

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS MATERIAIS

Kelly Fernanda Martins

**Obtenção e caracterização de microesferas do copolímero PLDLA
contendo Paclitaxel**

Sorocaba, 2013

Kelly Fernanda Martins

**Obtenção e caracterização de microesferas do copolímero PLDLA
contendo paclitaxel**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências dos Materiais.

Orientador: Prof^a Dr^a. Eliana Aparecida de Rezende Duek

Sorocaba, 2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

KELLY FERNANDA MARTINS

**"OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DO
COPOLÍMERO PLDLA CONTENDO PACLITAXEL"**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM, para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais. Área de concentração Nanociência e Nanotecnologia de Materiais, da Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 05 de fevereiro de 2013.

Orientador(a)



Prof (a). Dr.(a) Eliana Aparecida de Rezende Duek
PUC – Pontifícia Universidade Católica de SP/campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof (a). Dr. (a) Fábio de Lima Leite
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof (a). Dr.(a) Adriana Cristina Motta
PUC – Pontifícia Universidade Católica de SP/campus Sorocaba

Martins, Kelly Fernanda
M386o Obtenção e caracterização de microesferas do copolímero PLDLA
contendo paclitaxel / Kelly Fernanda Martins. -- Sorocaba, 2013.
77 f. : il. (color.) ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, *Campus*
Sorocaba, 2013
Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek
Banca examinadora: Fábio de Lima Leite, Adriana Cristina Motta
Bibliografia

1. Biomateriais. 2. Polímeros (Materiais). 3. Microesferas – uso
terapêutico. 4. Sistemas de liberação de drogas – métodos. I. Título. II.
Sorocaba - Universidade Federal de São Carlos.

CDD 610.28

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do *Campus* de Sorocaba.

DEDICATÓRIA

À Deus em quem deposito toda minha confiança . Obrigado por iluminar a minha vida e guiar o meu caminho.

À minha mãe Vanda, agradeço pelo carinho, amor e pelos valores e ensinamentos de vida que sempre me proporcionou. Agradeço pela mãe maravilhosa que tenho.

As minhas irmãs Kassandra e Luiza, pelos momentos maravilhosos e especiais que sempre passamos juntas.

Aos meus avós Valdir e Amélia, pelo carinho e dedicação que sempre tiveram comigo.

Ao meu esposo, e grande amor, Diego, por sempre me apoiar e acreditar em mim. Agradeço pelo seu amor, pela sua paciência e pelos seus valores de vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Eliana Duek, por me apoiar e me ensinar o que é ser uma pesquisadora. Agradeço pela sua amizade e por me proporcionar muitas oportunidades e ensinamentos que contribuíram muito para minha vida pessoal e profissional.

À toda equipe do Laboratório de Biomateriais, pós-doutorandos, doutorandos, mestrandos, alunos de iniciação científica, apoio técnico, pelo carinho e amizade que sempre tiveram comigo.

Ao amigo e doutorando André Messias, pela amizade e valiosas contribuições para realização desse trabalho. Obrigado pelas longas conversas que sempre tivemos. Aprendi muito com você nestes três anos de convivência. Você é um amigo muito valioso para mim .

Ao Laboratório Multiusuários de Microscopia Eletrônica de Varredura (LabMEV-Unicamp), pelas imagens de microscopia eletrônica.

Ao Instituto de Química da Unicamp pelas orientações sobre as análises de espalhamento de luz.

À empresa farmacêutica LIBBS, pela doação do quimioterápico paclitaxel.

Ao Prof. Dr. Fábio de Lima Leite, coordenador do Laboratório de Nanoneurobiofísica e Nanomedicina da Universidade Federal de São Carlos- Campus Sorocaba, pelas análises de microscopia de força atômica.

Às pesquisadoras Adriana Motta e Priscyla Marcatto, pelo apoio, amizade, incentivo e principalmente pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos da Programa de Pós Graduação em Ciência dos Materiais, Diego, Juliana, Cristiane, Thiago e Carolina. Obrigado pelas contribuições de cada um tanto para minha dissertação, quanto para minha vida.

À CAPES pelo apoio financeiro.

O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

Fernando Sabino

RESUMO

MARTINS, Kelly Fernanda, *Obtenção e caracterização de microesferas de copolímero PLDLA contendo paclitaxel*, Sorocaba, Universidade Federal de São Carlos, 2013. Dissertação (Mestrado).

Uma forma de minimizar os efeitos colaterais de quimioterápicos concomitantemente ao processo de potencialização de sua ação terapêutica é empregá-los em dispositivos de liberação controlada de drogas, por meio de veículos, como microesferas poliméricas, que agem como carreadores de fármacos, modificando seu perfil de distribuição no organismo. O paclitaxel (Taxol[®]) é um quimioterápico utilizado principalmente no tratamento do câncer de ovário, mama, pulmão e bexiga. Devido à sua relevante ação antimitótica e antiproliferativa, existe potencial interesse de seu uso na terapia do câncer, porém o sucesso de sua aplicação clínica é limitado devido sua baixa solubilidade em água e sua ação tóxica. O objetivo desse estudo foi o de obter e caracterizar, físico-quimicamente, microesferas do copolímero biorreabsorvível e biocompatível poli(L-co-D,L ácido láctico) (PLDLA) encapsulando o quimioterápico paclitaxel. A técnica de simples emulsão permitiu a obtenção de microesferas na forma esférica, verificado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM). O tamanho médio das microesferas de PLDLA puro e contendo paclitaxel, foi, respectivamente, de $10,3\mu\text{m}\pm 1,7$ e $12,7\mu\text{m}\pm 1,3$, obtidos pela técnica de espalhamento de luz laser (LLS). Já o ensaio de calorimetria diferencial exploratória (DSC), sugere que o fármaco paclitaxel está disperso de forma homogênea nas microesferas de PLDLA. A eficiência de encapsulação do paclitaxel nas microesferas de PLDLA foi de $98,0\%\pm 0,3$, obtidos pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O estudo de liberação do fármaco *in vitro* realizado no HPLC apresentou liberação inicial em explosão, seguida de uma liberação mais lenta, características de microesferas que apresentam diâmetros variados. As microesferas de PLDLA liberaram $90\%\pm 4,0$ do fármaco paclitaxel até o 30º dia de estudo enquanto se degradavam. Assim, as microesferas de PLDLA obtidas são dispositivos promissores como carreadores do paclitaxel, com potencial para futura aplicação em sistemas de liberação de fármacos.

Palavras-chave: PLDLA, Microesferas, Paclitaxel, Quimioterápico.

ABSTRACT

MARTINS, Kelly Fernanda, *Obtaining and characterization of the copolymer PLDLA microspheres containing paclitaxel*, Sorocaba, Universidade Federal de São Carlos, 2013. Dissertação (Mestrado).

In order to minimize the side effects of chemotherapy concurrently with the enhancement of its therapeutic action is to use it on devices that enable a controlled drug release, by vectors, such as polymeric microspheres, which act as a drug carrier, modifying its distribution pattern in the organism. Paclitaxel ((Taxol®) is a drug used primarily in the treatment of ovarian, breast, lung and bladder cancer. Due to its antimitotic and antiproliferative action, there is a potential interest in cancer therapy. However, the success of this clinical application is limited to low solubility in water and toxic action. The objective of this study was to obtain and characterize physico-chemically the bioresorbable and biocompatible copolymer poly (L-co-D, L lactic acid) (PLDLA) microspheres encapsulating the paclitaxel chemotherapy. The simple emulsion technique allowed to obtain spherical microspheres, verified by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). The average size of the microspheres PLDLA pure and containing paclitaxel were, respectively, $10.3 \mu\text{m} \pm 1.7$ and $12.7 \mu\text{m} \pm 1.3$, obtained by the technique of laser light scattering (LLS). Moreover the essay of differential scanning calorimetry (DSC) suggests that the drug paclitaxel is homogeneously dispersed in the microspheres PLDLA. The encapsulation efficiency of the microspheres PLDLA paclitaxel was $98.0\% \pm 0.3$, obtained by high performance liquid chromatography (HPLC). The in vitro release study performed on HPLC showed initial burst release followed by a slower release, which characterizes large diameter distribution systems. PLDLA microspheres released $90\% \pm 4.0$ of the drug paclitaxel up to 30th day of study while the degradation process occurred. Thus, the microspheres obtained PLDLA devices are promising as carriers of paclitaxel, with potential for future applications in drug delivery systems.

Keywords : Microspheres, PLDLA, Paclitaxel, Chemotherapeutic.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
SUMÁRIO	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA TABELAS	XII
SÍMBOLOS E SIGLAS	XIII
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 – OBJETIVOS	3
1.1.1 – GERAL	3
1.1.2 – ESPECÍFICOS	3
CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS	4
2.1 – SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DROGAS	4
2.2 – POLI (L-CO-,D,L ÁCIDO LÁCTICO)- PLDLA	8
2.3 – PARTÍCULAS POLIMÉRICAS	10
2.3.1 – OUTRAS APLICAÇÕES DE MICROESFERAS POLIMÉRICAS	13
2.4 – MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	14
2.4.1 – MÉTODO DE EVAPORAÇÃO OU EXTRAÇÃO DO SOLVENTE.....	14
2.4.2 – PROCESSO COM SIMPLES EMULSÃO	14
2.4.3 – PROCESSO COM DUPLA EMULSÃO	16
2.4.4 – COACERVAÇÃO (SEPARAÇÃO DE FASES)	17
2.4.5 – SPRAY DRYING.....	18
2.4.6 – POLIMERIZAÇÃO COM EMULSÃO	18
2.5 – PRINCIPAIS TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS POLIMÉRICAS.....	19
2.5.1 – AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E TAMANHO MÉDIO DA PARTÍCULA	19
2.5.2 – PROPRIEDADES TÉRMICAS	19
2.5.3 – QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO PRESENTE EM MICROESFERAS POLIMÉRICAS	19
2.6 – APLICAÇÕES DE MICROESFERAS POLIMÉRICAS CARREGADAS COM QUIMIOTERÁPICOS.....	20

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 – OBTENÇÃO DAS MICROESFERAS	23
3.2 – MICROESFERAS SEM O QUIMIOTERÁPICO.....	23
3.3 – MICROESFERAS COM O QUIMIOTERÁPICO	23
3.4 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS.....	24
3.4.1 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	24
3.4.2 – MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM).....	24
3.4.3 – ESPALHAMENTO DE LUZ –(LLS).....	24
3.4.4 – CALORÍMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	25
3.4.5 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	25
3.4.5.1 – MEDIDAS DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (E.E) DO PACLITAXEL NAS MICROESFERAS DE PLDLA	25
3.4.5.2 – ENSAIO DE LIBERAÇÃO IN VITRO DO PACLITAXEL	26
CAPÍTULO 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 – MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS.....	28
4.2 – ESPALHAMENTO DE LUZ	31
4.3 – CALORÍMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL.....	32
4.4 – EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO FÁRMACO PACLITAXEL	34
4.5 – ESTUDO DA LIBERAÇÃO IN VITRO DO FÁRMACO PACLITAXEL.....	35
CAPÍTULO 5- CONCLUSÕES	42
PERSPECTIVAS	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Principais carreadores de ativos utilizados na liberação controlada de fármacos.....	6
Figura 2.2: Perfis de liberação da droga em função do tempo: convencional x controlada.....	7
Figura 2.3: Degradação bioquímica do PLDLA.....	9
Figura 2.4: Estrutura química do PLDLA.....	10
Figura 2.5: Partículas poliméricas utilizadas no carreamento de ativos.....	10
Figura 2.6: Esquema do processo de obtenção das microesferas poliméricas, pelo método de simples emulsão, seguida da evaporação do solvente.....	15
Figura 2.7: Esquema da interação química entre as moléculas durante o processo de simples emulsão.....	16
Figura 2.8: Esquema do processo de obtenção das microesferas poliméricas, pelo método de dupla emulsão, seguida da evaporação do solvente.....	17
Figura 2.9: Estrutura química do paclitaxel.....	21
Figura 2.9.1: Mecanismo de ação do paclitaxel.....	22
Figura 3.1: Representação da metodologia utilizada na obtenção de microesferas de PLDLA sem e com o fármaco paclitaxel.....	24
Figura 3.2: Equação para cálculo da eficiência de encapsulação do fármaco.....	26
Figura 3.3: Representação do ensaio de degradação <i>in vitro</i> das microesferas de PLDLA contendo paclitaxel.....	27
Figura 4.1: Microscopia eletrônica de varredura das microesferas: A e B) microesferas de PLDLA sem o paclitaxel; C e D) microesferas de PLDLA com o paclitaxel.....	29
Figura 4.2: Imagens de AFM de microesferas de PLDLA sem o paclitaxel em condições ambiente (90µm x 90µm) em (A) 2D e em (B) 3D.....	30
Figura 4.3: Imagens de AFM de microesferas de PLDLA com o paclitaxel em condições ambiente (90µm x 90µm) em (A) 2D e em (B) 3D.....	30
Figura 4.4: Termogramas de DSC: A) paclitaxel puro, B) mistura física de PLDLA + paclitaxel, C) microesferas de PLDLA com paclitaxel, D) microesferas de PLDLA vazias e E) polímero PLDLA.....	33
Figura 4.5: Quantidade de paclitaxel liberado <i>in vitro</i> pelo tempo de liberação estudado	36
Figura 4.6: Cromatograma do sobrenadante após 1 dia de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.....	39

Figura 4.7: Cromatograma do sobrenadante após 2 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.....	39
Figura 4.8: Cromatograma do sobrenadante após 3 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.....	39
Figura 4.9: Cromatograma do sobrenadante após 5 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.....	40
Figura 4.10: Cromatograma do sobrenadante após 10 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.....	40
Figura 4.11: Cromatograma do sobrenadante após 15 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.....	40
Figura 4.12: Cromatograma do sobrenadante após 20 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.....	41
Figura 4.13: Cromatograma do sobrenadante após 25 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.....	41
Figura 4.14: Cromatograma do sobrenadante após 30 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Diferentes carreadores de ativos e suas principais aplicações	7
Tabela 2.2: Polímeros utilizados em sistemas de liberação de medicamentos.....	9
Tabela 4.1: Valores do diâmetro médio e desvio padrão das microesferas de PLDLA sem e com paclitaxel	31
Tabela 4.2: Concentração do paclitaxel no sobrenadante em diferentes tempos, obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência	34

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS**SÍMBOLOS**

μ - micro (10^{-6})

n- nano (10^{-9})

SIGLAS

Tg- Temperatura de transição vítrea ($^{\circ}\text{C}$)

Mw- Massa molar ponderal média

O/W - Processo por Simples Emulsão óleo/água

W/O/W- Processo por Dupla Emulsão água/óleo/água

PGA - Poli(ácido glicólico)

PLA - Poli(ácido láctico)

PLGA Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

PCL - Poli(-caprolactona)

PLLA Poli(L-ácido láctico)

PLDLA- Poli(L-co-D,L ácido láctico)

PTX- Paclitaxel

PEG- Poli(etileno glicol)

FDA- Food and Drug Administration

OMS- Organização Mundial da Saúde

PVAI - Poli(álcool vinílico)

PBS - Solução tampão fosfato salina

LLS – Espalhamento de luz laser

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

AFM- Microscopia de Força Atômica

E.E- Eficiência de Encapsulação

I.P – Índice de Polidispersão

PD- Produtos de degradação

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

O aumento mundial do número de casos de câncer tem provocado uma corrida dos pesquisadores na busca de soluções para cura e/ou controle desta patologia. Apesar da existência de inúmeros produtos farmacêuticos, naturais ou sintéticos, utilizados no tratamento das neoplasias, as particularidades biológicas inerentes a cada tipo de tumor, juntamente com a resistência aos quimioterápicos que as células tumorais podem desenvolver, impulsionam a pesquisa de novos produtos com ação antineoplásica (OSTROWSKI *et al.*, 2009).

O poli (L-co-D, L ácido láctico), PLDLA, é um copolímero que vem sendo estudado pelo grupo de Biomateriais da PUC-SP para diversas aplicações na área médica, devido suas características como biocompatibilidade (gerando resposta inflamatória mínima quando em contato com o organismo), ser hidroliticamente degradado gerando produtos não tóxicos para o organismo, além de ser biorreabsorvível (polímero passível de degradação pela diminuição da cadeia macromolecular, cujos subprodutos são reabsorvidos *in vivo*, isto é, eles são quebrados em moléculas que podem seguir as rotas metabólicas do organismo. Assim sendo, o PLDLA é degradado pela quebra de suas ligações ésteres, gerando, como último subproduto, moléculas de ácido láctico, as quais são incorporadas ao ciclo de Krebs, que após sofrerem a ação metabólica do organismo, são transformados em CO₂ e H₂O (MOTTA & DUEK, 2008).

A obtenção de microesferas poliméricas utilizadas na encapsulação de quimioterápicos representa uma alternativa para associar o fármaco a um sistema que permita manter suas propriedades físico-químicas sem alterar sua estrutura química. Os fármacos, quando encapsulados no interior de matrizes poliméricas, não estão prontamente disponíveis para o sistema biológico como quando em solução. Assim, o fármaco será liberado após o início do processo de degradação do polímero, por isso o polímero utilizado na preparação das microesferas deve ser biocompatível e hidroliticamente degradado quando em contato com o organismo (SCHAFFAZICK & GUTERREZ, 2003).

O uso de microesferas poliméricas no tratamento do câncer vem sendo estudado pelos pesquisadores como um sistema de liberação controlada de fármacos e representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares

podendo contribuir muito para o avanço da saúde humana. Os sistemas de liberação, freqüentemente descritos como “drug delivery systems”, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional, destacando-se, maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz polimérica; diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação; administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses); direcionamento a alvos no organismo (células, tecido). Dessa forma a obtenção e a caracterização de dispositivos microparticulados representa uma alternativa no tratamento de inúmeras patologias, principalmente no encapsulamento de quimioterápicos. (JABR-MILANE *et al*, 2008).

Dentre os quimioterápicos utilizados destaca-se o paclitaxel, o qual foi aprovado pelo FDA em 1992 para uso no tratamento do câncer de ovários, mama, pulmão e bexiga . O paclitaxel é pouco solúvel em água, por isso é solubilizado em Cremophor para ser utilizado atualmente no tratamento de quimioterapia, aumentando os efeitos colaterais, destacando supressão da medula óssea, náuseas e vômitos, hipersensibilidade, infecções, perda de cabelo, diarreia, mucosite e reações de hipersensibilidade em alguns casos (SINGLA *et al.*, 2002) .

Uma estratégia para reduzir os efeitos colaterais do paclitaxel pode ser a encapsulação dessa droga antitumoral em microesferas poliméricas visando aumentar a biodisponibilidade desse fármaco, proporcionando um dispositivo que permita uma administração clínica com menos efeitos colaterais (LINKOV *et al*, 2008; BRIGER *et al*,2002).

Diante do exposto o presente trabalho teve como objetivo a obtenção e a caracterização de microesferas do copolímero PLDLA, contendo paclitaxel com potencial para futuras aplicações em sistemas de liberação de fármacos.

1.1 OBJETIVOS:

1.1.1 Geral

Obter e caracterizar microesferas poliméricas do copolímero PLDLA contendo paclitaxel, com potencial para futura aplicação na liberação de medicamentos.

1.1.2 Específicos

Obter microesferas do copolímero biodegradável PLDLA, pelo método de simples emulsão seguida da evaporação do solvente.

Encapsular o fármaco lipofílico paclitaxel nas microesferas de PLDLA, pelo método de simples emulsão seguida da evaporação do solvente.

Caracterizar as microesferas quanto ao diâmetro, morfologia, propriedades térmicas, eficiência de encapsulamento, e cinética de liberação *in vitro* do paclitaxel.

Capítulo 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Sistema de liberação Controlada de Drogas.

O uso de sistemas de liberação controlada de fármacos representa uma das áreas multidisciplinar da ciência, que tem crescido rapidamente nos últimos anos, pois promove redução da toxicidade, melhor eficácia do tratamento quando comparado ao sistema convencional de administração de medicamentos (KUMAR, 2000; LASSALE & FERREIRA, 2007).

A liberação controlada de fármacos tem despertado grande interesse de pesquisadores, pois oferece inúmeras vantagens em relação ao sistema convencional de dosagem de medicamentos. Entre elas pode-se citar a redução da toxicidade, onde o fármaco é mantido a um nível terapeuticamente desejável no plasma, uma maior conveniência para os pacientes, uma vez que os efeitos colaterais gerados pelo sistema convencional de administração do medicamento podem ser minimizados pelas pequenas quantidades do princípio ativo que o sistema de liberação controlada aplica. Do ponto de vista econômico sistemas de liberação controlada de medicamentos são potencialmente mais baratos pois geram uma maior eficiência de aplicação do fármaco, (KUMAR, 2000).

Quando um fármaco é administrado no organismo, apenas uma pequena fração da dose atinge o tecido alvo, sendo que a maior parte é desperdiçada, devido à sua distribuição por outros tecidos e à sua metabolização ou excreção antes de atingir o local de ação. (KUMAR, 2000; MUNDARG *et al*, 2008).

A liberação controlada implica a associação, química ou física, dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados *in vivo*, tenham a capacidade de controlar a liberação do fármaco e/ou conduzir o fármaco até ao sítio específico em que este deve atuar. Neste contexto, o termo “fármaco” engloba todos compostos bioativos administrados com intuito terapêutico, desde moléculas de baixo peso molecular a proteínas e a material genético (AZEVEDO, 2002, RAWAT, 2006).

Uma forma de modificar e melhorar a biodistribuição de fármacos é associá-los a carreadores, como vesículas lipídicas, lipossomos, micro/nanopartículas poliméricas (figura 2.1 , tabela 2.1). Ao associar um fármaco em um carreador as suas propriedades cinéticas podem ser modificadas para melhorar sua resposta farmacológica. Desse modo, a

associação de fármacos a esses carreadores apresenta diversas vantagens em relação em relação ao tratamento convencional : (AZEVEDO, 2002 ; RAWAT, 2006)

- a) Diminuição da toxicidade;
- b) Maior eficácia terapêutica devido à liberação progressiva e controlada do fármaco;
- c) Alvo–especificidade, isto é os carreadores podem ser direcionados ao local de ação da droga;
- d) Maior tempo de permanência do fármaco na circulação;
- e) Administração conveniente e segura;
- f) Redução das dosagens de fármaco empregada;
- g) Redução do custo da terapia.

Os sistemas de carreadores utilizados no processo de liberação controlada de fármacos, podem ser aplicados, principalmente em formulações, onde principio ativo requer mais do que uma aplicação ao dia no paciente para atingir a eficácia do tratamento. Deste modo, a droga é liberada de maneira lenta e gradual, permanecendo por um maior período de tempo no organismo , diferentemente do que aconteceria com as formulações convencionais. (RAWAT, 2006)

Além disso, para a maioria dos fármacos utilizados atualmente, a atividade contra certas doenças, não é baseada na sua capacidade de acumular-se seletivamente no órgão patológico, tecido ou célula. Usualmente, o agente farmacológico é uniformemente distribuído pelo organismo. Assim, para alcançar o sítio de ação, o fármaco precisa atravessar muitas barreiras biológicas, tais como outros órgãos, células e compartimentos intracelulares, onde o fármaco pode ser inativado ou induzir efeitos indesejados nos órgãos e tecidos que não envolvem processos patológicos. (BAJPAI *et al*, 2008).

Portanto para alcançar a concentração terapêutica requerida do fármaco em certo compartimento do organismo, deve-se administrá-lo em grandes quantidades, dessa forma a concentração do ativo na corrente sanguínea apresenta uma aumento, atinge um pico máximo e então declina. Desde que cada composto sempre possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Isto será problemático se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica e também pelo fato de haver acúmulo de fármaco e ou metabólitos também tóxicos. (DASH & CUTWORTH, 1998; BAJPAI *et al*, 2008).

Desse modo, o objetivo de uma liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis (ou seja, na faixa terapêutica), por um tempo prolongado,

utilizando-se de uma única dosagem. A diferença da variação de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas convencionais e liberação controlada, pode ser visualizado na figura 2.2.



Figura 2.1: Principais carreadores de ativos utilizados na liberação controlada de fármacos , modificado de RAWAT *et al*, 2006.

Os materiais de natureza lipídica, inorgânica e polimérica têm sido utilizados como suportes no sistema de liberação controlada de fármacos. Destes, os materiais poliméricos estão sendo bastante investigados pelos pesquisadores na obtenção de dispositivos para serem utilizados como carreadores de fármacos. (PARK *et al*, 2005).

Tabela 2.1 Diferentes carreadores de ativos e suas principais aplicações, modificado de RAWAT *et al*, 2006.

SISTEMA CARREADOR	ATIVO	APLICAÇÕES
Nanotubo de carbono	Cisplatina Oligonucleotídeo	Terapia gênica
Lipossomos	Oligonucleotídeo Anfotericina B	Antitumoral Antifungico
Partículas lipídicas sólidas	DNA Tretinoína	Terapia gênica
Nano/Micropartículas poliméricas	Doxorrubicina β caroteno Diclofenaco	Antitumoral Antioxidante Anestésicos
Micelas	Indometacina Doxorrubicina	Antitumoral Regeneração Tecidual
Dendrímeros	Ceramida Doxorrubicina	Antitumoral

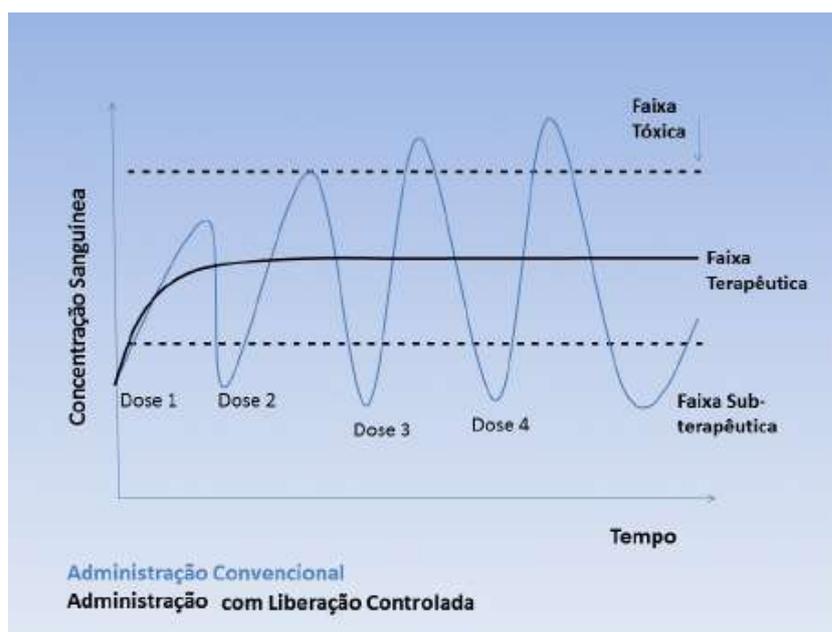


Figura 2.2: Perfis de liberação de droga em função do tempo : convencional x controlada, adaptado de DASH & CUTWORTH , 1998 .

2.2 Poli (L-co-D,L ácido láctico) - PLDA

Biomateriais são todos os materiais de origem natural ou sintética que interagem em contato com tecidos vivos a fim de direcionar, complementar ou substituir as funções destes, minimizando os efeitos indesejáveis ou rejeição (BET *et al.*, 2003).

A síntese de novos polímeros tem proporcionado um grande avanço na tecnologia farmacêutica, no desenvolvimento de dispositivos para serem utilizados como carreadores em sistemas de liberação de fármacos. Na obtenção destes sistemas, polímeros naturais biodegradáveis podem ser utilizados (tabela 2.2).

Além dos polímeros de origem natural, polímeros sintéticos biodegradáveis (tabela 2.2) também são utilizados tendo seu uso aumentado nas duas últimas décadas. Dentre os polímeros sintéticos biorreabsorvíveis e biodegradáveis encontram-se os poli(α -hidroxi ácidos), representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, os quais fazem parte o poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(-caprolactona) (PCL), seus copolímeros e outros. (BARBANTI *et al.*, 2005). Estes são considerados uma das famílias de polímeros mais promissoras na área médica (ELKE, 2003), sendo utilizados em um amplo número de aplicações no corpo humano, tais como, suturas cirúrgicas, sistemas para liberação controlada de drogas, peles artificiais, na regeneração das lesões nervosas periféricas, veias e artérias artificiais e dispositivos ortopédicos (ELKE, 2003, MOTTA & DUEK, 2008).

Entre os polímeros mais utilizados como carreadores de medicamentos se encontram os poli os poli(α -hidroxi-ácidos) e seus copolímeros, sendo possível a obtenção de materiais com diferentes propriedades mecânicas, e diferentes taxas de degradação, de acordo com as diferentes proporções de monômeros usadas nas sínteses destes copolímeros. O processo de biorreabsorção desses polímeros ocorre através da hidrólise de suas ligações ésteres em contato com fluidos corpóreos, originando produtos na forma de oligômeros solúveis e não tóxicos, que após sofrerem a ação metabólica do organismo são transformados em CO₂ e H₂O (figura 2.3).

O poli (ácido láctico) existe em duas formas químicas específicas : poli(L-ácido láctico) e poli(D,L ácido láctico), passíveis de serem combinadas para formar um copolímero com propriedades diferentes daquelas exibidas por cada um desses polímeros isolados. Trata-se portanto do copolímero Poli(L-co-D,L ácido láctico)- PLDLA (figura 2.4), nas proporções 70:30 sintetizado pelo grupo do laboratório de Biomateriais da PUC-

SP, um copolímero amorfo que reúne em si características importantes para os sistemas empregados na liberação controlada de drogas.

Tabela 2.2 Polímeros utilizados em sistemas de liberação de medicamentos (modificado de SWATI *et al*, 2012).

Origem Natural	Polímeros
Baseado em proteínas	Colágeno, albumina, gelatina
Polissacarídeos	Agarose, alginato, ácido hialurônico, dextrana, quitosana, ciclodextrina
Origem Sintética	
Poliésteres	Poli-ácido láctico (PLA), poli-ácido glicólico (PGA), copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA), poli-caprolactona, poli-dioxanona
Polianidridos	Poli-ácido sebáico, poli-ácido adípico, poli-ácido teraftálico
Poliamidas	Poli-amino carbonato, poli-ácido amino
Baseado em fósforos	Poli-fosfatos, poli-fosfonatos

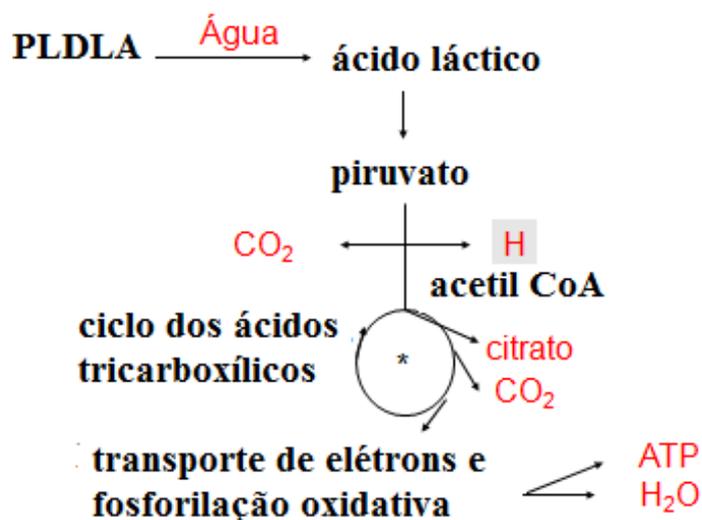


Figura 2.3: Degradação Bioquímica do PLDLA, adaptado de BARBANTI *et al*, 2005.

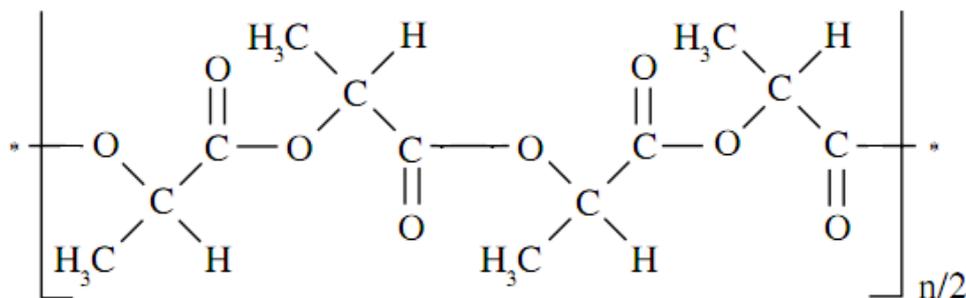


Figura 2.4: Estrutura química do PLDLA, adaptado de MOTTA & DUEK, 2007.

2.3 Partículas Poliméricas

A utilização de partículas enquanto veículos para a liberação controlada de fármacos, especialmente nano e micropartículas poliméricas, é e tem sido alvo de muita investigação (PARK *et al*, 2005).

O termo nano/micropartículas para aplicações farmacêuticas, está relacionado ao tamanho da partícula que está se referindo. Partículas com tamanho menor que 1 μ m são consideradas nanopartículas (SOPPIMATH *et al*, 2001), enquanto que as partículas maiores são denominadas micropartículas. O termo nano/micropartícula inclui as nano/microcápsulas e as nano/microesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nano/microcápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nano/microesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco fica retido (JANG *et al*, 2007; SOPPIMATH *et al*, 2001). A figura 2.5 ilustra partículas (nano/microcápsulas) e (nano/microesferas) poliméricas utilizadas no carregamento de ativos.

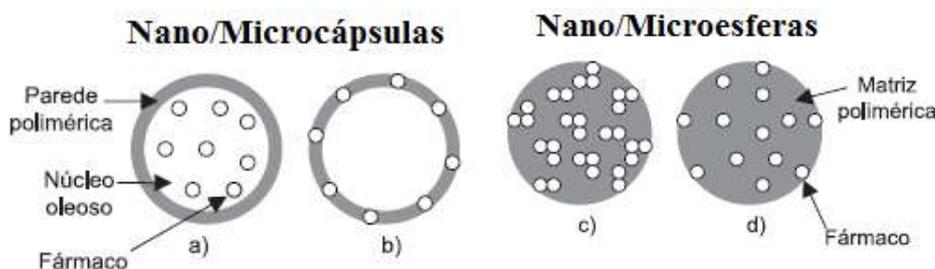


Figura 2.5: Partículas poliméricas utilizadas no carregamento de ativos, SCHAFFAZICK & GUTERREZ, 2003

A utilização de nano/ micropartículas poliméricas em estudos envolvendo a entrega de drogas tem crescido muito nos últimos anos. Esses materiais são altamente versáteis, pois suas propriedades físico-químicas podem ser controladas de acordo com sua a composição e com os seus grupos funcionais terminais. A produção de nano/micropartículas de polímeros biorreabsorvíveis, dentre eles o poli (ácido lático), PLA, poli (ácido-lático-co-ácido glicólico) PLGA e o poli (-caprolactona) PCL, tem despertado o interesse dos pesquisadores no estudo do mecanismo da liberação controlada de fármacos, pois estas são biocompatíveis, mecanicamente resistentes, fáceis de fabricar, oferecem flexibilidade na dosagem do fármaco encapsulado, são degradadas por reações simples de hidrólise, produzem produtos não tóxicos e apresentam uma alternativa na redução da toxicidade de inúmeras terapias (SCHAFFAZICK & GUTERREZ, 2003).

As nano/micropartículas poliméricas podem agir como um veículo de droga capaz de atingir tecidos tumorais ou células, enquanto protege a inativação prematura da droga durante o seu transporte. A encapsulação permite uma melhora da estabilidade da droga, em decorrência da sua proteção (condições de estocagem) e redução dos efeitos tóxicos ou adversos. O principal interesse desses vetores coloidais baseia-se na melhora do efeito terapêutico pelo direcionamento das moléculas ativas em seus sítios de ação (LEE & YUK, 2007).

As nano/ micropartículas apresentam um enorme potencial na área da liberação controlada de fármacos (FARAJI, 2009). Estas possuem uma elevada área superficial e podem sofrer modificações em sua superfície. Estas propriedades têm sido exploradas no desenvolvimento de vários sistemas de liberação controlada localizados, desenhados para liberarem o fármaco num tipo específico de tecido/células, como por exemplo nas células de tumores. Ainda devido ao seu tamanho, algumas nanopartículas possuem a capacidade de penetrar a barreira hematoencefálica e atingir o sistema nervoso central (cérebro), uma das zonas de mais difícil acesso do organismo. Desta forma estas são vistas com grande interesse como carreadores de fármacos que atuam diretamente sobre o sistema nervoso central (FARAJI, 2009; HALEY, 2008; KUMARI, 2010).

As nano/micropartículas podem ser injetadas por via intravenosa, permitindo-lhes uma rápida distribuição e acesso aos tecidos alvo. Estudos com microesferas poliméricas demonstram que estas podem sofrer modificações em sua superfície, sendo normalmente revestidas/modificadas por um polímero hidrofílico, geralmente o polietileno glicol (PEG). A este agente de revestimento podem ainda ser acoplados ligantes com a capacidade de interagir especificamente com as membranas de determinadas células,

através de um processo de reconhecimento molecular. A utilização desta estratégia permite direcionar, de uma forma ativa, as nano/micropartículas até aos tecidos/células alvo. (MUNDARGI, 2008; KUMARI, 2010).

Inúmeros estudos, na área de biotecnologia de medicamentos utilizam carreadores poliméricos sendo um dos alvos de pesquisas para encapsular inúmeras substâncias com aplicações biomédica os sistemas de liberação de fármacos à base de nano/micropartículas (FARAJI, 2009; KUMARI 2010).

As nano/micropartículas são também investigadas na administração de fármacos de natureza proteica por via oral . A natureza pouco invasiva desta via de administração faz com que esta seja a via preferível para a introdução de fármacos no organismo (MUNDARGI, 2008).

Estudos demonstram que o encapsulamento de fármacos de natureza proteica em nano/micropartícula poliméricas resultam num aumento da biodisponibilidade destes quando administrados por via oral. Este efeito deve-se sobretudo à capacidade que as nano/micropartículas têm de proteger o fármaco do meio físico-químico e enzimático do trato gastrointestinal e de, simultaneamente, aumentarem a absorção deste, pela promoção do transporte através do tecido mucoso intestinal (MUNDARGI, 2008; HALEY, 2008, KUMARI, 2010).

Outra área onde as nano/micropartículas poliméricas têm despertado grande interesse é na área da liberação ocular. A entrega de fármacos a nível ocular pelas formulações tradicionais disponíveis comercialmente resulta normalmente numa biodisponibilidade do fármaco bastante baixa, isto devido à rápida eliminação deste do local de ação pelos mecanismos de limpeza/proteção do olho. Um exemplo típico são as formulações líquidas, na forma de soluções ou suspensões, administradas topicamente no olho. Nano/micropartículas de polímeros carregadas de fármacos, administradas topicamente na forma de soluções coloidais, já demonstraram serem capazes de aumentar significativamente a biodisponibilidade dos fármacos, ao prolongarem o tempo de residência destes na área pré-corneal. (MUNDARGI, 2008; KUMARI, 2010, HALEY 2008)

Os sistemas poliméricos nano/microparticulados têm sido empregados com sucesso no processo de encapsulando de uma grande variedade de fármacos, incluindo enzimas, hormônios, peptídeos, antibióticos, anticancerígenos, antifúngicos, antiinflamatórios, analgésicos, quimioterápicos (YANG *et al.*, 2001; ROULLN *et al.*, 2002; JANG FU *et al.*, 2002; BARRIO *et al.*, 2003).

Os estudos de HAGAN *et al.* (1998) avaliaram a habilidade das micropartículas de PLGA, no encapsulamento de antígenos. O uso destes sistemas, por via oral encapsulando antígenos, fez com que as micropartículas biodegradáveis protegessem o antígeno administrado oralmente contra degradação enzimática.

O desenvolvimento de microencapsulação de vacinas provê de uma alternativa viável para obtenção de melhor resposta imune, aumentando a eficácia da vacina, e diminuindo a multi dose e os horários de injeção (YOUAN *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2002).

BARRIO *et al.* (2003) preparam micropartículas encapsulando DNA, os pesquisadores observaram que DNA pode ser eficientemente encapsulado, podendo ser utilizado em tratamentos de terapia gênica.

As microesferas de PLGA são utilizadas no tratamento e monitoramento de pacientes com câncer. Estes sistemas apresentam uma aplicação promissora na quimioterapia efetiva de câncer, através da quimioembolização. As microesferas com a superfície modificada são utilizadas como vetores, direcionando o fármaco ao local específico, o tumor (WANG *et al.*, 1997).

Nos estudos de ERTL *et al.* (1999) foram obtidas microesferas de PLGA encapsulando um agente anticancerígeno com baixa solubilidade em água, obtido da árvore oriental *Camptotheca acuminata*, o camptotecim. Eles verificaram a estabilidade do fármaco e o perfil cinético de liberação controlada a partir das microesferas de PLGA, indicando que essas propriedades podem reduzir a toxicidade local com eficácia prolongada, oferecendo novas perspectivas na quimioterapia. HUSSAIN *et al.* (2002) obtiveram com êxito as microesferas de PLGA encapsulando em combinação e separadamente, um oligonucleotídeo e o 5-fluoracil, para potencializar a terapia contra o câncer.

2.3.1 Outras aplicações de micropartículas poliméricas.

A microencapsulação tem inúmeras outras aplicações industriais, entre elas, no setor agropecuário, na produção de pesticidas sintetizados quimicamente ou de natureza biológica; na indústria de alimentos com a microencapsulação de óleos essenciais para prevenir a oxidação e controlar a liberação do aroma. Outro campo para o qual a microencapsulação vem trazendo grandes benefícios é o nutricional, em especial no caso do combate à deficiência mineral. O interesse industrial pela tecnologia de microencapsulação vem se desenvolvendo e deve crescer rapidamente nos próximos anos,

porque ela pode levar a produtos diferenciados (LAMPRECHT *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2000).

2.4 Métodos de obtenção de micropartículas poliméricas

As técnicas mais usadas para fabricação de microesferas poliméricas são: evaporação ou extração do solvente, separação de fases (coacervação) e “Spray-drying” (JAIN, 2000)

2.4.1 Método de evaporação ou extração do solvente.

A evaporação do solvente é uma das técnicas normalmente utilizadas na indústria farmacêutica para imobilizar compostos terapêuticos em microesferas poliméricas, biodegradáveis e/ou biocompatíveis. Na literatura científica esta técnica tem sido extensivamente utilizada e investigada, principalmente na preparação de microesferas de poli(ácido láctico), PLA, e do seu copolímero poli(ácido láctico-*co*-ácido glicólico), PLGA. (ANDERSON *et al.*, 1997; CHUNG *et al.*, 2001; LASSALE *et al.*, 2007;).

Existem diversas formas de imobilizar um agente bioativo em microesferas poliméricas utilizando a técnica da extração/evaporação do solvente. A escolha do método específico é normalmente feita considerando as características de solubilidade do composto bioativo, sendo geralmente o critério subjacente a esta escolha a maximização da eficiência de imobilização do ativo no interior das microesferas poliméricas. (PERES *et al.*, 2000; PICOS *et al.*, 2001; THOTE *et al.*, 2005) .

A técnica de evaporação de solvente pode ser subdivida em simples emulsão e dupla emulsão. As emulsões simples óleo/água (O/W) são usadas para encapsular fármacos hidrofóbicos, já a técnica de dupla emulsão água/óleo/água (W/O/W) são utilizadas no processo de encapsulação de fármacos hidrofílicos. (THOTE *et al.* 2005; VIPPAGUNTA *et al.*, 2006; WISCHKE *et al.*, 2008).

2.4.2 Processo com simples emulsão (O/W) :

Para compostos hidrofóbicos e com uma baixa solubilidade em soluções aquosas, o método geralmente adotado é o processo de simples emulsão óleo/água (O/W). (LASSALE *et al.*, 2007; PERES *et al.*, 2000; PICOS *et al.*, 2001; THOTE *et al.*, 2005). A execução deste método envolve quatro passos gerais que são esquematizados na figura 2.6 (1) Preparação da fase orgânica: dissolução do polímero e do composto bioativo (fármaco) num solvente orgânico volátil.

- (2) Emulsificação, por meio da adição e agitação, da fase orgânica (fase dispersa) numa solução aquosa contendo um agente estabilizante (fase contínua).
- (3) Formação das partículas: extração do solvente orgânico da fase dispersa para a fase contínua e subsequente evaporação deste, com a conseqüente precipitação do polímero e fármaco na forma de partículas sólidas.
- (4) Isolamento das partículas, por filtração ou centrifugação, e posterior secagem.

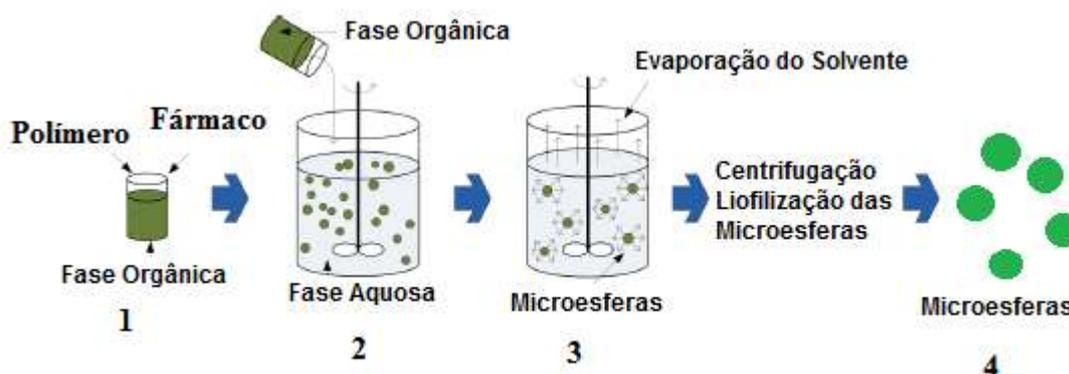


Figura 2.6 Esquema do processo de obtenção de microesferas poliméricas pelo método de simples emulsão, seguida da evaporação do solvente.

A escolha do solvente orgânico é feita com base numa série de critérios: o solvente a ser utilizado deve ser capaz de dissolver o polímero escolhido, possuir uma baixa solubilidade na fase contínua, e uma alta volatilidade. (ANDERSON *et al*, 1997, BERKLAND *et al*, 2003; BIRNBAUM *et al*, 2000, BLITTERSWIJK *et al*, 2000).

Geralmente a emulsão é estabilizada com um surfactante que deve estar presente na fase contínua. Este reduz a tensão superficial da fase contínua, evitando assim a coalescência e a aglomeração das gotas da fase dispersa. Dos surfactantes utilizados na preparação de microesferas pelo processo de simples emulsão, o poli (álcool vinílico) (PVAI) é o mais utilizado devido sua baixa toxicidade. As propriedades finais das microesferas com o composto ativo incorporado são afetadas por uma série de fatores, dentre eles, princípio ativo, polímero, solvente orgânico, surfactante, as condições operacionais do processo (tipo de agitação, velocidade de agitação, temperatura, pressão, etc) e outros parâmetros como a viscosidade da fase dispersa, a concentração de surfactante, a fração mássica entre o composto bioativo e o polímero, e a fração volumétrica entre fase dispersa e fase contínua. (ANDERSON *et al*, 1997, BERKLAND *et*

al, 2003; BIRNBAUM *et al*, 2000, BLITTERSWIJK *et al*, 2000; CHUNG *et al*, 2001; LASSALE *et al* 2007; PERES *et al*, 2000; PICOS *et al*, 2001; THOTE *et al* 2005, VIPPAGUNTA *et al* , 2006; WISCHES *et al*, 2008).

Este conjunto de fatores, bem como os efeitos das interações entre eles, determinam as propriedades das microesferas poliméricas obtidas (tamanho médio, morfologia, quantidade de composto bioativo imobilizado, distribuição e estado do composto bioativo), propriedades essas que, por sua vez, determinarão o perfil de libertação do composto bioativo, em fármacos lipofílicos a eficiência de encapsulamento é alta, como pode ser observado, no esquema representado pelo figura 2.7, a qual representa a interação química entre as moléculas durante o processo de simples emulsão. (BLITTERSWIJK *et al*, 2000; CHUNG *et al*, 2001; LASSALE *et al* 2007).

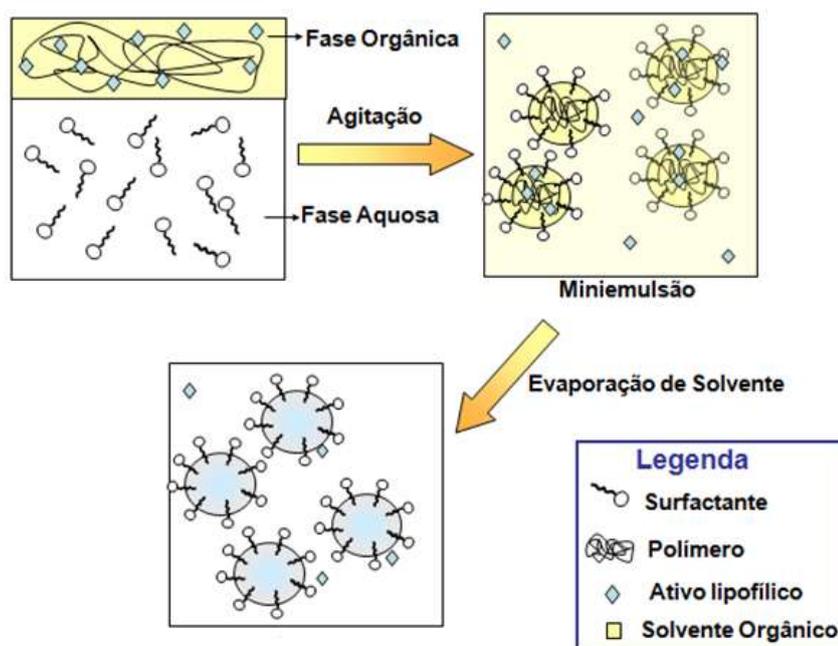


Figura 2.7. Esquema da interação química entre as moléculas , durante o processo de simples emulsão, modificado de KIETZKE, 2003.

2.4.3 Processo com dupla emulsão (W/O/W) :

Este método, representado pela figura 2.8, envolve emulsificação de água/óleo/água (w/o/w), sendo utilizado para encapsular drogas solúveis em água como peptídeos, proteínas e vacinas. Uma solução tamponada ou aquosa da droga (ativo) é adicionada na fase orgânica que consiste do polímero e solvente adequado, com agitação para formar uma emulsão primária (o/w). Esta emulsão é adicionada sob agitação dentro

de um volume maior de água com um tensoativo (surfactante) para formar a emulsão múltipla (w/o/w). A emulsão é homogeneizada a temperatura ambiente para remoção do solvente pelo processo da evaporação. As microesferas sólidas são obtidas e então lavadas e coletadas por filtração ou centrifugação. Estas são então secas pelo processo de liofilização. Parâmetros da formulação (natureza e concentração dos constituintes) e variáveis do processo (aparelhagem, tempo e velocidade de agitação, afetam significativamente o produto final das microesferas e a liberação da droga (JAIN, 2000 CHUNG *et al*, 2001; LASSALE *et al* 2007; PERES *et al*, 2000; PICOS *et al*, 2001; THOTE *et al* 2005, VIPPAGUNTA *et al* , 2006; WISCHES *et al*, 2008).

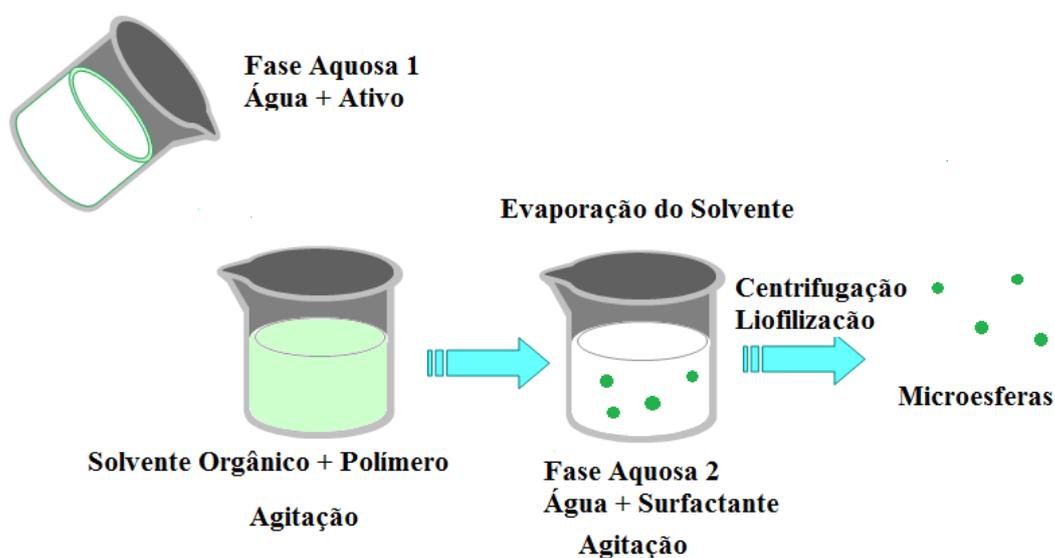


Figura 2.8: Esquema do processo de obtenção de microesferas poliméricas pelo método de dupla emulsão, seguida da evaporação do solvente.

2.4.4 Coacervação (Separação de Fases)

Este processo de coacervação inclui três etapas (i) separação de fase da camada polimérica; (ii) adsorção do coacervado ao redor das partículas da droga; e (iii) solidificação das microesferas. Inicialmente, a substância a ser encapsulada é dispersa num líquido, no qual se tenha dissolvido o material envolvente (o polímero). Através de diferentes meios se produz uma diminuição da solubilidade do polímero dissolvido em forma de colóide no líquido de dispersão, separando-se em forma de gotículas, coacervação propriamente dita. O coacervato formado é solidificado e endurece através de

medidas adequadas, como geleificação, reticulação ou por polimerização do filme líquido. As micropartículas são coletadas por lavagem, filtração ou centrifugação e são finalmente secas. As desvantagens desse processo, que trazem limitações a utilização do método, são: presença de solvente residual nas microesferas, processo caro quando comparado aos demais devido à grande quantidade de solvente utilizada, as microesferas obtidas podem apresentar aglomerados caso não haja um estabilizador [(THOMASIN *et al.*, 1998).

2.4.5 Spray drying

O spray drying é um método muito rápido, conveniente, de fácil escalonamento, envolve condições moderadas e depende menos do parâmetro de solubilidade da droga e do polímero. Em princípio o poliéster biodegradável é dissolvido em um solvente orgânico volátil, a droga em forma sólida é dispersa na solução polimérica por um bico de nebulizador sob um determinado fluxo e pressão. A evaporação instantânea do solvente, forma as gotículas, resultando em microesferas de tamanho típico de 1 a 100µm, dependendo das condições de atomização . As principais desvantagens dessa técnica é a grande perda de material, devido à adesão do mesmo na parede da câmara de evaporação, e a formação de muitos agregados resultantes da viscosidade que as microesferas apresentam antes da remoção total do solvente. (BLANCO-PRIETO *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2005).

2.4.6 Polimerização pelo processo de emulsão.

Nesta técnica o monômero é dissolvido na fase externa de uma emulsão, normalmente uma solução aquosa, na qual está presente um iniciador e um tensoativo numa concentração superior à concentração necessária para a formação de micelas. A polimerização ocorre no interior hidrofóbico das micelas de tensoativo, no qual o monômero e o iniciador se difundem. O fármaco pode estar presente durante a polimerização para ser aprisionado na rede polimérica, pode estar ligado covalentemente ao polímero ou pode ser adicionado após a polimerização para ser adsorvido à superfície do polímero. A polimerização de emulsão em fase externa orgânica não é tão utilizada por que requer elevadas quantidades de solventes orgânicos e tensoativos (BLANCO-PRIETO *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2005).

2.5 Principais técnicas de caracterização de microesferas poliméricas.

2.5.1 Avaliação morfologia e tamanho médio da partícula.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido muito empregada na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das microesferas (KUMAR *et al*, 2000; SCHAFFAZICK & GUTTEREZ, 2003; LASSALE *et al*, 2007. GUERRA *et al* 2011). Outra técnica que tem sido empregada para caracterizar a morfologia de superfície das microesferas é a microscopia de força atômica (AFM), a qual fornece informações com alta resolução em três dimensões, sendo capaz ainda de fornecer alta resolução de superfície (KUMAR *et al*, 2000; SCHAFFAZICK & GUTTEREZ, 2003; LASSALE *et al*, 2007; GUERRA *et al* 2011).

A técnica de espalhamento de luz é usualmente empregada para determinação do diâmetro médio de nano e micropartículas poliméricas. Esse método está baseado na propriedade das partículas em suspensão se difundirem por todas as direções e estarem em movimento permanente (movimento Browniano), espalhando o feixe de luz quando este incide sobre elas, determinando assim, o raio hidrodinâmico das partículas em suspensão (SCHAFFAZICK & GUTTEREZ, 2003; PEREIRA *et al*, 2008).

2.5.2 Propriedades Térmicas

O método termo-analítico de calorimetria exploratória diferencial (DSC), é um método de grande utilidade para análise de polímeros, e tem sido utilizado também para investigar interações entre polímeros e fármacos em diversas formulações de microesferas. Deste modo informações úteis podem ser obtidas a respeito da morfologia do polímero (cristalino, amorfo) e sobre o estado de dispersão sólida ou molecular do fármaco associado a estes sistemas poliméricos. Também é possível investigar reações químicas como polimerização e degradação (YANG *et al*, 2009; GUERRA *et al*, 2011; SCHAFFAZICK & GUTTEREZ, 2003).

2.5.3 Quantificação do fármaco presente em microesferas poliméricas.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) representa uma técnica analítica muito utilizada na separação e quantificação de fármacos presentes em dispositivos poliméricos. Este método analítico, permite separar e quantificar compostos, presentes em amostras biológicas, sendo muito utilizada pela indústria farmacêutica. (KIM *et al*, 2005; LEE *et al*, 2009; LUO *et al*, 2011; MITTAL *et al*, 2011).

2.6 Aplicações de microesferas poliméricas carregadas com quimioterápicos

A obtenção de microesferas poliméricas utilizadas na encapsulação de quimioterápicos representa uma alternativa para associar o fármaco a um sistema que permita manter suas propriedades físico-químicas sem alterar sua estrutura química, por isso dentre as diversas aplicações de microesferas contendo medicamentos, destaca-se os tratamentos quimioterápicos.

O câncer origina-se a partir de uma série de mutações em genes responsáveis pelo crescimento e mitose celular, provocando modificações nos diferentes tecidos dos organismos vivos, que se caracterizam por um crescimento e multiplicação celular descontrolados. Esses genes anormais são chamados de oncogenes. Carcinogênese ou oncogênese são termos que designam o processo de desenvolvimento de uma neoplasia, desde as alterações mais precoces no DNA, que supostamente ocorrem em uma só célula ou em um pequeno grupo delas, até a formação de um tumor que pode destruir o organismo hospedeiro. As neoplasias resultam de proliferações anormais de células que tendem a perder sua diferenciação, e apresentam crescimento autônomo. As células neoplásicas apresentam diferentes graus de comportamento, diferem das células normais em vários aspectos, tais como: crescimento acelerado; alterações morfológicas, metabólicas e antigênicas; e irregularidades citoplasmáticas (GUYTON & HALL, 2006; BRASILEIRO-FILHO, 1998; FRANKS & TEICH, 1997; GOMES & MILANEZ, 1997).

Segundo pesquisas recentes do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2011), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Em 2009, estimou-se que ocorreriam 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, sendo válidas também para o ano de 2011 apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer.

Devido à importância epidemiológica dos processos neoplásicos, inúmeras abordagens terapêuticas vêm sendo propostas. As categorias básicas para o tratamento são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A radioterapia emprega um feixe de radiação ionizante para destruir células tumorais; a resposta do tecido à radiação depende de fatores como a sensibilidade do tumor ao tratamento, sua localização e o tempo de irradiação. A quimioterapia é uma técnica que utiliza substâncias químicas que interferem na síntese de enzimas celulares, afetando a função e a proliferação tanto das células normais quanto das cancerígenas. A cirurgia se baseia na remoção do tecido doente e de seus arredores (BRIGGER *et al.*, 2002). É bem verdade que esses tratamentos são eficazes contra muitos

tipos de tumores e, em muitos casos, proporcionam um considerável aumento no tempo de vida do paciente. Mas, apesar desse relativo sucesso, essas terapias apresentam efeitos colaterais bastante dolorosos. Além disso, a perspectiva de cura nem sempre é eficaz.

Dentre os quimioterápicos destaca-se o paclitaxel (figura 2.9), de estrutura cristalina, descoberto e extraído , em 1962, a partir de extratos de casca da árvore *Taxus brevifolia*, passou a ser estudado em testes in vitro anticancerígeno pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos. O paclitaxel é o fármaco precursor de uma nova classe de agentes estabilizantes de microtúbulos, os taxanos. Os microtúbulos são essenciais para a manutenção da forma celular, sendo um dos componentes do fuso mitótico e do transporte de organelas dentro das células. A sua estabilização provoca um bloqueio do ciclo celular, o que por sua vez impede a divisão celular e a conseqüente proliferação das células neoplásicas. O paclitaxel liga-se reversivelmente aos microtúbulos e assim as células tratadas com paclitaxel não conseguem dividir-se e ficam bloqueadas na fase G2 tardia ou M do ciclo celular (figura 2.9.1) . Assim ocorrem mudanças na forma, no transporte intracelular e nas funções secretoras das células neoplásicas.

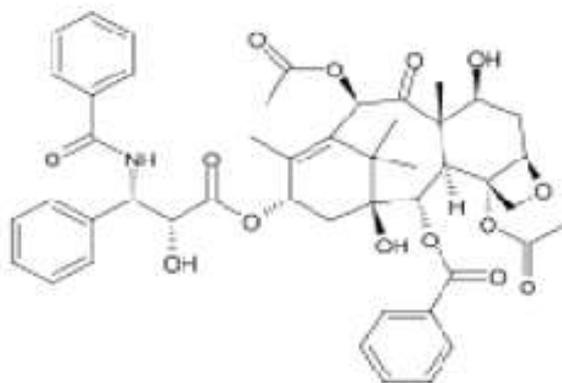


Figura 2.9 : Estrutura química do paclitaxel, SINGLA et al, 2002.

O paclitaxel (Taxol®) foi aprovado pelo FDA em 1992 para uso no tratamento do câncer de ovários, mama, fígado e, como tratamento de segunda linha do sarcoma de Kaposi. O paclitaxel é também utilizado para tratar câncer de cabeça e pescoço, câncer de pulmão e câncer de bexiga. Os efeitos colaterais incluem supressão da medula óssea, náuseas e vômitos, hipersensibilidade, infecções, perda de cabelo, diarreia, mucosite e reações de hipersensibilidade em alguns casos (SINGLA et al., 2002) .

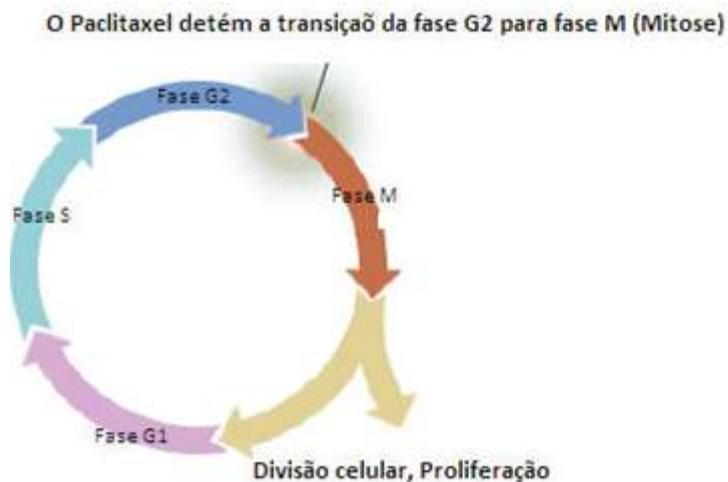


Figura 2.9.1 – Mecanismo de ação do paclitaxel, adaptado de ALMEIDA *et al*, 2005.

O sucesso na cura do câncer está associado a um diagnóstico precoce da doença, assim como uma terapia eficiente. Nos últimos anos, novas formas de diagnósticos e terapias de combate ao câncer têm sido desenvolvidas, aumentando as chances de diagnósticos em estágios iniciais da doença, potencializando as chances de cura. Nesse sentido, o uso de carreadores micro e nanoestruturados tem proporcionado uma verdadeira revolução na medicina, através do utilização desses carreadores no processo de encapsular quimioterápicos , (FARAJI & WIPF, 2009).

A eficácia da quimioterapia na cura do câncer está principalmente limitada pela toxicidade associada com as drogas anticancerígenas nos tecidos normais (AHMED *et al.*, 2010; DREIS *et al.*, 2007). Uma estratégia pode ser a associação de drogas antitumorais em microesferas poliméricas visando aumentar a seletividade dessas drogas em células cancerosas enquanto reduz a sua toxicidade em tecidos normais (JONG-HO KIM *et al*, 2008; LINKOV *et al*, 2008).

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das Microesferas

As microesferas de PLDLA com e sem o quimioterápico foram produzidas pelo método de simples emulsão seguida da evaporação do solvente, onde a técnica escolhida foi em função da solubilidade do fármaco utilizado. A obtenção das microesferas foi realizada no Laboratório de Biomateriais da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Campus Sorocaba .

3.2 Microesferas sem o quimioterápico

Adaptando-se o processo de (GUERRA *et al* , 2011), inicialmente 140mg de PLDLA 70/30 (Mw = 90.000 g/mol) sintetizado no Laboratório de Biomateriais- PUC-SP (MOTTA & DUEK, 2007) foram pesadas e dissolvidas em 2mL de clorofórmio (MERCK). Após a dissolução do polímero e sob agitação constante em agitador magnético, a solução polimérica foi vertida em um béquer contendo 100 mL de solução aquosa de 1% de álcool polivinílico (PVAI) sob agitação constante de 17.000 rpm durante 2 minutos e 5200 rpm durante 20 minutos em um emulsificador (ULTRA-TURRAX IKA T25), formando assim uma simples emulsão. Posteriormente o sistema foi mantido em um agitador magnético durante vinte e quatro horas para remoção do solvente.

Em seguida, as microesferas foram centrifugadas a 3500 x g por 5 minutos, lavadas com água destilada por três vezes consecutivas, congeladas e secas em um liofilizador. A representação da metodologia utilizada na obtenção das microesferas está ilustrada na figura 3.1.

3.3 Microesferas com o quimioterápico

O procedimento para a obtenção das microesferas de PLDA com o quimioterápico seguiu a mesma metodologia descrita anteriormente no item 3.2 A diferença, entretanto foi a adição 14mg do quimioterápico paclitaxel (fornecido pela empresa farmacêutica LIBBS) na solução polimérica.

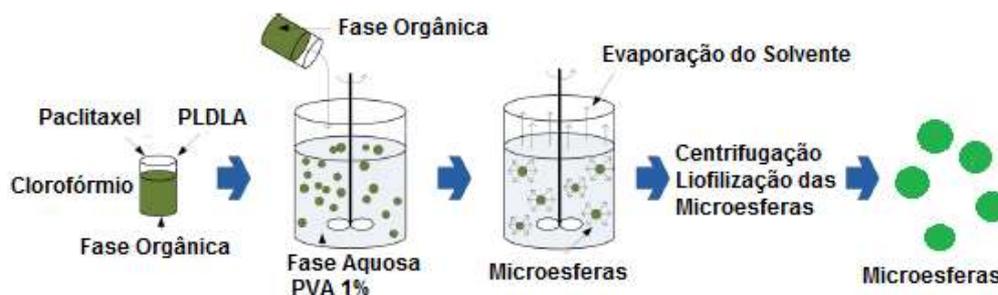


Figura 3.1: Representação da metodologia utilizada na obtenção das microesferas de PLDLA sem e com o fármaco paclitaxel.

3.4 Caracterização das microesferas

3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise morfológica das microesferas de PLDLA e PLDLA contendo paclitaxel foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JXA 840A com tensão de 10kV. Uma pequena quantidade de microesferas foi adicionada em uma fita de carbono e fixada em um porta amostra de latão. Para metalização das amostras foi utilizado um metalizador SPUTER COATER BALTEC SCD 050 com corrente de 40mA por 200s. As análises de MEV foram realizadas na Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas.

3.4.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A morfologia das microesferas de PLDLA e PLDLA contendo paclitaxel foram analisadas em um Microscópio de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) da marca Bruker modelo diMultiMode V. As imagens foram obtidas no modo contato intermitente (*Tapping®*), empregando-se um cantiléver com constante elástica de aproximadamente 0.06N/m (valor nominal) e uma ponta com raio de aproximadamente 12nm (modelo SNL-10). A taxa de varredura foi de 1Hz. As análises de AFM foram realizadas no Laboratório de Nanoneurobiofísica e Nanomedicina da Universidade Federal de São Carlos- Campus Sorocaba.

3.4.3 Espalhamento de luz (LLS)

O diâmetro médio das microesferas foi determinado por meio da técnica de espalhamento de luz laser (LLS) utilizando o aparelho Mastersizer. Para isto 1mL de amostra diluída em água (1:10) foi adicionada em uma cubeta de acrílico e as medidas em

triplicata do diâmetro médio das microesferas de PLDA puras e com paclitaxel foram obtidas.

3.4.4 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

O estado físico do paclitaxel nas microesferas de PLDLA foi caracterizado pelas análises de curvas de DSC. As curvas foram obtidas em um equipamento TA Instruments modelo MSDC2910 onde utilizaram-se cadinhos de alumínio com aproximadamente 10 mg de amostra, sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e taxa de aquecimento de 10°C/min iniciando o aquecimento em 0°C e atingindo 300°C. Realizaram-se análises do paclitaxel puro, PLDLA puro, microesferas de PLDLA com e sem o fármaco e mistura física de microesferas de PLDLA + paclitaxel nas mesmas proporções utilizadas no processo de obtenção das microesferas. As análises de DSC foram realizadas no Laboratório de Biomateriais da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo – Campus Sorocaba .

3.4.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

3.4.5.1 Medidas da Eficiência da Encapsulação (E.E) do paclitaxel nas microesferas de PLDLA

A obtenção da eficiência de encapsulação do fármaco paclitaxel nas microesferas de PLDLA foi determinada em análises conduzidas pelo software Waters Breeze, equipamento Waters equipado com um detector de UV modelo 2487 e uma bomba mod. LC-1525. A coluna utilizada na detecção do paclitaxel foi uma Symmetry C18 3,9 X150 mm (Waters corporation). A absorvância foi monitorada à 227 nm com um fluxo de fase móvel de 1,0 mL/min. A injeção das amostras foi de 20 µL e realizada em triplicata . O resultado final da concentração de fármaco é a média aritmética dos valores obtidos. A fase móvel utilizada foi constituída por 50 % de acetonitrila e 50% de água, filtrada em membrana de 0,45 µm e submetida a banho de ultrasson para eliminar bolhas, metodologia adaptada de GUERRA *et al* 2011; KIM *et al*, 2005; LUO *et al*, 2011. Para a obtenção da curva de calibração, foram preparadas soluções padrão de paclitaxel em acetonitrila de concentrações 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160,0 µg/mL ($y = 1192.9x + 2829$, $r = 0,996$, sendo y a área da absorvância e x a concentração do fármaco) . Para a obtenção da eficiência de encapsulação do fármaco, após a etapa de preparação das microesferas coletou-se o sobrenadante final e quantificou-se a concentração de fármaco

existente no mesmo. As análises foram realizadas em triplicatas (anexo 1). Esse valor foi subtraído da concentração total de fármaco utilizada para se conhecer a concentração de fármaco encapsulada. A eficiência de encapsulação (E.E) do dispositivo foi calculada utilizando-se a equação representada pela figura 3.2.

$$E.E (\%) = \frac{\text{Concentração de paclitaxel presente nas microesferas}}{\text{Concentração de paclitaxel usado na obtenção das microesferas}} \times 100$$

Figura 3.2 : Equação para o cálculo da eficiência de encapsulação do fármaco.

As análises de HPLC foram realizadas no Laboratório de Biomateriais da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo – Campus Sorocaba .

3.4.5.2 Ensaio de liberação in vitro do paclitaxel

Neste ensaio, após o processo de obtenção das microesferas de PLDLA com o princípio ativo (Paclitaxel) , as mesmas foram centrifugadas, e o sobrenadante descartado. Posteriormente foi acrescentado no tubo com as microesferas 100mL de solução tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4) e 2% de acetona a fim de solubilizar o paclitaxel liberado..Os tubo foi mantido em banho termostaticado à 38,0°C ± 0,5, sob leve agitação durante 1°,2°,3°,5°,10°,15°,20°,25°,30° dias de ensaio (Figura 3.2). Durante cada tempo de ensaio o tubo foi centrifugado, e o sobrenadante retirado para análise em HPLC. Os ensaios foram realizados em triplicada para cada tempo do estudo (anexos, 2,3,4,5,6,7,8 9 e 10) .

O estudo da liberação in vitro do paclitaxel foi conduzido por um sistema WATERS equipado com um detector de absorvância Dual (modelo 2487). A coluna utilizada na separação do paclitaxel foi uma SYMMETRY C18 5µm 3,9 x 150mm (WATERS). A fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila e água (50:50 v/v) . A absorvância será monitorada à 227nm com um fluxo de fase móvel de 1,0mL/mim. Para a obtenção da curva de calibração, foram preparadas soluções padrão de paclitaxel em acetonitrila de concentrações 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160,0 µg/mL ($y = 1192.9x + 2829$, $r = 0,996$, sendo y a área da absorvância e x a concentração do fármaco). A injeção das amostras será de 20µL. A metodologia descrita para quantificar o quimioterápico paclitaxel presente nas microesferas de PLDLA pelo técnica do HPLC foi adaptada de GUERRA *et al* 2011; KIM *et al*, 2005; LUO *et al*, 2011. As análises de HPLC foram

realizadas no Laboratório de Biomateriais da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo – Campus Sorocaba .

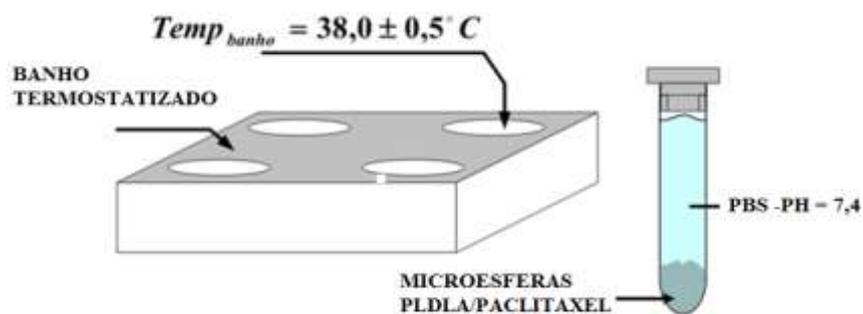


Figura 3.3: Representação do ensaio da degradação *in vitro* das microesferas de PLDLA contendo paclitaxel.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Morfologia das Partículas

A fim de obter informações relativas à forma das microesferas, as micropartículas foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM). Estas técnicas de caracterização são de grande importância na análise de microesferas obtidas a partir de matrizes poliméricas, pois fornecem informações acerca da morfologia e do tamanho de tais dispositivos. (FREITAS *et al* 2005; SCHAFFAZICK & GUTERREZ, 2003).

As imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura (figura 4.1) e microscopia de força atômica (figuras 4.2 e 4.3) demonstraram que as microesferas de PLDLA com e sem o fármaco paclitaxel apresentam morfologia esférica, tamanho em escala micrométrica, grande distribuição de diâmetros, e ausência de agregação ou adesão.

A técnica de microencapsulação, seguida da evaporação do solvente, utilizada neste trabalho, possibilitou a formação de microesferas com diâmetros menores que 250 μm , o que permite que as micropartículas de PLDLA, possam ser administradas por diferentes vias de administração, como por exemplo, oral, nasal, intramuscular e subcutânea (JAIN *et al*; 2000, YUN *et al*; 2004).

As micropartículas poliméricas são consideradas dispositivos com um grande potencial na área da liberação controlada de fármacos. As características apresentadas pelas nano/micropartículas poliméricas têm sido exploradas no desenvolvimento de vários sistemas de liberação controlada localizados, desenhados para liberarem o fármaco num tipo específico de tecido/células, como por exemplo, nas células de tumores (HALEY & FRENKEL, 2008). Ainda devido ao seu tamanho, algumas nano/micropartículas possuem a capacidade de penetrar a barreira hematoencefálica e atingir o sistema nervoso central (cérebro), uma das zonas de mais difícil acesso do organismo.

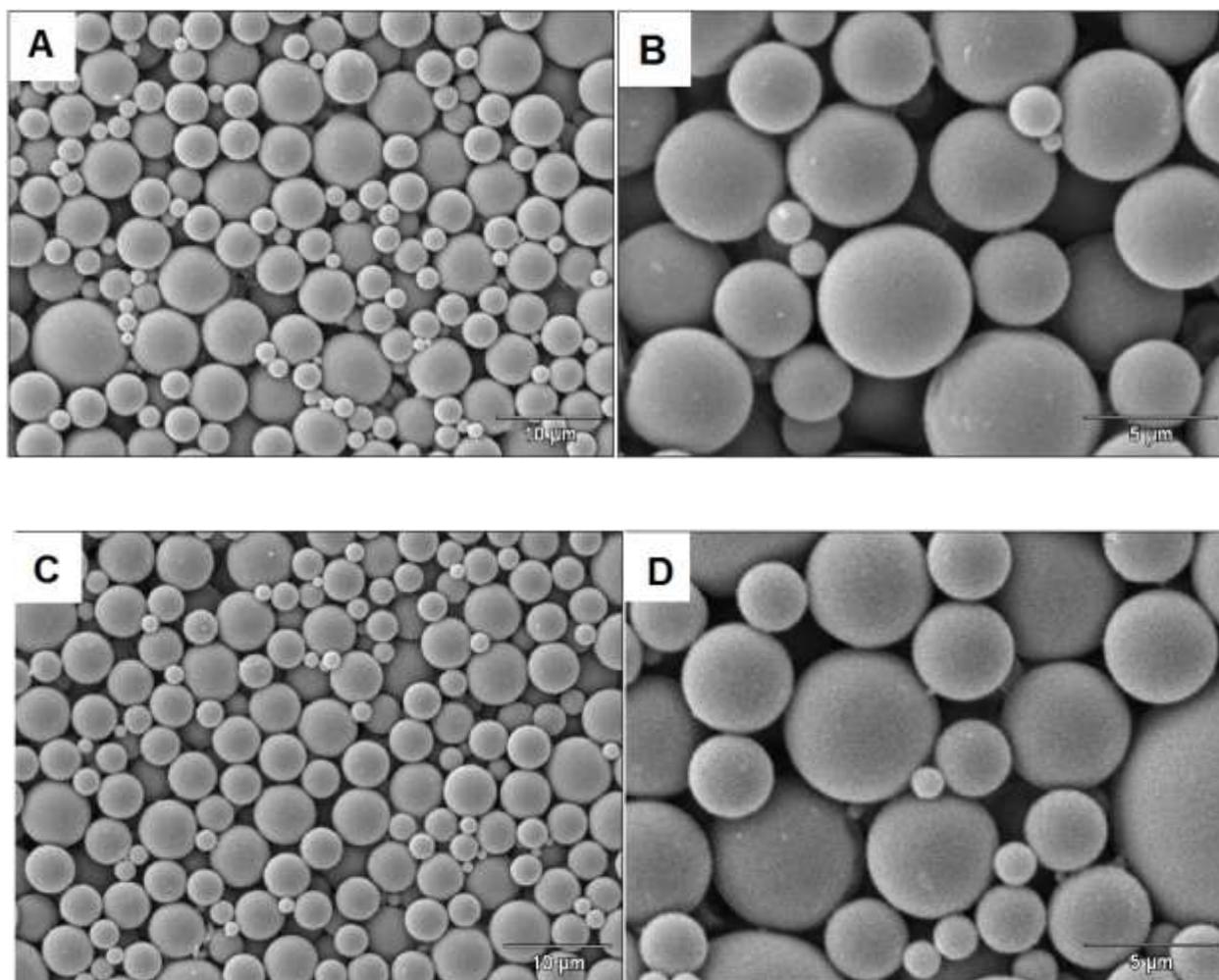


Figura 4.1: Microscopia eletrônica de Varredura das Microesferas: A e B) Microesferas de PLDLA sem o paclitaxel; C e D) Microesferas de PLDLA com o paclitaxel.

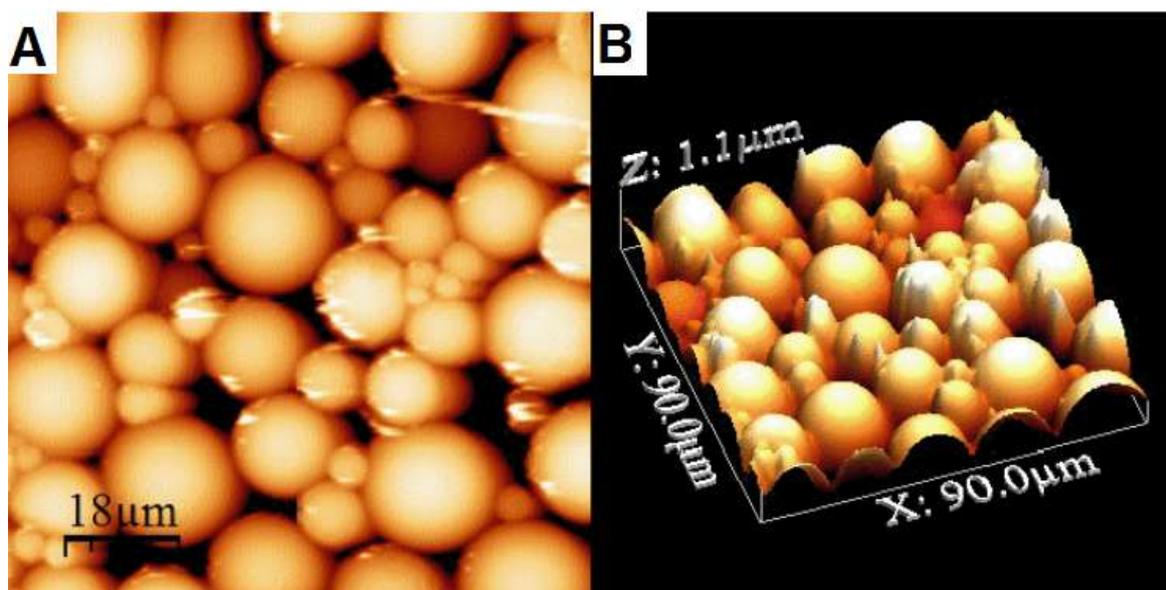


Figura 4.2: Imagens de AFM de microesferas de PLDLA sem paclitaxel em condições ambiente ($90\ \mu\text{m} \times 90\ \mu\text{m}$) em (A) 2D e em (B) 3D.

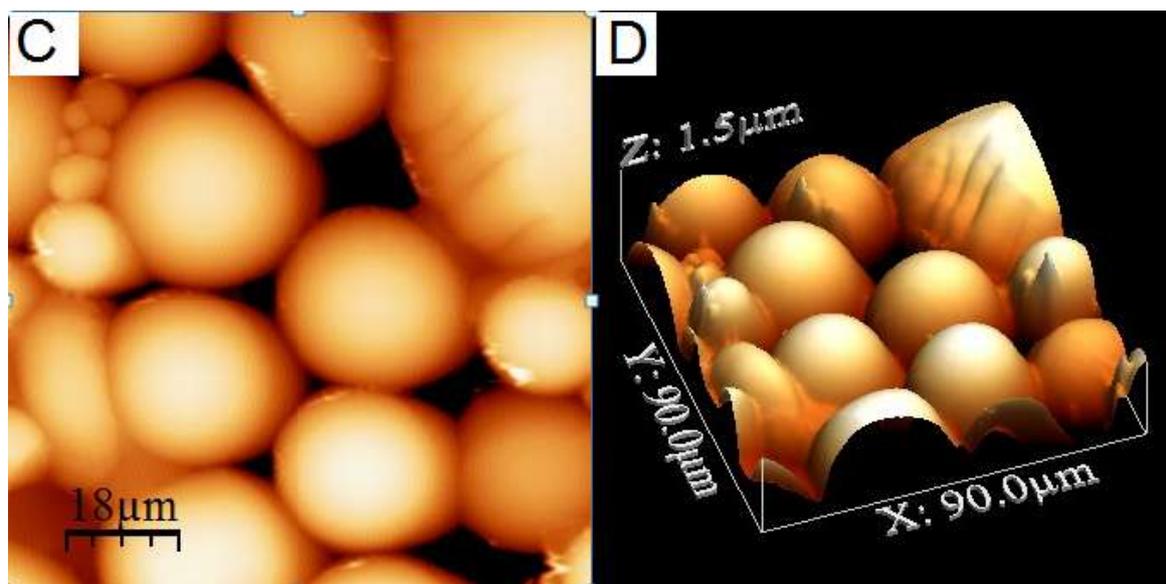


Figura 4.3: Imagens de AFM de microesferas de PLDLA com paclitaxel em condições ambiente ($90\ \mu\text{m} \times 90\ \mu\text{m}$) em (C) 2D e em (D) 3D

4.2 – Espalhamento de luz laser (LLS)

Os valores de diâmetro médio das microesferas de PLDLA sem e com paclitaxel foram obtidos pela técnica de espalhamento de luz laser (LLS).

A técnica de espalhamento de luz laser baseia-se na determinação das flutuações na intensidade da luz espalhada pelas partículas em função do tempo, possibilitando a obtenção do diâmetro hidrodinâmico das partículas em solução aquosa.

Os valores de diâmetro médio das microesferas de PLDLA sem e com paclitaxel estão apresentados na Tabela 4.1 .

Tabela 4.1 Valores de diâmetro médio e desvio padrão das microesferas de PLDLA sem e com paclitaxel.

Dispositivo	Diâmetro (μm) \pm s.d
Microesferas de PLDLA sem paclitaxel	10,3 \pm 1,7
Microesferas de PLDLA com paclitaxel	12,7 \pm 1,3

As partículas de PLDLA sem paclitaxel apresentam tamanho médio de $10,3\mu\text{m}\pm 1,7$, já as partículas de PLDLA contendo paclitaxel apresentam tamanho médio de $12,7\pm 1,3\mu\text{m}$.

A técnica de espalhamento de luz permite obter o diâmetro hidrodinâmico das partículas. Estes valores representam o diâmetro efetivo das microesferas em solução aquosa. Normalmente esses valores de diâmetro médio podem ser maiores comparados aos observados nas micrografias, visto que as microesferas não estão liofilizadas e sim em solução aquosa. Isto pode ser atribuído à presença, na superfície das partículas, de uma camada de hidratação e também devido à adsorção de cadeias poliméricas do surfactante (PVAI), que se projetam em direção à fase aquosa (forte solvatação) e são denominadas “cabelos” (hairs), (SCHAFFAZICK & GUTERREZ, 2003; KASZUBA *et al* 2008; PEREIRA *et al*, 2008).

A presença do fármaco, assim como o tensoativo utilizado na fase aquosa durante o processo de obtenção das partículas pode provocar alteração no tamanho das mesmas (LASSALE & FERREIRA, 2007; SCHAFFAZICK & GUTTEREZ, 2003) .

Vários fatores determinam o tamanho e a distribuição de tamanho de diâmetros das microesferas: a massa molar do polímero, o tipo e concentração do surfactante (tensoativo), a proporção da fase orgânica/aquosa, o solvente utilizado na dissolução do polímero, a taxa de evaporação do solvente, a encapsulação do fármaco e a velocidade de agitação da emulsão (ASTETE E SABLIOV, 2006; MANDARGI, 2008).

4.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A técnica de DSC tem sido muito utilizada para investigar interação entre polímeros e fármacos em nano e micropartículas, podendo fornecer informações como temperatura de fusão, temperatura de cristalização, temperatura de transição vítrea, entalpia de fusão, entalpia de cristalização e grau de cristalinidade. (SCHAFFAZICK & GUTERREZ, 2003).

A figura 4.4 mostra as curvas de DSC para o paclitaxel puro, para a mistura física PLDLA + paclitaxel, para as microesferas de PLDLA sem e com incorporação do paclitaxel e para o polímero PLDLA.

O paclitaxel puro (figura 4.4 A) mostra um pico endotérmico que corresponde ao ponto de fusão à 220°C, o que demonstra sua natureza cristalina. O mesmo pico de cristalização pode ser observado na figura 4.4 B, para a mistura física de PLDLA e paclitaxel nas mesmas proporções utilizadas na preparação das microesferas. Na figura 4.4 C, não se observa o pico de cristalização do fármaco, o que indica que o paclitaxel não estava na forma de cristais nas microesferas de PLDLA, sugerindo que o fármaco paclitaxel se encontra como uma dispersão sólida nas microesferas. Esses resultados estão de acordo com YANG e colaboradores (2009).

A figura 4.4 (curvas B, C, D e E) mostra a temperatura de transição vítrea (T_g), do polímero PLDLA, entre 33 e 40°C, indicando que a incorporação de paclitaxel nas microesferas não alterou as propriedades térmicas do polímero. Sendo o PLDLA um polímero amorfo, não se observa pico de fusão. Essa característica é importante, pois influencia diretamente na velocidade de degradação do polímero. Dependendo da aplicação é conveniente que os dispositivos apresentem grau de cristalinidade baixo para que o processo de degradação do material seja mais rápido, diminuindo assim a permanência de fragmentos do material no local do implante, pois à medida que o polímero degrada fragmentos cristalinos são acumulados no organismo, podendo gerar reações inflamatórias. (MOTTA & DUEK, 2008). Assim o polímero PLDLA, mostra-se

um material adequado para a obtenção de dispositivos para serem utilizados no processo de encapsulamento e liberação de fármacos.

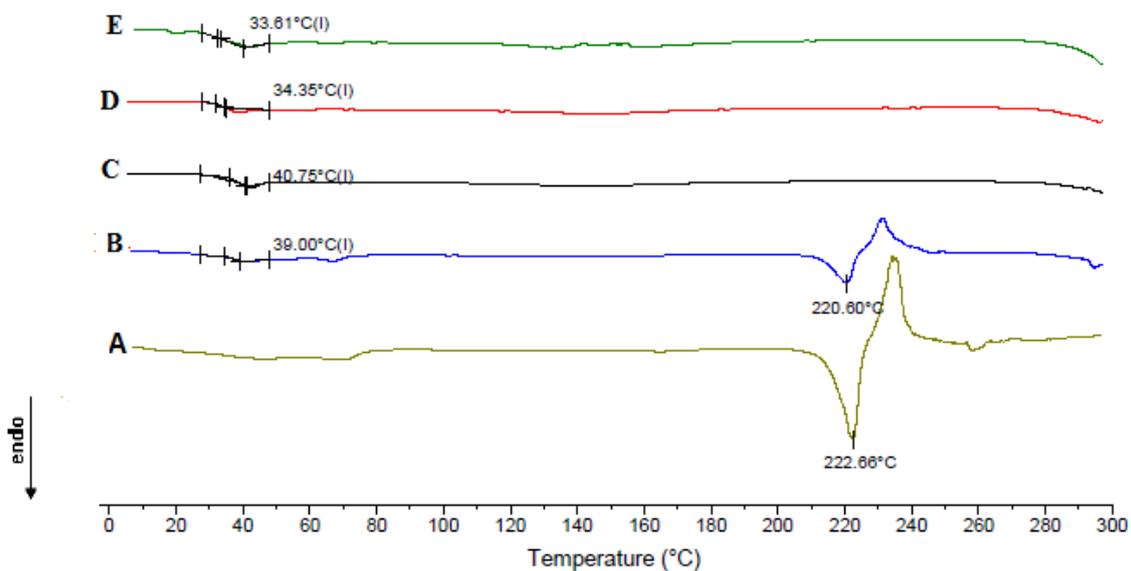


Figura 4.4: Termogramas de DSC: A) paclitaxel puro, B) mistura física de PLDLA+ paclitaxel, C) microesferas de PLDLA com paclitaxel, D) microesferas de PLDLA sem paclitaxel e E) polímero PLDLA

4.4 Eficiência de Encapsulação do Fármaco

A quantificação de um analito por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido adotada por ser uma metodologia versátil, segura e prática para a separação e a quantificação de fármacos presentes em nano/micropartículas poliméricas. (HALEY & FRENKEL, 2008; SCHAFFAZICK & GUTERREZ, 2003).

A eficiência de encapsulação do fármaco paclitaxel presente nas microesferas de PLDLA foi obtida a partir do sobrenadante da solução contendo as microesferas.

De acordo com o item 3.4.5 apresentado na metodologia, a eficiência de encapsulação do fármaco foi calculada subtraindo-se a concentração encontrada no sobrenadante, $2,5\mu\text{g/mL}\pm 0,3$ (tempo zero da tabela 4.2) da concentração total usada na preparação das microesferas, $140,0\mu\text{g/mL}$. A eficiência de encapsulação do fármaco paclitaxel foi de 98%; calculada a partir da média da concentração de três formulações de microesferas de PLDLA (anexo 1).

Tabela 4.2 Concentração de paclitaxel presente no sobrenadante em diferentes tempos de degradação, obtidas pela técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) .

Tempo (dias)	C ($\mu\text{g/ml}$)
0	$2,5 \pm 0,3$
1	$21,7 \pm 1,3$
2	$38,6 \pm 1,3$
3	$55,3 \pm 0,6$
5	$67,3 \pm 1,7$
10	$70,5 \pm 0,7$
15	$80,8 \pm 1,5$
20	$86,3 \pm 0,6$
25	$93,2 \pm 3,5$
30	$123,0 \pm 4,2$

A técnica de simples emulsão seguida da evaporação do solvente é uma das técnicas normalmente utilizada pelos pesquisadores para imobilizar compostos terapêuticos em micropartículas poliméricas, hidroliticamente degradáveis e biocompatíveis. Essa técnica tem sido extensivamente utilizada e investigada, principalmente na preparação de micropartículas de poli (ácido láctico), PLA, e do copolímero poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA (LASSALE & FERREIRA, 2007; MUNDARGI *et al*, 2009; SCHAFFAZICK & GUTERREZ, 2003).

Existem diversas formas de imobilizar um agente bioativo em micropartículas poliméricas utilizando a técnica da evaporação do solvente. A escolha do método específico baseia-se principalmente nas características de solubilidade do composto bioativo, visando uma alta eficiência de encapsulação do fármaco no interior da matriz polimérica (MUNDARGI *et al*, 2009). A escolha do fármaco paclitaxel, bem como a técnica de simples emulsão escolhida para preparação das microesferas de PLDLA, possibilitou uma alta eficiência de encapsulação do fármaco no interior da matriz polimérica. Estudos têm sido desenvolvidos visando avaliar os principais fatores que interferem na eficiência de encapsulação de fármacos em partículas poliméricas, sendo o método de preparação utilizado na obtenção das partículas um fator determinante (SCHAFFAZICK & GUTERREZ, 2003).

A presença do fármaco, assim como o tensoativo utilizado na fase aquosa, para obtenção das partículas influenciam em sua eficiência de encapsulação. Neste trabalho utilizamos como tensoativo na fase aquosa, o poli (álcool vinílico) PVAI 1%, devido à sua baixa toxicidade, o que possibilitou uma alta eficiência de encapsulação. Segundo LASSALE & FERREIRA, 2007, os métodos de agitação e homogeneização, bem como o tensoativo utilizado na fase aquosa permitem obter partículas com alta eficiência de encapsulação de fármacos.

4.5 Estudo da liberação *in vitro* do fármaco paclitaxel.

O estudo *in vitro* da liberação de paclitaxel, incorporado nas microesferas de PLDLA, foi realizado pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

As figuras 4.6 a 4.14 apresentam os cromatogramas obtidos pelo HPLC durante o estudo *in vitro* das microesferas de PLDLA contendo paclitaxel. Verificam-se os picos correspondentes ao paclitaxel (PTX) com tempo de retenção de 6 min, e aos produtos de degradação (PD) não identificados.

As análises das medidas das concentrações de paclitaxel em triplicata, para cada tempo do estudo, estão representados nos anexos (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10). Os valores médios da concentração de paclitaxel obtidos durante 1°, 2°, 3°, 5°, 10°, 15°, 20°, 25° e 30° dias de estudo, estão representados na tabela 4.2.

O gráfico representado pela figura 4.5 ilustra a curva de liberação do paclitaxel em função do tempo estudado. Verifica-se que durante os primeiros cinco dias de estudo ocorreu liberação inicial explosiva do paclitaxel, —”burst release,” (aproximadamente 50%), seguida de uma liberação, mais lenta entre os 10° e 25° dias de estudo (aproximadamente 20%). Entre 25° e 30° dia ocorreu uma liberação acelerada do paclitaxel (aproximadamente 20%).

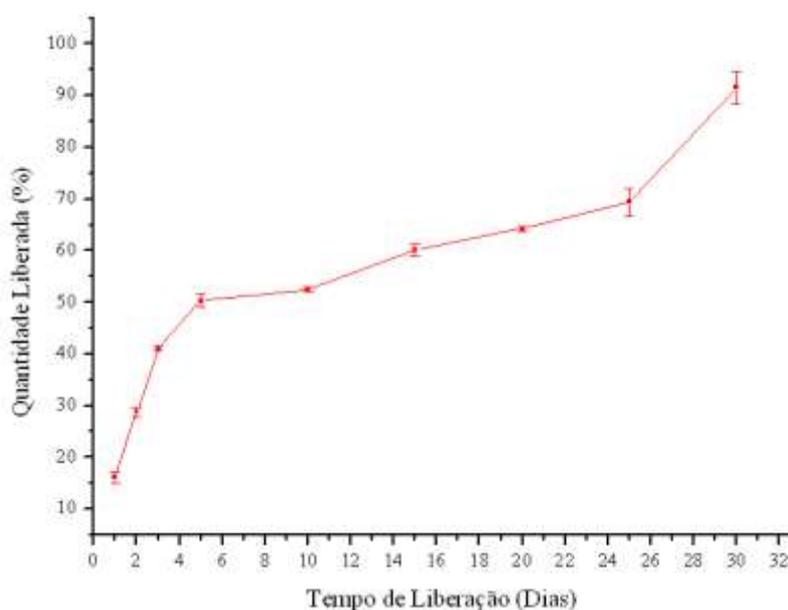


Figura 4.5: Quantidade de paclitaxel liberado *in vitro* pelo tempo de liberação estudado.

Nos estudos de RAJENDER e colaboradores (2009), MAKINO e colaboradores, (2000) com microesferas poliméricas, verificou-se que um sistema de liberação controlada de fármacos pode apresentar até três diferentes fases de liberação: a liberação rápida do fármaco que ocorre em poucas horas ou dias, conhecido como liberação explosiva, no inglês —”burst release”, atribuída ao fármaco que se encontra aderido à parede das microesferas; a liberação lenta, a qual dependente da cinética de degradação do polímero utilizado na processo de obtenção das microesferas, e a liberação tardia

acelerada, que ocorre devido a sistemas que apresentam microesferas com diâmetros variados.

As microesferas de PLDLA puras e com paclitaxel utilizadas neste estudo foram obtidas do copolímero poli (L-co-D, L ácido láctico), onde o processo de degradação ocorre pela hidrólise das ligações ésteres. A velocidade de hidrólise desse polímero depende de sua composição química, da proporção dos monômeros e do tamanho da cadeia podendo se obter tempos de degradação que variam entre algumas semanas até alguns meses, de acordo com as características do polímero. (ANDERSON & SHIVE, 1997).

De acordo com MU & FENG, (2003); MU & FENG,(2002) e MITTAL e colaboradores (2011), o perfil cinético de liberação do fármaco paclitaxel, a partir da degradação das microesferas de PLDLA, são característicos de sistemas compostos por carreadores de diversos diâmetros, onde as microesferas de menor diâmetro degradam rapidamente liberando o fármaco enquanto as maiores apresentam um perfil de liberação lento.

Além disso, a liberação do fármaco em microesferas poliméricas pode ocorrer por difusão, pela degradação da matriz polimérica e pelo mecanismo de erosão.

A difusão ocorre quando o fármaco passa pelo interior do polímero que controla sua liberação, podendo ocorrer em escala macroscópica através dos poros da matriz polimérica, ou em nível molecular, pela passagem do fármaco entre as cadeias do polímero. A morfologia da matriz polimérica é um fator determinante tanto para liberação por difusão, quanto por degradação (MCDONALD *et al.*; 2006). O método de preparo de um sistema interfere na morfologia da matriz e no tamanho das partículas e, portanto, pode influenciar na velocidade de liberação do fármaco.

As microesferas de PLDLA obtidas apresentaram morfologia esférica e tamanho menor que 250µm. Segundo JAIN (2000), um sistema de liberação de fármacos ideal deve apresentar partículas com diâmetros médios que não excedam 250 µm, possibilitando assim sua aplicação com seringas sem causar o entupimento da agulha. Estes dispositivos poliméricos têm sido empregados com sucesso numa grande variedade de fármacos incluindo: enzimas, hormônios, peptídeos, antibióticos, anticancerígenos, antifúngicos, antiinflamatórios, analgésicos, quimioterápicos.(BLANCO-PRIETRO *et al.*,1998; YANG *et al.*, 2001; ROULLIN *et al.*, 2002; JANG FU *et al.*, 2002; BARRIO *et al.*, 2003).

O valor do diâmetro médio das microesferas de PLDLA com e sem o quimioterápico paclitaxel obtidos neste estudo estão de acordo com o valor de diâmetro

médio obtidos no trabalho de YUN e colaboradores (2004), onde as microesferas obtidas, apresentaram morfologia esférica, diâmetros menores que 250 μm , o que oferecem flexibilidade na dosagem, cinética de liberação e marcação de receptores para aplicações como liberação de fármacos ou genes. Facilitam a administração de novas drogas de estrutura complexa, como peptídeos, que são frequentemente difíceis de serem administradas de maneira conveniente por outros meios. No caso dos anti-inflamatórios pode-se evitar a irritação da mucosa gástrica causada pelos medicamentos (PEPPAS, 1997; RÉ, 2000]. Microesferas biodegradáveis podem ser utilizadas na liberação controlada em formulações injetáveis, orais, e em sistemas bioadesivos [BRANNON-PEPPAS, 1995].

Nos estudos realizados por HUSSAIN e colaboradores (2002) com microesfera de PLGA contendo o quimioterápico 5- fluoracil verificou-se que esses dispositivos microparticulados apresentaram uma liberação *in vitro* semelhante às microesferas de PLDLA obtidas neste trabalho. Segundo os trabalhos de degradação *in vitro*, realizados por LASSALE e colaboradores (2007), as microesferas de polímeros biodegradáveis, podem ser utilizadas em terapias gênicas. Tais pesquisadores avaliaram, tanto o perfil cinético como a liberação do fármaco em função do polímero empregado no processo de obtenção de microesferas, sendo constatado que o diâmetro das microesferas, influenciam no processo de degradação do polímero, bem como na liberação do ativo. Conforme se aumenta o diâmetro das partículas diminui-se a superfície específica dos dispositivos de liberação com o meio aquoso, o que conseqüentemente diminui a taxa de liberação do fármaco, pois o fármaco passa por difusão para o meio líquido. Portanto partículas de diâmetros menores degradam e liberam rapidamente o fármaco encapsulado (BERKLAND *et al.*, 2003). Além do diâmetro das microesferas, a cinética de liberação do fármaco pode ser influenciada pela localização do fármaco na matriz polimérica, de forma que se o fármaco se encontra na superfície do dispositivo será liberado em menor tempo do que o que está no interior do mesmo. Os poros presentes nas microesferas influenciam no processo de difusão de fármacos em microesferas biodegradáveis, assim quanto maior for a quantidade e o diâmetro dos poros maior será a difusão de líquidos pelo sistema polimérico, resultando assim numa degradação mais rápida do polímero com conseqüente liberação do fármaco; outras características do polímero utilizado no processo de obtenção das microesferas, como tempo de degradação, porção amorfa e cristalina, influenciam no processo de degradação do polímero e conseqüentemente na cinética de liberação do ativo. (SOPPIMATH *et al.*, 2001; MCDONALD *et al.*; 2006).

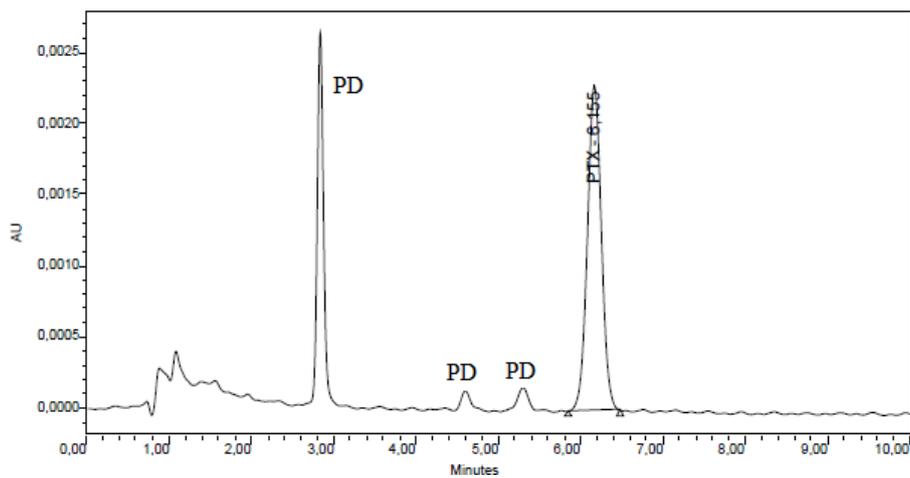


Figura 4.6: Cromatograma do sobrenadante após 1 dia de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.

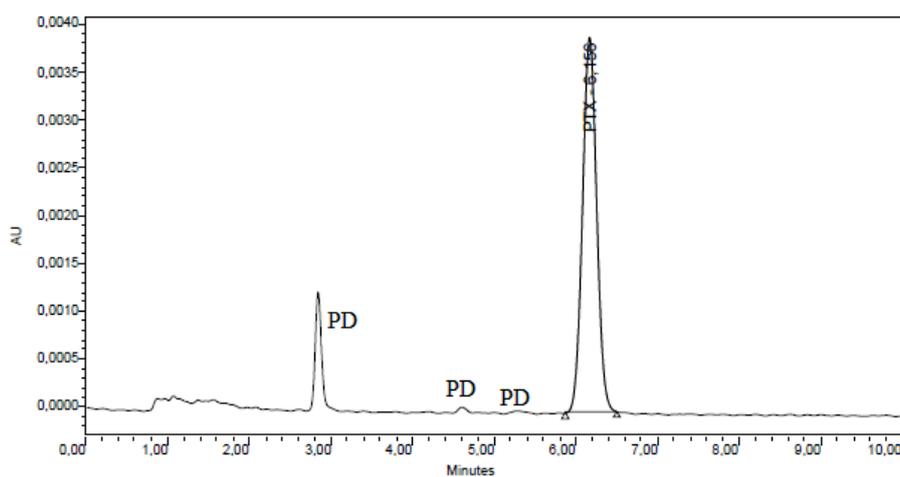


Figura 4.7: Cromatograma do sobrenadante após 2 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel

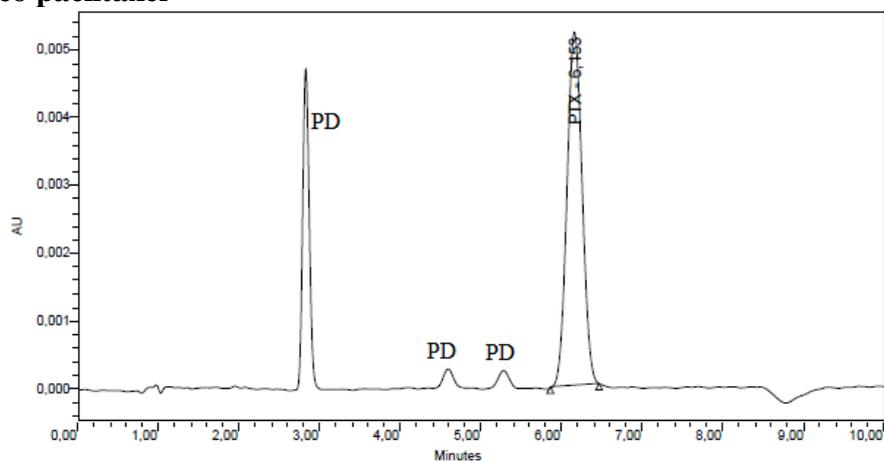


Figura 4.8: Cromatograma do sobrenadante após 3 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.

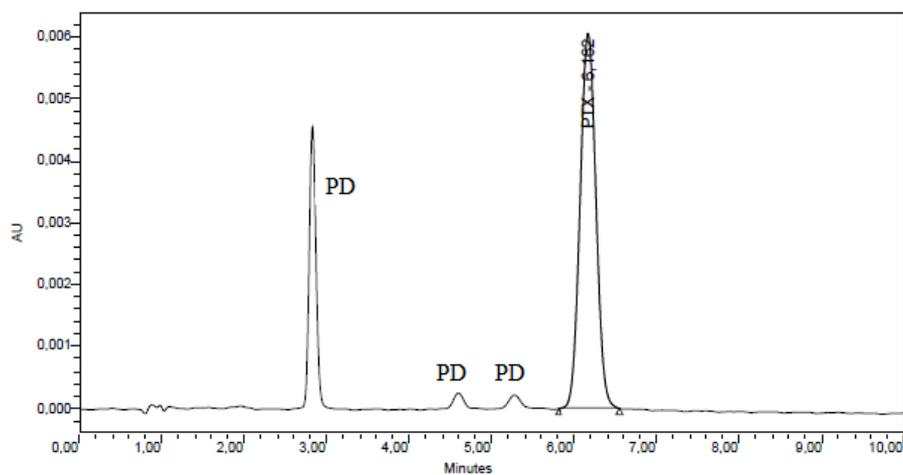


Figura 4.9: Cromatograma do sobrenadante após 5 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.

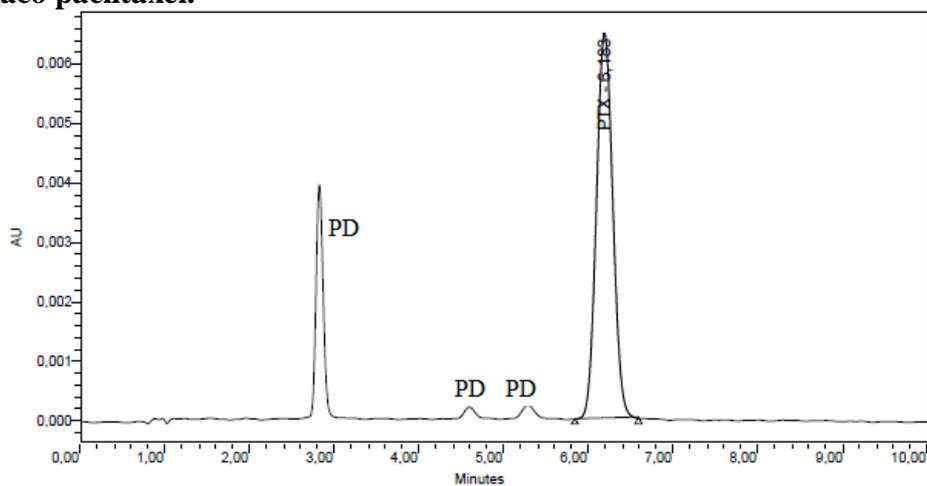


Figura 4.10: Cromatograma do sobrenadante após 10 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.

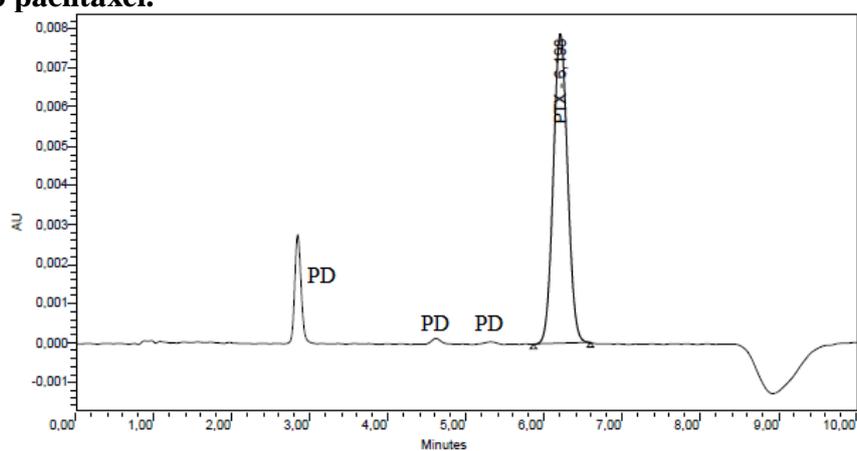


Figura 4.11: Cromatograma do sobrenadante após 15 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.

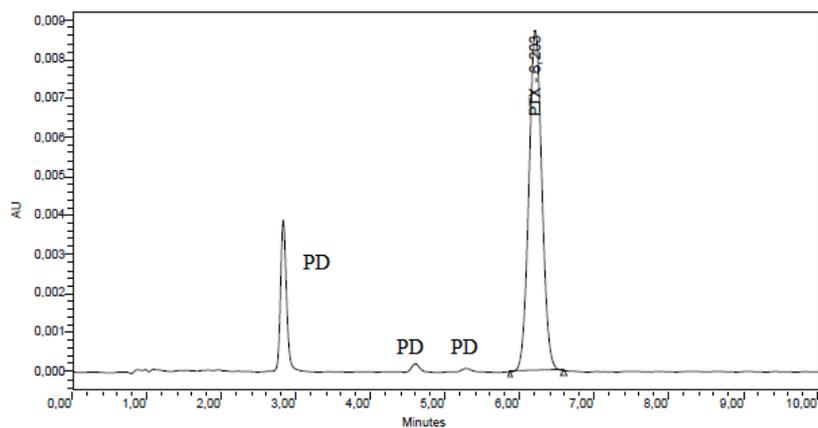


Figura 4.12: Cromatograma do sobrenadante após 20 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.

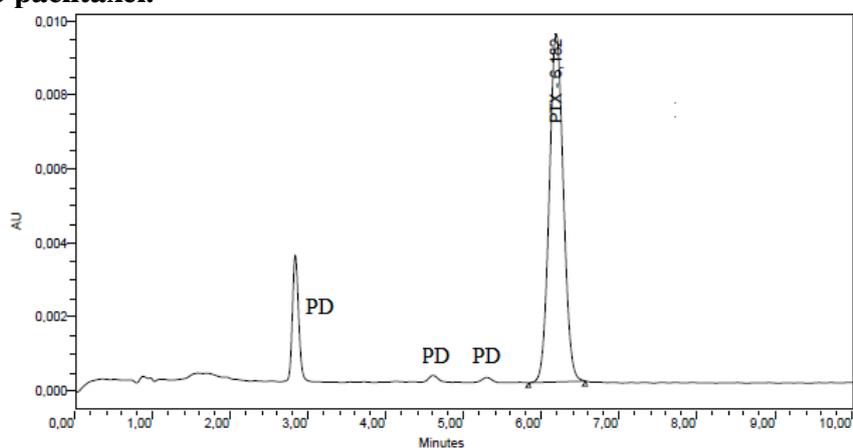


Figura 4.13: Cromatograma do sobrenadante após 25 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.

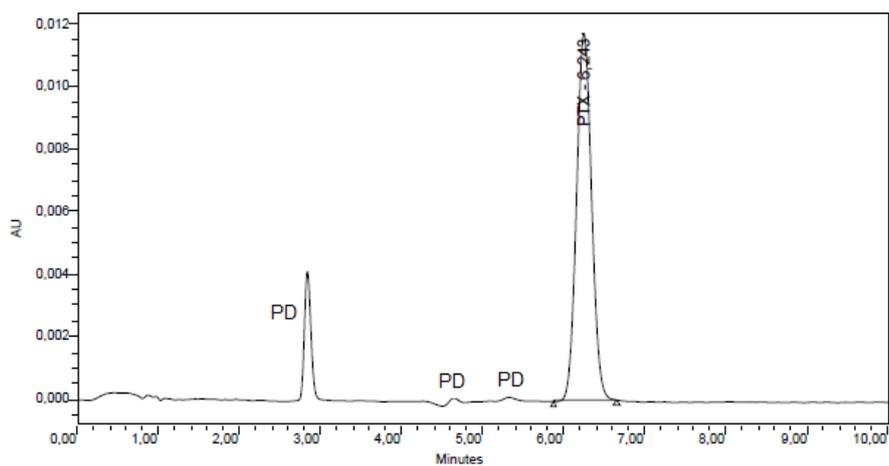


Figura 4.14: Cromatograma do sobrenadante após 30 dias de degradação e liberação do fármaco paclitaxel.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO

A técnica de simples emulsão, utilizada neste trabalho, possibilitou a obtenção de microesferas de PLDLA com alta eficiência de encapsulação do quimioterápico paclitaxel.

A análise das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), e microscopia de força atômica (AFM), demonstra que as microesferas de PLDLA sem e com o fármaco paclitaxel, apresentaram morfologia esférica, tamanho em escala micrométrica e grande distribuição de diâmetros.

O diâmetro médio das microesferas de PLDLA com e sem o paclitaxel, obtidos pela técnica de espalhamento de luz laser (LLS) , demonstra que a emulsão de microesferas pode ser utilizada em estudos *in vitro* e *in vivo*, visando aplicações em diferentes rotas de administração, como por exemplo, oral, nasal, intramuscular e subcutânea.

O perfil cinético da liberação *in vitro* do paclitaxel, a partir das microesferas de PLDLA, apresentou uma liberação inicial explosiva (“burst release”), seguida de uma liberação mais lenta, e uma liberação acelerada tardia, característica de microesferas com diâmetros variados.

As microesferas de PLDLA obtidas apresentam potencial para serem utilizadas como carreadores de fármacos, para futuras aplicações em liberação de medicamentos.

PERSPECTIVAS :

- Estudo “in vivo” da liberação do fármaco.
- Modificação de superfície das microesferas de PLDLA.
- Monitorar a distribuição de microesferas de PLDLA no corpo do animal, através de ensaios de tomografia.
- Estudar a eficácia terapêutica das microesferas de PLDLA em ensaios de cultura de células e modelo animal.
- Síntese de nanopartículas poliméricas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A; REINA,L.C.B; MONTANARI, C.A; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo- celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o DNA, uma introdução. *Química Nova*, v.28. n.1, p.118-129,2005.

ANDERSON, J.M.; SHIVE, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 28, n.1, p. 5-24, 1997.

AHMED, M. AL-ABD.; KI-YUN HONG.; SOOCHANG SONG.; HYO-JEONG KUH. Pharmacokinetics of doxorubicin after intratumoral injection using a thermosensitive hydrogel in tumor-bearing mice. *Journal of Controlled Release*, v. 142, p. 101-107, 2010

ARSHADY, R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2. Polylactides and related polyesters. *Journal of Controlled Release*, v.17, n.1, p.1-21, 1991.

ASTETE, C. E.; SABLIOV C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, v.17, p. 247-289, 2006.

AZEVEDO, M.M.M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. Monografia. LQES- Laboratório de Química do Estado Sólido. Instituto de Química, Unicamp, 2002.

BAJPAI, A.K., SHULKLA,K.S., BHANU, S., KANKANE, S. Responsive polymers in controlled drug delivery, v. 33, p. 1088-1118, 2008.

BARBANTI,S.H.; ZAVAGLIA,C.A.C.; DUEK,E.A.R. Bioresorbable polymers in tissue engineering. *Polimeros*. v.15.n.1.p.13-21,2005.

BARRIO, G. G.; NOVO, F. L.; IRACHE, J. M. Loading of plasmid DNA into PLGA microparticles using TROMS (Total Recirculation One-Machine System): evaluation of its integrity and controlled release properties. *Journal of Controlled Release*. v.86, p.123-130, 2003.

BENITA, S.; BENOIT, J.P.; PUISIEUX, F.; THIES, C. Characterization of drug-loaded poly(d,l-lactide) microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.73, n.12, p. 1721–1724, 1984.

BERKLAND, C.; KIM, K.; PACK, D. W. PLG microspheres size controls drug release rate through several competing factors. *Pharmaceutical Research*, v. 20. n.7, p. 1055–1062, 2003.

BIRNBAUM, D.T.; KOSMALA, J.D.; HENTHORN, D.B.; BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release of β -estradiol from PLGA microparticles: the effect of organic phase solvent on encapsulation and release. *Journal of Controlled Release*, v.65, n.3, p.375–387, 2000.

BLANCO-PRIETO, M. J.; CAMPANERO, M. A.; BESSEGHIR, K.; HEIMGATNER, F.; GANDER, B. Importance of single or blended polymer types for controlled *in vitro* release and plasma levels of a somatostatin analogue entrapped in PLA/PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*, v. 96, n.3, p. 437-448, 2004.

BLITTERSWIJK, C. A.; FEIJEN, J. Microspheres for protein delivery prepared from amphiphilic multiblock copolymers 2. Modulation of release rate. *Journal of Controlled Release*, v.67, n. 2-3, p. 249–260, 2000.

BRANNON-PEPPAS, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v.116, n.1, p. 1-9, 1995.

BRASILEIRO-FILHO, G. *Patologia Geral*, 2 ed., Ed. Guanabara Koogan S/A, Rio de Janeiro, 1998.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. 631-651, 2002.

CHUNG, T.; HUANG, Y.; LIU, Y. Effects of the rate of solvent evaporation on the characteristics of drug loaded PLLA and PLDLA microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v.212, n.1, p.161-169, 2001.

DANHIER, F., LECOUTURIER, N., VROMAN, B., JEROME, C., BRYNAERT, M.J., FERON, O., PREAT, V. Paclitaxel-loaded pegylated PLGA- based nanoparticle: In vitro and in vivo evaluation. *Journal of controlled release*, v. 133, p. 11-17, 2009.

DASH, A.K.; CUTWORTH II, G.C. Therapeutic, application of implantable drug delivery systems. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.40, n.1, p. 1-12, 1998.

DREIS, S.; ROTHWEILER, F.; MICHAELIS, M.; CINATL JR., J.; KREUTER, J.; LANGER, K. Preparation, characterization and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HAS) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 341, p. 207-214, 2007.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. Nanotecnologia: Introdução, preparação, caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Artliber Editora, 2006.

ELKE, M.; ROLF-JOACHIM, M. & WOLF-DIETER, D. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. *Polymer Degradation and Stability*, v.80, n.3, p.485-501, 2003.

ERTL, B.; PLATZER, P.; WIRTH, M.; GABOR, F. Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for sustained delivery and stabilization of camptothecin. *Journal of Controlled Release*, v.61, p. 305-317, 1999.

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

FRANKS, L. M.; TEICH, N. M. O que é Câncer? In: *Introdução a Biologia Celular e Molecular do Câncer*. Ed. Roca, 1ª ed., São Paulo, p. 1-24, 1997.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B., Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*, v. 102, p. 313-332, 2005.

GOMES, N. G. L.; MILANEZ, M. C. *Biologia dos Tumores*. In: *Gomes R. Oncologia Básica*. Ed. Revinter, Rio de Janeiro, p. 18-35, 1997

GUERRA, G.D., CRISTALLINI,C., BARBANI,N., GAGLIARDI, M. Bioresorbable microspheres as devices for the controlled release of paclitaxel. *International Journal of biology and biomedical engineering*, v.3, p.121-128, 2011.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*, 11ed., Ed. Elsevier Ltda, Rio de Janeiro, cap. 03, p. 40-41, 2006.

HALEY,B.; FRENKEL,E. Nanoparticles for drug delivery in câncer treatment. *Urologic Oncology-Seminars and Originals Investigation*. v. 26, p. 57-64, 2008.

HAMIDI, M., AZADI, A., RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery*. v. 60, p.1638-1649, 2008.

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

HECQ, J.; DELLERS, M.; FANARA, H.; VRANCKX, H. AMIGHI, K. Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipina. *International Journal of Pharmaceutics*, v.299, p.177-167, 2005.

HUSSAIN, M.; BEALE, G.; HUGHES, M.; AKHTAR, S. Co-delivery an antisense oligonucleotide and 5-fluoracil using sustained release poly(lactide-co-glycolide) microsphere formulations for potential combination therapy in cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, v.234, p.129-138, 2002.

Disponível em : < [http:// www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br) > Acesso em 10 de agosto de 2011

JABR-MILANE, L. S.; VAN VLERKEN, L. E.; YADAV, S.; AMIJI, M. M. Multi-functional nanocarriers to overcome tumor drug resistance. *Cancer Treatment. Reviews.*, v.34, p. 592-602, 2008.

JAIN, A. R. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, v.21, n.23, p. 2475-2490, 2000.

JANG FU; FIEGEL, J.; KRAULAND, E.; HANES, J. New polymeric carriers for controlled drug delivery following inhalation or injection, *Biomaterials*, v.23, p.4425-4433, 2002.

JANG,J.Y.; KWON,B.S.; LEE,H.E.; KIM,D.H.; KANG,H.K.; KANG,J.S.; LEE,S.; CHOI,G.J. Preparation of Biodegradable PLGA Nanospheres Employing a Fast Solvent Evaporation Method. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* v.13.n.6.p.1043-1046,2007

JONG-HO KIM; YOO-SHIN KIM; KYEONGSOON PARK; SEULKI LEE; HAE YUN NAM; KYUNG HYUN MIN; HYUNG GON JO; JAE HYUNG PARK; KUIWON CHOI; SEO YOUNG JEONG; RANG-WOON PARK; IN-SAN KIM; KWANGMEYUNG KIM; ICK CHAN KWON. Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice. *Journal of Controlled Release*, v. 127, p. 41-49, 2008

KASZUBA,M.; MCNIGHT,D.; MALCOL,T.;WATSON,F.K.M. Measuring sub sizer using dynamic light scattering. *Journal Nanoparticles Research*,v.10, p.823-829, 2008

KAYSER, O.; OLBRICH, C.; YARDLEY, V.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. *Internation. Journal of Pharmaceutics.*, v.254, p.73-75, 2003.

KIETZKE,T; NEHER,D; LANDFESTER,K; MONTENEGRO, R; GUNTNER, R; SCHERF, U. Novel approachers to polymers blends based on polymer nanoparticles. *Nature Materials*, v.2, p. 408-412, 2003

KIM,C.S.; YU,J.; LEE,W.J.; PARK,S.E.; CHI,C.S. Sensitive HPLC method for quantitation of paclitaxel in biological samples with application to preclinical pharmacokinetics and biodistribution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.39, p.170-176, 2005

KUMAR, M. N. V. R. Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 234-258, 2000.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.75, p. 1-18, 2010.

LAMPRECHT A.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, C.M. Visualization and quantification of polymer distribution in microcapsules by confocal laser scanning microscopy (CLSM). *International Journal of Pharmaceutics*, v.196, p.223-226, 2000.

LASSALE,V.; FERREIRA,M.L. PLA nano- and microparticle for drug delivery: An overview of the methods of preparation micromolecular. *Bioscience*, v.7, p.767-783, 2007.

LEE, A. L. Z.; WANG, Y.; CHENG, H. Y.; PERVAIZ, S.; YANG, Y. Y. The co-delivery of paclitaxel and Herceptin using cationic micellar nanoparticles. *Biomaterials*, v. 30, p. 919-927, 2009.

LEE,H.S.; SON,C.B.; SHIN,S.H.; KIM,Y.S. Clinical correlation between brain natriuretic peptide and anthracyclin-induced cardiac toxicity. *Cancer Research and Treatment*,v.40,p.121-126,2008

LEE, K.Y. & YUK, S. H. Polymeric protein delivery systems. *Progress in Polymer Science.*, v. 32, p. 669-697, 2007.

LINKOV, I., SATTERSTROM, F. K., COREY, L. M. Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* ,v.4, p.167-171, 2008.

LUO, F., LI, Z.,GUO,J., ZHANG, H., LI, X., MEI,X. A simple and rapid HPLC assay of paclitaxel in thermo- sensitive liposomes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.6, p.76-81, 2011.

MAKINO, K.; MOGI, T.; OHTAKE, N.; YOSHIDA, M.; ANDO, S.; NAKAJIMA, T.; OHSHIMA, H. Pulsatile drug release from poly (lactide-co-glycolide) microspheres: how does the composition of the polymer matrices affect the time interval between the initial burst and the pulsatile release of drugs? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 19, n.2, p. 173–179, 2000.

MAO, S.; SHI, Y.; LI, L.; XU, J.; SCHAPER, A.; KISSEL, T. Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres formed by solvent evaporation method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 68, n.2, p. 214–223, 2008.

MITTAL, A., KURAPATI, P., CHITKARA, D., KUMAR, N. In vitro release behavior of paclitaxel and carboplatin from poly (L- lactide) microspheres dispersed in thermosensitive biodegradable gel for combination therapy. *International Journal of Drug Delivery*, v.3, p. 245-259, 2011.

MOTTA,A.C.; DUEK,E.A.R. Síntese e Caracterização do Copolímero Poli(L-co-D-L Ácido Lactico). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.17, p.123-129, 2007.

MOTTA,A.C.; DUEK,E.A.R. Estudo inicial da Degradação in vitro de Poli(L-co-D-L Ácido Láctico) sintetizado em laboratório. *Matéria*, v.1, p.1-2, 2008.

MU, L.; FENG, S. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol(R)): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *Journal of Controlled Release*, v.86, n.1, p.33-48, 2003.

MU, L.; FENG, S.S. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol®). *Journal of Controlled Release*, v. 80, n.1-3, p. 129-144, 2002.

MUNDARGI, R.C.; BABU,V.R.; RANGASWAMY, V.; PATEL, P.; AMINABHAVI,T.M. Nano/ Micro Technologies for delivering macromolecular therapeutics using Poly (D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release*, v.124, p.193-209, 2008.

OSTROWSKI, A. D.; MARTIN, T.; CONTI, J.; HURT, I.; HARTHORN, B. H. Nanotoxicology: characterizing the scientific literature. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 11, p. 251-257, 2009.

PARK,J.H., YE. M., PARK, K. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. *Molecules*, v.10, p. 146-161, 2005

PEREIRA, M.A.; MOSQUEIRA, V.C.F.; VILELA, J.M.C.; ANDRADE, M.S.; RAMALDES, G.A.; CARDOSO, V.N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with ^{99m}Techetium –HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutical Science*, v.33, p. 42-51, 2008.

PEREZ, H. M.; ZINUTTI, C.; LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; ASTIER, A.; HOFFMAN, M.; BODMEIER, R.; MAINCENT, P. The preparation and evaluation of poly(epsilon-caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *Journal of Controlled Release*, v. 65, p. 429-438, 2000.

PICOS, R. D.; CARRIL, G. M., MENA, F.D. Métodos de Obención de Microesferas Biodegradables. *Revista Cubana de Farmacia*, v. 35, p. 126-35, 2001.

RAJENDER, G.; NARAYANAN, N.G.B. Sensitive and validated HPLC method for determination of paclitaxel in human serum. *Journal of Science and Technology*, v.2, p.501-510, 2009.

RAWAT,M., SINGH,D., SARAF,S. Nanocarriers: Promising vehicles for bioactive drugs. *Biol. Pharm. Bull*, v.29, p. 1970-1978, 2006.

ROULLIN, V. G., DEVERRE, J. R., LAURENT, L., HINDRÉ F., VENIER-JULIENNE, M.C., VIENET, R., BENOIT, J. P. Anti-cancer drug diffusion within living rat brain tissue: an experimental study using [³H] (6)-5-fluorouracil-loaded PLGA microspheres. *Europen Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.53, p.293-299, 2002.

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

SCHWENDEMAN, S.P., COSTANTINO, H.R., GUPTA, R.K., LANGER, R. Progress and challenges for peptide, protein, and vaccine delivery from implantable polymeric systems In: Park, K. (Ed.), *Controlled Drug Delivery: Challenges and Strategies*. The American Chemical Society, Washington, DC, p. 229–267, 1997.

SING, R.; LILLARD,J.W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, v.86, p.215-223, 2009

SINGLA, A.K.; GARG,G., AGGARWAL,D. Paclitaxel and its formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 235, p. 179-192, 2002

SINHA, V. R.; TREHAN, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *Journal of Controlled Release*, v.90, p. 261-280, 2003.

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

SWATI, A; GOEL, A; SINGLA, S. Drug delivery special emphasis given on biodegradable polymers. *Advances in polymer science and technology: An International Journal*, v.2, p-1-15, 2012.

TEIXEIRA, M.; ALONSO, M. J.; PINTO, M. M. M.; BARBOSA, C. M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.59, p. 491-500, 2005.

THOTE, A.J.; CHAPPELL, J.T.; KUMAR, R.; GUPTA, R.B. Reduction in the initial burst release by surface crosslinking of PLGA microparticles containing hydrophilic or hydrophobic drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 31, p. 43–57, 2005.

TZAFRIRI, A.R.; LERNER, E.I.; FLASHNER-NARAK, M.; HINCHCLIFFE, M.; RATNER, E.; PARNAS, H. Mathematical modeling and optimization of drug delivery from intratumorally injected microspheres. *Clinical Cancer Research*, v.11, n.2, p. 826–834, 2005.

VIPPAGUNTA S.R.; WANG Z.; HORNUNG S.; KRILL S.L. Factors affecting the formation of eutectic solid dispersions and their dissolution behavior. *Journal of Pharmaceutics Sciences*, v.96, p. 294-304, 2006.

WANG, Y. M.; SATO, H.; HORIKOSHI, I. In vitro in vivo evaluation of taxol release from poly(lactic-co-glucolic acid) microspheres containing isopropyl myristate and degradation of the microspheres. *Journal of Controlled Release*, v.49, p.157-166, 1997.

WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 364, n.2, p. 298-327, 2008.

YANG,R.; HAN,X.; SHI,K.;CHENG,G.; SHIN,C.K.; CUI,F. Cationic formulation of paclitaxel poly D,L-lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles using an emulsion-solvent diffusion method. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 2, p.89-95, 2009.

YANG, Y.; WAN, J.; CHUNG, T.; PALLATHADKA, P. K.; STEVE, N.; HELLER, J. POE-PEG-POE triblock copolymeric microspheres containing protein I. Preparation and characterization. *Journal of Controlled Release*, v.75, p.115-128, 2001.

YANG, Y-Y.; CHUNG, T-S; BAI, X-L; CHAN, W-K Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *Chemical Engineering Science*. v.55, p. 2223-2236, 2000.

YOUAN, B. B. C.; JACKSON, T. L.; DICKENS, L.; HERMANDEZ, C.; OWUSUABABIO,G. Protein release profiles and morphology of biodegradable microcapsulescontaining an oily core. *Journal of Controlled Release*, v.76, p.313-326, 2001.

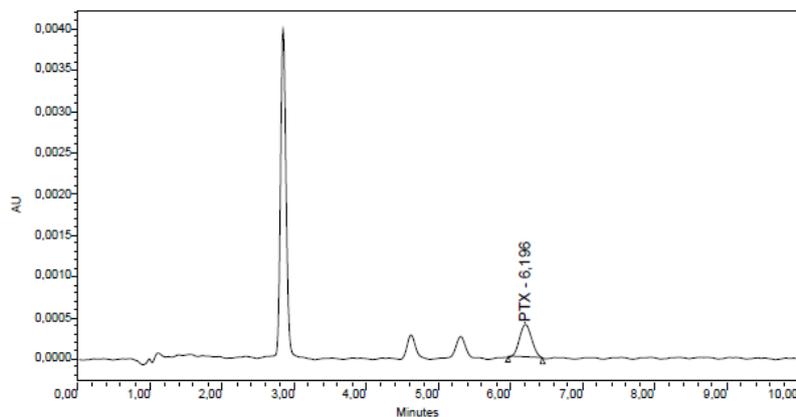
YUN, Y.H.; GOETZ, D.J.; YELLEN, P.; CHEN, W. Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific tarfeting. *Biomaterials*, v.25,p.147-157,2004.

ZHANG, Y.; ZHUO, R. Synthesis and in vitro drug release behaviour of amphiphilic triblock copolymer nanoparticles based on poly (ethylene glycol) and polycaprolactone. *Biomaterials.*, v.26, p. 6736-6742, 2005.

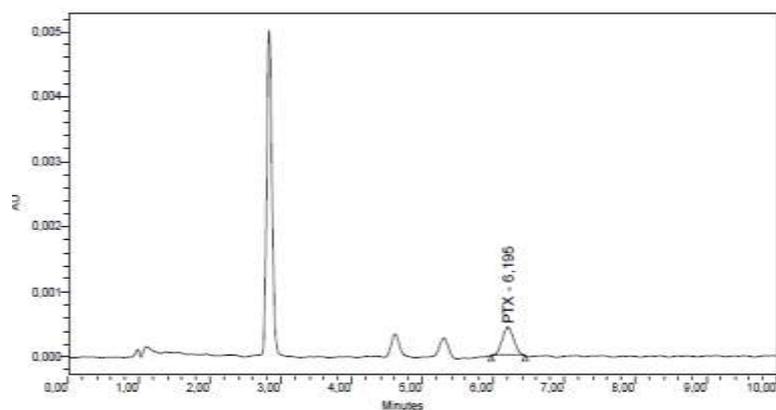
ZHOU, S.; LIAO, X.; LI, X.; DENG, X.; LI, H. Poly-DL-lactide-co-poly(ethylene glycol) microspheres as potential vaccine delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 2002. ***In Press.***

ANEXOS

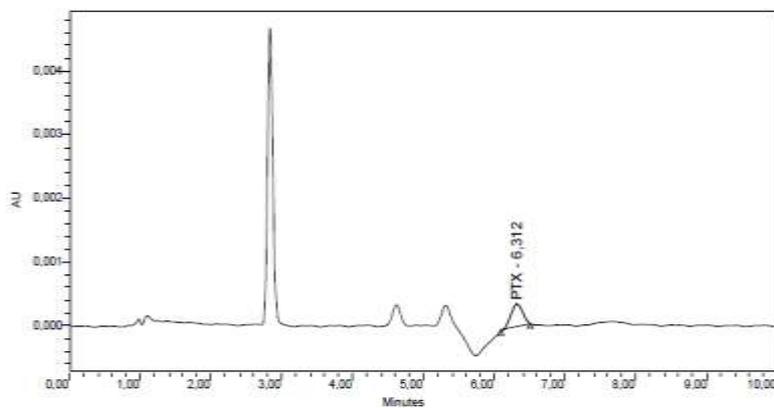
ANEXO 1 – Triplicata da análise de HPLC do sobrenadante para determinação da eficiência de encapsulação do fármaco paclitaxel nas microesferas de PLDLA



Peak Name	RT (min)	Area (V*sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,196	4785	100,00	403	100,00	2,514	ug/mL

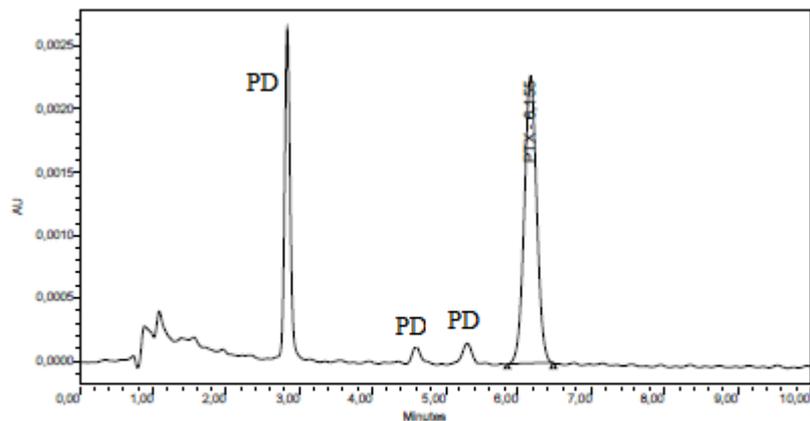


Peak Name	RT (min)	Area (V*sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,195	5121	100,00	433	100,00	2,794	ug/mL

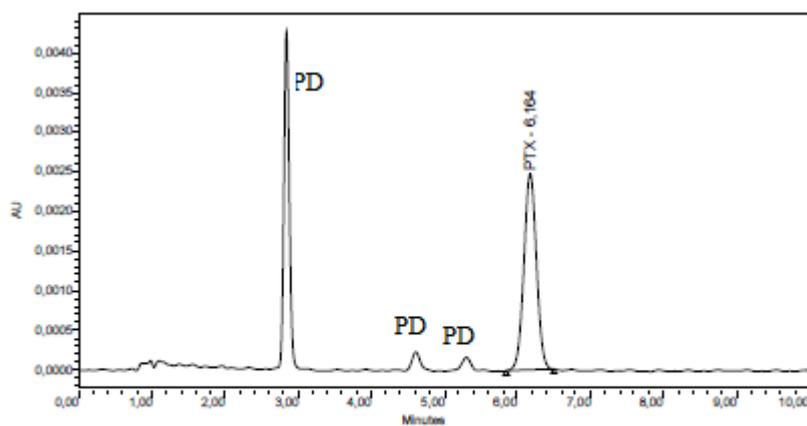


Peak Name	RT (min)	Area (V*sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,312	4380	100,00	363	100,00	2,178	ug/mL

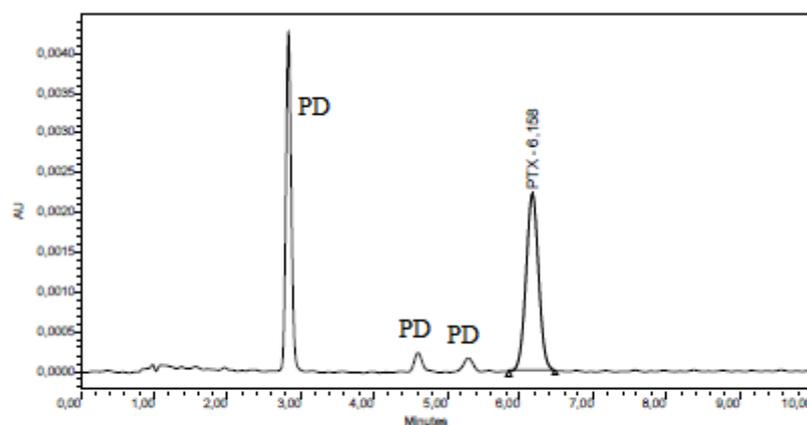
ANEXO 2 – Triplicata da análise de HPLC do sobrenadante após 1 dia de degradação das microesferas de PLDLA e liberação do fármaco paclitaxel.



Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,155	27006	100,00	2285	100,00	20,998	ug/mL

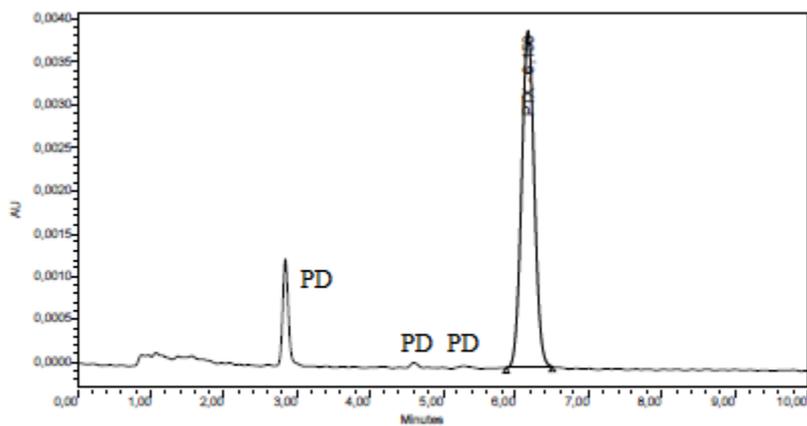


Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,164	29743	100,00	2483	100,00	23,273	ug/mL

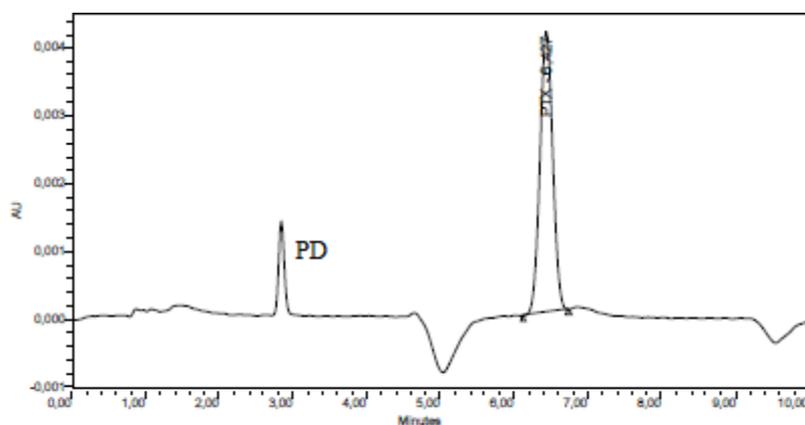


Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,158	26773	100,00	2231	100,00	20,803	ug/mL

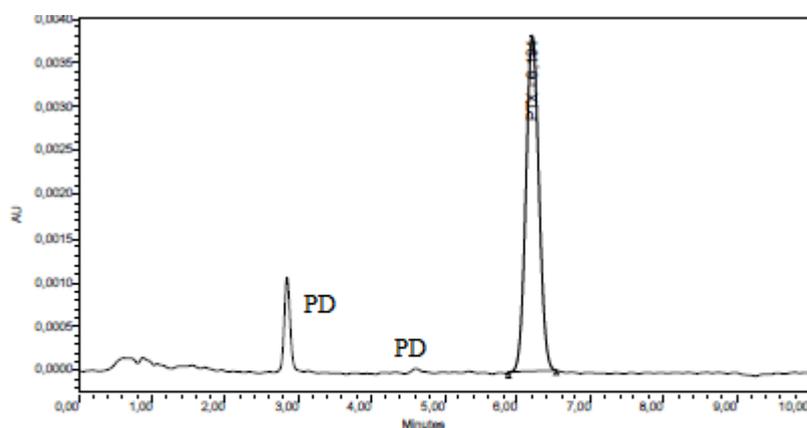
ANEXO 3 – Triplicata da análise de HPLC do sobrenadante após 2 dias de degradação das microesferas de PLDLA e liberação do fármaco paclitaxel.



Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,156	47293	100,00	3920	100,00	37,870	ug/mL

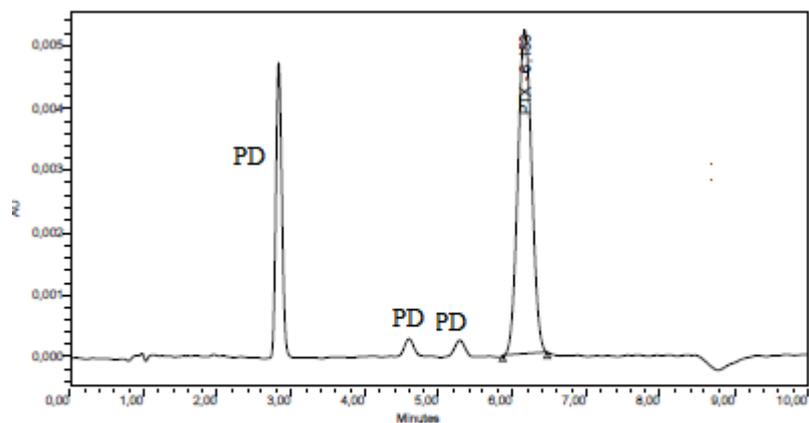


Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,427	49989	100,00	4140	100,00	40,112	ug/mL

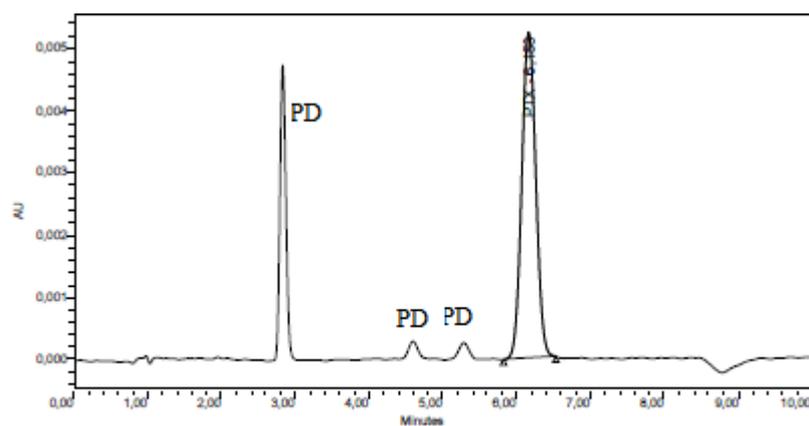


Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,194	47303	100,00	3818	100,00	37,878	ug/mL

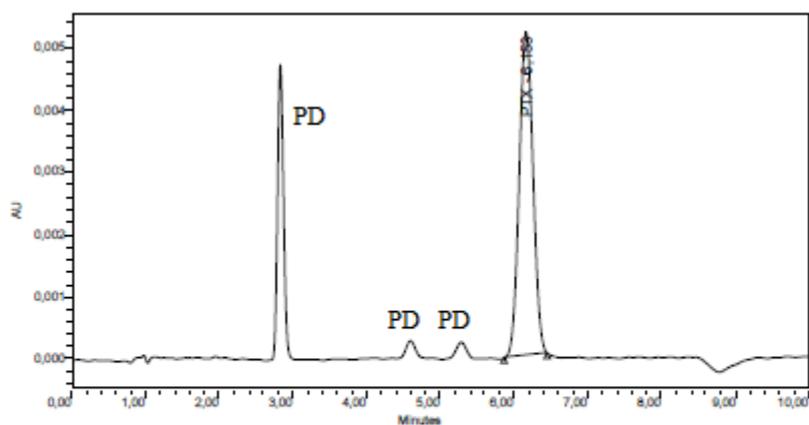
ANEXO 4 – Triplicata da análise de HPLC do sobrenadante após 3 dias de degradação das microesferas de PLDLA e liberação do fármaco paclitaxel.



Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,153	68071	100,00	5212	100,00	55,151	ug/mL

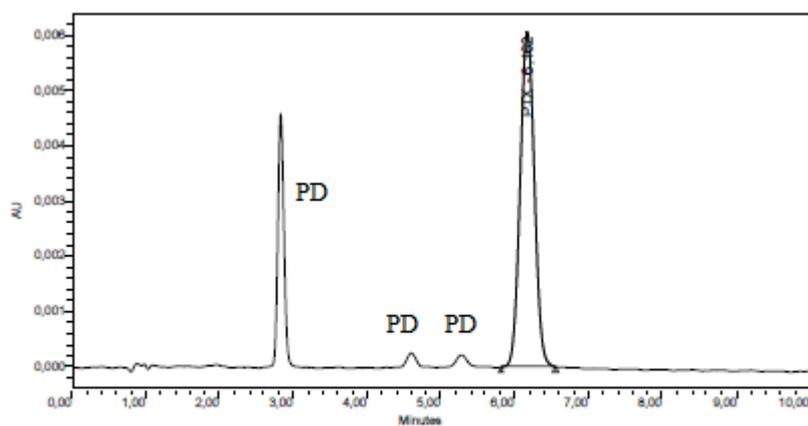


Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,153	69083	100,00	5237	100,00	55,993	ug/mL

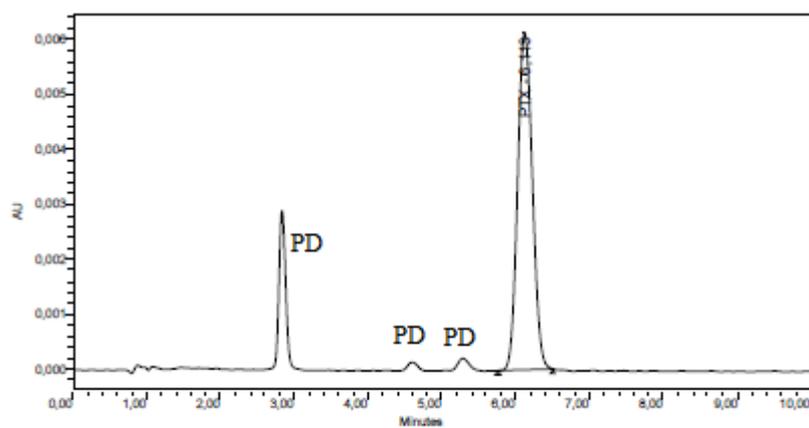


Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,153	67699	100,00	5202	100,00	54,843	ug/mL

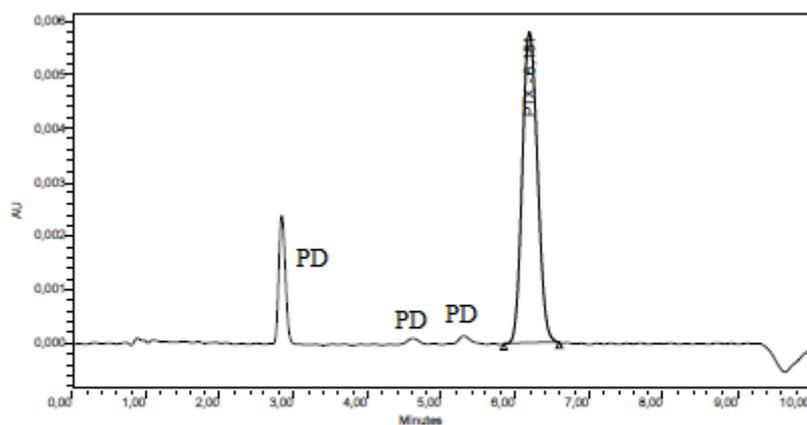
ANEXO 5 – Triplicata da análise de HPLC do sobrenadante após 5 dias de degradação das microesferas de PLDLA e liberação do fármaco paclitaxel.



Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,162	81131	100,00	6052	100,00	66,014	ug/mL

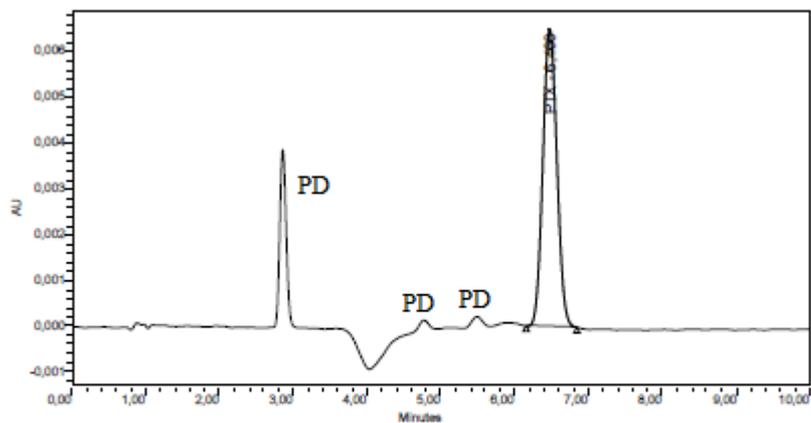


Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,113	85146	100,00	6135	100,00	69,354	ug/mL

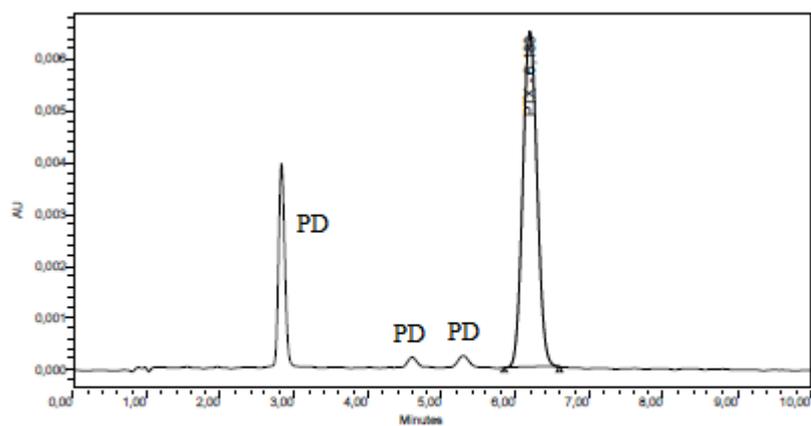


Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,181	82955	100,00	5808	100,00	67,531	ug/mL

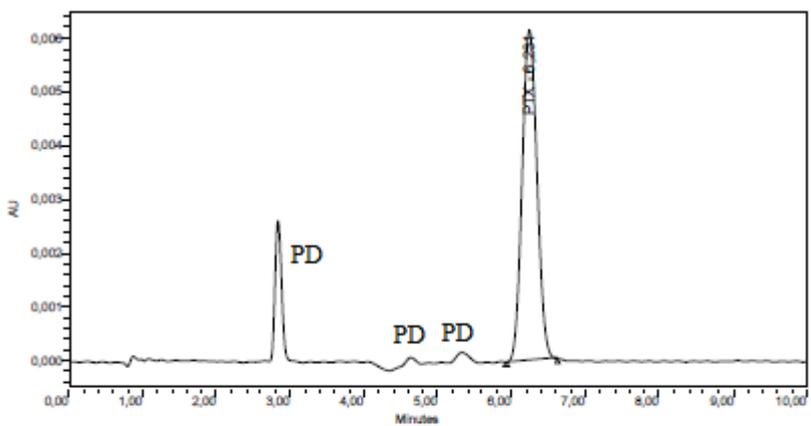
ANEXO 6 – Triplicata da análise de HPLC do sobrenadante após 10 dias de degradação das microesferas de PLDLA e liberação do fármaco paclitaxel.



Peak Name	RT (min)	Area (V*sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,465	86121	100,00	6521	100,00	70,164	ug/mL

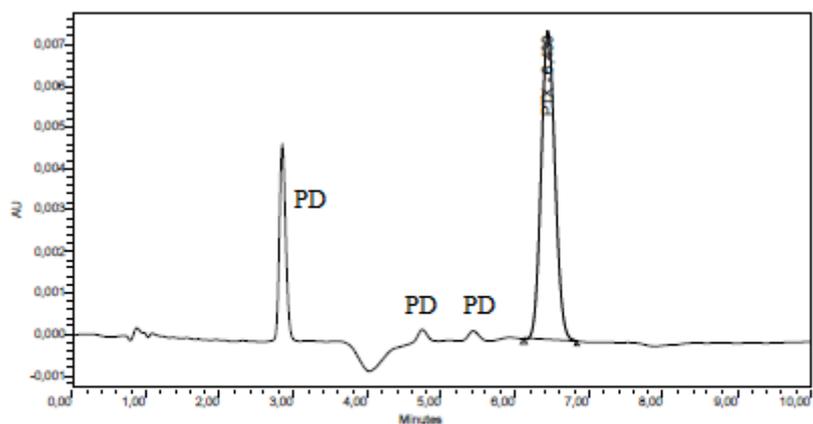


Peak Name	RT (min)	Area (V*sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,183	87508	100,00	6499	100,00	71,318	ug/mL

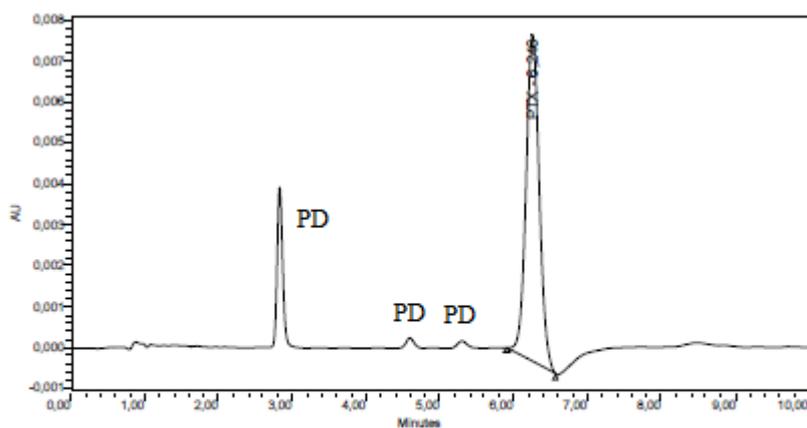


Peak Name	RT (min)	Area (V*sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,231	86145	100,00	6147	100,00	70,185	ug/mL

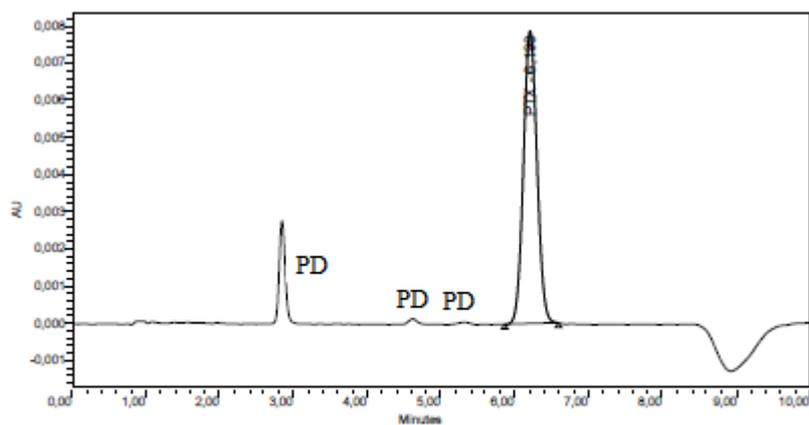
ANEXO 7 – Triplicata da análise de HPLC do sobrenadante após 15 dias de degradação das microesferas de PLDLA e liberação do fármaco paclitaxel.



Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,430	97005	100,00	7443	100,00	79,217	ug/mL

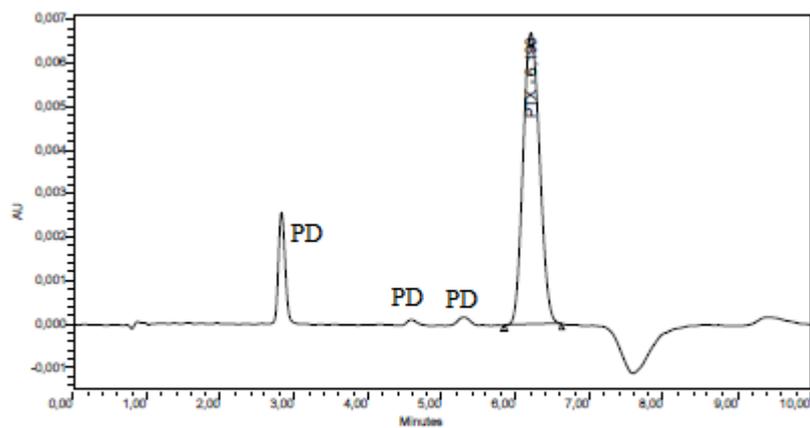


Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,246	99163	100,00	7967	100,00	81,012	ug/mL

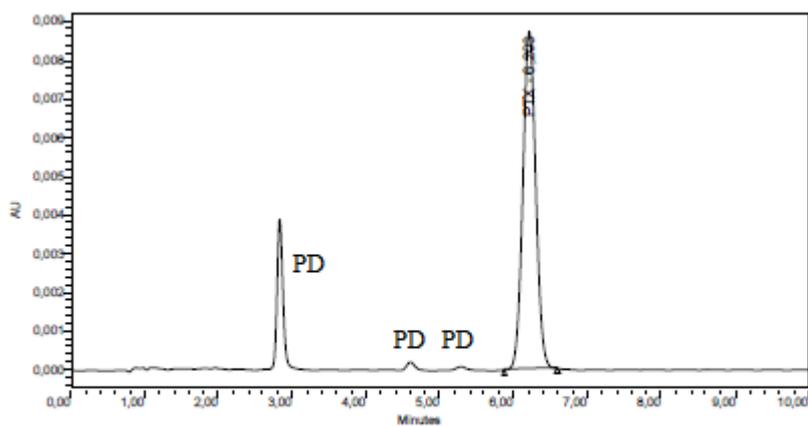


Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,198	100631	100,00	7876	100,00	82,233	ug/mL

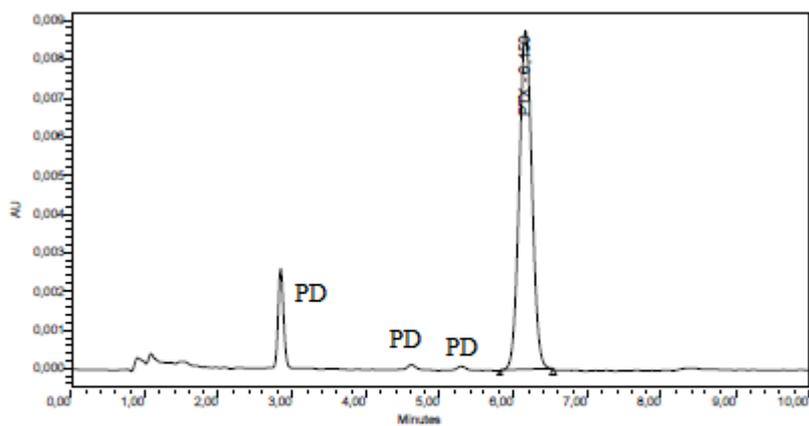
ANEXO 8 – Triplicata da análise de HPLC do sobrenadante após 20 dias de degradação das microesferas de PLDLA e liberação do fármaco paclitaxel.



Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,196	104807	100,00	6691	100,00	85,706	ug/mL

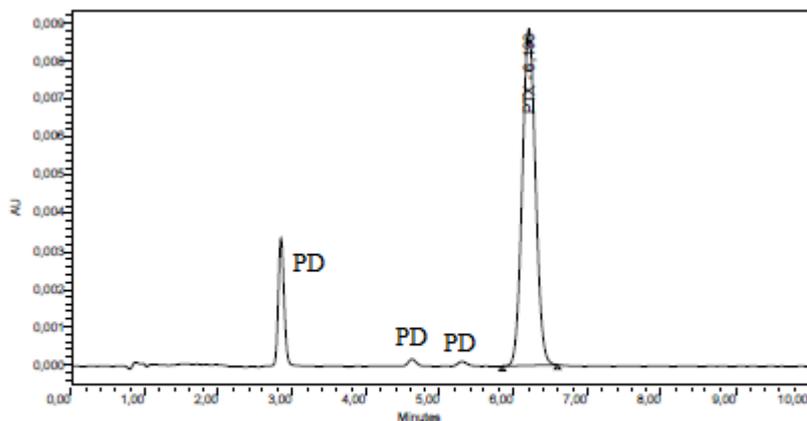


Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,203	106014	100,00	8728	100,00	86,710	ug/mL

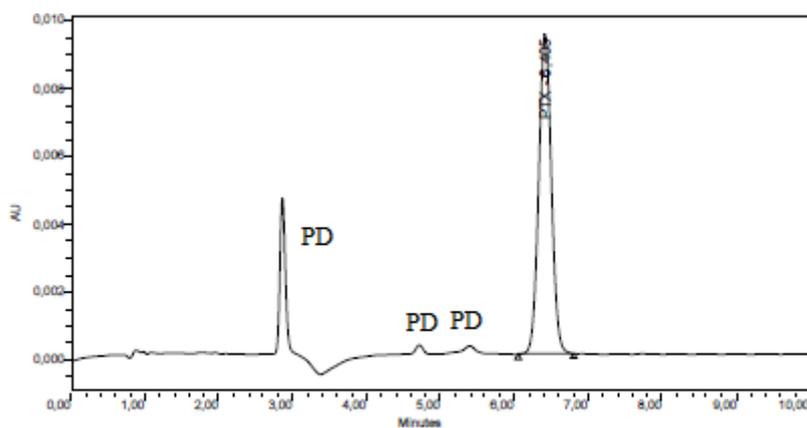


Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,150	106052	100,00	8752	100,00	86,742	ug/mL

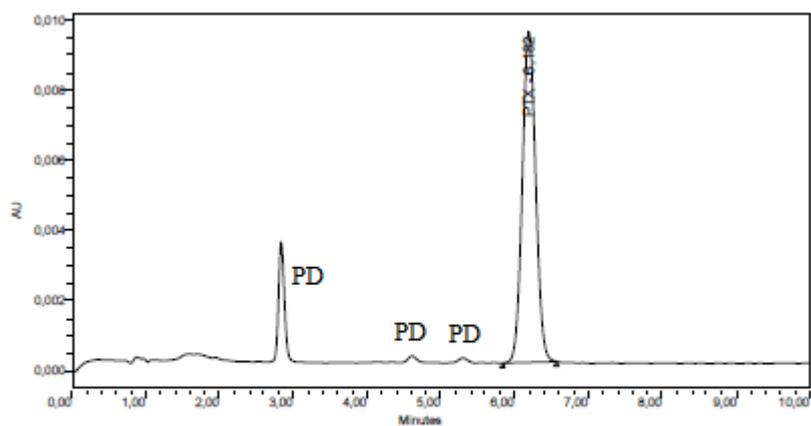
ANEXO 9 – Triplicata da análise de HPLC do sobrenadante após 25 dias de degradação das microesferas de PLDLA e liberação do fármaco paclitaxel.



Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,196	111033	100,00	8862	100,00	90,684	ug/mL

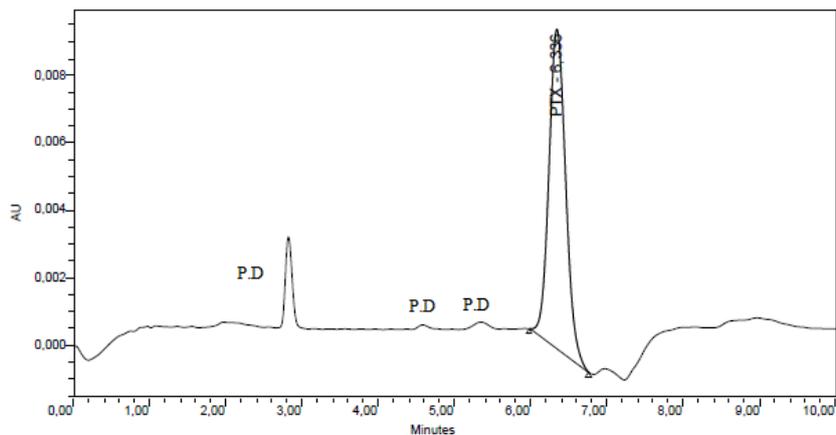


Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,405	111931	100,00	9424	100,00	91,631	ug/mL

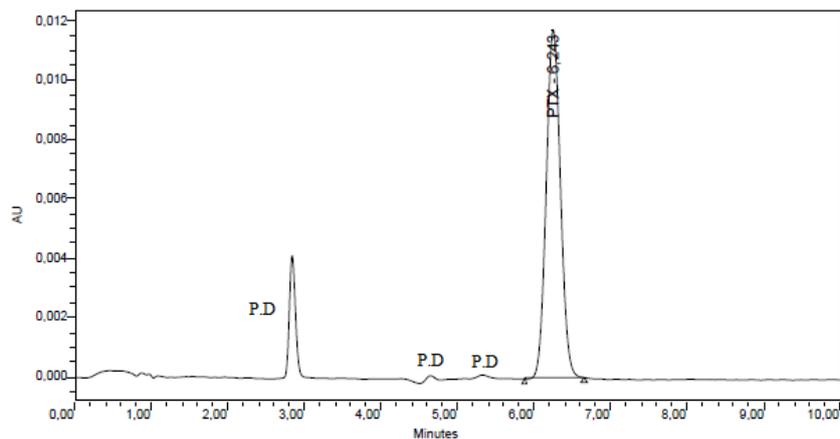


Peak Name	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,182	118835	100,00	9418	100,00	97,374	ug/mL

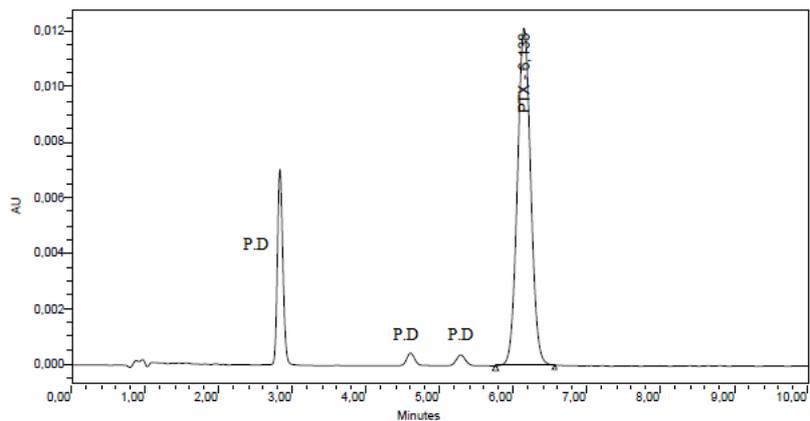
ANEXO 10 – Triplicata da análise de HPLC do sobrenadante após 30 dias de degradação das microesferas de PLDLA e liberação do fármaco paclitaxel.



Peak Name	RT (min)	Area (V*sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,336	143953	100,00	9463	100,00	118,265	ug/mL



Peak Name	RT (min)	Area (V*sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,243	151896	100,00	11738	100,00	124,872	ug/mL



Peak Name	RT (min)	Area (V*sec)	% Area	Height (V)	% Height	Amount	Units
1 PTX	6,138	153306	100,00	12161	100,00	126,044	ug/mL