setas) obtidas na ampliação de 1000x. (A) 5-FU@NaY; (B) 5-FU@LTL; (C) 5-FU@NanoNa-Y.	101
Figura 4.50: Esquema do processo de endocitose para a entrada dos zeólitos ou DDSs nas células.	102
Figura 4.51: Imagem de microscopia ótica de células da linha RKO (controle) obtida na ampliação de 1000x.	102
Figura 4.52: Imagens de microscopia ótica da interação dos zeólitos com as células da linha RKO (setas) obtidas na ampliação de 1000x. (A) NaY; (B) LTL; (C) NanoNa-Y.	102
Figura 4.53: Imagens de microscopia ótica da interação dos DDSs com as células da linha RKO (setas) obtidas na ampliação de 1000x. (A) 5-FU@NaY; (B) 5-FU@LTL; (C) 5-FU@NanoNa-Y.	103
Figura 4.54: Imagens de microscopia de células da linha HCT-15 (controle).	103
Figura 4.55: Imagens de microscopia da interação de células da linha HCT-15 com o NaY marcado com rodamina B após 48 h de incubação.	104
Figura 4.56: Imagens de microscopia da interação de células da linha RKO com o NaY marcado com rodamina B após 48 h de incubação.	104

Índice de Tabelas

Tabela 3.1: Características dos fármacos utilizados na preparação dos DDSs	35
Tabela 3.2: Características dos solventes utilizados para a preparação dos DDSs.....	35
Tabela 3.3: Designação dos DDSs preparados.....	36
Tabela 3.4: Características da rodamina B.....	37
Tabela 4.1: Concentrações finais de CHC nos diferentes DDSs preparados [88].	63
Tabela 4. 2: Resultados da análise química às amostras 5-FU@NaY, 5-FU@LTL e 5-FU@NanoNa-Y	70
Tabela 4.3: Resultados de variação de massa obtidos para os diferentes DDSs preparados	83
Tabela 4.4: Concentrações finais de 5-FU nas diferentes concentrações de DDSs testadas	93
Tabela 4.5: Resumo dos IC ₅₀ dos vários DDSs testados nas duas linhas celulares estudadas.	100

Capítulo 1

Introdução

1.1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia pode ser definida como desenvolvimento, caracterização e aplicação de materiais, dispositivos e sistemas tão pequenos que podem ser medidos a nível molecular [1, 2]. Esta área envolve conhecimentos transversais à química, física, engenharia e medicina e é esta interdisciplinaridade que tem contribuído para o crescimento exponencial e para o sucesso da nanotecnologia ao longo dos últimos anos [3, 4].

Foi o nobel da física Richard P. Feynman que em 1959, durante a sua conferência intitulada *“There’s plenty of room at the bottom”*, esboçou o conceito de nanotecnologia. Nesta conferência Richard P. Feynman sugeriu o uso de ferramentas que permitissem a criação de outras cada vez mais pequenas até chegar ao nível atómico. Porém o termo nanotecnologia, tal como hoje o conhecemos, só foi usado em 1974 pelo Professor Noro Taniguchi [5, 6].

O prefixo “nano” deriva da palavra grega “nanos” que significa “anão”. Um nanómetro (nm) é um bilionésimo do metro, o equivalente à largura de seis átomos de carbono ou de dez moléculas de água [4, 7, 8]. Um glóbulo vermelho tem cerca de 300 nm, os vírus entre 3 a 50 nm e o DNA entre 1 a 2 nm [9].

A nanotecnologia tem tido impacto positivo em diversas áreas, nomeadamente na saúde. Esta tem possibilitado o aparecimento de terapêuticas melhores e mais eficazes para o diagnóstico e tratamento de doenças, em especial na área da oncologia. Por este facto, ao longo dos últimos anos tem-se assistido a um aumento significativo da aplicação da nanotecnologia na medicina. Esta aplicação permitiu concretizar a ideia de se criar sistemas tão pequenos que poderiam ser introduzidos no organismo humano de forma a executar e reparar danos celulares ao nível molecular, surgindo assim o conceito de nanomedicina [5,10].

A nanomedicina consiste na aplicação da nanotecnologia de forma a monitorizar, diagnosticar, prevenir, reparar ou curar doenças e danos em tecidos de sistemas biológicos a nível molecular [11-13].

A ideia da nanomedicina foi apresentada nos anos 80 e 90 nos textos de Drexler [5, 14, 15] e nos textos de Freitas [5, 16, 17] em 1990 e 2000.

Na sua fase inicial, a nanomedicina focava-se apenas no aperfeiçoamento de técnicas de diagnóstico e terapêuticas já existentes, mas ao longo dos últimos vinte anos, com o conhecimento aprofundado do genoma humano, com a compreensão de certas doenças a nível molecular e com o desenvolvimento de tecnologias que permitem a manipulação à escala nano, a nanomedicina tem sido aperfeiçoada, sendo esse aperfeiçoamento mais evidente no tratamento de doenças vasculares e no cancro [3, 11].

Através da utilização da nanotecnologia, tem sido possível criar sistemas 100 a 10000 vezes menores do que as células humanas, ou seja, sistemas com tamanhos similares às biomoléculas tais como aminoácidos, proteínas, DNA, entre outras. Os sistemas menores do que 50 nm podem facilmente entrar na maioria das células, enquanto que os menores do que 20 nm podem circular nos vasos sanguíneos [12, 18]. Estes nanosistemas permitem desenvolver sistemas *drug delivery* eficazes no transporte de agentes quimioterapêuticos ou genes terapêuticos para o interior das células malignas, evitando assim que as células saudáveis entrem em contacto com esses agentes, o que torna a nanomedicina uma área muito atrativa para o tratamento do cancro [12, 19, 20].

Sendo o cancro uma das principais causas de morte no mundo, os investigadores, utilizando o potencial da nanomedicina, têm procurado desenvolver sistemas que permitam erradicar as células cancerígenas sem causar dano nas células saudáveis. O seu principal objetivo é conseguirem desenvolver nanopartículas que possam circular no organismo, detetar as mudanças moleculares associadas ao cancro, ajudar na imagiologia, libertar o agente terapêutico e depois monitorizar a eficácia da intervenção. Isto permitiria reduzir os efeitos colaterais das terapias anticancerígenas [21].

Os sistemas *drug delivery* baseados em nanopartículas são o cerne da nanomedicina uma vez que são apropriados para utilizar em doenças crónicas [22]. As nanopartículas são uma alternativa inovadora e promissora pois aumentam a eficácia terapêutica do fármaco e reduz os seus efeitos adversos noutros locais do organismo. Quando são corretamente projetadas, as nanopartículas podem acumular-se nos tumores sem serem eliminadas pelo organismo, e para além disso, podem aumentar a concentração intracelular de fármaco e melhorar de forma significativa o efeito citotóxico de vários agentes anticancerígenos nos órgãos pretendidos [23].

Os nanomateriais irão então provocar inúmeras alterações na medicina, devido à sua capacidade de interagir com os órgãos e tecidos ao nível molecular [24].

Com este trabalho pretendia-se criar sistemas *drug delivery* para o tratamento do carcinoma colorretal, usando modelos *in vitro*.

Como suporte sólido dos sistemas foram utilizadas duas estruturas zeolíticas, faujasite (NaY e NanoFAU-Y) e linde type L (LTL) e o fármaco escolhido foi o 5-fluoro-1H,3H-pirimidina-2,4-diona, de nome comercial 5-fluorouacilo.

Os zeólitos são aluminossilicatos cristalinos pois possuem uma estrutura composta por átomos de Si e Al. Estes apresentam uma grande capacidade de adsorção e devido à sua grande área superficial podem absorver uma quantidade considerável de substâncias, tornando-os promissores na entrega de fármacos [25].

O 5-fluorouacilo é um dos fármacos mais utilizado no tratamento de tumores sólidos, tais como o cancro da mama, cancro colorretal, entre outros [26, 27].

1.2. ESTRUTURA DA TESE

A tese aqui apresentada será organizada em sete capítulos distintos:

1. Introdução

Neste capítulo será feita uma introdução geral ao tema e será apresentado o objetivo do trabalho.

2. Estado da arte

Este capítulo abordará os fundamentos teóricos necessários para a compreensão do trabalho desenvolvido.

3. Procedimento experimental

Neste capítulo serão apresentados os materiais e os procedimentos utilizados para a preparação dos sistemas *drug delivery*, bem como as técnicas analíticas utilizadas para a caracterização dos mesmos.

Serão ainda descritos os procedimentos utilizados nos testes dos sistemas *drug delivery* em linhas celulares do carcinoma colorretal.

4. Resultados e discussão

Neste capítulo serão incluídos os resultados obtidos ao longo de todo o trabalho experimental, assim como a discussão dos mesmos.

5. Considerações finais

Este capítulo apresentará as conclusões finais do trabalho realizado.

6. Perspetivas futuras

Neste capítulo serão sugeridos estudos para realizar em trabalhos futuros.

7. Referências bibliográficas

Neste capítulo será apresentado todo o levantamento bibliográfico realizado para a compreensão, execução e escrita do trabalho.

O trabalho apresentado nesta tese foi desenvolvido no Centro de Química, Departamento de Química da Escola de Ciências da Universidade do Minho e no Instituto de Investigação da Vida e da Saúde (ICVS) da Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Minho.

Capítulo 2

Estado da arte

Neste capítulo serão abordados os conceitos e trabalhos de literatura necessários à compreensão do trabalho desenvolvido.

Como referido anteriormente, este trabalho tinha como objetivo criar sistemas *drug delivery* baseados em zeólitos e consequentemente avaliar a capacidade destes suportes como sistemas *drug delivery*. Assim, apresentar-se-á uma descrição sobre o que é e para que servem os sistemas *drug delivery*. Abordar-se-á ainda alguns materiais que permitem a criação destes sistemas e dar-se-á alguns exemplos da sua aplicação, sendo que neste subtópico será dado ênfase especial aos zeólitos que são um ponto fulcral no trabalho desenvolvido.

Nos tópicos finais, e uma vez que os sistemas preparados foram testados em células do carcinoma colorretal, será feita uma breve descrição sobre este cancro e por fim, descrever-se-á os fármacos utilizados.

2.1. SISTEMAS DRUG DELIVERY

Desde a antiguidade que o Homem tem desenvolvido estratégias terapêuticas, sendo um exemplo disso, a inalação de fumos resultantes da queima de plantas medicinais. Essas estratégias foram aperfeiçoadas ao longo dos séculos através da formulação de comprimidos e cápsulas. No entanto, alguns desses compostos apresentavam uma ação de curta duração e após a sua administração, por via oral ou intravenosa, atingiam um pico após o qual a sua ação diminuía. Surgiu então a necessidade de se desenvolverem novas formulações que permitam controlar a taxa e o prazo de libertação do fármaco em áreas específicas do organismo. Essas novas formulações têm o nome de sistemas *drug delivery* (DDSs) [28, 29].

Os DDSs possibilitam uma libertação controlada de fármacos em locais específicos do organismo humano e aumentam a eficácia terapêutica dos fármacos pela manutenção da sua concentração no organismo dentro do intervalo terapêutico e abaixo do limiar tóxico [28,30].

Estes sistemas apresentam diversas vantagens quando comparados com os sistemas de dosagem convencional uma vez que permitem uma maior eficácia terapêutica devido à libertação progressiva e controlada do fármaco, uma diminuição significativa da toxicidade do fármaco nos órgãos saudáveis do organismo e maior tempo de permanência em circulação. Permitem ainda uma administração segura e conveniente, sendo esta direcionada a alvos específicos [31, 32]. Idealmente, os DDSs devem ter tamanhos compreendidos entre os 10 a 100 nm [33].

Os DDSs podem ser classificados em sistemas de libertação temporais e sistemas de libertação direcionados. Os sistemas temporais libertam uma certa quantidade de fármaco a partir da matriz durante um determinado período de tempo. A vantagem destes sistemas é o facto de permitirem que a concentração terapêutica do fármaco seja mantida no organismo por longos períodos de

tempo sem que seja necessária uma nova administração do fármaco, minimizando assim os problemas de sobredosagem [34, 35].

Por sua vez os sistemas direcionados libertam a dose adequada de fármaco num local específico do corpo, evitando desta forma os efeitos adversos noutros tecidos ou órgãos do organismo. Estes sistemas assumem uma grande importância no caso de fármacos altamente tóxicos como é o caso dos fármacos utilizados em quimioterapia. Possibilitam ainda a libertação do fármaco em locais que de outra forma seriam inacessíveis como é o caso do cérebro [34, 35].

Atualmente o desenvolvimento de DDSs tem-se focado na área da nanotecnologia, utilizando nanopartículas para a sua criação. As nanopartículas são partículas com tamanhos compreendidos entre 10 a 1000 nm [36-39].

Na nanopartícula o fármaco pode ser dissolvido, aprisionado, encapsulado ou ligado a uma matriz e dependendo do método de preparação podem obter-se nanoesferas ou nanocápsulas. As nanoesferas têm uma estrutura tipo matriz, nas quais o fármaco pode estar adsorvido à superfície, retido ou dissolvido no interior das partículas. As nanoesferas contêm o fármaco no interior da matriz pelo que se obtém um sistema monolítico onde não é possível observar-se um núcleo diferenciado. Por sua vez nas nanocápsulas o fármaco é rodeado por uma membrana e é possível observar-se um núcleo que pode ser sólido ou líquido (Figura 2.1) [34, 36, 40, 41].

Uma vez no corpo, o fármaco contido na nanopartícula é libertado da matriz por difusão, erosão ou degradação.

Os DDSs baseados em nanopartículas podem ser facilmente manipulados para que consigam reter o fármaco no seu interior durante o transporte libertando-o apenas no local desejado e também para que consigam atravessar os capilares sanguíneos e possam ser administrados por diversas vias, nomeadamente via oral, nasal, intraocular, parental entre outras [29, 32, 36, 42].

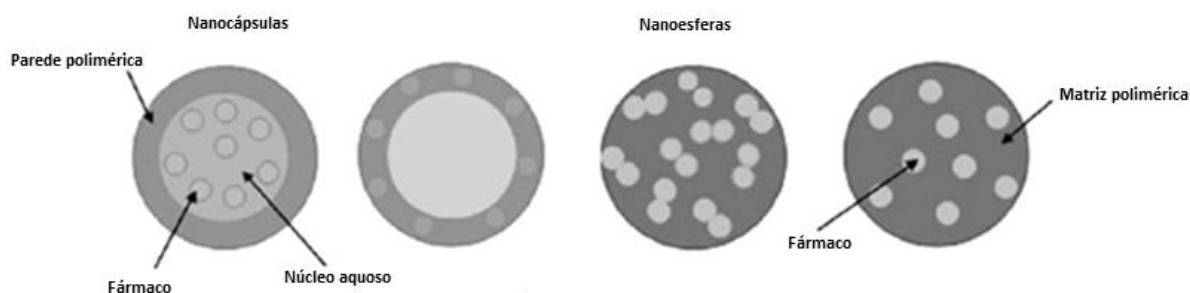


Figura 2.1: Representação esquemática de nanocápsula e nanoesferas (adaptado de [41])

A aplicação da nanotecnologia na criação dos DDSs permitirá desenvolver sistemas cada vez mais eficazes na libertação dos fármacos o que se traduzirá numa melhoria do índice terapêutico de quase

todos os fármacos uma vez que serão entregues diretamente nos seus alvos biológicos. Este aperfeiçoamento dos DDSs resultará numa resolução de diversos obstáculos. Por exemplo, os fármacos que apresentam tempos de meia-vida curtos em circulação podem ter a sua estabilidade aumentada se forem inseridos num suporte para libertação controlada [43].

2.2. MATERIAIS UTILIZADOS COMO DDSs

Como acima referido, os DDSs possibilitam uma maior eficácia terapêutica dos fármacos devido à sua libertação num local específico do organismo. Assim, muitos são os estudos realizados nesta área de forma a desenvolver materiais que permitam a criação de DDSs cada vez mais eficazes.

Durante a última década os investigadores têm-se focado nas nanopartículas e têm criado nanopartículas poliméricas para criação de DDSs. Para além dos polímeros também os materiais porosos, de entre os quais se destacam os zeólitos, se têm demonstrado eficazes no aumento da especificidade do fármaco para o órgão a tratar, bem como na redução da sua toxicidade, melhorando assim as taxas de absorção do fármaco.

2.2.1. MATERIAIS POLIMÉRICOS

Os polímeros são materiais muito versáteis que têm vindo a alterar o nosso dia a dia ao longo das últimas décadas. Dentro destes, a classe dos biomateriais tem sido amplamente estudada para aplicações médicas devido à sua flexibilidade de síntese ou modificação para aplicação em diversos tecidos e órgãos do corpo humano [35, 44].

Após a criação do primeiro DDS baseado no ácido poliglicólico, vários têm sido os polímeros utilizados como DDSs uma vez que estes permitem a criação de sistemas eficazes na libertação dos fármacos [37, 44, 45].

Nos DDSs poliméricos, o fármaco é incorporado na matriz polimérica e a sua taxa de libertação depende de diversos parâmetros, nomeadamente da natureza da matriz polimérica, da geometria da matriz, das propriedades do fármaco, entre outras. O mecanismo de libertação do fármaco a partir destas matrizes pode ser controlado por meios físicos ou químicos [34].

A maioria dos polímeros inicialmente estudados para o uso como DDSs eram hidrofóbicos e não degradáveis, como por exemplo, os poliuretanos (PU). No entanto estes polímeros apresentavam muitas limitações e requeriam uma operação cirúrgica para serem removidos. Assim, os polímeros biodegradáveis tornaram-se muito atrativos uma vez que após a sua inserção no organismo não é necessária uma cirurgia para a sua remoção e, para além disso conseguem sustentar os fármacos na sua matriz de forma eficaz [34].

Os primeiros polímeros biodegradáveis a serem estudados para utilização como DDSs foram os poliésteres alifáticos, como o ácido polilático (PLA) e o ácido poliglicólico (PGA). Os estudos iniciais nestes polímeros basearam-se em formulações monolíticas onde as matrizes bidimensionais foram preparadas por evaporação de uma solução orgânica de polímero/fármaco. Os primeiros estudos ocorreram em 1970 e nesta altura foi lançado o sistema PLA /ciclazocina [34, 39].

As nanopartículas poliméricas são formuladas pela incorporação de polímeros biodegradáveis de forma a maximizar a compatibilidade para o tecido e de forma a minimizar a citotoxicidade. Por exemplo, o PLA pode ser facilmente hidrolisado em monómeros individuais (ácido lático ou ácido glicólico), que são removidos do corpo através das vias metabólicas normais [39, 44, 46].

As nanopartículas de polímeros biodegradáveis revelam-se úteis para a introdução intravenosa de fármacos anti-tumorais no corpo, permitindo uma libertação controlada do fármaco no local de interesse.

Uma grande variedade de agentes terapêuticos, tais como fármacos anti-tumorais, proteínas e péptidos, podem ser eficazmente entregues através de DDSs baseados em nanopartículas poliméricas [46-48].

2.2.2. MATERIAIS POROSOS

Os materiais porosos são divididos em três classes consoante o tamanho do seu poro: microporosos (< 2 nm), mesoporosos (2-50 nm) e macroporosos (> 50 nm) [49].

Com a descoberta dos materiais mesoporosos em 1990, os materiais porosos têm tido muita atenção por parte dos investigadores devido às suas estruturas bem definidas, ao tamanho dos seus poros e à sua elevada área de superfície. Na última década os materiais mesoporosos foram utilizados em inúmeras aplicações, por exemplo como em sensores e catálise, no encapsulamento de compostos farmacêuticos, proteínas e outras moléculas biogénicas. Estudos demonstram que moléculas de diversos tamanhos podem ser inseridas dentro dos poros através de um processo de encapsulamento e libertadas dos mesmos por difusão. Após o uso de MCM-41 (Figura 2.2) como DDSs por Vallet-Regi *et al.* [50] em 2001, muitos outros trabalhos têm sido feitos nessa área de forma a desenvolver diferentes tipos de materiais mesoporosos que possam sustentar diversos compostos farmacêuticos [51-53].

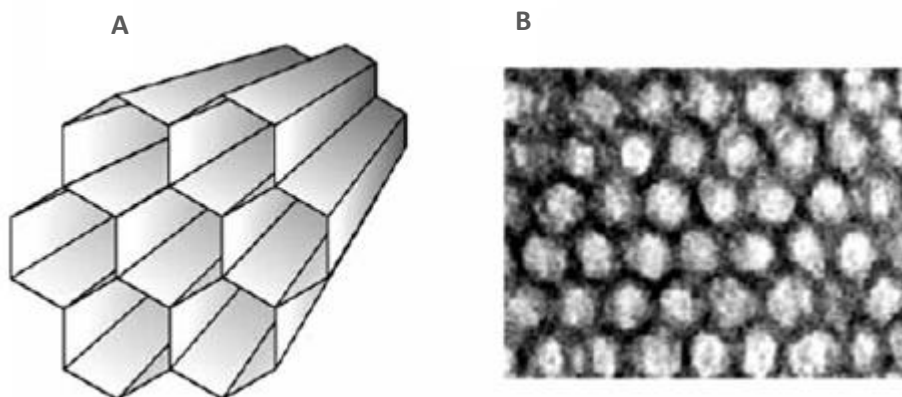


Figura 2.2: Estrutura do material mesoporoso MCM-41. A) Imagem esquemática; B) Imagem de TEM [54].

Apesar de promissores como DDSs, os materiais mesoporosos apresentam a desvantagem dos seus poros serem muitas vezes superiores ao tamanho do fármaco, o que resulta na diminuição da eficácia do sistema pois a libertação do fármaco não é devidamente controlada. De forma a ultrapassar este problema pode funcionalizar-se as paredes dos poros ou então sintetizar materiais com diâmetros menores. Isto foi conseguido com o Si-MCM-41. No entanto, a síntese de materiais mesoporosos com poros menores é um processo difícil. Uma forma fácil e eficaz de ultrapassar este problema é o uso de zeólitos pois os seus poros têm dimensões muito reduzidas (0,5-0,75 nm), situando-se no intervalo de tamanhos de muitas moléculas farmacológicas. Tendo em conta que estudos de toxicidade *in vivo* e *in vitro* revelaram a não toxicidade do zeólito clinoptilolite, estes são materiais promissores para a criação de DDSs [55-57].

2.2.3. ZEÓLITOS

Os zeólitos, cujo nome deriva das palavras gregas *Zeo* (ferver) e *Lithos* (pedra), são uma classe de minerais que foram descobertos em 1756 pelo mineralogista sueco Crønsted e desde então muitas estruturas zeolíticas, tanto naturais como sintéticas, têm sido descobertas e estudadas [58]. Em 1954 foram utilizados pela primeira vez como adsorventes para separações e purificações industriais mas devido às suas propriedades porosas únicas, são agora utilizados numa grande variedade de aplicações [59].

Os zeólitos são aluminossilicatos cristalinos com uma estrutura tridimensional composta por átomos de Si e Al ligados entre si por pontes de oxigénio. Os átomos Si^{4+} e Al^{3+} (cada átomo de Si e Al são denominados átomos "T") estão contidos em tetraedros com quatro átomos de oxigénio dando origem a SiO_4 e AlO_4^- , respetivamente (Figura 2.3). Estas ligações originam poros cuja dimensão é

caracterizada pelo tamanho do anel que o define. Este anel tem o nome de anel- n (n -ring), onde n representa o número de átomos T no anel. Por exemplo, um anel-8 origina um poro pequeno, um anel-10 um poro médio e um anel-12 um poro largo com diâmetros de aproximadamente 0,41; 0,55 e 0,74 nm, respetivamente (Figura 2.4). A presença de Al^{3+} origina uma carga negativa que é compensada pela presença de catiões, como por exemplo, H^+ , Na^+ ou Ca^{2+} [54, 55, 57, 58, 60].

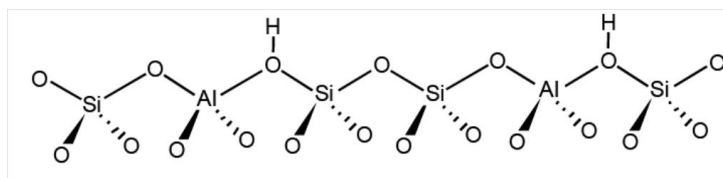


Figura 2.3: Representação esquemática de um zeólito na forma-H [58].

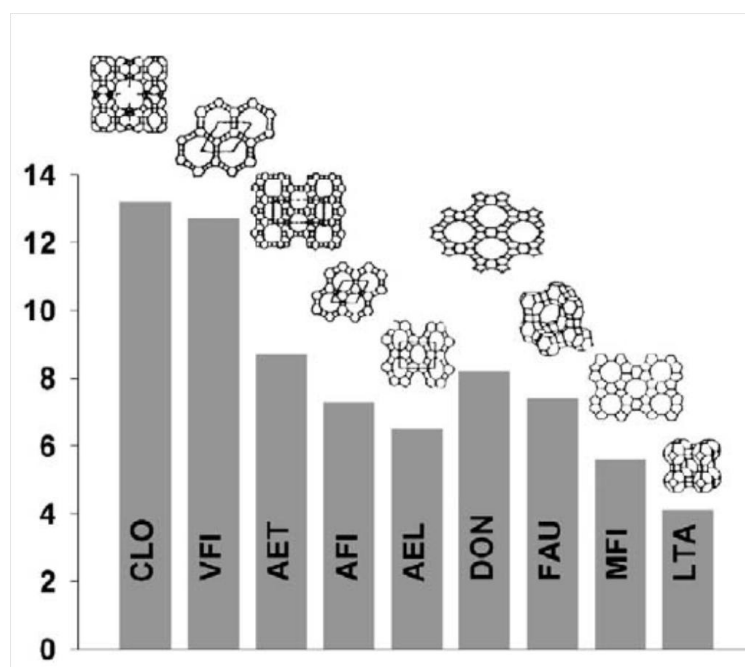


Figura 2.4: Comparação do tamanho dos poros de diferentes estruturas [61].

A forma como os tetraedros de SiO_4 e AlO_4^- se ligam entre si dá origem a uma variedade de arranjos cristalinos diferentes. Estes arranjos estão catalogados pela IZA – *International Zeolite Association*, cuja Comissão para Estrutura foi fundada em 1977 e é reconhecida pela IUPAC como a autoridade que regulamenta e atribui a nomenclatura das estruturas zeolíticas conhecidas [62, 63].

Um zeólito apresenta uma fórmula química do tipo $\text{M}_x/n[\text{Al}_x\text{Si}_y\text{O}_2(x+y)] \cdot p\text{H}_2\text{O}$, onde n indica a carga do catião M. Pode ainda representar-se a composição química de um zeólito em função do teor de óxidos Si e Al pela fórmula $\text{M}_2/n \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot z\text{SiO}_2 \cdot a\text{H}_2\text{O}$. Um parâmetro vulgarmente utilizado na descrição da composição química de um zeólito é a razão Si/Al que nunca assume valores inferiores a 1 (regra

de *Löwenstein*), sendo que nos zeólitos naturais se situa entre 5 e 6. Esta razão determina a capacidade iónica e propriedades como a estabilidade térmica e química ou a polaridade [54, 61, 63].

Os zeólitos apresentam uma elevada capacidade de adsorção e devido à sua grande área superficial podem absorver até cerca de 50% do seu peso em água ou uma quantidade considerável de outras substâncias [54, 61, 63].

Nos últimos anos tem-se assistido a uma crescente utilização de zeólitos com tamanho de partículas nano. Estes zeólitos têm cristais uniformes com dimensões reduzidas, por vezes inferiores a 100 nm, o que lhes confere características físico-químicas únicas [64].

Os nanozeólitos apresentam características comuns aos zeólitos com partículas maiores, nomeadamente, estruturas diversas e elevada estabilidade química. No entanto, estes zeólitos têm uma maior área superficial externa e poros mais reduzidos. A diminuição do tamanho da partícula traduz-se num aumento do número de átomos na superfície, ou perto desta, comparativamente ao número de átomos no interior [64-66]. Esta característica confere aos nanozeólitos uma capacidade notável de adsorção e imobilização de biomoléculas tornando-os muito atrativos na libertação de fármacos [25].

Neste trabalho foram utilizados dois nanozeólitos, o NanoNa-Y e o KLTL.

2.2.3.1. ESTRUTURA FAU

O zeólito Y (Figura 2.5), pertencente à família faujasite (FAU), possui poros de 0,73 nm com estrutura tridimensional [64].

A unidade estrutural básica do zeólito Y são as cavidades sodalite (ou cavidade β) (Figura 2.6), com diâmetro interno de 0,62 nm, que se ligam entre si através de prismas hexagonais com anéis duplos de seis membros. O arranjo entre estas duas estruturas origina uma supercavidade com diâmetro interno de 1,2 nm.

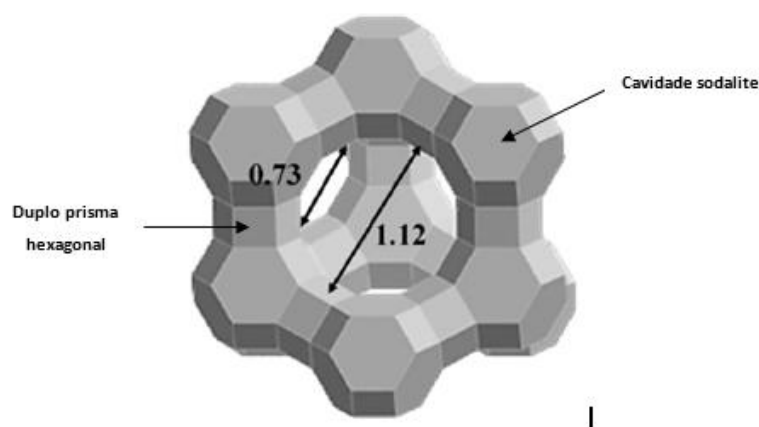


Figura 2.5: Estrutura FAU onde se observa o tamanho da supercavidade (1,12 nm) e do poro (0,73 nm), bem como uma cavidade sodalite e um duplo prisma hexagonal [adaptado de 55].

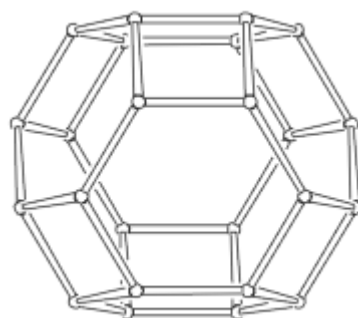


Figura 2.6: Cavidade sodalite [67]

A supercavidade, em conjunto com as sodalites e os prismas hexagonais, origina a estrutura cristalina do zeólito Y.

O zeólito Y apresenta uma razão de Si/Al de aproximadamente 2,5 e a sua fórmula química geral é $[(Ca, Mg, Na_2)_{29}(H_2O)_{240}][Al_{58}Si_{134}O_{384}]$ [63, 68].

Os zeólitos Y utilizados neste trabalho, NaY e NanoNa-Y, foram sintetizados na forma sódica. O NanoNa-Y apresenta partículas com cerca de 150 nm, enquanto o NaY tem partículas na ordem do 100-600 nm.

2.2.3.2. ESTRUTURA LTL

O zeólito L (Figura 2.7), pertencente à família linde type L (LTL), foi sintetizado em 1960 por Breck e Acara e foi designado um zeólito de poros grandes, característica que veio a ser confirmada anos mais tarde por Barrer e Marshall [69, 70].

Este zeólito, ao contrário do zeólito Y, possui canais unidimensionais que estão interligados por colunas cancrinite (CAN) através de átomos de oxigênio. Desta interligação resultam poros de anel-12 com cerca de 0,71 nm de diâmetro. As colunas CAN são formadas por cavidades cancrinite (Figura 2.8 (A)) e por anéis hexagonais duplos (D6R) (Figura 2.8 (B)) [69, 70].

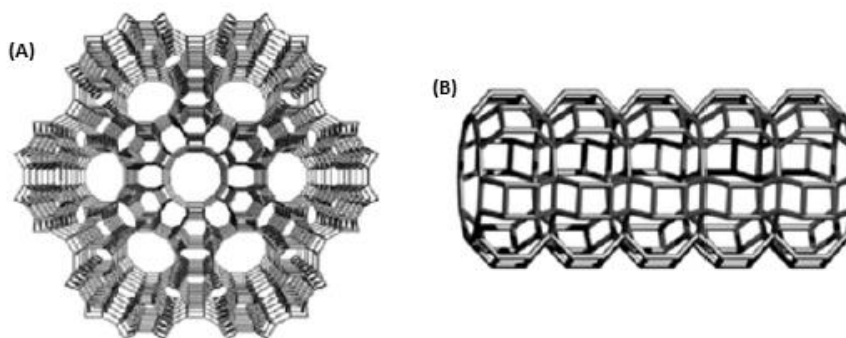


Figura 2.7: (A) Vista superior do zeólito LTL mostrando a estrutura hexagonal. (B) Vista lateral de um canal [71].



Figura 2.8: (A) Cavidade cancrinite. (B) D6R [62].

O zeólito L apresenta uma razão Si/Al de aproximadamente 3 e a sua fórmula química geral é $[K^+Na^{+3}(H_2O)_{21}][Al_9Si_{27}O_{72}]$ [62, 68].

O zeólito utilizado neste trabalho apresenta partículas com cerca de 80 nm e foi sintetizado na forma potássica (KLTL).

Diversos são os exemplos que mostram as vantagens do uso de zeólitos como DDSs. Um desses exemplos é a encapsulação de um agente anti-tumoral, ciclofosfamida, no zeólito CuX [54, 55, 72]. Testes *in vivo* demonstraram que a intensidade dos efeitos anti-tumorais do sistema zeólito CuX/ciclofosfamida são similares aos efeitos da ciclofosfamida sozinha. Uma vantagem importante deste sistema é a manutenção contínua da concentração de ciclofosfamida no sangue entre 100 e 1000 ng/mL.

Também os zeólitos do tipo FAU se têm revelado eficazes no armazenamento e libertação de fármacos como a doxorubicina, um composto anti-tumoral pertencente ao grupo da antraciclina. Neste sistema *drug delivery* as partículas são direcionadas para as células tumorais reduzindo a dose de doxorubicina necessária e minimizando desta forma os efeitos secundários do fármaco [54].

Foi com base nas vantagens dos zeólitos para o uso como DDSs que neste trabalho se propôs a preparação de DDSs utilizando os zeólitos NaY, NanoNa-Y e KLTL.

2.4. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE SISTEMAS *DRUG DELIVERY*

Dependendo das características físico-químicas do fármaco, é possível escolher o melhor método de preparação e definir qual o material que permite uma encapsulação mais eficaz.

2.4.1. SISTEMAS POLIMÉRICOS

O método usado na preparação de nanopartículas poliméricas depende da natureza do polímero utilizado, da natureza do fármaco a ser encapsulado, do uso que se pretende dar ao DDS e do tempo pretendido para a terapia [8]. Normalmente são utilizados três métodos: dispersão dos polímeros pré-formados, polimerização dos monómeros e coacervação ou solidificação iônica [36, 37, 40].

O método por dispersão de polímeros pré-formados é comumente utilizado na preparação de nanopartículas de PLA e poli(cianoacrilato) (PCA) e pode ser usado das seguintes formas: método de evaporação do solvente no qual o polímero é dissolvido num solvente orgânico, como o diclorometano ou clorofórmio, que é também usado para dissolver o fármaco; ou método de emulsificação espontânea/difusão do solvente onde se utiliza um solvente miscível em água (por exemplo, acetona) e um imiscível (por exemplo, diclorometano) formando-se uma fase em óleo e, devido à difusão do solvente miscível, ocorre uma turbulência entre as duas fases resultando na formação de pequenas partículas [36, 37, 40, 42].

No método de polimerização os monómeros são polimerizados numa solução aquosa para formar as nanopartículas. O fármaco é incorporado ou por dissolução no meio de polimerização ou por adsorção das nanopartículas após a polimerização completa. Posteriormente a suspensão de nanopartículas é purificada por ultracentrifugação de forma a remover os estabilizantes e surfactantes utilizados na polimerização e, as partículas são ressuspensas num meio isotônico sem surfactantes. Esta técnica é utilizada por exemplo na obtenção de nanopartículas de poli(butilcianoacrilato) [36, 40, 42]. No método de coacervação ou solidificação iônica é utilizado uma mistura de duas fases aquosas em que uma é um polímero e a outra é um polianião sódio tripolifosfato [36, 42, 46].

Podem ainda ser utilizados outros métodos na preparação de nanopartículas como a tecnologia de fluido supercrítico [36, 37, 73].

Os fluidos supercríticos têm-se tornado alternativas atraentes pois são solventes ecológicos e permitem a obtenção de partículas de elevada pureza sem qualquer vestígio de solvente orgânico,

pelo que o número de estudos que utilizam esta técnica na produção de nanopartículas é enorme [36, 37, 73].

2.4.2. MATERIAIS POROSOS

Tal como na preparação de nanopartículas poliméricas, também na preparação de DDSs com materiais porosos podem ser utilizados diversos tipos de procedimentos.

Quando o material a utilizar são zeólitos é necessário remover a água que está presente na sua estrutura. Assim, estes, antes da inclusão de qualquer composto, devem ser submetidos a uma temperatura ligeiramente superior a 100°C sob pressão reduzida ou a um aquecimento a temperaturas mais elevadas, na ordem de 250°C, quando sob pressão atmosférica. Após a desidratação, a água pode ser parcialmente ou completamente recuperada após exposição à humidade ambiente [74].

O procedimento mais simples para a adsorção de fármacos a zeólitos consiste na dissolução do fármaco num solvente inerte, de preferência apolar. De seguida coloca-se esta solução em contacto com os zeólitos desidratados. A adsorção pode feita através de agitação do sólido em solução à temperatura ambiente ou com aquecimento. Um aquecimento ligeiro pode facilitar de forma significativa a adsorção [60].

A natureza do solvente tem grande influência na adsorção do fármaco. Se o solvente é fortemente adsorvido dentro do zeólito então a adsorção do fármaco é desfavorecida. Se pelo contrário a interação entre o zeólito e o solvente é fraca, é favorecida a adsorção do fármaco [60, 72, 75].

Também o tempo de agitação é crucial para garantir que é encapsulado o máximo de fármaco na estrutura do material [75].

Uma outra forma de incorporar fármacos na estrutura zeolítica é através de fase gasosa nos casos em que a pressão do vapor dos compostos é suficientemente alta à temperatura ambiente ou quando o composto a ser adsorvido pode ser aquecido a temperatura adequadas. Para se conseguir este propósito, podem ser usadas câmaras de deposição de vapor. A ausência de solvente na fase de vapor facilita a adsorção do composto e, para além disso, as amostras resultantes estão livres de contaminações resultantes da presença residual de moléculas de solvente [60].

Um outro método de inserção de fármacos em materiais porosos é o método de impregnação. Este método consiste no contacto do material poroso com uma solução contendo o fármaco que se

pretende depositar na superfície do material. Existem diversos tipos de impregnação, mas os mais usuais são a impregnação por imersão e a impregnação húmida incipiente [76].

Na impregnação por imersão a deposição do fármaco no material ocorre de forma lenta, requerendo muitas horas ou mesmo dias e, o excesso de solvente é eliminado por evaporação ou por escoamento. Este método permite uma boa dispersão do fármaco no material [76].

Na impregnação húmida incipiente o fármaco é dissolvido numa solução aquosa. Posteriormente esta solução, com concentração conhecida, é adicionada ao material sendo o volume impregnado igual ao volume dos poros do material [75-78].

Certas estruturas zeolíticas têm na sua constituição cavidades maiores que se interligam por cavidades menores. Quando os compostos a encapsular têm um tamanho molecular demasiado grande para se alojarem nas cavidades maiores, podem ser incorporados na estrutura zeolítica através do método de síntese *ship-in-a-bottle* [60, 79, 80].

Existem também os chamados procedimentos secos que são especialmente úteis em moléculas pouco solúveis. Neste procedimento há uma moagem conjunta do material (por exemplo argilas) e do fármaco, ou então podem ser colocados em contacto um com o outro e colocados à temperatura de fusão do fármaco. [74].

Para além dos métodos apresentados, pode ainda utilizar-se a tecnologia de impregnação supercrítica [79, 81].

No presente trabalho foi utilizado o método de adsorção do fármaco em fase líquida, para a preparação dos DDSs. Como já mencionado anteriormente, a eficácia dos DDSs preparados foi avaliada através de testes de viabilidade celular em células do carcinoma colorretal. Assim, seguir-se-á uma breve descrição do mesmo, bem como dos fármacos até agora utilizados para a preparação de DDSs.

2.5. O CANCRO

No nosso dia a dia estamos em contacto com certas substâncias que podem contribuir para o aparecimento de cancros, os carcinogéneos. Estas substâncias têm sido detetadas em estudos realizados em animais e através de análises epidemiológicas da frequência de cancro na população. Um exemplo desse tipo de substâncias é o fumo do tabaco que é uma das maiores causas de cancro de pulmão. Cerca de 80% a 90% destes cancros deve-se aos carcinogéneos presentes no tabaco (benzo(a)pireno, dimetilnitrosamina e níquel). No entanto, o aparecimento de cancro é um processo muito complexo que envolve várias etapas e para além dos carcinogéneos há muitos outros fatores

que podem estar na base do seu desenvolvimento, como por exemplo, a radiação, as substâncias químicas e os vírus que atuam no DNA causando mutações [82].

Os tumores resultam de uma divisão celular incontrolada. As células cancerígenas apresentam falhas nos mecanismos que regulam a normal proliferação celular, a diferenciação e a sobrevivência das células. Normalmente, a divisão celular é regulada por um conjunto de fatores de crescimento extracelulares e defeitos na síntese, regulação ou reconhecimento destes fatores pode levar ao aparecimento de cancro [82-85].

As células normais que se vão tornando malignas, adquirem seis marcas que lhes conferem as suas características (Figura 2.9). Essas marcas são: a autossuficiência em sinais de crescimento, a insensibilidade a sinais de inibição de crescimento, a resistência à morte celular programada (apoptose), o potencial de replicação ilimitado, a indução de angiogénese e a invasão e metástase nos tecidos [86,87].

Devido às desregulações nestes fatores as células cancerígenas tornam-se autossuficientes.

Atualmente sabe-se que para além das seis marcas apresentadas, as células cancerígenas apresentam ainda mais duas. Uma é a reprogramação do metabolismo celular uma vez que as células neoplásicas para além do crescimento desregulado, precisam também de ajustar a energia metabólica para estimular esse crescimento e divisão. Outra é a evasão à destruição pelo sistema imunitário. Subjacente a estas marcas encontra-se a instabilidade do genoma, resultando em diversidade genética que acelera a aquisição e inflamação das células cancerígenas [86, 88]



Figura 2.9: As marcas do cancro [adaptado de 86].

Para que a proliferação celular ocorra, torna-se necessária a presença de vários nutrientes nomeadamente a glicose, aminoácidos, ácidos gordos, vitaminas e micronutrientes, entre outros. Muito destes nutrientes por serem hidrofílicos, são incapazes de atravessar a membrana plasmática das células. É neste ponto que as células tumorais se começam a distinguir das células normais, pois conseguem arranjar mecanismos que lhes permitem satisfazer essa necessidade crescente de nutrientes. A grande quantidade de vasos sanguíneos presentes nos tumores sólidos permite às células tumorais obter os nutrientes de que precisam através do fluxo sanguíneo [89].

Em 1926 Warburg *et al.* [90] descobriram que as células tumorais apresentam características metabólicas muito diferentes das células normais [91]. As células normais, em condições aeróbicas, utilizam a glicose como primeira fonte de energia, convertendo-a a piruvato no citosol através da glicólise e depois em dióxido de carbono na mitocôndria; quando em condições de anaerobiose, as células utilizam a glicólise anaeróbia uma vez que a função da mitocôndria se encontra suprimida devido à ausência de oxigénio, gerando-se lactato. Deste processo resulta a produção de apenas duas moléculas de ATP por cada molécula de glicose consumida, pelo que as células normais só utilizam este processo em condições anaeróbias [85, 89]. No entanto as células tumorais utilizam este processo como fonte preferencial de produção de energia, apresentando as funções mitocondriais reduzidas mesmo na presença de oxigénio [89]. Este elevado fluxo glicolítico é uma estratégia metabólica que permite às células tumorais assegurar a sua sobrevivência e crescimento mesmo quando as concentrações de oxigénio são reduzidas [92, 93].

O cancro é a principal causa de morte nos países industrializados e segunda nos países em desenvolvimento, o que faz desta doença um grande problema de saúde pública. Este tem vindo a aumentar de forma significativa nos países desenvolvidos devido ao envelhecimento da população e aos estilos de vida pouco saudáveis [94, 95].

Em 2008, estima-se que ocorreram 12,7 milhões de novos cancros e desses, 7,6 milhões resultaram em morte [94, 96].

2.5.1. O CARCINOMA COLORRETAL

O cancro colorretal (CRC) é o terceiro cancro mais comum e a quarta causa de morte no mundo [97-99]. Todos os anos este cancro é responsável por cerca de 400000 mortes em todo o mundo [100].

A incidência deste cancro na Europa tem vindo a aumentar desde 1975 sendo que em 2008 tinha um peso de 13,6% na percentagem de cancros. Pode dizer-se que o cancro colorretal é uma doença com “igualdade de oportunidades” uma vez que afeta de igual forma homens e mulheres [94, 97]. No

entanto, estima-se que 33% dos casos femininos e 53% dos casos masculinos de cancro colorretal possam ser reduzidos diminuindo a exposição a fatores de risco [99].

Fatores, como a falta de atividade física, o excesso de peso, o consumo excessivo de álcool e fumar, são reconhecidos como potenciadores do desenvolvimento do carcinoma colorretal [99, 101]. Grande parte dos câncros colorretais está associada a fatores ambientais. Apenas 20% dos casos de CRC têm base familiar e estes estão associados a síndromes bem definidas, como cancro colorretal hereditário sem polipose e polipose adenomatosa familiar [102].

A maioria dos CRCs tem origem no cólon sigmóide ou reto e os sintomas refletem a localização do tumor. Normalmente, os CRCs surgem como pólipos benignos superiores a um centímetro. Cerca de metade dos pólipos com mais de dois centímetros sofrem alterações malignas e os pólipos inferiores a cinco milímetros raramente sofrem essas alterações [103].

A carcinogénese do CRC envolve duas vias: a via “*canonical*” (sequência adenoma-carcinoma) ou “supressora” que envolve instabilidade cromossómica e a via “*mutator*” [105].

A via “*canonical*” está presente em cerca de 80% a 85% dos carcinomas colorretais e segue o modelo de Fearon e Vogelstein [104]. Esta abordagem propõe um modelo da carcinogénese colorretal que relaciona os eventos genéticos específicos com evolução da morfologia do tecido [105].

A transformação do epitélio normal em carcinoma envolve uma série de etapas. Um sistema passa de um epitélio normal para um micro adenoma, que por sua vez vai sofrendo diversas alterações até se tornar num adenoma grande originando por fim um cancro. Cada uma destas etapas deve-se a alterações em genes supressores tumorais (APC, p53 e DCC) e em oncogenes (K-*ras*) e também a desequilíbrio alélico nos cromossomas 5q, 8p, 17p e 18q (Figura 2.10) [105, 106].

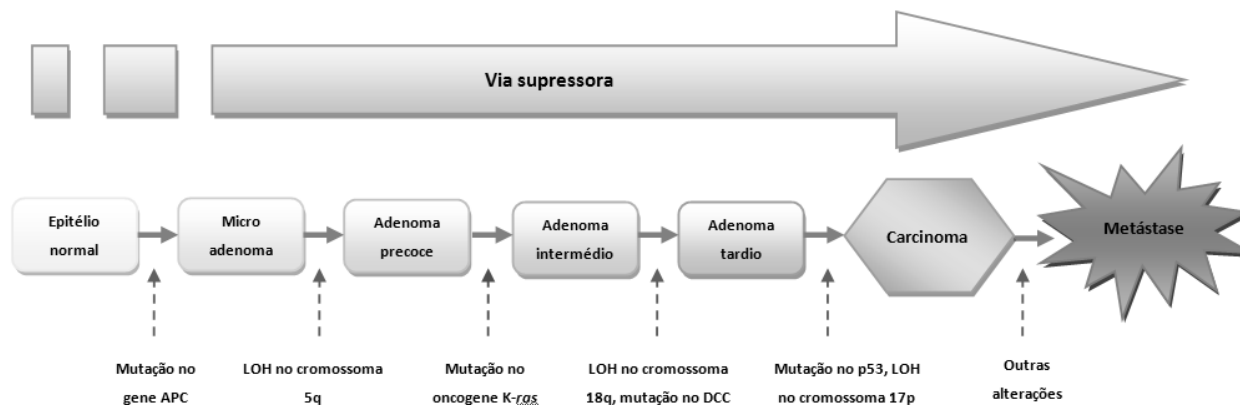


Figura 2.10: Alterações na via supressora [adaptado de 105].

A via “*mutator*” ocorre em cerca de 15% dos cancros colorretais esporádicos [105, 107].

Os tumores decorrentes desta via são caracterizados por uma instabilidade genética generalizada que perturba principalmente as sequências de microssatélites, geralmente resultado de um defeito nos genes hMLH1 E hMSH2. Estes tumores são designados de MSI-H (*microsatellite instabilityhigh*) [105, 107, 108].

Os tumores resultantes da via supressora e da via “*mutator*” apresentam características clínicas e histopatológicas diferentes [105].

O cancro colorretal pode ser diagnosticado quando o paciente apresenta sintomas ou através de um rastreio. No entanto, os sintomas de um cancro colorretal em fase inicial não são específicos (mudanças nos hábitos intestinais, desconforto abdominal geral, perda de peso sem causa aparente, cansaço constante), o que torna necessário um rastreio para um diagnóstico precoce [109].

Quando detetados precocemente cerca de 70 a 80% dos casos estão localizados apenas no órgão ou nos nódulos linfáticos locais e podem ser removidos recorrendo à cirurgia. No entanto, em alguns casos, mesmo após a cirurgia há ainda possibilidade da ocorrência de metástases. Assim, torna-se necessário que após a remoção cirúrgica do tumor, se realizem sessões de quimioterapia para garantir que, caso se encontrem já presentes, se destruam todas as metástases microscópicas diminuindo assim o risco de aparecimento de novos tumores [110, 111].

Um dos fármacos utilizados na quimioterapia do cancro colorretal é o 5-fluoro-1H,3H-pirimidina-2,4-diona.

2.6. FÁRMACOS

2.6.1. 5-FLUORO-1H,3H-PIRIMIDINA-2,4-DIONA

O 5-fluoro-1H,3H-pirimidina-2,4-diona, de nome comercial 5-fluorouracilo (5-FU) (Figura 2.11), de fórmula química $C_4H_3FN_2O_2$ e baixo peso molecular (130,08 g/mol), foi sintetizado em 1957 por Heidelberger *et al.* [112] e desde então tornou-se um dos agentes terapêuticos mais utilizados no tratamento de tumores sólidos, tais como o cancro da mama, cancro colorretal, entre outros [26, 113-117].

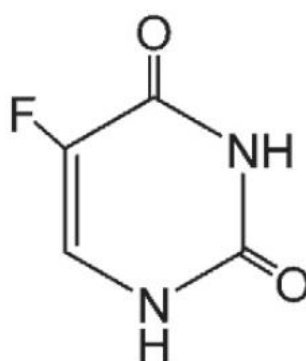


Figura 2.11: Estrutura do 5-fluoro-1H,3H-pirimidina-2,4-diona (5-FU) [118].

O 5-FU é um análogo do uracilo pelo que, para exercer o seu efeito, necessita de uma conversão a nível dos nucleótidos. Esta molécula é rapidamente metabolizada após a sua administração e origina fluoronucleótidos que têm propriedades antineoplásicas pois interfere com a síntese dos ácidos nucleicos, retardando o crescimento das células tumorais [113, 114, 117].

O seu mecanismo de ação tem sido associado à inibição da timidilato sintase e à sua incorporação no RNA e DNA [119].

Após a entrada na célula, o 5-FU é metabolizado através de duas vias metabólicas (Figura 2.12): a via anabólica que origina metabolitos ativos e a via catabólica que inativa 80 % do 5-FU no fígado e conduz à sua eliminação do organismo [113, 114].

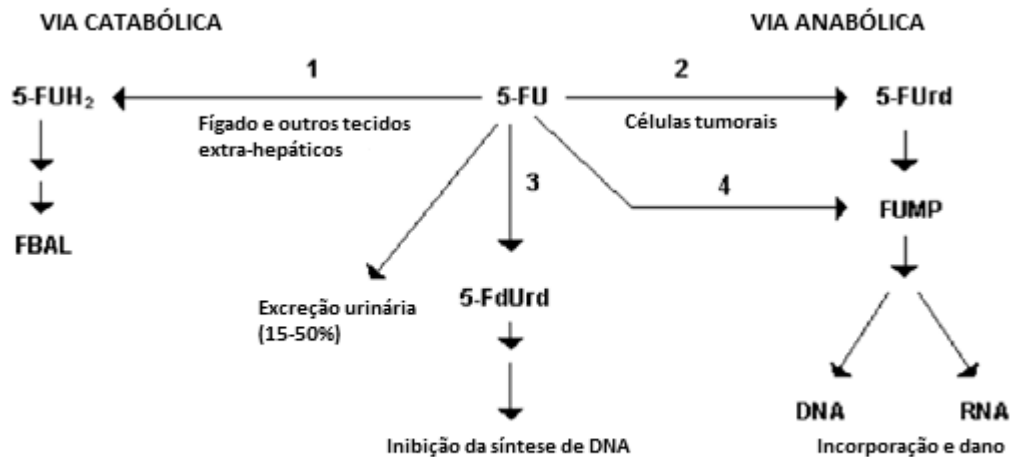


Figura 2.12: Via anabólica e via catabólica do 5-FU em humanos. 1: dihidropirimidina dehidrogenase (DPD); 2: uridinafosforilase; 3: timidina fosforilase; 4: fosforibosil-transferase. Abreviaturas: 5-FU (5-fluorouacilo); 5-FUH₂ (5-fluoro-5,6-dihidro-uracilo); 5-FUrd (5-fluorouridina), 5-FdUrd (5-fluoro-2-deoxiuridina); FUMP (5-fluorouridina-5-monofosfato) [adaptado 114].

A via anabólica do 5-FU (Figura 2.13) é um processo complexo uma vez que envolve várias reações paralelas. O 5-FU pode reagir em três fases distintas. Na primeira há a formação de 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (5-FdUMP), sendo esta fase a menos importante do ponto de vista quantitativo. Nas duas fases seguintes, ocorre a formação de 5-fluorouridina-5'-monofosfato (5-FUMP) que após fosforilações sucessivas origina o 5-fluorouridina-5'-difosfato (5-FUDP) seguido do 5-fluorouridina-5'-trifosfato (5-FUTP) que é incorporado no RNA substituindo a uridina-5'-trifosfato (UTP). O 5-FUTP pode ser conjugado com açúcares e originar açúcares 5-FU-nucleótidos. Por sua vez o 5-FUDP e o 5-FdUMP podem ser convertidos em 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-difosfato (5-FdUDP), que é fosforilado a 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (5-FdUTP) que atua como substrato para as DNA polimerase, sendo desta forma incorporado no DNA [113].

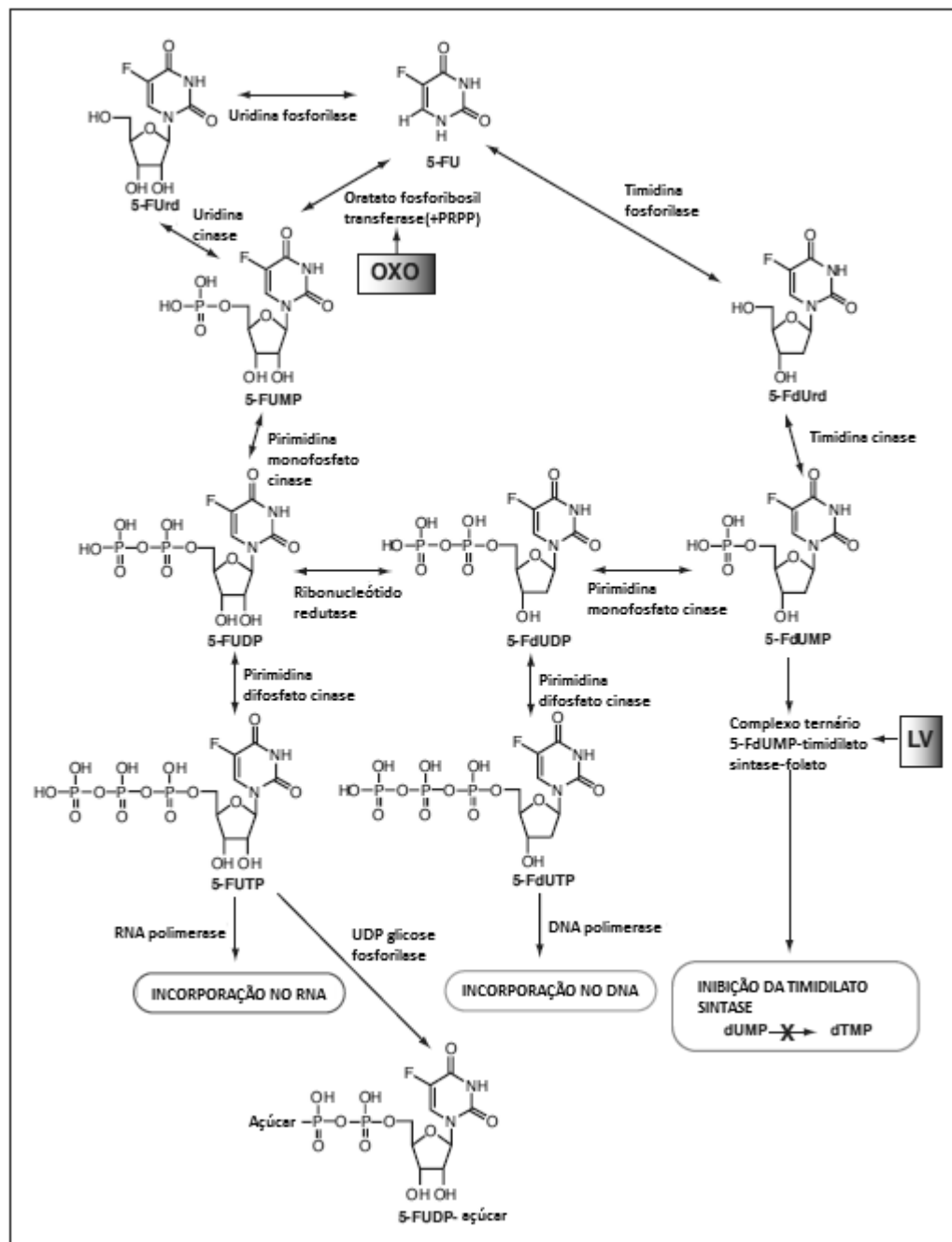


Figura 2.13: Anabolismo intracelular do 5-FU. Todos os compostos estão representados na forma neutra. A leuoverina (LV) e o oxonato de potássio (OXO) são moduladores bioquímicos do 5-FU. Abreviaturas: 5-FUrd (5-fluorouridina); PRPP (5'-fosforibosil-1-pirofosfato); 5-FUMP (5-fluorouridina-5'-monofosfato); 5-FUDP (5-fluorouridina-5'-difosfato); 5-FUTP (5-fluorouridina-5'-trifosfato); 5-FUDP-açúcar (açúcar 5-FU-nucleótido); 5-FdUrd (5-fluoro-2'-deoxiuridina); 5-FdUMP (5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato); 5-FdUDP (5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-difosfato); 5-FdUTP (5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato); dUMP (2'-deoxiuridina-5'-monofosfato); dTMP (timidina-5'-monofosfato) [adaptado de 114].

Aquando da administração do 5-FU no organismo, mais de 80% da dose injetada é degradada através da via catabólica de acordo com o esquema da Figura 2.14. Essa degradação é muito rápida na primeira etapa da via catabólica do 5-FU, na qual o 5-FU é reduzido a 5,6-dihidro-5-fluorouracilo

(5-FUH₂). Pode dizer-se que esta primeira etapa é uma etapa limitante, uma vez que é ela que gere a taxa a que o 5-FU fica disponível para a via anabólica. Numa segunda etapa, o 5-FUH₂ é clivado e origina ácido α-fluoro-β-ureidopropiónico (FUPA) e por fim, numa terceira etapa, ocorre a formação de α-fluoro-β-alanina (FBAL), o maior produto do catabolismo do 5-FU [113].

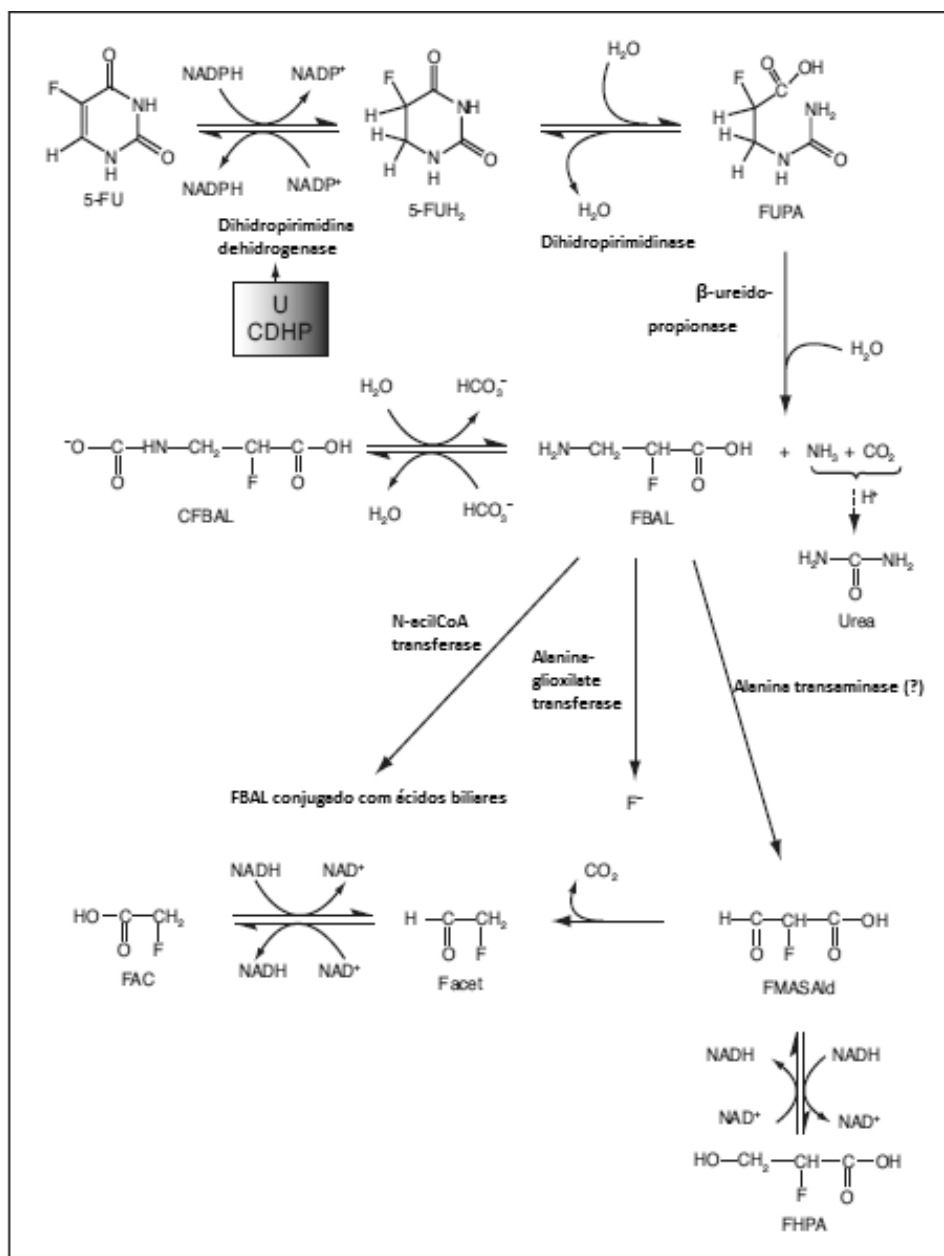


Figura 2.14: Via catabólica do 5-FU. Todos os compostos, com exceção do N-carboxi-α-fluoro-β-alanina (CFBAL) estão representados na forma neutra. U (uracilo) e CDHP (5-cloro-2,4-dihidropiridina) são inibidores da enzima dihidropirimidina dehidrogenase. Abreviaturas: 5-FUH₂ (5,6-dihidro-5-fluorouacilo); FUPA (ácido α-fluoro-β-ureidopropiónico); FBAL (α-fluoro-β-alanina); F⁻ (ião fluoreto); FMASAlD (ácido semi-aldeídico fluoromalónico); FHPA (ácido 2-fluoro-3-hidroxiopropanóico); Facet (fluoroacetaldeído); FAC (fluoroacetato) [adaptado de 114].

Apesar da sua larga utilização, o 5-FU apresenta uma ação farmacológica pouco seletiva pelo que, a sua administração é sempre acompanhada de toxicidade sistémica e, devido ao seu curto tempo de meia vida *in vivo*, não permite a obtenção de um efeito terapêutico prolongado [115, 117].

2.6.2. ÁCIDO α -CIANO-4-HIDROXICINÂMICO

Tal como já foi referido, os tumores malignos são altamente glicolíticos produzindo grande quantidades de ácido láctico, que pode levar à acidose intracelular e conseqüentemente desencadear a apoptose, e o CRC não é exceção. De forma a controlar esta acidose e a permitir a sua sobrevivência e proliferação, as células cancerígenas aumentam as taxas de efluxo de prótons e de lactato através de reguladores de pH, como sejam os transportadores de monocarboxilatos (MCTs) [120, 121].

Os MCTs são proteínas transmembranares expostas ao meio extracelular codificadas pela família de genes *SLC16*, que transportam para o exterior das células lactato ou piruvato juntamente com prótons desempenhando por isso um papel fulcral na regulação do pH [120-124].

A família dos MCTs é composta por catorze membros que possuem diferentes propriedades de transporte e distribuição em tecidos, sendo que, o rim expressa muitos destes membros [121]. Dos catorze MCTs existentes, apenas os quatro primeiros (MCT1, MCT2, MCT3 e MCT4) têm sido caracterizados funcionalmente e apresentaram resultados como catalisadores no transporte lactato, piruvato ou corpos cetónicos [125, 126].

O MCT1, codificado pelo gene *SLC16A1* localizado no cromossoma 1, encontra-se amplamente distribuído nas células animais e está bem caracterizado quer a nível funcional quer estrutural [125, 127, 128]. Este é especialmente importante no coração e músculos onde é regulado em resposta ao aumento do esforço, sugerindo por isso um papel importante na oxidação do ácido láctico [129, 130].

O MCT2 é codificado pelo gene *SLC16A7* localizado no cromossoma 12 (12q13) [123, 128, 131]. As suas propriedades cinéticas permitem estabelecer-lo como um transportador de prótons, porém, a sua característica bioquímica única é a sua elevada afinidade para o transporte do piruvato, o que sugere que este MCT é o transportador primário de piruvato no homem.

A expressão de mRNA do MCT2 humano é amplamente expresso em linhas de células cancerígenas, indicando que este MCT pode ser regulado pré-transducionalmente nas neoplasias [131].

O MCT3, codificado pelo gene *SLC16A8*, apresenta uma distribuição única estando confinado à membrana basal do epitélio pigmentado da retina e ao epitélio do plexo coroide [125, 132].

O MCT4, codificado pelo gene *SLC16A3* localizado no cromossoma 17, é expresso no mRNA e proteínas e fortemente expresso em tecidos glicolíticos, transportando por isso grandes quantidades de ácido láctico [125, 128, 132].

A utilização de inibidores de MCTs pode permitir a criação de novas terapias no tratamento do cancro, pois levam à redução da angiogénese do tumor, invasão e metastização. Um dos inibidores de MCTs mais utilizado é o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHC).

O ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHC) (Figura 2.15) com fórmula química $\text{HO}_2\text{CCH}=\text{C}(\text{CN})\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ e massa molecular de 189,17g/mol [16], é um inibidor competitivo dos transportadores de monocarboxilatos (MTCs) derivado do ácido cinâmico [125].

Foi Halestrap *et al.* [133] que descobriu que o CHC é um inibidor específico do transporte de lactato e piruvato quer na mitocôndria quer nos glóbulos vermelhos [133, 134]. Uns anos mais tarde, o potencial inibidor do CHC foi reforçado por Lehninger *et al.* que comprovou o seu efeito em células de ascites *Ehrlich* [134].

O CHC consegue retardar o crescimento de tumores quando direcionado ao MCT1, sendo a eficácia anti-tumoral da inibição do MCT1 restrita a células tumorais que expressam o MCT1 na membrana plasmática. Este efeito foi inferido após a utilização de dois modelos experimentais baseados na expressão de MCT1: carcinoma de pulmão Lewis (com MCT1 expresso na membrana plasmática e hepatocarcinoma (sem MCT1 expresso na membrana plasmática) [88].

Foi também demonstrado que a inibição do MCT1 através da utilização do CHC pode contribuir para a obtenção de melhores resultados da radioterapia [121].

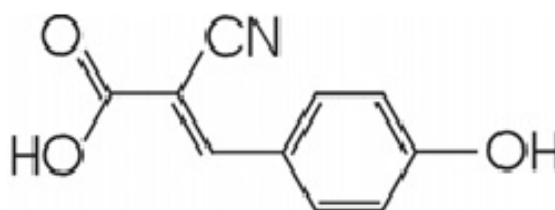


Figura 2.15: Estrutura do ácido α -Ciano-4-hidroxicinâmico (CHC) [135].

Capítulo 3

Procedimiento experimental

Neste capítulo será apresentado todo o trabalho experimental desenvolvido ao longo da tese. Este trabalho subdividiu-se em quatro componentes principais. As três primeiras componentes foram realizadas no Departamento de Química, enquanto que a quarta foi realizada no Instituto de Ciências da Vida e Saúde (ICVS) da Universidade do Minho.

A primeira componente consistiu na preparação dos DDSs baseados em zeólitos, seguindo-se a componente na qual se efetuaram os estudos de difusão do fármaco dos sistemas para a solução de PBS.

Numa terceira componente do trabalho experimental, foi efetuada a caracterização dos DDSs preparados, utilizando-se para este efeito diversas técnicas de caracterização estruturais e analíticas, nomeadamente o SEM, UV/Vis, FTIR, SAXS, RMN e a análise química elementar.

Por fim, na quarta componente, realizaram-se testes de viabilidade celular em linhas celulares de carcinoma colorretal de forma a averiguar a eficácia dos sistemas preparados, bem como ensaios de microscopia para observar a interação zeólito-células e DDSs-células.

3.1. ESTUDOS PRELIMINARES PARA A ESCOLHA DO SUPORTE DOS DDSs

O projeto desta dissertação vem dar continuidade aos estudos iniciados no âmbito do projeto individual da licenciatura em Bioquímica com o tema “*Drug delivery – Preparação de fármacos em estruturas nanoporosas*”. Nesse projeto, utilizaram-se como suporte dos DDSs as estruturas zeolíticas mordenite (NaMOR) e LTA (NaA) [136] e posteriormente a estrutura fausajite (NaY), e como fármaco o CHC. Os DDSs desses estudos foram preparados de forma similar à apresentada no item 3.3. e após a sua caracterização, foram testados em células da linha HCT-15 do carcinoma colorretal.

Os resultados desses estudos evidenciaram que o zeólito NaA permite a obtenção de efeitos satisfatórios na redução da viabilidade celular e potenciação do efeito do fármaco [136]. No entanto os estudos com o zeólito NaY, vieram demonstrar que é com esta estrutura que a redução da viabilidade e a potenciação da ação do fármaco é mais acentuada [137]. Desta forma, no desenvolvimento do projeto desta dissertação, optou-se por utilizar como suporte dos DDSs a estrutura NaY.

Também com base nos estudos anteriores, e uma vez que os resultados obtidos foram promissores, decidiu-se testar outro fármaco, o 5-FU que é utilizado no tratamento de diversos tumores sólidos, incluindo o cancro colorretal. Porém, sendo este um fármaco de pequenas dimensões, decidiu-se utilizar, para além do NaY outra estrutura zeolítica, a estrutura linde type L (nanoLTL). Este material apresenta poros e dimensões de partículas mais pequenas, o que permitirá estudar se o tamanho da partícula tem influência na difusão do fármaco dos DDSs para a solução e

consequentemente influência na redução da viabilidade celular. Com este mesmo objetivo, foi também utilizada a estrutura faujasite com tamanhos de partículas diferentes (NanoNa-Y).

3.2. MATERIAIS DE SUPORTE, FÁRMACOS E SOLVENTES UTILIZADOS

3.2.1. MATERIAIS DE SUPORTE

Como acima mencionado, os DDSs foram preparados tendo como base duas estruturas zeolíticas distintas: a estrutura FAU e a LTL. Dentro da estrutura FAU foram utilizados o zeólito NaY, com tamanho de partículas compreendidas entre os 100 e os 600 nm, e o NanoNa-Y, com tamanho de partículas de 150 nm. Por sua vez, o zeólito KLTL tem partículas de 80 nm.

O zeólito NaY, da *Zeolyst International*, na forma de um fino pó branco, foi previamente calcinado num forno modelo *Termolab* a 500°C de acordo com a Figura 3.1, de forma a garantir que todas impurezas presentes na estrutura zeolítica são removidas, evitando assim posteriores contaminações.

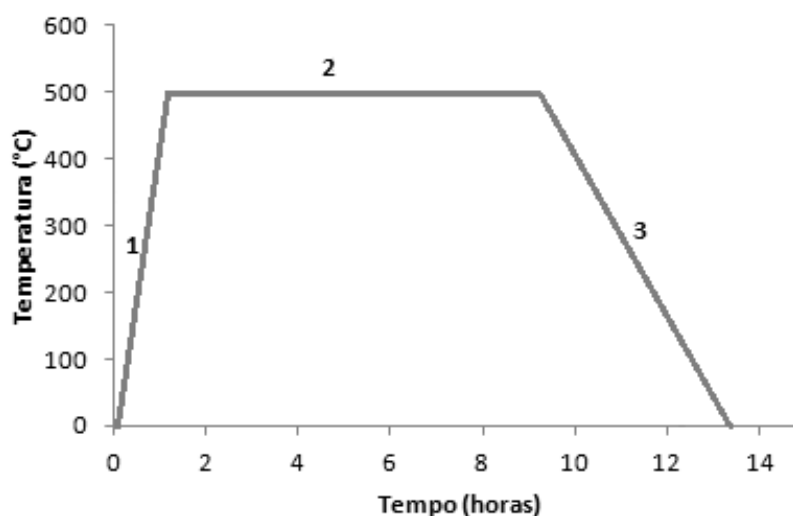


Figura 3.1: Representação do gradiente de temperatura utilizado para a calcinação do NaY. Curva 1, com a duração de 1h30min, corresponde à fase de aquecimento dos 20°C até aos 500°C, à velocidade de 5°C/min. Curva 2 a temperatura é mantida a 500°C durante 8h. Curva 3, com cerca de 4h, representa o arrefecimento até à temperatura ambiente [adaptado de 63].

Os zeólitos NanoNa-Y e KLTL, obtidos comercialmente da *Nanoscape*, apresentavam-se na forma de um fino pó branco. Contrariamente ao zeólito NaY, estes zeólitos não foram calcinados. Ambas as estruturas zeolíticas foram colocadas numa pistola de secagem *Büchi* a 100°C, durante 24 h, de forma a garantir que a água retida na estrutura cristalina do zeólito era libertada.

3.2.2. FÁRMACOS

O fármaco 5-fluoro-1*H*,3*H*-pirimidina-2,4-diona (5-FU) foi obtido comercialmente da *Sigma-Aldrich*, apresentando-se na forma de um fino pó branco.

O fármaco ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHC), utilizado no projeto individual de licenciatura, foi obtido comercialmente da *Sigma-Aldrich*, apresentando-se na forma de um pó amarelo fino.

Na Tabela 3.1 estão apresentadas as características dos fármacos estudados.

Tabela 3.1: Características dos fármacos utilizados na preparação dos DDSs

Fármaco	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g/mol)	Frases de Risco	Frases de Segurança	Pureza (%)	Marca
5-FU	C ₄ H ₃ FN ₂ O ₂	130,08	25-52	45	99	Sigma-Aldrich
CHC	C ₁₀ H ₇ NO ₃	189,17	36/37/38	26	98	Sigma-Aldrich

3.2.3. SOLVENTES

Para a preparação dos DDSs foram efetuados testes de solubilidade do 5-FU com metanol e acetona.

Na Tabela 3.2 são apresentadas as características dos solventes utilizados.

Tabela 3.2: Características dos solventes utilizados para a preparação dos DDSs

Solvente	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g/mol)	Frases de Risco	Frases de Segurança	Pureza (%)	Marca
Acetona	CH ₃ COCH ₃	58,08	11	9-16-23-33	99,5	Merck
Metanol	CH ₄ O	32,04	11-23/24/25-39	7-16-36/37-45	99,8	Riedel-de Haën

3.3. PREPARAÇÃO DOS DDS BASEADOS EM ZEÓLITOS

3.3.1. PREPARAÇÃO DOS DDS

Efetuuou-se o mesmo procedimento para ambos os fármacos e apresenta-se como exemplo, o procedimento seguido nos DDSs com 5-FU. Para a preparação dos DDSs pesou-se 100 mg do respectivo zeólito ao qual se adicionou uma solução de fármaco (130 mg, 0,999 mmoles) em 15 mL de solvente num balão de fundo redondo e colocou-se sob agitação a 300 rpm numa placa *Agimatic-E* durante 48 h à temperatura ambiente.

Finalizado o tempo de agitação, deixou-se repousar a mistura até à deposição do DDS no balão e decantou-se cuidadosamente o sobrenadante para um funil de placa porosa G4 (com poros de 1 nm de largura). Terminada a decantação e a filtração, colocou-se o balão e o funil numa estufa a 60°C durante 24 horas, após as quais se removeu do balão e funil a amostra preparada.

Os zeólitos de partida, NaY, NanoNa-Y e KLTL foram submetidos ao mesmo procedimento experimental, mas sem o fármaco, com o objetivo de estudara a influência do solvente na estrutura.

Na nomenclatura utilizada para apresentar os sistemas preparados, a estrutura que serviu de suporte ao fármaco é precedida pela abreviatura deste (5-FU). Para os sistemas preparados em metanol surge entre parêntesis a letra M. Na Tabela 3.3 estão apresentadas as designações de cada DDS preparado.

Tabela 3.3: Designação dos DDSs preparados

Solvente	Fármaco	Zeólito	DDS
Metanol	5-FU	NaY	5-FU@NaY (M)
Metanol	5-FU	NanoNa-Y	5-FU@NanoNa-Y (M)
Metanol	5-FU	LTL	5-FU@LTL (M)
Acetona	5-FU	NaY	5-FU@NaY
Acetona	5-FU	NanoNa-Y	5-FU@NanoNa-Y
Acetona	5-FU	LTL	5-FU@LTL
Acetona	CHC	NaY	CHC@Y
Acetona	CHC	NaA	CHC@A

3.3.2. MARCAÇÃO DO ZEÓLITO NaY COM RODAMINA B

Com o intuito de estudar se os zeólitos conseguem internalizar-se nas células, marcou-se zeólito NaY com rodamina B (RB) (Figura 3.2). Esta é uma substância muito utilizada como corante orgânico e apresenta um elevado coeficiente de absorção e fluorescência [138]. Na Tabela 3.4 estão apresentadas as suas características.

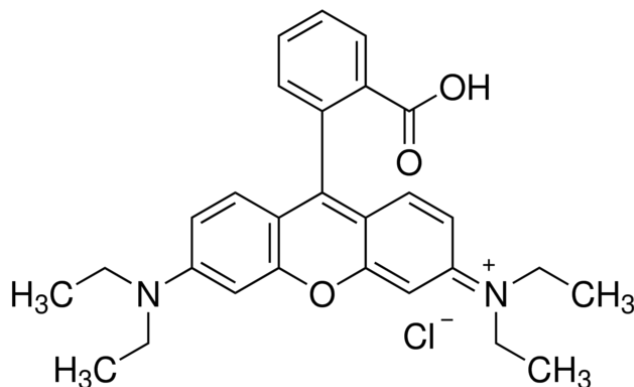


Figura 3.2: Estrutura da rodamina B [139].

Para a marcação do NaY, pesou-se 100 mg de zeólito às quais se adicionou uma solução de Rodamina B (20 mg, 0,042 mmoles) em 15 mL de acetona num balão de fundo redondo previamente revestido com papel de alumínio de forma a manter a solução protegida da luz. Colocou-se sob agitação a 300 rpm numa placa *Agimatic-E* durante 48 h à temperatura ambiente.

Terminado o tempo deixou-se repousar a solução até a deposição da amostra no balão e decantou-se cuidadosamente, sendo o sobrenadante rejeitado. Colocou-se o balão numa estufa a 60°C durante 24 h, após as quais se removeu a amostra preparada.

A amostra obtida será designada por RB@NaY.

Tabela 3.4: Características da rodamina B

Corante	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g/mol)	Frases de Risco	Frases de Segurança	Pureza (%)	Marca
Rodamina B	C ₂₈ H ₃₁ ClN ₂ O ₃	479,02	41-52/53	22-26-39-61	≥90	Merck

3.4. ESTUDOS DE LIBERTAÇÃO DE FÁRMACO

3.4.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

3.4.1.1. PRINCÍPIOS GERAIS DA TÉCNICA

A cromatografia é uma técnica analítica que consiste na separação de misturas pela distribuição dos seus componentes entre duas fases, uma estacionária e uma móvel. A cromatografia pode ser dividida em duas classes: cromatografia líquida e cromatografia gasosa [140, 141].

Na sua fase inicial a cromatografia líquida era realizada em colunas de vidro com diâmetro interno de 10 a 50 mm, empacotadas com partículas sólidas e recobertas por um líquido adsorvido que formava a fase estacionária. Apesar destas colunas permitirem a realização de separações notáveis, as análises eram muito demoradas. Com o desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em 1969 estes problemas foram ultrapassados [142, 143].

O HPLC é um tipo de cromatografia muito versátil, sendo muito utilizado para fins qualitativos e quantitativos. É frequentemente utilizada para separar e determinar espécies numa grande quantidade de compostos orgânicos, inorgânicos e biológicos devido à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade e devido à possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis [142, 144].

O HPLC utiliza uma fase móvel líquida para separar os componentes da mistura. A fase estacionária pode ser líquida ou sólida. Estes componentes primeiro são dissolvidos num solvente que é forçado a fluir através de uma coluna cromatográfica sob uma elevada pressão. Na coluna a mistura é separada nos seus diversos componentes [142].

O equipamento de HPLC (Figura 3.3) é constituído por uma fase móvel, uma bomba peristáltica, um sistema de injeção da amostra, colunas (fase estacionária), detetores e um sistema de aquisição de dados [145].

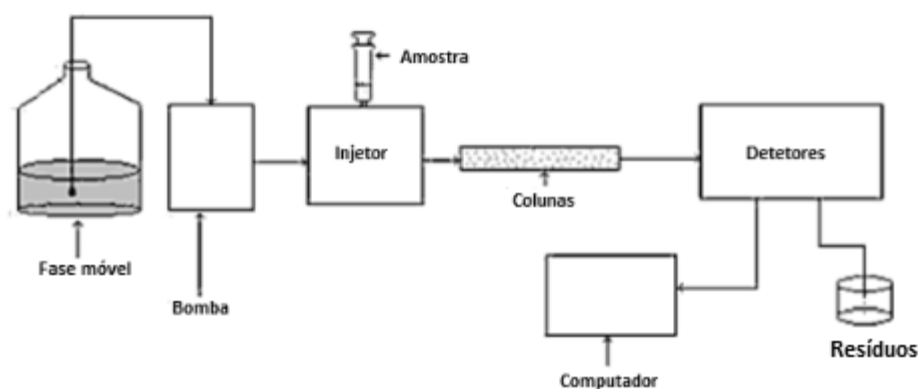


Figura 3.3: Diagrama esquemático de um HPLC [adaptado de 145].

A cromatografia líquida de alta eficiência pode ser utilizada para controlar a saída do fármaco da estrutura no qual foi inserido.

3.4.1.2. LIBERTAÇÃO DO 5-FU

A liberação *in vitro* do 5-FU a partir dos sistemas 5-FU@NaY, 5-FU@NanoNa-Y, 5-FU@LTL, foi avaliada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os DDSs foram suspensos em PBS e colocados num banho a 37°C durante 48 h. Em tempos pré-determinados foram retirados 5 mL da suspensão PBS/DDS e repostos 5 mL de PBS fresco. Para comparação de resultados, efetuou-se o mesmo procedimento mas colocando a suspensão de PBS/DDS em agitação.

O sistema de HPLC utilizado para a determinação do 5-FU foi um *Jasco-PU 980* equipado com um detetor UV (*Jasco-UV 975*) utilizando uma coluna LiChroCart 250-4 RP-18e/5 µm da *Merck*, com um *loop* de 20 µL. A fase móvel era constituída por tampão fosfato 0.01M em metanol/água (60/40), com um fluxo de 0,4 mL/min, sendo a detecção UV realizada a 260 nm.

3.5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

Como referido anteriormente, os zeólitos têm-se revelado materiais promissores no desenvolvimento de novas e avançadas tecnologias. Apesar da sua simplicidade, estes têm sido aplicados em diversos campos que vão desde a remediação ambiental até às aplicações na medicina. Assim, para que seja possível uma correta aplicação destes materiais é necessária a obtenção de informação detalhada acerca dos mesmos através de técnicas de caracterização e análise química.

Neste tópico serão apresentadas as técnicas de caracterização e análise utilizadas para a caracterização dos DDSs preparados.

3.5.1. ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

3.5.1.1. PRINCÍPIOS GERAIS DA TÉCNICA

A espectroscopia de infravermelho pode ser usada para se obter informação estrutural acerca do composto em estudo e para avaliar a pureza do mesmo, permitindo a obtenção de um espectro de uma forma rápida e simples [146].

A espectroscopia de infravermelho baseia-se nas vibrações das ligações químicas entre os átomos numa molécula. Um espectro de infravermelho é obtido fazendo-se incidir radiação infravermelha através das amostras e pode dizer-se que é uma impressão digital da amostra. Esta espectroscopia resulta numa identificação (análise qualitativa) de cada tipo de material e pode ainda dar indicação da quantidade de material presente através da análise do tamanho dos picos [147, 148].

Os primeiros espectrofotômetros, comercializados em 1940, eram do tipo dispersivo, ou seja, separavam a radiação nos seus componentes espectrais com o auxílio de um prisma ótico. Os prismas foram posteriormente substituídos por grades de difração permitindo uma melhor dispersão da radiação. No entanto, estes espectrofotômetros apresentavam diversas limitações, pelo que era necessária a obtenção de instrumentos mais eficazes. Isso aconteceu em 1970 quando se introduziu o interferómetro de Michelson (Figura 3.4) como elemento dispersivo, surgindo com esta introdução a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os instrumentos que se baseiam na transformada de Fourier são chamados interferómetros [147-149].

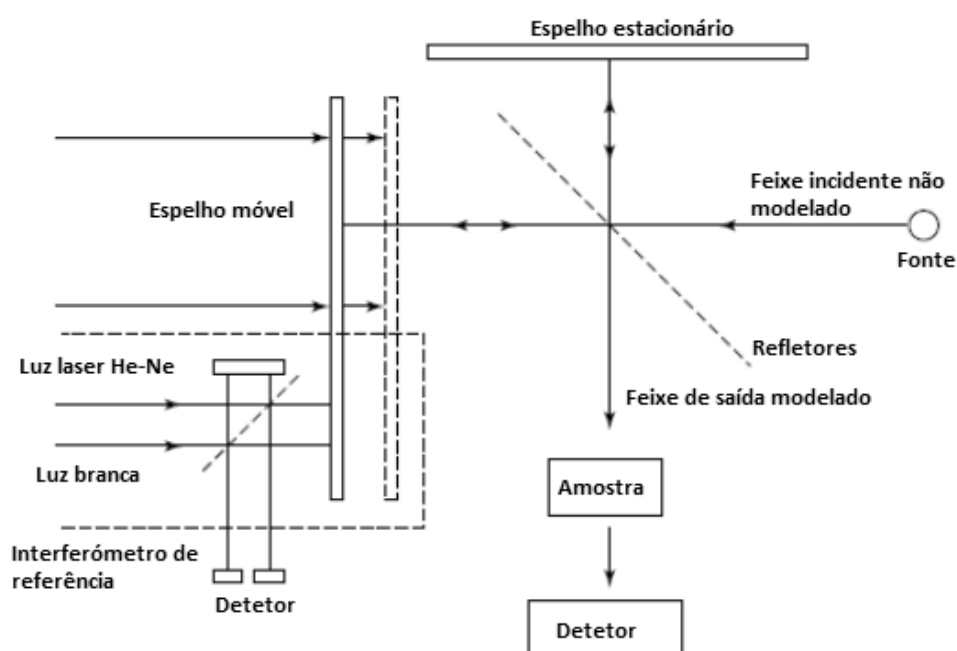


Figura 3.4: Representação esquemática do interferómetro de Michelson [adaptado de 148].

Um espectrofotómetro de FTIR é constituído pelos componentes apresentados na Figura 3.5. Dos componentes apresentados, o mais importante é o interferómetro de Michelson.

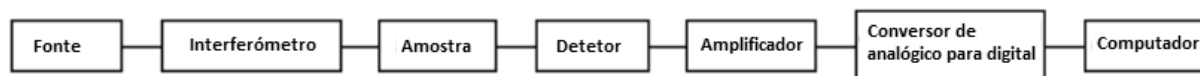


Figura 3.5: Componentes básicos de um espectrofotómetro de FTIR [adaptado de 148].

Os interferómetros permitem uma rápida medição do sinal, usualmente na ordem de um segundo, pelo que o tempo de medição por amostra demora apenas poucos segundos [147].

A maioria dos interferómetros utiliza um divisor de feixe que divide a radiação incidente em dois feixes, sendo um feixe transmitido para um espelho móvel e outro feixe refletido para um espelho fixo. Os dois feixes refletem-se e quando voltam a recombinar-se não se encontram em fase, interferindo um com o outro. O sinal resultante designa-se de interferograma [147, 148].

A radiação emergente da fonte passa através de um interferómetro e da amostra chegando depois a um detetor. Posteriormente, o sinal é amplificado e após essa amplificação os dados são medidos informaticamente sofrendo uma transformação de Fourier [148].

Os resultados obtidos por FTIR são extremamente precisos e reprodutíveis [147].

A técnica de FTIR revela-se muito útil quando se pretende caracterizar estruturas zeolíticas. Um espectro de infravermelho de um zeólito compreende as seguintes zonas (Figura 3.6): a 1250 e 950 cm^{-1} , onde se encontram as vibrações de estiramento assimétrico das ligações T-O-T; a 790 e 650 cm^{-1} , onde se encontram as vibrações de estiramento simétrico das ligações T-O-T; a 650-500 cm^{-1} e 420-300 cm^{-1} , que se referem às vibrações do duplo anel [61].

A água na estrutura zeolítica aparece numa banda entre 1600 e 1650 cm^{-1} e a 3000-3400 cm^{-1} correspondente aos OH [61, 63].

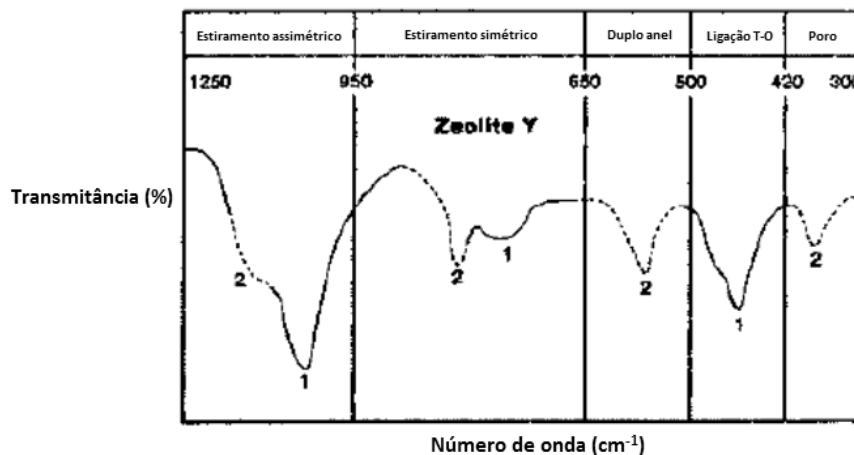


Figura 3.6: Vibrações características do zeólito Y [adaptado de 61].

Esta técnica pode ser usada na caracterização de DDSs baseados em zeólitos permitindo perceber os efeitos que a inserção do fármaco tem na estrutura zeolítica e ainda avaliar se o fármaco está presente na estrutura com o aparecimento de novas bandas de absorção.

3.5.1.2. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA ANÁLISE DOS DDSs

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos utilizando o espectrofotômetro FTIR BOMEM MB104 numa gama de número de onda na região dos 4000-500 cm⁻¹ e com uma resolução de 4 cm⁻¹. Fizeram-se pastilhas de KBr com uma razão mássica amostra/KBr de 2 mg de amostra por 98 mg de KBr. As misturas foram efetuadas num almofariz de ágata obtendo-se um pó fino e homogêneo. Posteriormente colocaram-se num sistema próprio e foram prensadas numa prensa *Manfredi* até cerca de 5 Ton para se obter pastilhas transparentes, que foram posteriormente analisadas.

3.5.2. ESPETROSCOPIA DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV/VIS)

3.5.2.1. PRINCÍPIOS GERAIS DA TÉCNICA

A técnica de espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV/Vis) é uma técnica de espectroscopia eletrónica que se baseia na absorção de luz na região do ultravioleta e visível (comprimentos de onda entre 100 e 700 nm). É uma técnica muito utilizada devido ao seu custo relativamente baixo e à sua grande aplicabilidade [63, 150].

A radiação de ultravioleta-visível tem a energia necessária para que os fótons interajam com os elétrons da amostra, provocando desta forma a excitação dos elétrons ligantes ou não-ligantes para orbitais de energias superiores [63].

Esta técnica fundamenta-se na Lei de Lambert-Beer. Em medidas de absorção de radiação num determinado comprimento de onda (λ), tem-se:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon bc \text{ (Eq. 3.1)},$$

onde A representa a absorvância, I_0 a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absorvidade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do λ da radiação incidente. Por sua vez c representa a concentração da espécie absorvente e b a distância percorrida pelo feixe através da amostra [150].

A técnica de UV/Vis permite obter informação estrutural da amostra. Há valores tabelados para os comprimentos de onda de absorção de determinados cromóforos quando se encontram isolados. No entanto, a presença de outros grupos funcionais ou de elementos muito eletronegativos, pode provocar alterações dos valores de λ tabelados.

Esta técnica é especialmente útil em química orgânica, em conjugação com outras técnicas de caracterização [63].

3.5.2.2. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA ANÁLISE DOS DDSs

De forma a verificar a presença do fármaco nos DDSs preparados com acetona, efetuou-se uma análise UV/Vis com nujol. Os espectros de UV/vis foram obtidos num espectrofotómetro UV-2501 PC da *Shimadzu*. As análises foram realizadas na região dos 700 a 200 nm. Utilizaram-se duas células de quartzo, de percurso ótico de 1 cm, em que uma continha nujol como referência e, outra a amostra a analisar numa razão amostra/nujol de 10 mg de amostra por 2 mL de nujol.

3.5.3. MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO (SEM)

3.5.3.1. PRINCÍPIOS GERAIS DA TÉCNICA

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM) permite observar e caracterizar materiais orgânicos e inorgânicos numa escala nanométrica e micrométrica fornecendo ao investigador uma imagem muito amplificada da superfície do material em estudo [149].

Um microscópio SEM é composto por uma coluna eletrónica que contém a fonte de eletrões, um sistema de lentes, uma câmara de vácuo para a amostra, um sistema de deteção da radiação gerada e um sistema que processa o sinal (Figura 3.7). Atualmente estes microscópios são ainda equipados com detetores de raios-X fazendo uso de um detetor de energia dispersiva [63, 149].

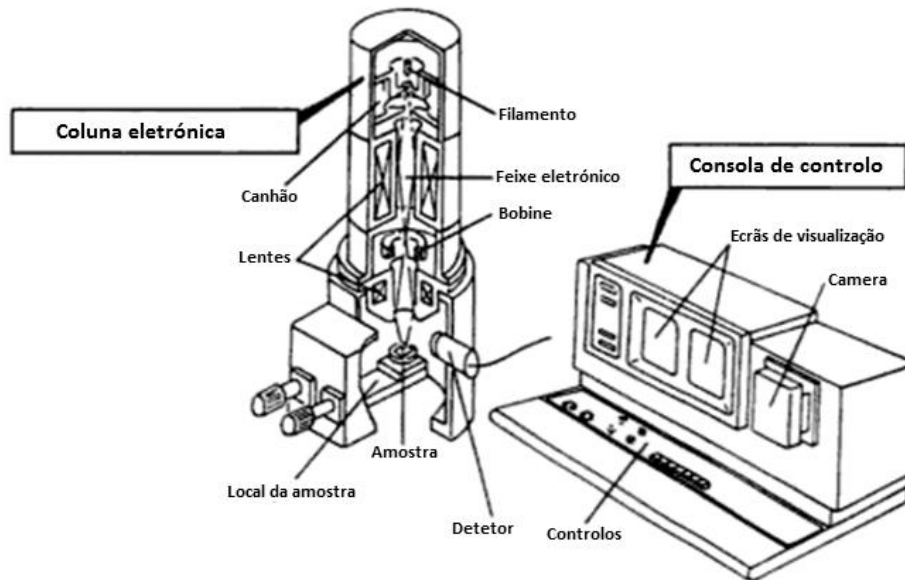


Figura 3.7: Os dois componentes principais de um microscópio SEM: coluna e consola eletrónicas [adaptado de 151].

Nesta técnica uma fonte emite um feixe de eletrões ao qual é aplicado uma diferença de potencial que pode variar entre 0,5 e 30 kV, provocando uma aceleração dos eletrões. A correção do percurso dos feixes é realizada por um sistema de lentes eletromagnéticas, que colima os feixes em direção à abertura da objetiva. Por sua vez a objetiva ajusta o foco dos feixes de eletrões antes que estes penetrem na amostra a analisar [152, 153].

Da interação do feixe de eletrões com a amostra resulta a emissão de diversos tipos de radiação e eletrões (Figura 3.8). Estas radiações fornecem informações sobre a composição, topografia, cristalinidade, potencial electrostático, campo magnético entre outras propriedades [153].

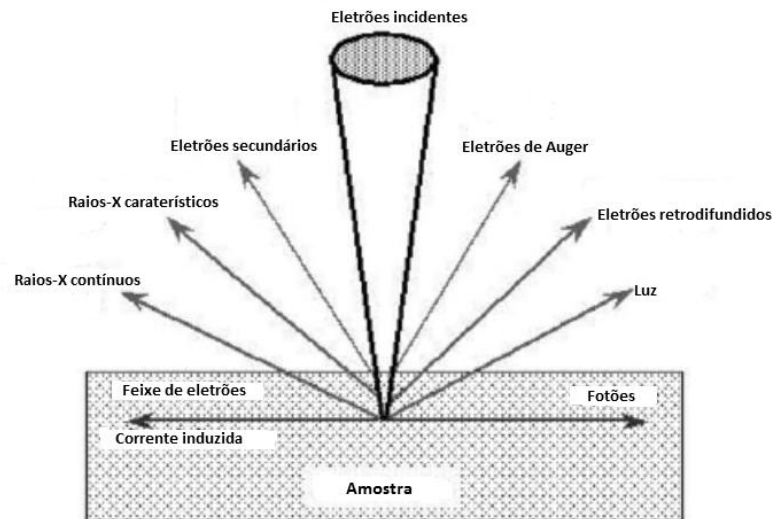


Figura 3.8: Representação esquemática dos sinais gerados quando um feixe de elétrons atinge a amostra [adaptado de 154].

A energia dispersiva de raios-X (EDS) é essencial à caracterização microscópica de materiais, permitindo a determinação da composição química da amostra. Quando o feixe de elétrons incide sobre um material, os elétrons internos dos átomos e dos iões que o constituem são excitados mudando de níveis energéticos. Quando regressam à sua posição inicial, libertam a energia adquirida na forma de radiação eletromagnética de comprimento de onda no espectro de raios-X. Um detetor instalado na câmara de vácuo do SEM, ao qual o EDS está acoplado, mede a energia associada a esse eletrão. Como os níveis de energia dos elétrons internos de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar os elementos presentes. O diâmetro reduzido do feixe permite a determinação da composição em amostras de tamanho muito reduzido ($< 5 \mu\text{m}$) [152].

As amostras a analisar por SEM devem ser condutoras. Porém, se esta condição não se verificar, as amostras não condutoras podem ser recobertas com um fino filme de uma substância condutora, evitando que se acumulem cargas superficiais que impeçam o feixe de atingir a amostra [63].

O SEM é uma técnica muito utilizada devido a diversos fatores, tais como a versatilidade dos seus modos de imagem, a sua excelente resolução, a simplicidade de preparação das amostras, a interpretação simples das imagens obtidas, entre outros [154].

3.5.3.2. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA ANÁLISE DOS DDSs

De forma a estudar a morfologia dos sistemas de libertação de fármaco preparados, efetuou-se microscopia eletrónica de varrimento (SEM). Foram feitas duas análises distintas. As análises ao zeólito NaY e ao sistema 5-FU@NaY foram realizadas num microscópio *Leica Cambridge S360*, equipado com sistema de EDS, numa ampliação de 5000×.

Por sua vez, as análises ao zeólito NaY, ao zeólito KLTL e aos sistemas 5-FU@NanoNaY e 5-FU@LTL foram efetuadas num microscópio *Nova NanoSEM 200*, equipado com sistema de microanálise por raios-X (EDS) e sistema de deteção e análise de padrões de difração de eletrões retrodifundidos (EBSD), em diferentes ampliações.

Em ambas as análises, as amostras foram colocadas numa fita de carbono sendo posteriormente recobertas com uma fina camada de ouro.

3.5.4 ANÁLISE QUÍMICA ELEMENTAR

3.5.4.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA ANÁLISE DOS DDSs

Foi efetuada análise química elementar de carbono, nitrogénio e hidrogénio a todos os DDSs preparados de forma a verificar a razão carbono/nitrogénio. Estes elementos químicos não estão presentes no zeólito, pelo que a razão obtida corresponderá à do fármaco e deverá estar de acordo com o valor teórico.

A análise elementar aos elementos carbono, hidrogénio e nitrogénio foi obtida num aparelho *Leco CHNS-932*.

3.5.5 ANÁLISES TÉRMICAS

Análise térmica é um termo abrangente, frequentemente utilizado para descrever técnicas analíticas que investigam o comportamento de amostras em função da temperatura. Quando submetida a uma variação de temperatura, uma dada substância pode sofrer alterações físicas e/ou químicas, reagir com os componentes do meio ambiente, perder água de cristalização, entre outras, sendo que muitas dessas transformações são acompanhadas por alterações de massa e/ou de libertação ou absorção de energia calorífica [155, 156].

De acordo com a Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria, análise térmica é definida como um grupo de técnicas analíticas nas quais uma propriedade da amostra é monitorizada em função da temperatura ou do tempo, enquanto é sujeita a um programa de

temperatura controlado numa atmosfera específica. Este programa pode envolver aquecimento ou arrefecimento a uma velocidade fixa ou variável, manutenção da amostra a temperatura constante, ou qualquer sequência destas três possibilidades [155].

As suas áreas de aplicação estendem-se desde o domínio científico ao industrial, onde adquire particular importância nas Indústrias Farmacêutica e Cosmética, Alimentar, dos Polímeros, quer na fase de investigação e desenvolvimento de um processo ou produto, quer na fase de controlo de qualidade de matérias-primas e produtos [156].

3.5.5.1. TERMOGRAVIMETRIA

PRINCÍPIOS GERAIS DA TÉCNICA

A termogravimetria (TG) é um ramo da análise térmica que avalia a variação de massa de uma amostra em função da temperatura (ensaios dinâmicos) ou em função do tempo a uma temperatura constante (ensaios isotérmicos).

Nem todos os eventos térmicos resultam na variação de massa da amostra, como é o caso da fusão, cristalização ou transição vítrea. No entanto essa variação de massa verifica-se tanto em fenómenos de desorção, absorção, sublimação, oxidação, redução, entre outros [145 e 157, 158].

A TG é utilizada para caracterizar a decomposição e estabilidade térmicas de materiais quando sujeitos a diferentes condições e para examinar a cinética de processos físico-químicos que ocorrem na amostra. Nesta técnica, a amostra é aquecida ou arrefecida a uma velocidade selecionada, ou pode ser mantida a uma temperatura constante [145, 157].

As variações de massa de um material estão fortemente dependentes das condições experimentais aplicadas. Há diversos fatores que têm influências importantes na curva de TG, nomeadamente a massa da amostra, volume, estado físico, forma e natureza da amostra, entre outros [157, 159].

Os resultados das análises de TG são apresentados sob a forma de gráficos, no qual, o eixo das abcissas contém os registos da temperatura (ou tempo) e o eixo das ordenadas contém os registos da variação de massa (Figura 3.9) [145, 157, 160].

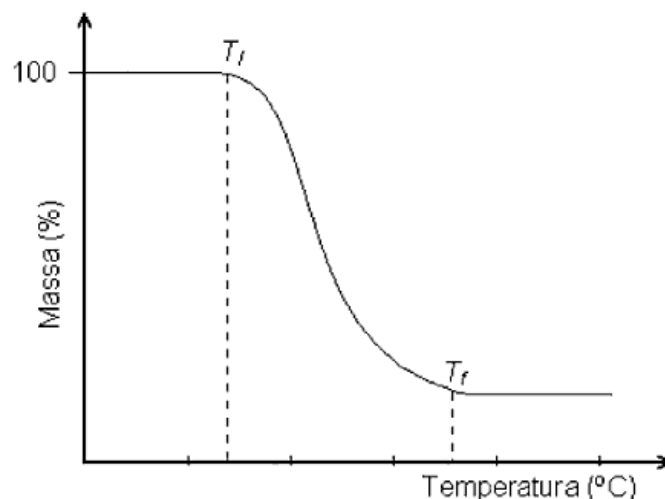


Figura 3.9: Curva de decomposição térmica de um material. T_i é a menor temperatura na qual pode ser detetado o início da variação de massa, para um determinado conjunto de condições experimentais (“onset”). T_f é a menor temperatura que indica que o processo responsável pela variação de massa foi concluído [145].

Os instrumentos equipados com software de aquisição de dados permitem monitorizar as alterações que ocorrem na amostra, permitindo também a obtenção da derivada da curva. Nestes equipamentos, a velocidade de variação de massa em função da temperatura (dm/dT) ou em função do tempo (dm/dt) é denominada de termogravimetria diferencial (DTG). Esta curva é muito útil quando os registos de TG apresentam sobreposições devido ao tipo de amostra ou mesmo às condições experimentais. A Figura 3.10 mostra o resultado de uma curva TG, a partir da qual foi calculada a curva de DTG [145, 158].

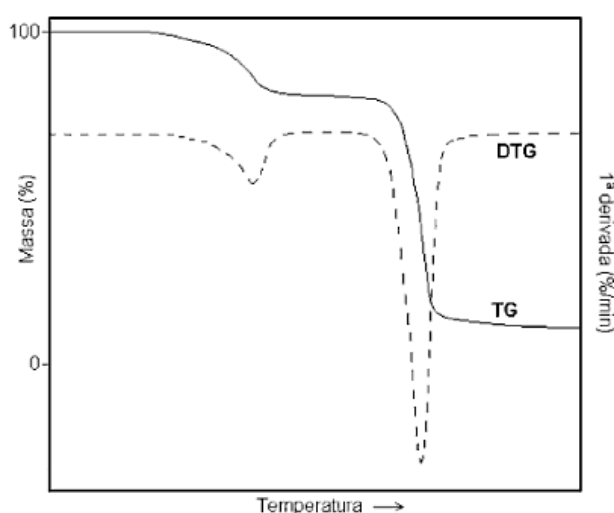


Figura 3.10: Curva de decomposição térmica de um material. A linha contínua representa a curva de TG e a linha tracejada está representada a derivada da curva de TG (DTG), onde os picos indicam as temperaturas onde a velocidade de decomposição é máxima. [145].

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA ANÁLISE DOS DDSS

Foram realizados ensaios termogravimétricos às amostras, utilizando um sistema de análise térmica *Netzsch STA 409 PC Luxx* ligado a um computador onde a aquisição de dados é feita pelo programa *STA 409 PC*, sob atmosfera de ar de elevada pureza com um fluxo constante de 50 mL.min⁻¹ de 50 até 700 °C cuja velocidade de aquecimento foi de 10 °C/min. Utilizaram-se cadinhos de 70 µL de óxido de alumínio, fornecidos pela *Shimadzu*, nos quais se colocou uma determinada quantidade de amostra.

3.5.6. DISPERSÃO DE RAIOS-X DE BAIXO ÂNGULO (SAXS)

3.5.6.1. PRINCÍPIOS GERAIS DA TÉCNICA

A técnica de dispersão de raio-X a baixo ângulo (SAXS) foi desenvolvida por Guinier em 1930 enquanto estudava a difração de raio-X em ligas metálicas [161, 162]. Desde então, esta técnica tornou-se uma ferramenta muito útil no estudo de materiais porosos e de nanomateriais, uma vez que permite determinar a sua geometria e organização das partículas ou agregados. Utilizando um equipamento de dispersão a baixo ângulo moderno, torna-se possível a observação de objetos com tamanhos compreendidos entre 1nm (10Å) e 20 µm (200,000Å) [161, 163-165].

Os raios-X com comprimentos de onda entre 0,1-100 Å e, dependendo do frequência da onda eletromagnéticas, possibilitam a observação de diferentes interações com a amostra, permitindo ainda detetar as flutuações de densidade eletrónica que refletem a heterogeneidade química dentro da amostra [163].

Os raios-X atingem a amostra com eletrões de energia de 10000 eV ou superior. Após a colisão, estes eletrões de elevada energia podem retirar eletrões dos átomos alvo, deixando camadas eletrónicas livres. Por exemplo, se a vaga é produzida na camada mais interna (K) do átomo, esta rapidamente será preenchida por um eletrão da camada seguinte (L), ou por um da camada M. Os fótons emitidos como resultado destas transições são os raios-X [166].

Os raios-X podem interagir com a matéria através de absorção, dispersão elástica ou inelástica (Figura 3.11). A dispersão elástica é o evento básico das técnicas de dispersão de raio-X. Neste tipo de dispersão, os fótons de raio-X incidentes são sujeitos a colisões perfeitamente elásticas com os eletrões, deixando a sua energia inalterada e levando à propagação de radiação a partir da amostra em todas as direções [166].



Figura 3.11: Fenómeno de dispersão [adaptado de 166].

As análises de SAXS normalmente são realizadas em modo de transmissão (Figura 3.12). Neste modo, o máximo de intensidade da dispersão, para qualquer material, depende da espessura do material,

$$x_{id} \approx \frac{1}{\mu(\lambda)} \text{ (Eq. 3.2),}$$

onde $\mu(\lambda)$ é o coeficiente de absorção.

Quando é utilizado um feixe de raio-X com um comprimento de onda longo ($\lambda \gg 1\text{\AA}$), um material típico apresenta uma absorção muito elevada pelo que a amostra a estudar deve ser muito fina. Por outro lado, quando os comprimentos de onda são muito pequenos ($\lambda \ll 1\text{\AA}$), a dispersão concentra-se em ângulos extremamente pequenos dificultando as análises. Por este motivo, grande parte das experiências de SAXS utilizam comprimentos de onda entre 0,7 e 1,7 \AA [166, 167].

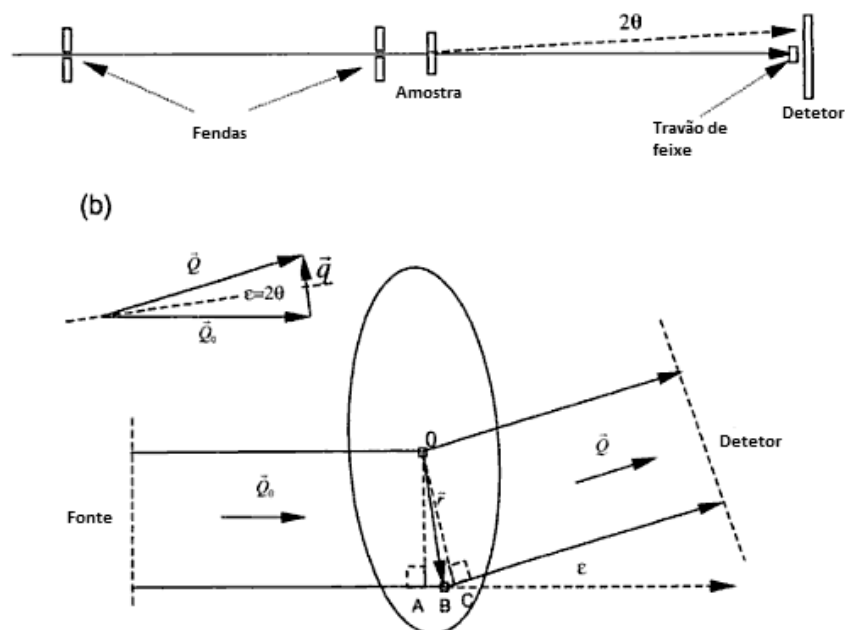


Figura 3.12: a) Representação esquemática da configuração de SAXS. (b) Direção do raio-X desde a fonte até ao detetor [adaptado de 167].

Os resultados das análises de SAXS normalmente são apresentados graficamente em termos da intensidade de dispersão *versus* o vetor de dispersão (Q),

$$Q = \left(\frac{4\pi}{\lambda}\right) \sin\left(\frac{\Theta}{2}\right) \text{ (Eq. 3.3),}$$

Onde Θ é o ângulo de dispersão e λ o comprimento de onda de raios-X. Se o ângulo de dispersão é pequeno, Θ não ultrapassa 5° , pelo que $\sin\left(\frac{\Theta}{2}\right)$ é aproximadamente $\left(\frac{\Theta}{2}\right)$ e Q é apenas o ângulo de dispersão expresso em \AA em vez de graus [163].

A técnica de SAXS é relativamente barata, não destrutiva e requer uma preparação de amostra reduzida. Contrariamente à microscopia eletrónica e ao RMN, as análises de SAXS podem ser realizadas em diversas condições. As medições são realizadas com cerca de $1,0 \text{ mg/mL}$ de amostra num volume de aproximadamente $15 \text{ }\mu\text{L}$ e geralmente demoram apenas alguns minutos [168, 169, 170].

3.5.6.2. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA ANÁLISE DOS DDSS

As análises de SAXS foram realizadas no Laboratório Elettra (Trieste, Itália).

3.5.7 ESPETROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO (RMN DE ESTADO SÓLIDO)

3.5.7.1. PRINCÍPIOS GERAIS DA TÉCNICA

Com a descoberta do fenómeno de ressonância magnética nuclear em 1964 por Bloch e Purcell a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) tornou-se uma das técnicas mais poderosas para estudar a estrutura e dinâmica de sistemas moleculares. Esta técnica baseia-se no facto das transições eletrónicas dos núcleos atómicos poderem ser induzidas por um campo magnético. Permite a análise estrutural de compostos orgânicos e inorgânicos sendo muito aplicada na química e biologia [171, 172].

O núcleo de certos elementos e isótopos comporta-se como se fosse um íman girando à volta de um eixo. Numa experiência de RMN, a amostra a analisar é sujeita a um campo magnético muito forte e a radiação eletromagnética. Quando a frequência do aparelho de RMN corresponde à frequência de ressonância característica do núcleo, os núcleos mudam de orientação, voltando à sua posição inicial quando se deixa de incidir radiação eletromagnética. Desta forma emitem uma radiação que é quantificada originando um espectro característico [172, 173].

Até aos finais de 1970 a técnica de RMN era essencialmente aplicada a líquidos. No entanto, com o desenvolvimento de técnicas de RMN mais sofisticadas tornou-se possível a obtenção de espectros de sólidos com boa resolução. A técnica de RMN de estado sólido fornece informação acerca da estrutura e pode ser aplicada a amostras cristalinas, microcristalinas e amorfas. A primeira aplicação de RMN de estado sólido nos zeólitos foi apresentada em 1979 [171].

A técnica de RMN tornou-se um método muito utilizado na caracterização de sólidos devido à introdução da técnica de rotação da amostra em torno do ângulo mágico (MAS-RMN). Esta técnica é também aplicada a zeólitos, cuja rede comporta núcleos com momento magnético não nulo ^{29}Si e ^{27}Al . Assim, utilizando RMN de ^{29}Si e de ^{27}Al pode determinar-se a razão de Si/Al [174].

Lippma *et al.* [61], mostraram que numa rede tridimensional $\text{Si}(\text{OSi})_4$, a substituição de átomos Si por átomos de Al conduz a um deslocamento do desvio químico no espectro de RMN para campos fracos de cerca de 5 ppm por átomo substituído (Figura 3.13). Porém, o desvio químico não varia apenas com o número de átomos de Al vizinhos (n), mas depende igualmente do ângulo TOT. A aplicação de RMN de ^{29}Si a zeólitos conduz geralmente a espectros nos quais se podem observar de um a cinco picos separados ($n=0, 1, 2, 3$ e 4) [174].

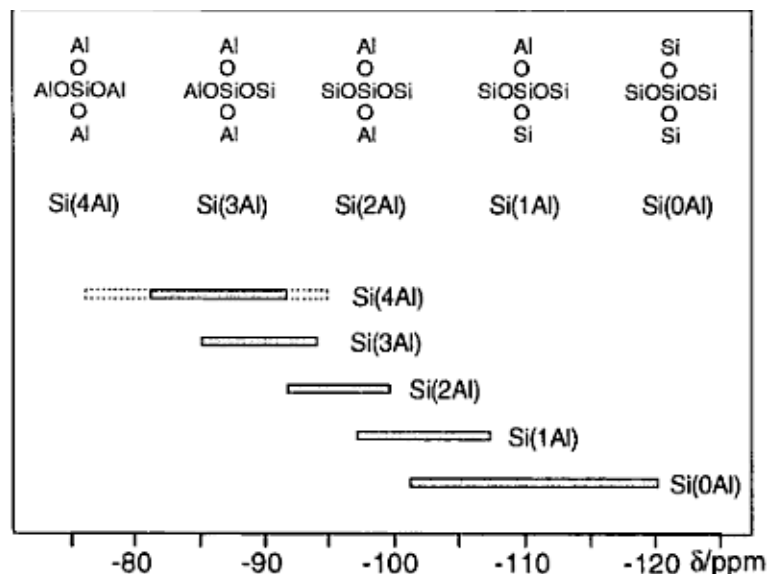


Figura 3.13: Intervalos de desvios químicos do ^{29}Si para unidades $\text{Si}(n\text{Al})$ em zeólitos. $\text{Si}(4\text{Al})$ -SOD refere-se a $\text{Si}(4\text{Al})$ em sodalites [171].

Através da Equação 3.4 é possível calcular-se a razão Si/Al :

$$(\text{Si}/\text{Al})_{\text{rede}} = \frac{\sum_{n=0}^4 I_{\text{Si}(n\text{Al})}}{\sum_{n=0}^4 \binom{n}{4} I_{\text{Si}(n\text{Al})}} \quad (\text{Eq. 3.4}),$$

onde $I_{\text{Si}(n\text{Al})}$ representa a intensidade do pico relativo às unidades constituídas por um átomo de Si ligado a n átomos de Al. Como a intensidade de cada pico é proporcional ao número de átomos Si respectivos, o número total de átomos Si é proporcional à soma das intensidades de todos os picos. Por outro lado, visto que cada átomo Al tem necessariamente quatro Si vizinhos, cada grupo Si-O-Al de uma unidade $\text{Si}(n\text{Al})$ compreende $\frac{1}{4}$ de átomo Al e, portanto, uma unidade inteira compreende $n/4$ de átomo de alumínio [174].

A razão Si/Al da rede pode também ser obtida a partir da composição global do zeólito e da sua caracterização por RMN de ^{27}Al [174].

3.5.7.2. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA ANÁLISE DOS DDSS

As análises de RMN do estado sólido foram realizadas num espectrômetro *Bruker Avance* (frequência Larmor de 400 MHz, ^1H) com *wide-bore* 9.4 T para o ^{13}C de rotação da amostra em torno do ângulo *spinning* (^{13}C -CP/MAS NMR) e para o espectro de MAS do ^{27}Al . A 4 mm foi aplicada a dupla ressonância com sonda MAS a 100.6 MHz (^{13}C) e 104.2 MHz (^{27}Al) nas frequências de Larmor. As amostras foram centrifugadas em porta amostras de ZrO_2 utilizando o ângulo de *spinning* a

velocidades de 14 kHz. O espectro de ^{13}C -CP/MAS NMR foi obtido utilizando a rampa (variando de 100% a 50% em amplitude usando 100 pontos); tempo de contacto foi 3.0 ms; impulso de excitação para ^1H a 90° foi 2.5 μs ; O comprimento do campo de rádio frequência aplicado para CP foi 87 kHz para o ^1H e 68 kHz para o ^{13}C ; a correção do ciclo foi de 5 s. A dissociação de TPPM-15 foi utilizada durante a aquisição do sinal básico TPPM com um comprimento de impulso de 4.75 μs ao longo do canal de ^1H , usando uma rádio frequência no campo de força de 100 kHz. Para as análises de ^{27}Al MAS, foi aplicado um comprimento de impulso de 0.50 μs , equivalente a um ângulo de inversão de 10° . Os desvios químicos do ^{13}C são apresentados em ppm em relação ao TMS e calibrados em relação à referência externa, glicina (CO, 176.03 ppm). Todos os desvios químicos do ^{27}Al são referenciados em relação à solução saturada de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$. As amostras foram colocadas num recipiente fechado em contacto com uma solução saturada de K_2SO_4 (humidade relativa de 97%) durante duas semanas, antes da aquisição dos resultados de RMN do estado sólido. Este protocolo foi necessário para garantir a hidratação das amostras e posterior reprodutibilidade dos resultados.

3.6. TESTES DE VIABILIDADE CELULAR

Os DDSs preparados foram testados no Instituto de Ciências da Vida e Saúde (ICVS) de forma a verificar a eficácia dos mesmos. Para tal foram utilizadas duas linhas celulares humanas, HCT-15 (Figura 3.14 (A)) e RKO (Figura 3.14 (B)), do carcinoma colorretal humanas fornecidas pela Dra. Raquel Seruca, IPATIMUP, Porto.

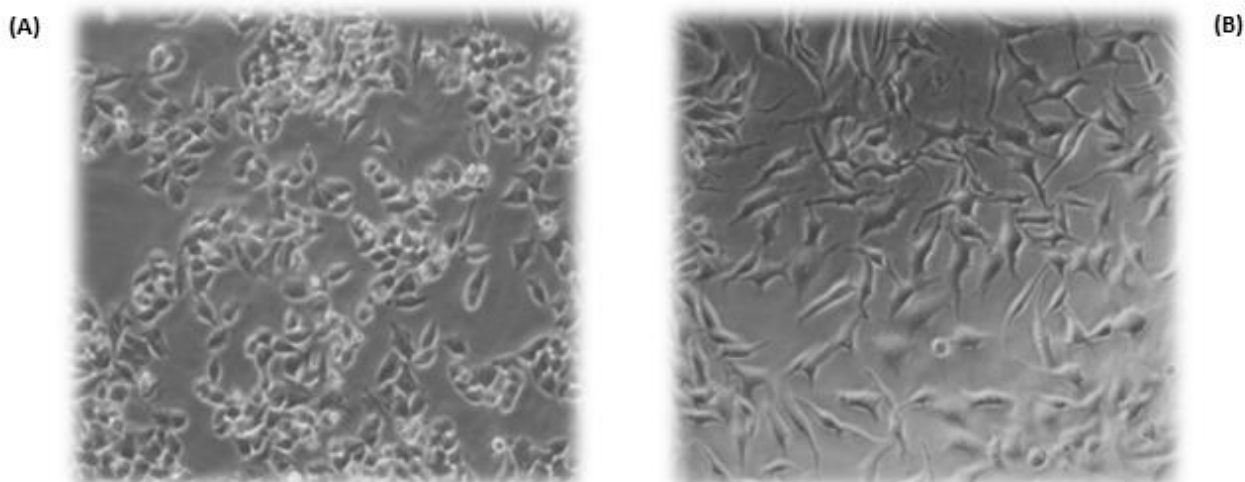


Figura 3.14: Linha celulares de carcinoma colorretal. (A) Linha celular HCT-15. (B) Linha celular RKO

3.6.1. CULTURAS CELULARES

As células HCT-15 do carcinoma colorretal foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Gibco, Invitrogen, USA*) enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) (*Gibco, Invitrogen, USA*) e solução de penicilina-streptomicina 1% (v/v) (Pen/Strep) (*Invitrogen, USA*).

A linha celular RKO foi cultivada em meio DMEM (*Gibco, Invitrogen, USA*) enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) (*Gibco, Invitrogen, USA*) e solução de penicilina-streptomicina 1% (v/v) (Pen/Strep) (*Invitrogen, USA*).

Ambas as linhas celulares mencionadas, foram incubadas a 37°C numa atmosfera húmida com 5% de CO₂.

3.6.2. APLICAÇÃO DOS DDSs NAS LINHAS CELULARES

Para testar os DDSs, foram plaqueadas células HCT-15 (7500 células/ 100 µL/poço) e RKO (6000 células/ 100 µL/poço) em placas de 96 poços e incubadas a 37°C numa atmosfera húmida com 5% de CO₂ durante 24 h.

Prepararam-se soluções *stock* 0,5mg/mL (1 mg de amostra/2 mL de meio de cultura sem FBS) de zeólitos e dos DDSs a testar. Estas soluções foram colocadas num ultrassom da *Fungilab S.A* durante 2 minutos de forma a homogeneizar o zeólito no meio de cultura, pois verificou-se que a solubilidade destas nanoestruturas em meio de cultura é reduzida, o que poderia levar à formação de aglomerados que falseariam os resultados. A partir das soluções *stock* foram efetuadas várias diluições de forma a obter as concentrações a testar: 0,1; 0,05; 0,025; 0,01 e 0,005 mg/mL.

De forma a avaliar os efeitos citotóxicos dos DDSs preparados, retirou-se o meio de cultura de ambas as linhas celulares e substituiu-se pelas soluções anteriormente preparadas deixando-se a incubar durante 48 h.

3.6.3 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada através de dois ensaios distintos, um baseado em sulforodamina B e outro em MTS.

3.6.3.1. ENSAIO BASEADO EM SULFORODAMINA B

O ensaio baseado na sulforodamina B (SRB) utiliza um kit da *Sigma-Aldrich*. Este teste mede a biomassa total baseado na quantidade de proteínas celulares pela coloração com o corante sulforodamina B. As células são lavadas, fixadas e por fim coradas. O corante incorporado é depois libertado das células numa solução Tris base. O aumento ou diminuição no número de células (biomassa total) resulta numa mudança concomitante da quantidade de corante incorporado pelas células, indicando desta forma o grau de citotoxicidade do material testado, neste caso, os zeólito e os DDSs [175].

Após as 48 h de incubação dos DDSs, removeu-se o meio de cultura e os poços foram lavados duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) 1 x de forma a garantir que o zeólito depositado na superfície das células era removido. Retirou-se o PBS e adicionou-se 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) frio de forma a fixar as células. Após uma hora de incubação a 4 °C, os poços foram lavados três vezes com água desionizada e deixados ao ar até secagem total dos mesmos. Posteriormente, adicionou-se sulforodamina B a 0,4 % e deixou-se à temperatura ambiente durante 30 min. Terminado o tempo de coloração, removeu-se a sulforodamina B e lavaram-se rapidamente as células três vezes com ácido acético 1 % e deixadas a secar até deixar de ser visível humidade (aproximadamente 30 min). Posteriormente, o corante incorporado nas células foi então solubilizado com 100 µL de uma solução Tris base 10 mM. Deixou-se a incubar durante 5 min à temperatura ambiente sobre um agitador com plataforma da *Grant bio*.

Por fim foi lida a absorvância a 570 nm com uma absorvância de *background* de 655 nm. As medições foram efetuadas num leitor de microplacas da *Tecan*.

A viabilidade celular foi determinada como percentagem: $(OD \text{ amostra}/OD \text{ controlo}) \times 100 (\%)$. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado.

A análise estatística dos resultados foi efetuada através da teste *one-way ANOVA* através do software *GraphPad Prism 5®*. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3.6.3.2. ENSAIO MTS

O ensaio MTS foi realizado de forma a confirmar os resultados obtidos no ensaio de SRB.

Este ensaio utiliza o composto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (MTS) que é reduzido a um composto colorido, o *formazan*, pela ação da enzima desidrogenase mitocondrial das células viáveis. A quantidade de produto produzido é diretamente proporcional ao número de células vivas e pode ser lido por volta dos 492 nm comprimento de onda onde a absorção do produto *formazan* é máxima [176-178].

Após as 48 h de incubação dos DDSs, removeu-se o meio de cultura com os DDSs e lavaram-se as células com 100µL de PBS 1%. Retirou-se o PBS e adicionou-se 100 µL de meio de cultura a cada poço, seguidos de 10 µL de MTS e deixou-se a incubar a 37°C durante 2 h.

Terminado o tempo de incubação, leu-se a absorvância dos poços a 490 nm num leitor de microplacas da *Tecan*.

A viabilidade celular foi determinada como percentagem: (OD amostra/OD controlo) × 100 (%). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado.

3.6.4. ENSAIOS DE MICROSCOPIA

3.6.4.1. MICROSCOPIA ÓTICA COM AZUL DE TRIPANO

Para estes testes foram plaqueadas células HCT-15 (10000 células/ 500 µL/poço) e RKO (50000 células/ 500 µL/poço) em placas de 24 poços em que cada poço selecionado continha uma lamela sobre a qual as células cresceram. As placas foram incubadas a 37°C numa atmosfera húmida com 5% de CO₂ durante 24 h.

As soluções stock para este ensaio foram efetuadas como descrito no item 3.6.2. A partir das soluções stock foram preparadas soluções com a concentração de 0,01 mg/mL.

A aplicação destas soluções nas células foi também realizada como descrito em 3.6.2.

Após as 48 h de incubação dos DDSs, removeu-se o meio de cultura e os poços foram lavados duas vezes com PBS 1 x.

Seguidamente, colocou-se a lamela contendo as células sobre uma lâmina, corou-se com azul de tripano e observou-se ao microscópio na objetiva de 100 x.

3.6.4.2. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

O zeólito NaY marcado com rodamina B foi utilizado para avaliar se este entra nas células. Para estudar este efeito, foram plaqueadas células HCT-15 (75000 células/ 1000 µL/poço) e RKO (50000 células/ 1000 µL/poço) em placas de 12 poços em que cada poço selecionado continha uma lamela sobre a qual as células cresceram.

A preparação das soluções *stock* de RB@NaY, soluções de concentração intermédias de 0,025 mg/mL e aplicação das soluções nas células foi realizado como descrito no item 3.6.2.

Após as 48 h de incubação do zeólito com rodamina B, removeu-se o meio de cultura. As células foram lavadas duas vezes com PBS-Tween 0,05 % (PBST 0,05 %) e fixadas com metanol frio durante 10 min. Após este tempo, as células foram novamente lavadas duas vezes com PBST 0,05 % e permeabilizadas com PBST 0,01 % durante 20 min.

Seguidamente, e após as células terem sido novamente lavadas duas vezes com PBST 0,05 %, foram bloqueadas com FBS 10 % em PBST 0,05 % durante 30 min, sendo posteriormente incubado o anticorpo anti-β tubulina (ab6046, Abcam®) diluído em 5 % FBS em PBST 0,05 % (1:700) durante 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBST 0,05 % (10 min cada lavagem) e incubadas com um anticorpo secundário anti-coelho, Alexa Fluor 488 (A11008, *Invitrogen*), diluído em 5 % FBS em PBST 0,05 % (1:1000) durante 1 h à temperatura ambiente.

Por fim, após três lavagens das células com PBST 0,05 % (10 min cada) e uma lavagem com PBS (5 min), as células foram montadas em meio de montagem *Vectashield* com 4',6'-diamidino-2'-fenilindole (DAPI) (*Vector Laboratories*). As imagens foram obtidas com um microscópio de fluorescência *Olympus IX81*, utilizando o software *Cell P*.

Capítulo 4

Resultados e discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos ao longo da realização de todo o trabalho experimental e apresentar-se-á organizado em quatro partes distintas.

Na primeira parte serão apresentados e discutidos os resultados de estudos efetuados anteriormente a este trabalho com o zeólito NaY e o fármaco CHC que serviram de fundamento à escolha da estrutura zeolítica como padrão a utilizar no trabalho desta tese.

Numa segunda parte serão apresentados os resultados da preparação das amostras, seguidos dos resultados da caracterização dos DDSs derivados de diferentes estruturas zeolíticas. A esta segunda parte, seguir-se-á uma terceira na qual serão apresentados os resultados dos testes de libertação de fármaco *in vitro*.

Finalmente, numa quarta parte, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nos testes dos DDSs em linhas celulares do carcinoma colorretal.

4.1. ESTUDOS PRELIMINARES PARA A ESCOLHA DO SUPORTE DO DDSs

Como já referido, este projeto visa dar continuidade aos estudos iniciados no âmbito do projeto individual da licenciatura em Bioquímica com o tema “*Drug delivery – Preparação de fármacos em estruturas nanoporosas*” [136], no qual se utilizou o CHC como fármaco e como suportes dos DDSs os zeólitos NaMOR e NaA e em estudos posteriores o zeólito NaY. Nestes estudos foram preparados três DDSs com diferentes concentrações de fármaco: 1:10 que representa os DDSs com menor concentração, 2:10 que representa uma concentração intermédia e 5:10 que representa a concentração mais elevada em CHC.

Serão apresentados os resultados dos testes de viabilidade celular na linha HCT-15 do carcinoma colorretal com os DDSs CHC@Y e o CHC@A.

A Figura 4.1 mostra o efeito do zeólito NaA e do DDS CHC@A na viabilidade das células HCT-15 do carcinoma colorretal.

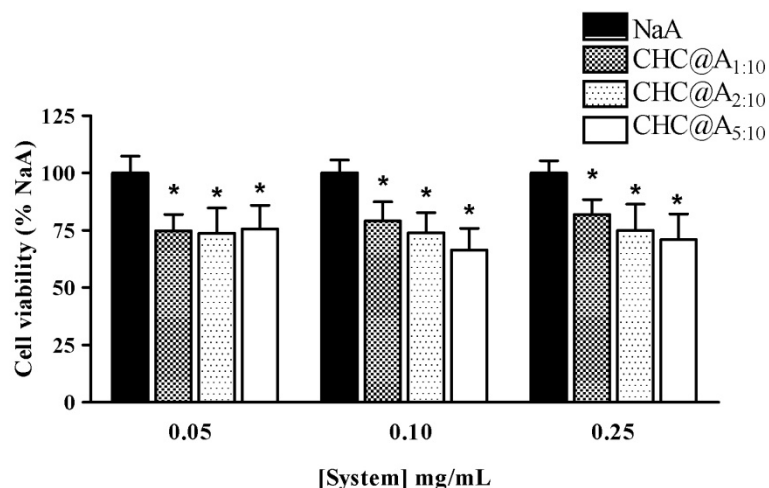


Figura 4.1: Efeito do NaA do CHC@A na viabilidade celular da linha HCT-15 do carcinoma colorretal. As células foram incubadas com diferentes concentrações de NaA e o CHC@A durante 24 horas. A viabilidade celular foi medida através do ensaio de SRB [88].

Os resultados apresentados mostram que o zeólito NaA sozinho não provoca redução da viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas. Por sua vez, para o CHC@A observa-se redução na viabilidade celular, sendo essa redução visível tanto no sistema CHC@A_{1:10}, como no CHC@A_{2:10} e CHC@A_{5:10}.

Na concentração de 0,05 mg/mL, verifica-se que os três DDSs têm efeito similar na redução da viabilidade celular. Já nas concentrações 0,10 mg/mL e 0,25 mg/mL a redução da viabilidade celular parece ser proporcional à concentração de CHC no DDS, isto é, quanto maior a concentração de CHC no DDS, mais significativa é a diminuição da viabilidade celular.

A Figura 4.2 apresenta os resultados do zeólito NaY e do DDS CHC@Y na viabilidade das células HCT-15 do carcinoma colorretal.

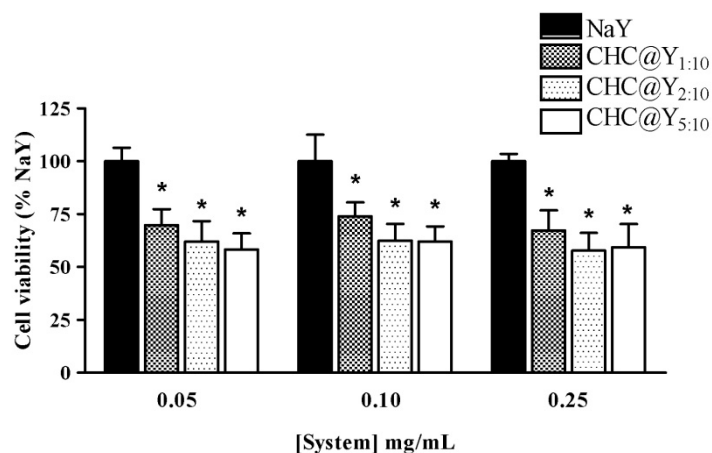


Figura 4.2: Efeito do NaY e do CHC@Y na viabilidade celular da linha HCT-15 do carcinoma colorretal. As células foram incubadas com diferentes concentrações de NaY e o CHC@Y durante 24 horas. A viabilidade celular foi medida através do ensaio de SRB [88].

Estes resultados vêm confirmar que o zeólito sozinho não é citotóxico para as células. Os DDSs testados por sua vez já revelam citotoxicidade uma vez que se verifica uma redução da viabilidade celular. Esta redução é mais acentuada para os DDSs com maior concentração de CHC (CHC@Y_{5:10}), não sendo no entanto evidente uma redução proporcional às concentrações de DDS testadas, uma vez que para a concentração 0,05 mg/mL observa-se uma maior redução do que nas concentrações seguintes.

Estes resultados demonstram ainda uma potenciação do efeito do CHC quando encapsulado nos zeólitos. Em testes em que se utilizou apenas CHC verificou-se que para a redução de 30% da viabilidade celular (IC₃₀) era necessária uma concentração de 6,43 mM de CHC. Nestes testes, utilizando o CHC@Y como referência e para a concentração de 0,5 mg/mL, o IC₃₀ é obtido para 0,011 a 0,054 mM de CHC (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Concentrações finais de CHC nos diferentes DDSs preparados [88].

DDS	0,50 mg/mL (mM)	0,25 mg/mL (mM)	0,10 mg/mL (mM)	0,05 mg/mL (mM)
CHC@A _{1:10}	0,198	0,050	0,020	0,010
CHC@A _{2:10}	0,377	0,094	0,038	0,019
CHC@A _{5:10}	0,876	0,219	0,088	0,044
CHC@Y _{1:10}	0,226	0,057	0,023	0,011
CHC@Y _{2:10}	0,435	0,110	0,044	0,022
CHC@Y _{5:10}	1,081	0,270	0,108	0,054

Os resultados vieram demonstrar que os DDSs preparados tanto com NaA como com NaY permitem obter efeitos satisfatórios na redução da viabilidade celular. No entanto, é com o NaY que ocorrem os melhores resultados pelo que se decidiu utilizar o NaY, como padrão, no trabalho desenvolvido nesta tese.

Devido aos resultados promissores da utilização dos zeólitos como DDSs para o tratamento do carcinoma colorretal, decidiu-se testar o 5-FU que é um fármaco classicamente utilizado no tratamento de diversos tumores sólidos, incluindo o cancro colorretal.

Este é um fármaco cuja estrutura apresenta dimensões inferiores ao tamanho dos poros do zeólito Y, então para além da utilização do NaY, decidiu-se utilizar mais dois zeólitos com tamanhos de partículas diferentes mas com o mesmo tamanho de poro, o NanoNaY e o nanoKLTL. O zeólito LTL é uma estrutura zeolítica unidimensional (1D) enquanto os zeólitos Y são tridimensionais (3D).

4.2. PREPARAÇÃO DOS DDSs

4.2.1. ESCOLHA DO SOLVENTE

Para avaliar qual o solvente utilizar na preparação dos DDSs efetuaram-se testes de solubilidade com metanol e acetona. Através desses testes verificou-se que o 5-FU é mais solúvel no metanol do que em acetona. Começou-se então por preparar três sistemas distintos: 5-FU@NaY (M), 5-FU@LTL (M) e 5-FU@NanoNa-Y (M). Após a preparação, estes sistemas foram caracterizados através da técnica de FTIR e foram efetuados testes preliminares de viabilidade celular.

Nas Figuras 4.3, 4.4 e 4.5 estão representados os espectros de FTIR dos sistemas 5-FU@NaY (M), 5-FU@LTL (M) e 5-FU@NanoNa-Y (M), do 5-FU e dos zeólitos NaY, LTL e NanoNa-Y.

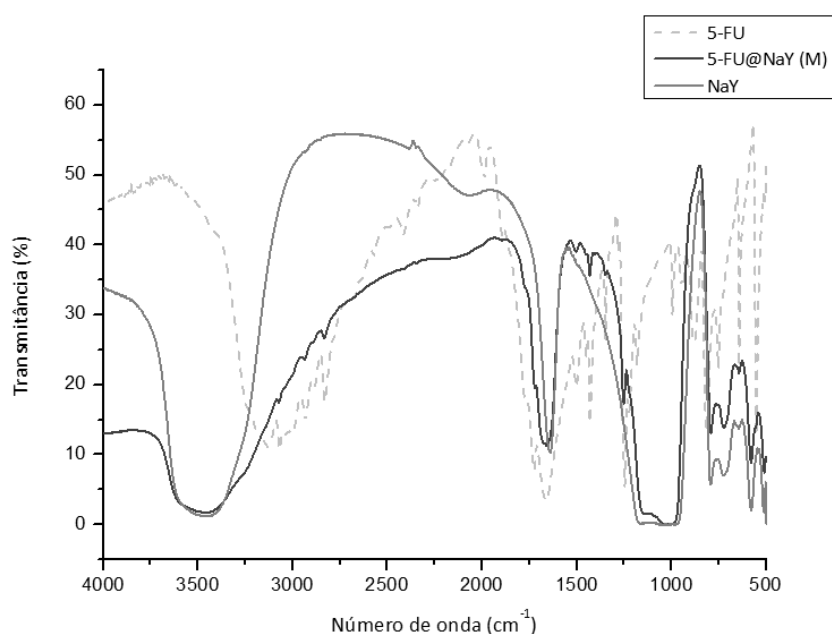


Figura 4.3: Espectro de FTIR do 5-FU, do 5-FU@NaY(M) e do NaY

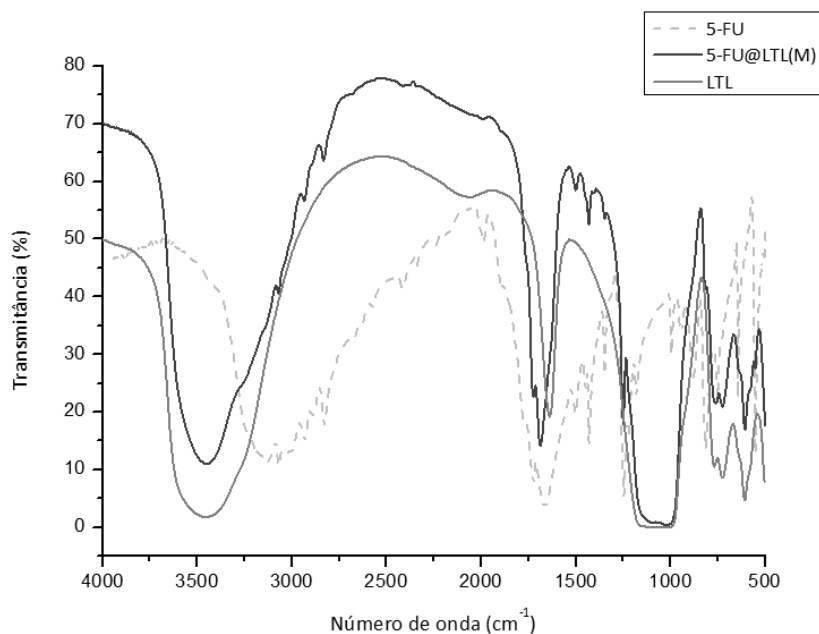


Figura 4.4: Espectro de FTIR do 5-FU, do 5-FU@LTL (M) e do LTL

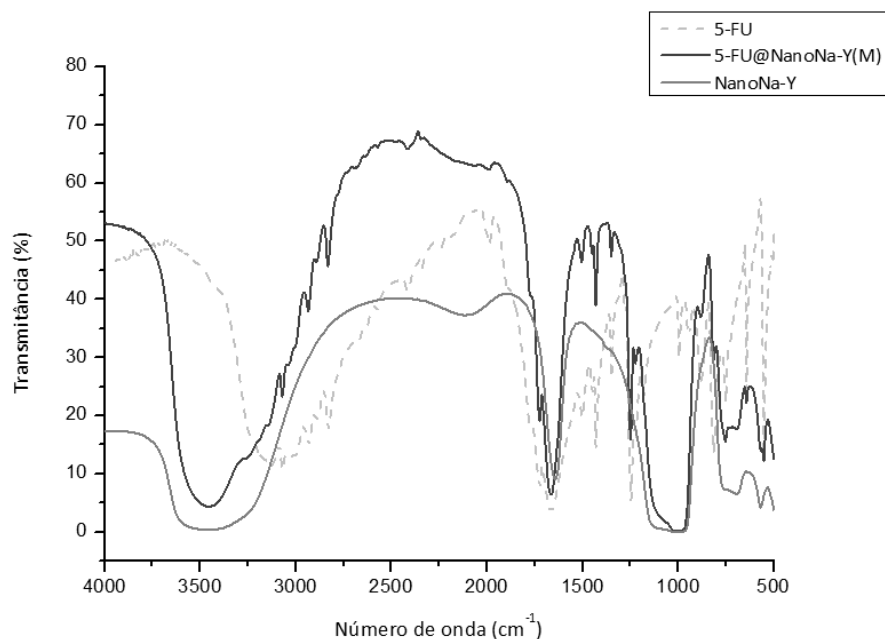


Figura 4.5: Espectro de FTIR do 5-FU, do 5-FU@NanoNa-Y (M) e do NanoNa-Y

Nos espectros referentes aos zeólitos NaY, KLTL e NanoNa-Y, observa-se a presença de diversas bandas de absorção que lhes são características. Verifica-se que todos apresentam uma banda larga entre 3000 e 3800 cm^{-1} e uma banda entre 950 e 1250 cm^{-1} , características das vibrações dos grupos TO_4 . Bandas de absorção idênticas continuam a ser observadas nos DDSs das diferentes estruturas zeolíticas estudadas.

Observando os espectros dos três DDSs preparados (5-FU@NaY (M), 5-FU@NanoNaY (M) e 5-FU@LTL (M)) não são observáveis desvios nas bandas características dos zeólitos. Por este facto, é possível inferir que o encapsulamento do fármaco nos zeólitos, não provoca alterações na estrutura zeolítica.

Nestes espectros é ainda notória a presença do fármaco nas estruturas zeolíticas, com o aparecimento de bandas de absorção características do espectro do 5-FU, sobretudo na zona em que o zeólito não absorve.

Procedeu-se de seguida os testes preliminares de viabilidade celular determinantes para a escolha do solvente, nas células da linha RKO do carcinoma colorretal.

A Figura 4.6 mostra o efeito do NaY tratado com metanol e do DDS 5-FU@NaY (M) na viabilidade das células do carcinoma colorretal.

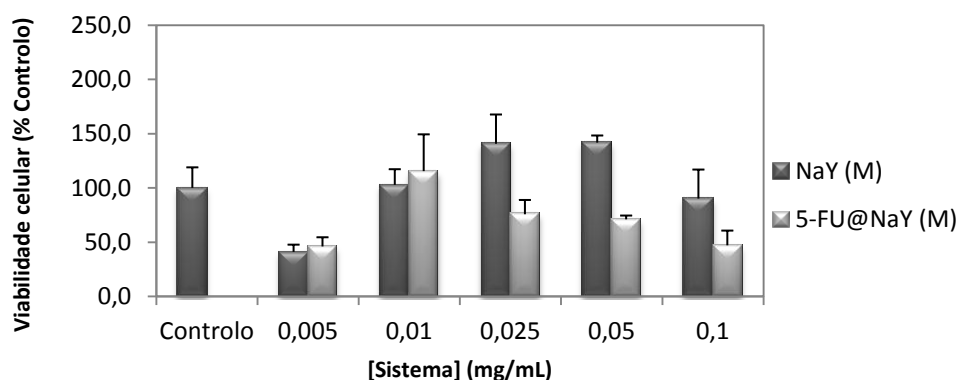


Figura 4.6: Efeito do NaY tratado com metanol e do 5-FU@NaY preparado com metanol na viabilidade da linha celular RKO do carcinoma colorretal. As células foram incubadas com diferentes concentrações de NaY e o 5-FU@NaY durante 48 horas. A viabilidade celular foi medida através do ensaio de SRB.

Observando os resultados deste ensaio, verifica-se que o zeólito sozinho, tratado com metanol, provoca uma redução na viabilidade celular de 59% para a concentração de 0,005 mg/mL relativamente ao controlo (apenas células). Esta citotoxicidade não é esperada uma vez que nos estudos anteriores, se comprovou que os zeólitos não são citotóxicos para as células. Então, esta redução da viabilidade celular não está relacionada com o zeólito, mas sim com o metanol. Este solvente é fortemente adsorvido no zeólito tornando difícil a sua completa evaporação da estrutura nos processos de secagem dos DDSs.

Observa-se ainda que nas concentrações mais altas de 5-FU@NaY (M) não há redução da viabilidade celular. Estes resultados podem ser explicados pelo facto de o metanol, devido à elevada

adsorção, impedir a difusão do fármaco para o exterior do zeólito, impossibilitando assim que o mesmo atue nas células.

A Figura 4.7 mostra o efeito do LTL tratado com metanol e do DDS 5-FU@LTL (M) preparado com metanol na viabilidade das células do carcinoma colorretal.

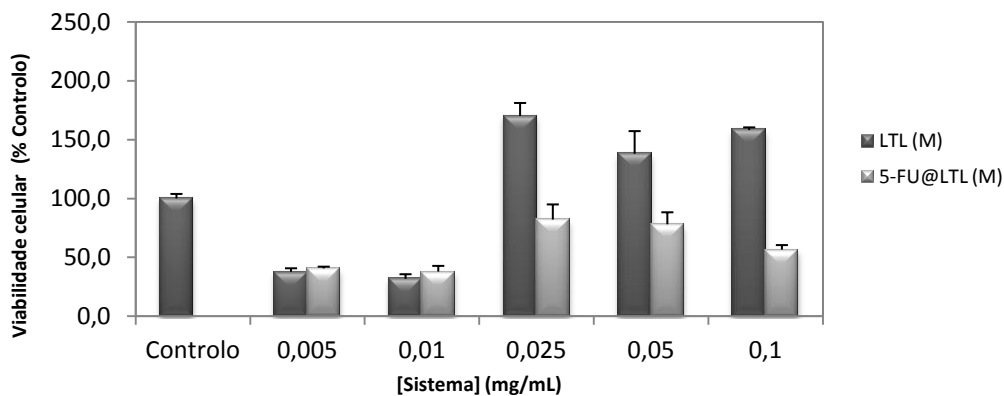


Figura 4.7: Efeito do LTL tratado com metanol e do 5-FU@LTL preparado com metanol na viabilidade da linha celular RKO do carcinoma colorretal. As células foram incubadas com diferentes concentrações de LTL e o 5-FU@LTL durante 48 horas. A viabilidade celular foi medida através do ensaio de SRB.

Estes resultados manifestam comportamento similar aos resultados apresentados na figura 4.6. Para este zeólito nas concentrações 0,005 mg/mL e 0,01 mg/mL ocorre morte celular com o zeólito sozinho. Na concentração de 0,005 mg/mL há uma redução de 62,3% e na concentração de 0,01 mg/mL uma redução de 68,3% em relação ao controle. Esta citotoxicidade do zeólito vem comprovar que o metanol não é um solvente adequado para a preparação dos DDSs em estudo.

Também à semelhança do que acontece com o 5-FU@NaY, não há redução da viabilidade celular com o 5-FU@LTL nas concentrações mais elevadas, pelos mesmos motivos anteriormente explicados.

Por fim, a Figura 4.8 mostra o efeito do NanoNa-Y tratado com metanol e do DDS 5-FU@NanoNa-Y (M) na viabilidade das células do carcinoma colorretal.

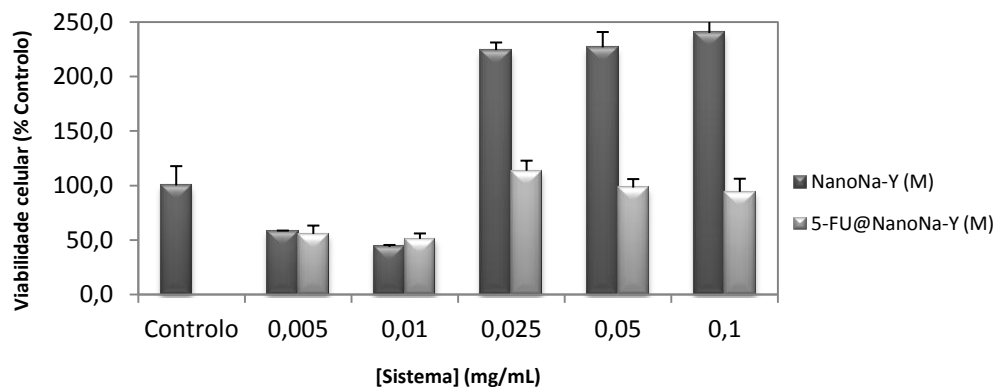


Figura 4.8: Efeito do NanoNa-Y tratado com metanol e do 5-FU@NanoNa-Y (M) preparado com metanol na viabilidade da linha celular RKO do carcinoma colorretal. As células foram incubadas com diferentes concentrações de NanoNaY e o 5-FU@NanoNaY (M) durante 48 horas. A viabilidade celular foi medida através do ensaio de SRB.

Mais uma vez, nestes resultados, verifica-se o mesmo comportamento dos resultados apresentados na Figura 4.7. Ocorre também uma acentuada redução da viabilidade celular com a utilização do zeólito sozinho nas concentrações de 0,005 mg/mL (41,8%) e 0,01 (56,5%) mg/mL relativamente ao controlo. Também para este DDS não se observa redução da viabilidade celular nas concentrações mais elevadas.

Os resultados obtidos nestes ensaios preliminares foram determinantes para o desenvolvimento do restante trabalho experimental. Estes permitiram verificar que o metanol não é um solvente apropriado para a preparação dos DDSs devido à sua forte interação com os zeólitos. Esta forte interação traduz-se numa dificuldade da completa evaporação do metanol da estrutura zeolítica, bem como na dificuldade na difusão do fármaco para o exterior dos zeólitos. A existência de metanol nos DDSs mostrou-se tóxico para as células.

Face aos problemas expostos para este solvente, decidiu-se abandonar a sua utilização e preparar novos DDSs utilizando acetona. A acetona é um solvente mais fácil de evaporar e estudos anteriores comprovam que sistemas preparados com este solvente não são tóxicos para as células [137].

Todos os resultados que se seguirão referem-se aos DDSs preparados com acetona.

4.2.2. COLORAÇÃO DOS DDSs

O 5-FU apresenta-se na forma de um fino pó branco (Figura 4.9), sendo de esperar que os DDSs com ele preparado mantenham essa coloração.

Este é um parâmetro simples mas importante pois é o primeiro sinal que indica se o processo de preparação decorre conforme o pretendido. Quando a coloração dos DDSs se desvia da coloração esperada, pode ser indicativo de erros no processo de preparação que podem advir de diversos parâmetros, nomeadamente da temperatura utilizada para a secagem dos sistemas. Este parâmetro permite detetar esses erros atempadamente e conseqüentemente ajustar o processo de preparação de forma a que o fármaco mantenha a sua integridade estrutural.

Todos os DDSs obtidos apresentavam a coloração branca (Figura 4.10), indicando que a preparação dos mesmos decorreu sem problemas.



Figura 4.9: Coloração do 5-FU.



Figura 4.10: Coloração dos DDSs preparados. (A) 5-FU@NaY, (B) 5-FU@LTL, (C) 5-FU@NanoNa-Y

4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.3.1. ANÁLISE QUÍMICA ELEMENTAR

Para avaliar a integridade estrutural do fármaco na estrutura zeolítica determinou-se a razão carbono/azoto (C/N) das amostras preparadas com acetona através dos resultados de análise química elementar. Os elementos carbono e o azoto apenas estão presentes no 5-FU, portanto os

resultados obtidos poderão indicar a presença do fármaco na estrutura e se a evaporação da acetona, solvente utilizado na preparação dos DDSs, foi completa.

Na Tabela 4.2 são apresentadas a razão C/N para o 5-FU@NaY, 5-FU@LTL e 5-FU@NanoNa-Y.

Tabela 4.2: Resultados da análise química às amostras 5-FU@NaY, 5-FU@LTL e 5-FU@NanoNa-Y

Elemento	Valor teórico	5-FU@NaY		5-FU@LTL		5-FU@NanoNa-Y	
		Análise 1	Análise 2	Análise 1	Análise 2	Análise 1	Análise 2
C	36,93	18,34	18,49	16,89	16,41	17,44	17,68
H	2,325	2,10	2,04	1,51	1,53	2,01	2,07
N	21,54	10,19	10,42	9,40	9,36	9,37	9,37
C/N	1,72	1,80	1,78	1,80	1,75	1,86	1,89
Média		1,79		1,78		1,87	

Pelos resultados obtidos verifica-se que a razão C/N dos sistemas 5-FU@NaY, 5-FU@LTL e 5-FU@NanoNa-Y é superior ao valor teórico. No entanto, nos sistemas 5-FU@NaY e 5-FU@LTL, esta razão difere apenas em algumas décimas logo a diferença não pode ser considerada significativa. Para o sistema 5-FU@NanoNa-Y a diferença entre a razão C/N teórica e a calculada já difere de forma significativa. Esta diferença pode dever-se à presença de solvente na estrutura zeolítica.

4.3.2. ANÁLISE POR UV/VIS

A análise de UV/Vis permitir avaliar se o fármaco se encontra presente nos DDSs preparados e avaliar a sua integridade molecular. Esta avaliação é feita comparando os espectros de UV/Vis dos DDSs com os espectros dos zeólitos de partida e com o espectro do fármaco.

Na Figura 4.11 estão apresentados os espectros de UV/Vis do zeólito NaY, do respetivo DDS e do fármaco.

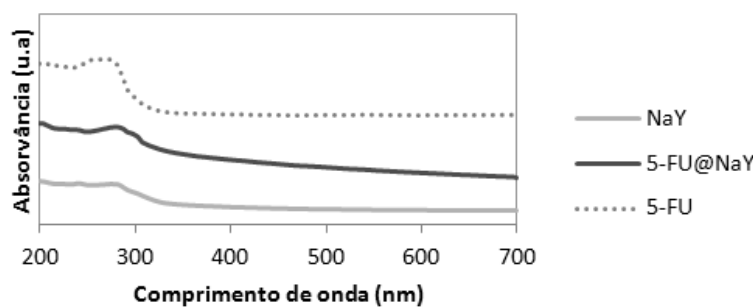


Figura 4.11: Espectro de UV/Vis do NaY, 5-FU@NaY e 5-FU obtidos em suspensões de Nujol.

No espectro do 5-FU observa-se a presença de uma banda entre 320 e 250 nm, que é a banda de absorção característica do fármaco. Esta banda está também presente no espectro do 5-FU@NaY, não aparecendo no entanto no espectro do NaY. Assim, devido à presença da banda do fármaco no espectro do 5-FU@NaY, é possível concluir-se que o fármaco está presente neste DDS e mantém a sua estrutura.

Na Figura 4.12 estão apresentados os espectros de UV/Vis do zeólito LTL, do respetivo DDS e do fármaco.

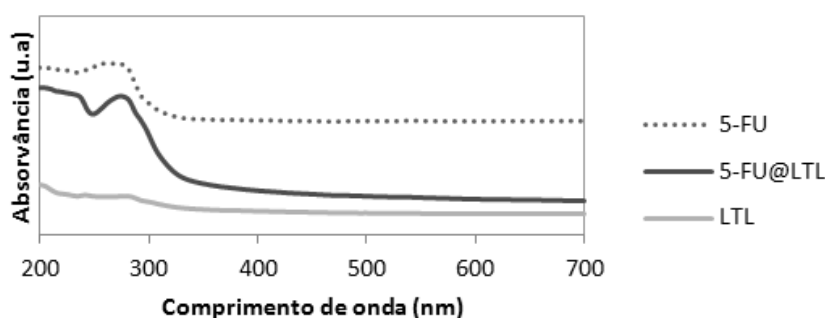


Figura 4.12: Espectro de UV/Vis do LTL, 5-FU@LTL e 5-FU obtidos em suspensões de Nujol.

À semelhança do observado nos espectros da Figura 4.11, também o espectro do 5-FU da Figura 4.12 apresenta a sua banda de absorção característica entre 320 e 250 nm. De igual modo para o sistema 5-FU@LTL verifica-se a presença desta banda, não sendo observada no espectro do LTL. Através destes resultados pode dizer-se que o 5-FU está presente no sistema 5-FU@LTL.

Na Figura 4.13 mostra os espectros de UV/Vis do zeólito NanoNa-Y, do respetivo DDS e do fármaco.

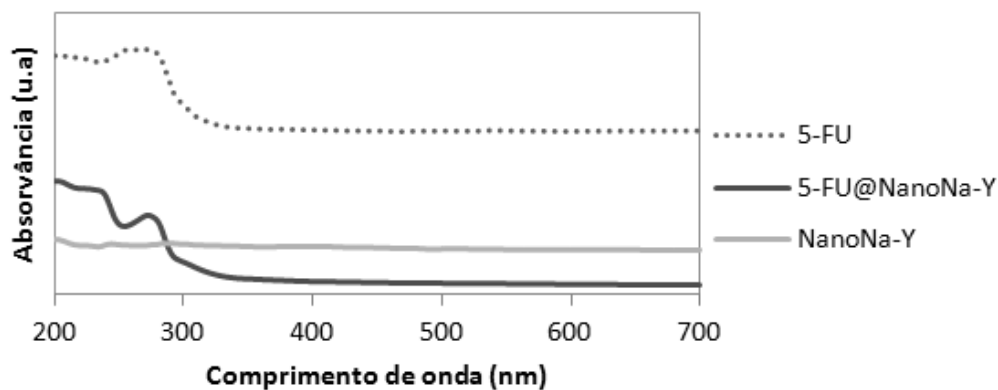


Figura 4.13: Espectro de UV/Vis do NanoNa-Y, 5-FU@NanoNa-Y e 5-FU obtidos em suspensões de Nujol.

No espectro do 5-FU@NanoNa-Y observa-se uma banda na mesma zona que se observa no espectro do 5-FU, 320 a 250 nm. À semelhança dos espectros do NaY e LTL, também no espectro do NanoNa-Y não é visível nenhuma banda na região de 320 a 250 nm. Desta forma, a banda que aparece no espectro do 5-FU@NanoNa-Y provém do 5-FU, o que comprova a presença do fármaco no DDS.

Os resultados obtidos por esta técnica confirmam que o fármaco foi encapsulado com sucesso nos zeólitos que lhe serviram de suporte e que o 5-FU mantém a sua integridade estrutural.

4.3.3. ANÁLISE POR FTIR

A análise por FTIR é importante na caracterização dos DDSs, uma vez que permite avaliar a presença do fármaco nos zeólitos devido às bandas de absorção características do fármaco estarem presentes em regiões nas quais o zeólito não absorve, e verificar se a estrutura dos mesmos é alterada aquando da inserção do fármaco.

Na Figura 4.14 estão representados os espectros de FTIR do 5-FU, NaY e 5-FU@NaY obtidos na região entre 4000 e 500 cm^{-1} .

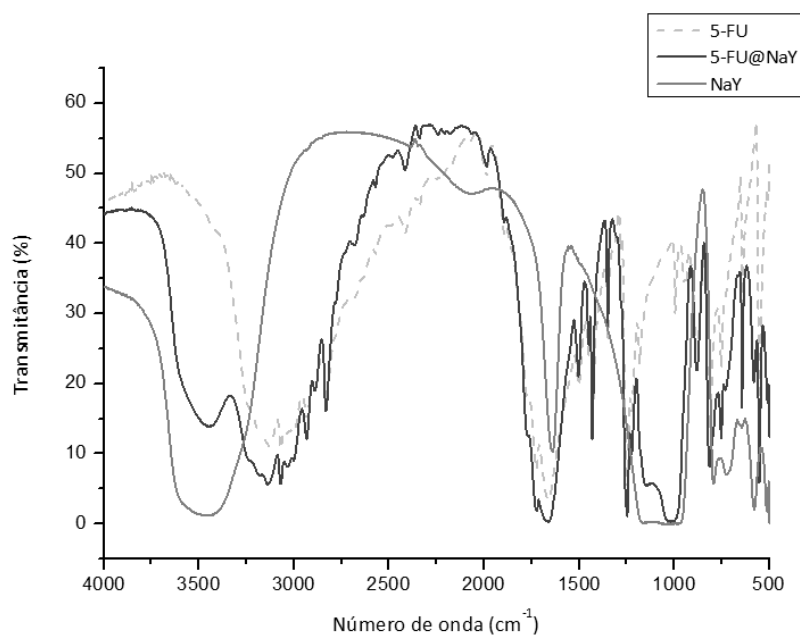


Figura 4.14: Espectros de FTIR do NaY, 5-FU e 5-FU@NaY

No espectro referente ao NaY, é possível observar a presença de diversas bandas de absorção estruturais que lhe são características.

A banda larga a 3469 cm^{-1} deve-se a vibrações de alongamento (O-H) e deriva dos grupos hidroxilo presentes à superfície ou no interior da estrutura zeolítica sob a forma de Si-OH-Al. A banda a 1640 cm^{-1} resulta também da presença de água na estrutura zeolítica. Observam-se ainda bandas de absorção entre 1250 e 950 cm^{-1} que se devem a vibrações Si-O(Si) e Si-O(Al) e entre 700 e 500 cm^{-1} que se devem a vibrações nas unidades estruturais da rede [179, 180].

No espectro do 5-FU são visíveis diversas bandas de absorção que lhe são características devido aos diferentes grupos funcionais presentes na molécula. A banda a 3135 cm^{-1} deve-se às vibrações do grupo amida (N-H). Por sua vez, as bandas a 1722 e 1660 cm^{-1} devem-se às vibrações do grupo carbonilo (C=O) e as bandas a 1430 , 1246 , 814 e 550 cm^{-1} devem-se ao anel aromático.

Comparando os três espectros verifica-se que a banda característica do NaY a 3469 cm^{-1} , não sofre qualquer desvio no espectro do 5-FU@NaY. Observa-se ainda no espectro do 5-FU@NaY as bandas a 3136 , 1722 e 1661 cm^{-1} que são características do espectro do 5-FU e uma a 1017 cm^{-1} característica do espectro do NaY.

Tais resultados levam a inferir que o fármaco está presente no DDSs e mantém, a sua integridade estrutural.

Na Figura 4.15 estão representados os espectros de FTIR do 5-FU, LTL e 5-FU@LTL obtidos na região entre 4000 e 500 cm^{-1} .

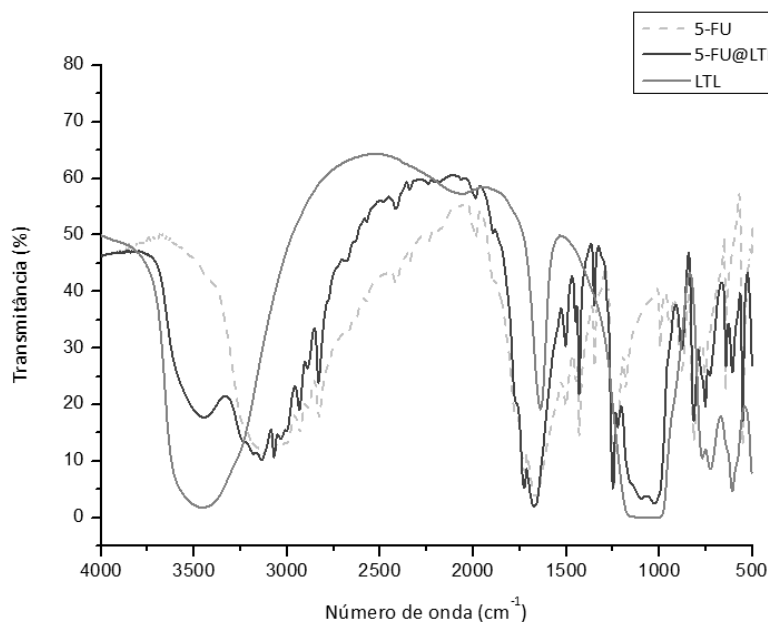


Figura 4.15: Espectros de FTIR do LTL, 5-FU e 5-FU@LTL

Tal como observado no espectro do NaY, o espectro do zeólito LTL apresenta as bandas características dos zeólitos. A banda larga devida à presença dos grupos hidroxilos apresenta um ligeiro desvio em relação ao zeólito NaY, aparecendo neste zeólito a 3457 cm^{-1} . As restantes bandas de absorção apresentam valores de vibração coincidentes em ambas as estruturas.

Comparando os três espectros verifica-se que no espectro do 5-FU@LTL a banda a 3457 cm^{-1} , à semelhança do que acontece no sistema 5-FU@NaY, não sofre nenhum desvio. Nesta região verifica-se a presença de uma banda a 3139 cm^{-1} que coincide com a banda do espectro do 5-FU. Esta banda de absorção é atribuída à presença do fármaco no zeólito. Também as bandas de absorção a 1728 , 1670 cm^{-1} , características do 5-FU, vêm comprovar a presença do fármaco na estrutura zeolítica.

Na Figura 4.16 os espectros do 5-FU, NanoNa-Y e 5-FU@NanoNa-Y obtidos na região entre 4000 e 500 cm^{-1} .

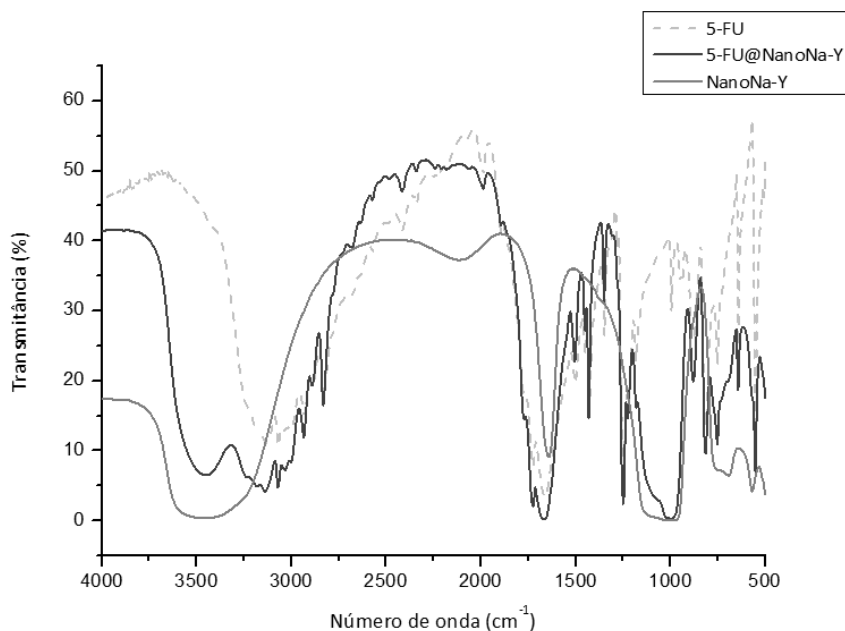


Figura 4.16: Espectros de FTIR do NanoNa-Y, 5-FU e 5-FU@NanoNa-Y

À semelhança dos espectros do NaY e LTL, também no espectro do NanoNa-Y estão presentes as bandas de absorção características de zeólitos, no entanto a banda a 3469 cm^{-1} não é tão intensa e definida como nos espectros do NaY e LTL.

O espectro do 5-FU@NanoNa-Y apresenta bandas de absorção com valores similares aos obtidos em espectros já analisados para o 5-FU@NaY e 5-FU@LTL. Assim, pode inferir-se que o fármaco se encontra presente neste DDS, e distribuído homogeneamente na estrutura zeolítica.

Os resultados apresentados nos espectros dos sistemas em relação ao zeólito de partida, demonstram que o fármaco não provoca alterações estruturais no zeólito.

A técnica de FTIR permite ainda calcular a razão de Si/Al do zeólito NaY [181]. Esta razão é calculada através da banda mais sensível do zeólito Y que se situa entre $600\text{ e }570\text{ cm}^{-1}$, utilizando a seguinte equação:

$$x = 3,857 - 0,00621w_{DR} (\text{cm}^{-1}) \text{ (Eq. 4.1)},$$

onde $x = [1 + (Si/Al)]^{-1}$, com x compreendido entre 0,1 e 0,3, e w_{DR} é o valor da banda entre $600\text{ e }570\text{ cm}^{-1}$.

Esta razão só pode ser calculada para o zeólito NaY, pois o zeólito LTL e o NanoNa-Y não apresentam banda nesta região (Figura 4.17).

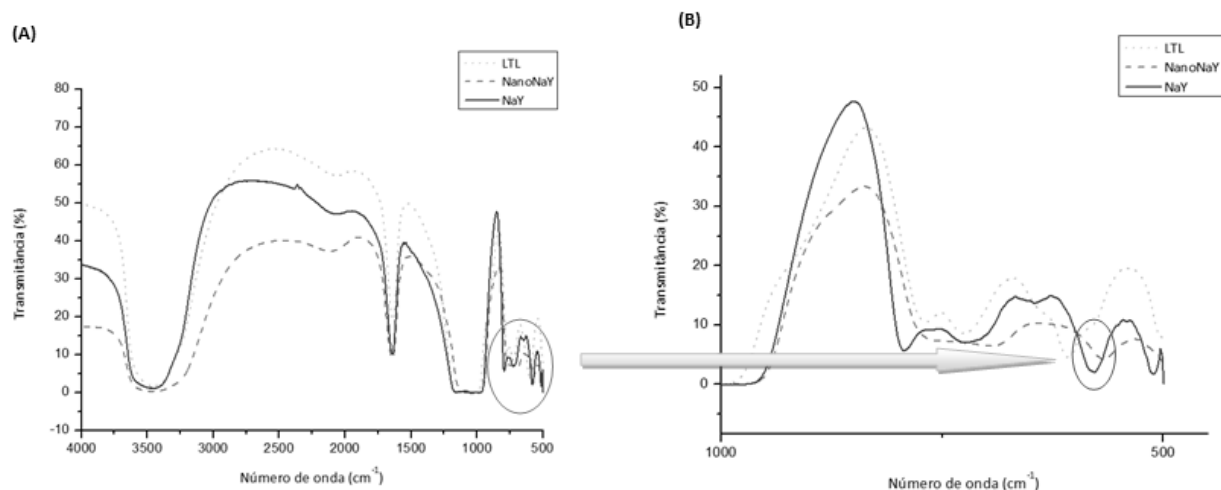


Figura 4.17: (A) Espectros de FTIR dos três zeólitos utilizados; (B) Ampliação da região entre 600 e 570 cm^{-1} assinalada em (A). Na região assinalada em (B) estão as bandas características do zeólito NaY.

As razões Si/Al calculadas para o zeólito NaY e para o sistema 5-FU@NaY foram 2,75 e 2,98 respetivamente, indicando que a estrutura do zeólito é pouco afetada pela introdução do fármaco.

4.3.4. ANÁLISE POR SEM

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM) permitiu avaliar se a morfologia dos zeólitos se mantém inalterada após o encapsulamento do fármaco.

Na Figura 4.18 estão apresentadas as micrografias de SEM obtidas para o NaY (Figura 4.18 (A)) e o sistema 5-FU@NaY (Figura 4.18 (B)) numa ampliação de 5000 \times .

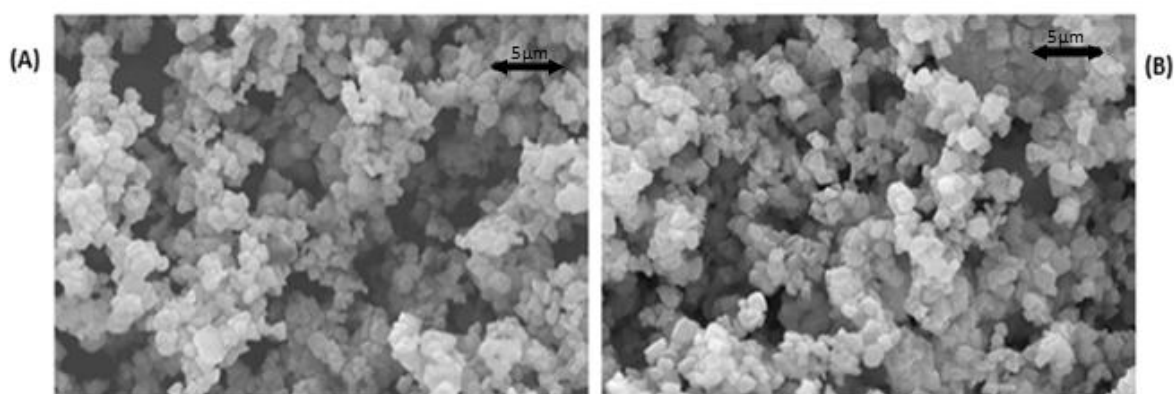


Figura 4.18: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (5000 \times). (A) NaY, (B) 5-FU@NaY.

Através da Figura 4.18 (A) verifica-se que o NaY apresenta a morfologia característica de um aluminossilicato microcristalino com agregados de partículas pequenas e regulares. Estes apresentam uma dimensão média de 0,5 a 1,5 μm . Comparando esta micrografia com a micrografia em (B) parece não haver alterações nas partículas do zeólito decorrentes do fármaco encapsulado. A manutenção da morfologia do zeólito é comprovada após análise das partículas uma vez que se verificou que as partículas do 5-FU@NaY mantêm o mesmo diâmetro das partículas do NaY antes do encapsulamento, indicando por isso que a presença do fármaco não altera a morfologia do zeólito.

Os zeólitos NanoNa-Y e KLTL foram analisados com ampliações diferentes por estes materiais apresentarem partículas com dimensões na ordem dos nanómetros.

Na Figura 4.19 são apresentadas as micrografias de SEM obtidas para o LTL (Figura 4.19 (A)) e para o sistema 5-FU@LTL (Figura 4.19 (B)) numa ampliação de 2000 \times .

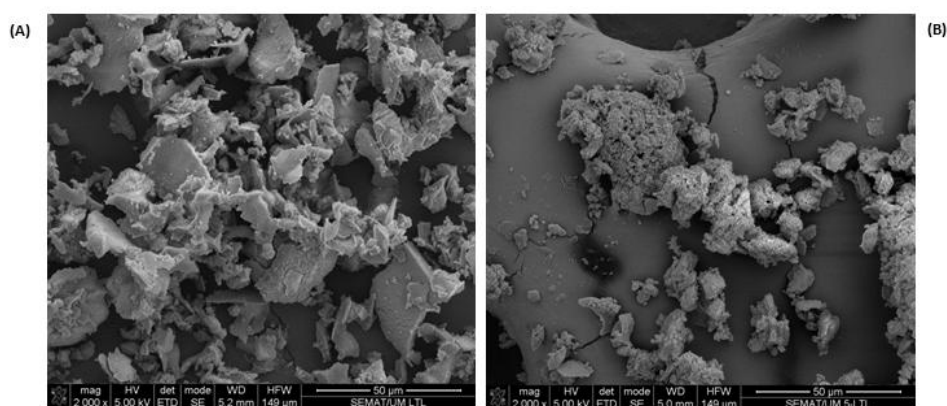


Figura 4.19: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (2000 \times). (A) LTL, (B) 5-FU@LTL.

Na Figura 4.20 são apresentadas as micrografias de SEM obtidas para o LTL (Figura 4.20 (A)) e para o sistema 5-FU@LTL (Figura 4.20 (B)) numa ampliação de 10000 \times .

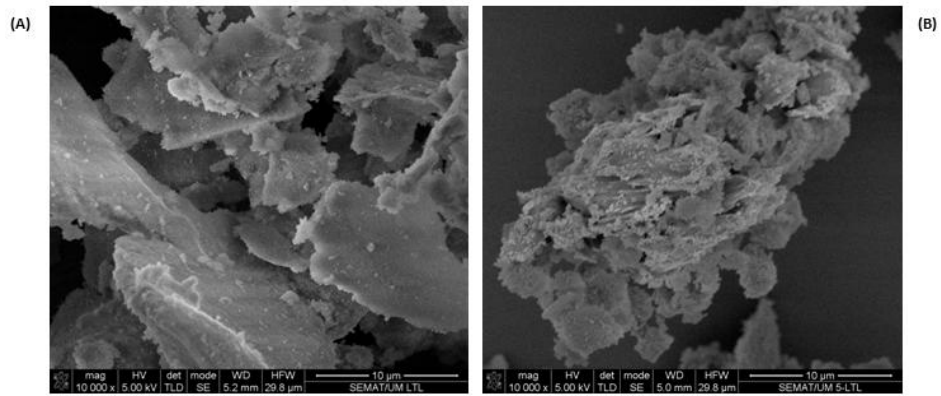


Figura 4.20: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (10000×). (A) LTL, (B) 5-FU@LTL.

Na Figura 4.21 são apresentadas as micrografias de SEM obtidas para o LTL (Figura 4.21 (A)) e para o sistema 5-FU@LTL (Figura 4.21 (B)) numa ampliação de 50000×.

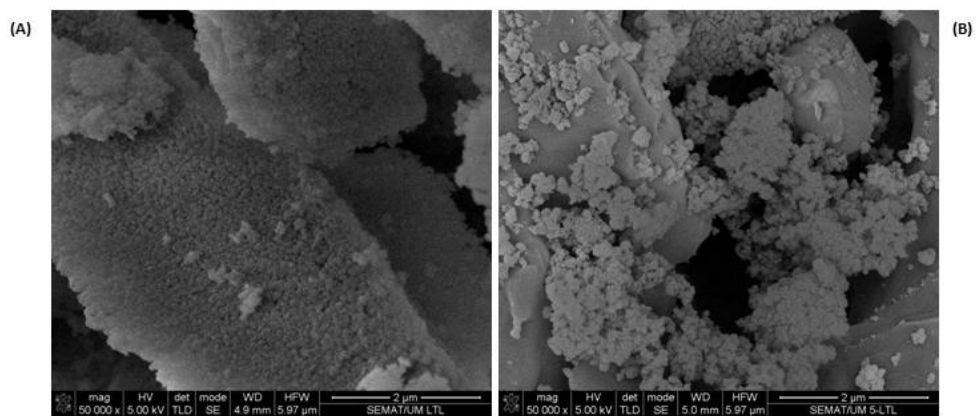


Figura 4.21: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (50000×). (A) LTL, (B) 5-FU@LTL.

Na Figura 4.22 são apresentadas as micrografias de SEM obtidas para o LTL (Figura 4.22 (A)) e para o sistema 5-FU@LTL (Figura 4.22 (B)) numa ampliação de 100000×.

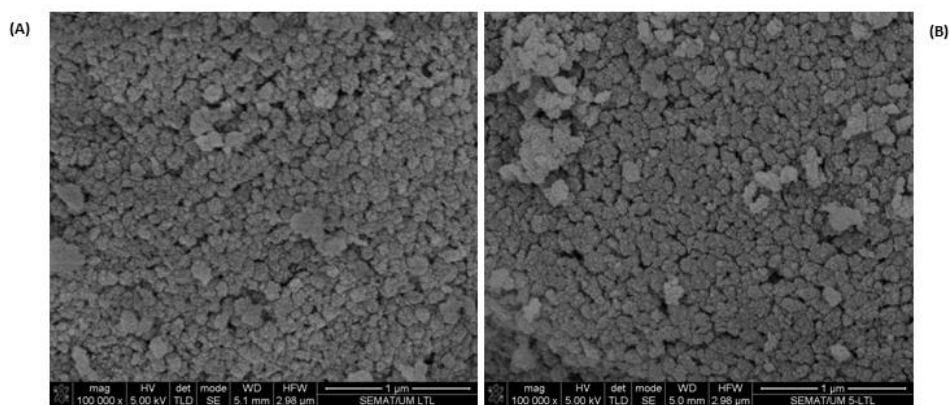


Figura 4.22: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (100000×). (A) LTL, (B) 5-FU@LTL.

Na Figura 4.19 (A) apenas são visíveis aglomerados de partículas de zeólito. À medida que se vai aumentando a ampliação vai-se tornando possível observar a constituição do LTL. Na ampliação de 100000× (Figura 4.22 (A)) já se conseguem observar as partículas do zeólito. Este apresenta uma estrutura regular com diâmetro de partículas cerca de 0,08 μm .

Quando comparadas as micrografias em (A) (LTL) com as micrografias em (B) (5-FU@LTL) verifica-se que não há alterações morfológicas após a inserção do fármaco no zeólito, uma vez que as partículas de zeólito no 5-FU@LTL mantêm o mesmo diâmetro que as partículas do zeólito sem fármaco. Também através das micrografias do 5-FU@LTL é possível notar, especialmente através na Figura 4.22 (B), a presença de alguns agregados à superfície do zeólito que não são partículas do mesmo.

Na Figura 4.23 são apresentadas as micrografias de SEM obtidas para o NanoNa-Y (Figura 4.23 (A)) e para o sistema 5-FU@NanoNa-Y (Figura 4.23 (B)) numa ampliação de 2000×.

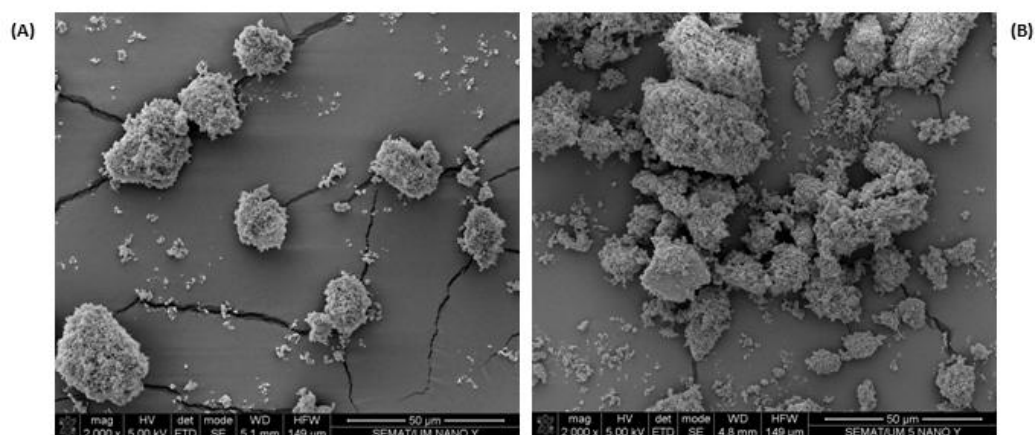


Figura 4.23: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (2000×). (A) NanoNa-Y, (B) 5-FU@NanoNa-Y.

Na Figura 4.24 são apresentadas as micrografias de SEM obtidas para o NanoNa-Y (Figura 4.24 (A)) e para o sistema 5-FU@NanoNa-Y (Figura 4.24 (B)) numa ampliação de 10000×.

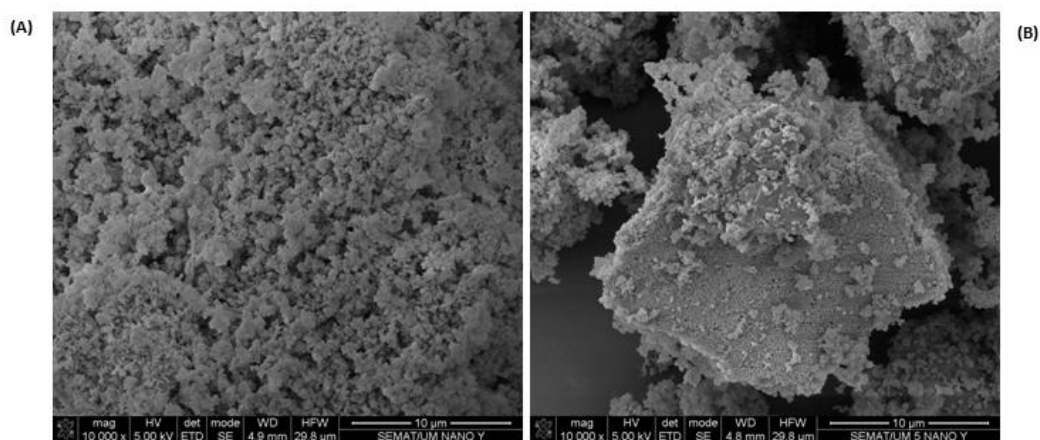


Figura 4.24: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (10000×). (A) NanoNa-Y, (B) 5-FU@NanoNa-Y.

Na Figura 4.25 são apresentadas as micrografias de SEM obtidas para o NanoNa-Y (Figura 4.25 (A)) e para o sistema 5-FU@NanoNa-Y (Figura 4.25 (B)) numa ampliação de 50000×.

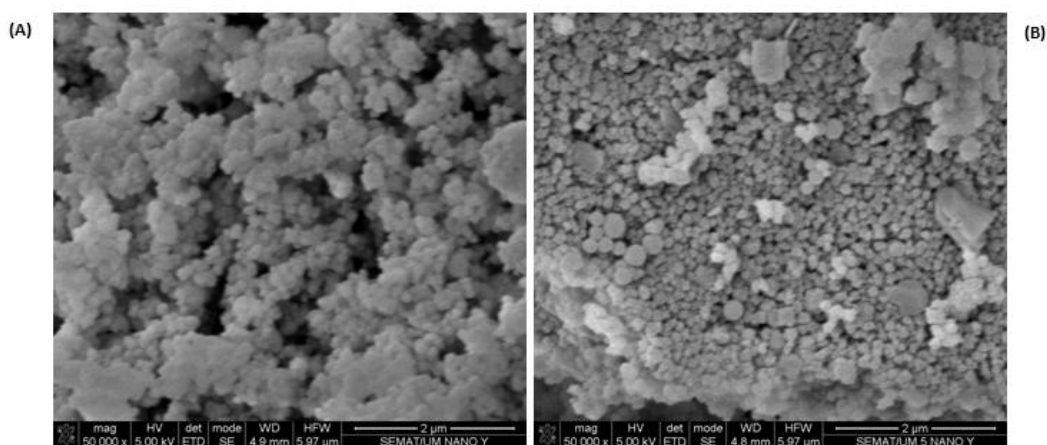


Figura 4.25: Micrografias de SEM obtidas na mesma ampliação (50000×). (A) NanoNa-Y, (B) 5-FU@NanoNa-Y.

À semelhança dos resultados obtidos para o LTL, também para o NanoNa-Y só à medida que a ampliação aumenta é que se torna possível a visualização das partículas de zeólito. Analisando a Figura 4.25 (A) verifica-se que este zeólito apresenta uma morfologia de partículas regular com tamanhos compreendidos entre 0,13 e 0,17 μm . Também para este zeólito o encapsulamento do fármaco não provoca alterações na sua estrutura, uma vez que as partículas do 5-FU@NanoNa-Y se

mantêm com os mesmos diâmetros. Mais uma vez, tal como nas micrografias do zeólito LTL, também nas micrografias referentes ao 5-FU@NanoNa-Y se observa a presença de fármaco à superfície.

4.3.5. ANÁLISE POR TERMOGRAVIMETRIA

A análise por termogravimetria (TG) permite conhecer as alterações que o aquecimento ou arrefecimento podem provocar na massa de uma dada substância, permitindo desta forma estabelecer a faixa em que adquire uma composição química definida e constante bem como as temperaturas de início da degradação. Assim, de forma a perceber a estabilidade do 5-FU, dos zeólitos e dos sistemas ao aumento de temperatura, bem como de forma a calcular a quantidade de 5-FU nos DDSs efetuou-se uma análise TG. Esta análise foi realizada com uma velocidade de aquecimento constante de 10 °C/min na presença de ar a fluxo constante 50 mL.min⁻¹ para garantir a oxidação total do fármaco e contaminantes presentes nos zeólitos.

As curvas TG são obtidas representando a variação da massa das amostras (m/m_0 (%)) em função da temperatura (T (°C)). As curvas DTG obtêm-se, fazendo o tratamento matemático da TG, ou seja, através da termogravimetria diferencial, assim é representada a velocidade de variação de massa (dm/dT) em (mg/min) em função da temperatura (T (°C)). As curvas de DTG servem como base para a determinação das temperaturas onde a perda de massa é máxima.

Na Figura 4.26 estão registados os termogramas de TG e DTG obtidos para o 5-FU.

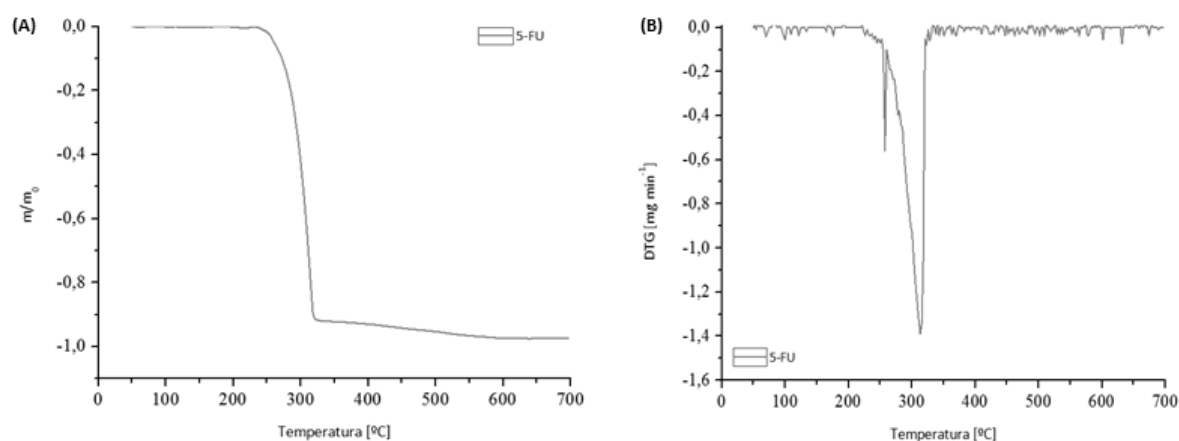


Figura 4.26: (A) Registo da curva de TG do 5-FU. (B) Registo da curva de DTG do 5-FU.

Observando a curva de TG obtida (Figura 4.26 (A)) verifica-se que o 5-FU se mantém estável numa gama de temperatura entre 50 a 215 °C. A partir desta temperatura verifica-se uma inflexão no registo de TG indicando o início da degradação, sendo a temperatura de degradação inicial 221,3 °C.

Estes resultados são comprovados pela curva de DTG (Figura 4.26 (B)) onde se verifica que a temperatura máxima de degradação do 5-FU é por volta do 315 °C. Estes resultados permitem inferir que o 5-FU é um fármaco bastante estável.

Na Figura 4.27 são apresentadas as curvas de variação de massa resultante da análise de TG e DTG para o zeólito NaY (azul), 5-FU (vermelho) e o 5-Fu@NaY (verde).

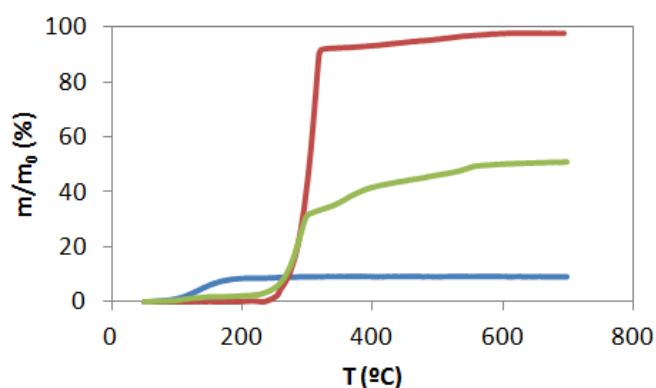


Figura 4.27: Curvas de variação de massa para o NaY (azul), 5-FU (vermelho) e 5-Fu@NaY (verde).

Nas Figuras 4.28 (A) e (B) são representadas as curvas de variação de massa para os sistemas NanoNa-Y e LTL respectivamente.

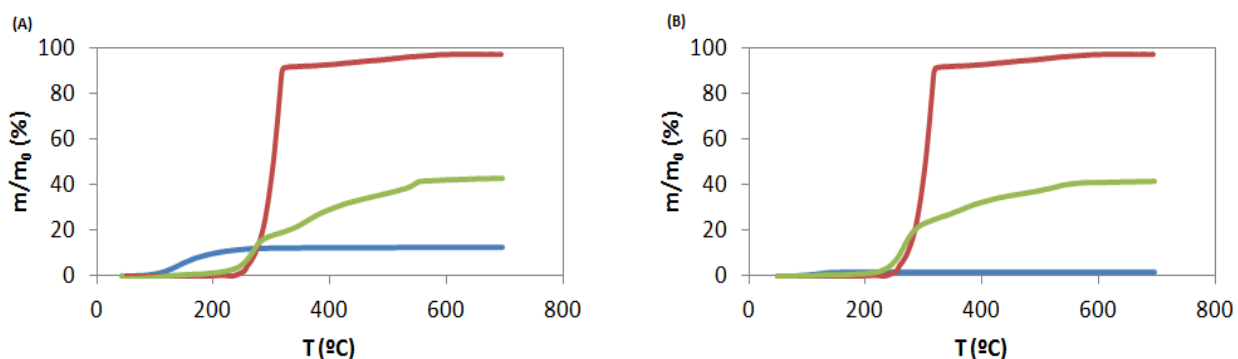


Figura 4.28: Curvas de variação de massa para o zeólito (azul), 5-FU (vermelho) e 5-FU@zeólito (verde). (A) NanoNa-Y e (B) LTL.

As curvas apresentadas nas Figuras 4.27 e 4.28 tem o mesmo tipo de comportamento. Os zeólitos de partida têm uma perda de massa entre 50-200 °C que corresponde às moléculas de água presentes na estrutura. Com a introdução do fármaco observa-se, além deste patamar, outros dois a temperaturas elevadas, sendo que o primeiro (200-410 °C) é o mais importante ao compararmos

com o fármaco sozinho. Finalmente a Figura 4.29 apresenta a comparação entre os três sistemas DDSs preparados.

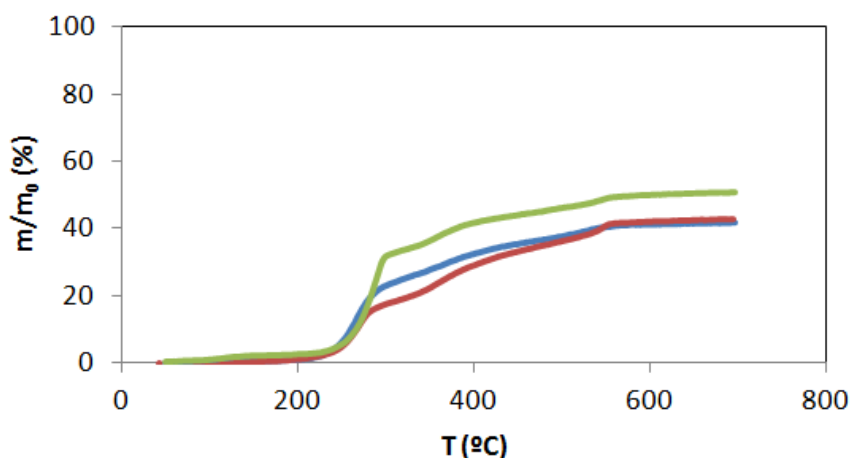


Figura 4.29: Curvas de variação de massa para os diferentes DDSs preparados. 5-FU@NaY (verde), 5-FU@LTL (azul), 5-FU@NanoNa-Y (vermelho).

O sistema preparado com o zeólito NaY apresenta maior capacidade de adsorção do fármaco do que os restantes zeólitos. Os zeólitos, NanoNa-Y e LTL, cujas partículas são na ordem dos nanómetros têm praticamente a mesma capacidade de adsorção.

Na Tabela 4.3 apresenta-se os resultados obtidos das análises térmicas.

Tabela 4.3: Resultados de variação de massa obtidos para os diferentes DDSs preparados

	NaY	NanoNa-Y	LTL	5-FU	5-FU@NaY	5-FU@NanoNa-Y	5-FU@LTL
m_{inicial} (mg)	5,51	8,452	2,352	4,678	5,328	4,01	3,358
Variação de massa (%)	0 - 200 °C	8,5	9,7	1,96	1,71	2,29	1,07
	200 - 305 °C	0,61	2,3	0	53,19	29,91	16,8
	305 - 410 °C	0,04	0,2	0	38,3	10	12
	410 - 700 °C	-0,08	0,2	0	4,3	8,6	12,7
	TOTAL	9,07	12,4	1,96	97,5	50,8	42,6

Nos zeólitos de partida, a única perda de massa observada é associada à água presente na estrutura, em torno de 9% para as estruturas faujasite e 2% para o LTL. Com a introdução do fármaco, o NaY é o que apresenta a maior quantidade de massa, 50,8 %, seguido do NanoNa-Y com 42,6% e o LTL com 41,5%.

4.3.6. ANÁLISE POR SAXS

Com o objetivo de avaliar a localização, interação e o volume ocupado pelo fármaco na estrutura, as amostras foram analisadas pela técnica de espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS), análises integradas num projeto em desenvolvimento com o Elettra Laboratory, Sincrotrone Trieste, Itália. O tratamento de resultados encontra-se em curso, e devido à sua complexidade não integram a discussão nesta tese.

4.3.7. ANÁLISE POR RMN DE ESTADO SÓLIDO

Os sistemas de DDSs foram analisados por RMN do estado sólido com o objetivo de determinar possíveis interações dos fármacos com a estrutura zeolítica e avaliar se o processo de preparação dos sistemas provocava alterações na estrutura. Serão apresentados os resultados obtidos para o fármaco CHC nas estruturas Y e A.

Nestas análises avaliou-se também se o solvente utilizado na preparação dos DDSs, a acetona, ficava retido na estrutura o que poderia afetar os resultados dos testes de viabilidade celular.

Na Figura 4.30 são apresentados os espectros do ^{27}Al CP/MAS RMN para acetona@zeólito (verde), zeólito (azul) e fármaco@zeólito (vermelho) para o zeólito NaY (Figura 4.30 (A)) e para o zeólito NaA (Figura 4.30 (B)).

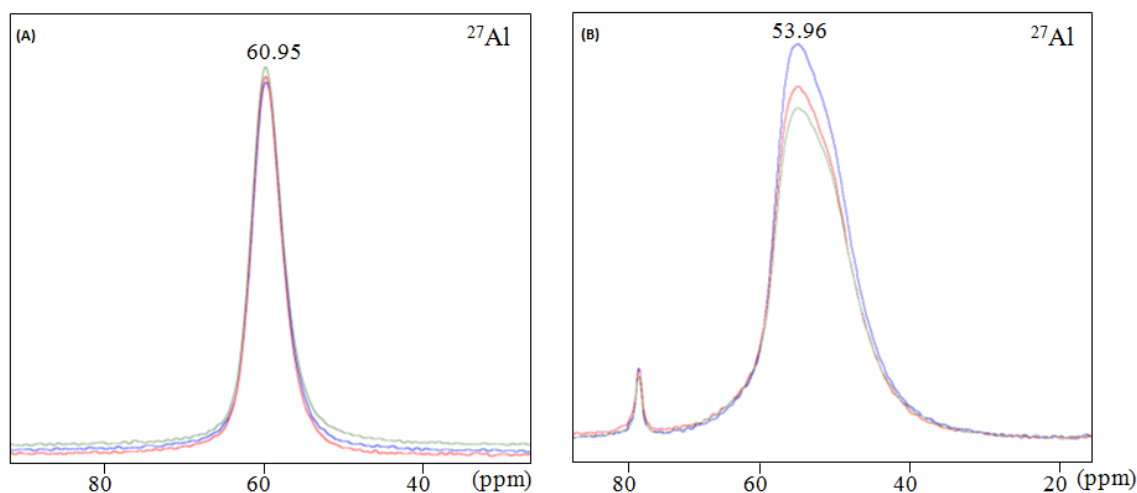


Figura 4.30: Espectros de ^{27}Al CP/MAS RMN. (A) NaY; (B) NaA. Acetona@zeólito (verde), zeólito padrão (azul) e fármaco@zeólito (vermelho).

Em ambas as estruturas zeolíticas observa-se que o solvente e o procedimento experimental utilizados na preparação dos DDSs não alteram a estrutura zeolítica. Todas as amostras apresentam espécies de alumínio tetraédrico demonstrado pelo pico a 60,95 ppm (NaY) e a 53,96 ppm (NaA). Não há evidência de nenhum deslocamento ou alargamento dos picos do alumínio após o seu tratamento com acetona ou após o encapsulamento do fármaco, o que indica que os procedimentos experimentais não provocam alterações na estrutura do zeólito. Estas estruturas porosas são portanto estáveis para este tipo de aplicações.

O mesmo comportamento é observado nos espectros de ^{23}Na CP/MAS RMN. Na Figura 4.31 é apresentado os espectros do ^{23}Na CP/MAS RMN para acetona@zeólito (verde), zeólito padrão (azul) e fármaco@zeólito (vermelho) para o zeólito NaY (Figura 4.31 (A)) e para o zeólito NaA (Figura 4.31 (B)).

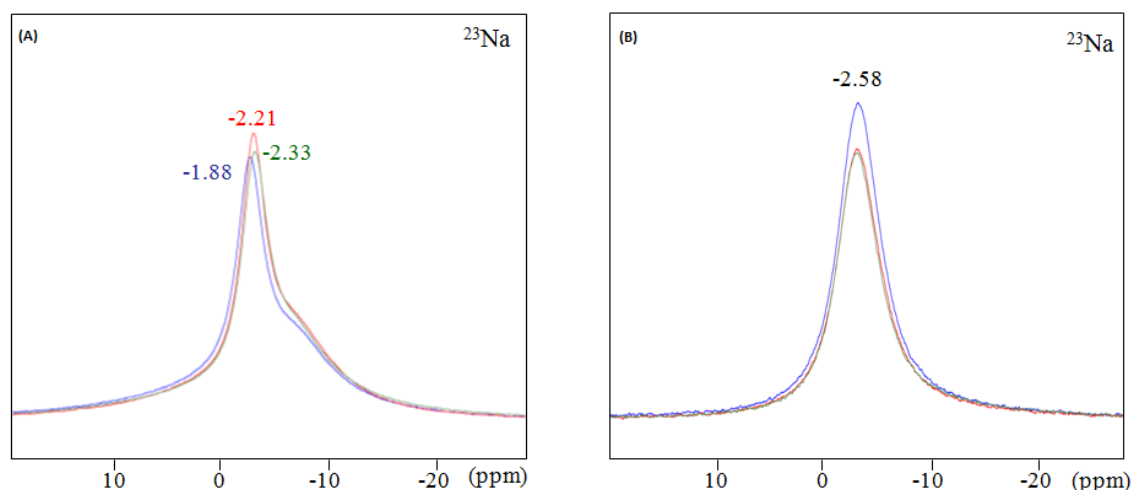


Figura 4.31: Espectros de ^{23}Na CP/MAS RMN. (A) NaY; (B) NaA. Acetona@zeólito (verde), zeólito padrão (azul) e fármaco@zeólito (vermelho).

No espectro do NaY verificam-se uns ligeiros desvios nos picos do sódio no entanto não são significativos. No espectro do NaA não se verificam quaisquer desvios químicos. Isto comprova que os zeólitos são estruturas estáveis.

Estas análises vêm corroborar os resultados obtidos nas análises de FTIR e de SEM, pois comprovam que o encapsulamento do fármaco não provoca alterações na estrutura do zeólito.

Para avaliar as interações fármaco-zeólito, obtiveram-se os espectros de ^{13}C CP/MAS RMN dos sistemas CHC@Y e CHC@A. Os resultados desta análise estão apresentados na Figura 4.32.

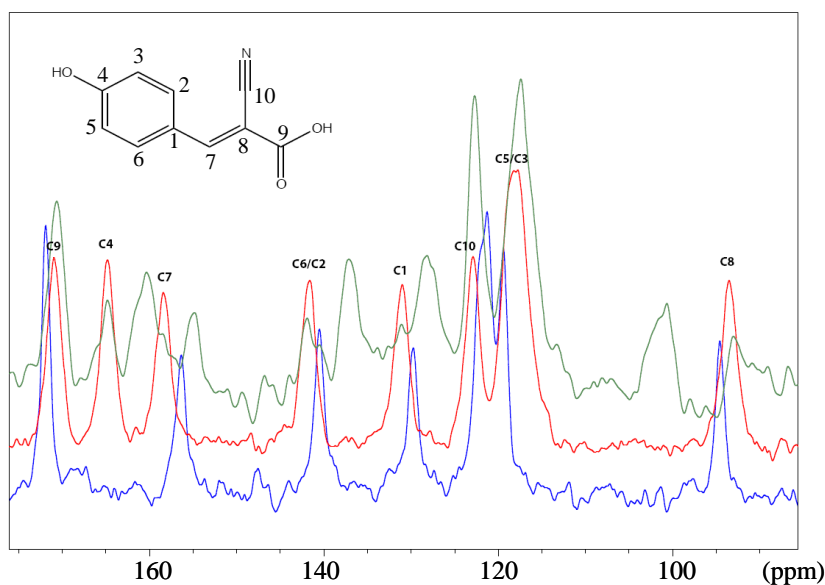


Figura 4.32: Espectro de ¹³C CP/MAS RMN do CHC (vermelho), CHC@Y (verde) e CHC@A (azul).

O espectro do CHC mostra picos característicos da sua molécula. Em ambos os DDSs aparecem picos similares aos picos do CHC puro o que evidencia a presença do fármaco nos DDSs e a sua integridade dentro da estrutura zeolítica. Porém, os picos observados aparecem com ligeiro desvio químico relativamente aos picos do CHC puro, com maior evidência na parte alifática do composto, o que indica que as interações entre parte do grupo dos carboxilatos do CHC e a estrutura zeolítica são mais significativas. As interações que se observam entre o CHC e o zeólito mostram que o fármaco está no interior da estrutura zeolítica.

Com base nestes resultados, será de esperar que o 5-FU e os zeólitos apresentem o mesmo comportamento, estabelecendo interações fármaco-zeólito similares a estas.

4.4. ESTUDOS DE LIBERTAÇÃO DO 5-FU

De forma a otimizar a análise por HPLC foram testadas diferentes fases móveis. A resolução do pico do 5-FU mais satisfatória foi obtida com a fase móvel tampão fosfato 0,01M em metanol/água (60/40).

Começou-se por injetar o padrão para verificar o tempo de retenção do mesmo. Verificou-se que a 260 nm, o 5-FU apresenta um tempo de retenção por volta dos 5 min. Na Figura 4.33 está apresentado o cromatograma do mesmo.

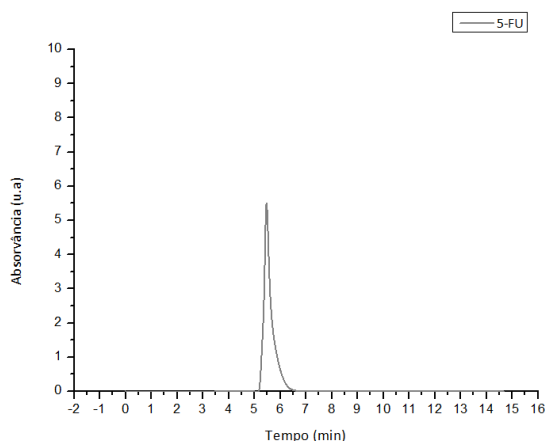


Figura 4.33: Cromatograma do padrão 5-FU em PBS.

Seguidamente prepararam-se soluções de 10 mg de DDS/50 mL de PBS que se colocaram a 37°C durante 48 h. As primeiras foram mantidas em repouso e as segundas colocadas sob agitação (100 rpm) para verificar se o processo de agitação tem alguma influência no perfil de libertação do 5-FU. Para cada análise foram retirados 5 mL da suspensão PBS/DDS e repostos 5 mL de PBS fresco. Os resultados apresentados nos diferentes gráficos do número de moles do 5-FU libertados em função do tempo contemplam as diluições efetuadas.

4.4.1. LIBERTAÇÃO A PARTIR DO 5-FU@NA-Y SEM AGITAÇÃO

A Figura 4.34 mostra o cromatograma da libertação do 5-FU (figura 4.34 (A)) e a quantidade de 5-FU libertado (em moles) do 5-FU@NaY ao longo de 48 h em condições de repouso (figura 4.34 (B)).

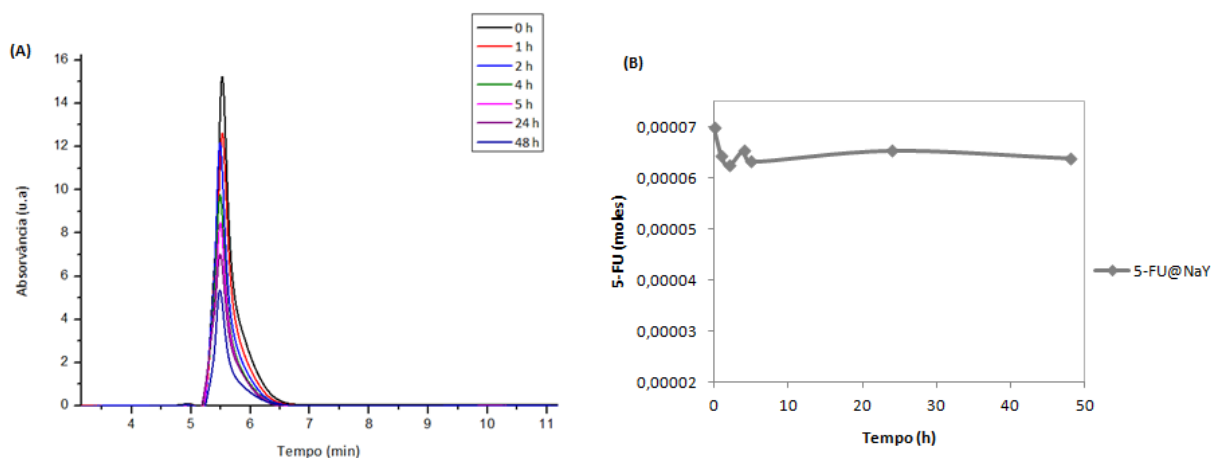


Figura 4.34: (A) Cromatograma da libertação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@NaY durante 48 h sem agitação. (B) Perfil da libertação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@NaY durante 48 h sem agitação.

Pelos resultados obtidos neste estudo observa-se que no tempo 0h, correspondente à primeira injeção, há uma elevada quantidade de fármaco na solução ($6,98 \times 10^{-5}$ moles). Este elevado valor deve-se à presença de fármaco à superfície do DDS.

Após a primeira injeção verifica-se uma redução da quantidade de 5-FU na solução vindo a estabilizar em torno de aproximadamente $6,55 \times 10^{-5}$ moles. Este comportamento mantém-se constante até às 48 h, tempo que corresponde aos ensaios de viabilidade celular.

Este mesmo comportamento é observado para os outros dois zeólitos.

4.4.2. LIBERTAÇÃO A PARTIR DO 5-FU@LTL SEM AGITAÇÃO

A Figura 4.35 mostra o cromatograma da libertação do 5-FU (Figura 4.35 (A)) e a quantidade de 5-FU libertado (em moles) do 5-FU@LTL ao longo de 48 h em condições de repouso (Figura 4.35 (B)).

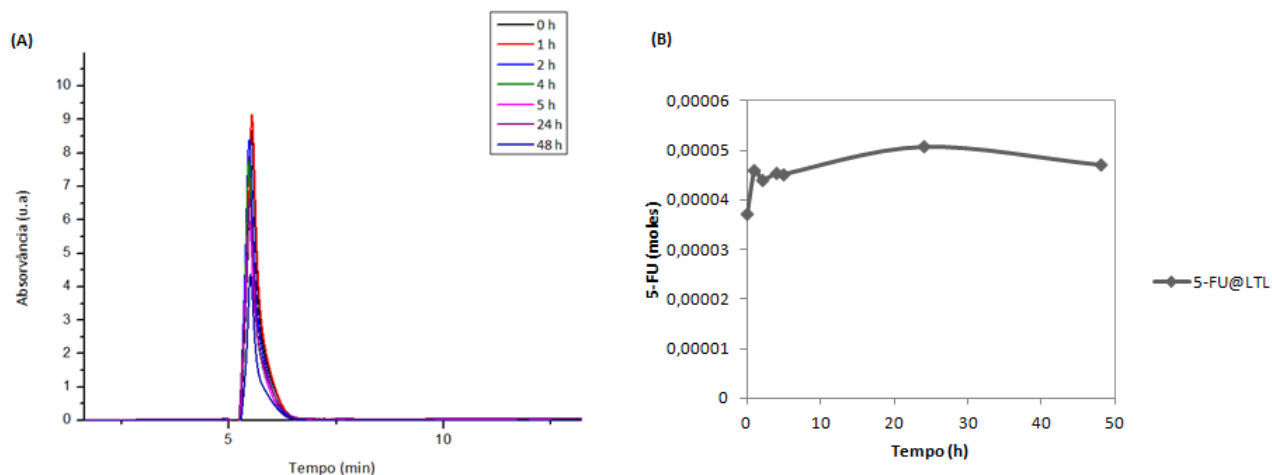


Figura 4.35: (A) Cromatograma da libertação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@LTL durante 48 h sem agitação. (B) Perfil da libertação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@LTL durante 48 h sem agitação.

Neste sistema, ao contrário do que acontece com o NaY, observa-se menos quantidade de 5-FU no ponto 0 h ($3,70 \times 10^{-5}$ moles). Como no sistema anterior, a libertação adquire um perfil constante em torno de $4,50 \times 10^{-5}$ moles até 48 h, apesar de verificar-se um pequeno aumento às 24 h.

4.4.3. LIBERTAÇÃO A PARTIR DO 5-FU@NANO NA-Y SEM AGITAÇÃO

A Figura 4.36 mostra o cromatograma da libertação do 5-FU (Figura 4.36 (A)) e a quantidade de 5-FU libertado (em moles) do 5-FU@NanoNa-Y ao longo de 48 h em condições de repouso (Figura 4.36 (B)).

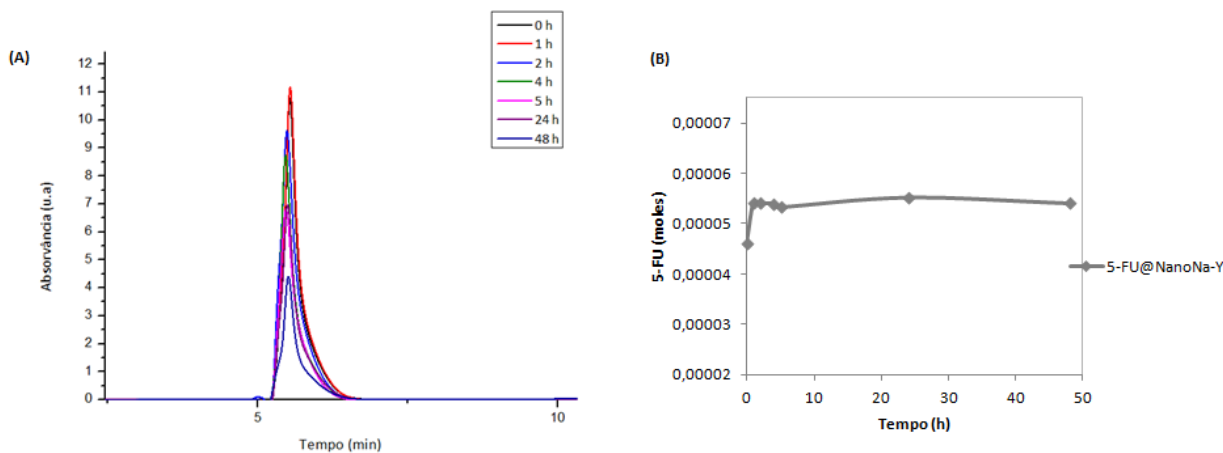


Figura 4.36: (A) Cromatograma da liberação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@NanoNa-Y durante 48 h sem agitação. (B) Perfil da liberação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@NanoNa-Y durante 48 h sem agitação.

Neste DDS, o comportamento inicial é muito semelhante ao sistema anterior descrito, 5-FU@LTL. Para este DDS verifica-se que entre a primeira injeção (0 h) e a segunda (1 h) ocorre um aumento da quantidade de 5-FU em solução. A partir deste momento a quantidade de 5-FU na solução mantém-se praticamente constante até às 48 h.

Estes DDSs foram ainda submetidos a agitação mecânica, a fim de avaliar se a difusão do fármaco para a solução era limitada pelas diferentes estruturas zeolíticas e de reproduzir as condições que seriam encontradas num organismo humano.

4.4.4. LIBERTAÇÃO DO 5-FU@LTL COM AGITAÇÃO

A Figura 4.37 mostra o cromatograma da liberação do 5-FU (Figura 4.37 (A)) e a quantidade de 5-FU libertado (em moles) do 5-FU@LTL ao longo de 48 h quando sujeito a agitação mecânica (Figura 4.37 (B)).

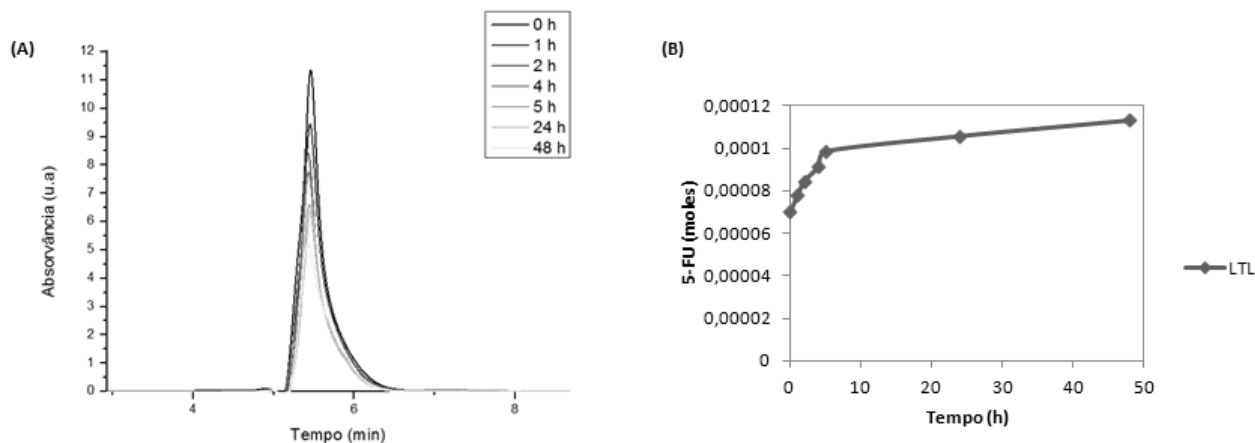


Figura 4.37: (A) Cromatograma da liberação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@LTL durante 48 h. (B) Perfil da liberação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@LTL durante 48 h.

Observando a Figura 4.37 (B) verifica-se que a liberação do 5-FU vai aumentando ao longo do tempo, verificando-se um aumento significativo nas primeiras 5 h, tempo após o qual o número de moles de 5-FU é $9,87 \times 10^{-5}$ moles. Após estas 5 h, continua a verificar-se um aumento até às 48 h no entanto não é tão significativo.

4.4.5. LIBERTAÇÃO DO 5-FU@NA-Y E DO NANO NA-Y COM AGITAÇÃO

A Figura 4.38 mostra os perfis de liberação do 5-FU libertado (em moles) do 5-FU@NaY (Figura 4.38 (A)) e do 5-FU@NanoNaY (figura 4.38 (B)) ao longo de 48 h quando sujeito a agitação mecânica.

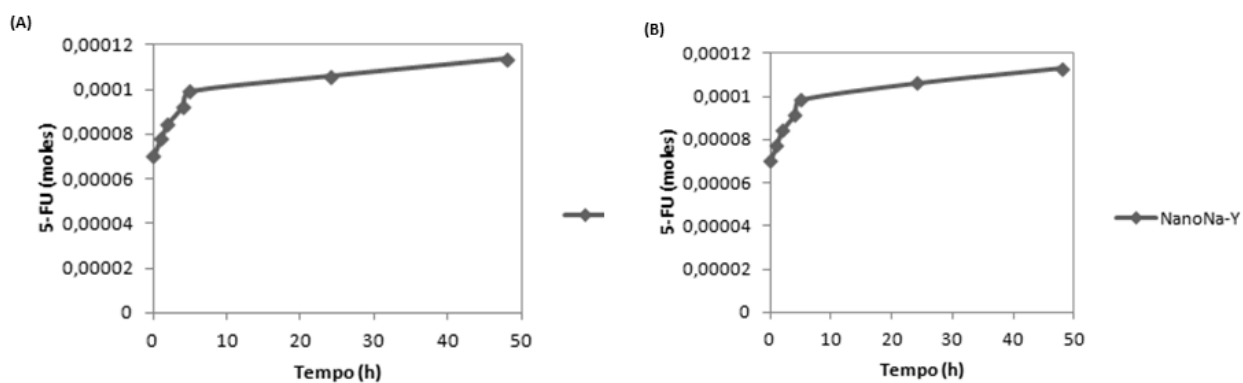


Figura 4.38: (A) Perfil da liberação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@NaY durante 48 h com agitação. (B) Perfil da liberação do 5-FU a partir do DDS 5-FU@NanoNa-Y durante 48 h.

O comportamento do perfil de liberação do fármaco para os dois DDSs é idêntico. Em ambos os casos, verifica-se um aumento significativo nas primeiras 5h, observando-se depois um aumento ligeiro até às 48 h.

Comparando os resultados obtidos sem agitação e com agitação, verifica-se que a agitação leva à liberação de maior quantidade de 5-FU dos DDSs do que quando se encontram numa solução em repouso. Verifica-se ainda que neste processo de agitação os sistemas têm comportamentos muito similares e que as quantidades de 5-FU libertadas dos mesmos não diferem (Figura 4.39).

Nas amostras em repouso, apesar dos perfis de liberação também serem idênticos, verifica-se que a quantidade de 5-FU na solução ao longo das 48 h não é a mesma para todos os sistemas, sendo mais elevada no 5-FU@NaY, seguido do 5-FU@NanoNa-Y e por fim do 5-FU@LTL (Figura 4.40). Estes resultados demonstram que o fármaco, numa solução em repouso, tem maior facilidade em libertar-se a partir de DDS com zeólitos com estruturas tridimensionais. A estrutura Y é 3D, composta de grandes cavidades (1.2 nm), enquanto que a estrutura LTL é 1D com canais unidimensionais cujo tamanho coincide com o diâmetro do poro (0.70 nm). Ambas as estruturas são caracterizadas por poros largos (dimensão dos poros: NaY=NanoNa-Y (0.73 nm) > KLTL) Sem agitação a estrutura 3D facilita a liberação do fármaco, enquanto na estrutura 1D pode haver empacotamento do fármaco ao longo do canal. A agitação para ambas as estruturas facilita a liberação do fármaco sem impedimentos, uma vez que o 5-FU tem dimensões inferiores ao tamanho dos poros.

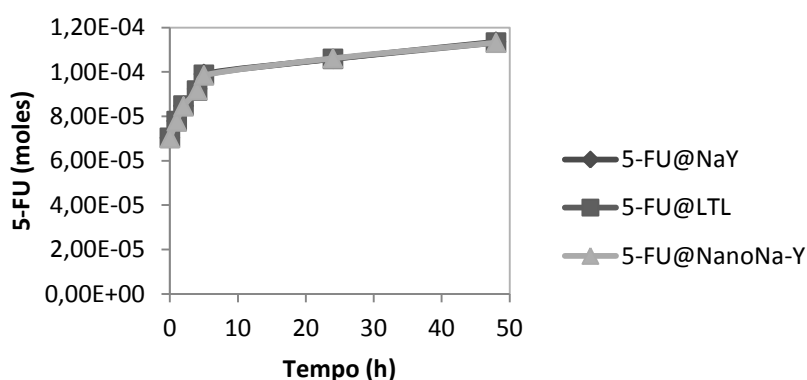


Figura 4.39: Comparação dos perfis de liberação do 5-FU a partir dos DDSs estudados durante 48 h quando sujeitos a agitação.

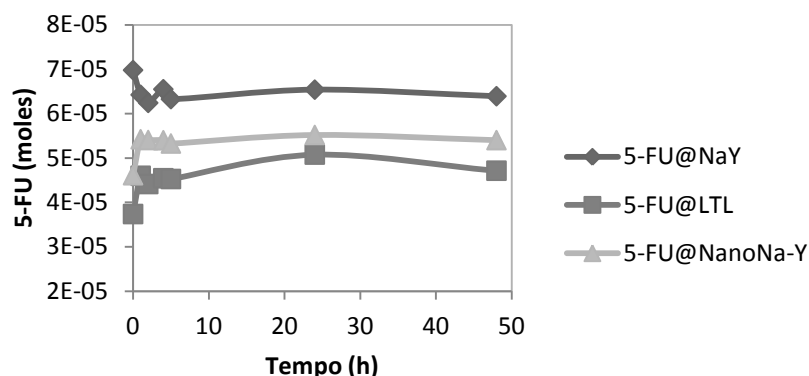


Figura 4.40: Comparação dos perfis de liberação do 5-FU a partir dos DDSs estudados durante 48 h em condições de repouso.

4.5. TESTES DE VIABILIDADE CELULAR

Tal como já referido anteriormente, os DDSs preparados foram testados em duas linhas celulares do carcinoma colorretal, HCT-15 e RKO, de forma a avaliar a sua eficácia.

A citotoxicidade de todos os DDSs e dos zeólitos foi comparada relativamente ao controlo. Os zeólitos sem fármaco não devem causar redução na viabilidade celular, ou caso se verifique alguma redução, essa deve ser insignificante, caso contrário, o material deixa de ser apropriado para a utilização como DDS.

4.5.1. CONCENTRAÇÕES DE 5-FU NOS DDSs

Antes de se iniciarem os testes de viabilidade celular, procedeu-se ao cálculo da concentração de 5-FU em cada uma das concentrações de DDS testadas.

Todos os DDSs foram preparados com a mesma quantidade de 5-FU (130 mg).

Num total de 230 mg de DDS temos 100 mg de zeólito e 130 mg de 5-FU. Então, em 1 mg de DDS temos 0,5652 mg de 5-FU, o que corresponde a $4,3450 \times 10^{-6}$ moles. Sabe-se que esta quantidade de 5-FU está presente em 1 mL (1×10^{-3} L) de meio de cultura, sendo assim possível calcular a concentração de 5-FU nos DDSs para as diferentes concentrações das suspensões testadas.

Na Tabela 4.4. são apresentadas as concentrações finais de 5-FU nos DDSs preparados.

Tabela 4.4: Concentrações finais de 5-FU nas diferentes concentrações de DDSs testadas

DDS	0,10 mg/mL (mM)	0,05 mg/mL (mM)	0,025 mg/mL (mM)	0,01 mg/mL (mM)	0,005 mg/mL (mM)
5-FU@zeólito	0,434	0,217	0,109	0,043	0,022

4.5.2. EFEITO DO SISTEMA 5-FU@NaY NA LINHA CELULAR HCT-15

A Figura 4.41 mostra o efeito do zeólito NaY e do DDS 5-FU@NaY sobre a viabilidade das células HCT-15, determinados pelo ensaio de SRB.

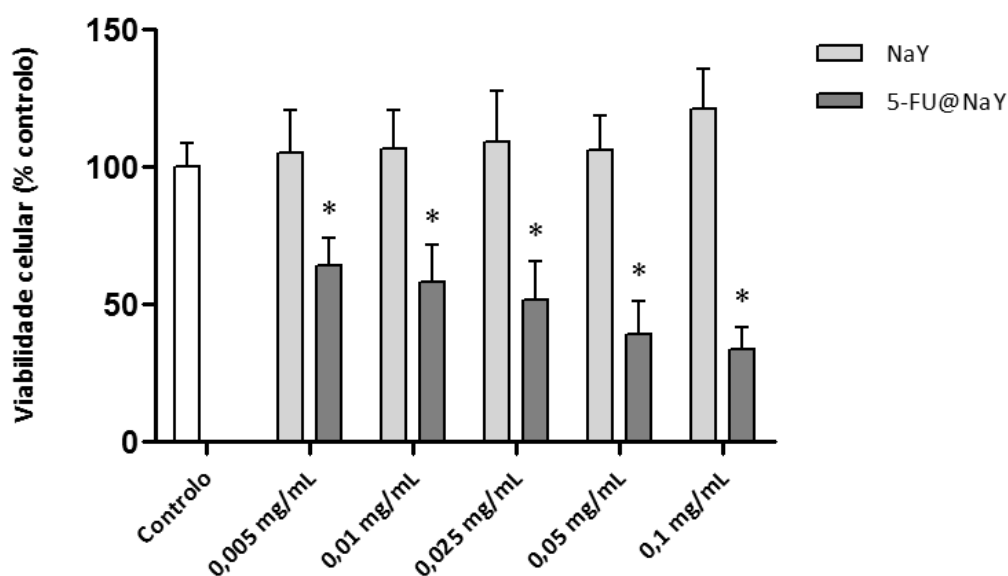


Figura 4.41: Efeito do NaY e do 5-FU@NaY preparado na viabilidade da linha celular HCT-15 do carcinoma colorretal. As células foram incubadas com diferentes concentrações de NaY e de 5-FU@NaY durante 48 h. A viabilidade celular foi medida através do ensaio de SRB. Os valores são média \pm desvio padrão de três ensaios independentes, cada um realizado em triplicado. * $p < 0,05$, comparado com a barra do controle (células).

Analisando os resultados obtidos, verifica-se que o zeólito NaY não apresenta citotoxicidade para as células durante as 48 h de incubação em qualquer uma das concentrações testadas, pois não se verifica redução da viabilidade celular comparativamente ao controle (células).

Por outro lado, quando se observam as barras referentes ao 5-FU@NaY verifica-se que há diminuição da viabilidade celular, sendo essa redução proporcional à concentração testada. Para a concentração mais baixa (0,005 mg/mL) verifica-se uma redução de cerca de 35 % da viabilidade celular e na concentração mais alta (0,1 mg/mL) essa redução é de 66 %.

Através do *software GraphPad Prism 5*[®] determinou-se que IC₅₀ (concentração em que se verifica redução de 50% da viabilidade celular) deste DDS nesta linha celular é 0,0914 mM.

O IC₅₀ do 5-FU livre às 48 h para esta linha celular é 0,4229 mM. Estes resultados levam a inferir que o 5-FU@NaY permite aumentar a eficiência do 5-FU cerca de 5 vezes, ocorrendo por isso uma potenciação do efeito do fármaco.

4.5.3. EFEITO DO SISTEMA 5-FU@LTL NA LINHA CELULAR HCT-15

A Figura 4.42 mostra o efeito do zeólito LTL e do DDS 5-FU@LTL sobre a viabilidade das células HCT-15, determinados pelo ensaio de SRB.

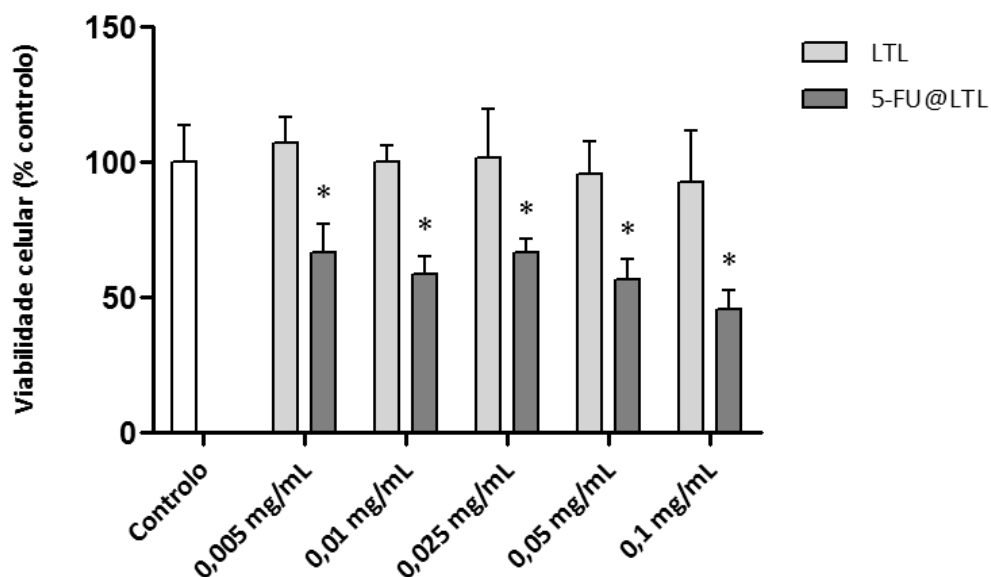


Figura 4.42: Efeito do LTL e do 5-FU@LTL preparado na viabilidade da linha celular HCT-15 do carcinoma colorretal. As células foram incubadas com diferentes concentrações de LTL e o 5-FU@LTL durante 48 h. A viabilidade celular foi medida através do ensaio de SRB. Os valores são média \pm desvio padrão de três ensaios independentes, cada um realizado em triplicado. * $p < 0,05$, comparado com a barra do controlo (células).

Pelos resultados apresentados, observa-se que o zeólito LTL sozinho, à semelhança do zeólito NaY, não provoca redução de viabilidade celular, ou então essa redução é pouco significativa (nas concentrações de 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL) relativamente ao controlo, pelo que é possível dizer-se que o zeólito LTL também não é citotóxico para as células.

Analisando as barras do 5-FU@LTL, verifica-se uma redução na viabilidade celular entre 33 % (na concentração de 0,005 mg/mL) e 54 % (na concentração de 0,1 mg/mL). Ao contrário do que acontece com o 5-FU@NaY, neste DDS a redução da viabilidade não é totalmente proporcional à

concentração das suspensões testadas, pois na concentração de 0,01 mg/mL (41,3%) obtém-se uma redução mais elevada do que na concentração de 0,025 mg/mL (33,3%).

Para este sistema o IC_{50} determinado é 0,4438 mM, sendo por isso mais elevado que o IC_{50} do fármaco sozinho. Nesta linha celular, ao contrário do 5-FU@NaY, este sistema não provoca potenciação do efeito do fármaco. Isto pode ser explicado pelo facto deste sistema, quando em repouso, não permitir uma boa difusão do fármaco, tal como foi verificado nos estudos de difusão por HPLC.

4.5.4. EFEITO DO SISTEMA 5-FU@NANO Na-Y NA LINHA CELULAR HCT-15

A Figura 4.43 mostra o efeito do zeólito NanoNa-Y e do DDS 5-FU@NanoNa-Y sobre a viabilidade das células HCT-15, determinados pelo ensaio de SRB.

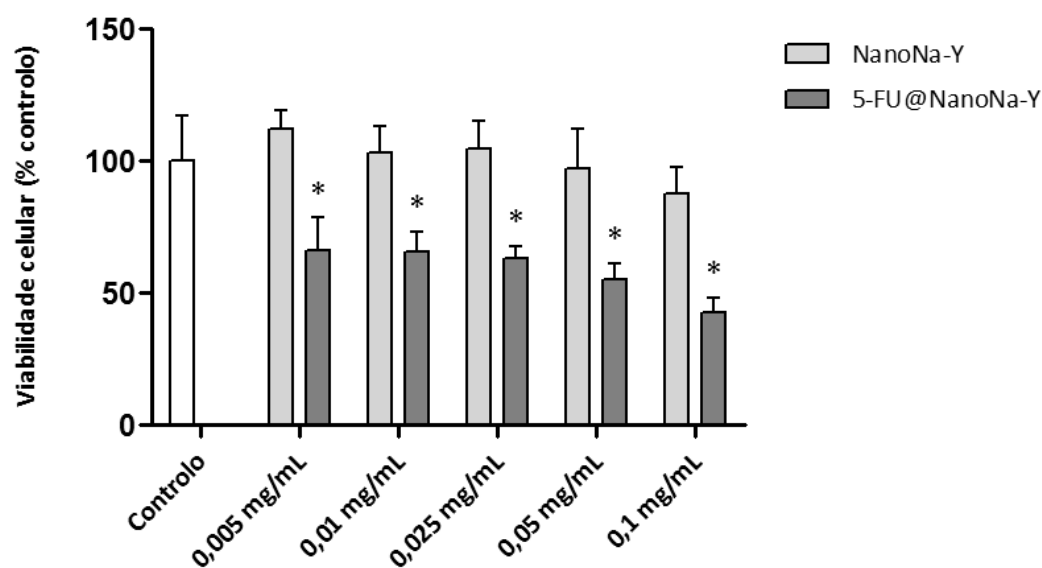


Figura 4.43: Efeito do NanoNa-Y e do 5-FU@NanoNa-Y preparado na viabilidade da linha celular HCT-15 do carcinoma colorretal. As células foram incubadas com diferentes concentrações de NanoNa-Y e o 5-FU@NanoNa-Y durante 48 h. A viabilidade celular foi medida através do ensaio de SRB. Os valores são média \pm desvio padrão de três ensaios independentes, cada um realizado em triplicado. * $p < 0,05$, comparado com a barra do controlo (células).

Os resultados apresentados, mostram que o NanoNa-Y não é citotóxico para as células. Apesar de na concentração de 0,1 mg/mL este reduzir a viabilidade celular em 13% relativamente ao controlo, a redução não é suficiente para que se possa dizer que o zeólito deixa de ser apropriado para a utilização como DDS.

Através da visualização do conjunto de dados referentes ao 5-FU@NanoNa-Y, observa-se que este DDS, tal como o 5-FU@NaY e o 5-FU@LTL, também permite obter bons resultados na redução da viabilidade celular. Essa redução situa-se entre 34 % na concentração mais baixa e 58% na concentração mais elevada e, tal como acontece no 5-FU@NaY, a redução da viabilidade parece ser proporcional ao aumento da concentração de DDS.

O IC_{50} determinado para este sistema é 0,2940 mM, sendo por isso mais baixo que o IC_{50} do 5-FU não encapsulado. Isto demonstra que este sistema também consegue potenciar o efeito do fármaco, no entanto essa potenciação não é tão significativa como no sistema 5-FU@NaY uma vez que para este sistema a potenciação é de 1,5 vezes contra as 5 vezes do 5-FU@NaY.

Fazendo uma análise global dos resultados obtidos na linha HCT-15, pode concluir-se que o 5-FU@NaY é o sistema que permite a obtenção de melhores resultados na redução da viabilidade celular, seguido do 5-FU@NanoNa-Y. Estes DDSs para além de permitirem uma diminuição significativa da viabilidade celular, permitem também potenciar a ação do fármaco.

Estes resultados estão concordantes com os resultados obtidos nos estudos de difusão, nos quais se verificou que quando colocados numa solução em repouso, o DDS 5-FU@NaY permite uma maior difusão do fármaco para o exterior do zeólito, seguindo-se o 5-FU@NanoNa-Y e o 5-FU@LTL.

4.5.5. EFEITO DO SISTEMA 5-FU@NaY NA LINHA CELULAR RKO

A Figura 4.44 mostra o efeito do zeólito NaY e do DDS 5-FU@NaY sobre a viabilidade das células RKO, determinados pelo ensaio de SRB.

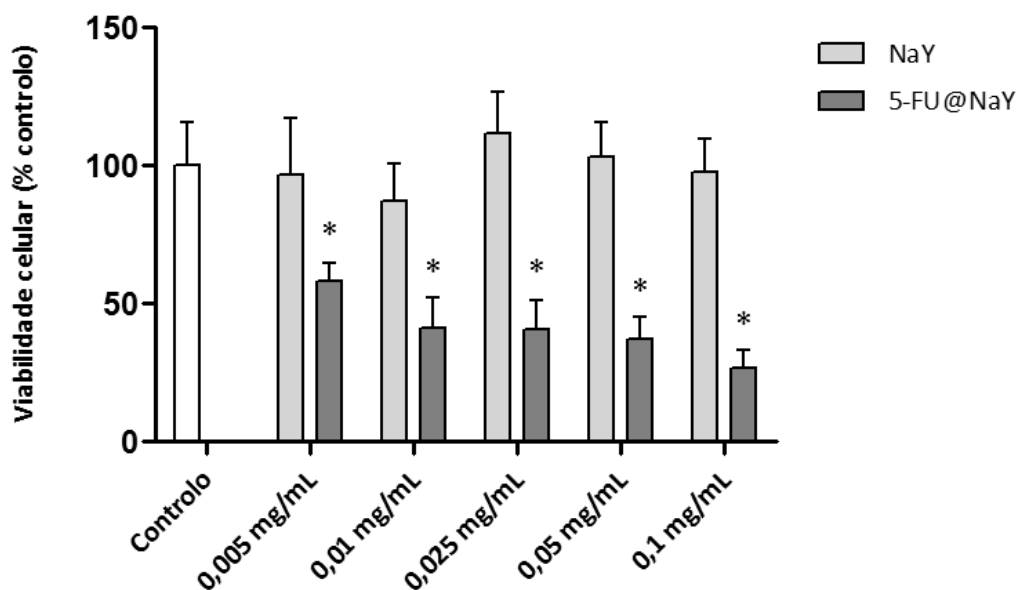


Figura 4.44: Efeito do NaY e do 5-FU@NaY preparado na viabilidade da linha celular RKO do carcinoma colorretal. As células foram incubadas com diferentes concentrações de NaY e o 5-FU@NaY durante 48 h. A viabilidade celular foi medida através do ensaio de SRB. Os valores são média \pm desvio padrão de três ensaios independentes, cada um realizado em triplicado. * $p < 0,05$, comparado com a barra do controle (células).

Observando as barras referentes ao NaY, verifica-se que o zeólito, à exceção da concentração 0,01 mg/mL, não apresenta citotoxicidade para as células durante o período de incubação. No entanto, a redução que se verifica a 0,01 mg/mL não é uma redução significativa, pelo que é possível dizer-se que o zeólito não é citotóxico para as células.

Observando as barras referentes ao 5-FU@NaY verifica-se que nesta linha celular, este sistema também permite uma redução muito significativa da viabilidade celular, sendo essa redução proporcional à concentração de DDS testada. Na concentração de 0,005 mg/mL verifica-se uma redução da viabilidade celular em 42,1% e na concentração de 0,1 mg/mL essa redução é de 73,3%.

Nesta linha celular, o IC_{50} do 5-FU sozinho às 48 h é de 0,1044 mM. O IC_{50} determinado para 5-FU@NaY é 0,0318 mM. Mais uma vez se mostra que este sistema permite uma potenciação do 5-FU, não sendo no entanto tão significativa como na linha HCT-15. O aumento da eficácia do 5-FU quando encapsulado neste zeólito na linha HCT-15 é cerca de 5 vezes e nesta linha é cerca de 3 vezes.

4.5.6. EFEITO DO SISTEMA 5-FU@LTL NA LINHA CELULAR RKO

A Figura 4.45 mostra o efeito do zeólito LTL e do DDS 5-FU@LTL sobre a viabilidade das células RKO, determinados pelo ensaio de SRB.

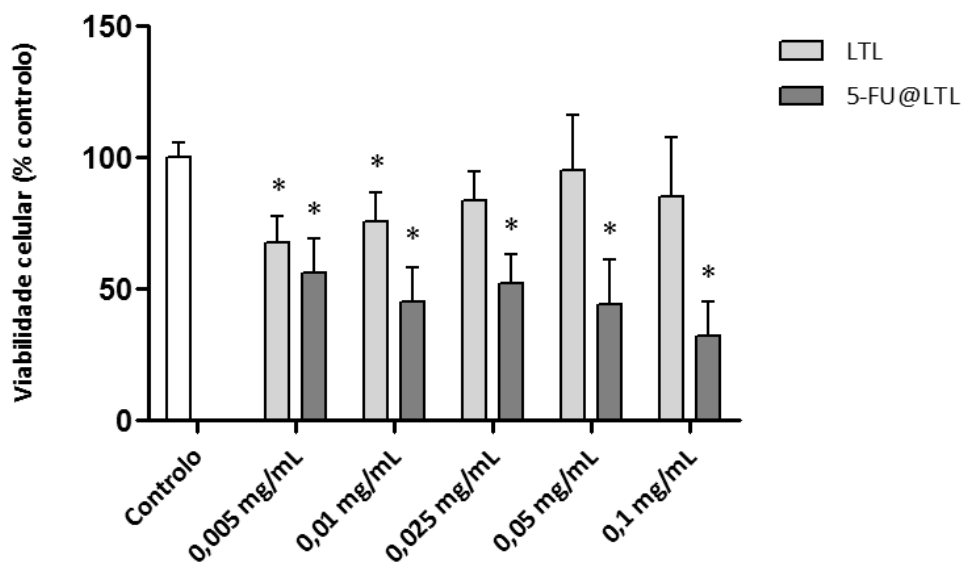


Figura 4.45: Efeito do LTL e do 5-FU@LTL preparado na viabilidade da linha celular RKO do carcinoma colorretal. As células foram incubadas com diferentes concentrações de LTL e o 5-FU@LTL durante 48 h. A viabilidade celular foi medida através do ensaio de SRB. Os valores são média \pm desvio padrão de três ensaios independentes, cada um realizado em triplicado. * $p < 0,05$, comparado com a barra do controle (células).

Analisando os resultados apresentados, verifica-se que o zeólito sozinho provoca redução da viabilidade em todas as concentrações testadas, no entanto essa redução só é considerada significativa nas concentrações 0,005 mg/mL e 0,01 mg/mL, onde a redução é de 32,3% e 24,2% respectivamente, o que não seria de esperar tendo em conta os resultados que sido apresentados. Esta redução pode dever-se à homogeneização incompleta das suspensões de zeólito, resultando numa deposição de aglomerados de zeólito sobre as células. Estes aglomerados podem criar uma barreira à difusão do oxigénio, comprometendo o acesso das células aos nutrientes do meio e provocando morte celular.

Relativamente aos resultados obtidos com o sistema 5-FU@LTL, verifica-se que há redução da viabilidade celular em todas as concentrações. A redução mais elevada é obtida na concentração de 0,1 mg/mL onde se observa uma diminuição de 68 % relativamente ao controlo.

Para este sistema o IC_{50} determinado foi de 0,0483 mM. Ao contrário do que acontece na linha celular HCT-15, em que este sistema não provoca potenciação do efeito do fármaco, nesta linha

celular já se verifica um aumento da eficácia do fármaco de cerca de 2,2 vezes quando comparado com o fármaco sozinho.

4.5.7. EFEITO DO SISTEMA 5-FU@NANO Na-Y NA LINHA CELULAR RKO

A Figura 4.46 mostra o efeito do zeólito NanoNa-Y e do DDS 5-FU@NanoNa-Y sobre a viabilidade das células RKO, determinados pelo ensaio de SRB.

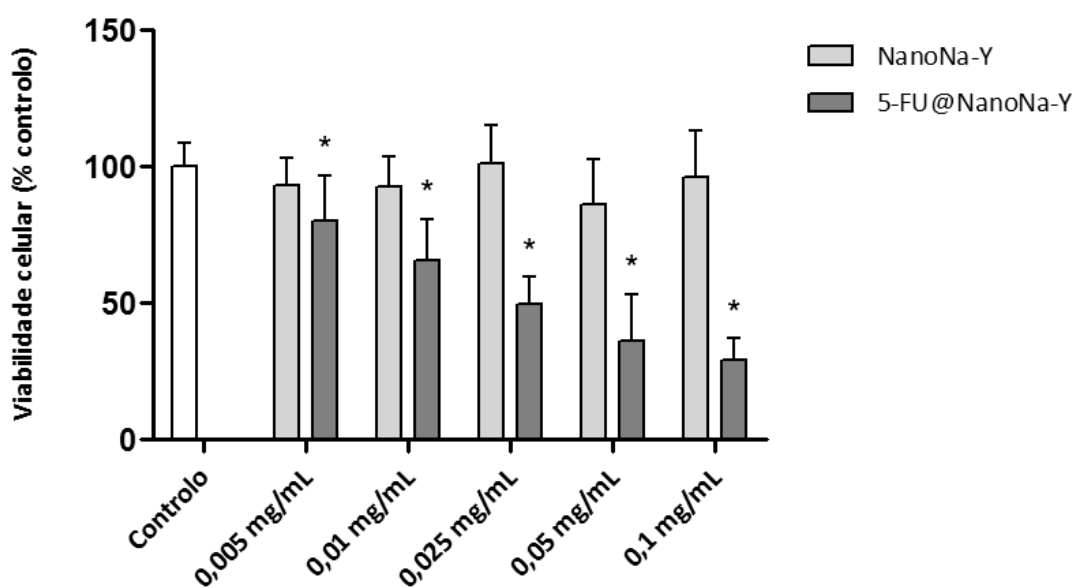


Figura 4.46: Efeito do NanoNa-Y e do 5-FU@NanoNa-Y preparado na viabilidade da linha celular RKO do carcinoma colorretal. As células foram incubadas com diferentes concentrações de NanoNa-Y e o 5-FU@NanoNa-Y durante 48 h. A viabilidade celular foi medida através do ensaio de SRB. Os valores são média \pm desvio padrão de três ensaios independentes, cada um realizado em triplicado. * $p < 0,05$, comparado com a barra do controlo (células).

Observando os resultados obtidos, verifica-se que o NanoNa-Y sozinho não provoca diminuição significativa da viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas.

Por sua vez o sistema 5-FU@NanoNa-Y provoca uma elevada redução da viabilidade celular, que é proporcional à concentração de DDS testada. A diminuição da viabilidade varia entre 19,7% na concentração 0,005 mg/mL e 71,03% na concentração 0,1 mg/mL.

O IC_{50} determinado para este DDS é 0,1102 mM. Então, nesta linha celular este sistema não consegue potenciar o efeito do fármaco pois o IC_{50} do 5-FU livre é inferior ao IC_{50} do 5-FU@NanoNa-Y.

Globalmente, verifica-se que o sistema que permite a obtenção de melhores resultados é o 5-FU@NaY independentemente da linha celular em que é testado. Estes resultados estão relacionados com a estrutura tridimensional NaY, permitindo por isso uma melhor difusão do fármaco para o exterior da estrutura zeolítica, bem como com a capacidade de adsorção deste zeólito como foi verificado nas análises térmicas.

Na Tabela 4.5 são comparados os IC₅₀s do 5-FU livre para as duas linhas e do 5-FU encapsulado nos vários sistemas testadas.

Tabela 4.5: Resumo dos IC₅₀ dos vários DDSs testados nas duas linhas celulares estudadas.

DDS	Linha HCT-15		Linha RKO	
	IC ₅₀ (mM)	Potenciação (×)	IC ₅₀ (mM)	Potenciação (×)
5-FU livre	0,4229	-	0,1044	-
5-FU@NaY	0,0914	5	0,0318	3
5-FU@LTL	0,4438	Não se verifica	0,0483	2
5-FU@NanoNa-Y	0,2940	1,5	0,1102	Não se verifica

4.5.8. ENSAIOS DE MICROSCOPIA

4.5.8.1. MICROSCOPIA ÓTICA COM AZUL DE TRIPANO

Com o intuito de observar a interação dos zeólitos e DDSs com as células, utilizou-se a técnica de microscopia ótica. Para isso coraram-se as células com azul de tripano e observaram-se as diferentes condições na objetiva de 100×.

As figuras que se seguem mostram alguns exemplos da interação zeólito-células (Figura 4.48) e DDSs-células (Figura 4.49) na linha HCT-15.



Figura 4.47: Imagem de microscopia ótica de células da linha HCT-15 (controlo) obtida na ampliação de 1000x.

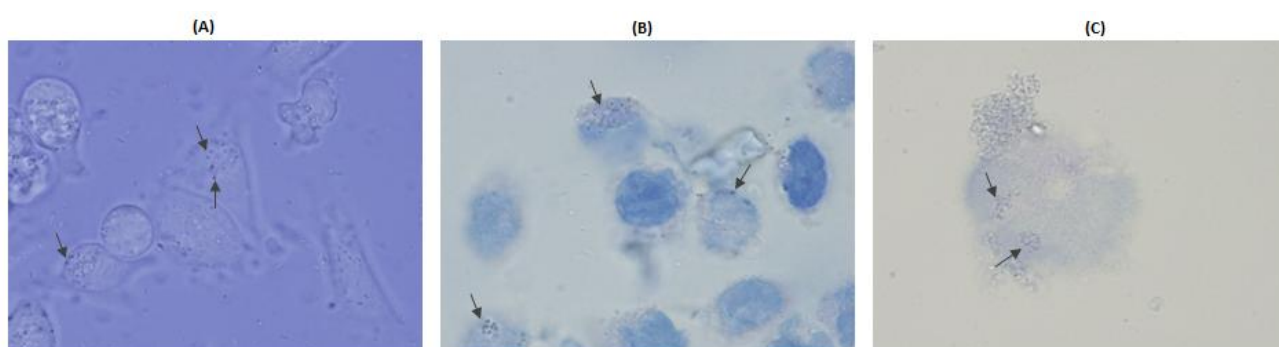


Figura 4.48: Imagens de microscopia ótica da interação dos zeólitos com as células da linha HCT-15 (setas) obtidas na ampliação de 1000x. (A) NaY; (B) LTL; (C) NanoNa-Y.

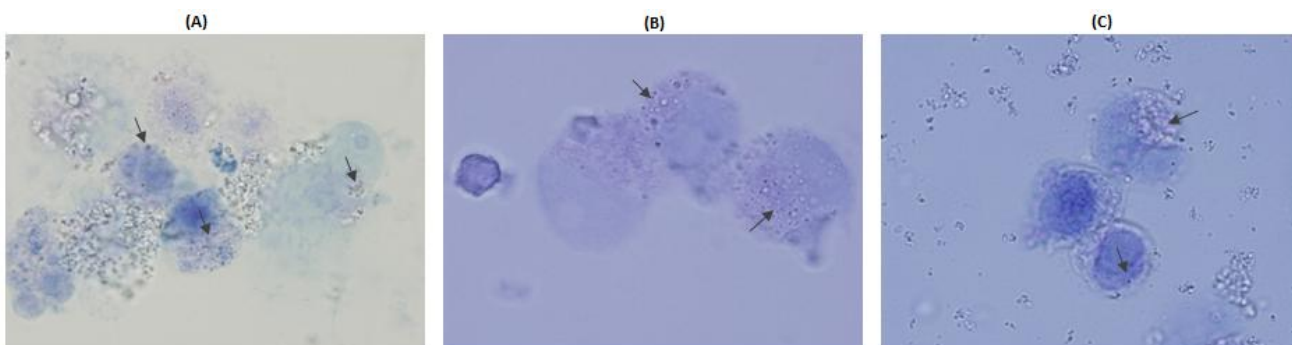


Figura 4.49: Imagens de microscopia ótica da interação dos DDSs com as células da linha HCT-15 (setas) obtidas na ampliação de 1000x. (A) 5-FU@NaY; (B) 5-FU@LTL; (C) 5-FU@NanoNa-Y.

Comparando as Figuras 4.48 e 4.49 com a Figura 4.47 (controlo), parece que os zeólitos e respetivos DDSs conseguem internalizar-se nas células. Nas imagens das células com zeólito e com DDSs observa-se a presença de pequenas partículas (assinaladas pelas setas) que não são visíveis na imagem do controlo (Figura 4.47). Estas partículas são partículas de zeólito e de DDS, que parecem ter entrado nas células, provavelmente por um processo de endocitose. Para que este processo

ocorra, forma-se uma invaginação na membrana celular. Quando esta invaginação da membrana se fecha, forma-se uma pequena vesícula na qual estão contidas partículas de zeólitos ou DDSs. Esta vesícula é libertada no citoplasma e junta-se a um lisossoma que através da ação de hidrolases ácidas permite a libertação do fármaco (Figura 4.50). No entanto, serão necessários mais estudos para provar que é este o processo envolvido na entrada do DDS nas células.

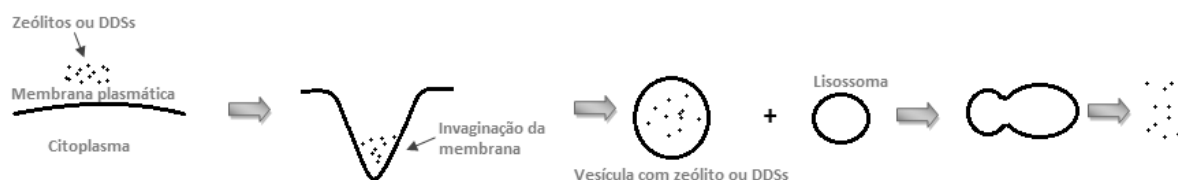


Figura 4.50: Esquema do processo de endocitose para a entrada dos zeólitos ou DDSs nas células [adaptado de 182].

Na linha celular RKO observa-se o mesmo tipo de interação entre os zeólitos-células e DDSs-células do que o observado para a linha HCT-15.

Nas figuras seguintes mostram-se exemplos da interação dos zeólitos (Figura 4.52) e DDSs (Figura 4.53) com as células da linha RKO.

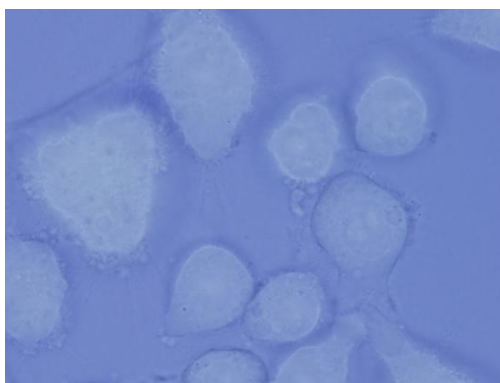


Figura 4.51: Imagem de microscopia ótica de células da linha RKO (controlo) obtida na ampliação de 1000x.

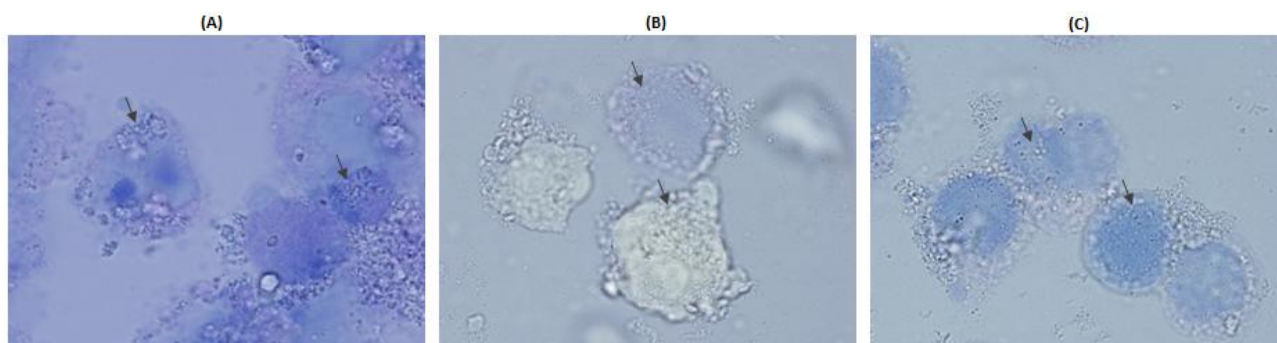


Figura 4.52: Imagens de microscopia ótica da interação dos zeólitos com as células da linha RKO (setas) obtidas na ampliação de 1000x. (A) NaY; (B) LTL; (C) NanoNa-Y.

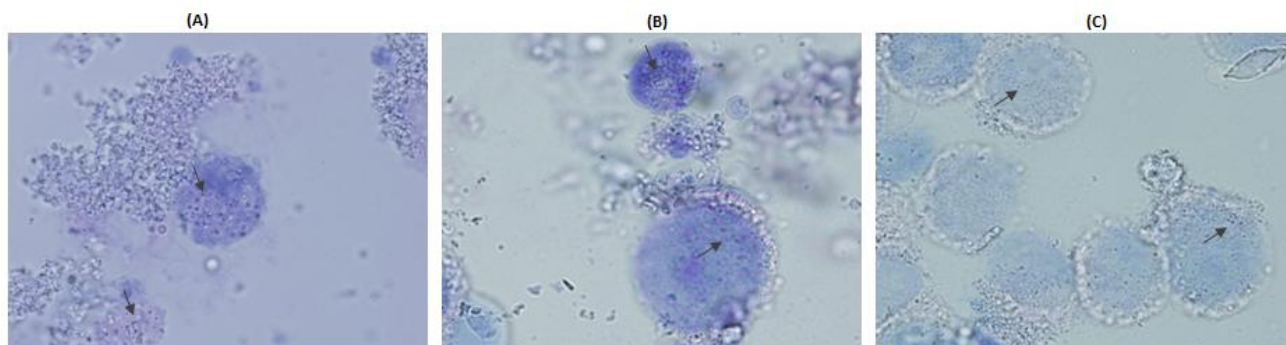


Figura 4.53: Imagens de microscopia ótica da interação dos DDSs com as células da linha RKO (setas) obtidas na ampliação de 1000 \times . (A) 5-FU@NaY; (B) 5-FU@LTL; (C) 5-FU@NanoNa-Y.

4.5.8.2. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Para comprovar os resultados da microscopia ótica, através da qual se observou a presença dos zeólitos no interior das células, marcou-se o NaY com rodamina B e efetuou-se uma análise de microscopia de fluorescência na linha HCT-15 e RKO. Os resultados desta análise estão apresentados nas Figuras 4.54, 4.55 e 4.56.

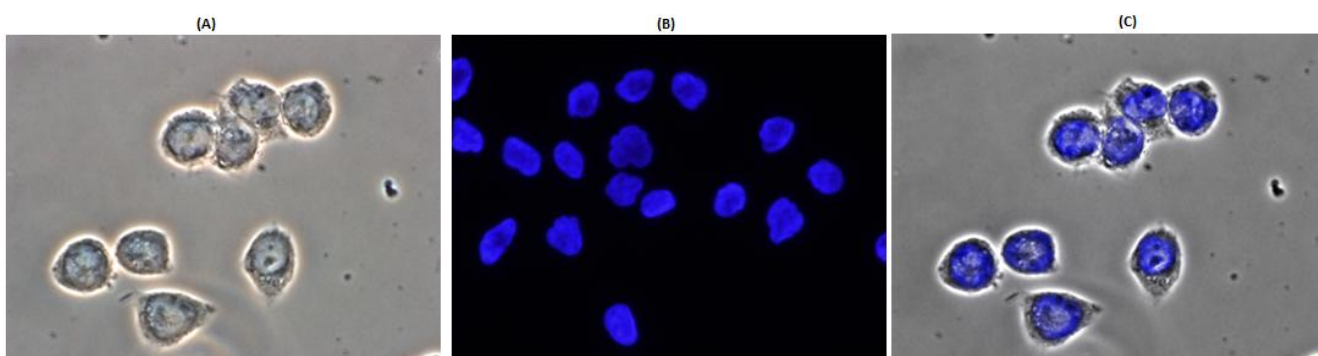


Figura 4.54: Imagens de microscopia de células da linha HCT-15 (controlo). (A) Contraste de fase; (B) Núcleos marcados com DAPI (coloração azul); (C) Conjugação das imagens de contraste de fase e DAPI.

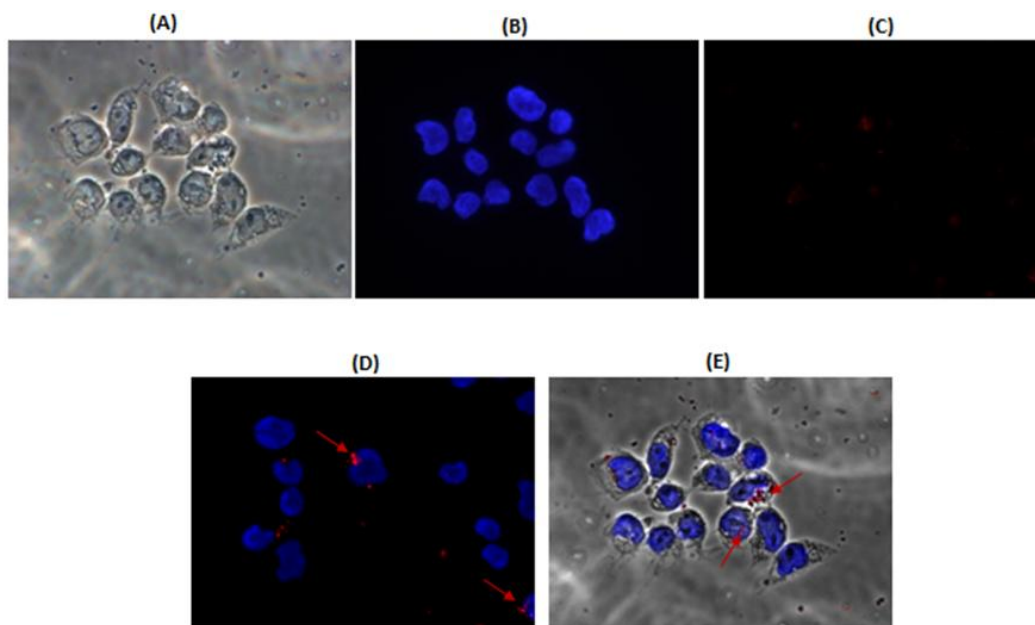


Figura 4.55: Imagens de microscopia da interação de células da linha HCT-15 com o NaY marcado com rodamina B após 48 h de incubação. (A) Contraste de fase; (B) Núcleos marcados com DAPI; (C) Rodamina B (vermelho); (D) Conjugação das imagens de DAPI e rodamina B; (E) Conjugação das imagens de contraste de fase, DAPI e rodamina B. As setas indicam os locais onde se pode visualizar o NaY marcado com rodamina B.

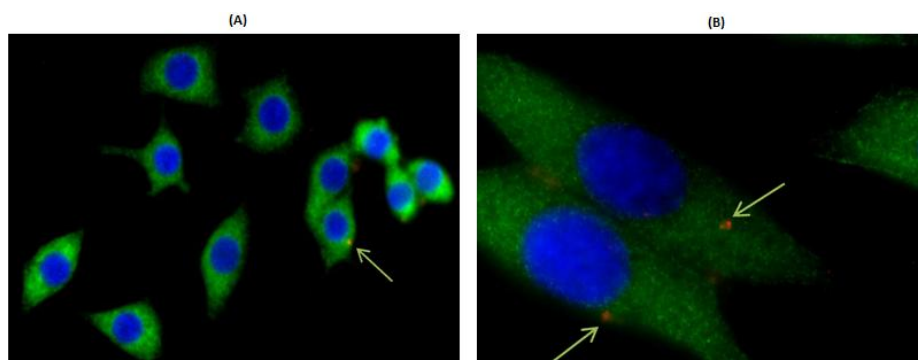


Figura 4.56: Imagens de microscopia da interação de células da linha RKO com o NaY marcado com rodamina B após 48 h de incubação. (A) e (B) Conjugação de imagens de DAPI, rodamina e β -tubulina (verde). O citoplasma das células encontra-se marcado com β -tubulina (coloração verde). As setas indicam os locais onde se pode visualizar o NaY marcado com rodamina B.

Comparando as imagens do controlo (só células) (Figura 4.54) com as imagens do zeólito NaY marcado com rodamina B (Figura 4.55), observa-se que o zeólito consegue internalizar-se no citoplasma das células o que vem comprovar o que foi observado através da microscopia ótica.

Apesar deste processo ter sido feito apenas para o zeólito NaY, será de esperar que aconteça o mesmo com o zeólito LTL e NanoNa-Y até porque têm partículas de menores dimensões, devendo por isso internalizar-se com maior facilidade nas células.

Extrapolando estes resultados para os DDSs, poder-se-á concluir que a libertação do fármaco é feita no citoplasma da célula.

Capítulo 5

Considerações finais

A aplicação da nanotecnologia na medicina é hoje uma realidade, possibilitando o desenvolvimento de sistemas à escala nano que permitem a prevenção, diagnóstico ou mesmo cura de doenças.

Atualmente tem-se assistido a um aumento exponencial dos estudos efetuados na área da nanomedicina, sendo a criação de sistemas *drug delivery* uma das áreas de grande interesse.

Este projeto tinha como propósito criar sistemas *drug delivery* (DDSs) para o tratamento do carcinoma colorretal, utilizando para o estudo os zeólitos NaY, NanoNa-Y e KLTL e o fármaco 5-FU. Perante os resultados obtidos, pode pois afirmar-se que o objetivo do trabalho foi alcançado.

A preparação de DDSs com dois solventes diferentes, metanol e acetona, permitiu mostrar que a escolha do solvente deve ser tida em consideração na preparação dos DDSs, uma vez que o solvente utilizado pode condicionar de forma significativa todos os resultados do trabalho, principalmente os ensaios de viabilidade celular. Neste processo de escolha do solvente deve então ter-se em conta diversas características físico-químicas do mesmo, como por exemplo a sua volatilidade, toxicidade e a sua afinidade para o zeólito. Com um solvente que tenha grande afinidade para o zeólito desfavorece-se a adsorção do fármaco ao zeólito, enquanto que se a afinidade para o zeólito for baixa, a adsorção do fármaco é favorecida. Esta característica está também relacionada com a evaporação do solvente do zeólito, pois quanto menor a afinidade do solvente para o zeólito mais facilmente será evaporado.

No trabalho realizado verificou-se que o metanol é um solvente que tem elevada afinidade para o zeólito dificultando por isso a sua total evaporação da estrutura, o que se traduz em citotoxicidade para as células. Verificou-se então, que dos dois solventes testados, a acetona é o solvente que permite a obtenção de melhores resultados nos ensaios de viabilidade celular, pois o zeólito quando tratado com este solvente não provoca citotoxicidade celular.

Ainda, relativamente à preparação dos DDSs, verificou-se que o método de preparação utilizado, encapsulamento, é um método eficaz para o encapsulamento do fármaco no zeólito e que o processo de secagem após encapsulamento é eficiente na evaporação do solvente. A escolha da temperatura a utilizar para a evaporação do solvente deve ter em conta a volatilidade do mesmo e a estabilidade do fármaco. Deve pois situar-se um pouco acima do ponto de ebulição do solvente mas abaixo do ponto de fusão do fármaco, de forma a que no processo de secagem haja a evaporação do solvente sem ocorrer a degradação do fármaco.

Após a preparação dos DDSs torna-se necessário caracterizá-los, para que se possa fazer uma correta aplicação dos mesmos. As técnicas de caracterização utilizadas permitiram comprovar a

presença do fármaco nas estruturas zeolíticas permitindo ainda averiguar a manutenção da estrutura do fármaco e da estrutura do zeólito.

Através da análise química elementar confirmou-se que o fármaco foi encapsulado com sucesso nos zeólitos pois as razões C/N experimentais e a razão teórica não apresentam diferenças significativas. Esta presença do fármaco nos zeólitos foi também confirmada pelas análises de UV/Vis. Na análise dos espectros de absorção observou-se a existência de um pico entre 320 e 250 nm em todos os espectros dos DDSs analisados, que comparando com o espectro do 5-FU e dos zeólitos, se verifica ser característico do fármaco uma vez que nos espectros dos zeólitos não se observa a existência desse pico.

Por sua vez, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) permitiu avaliar a presença do fármaco nos DDSs bem como demonstrar a manutenção da integridade estrutural dos zeólitos. Os espectros obtidos por esta técnica demonstraram a presença de bandas que são características dos zeólitos e do fármaco, sendo por isso comprovada a presença do fármaco nas estruturas zeolíticas. Através desta técnica verificou-se ainda que o encapsulamento do fármaco provoca uma ligeira alteração da razão Si/Al do NaY, pois antes do encapsulamento a razão do zeólito é 2,75 e após o encapsulamento é de 2,98, sugerindo por isso que o durante o processo de encapsulamento o zeólito se torna menos ácido.

As análises por microscopia eletrônica de varrimento mostraram que a morfologia dos três zeólitos utilizados se mantém intacta após o encapsulamento do fármaco, e mostraram a existência de agregados à superfície dos zeólitos atribuídos à presença de fármaco.

Através das análises térmicas constatou-se que o 5-FU mantém a sua estabilidade nos DDSs. Constatou-se ainda que dos zeólitos utilizados para a preparação dos DDSs é o zeólito NaY que apresenta maior capacidade de adsorção de fármaco e que os zeólitos KLTL e NanoNa-Y apresentam capacidades de adsorção semelhantes. Isto mostra que o tamanho das partículas dos zeólitos influencia a quantidade de fármaco que fica adsorvido na estrutura zeolítica, então, é possível dizer-se que quanto maiores as partículas maior a capacidade de adsorção do zeólito. Os resultados destas análises podem explicar os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular. Dado que o NaY é o que apresenta maior quantidade de fármaco encapsulado, é de esperar que este sistema seja o que apresenta melhores resultados na redução da viabilidade celular, o que efetivamente se verificou.

Por fim, as análises de RMN de estado sólido, realizadas aos zeólitos NaY e NaA e fármaco CHC, consolidaram os resultados obtidos com as técnicas de caracterização anteriormente mencionadas. Através de análises de ^{27}Al CP/MAS RMN e ^{23}Na CP/MAS RMN dos espectros obtidos para os zeólitos como padrão e zeólitos tratados com solvente e os zeólitos com fármaco verificou-se que não existem desvios químicos significativos dos picos do alumínio tetraédrico e do sódio, o que significa que tanto o procedimento experimental escolhido para o encapsulamento, como a presença do

fármaco, não provocam alterações estruturais no zeólito. Através de análises de ^{13}C CP/MAS RMN observou-se que o zeólito e o fármaco estabelecem interações através da unidade alifática do fármaco. Apesar de estas análises terem sido feitas apenas para o DDS CHC@zeólito, prevê-se o mesmo comportamento zeólito-fármaco com o 5-FU.

Relativamente aos estudos de libertação do 5-FU a partir dos DDSs, quando colocados em soluções em repouso e em soluções sujeitas a agitação, verificou-se que a agitação mecânica provoca uma maior libertação de fármaco para o exterior das estruturas. Então, e uma vez que agitação tinha como intuito mimetizar, de uma forma muito simplista, as condições a que estes sistemas seriam sujeitos se estivessem presentes no organismo humano, poder-se-á dizer que estes sistemas não terão dificuldade em libertar o fármaco nos órgãos pretendidos.

Os estudos efetuados permitem concluir que as estruturas tridimensionais facilitam a libertação do fármaco quando as soluções do sistema estão em repouso, não se verificando no entanto qualquer diferença na libertação das estruturas tridimensionais ou unidimensionais quando o sistema é sujeito a agitação. Então, poder-se-á dizer que a agitação ajuda a eliminar o empacotamento do fármaco que se forma no interior dos poros da estrutura unidimensional. Estes estudos possibilitaram ainda verificar que a integridade do fármaco é mantida após o seu encapsulamento nos zeólitos, pois comparando os cromatogramas dos DDSs com o cromatograma do 5-FU livre, observa-se o mesmo comportamento, isto é, um pico com a mesma resolução e com o mesmo tempo de retenção.

Este projeto culminou com o teste dos DDSs preparados em duas linhas celulares do carcinoma colorretal, a linha HCT-15 e linha RKO. Os testes dos zeólitos nas linhas mostraram que estes não apresentam citotoxicidade para as células.

Dos sistemas estudados, o que se revelou mais eficaz na redução da viabilidade celular foi o sistema 5-FU@NaY em ambas as linhas celulares. Nos ensaios celulares as suspensões de DDSs após serem colocadas nas células são mantidas em repouso durante 48h. Então, os resultados obtidos nestes ensaios estão concordantes com os obtidos nos estudos de libertação, onde se verificou que o sistema 5-FU@NaY é o que consegue libertar mais fármaco para a solução quando se encontra em repouso. Este sistema revelou-se ainda eficaz na potenciação do fármaco. O IC_{50} do 5-FU livre na linha HCT-15 é 0,4229 mM e o IC_{50} do 5-FU encapsulado no zeólito é 0,0914 mM, o que demonstra um aumento de cerca de 5 vezes da eficácia do fármaco quando presente nos DDSs. Na linha RKO o IC_{50} do 5-FU livre é 0,1044 mM e o IC_{50} do 5-FU encapsulado neste zeólito é 0,0318 mM verificando-se por isso um aumento de 3 vezes da eficácia do fármaco.

Para o sistema 5-FU@LTL também se obteve bons resultados na diminuição da viabilidade celular, no entanto esses resultados são mais satisfatórios na linha RKO, onde para além da redução

da viabilidade celular, se verifica um aumento da eficácia do fármaco. Nesta linha, o IC_{50} do 5-FU quando encapsulado neste zeólito é 0,0483 mM contra os 0,1044 mM para o fármaco livre.

Com o sistema 5-FU@NanoNa-Y, obtêm-se bons resultados em ambas as linhas, todavia esses resultados são mais satisfatórios na linha HCT-15 pois para além de diminuição da viabilidade ocorre potenciação do fármaco. O IC_{50} do 5-FU neste sistema é 0,2940 mM enquanto o do fármaco livre é 0,4229 mM.

A potenciação do fármaco quando encapsulado nos zeólitos confirma o que foi mencionado sobre os sistemas *drug delivery*, pois estes sistemas devido à libertação controlada do fármaco permitem aumentar a sua eficácia terapêutica.

Os resultados de microscopia ótica e microscopia de fluorescência revelaram-se úteis para avaliar a interação zeólito-células, observando-se que os zeólitos se internalizam nas células, provavelmente através de um processo de endocitose.

Capítulo 6

Perspetivas futuras

Finalizado o trabalho exposto e uma vez que os resultados apresentados são muito satisfatórios, importa pois sugerir ideias que permitam dar continuidade a este trabalho num futuro próximo.

Os sistemas até agora testados foram sempre preparados através do mesmo método de preparação. Será pois interessante preparar novos DDSs utilizando outros métodos de preparação, como a impregnação húmida incipiente ou impregnação por imersão, através de fase gasosa ou através dos procedimentos secos, para averiguar se também com esses métodos se consegue manter a estabilidade do fármaco e do zeólito e se os sistemas se mantêm eficazes na redução da viabilidade celular.

Dever-se-á também aumentar a especificidade destes sistemas para o local de atuação. Para isso poder-se-á funcionalizar a superfície dos zeólitos, através da utilização de grupos aminas ou grupos carboxilos com afinidade para as células alvo.

Diversos estudos têm vindo a conjugar outros fármacos, como por exemplo o Levamisol, com o 5-FU de forma a aumentar a eficácia dos tratamentos de quimioterapia. Então em estudos futuros, poder-se-á preparar sistemas com a conjugação de dois fármacos, para avaliar se também nestes casos há potenciação do efeito dos fármacos.

Será ainda interessante realizar estudos teóricos, utilizando programas de modelação molecular, que permitam observar o tipo de ligações que os fármacos estabelecem com os zeólitos.

Relativamente aos estudos de libertação do fármaco há ainda muito a ser feito, nomeadamente testar a libertação em diferentes valores de pH, de forma a imitar as condições a que estes sistemas serão sujeitos no organismo ao longo das estruturas fisiológicas, até chegarem aos locais de atuação. Dever-se-á também, efetuar estudos farmacocinéticos teóricos para perceber qual a lei cinética que se adequa à libertação do fármaco a partir destes sistemas. Dever-se-á ainda realizar mais estudos farmacodinâmicos, de forma a tentar garantir a repetibilidade dos resultados.

No que diz respeito aos testes celulares, há diversos parâmetros que precisam ser explorados. É necessário investigar o efeito que os DDSs podem provocar em células saudáveis, verificando se provocam morte celular ou não, e estudar o efeito que estes sistemas têm no metabolismo das linhas celulares estudadas. Dever-se-á ainda testar DDSs noutras linhas celulares do carcinoma colorretal e de outro tipo de cancros para apurar se a eficácia destes sistemas lhes é extensível.

A interação dos DDSs com as células é também outra área que necessita de desenvolvimento, pois contribuirá para a compreensão do mecanismo de libertação do fármaco a partir dos suportes sólidos. Para tal dever-se-ão marcar com um corante fluorescente, para além dos zeólitos livres, os DDSs e investigar a interação com as células ao longo do tempo através de microscopia confocal de varrimento a laser e através de microscopia eletrónica de varrimento.

Em estudos mais avançados, dever-se-á avaliar as reações de imunogenicidade que estes sistemas podem provocar, bem como estudar a sua acumulação em certos órgãos, como por exemplo o fígado.

Capítulo 7

Referências bibliográficas

- [1] Koo, O.M., Rubinstein, I., Onyuksel, H., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1 (2005) 193-212.
- [2] NanoBio-Raise, *Nanomedicine*, 2008. Acedido em 20 de Abril de 2012 em: <http://files.nanobio-raise.org/Downloads/Nanomedicine-fullweb.pdf>.
- [3] Farokhzad, O.C., Langer R., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 (2006) 1456-1459.
- [4] Sahoo, S.K., Parveen, S., Panda, J.J., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3 (2007) 20-31.
- [5] Freitas, R.A. Jr., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1 (2005) 2-9.
- [6] Irache, J.M., Esparza, I., Gamazo, C., Agüeros, M., Espuelas, S., *Veterinary Parasitology*, 180 (2011) 47-71.
- [7] Liu, Y., Miyoshi, H., Nakaruma, M., *International Journal of Cancer*, 120 (2007) 2527-2537.
- [8] Datta, L.C.R., Jaitawat, B.S.S., *Medical Journal Armed Forces India*, 62 (2006) 263-268.
- [9] Resnik, D.B., Tinkle, S.S., *Contemporary Clinical Trials*, 28 (2007) 433-441.
- [10] Huynh, N.T., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J.P., *International Journal of Pharmaceutics*, 379 (2009) 201-209.
- [11] Gupta, A.S., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7 (2011) 763-779.
- [12] Yih, T.C., Wei, C., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1 (2005) 191-192.
- [13] Duncan, R., *Current Opinion in Biotechnology*, 22 (2011) 492-501.
- [14] Drexler, K.E., *Engines of creation: the coming era of nanotechnology*, 1ª edição, Anchor Books, Nova Iorque, 1986.
- [15] Drexler, K.E., Peterson C., Pergamit G., *Unbounding the future: the nanotechnology revolution*, 1ª edição, William Morrow/Quill Books, Nova Iorque, 1991.
- [16] Freitas, R.A Jr., *Nanomedicine, Volume 1: Basic capabilities*, 1ª edição, Landes Bioscience, Georgetown, 1999. Acedido em 20 de Abril de 2012 em: www.nanomedicine.com/NMI.htm.
- [17] Freitas, R.A Jr. *Nanomedicine, Volume IIA: Biocompatibility*, 1ª edição, Landes Bioscience, Georgetown, 2003. Acedido em 20 de Abril de 2012 em: www.nanomedicine.com/NMIIA.htm.

[18] Sekhon, B.S., Kamboj, S.R., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6 (2010) 516-522.

[19] Rannarda, S., Owenb, A., *Nano Today*, 4 (2009), 382-384.

[20] Zhang, X.X., Eden, H.S., Chen, X., *Journal of Controlled Release*, 159 (2012) 2-13.

[21] Navalakhe, R.M., Nandedkar, T.D., *Indian Journal of Experimental Biology*, 45 (2007) 160-165.

[22] Pandey, R., Ahmad, Z., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7 (2011) 259-272.

[23] Shapiraa, A., Livneya, Y.D., Broxterman, H.J., Assaraf, Y.G., *Drug Resistance Updates*, 14 (2011) 150-163.

[24] Linkov, I., Satterstrom, F.K., Corey, L.M., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4 (2008) 167-171.

[25] Kihara, T., Zhang, Y., Hu, Y., Mao, Q., Tang, Y., Miyake, J., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111 (2011) 725-730.

[26] Yi, H., Cho, H.J., Cho, S.M., Lee D.-G., El-Aty, A. A, Yoon, S.J., Bae, G.W., Nho, K., Kim, B., Lee, C.H., Kim, J.S., Bartlett, M.G., Shin, H.C., *BMC Cancer*, 10 (2010) 211.

[27] Abdi, K., Nafisi, Sh., Manouchehri, F., Bonsaii, M., Khalaj, A., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 107 (2012) 20-26.

[28] Barbé, C., Bartlett, J., Kong, L., Finnie, K., Lin, H.Q., Larkin, M., Calleja, S., Bush, A., Calleja, G., *Advanced Materials*, 16 (2004) 1959-1966.

[29] Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., Zhang, Z., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (2008) 1650-1662.

[30] Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Kaiserling, E., Xiao, J.X., Kissel, T., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50 (2000) 147-160.

[31] Jong, W.H., Borm, P.J.A., *International Journal of Nanomedicine*, 3 (2008) 133-149.

[32] LaVan, D.A., McGuire, T., Langer, R., *Nature Biotechnology*, 21 (2003) 1184-1191.

[33] Psarros, C., Lee, R., Margaritis, M., Antoniadis, C., *Maturitas*, in press.
doi:10.1016/j.maturitas.2011.12.014

[34] Nair, L.S., Laurencin, C.T., *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 102 (2006) 47-90.

[35] Cannizzaro, S.M., Langer, R.S., *Chemical Reviews*, 99 (1999) 3181-3198

[36] Mohanraj, V.J., Chen, Y., *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5 (2006) 561-573.

[37] Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., Rudzinski, W.E., *Journal of Controlled Release*, 70 (2001) 1-20.

[38] Gelperina, S., Kisich, K., Iseman, M.D., Heifets, L., *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172 (2005) 1487-1490.

[39] Kreuter, J., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47 (2001) 65-81.

[40] Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2 (2006) 8-21.

[41] Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2 (2006) 53-65.

[42] Pathak, Y., Thassu, D., *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*, 1ª edição, Informa Healthcare, Nova Iorque, 2009.

[43] Kawasaki, E.S., Player, A., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1 (2005) 101-109.

[44] Pillai, O., Panchagnula, R., *Current Opinion in Chemical Biology*, 5 (2001) 447-451.

[45] Vogelson C.T., *Modern Drug Discovery*, 4 (2001) 49-50.

[46] Mishra, B., Patel, B.B., Pharm, B., Tiwari S., Pharm M., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6 (2010) 9-24.

[47] Chiellini, F., Bartoli, C., Dinucci, D., Piras, A.M., Anderson, R., Croucher, T., *International Journal of Pharmaceutics*, 343 (2007) 90-97.

[48] Jang, M., Jeong, Y., Nah, J., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81 (2010) 530-536.

[49] Garsuch, V., Breitzkreutz, J., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73 (2009) 195-201.

[50] Vallet-Regi, M., Ramila, A., Real, R.P., Perez-Pariente, J., *Chemistry of Materials*, 13 (2001) 308-311.

[51] Wang, S., *Microporous and Mesoporous Materials*, 117 (2009) 1-9.

[52] Scott, B.J., Wirnsberger, G., Stucky G.D., *Chemistry of Materials*, 13 (2001) 3140-3150.

[53] Hartmann, M., *Chemistry of Materials*, 17 (2005) 4577-4593.

[54] Danilczuk, M., Długopolska, K., Ruman, T., Pogocki, D., *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8 (2008) 1407-1417.

[55] Horcajada, P., Márquez-Alvarez, C., Rámila, A., Pérez-Pariente, J., Vallet-Regí, M., *Solid State Sciences*, 8 (2006) 1459-1465.

[56] Rodríguez-Fuentes, G., Barrios, M.A., Iraizoz, A., Perdomo, I., Cedré, B., *Zeolites*, 19 (1997) 441-448.

[57] Čejka, J., Bekkum, H. *Zeolites and Ordered Mesoporous Materials: Progress and Prospects*, 1ª edição, Elsevier, Amesterdão, 2005, 43.

[58] Pescarmona, P.P., *An Exploration of Silsesquioxanes and Zeolites using High – Speed Experimentation*, Tese de Doutorado, Technische Universiteit Delft, Holanda, 2003.

[59] Virta, R.L., *2008 Minerals Yearbook: Zeolites [Advance Release]*, USGS, 2008. Acedido em 3 de Maio de 2012 em: <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/zeolites/myb1-2008-zeoli.pdf>.

[60] Corma, A., Garcia, H., *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2004 (2004) 1143-1164.

[61] Auerbach, S.M., Carrado, K.A., Dutta, P.K., *Handbook of Zeolites Science and Technology*, 1ª edição, Marcel Dekker, Nova Iorque, 2003.

[62] *International Zeolite Association*. Acedido em 3 de Maio de 2012, em: <http://www.iza-online.org/>

[63] Figueiredo, H.S.P., *Reutilização Catalítica de Biossorventes Suportados em Zeólitos*, Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Braga, 2007.

- [64] Taufiqurrahmi, N., Mohamed, A.R., Bhatia, S., *Journal of Nanoparticle Research*, 13 (2011) 3177-3189.
- [65] Taufiqurrahmi, N., Mohamed, A.R., Bhatia, S., *IOP Conference Science: Materials Science and Engineering*, 17 (2011).
- [66] Tosheva, L., Valtchev, V.P., *Chemistry of Materials*, 17 (2005) 2494-2513.
- [67] Koningsveld, H.V., *Compendium of Zeolite Framework Types: Building Schemes and Type Characteristics*, 1ª edição, Elsevier, Amesterdão, 2007.
- [68] Auerbach, S.M., Carrado, K.A., Dutta, P.K., *Handbook of Zeolite Science and Technology*, 1ª edição, Marcel Dekker, Nova Iorque, 2003.
- [69] Gaona-Gómez, A., Cheng, C.H., *Microporous and Mesoporous Materials*, 153 (2012) 227-235.
- [70] Ohsuna, T., Slater, B., Gao, F., Yu, J., Sakamoto, Y., Zhu, G., Terasaki, O., Vaughan, D.E.W., Qiu, S., Catlow, C.R.A., *Chemistry - A European Journal*, 10 (2004) 5031-5040.
- [71] Lee, T.P., Saad, B., Ng, E.P., Salleh, B., *Journal of Chromatography A*, 1237 (2012) 46-54.
- [72] Rimoli, M.G., Rabaioli, M.R., Melisi, D., Curcio, A., Mondello, S., Mirabelli, R., Abignente, E., *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 87 (2008) 156-164.
- [73] Yeo, S.D., Kiran, E., *Journal of Supercritical Fluids*, 34 (2005) 287-308.
- [74] Aguzzi, C., Cerezo, P., Viseras, C., Caramella, C., *Applied Clay Science*, 36 (2007) 22-36.
- [75] Haber, J., Block, H., Delmon, B., *Pure and Applied Chemistry*, 67 (1995) 1257-1306.
- [76] Ali, I.O., *Materials Science and Engineering A*, 459 (2007) 294-302.
- [77] Horcajada, P., Serre, C., Maurin, G., Ramsahye, N.A., Balas, F., Vallet-Regí, M., Sebban, M., Taulelle, F., Férey, G., *Journal of the American Chemistry Society*, 130 (2008) 6774-6780.
- [78] Soares, O.S.G.P., *Nitrate removal by catalytic reduction with hydrogen*, Tese de Doutorado, Universidade do Porto, Porto, 2010.
- [79] López-Periago, A.M., Fraile, J., García-González, C. A., Domingo, C., *The Journal of Supercritical Fluids*, 50 (2009) 305-312.
- [80] Tanamura, Y., Uchida, T., Teramae, N., Kikuchi, M., Kusaba, K., Onodera, Y., *Nano Letters*, 1 (2007) 387-390.

- [81] Gläser, R., *Chemical Engineering & Technology*, 30 (2007) 557-568.
- [82] Coope, G.M., Hausman, R. E., *The Cell: A Molecular Approach*, 3ª edição, ASM Press, Washington, 2004.
- [83] Luciani, A.M., Rosi, A., Matarrese, P., Arancia, G., Guidoni, L., Viti, V., *European Journal of Cell Biology*, 80 (2001) 187-195.
- [84] Ullah, M.F., Aatif, M., *Cancer Treatment Reviews*, 35 (2009) 193-200.
- [85] Nelson, D.L., Cox, M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4ª edição, W. H. Freeman, Nova Iorque, 2004
- [86] Hanahan, D., Weinberg, R.A., *Cell*, 144 (2011) 646-674.
- [87] Hanahan, D., Weinberg, R.A., *Cell*, 100 (2000) 57-70.
- [88] Amorim, R.L.A., *Role of monocarboxylate transporters in colorectal cancer*, Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Braga, 2011.
- [89] Ganapathy, V., Thangaraju, M., Prasad, P.D., *Pharmacology & Therapeutics*, 121 (2009) 29-40.
- [90] Warburg O., Wind F., Negelein E., *Journal of Molecular Medicine*, 5 (1926) 829-832.
- [91] Costello, L.C., Franklin, R.B., *Molecular Cancer*, 5 (2006).
- [92] Sánchez, R.M., Enríquez, S.R., Hernández, A.M., Saavedra, E., *FEBS Journal*, 274 (2007) 1393-1418.
- [93] Pelicano, H., Martin, D.S. Xu, R.H., Huang, P., *Oncogene*, 25 (2006) 4633-4646.
- [94] Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61 (2011) 69-90.
- [95] Boyle, P., Langman, J. S., *BMJ*, 321 (2000) 805-808.
- [96] Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., *International Journal of Cancer*, 127 (2010) 2893-2917.
- [97] Payne, S., *Journal of Men's Health and Gender*, 4 (2007) 131-139.

- [98] Gramont, A., Gramont, A., Chibaudel, B., Larsen, A.K., Tournigand, C., André, T., *Clinical Colorectal Cancer*, 10 (2011) 218-226.
- [99] Vries, E., Soerjomataram, I., Lemmens, V.E.P.P., Coebergh, J.W.W., Barendregt, J.J., Oenema, A., Møller, H., Brenner, H., Renehan, A.G., *European Journal of Cancer*, 46 (2010) 2605-2616.
- [100] Labianca, R., Milesi, L., Mosconi, S., Pessi, M.A., Beretta, G.D., Quadri, A., *Surgical Oncology*, 16 (2007) 93-96
- [101] Halle, M., Schoenberg, M.H., *Deutsches Ärzteblatt International*, 106 (2009) 722-727.
- [102] Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., Karin, M., *Gastroenterology*, 138 (2010) 2101-2114.
- [103] Wilkes, G., Hartshorn, K., *Seminars in Oncology Nursing*, 25 (2009) 32-47.
- [104] Fearon, E.R., Vogelstein, B. *Cell*, 61 (1991) 759-767.
- [105] Morán, A., Ortega, P., Juan, C., Marcelo, T.F., Frías, C., Pernaute, A.S., Torres, J., Rubio, E.D., Iniesta, P., Benito, M., *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2 (2010) 151-158.
- [106] Gatenby, R.A., Vincent, T.L., *Cancer Research*, 63 (2003) 6212-6220.
- [107] Roh, S.A., Kim, H.C., Kim, J.S., Kim, J.C., *Journal of Korean Medical Science*, 18 (2003) 387-391.
- [108] Duval, A., Raphael, M., Brennetot, C., Poirel, H., Buhard, O., Aubry, A., Martin, A., Krimi, A., Leblond, V., Gabarre, J., Davi, F., Charlotte, F., Berger, F., Gaidano, G., Capello, D., Canioni, D., Bordessoule, D., Feuillard, J., Gaulard, P., Delfau, M. H., Ferlicot, S., Eclache, V., Prevot, S., Guettier, C., Lefevre, P. C., Adotti, F., Hamelin, R., *PNAS*, 101 (2004) 5002-5007.
- [109] Labianca, R., Beretta, G.D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M.A., Prochilo, T., Qaudri, A., Gatta, G., Braud, F., Wils, J., *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 74 (2010) 106-133.
- [110] Dosso, S., Sessa, C., Saletti, P., *Cancer Treatment Reviews*, 35 (2009) 160-166.
- [111] Lombardi, L. Morelli, F., Cinieri, S., Santini, D., Silvestris, N., Fazio, N., Orlando, L., Tonini, G., Colucci, G., Maiello, E., *Cancer Treatment Reviews*, 36S3 (2010) 34-41.
- [112] Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneberg P.B., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J., Scheiner, J., *Nature*, 179 (1957) 663-666.

- [113] Martino, M. M., Martino, R., *The Oncologist*, 7 (2002) 288-323.
- [114] Casale, F., Canaparo, R., Serpe, L., Muntoni, E., Pepa, C. D., Costa, M., Mairone, L., Zara, G. P., Fornari, G., Eandi, M., *Pharmacological Research*, 50 (2004) 173-179.
- [115] Daumar, P., Decombat, C., Chezal, J. M., Debiton, E., Madesclaire, M., Coudert, P., Galmier, M. J., *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46 (2011) 2867-2879.
- [116] Berrada, M., Yang, Z., Lehnert, S., *International Journal Radiation Oncology Biology Physics*, 54 (2002) 1550-1557.
- [117] Luo, Q., Wang, P., Miao, Y., He, H., Tang, X., *Carbohydrate Polymers*, 87 (2012) 2642-2647.
- [118] Puwang, L., Wang, Y., Peng, Z., She, F., Kong, L., *Carbohydrate Polymers*, 85 (2011) 698-704.
- [119] Akhdar, H., Loyer, P., Rauch, C., Corlu, A., Guillouzo, A., Morel, F., *European Journal of Cancer*, 45 (2009) 2219-2227.
- [120] Gomes, N. P., Vizcaíno, J. R., Gonçalves, V. M., Pinheiro, C., Silva, J., Pereira, H., Monteiro, P., Henrique, R. M., Reis, R. M., Lopes, C., Baltazar, F., *BMC Cancer*, 11 (2011) 312.
- [121] Busk, M., Walenta, S., Klieser, W.M., Steiniche, T., Jakobsen, S., Horsman, M.R., Overgaard, J., *Radiotherapy and Oncology*, 99 (2011) 404-411.
- [122] Coss, R.A., Storck, C.W., Daskalakis, C., Berd, D., Wahl, M.L., *Molecular Cancer Therapeutics*, 2 (2003) 383-388.
- [123] Becker, H.M., Mohebbi, N., Perna, A., Ganapathy, V., Capasso, G., Wagner, C.A., *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 299 (2010) 141-154.
- [124] Halestrap, A.P., Price, N.T., *Biochemical Journal*, 343 (1999) 281-299.
- [125] Halestrap, A.P., Meredith, D., *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 447 (2004) 619-628.
- [126] Pellerin, L., Halestrap, A.P., Pierre, K., *Journal of Neuroscience Research*, 79 (2005) 55-64.
- [127] Poole, R.C., Halestrap, A.P., *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (1997) 14624-14628.
- [128] Ullah, M.S., Davies, A.J., Halestrap, A.P., *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (2006) 9030-9037.
- [129] Fox, J.E.M., Meredith, D., Halestrap, A.P., *Journal of Physiology*, 529 (2000) 285-293.

[130] Wahl, M.L., Owen, J.A., Burd, R., Herlands, R.A., Nogami, S.S., Rodeck, U., Berd, D., Leeper, D.B., Owen, C.S., *Molecular Cancer Therapeutics*, 1 (2002) 617-628.

[131] Lin, R.Y., Vera, J.C., Chaganti, R.S.K., Golde, D.W., *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (1998) 28959-28965.

[132] Philp, N.J., Yoon, H., Grollman, E.F., *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 274 (1998) 1824-1828.

[133] Halestrap, A.P., Denton, R.M., *Biochemical Journal*, 138 (1974) 313-316.

[134] Spencer, T.L., Lehninger, A.L., *Biochemical Journal*, 154 (1976) 405-414.

[135] Hoyer, T., Tuszynski, W., Lienau, C., *Chemical Physics Letters*, 443 (2007) 107-112.

[136] Vilaça, N. S. B., *Drug Delivery-Preparação de fármacos em estruturas nanoporosas*, Projeto Individual, Universidade do Minho, Braga, 2010.

[137] Vilaça, N., Amorim, R., Martinho, O., Reis, R.M., Baltazar, F., Fonseca, A.M., Neves, I.C., *Journal of Materials Science*, 46 (2011) 7511-7516.

[138] Shao, Y., Wang, L., Zhang, J., Anpo, M., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 180 (2006) 59-64.

[139] Sigma-Aldrich, *Rhodamine-B*. Acedido em 4 de Maio de 2012, em: <http://www.sigmaaldrich.com/>.

[140] Cheremisinoff, N.P., *Polymer Characterization: Laboratory Techniques and Analysis*, 1ª edição, Noyes Publications, Nova Jersey, 1996.

[141] Braithwaite, A. e Smith, F.J., *Chromatographic Methods*, 5ª edição, Kluwer Academic Publishers, Londres, 1999.

[142] Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., *Fundamentos de Química Analítica*, 8ª edição, Thomson, 2005.

[143] Jeffery, G.H., Bassett, J., Mendham, J., Denney, R.C., *Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis*, 5ª edição, Longman Scientific & Technical, Londres, 1989.

[144] Tonhi, E., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F., Collins, C.H., *Química Nova*, 25 (2002) 616-623.

[145] Lucas, E.F., Soares, B.G., Monteiro, E.E.C., *Caracterização de Polímeros: Determinação do Peso Molecular e Análise Térmica*, 1ª edição, e-papers, Rio de Janeiro, 2001.

[146] Hornback, J.M., *Organic Chemistry*, 2ª edição, Thomson, Belmont, 2006.

[147] Thermo Nicolet Corporation, *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry*, 2001, Wisconsin.

[148] Stuart, B., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 1ª edição, John Wiley & Sons, Chichester, 2004.

[149] Brundle, C.R., Evans, C.A., Wilson, S., *Encyclopedia of Materials Characterization: Surfaces, Interfaces, Thin Films*, 1ª edição, Butterworth-Heinemann, Stoneham, 1992.

[150] Rocha, F.R.P., *Química Nova*, 27 (2004) 807-812.

[151] Goldstein, J., Newbury, D., Joy, D., Lyman, C., Echlin, P., Lifshin, E., Sawyer, L. e Michael, J., *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*, 3ª edição, Springer, Nova Iorque, 2003.

[152] Araujo, T.S., Santos-Filho, J.B., *Hidroxiapatita Pura e Dopada com Cr³⁺: Produção, Propriedades e Aplicação em Biosensores*, 1ª edição, Aracaju-SE, 2008.

[153] Padilha, A.F., Filho, F.A., *Técnicas de Análise Microestrutural*, 1ª edição, Hemus, Brasil, 2004.

[154] Yao, N., Wang, Z.L., *Handbook of Microscopy for Nanotechnology*, 1ª edição, Kluwer Academic Publishers, Nova Iorque, 2005.

[155] Casimiro, M.H., Leal, J.P., Gil, M.H., Nieto de Castro, C.A., *Química - Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, 98 (2005) 29-35.

[156] Ionashiro, M., *Giolito: Fundamentos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial*, 1ª edição, Giz Editorial, São Paulo, 2005.

[157] Hatakeyama, T., Quinn, F.X., *Thermal Analysis: Fundamentals and Applications to Polymer Science*, 2ª edição, John Wiley & Sons, Chichester, 1999.

[158] Speyer, R.F., *Thermal Analysis of Materials*, 1ª edição, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1994.

[159] Brown, M.E., *Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications*, 2ª edição, Kluwer Academic Publishers, Nova Iorque, 2001.

[160] Haines, P.J., *Principles of Thermal Analysis and Calorimetry*, 1ª edição, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2002.

[161] Grillo I., *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14 (2009) 402-408.

[162] Guinier A. *La diffraction des rayons X aux très petits angles: Application à l'étude de phénomènes ultramicroscopique*, 1ª edição, Annals of Physics, Paris, 1939.

[163] Radlinski, A.P., Mastalerz, M., Hinde, A.L., Hainbuchner, M., Rauch, H., Baron, M., Lin, J.S., Fan, L., Thiyagarajan, P., *International Journal of Coal Geology*, 59 (2004) 245-271.

[164] Laity, P.R., Cameron, R.E., *Powder Technology*, 192 (2009) 287-297.

[165] Hosokawa, M., Nogi, K., Naito, M., Yokoyama, T., *Nanoparticle Technology Handbook*, 2ª edição, Elsevier, Amesterdão, 2012.

[166] Kumar, C.S.S.R., *Nanosystem Characterization Tools in the Life Sciences*, 1ª edição, Wiley VCH, Weinheim, 2006.

[167] Sakka, S., *Handbook of Sol-Gel Science and Technology: Processing, Characterization and Applications: Volume II*, Kluwer Academica Publishers, Nova Iorque, 2004.

[168] Duhovny, D.S., Hammel, M., Sali, A., *Journal of Structural Biology*, 173 (2011) 461-471.

[169] Oliveira, C.L.P., Behrens, M.A., Pedersen, J.S., Erlacher, K., Otzen, D., Pedersen, S., *Journal of Molecular Biology*, 387 (2009) 147-161.

[170] Tsuruta, H., Irving, T.C., *Current Opinion in Structural Biology*, 18 (2008) 601-608.

[171] van Bekkum, H., Flanigen, E.M., Jacobs, P.A., Jansen, J.C., *Introduction to Zeolite Science and Practice*, 2ª edição, Elsevier Science Publishers, Amesterdão, 2001.

[172] Luzyanin, K., Abrantes, M., *Química*, 117 (2010).

[173] Amorim, S.A.C., *Desenvolvimento de Nanocompósitos para Embalagens para Aplicações Médicas*, Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Braga, 2009.

[174] Guisnet, M., Ribeiro, F.R., *Zeólitos – Um Nanomundo ao Serviço da Catálise*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2004.

[175] Sigma-aldrich, *Invitro Toxicology Assay Kit: Sulforhodamine B Based*, 2003, Missouri.

[176] O'Toole, S.A., Sheppard, B.L., McGuinness, E.P.J., Gleeson, N.C., Yoneda, M., Bonnar, J., *Cancer Detection and Prevention*, 27 (2003) 47-54.

[177] Malich, G., Markovic, B., Winder, C., *Toxicology*, 124 (1997) 179-192.

[178] Capasso, J.M., Cossío, B.R., Berl, T., Rivard, C.J., Jiménez, C., *Biomolecular Engineering*, 20 (2003) 133-138.

[179] Mozgawa, W., *Journal of Molecular Structure*, 555 (2000) 299-304.

[180] Kuzniarska-Biernacka, I., Biernacki, K., Magalhães, A.L., Fonseca, A.M., Neves, I.C., *Journal of Catalysis*, 278 (2011) 102-110.

[181] Ghesti, G.F., Macedo, J.L., Parente, V.C.I., Dias, J.A., Dias, S.C.L., *Microporous and Mesoporous Materials*, 100 (2007) 27-34.

[182] Chin, C.M., Ferreira, E.I., *Química Nova*, 22 (1999) 75-84.