

ANA CRISTINA DE MATTOS

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE NANOPARTÍCULAS DE PLA E PLA-PEG
CONTENDO 5-FLUOROURACIL, AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SOBRE
CÉLULAS TUMORAIS E FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA**

**GUARAPUAVA
2013**

ANA CRISTINA DE MATTOS

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE NANOPARTÍCULAS DE PLA E PLA-PEG
CONTENDO 5-FLUOROURACIL, AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SOBRE
CÉLULAS TUMORAIS E FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Concentração fármacos, medicamentos e biociências aplicadas á farmácia, da UNICENTRO- PR.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rubiana Mara Mainardes.

Co-orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Kalil

**GUARAPUAVA
2013**

Mattos, Ana Cristina de
M444d Desenvolvimento tecnológico de nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo 5-fluorouracil, avaliação da citotoxicidade sobre células tumorais e farmacocinética pré-clínica / Ana Cristina de Mattos. -- Guarapuava, 2013
xiii, 110 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, 2013

Orientadora: Rubiana Mara Mainardes

Co-orientador: Najeh Maissar Kalil

Banca examinadora: Ruy Beck, Marcelo Farina

Bibliografia

1. Farmácia. 2. Sistemas de liberação de fármacos. 3. Nanopartículas poliméricas. 4. 5-FU. 5. PLA. 6. PEG. 7. Delineamento fatorial. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

EPÍGRAFE

*“De tudo ficam três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus pela vida, por ter me conduzido neste caminho de sabedoria tão desafiador, e pelas condições indispensáveis que me ofereceu para que tudo fosse concretizado.

Aos meus pais, pelo amor, compreensão e por todos os valiosos ensinamentos que me foram passados, por toda a base e força para enfrentar os desafios da vida e sair vitoriosa.

A minha prima Ana Paula, pela amizade e paciência diária ao longo da graduação e mestrado.

Ao Vagner, meu porto seguro e grande amor da minha vida, pela atenção e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Rubiana Mara Mainardes pela oportunidade concebida desde a graduação até o mestrado, pela confiança, estímulo e orientação constante, durante todos estes anos de convívio e pelos conhecimentos adquiridos.

Ao Dr^º. Najeh Maissar Khalil pela co-orientação, por ter confiado em minha capacidade de trabalho e por me proporcionar muitas oportunidades que contribuíram para a minha vida profissional.

Aos amigos do Laboratório de Nanotecnologia da UNICENTRO, Diani, Luciana Dalmolin, Luciana Camargo, Thaísa, Daniel, Loreângela, Clescila, Leiziane, Débora, Juliana pela amizade e apoio. Obrigada pelas contribuições de cada um tanto para a minha dissertação quanto para a minha vida. E à todos os outros colegas a quem não me referi, mas que sempre estiveram presentes com um sorriso e uma palavra amiga.

À minha grande amiga Talita, por toda disposição que teve para me ajudar nos ensaios, pela grande amizade que nasceu entre nós, pelas longas e valiosas conversas que sempre tivemos e pelas risadas que demos ao longo dessa jornada.

Ao Programa e ao corpo docente de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de melhorar minha qualificação profissional.

À CAPES pela bolsa concebida.

À todos que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse realizado, deixo os meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Abreviaturas	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	v
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Câncer.....	3
3. 2.2. O 5-Fluorouracil.....	5
4. 2.3. Sistemas nanoestruturados carreadores de fármacos	9
2.4. Obtenção de sistemas nanoestruturados.....	12
5. Objetivos	21
6. 3.1. Objetivos gerais	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
7. Materiais.....	22
4.1. Substâncias e Reagentes	22
4.2. Equipamentos e acessórios	23
5. Metodologia	25
5.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para determinação de 5-FU em nanopartículas	25
5.1.1. Preparação das soluções padrão e amostra 25	5.1.2. Condições cromatográficas
.....	26
5.2. Parâmetros de validação	27
5.2.1. Linearidade	27
5.2.2. Precisão instrumental	27
5.2.3. Precisão	28
5.2.4. Exatidão	28
5.2.5. Especificidade	29
5.2.6. Limites de detecção e quantificação	30
5.2.7. Robustez	30
5.3. Obtenção de nanopartículas contendo 5-FU	31
5.4. Caracterização físico-química das nanopartículas	35
5.4.1. Determinação da eficiência de encapsulação	35
5.4.2. Determinação do diâmetro médio, distribuição do tamanho e índice de polidispersão das nanopartículas	35
5.5. Espectroscopia na região do infravermelho	36

5.6. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do 5-FU a partir das nanopartículas de PLA e PLA-PEG.....	36
5.7. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas contendo 5-FU sobre linhagem tumoral	38
5.8. Ensaio de farmacocinética pré-clínica	40
5.8.1. Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação de 5-FU em plasma de rato	40
5.8.1.1. Preparação das soluções padrão de 5-FU e do controle de qualidade	40
5.8.2. Condições cromatográficas	41
5.8.3. Validação do método bioanalítico	41
5.8.4. Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos após administração oral de dose única em ratos	43
5.8.4.1. Análise dos dados e estatística	44
6. Resultados e Discussão	45
6.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para determinação de 5-FU em nanopartículas	45
6.1.1. Condições cromatográficas	45
6.2. Parâmetros de validação	49
6.2.1. Especificidade	54
6.2.2. Linearidade	54
6.2.3. Exatidão	56
6.2.4. Precisão	56
6.2.5. Precisão instrumental.....	57
6.2.6. Limites de detecção e quantificação	58
6.2.7. Faixa de trabalho	59
6.2.8. Robustez	59
6.3. Obtenção de nanopartículas contendo 5-FU	60
6.4. Caracterização físico-química das nanopartículas	61
6.4.1. Determinação da eficiência de encapsulação	61
6.4.2. Determinação do diâmetro médio, distribuição do tamanho e índice de polidispersão das nanopartículas	62
6.5. Planejamento fatorial	64
6.6. Espectroscopia na região do infravermelho	76
6.7. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do 5-FU a partir das nanopartículas de PLA e PLA-PEG.....	78

6.8. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas contendo 5-FU sobre linhagem tumoral	83
6.9. Ensaio de farmacocinética pré-clínica	86
6.9.1. Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação de 5-FU em plasma de rato	86
6.9.1.1. Condições cromatográficas	86
6.9.1.2. Validação do método bioanalítico	88
6.9.2. Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos após administração oral de dose única em ratos	92
7. Conclusões	97
8. Referências bibliográficas	99
9. Anexo	111

RESUMO

O trabalho consistiu na preparação, caracterização e avaliação de sistemas de liberação sustentada veiculando 5-Fluorouracil (5-FU), um agente antineoplásico. O 5-FU foi encapsulado em nanopartículas poliméricas preparadas a partir dos polímeros ácido polilático (PLA) e polietilenoglicol (PEG) pela técnica da dupla emulsão-*evaporação do solvente*, e um delineamento fatorial foi aplicado a fim de se obter formulações otimizadas. Essas nanopartículas foram caracterizadas quanto à eficiência de encapsulação, diâmetro médio e distribuição de tamanho e perfil de liberação *in vitro* e avaliadas quanto a citotoxicidade sobre linhagens tumorais e farmacocinética pré-clínica. As formulações de PLA (formulação 1) e de PLA-PEG (formulação 3) foram escolhidas para os ensaios subsequentes devido apresentarem os melhores resultados de eficiência de encapsulação e menor diâmetro médio. O ensaio de liberação *in vitro* realizado empregando a técnica de difusão em célula de Franz demonstrou que após 320 h de ensaio, cerca de 55 e 52% do 5-FU foi liberado das nanopartículas de PLA e PLA-PEG, respectivamente. A cinética de liberação do 5-FU a partir das nanopartículas foi de primeira ordem, e o mecanismo de liberação calculado pelo modelo Korsmeyer-Peppas foi difusão e a erosão. Na avaliação da citotoxicidade sobre células tumorais HEP-2 verificou-se que as nanopartículas de PLA bem como as de PLA-PEG obtiveram a mesma eficácia que o 5-FU livre, uma vez que não houve diferença estatística significativa em relação aos valores de IC_{50} . Os parâmetros farmacocinéticos do 5-FU foram melhorados pela nanoencapsulação. A biodisponibilidade, C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$ e volume de distribuição foram significativamente aumentados, enquanto o clearance foram diminuídos. O PEG não influenciou nos parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados. O conjunto dos resultados demonstrou que as nanopartículas de PLA e

blendas de PLA-PEG são potenciais sistemas de liberação de fármacos no tratamento de tumores sólidos.

Palavras-chave: sistemas de liberação de fármacos, nanopartículas poliméricas, 5-FU, PLA, PEG e delineamento fatorial.

ABSTRACT

The work involved the preparation, characterization and evaluation of conveying systems for sustained release 5-fluorouracil (5-FU), an antineoplastic agent. 5-FU was encapsulated in polymeric nanoparticles prepared from polymers of polylactic acid (PLA) and polyethylene glycol (PEG) by the technique of double emulsion-solvent evaporation and a factorial design was applied in order to obtain optimal formulations. These nanoparticles were characterized for encapsulation efficiency, mean diameter and size distribution, and in vitro release profile and evaluation of its cytotoxicity on tumor cell lines and preclinical pharmacokinetics. The PLA formulations (formulation 1) and PLA-PEG (formulation 3) were selected for subsequent tests because present the best efficiency results encapsulation and smaller mean diameter. The in vitro release assay performed employing the technique of Franz diffusion cell demonstrated that after 320 h of test, about 55 to 52% of 5-FU was released from the nanoparticle PLA and PLA-PEG, respectively. The release kinetics of 5-FU from nanoparticles was first order, and the release mechanism calculated by Korsmeyer-Peppas model was diffusion and erosion. In the assessment of cytotoxicity on tumor cells HEP-2 was found that PLA nanoparticles had a lower IC_{50} than the free drug, since there wasn't statistically significant difference from the values of IC_{50} . Pharmacokinetics parameters of 5-FU were improved by nanoencapsulation. The bioavailability and C_{max} , T_{max} , $T_{1/2}$ and distribution volume were significantly increased, while the clearance were decreased. The presence of PEG in nanoparticles didn't influence the physicochemical and biological parameters evaluated. The overall results demonstrated that PLA and PLA-PEG nanoparticles can be used as potential drug delivery systems for the treatment of solid tumors.

Keywords: drug delivery systems, polymeric nanoparticles, 5-FU, PLA, PEG and factorial design.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracil
ANOVA	Análise de Variância
A/O/A	Água em Óleo em Água
CV%	Coefficiente de Variação (em porcentagem)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dUMP	Monofosfato de Desoxiuridina
dTMP	Timidina Monofosfato
dTTP	2'-deoxitimidina-5'-trifosfato
dUTP	2'-deoxiuridina-5'-trifosfato
DPR	Desvio-padrão Relativo
EPR	Efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentadas
EE%	Eficiência de Encapsulação (em porcentagem)
FUTP	Fluorouracil Trifosfato
FdUTP	Fluorodeoxiuridina Trifosfato
FdUMP	5-Fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato
HCl	Ácido Clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MTF	5,10-metilenotetraidrofolato
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazólio
NaOH	Hidróxido de Sódio
O/A	Óleo em Água
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLA	Poli (ácido Lático)
PBS	Fosfato de Sódio
PEG	Polietileno glicol
PEO	Óxido de Polietileno
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
PLGA-mPEG	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico-co-metoxi Polietilenoglicol)
PVA	Poli (álcool vinílico)

RNA	Ácido Ribonucléico
SMF	Sistema Mononuclear Fagocitário
SFB	Soro Fetal Bovino
TS	Timidilato Sintetase

LISTA DE FIGURAS

8. Estrutura química do 5-FU.....	5
9. Representação esquemática do mecanismo de ação do 5-FU na síntese e reparo do DNA	8
10. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas	12
11. Representação esquemática do método de elaboração de nanopartículas pelo método da dupla emulsão-evaporação do solvente.....	15
12. Cromatograma do 5-FU 1,0 µg/mL em água	46
13. Cromatograma do 5-FU 1,0 µg/mL em água:acetonitrila (90:10, v/v) (254 e 265 nm). 47	
14. Cromatograma do 5-FU 1,0 µg/mL em água:acetonitrila (90:10, v/v).....	48
15. Cromatograma da amostra de PVA 1% em água:acetonitrila (90:10, v/v)	49
16. Cromatograma da amostra do 5-FU 1,0 µg/mL em água:acetonitrila (90:10, v/v).....	50
17. Cromatograma do 5-FU 1,0 µg/mL tratado com NaOH 1M em água:acetonitrila (90:10, v/v)	52
18. Cromatograma do 5-FU 1,0 µg/mL após 24 horas de congelamento em água:acetonitrila (90:10, v/v).....	52
19. Cromatograma do 5-FU 1,0 µg/mL tratado com H ₂ O ₂ em água:acetonitrila (90:10, v/v).....	53
20. Cromatograma do 5-FU 0,1 µg/mL tratado com HCl em água:acetonitrila (90:10, v/v)53	
21. Cromatograma do 5-FU 0,1 µg/mL após 24 horas de exposição à luz em água:acetonitrila (90:10, v/v)	54
22. Curva analítica do 5-FU em água.....	55
23. Curva analítica do 5-FU em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4.....	55
24. Curva analítica para os limites de detecção e quantificação de 5-FU em água.....	58
25. Superfície de resposta das variáveis tensoativos da fase aquosa externa e variação na concentração de PVA na fase aquosa interna das nanopartículas de PLA.....	67
26. Superfície de resposta em função das variáveis independentes para as nanopartículas de PLA-PEG	70
27. Espectros das amostras de infravermelho	77
28. Perfil de liberação do 5-FU a partir das nanopartículas de PLA em tampão fosfato pH 7,4, contendo PVA 1% (p/v).....	79
29. Perfil de liberação do 5-FU a partir das nanopartículas de PLA-PEG em tampão fosfato pH 7,4, contendo PVA 1% (p/v)	80
30. Atividade citotóxica do 5-FU livre, nanopartículas brancas de PLA-PEG e de nanopartículas de PLA e PLA-PEG, contendo 5-FU sobre linhagem tumoral Hep-2, após 72 h de incubação	84
31. Cromatograma da solução padrão de 5-FU e timina a 1000 ng/mL em água (fase móvel: água ultrapura em 265 nm)	87

32. Cromatograma da solução padrão de 5-FU e timina a 1000 ng/mL em água (fase móvel: água:metanol (95:5, v/v em 265 nm)	87
33. Curva analítica do 5-FU em água (fase móvel: água 95%: metanol 5% em 265 nm) ...	88
34. Cromatograma da solução padrão de 5-FU e timina a 2000 ng/mL em água (fase móvel: água: metanol em 265 nm)	89
35. Cromatograma da amostra plasma puro	89
36. Curva da concentração plasmática de 5-FU em função do tempo a partir das diferentes formulações de 5-FU	93

LISTA DE TABELAS

1. Variáveis independentes avaliadas no planejamento experimental	32
2. Delineamento fatorial 2^4 empregado para avaliar a influência dos fatores da formulação	33
3. Formulações de nanopartículas contendo 5-FU utilizando delineamento fatorial	34
4. Ordem/modelo de cinética de liberação usados para avaliar o perfil de liberação do 5-FU a partir das nanopartículas de PLA e PLA-PEG.....	37
5. Condições cromatográficas utilizadas na quantificação do 5-FU	46
6. Resultados para amostras de 5-FU sob condições de estresse	51
7. Resultados da exatidão dos padrões de 5-FU.....	56
8. Precisões intra e inter-corridas	57
9. Resultado da precisão instrumental para a concentração padrão de 5-FU	58
10. Resultados de robustez para as diferentes concentrações de 5-FU	59
11. Valores das eficiências de encapsulação de 5-FU nas nanopartículas de PLA e PLA-PEG	61
12. Valores do diâmetro médio, índice de polidispersão e distribuição do tamanho	63
13. Análise de variância realizada para o delineamento fatorial 2^4 sobre o teor de 5-FU nas nanopartículas	64
14. Análise de variância realizada para o delineamento fatorial 2^4 sobre o tamanho das nanopartículas de 5-FU	65
15. Análise de variância realizada para observar a influência das variáveis sobre os valores de teor de 5-FU nas nanopartículas de PLA	66
16. Análise de variância realizada para observar a influência das variáveis sobre os valores de teor de 5-FU nas nanopartículas de PLA-PEG	68
17. Diferenças absolutas entre as médias das eficiências de encapsulação das formulações de PLA.....	72
18. Diferenças absolutas entre as médias das eficiências de encapsulação das formulações de PLA-PEG	72
19. Diferenças absolutas entre as médias dos tamanhos de partículas das formulações de PLA	73
20. Diferenças absolutas entre as médias dos tamanhos de partículas das formulações de PLA-PEG	74
21. Valores das constantes de liberação para as nanopartículas de PLA e PLA-PEG	81
22. Valores dos IC_{50} das nanopartículas utilizadas no ensaio de citotoxicidade	85
23. Resultados da exatidão para os padrões de 5-FU em plasma	90
24. Precisões intra-corrída e inter-corrída do 5-FU em plasma.....	90
25. Estabilidade de curta e longa duração em amostras de 5-FU em plasma	91

26. Parâmetros farmacocinéticos do 5-FU, após administração oral de dose única de solução aquosa de 5-FU, nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo 5-FU em ratos	94
--	----

1. INTRODUÇÃO

O 5-fluorouracil (5-FU) é um agente antineoplásico utilizado no tratamento de tumores sólidos. Suas principais vias de administração são a intravenosa, intracavitária, endovenosa e via tópica (SKEEL & LACHANT, 1995) Sua administração endovenosa causa diversas e importantes reações adversas, incluindo toxicidade cardíaca, anorexia, alterações das mucosas do trato gastrointestinal, que podem até mesmo levar à diarreia fulminante, choque e morte, com isso sua utilização pela via oral é mais segura.

Após a administração oral, a biodisponibilidade do 5-FU é bastante variável devida a inconsistente absorção no trato gastrointestinal e pelo metabolismo de primeira passagem através do fígado. Seu tempo de meia-vida é extremamente curto (6-20 min), devido ao intenso metabolismo pré-sistêmico, por isso são necessárias altas e frequentes doses para manter concentrações plasmáticas adequadas (entre 0,1 a 1,0 mM). A toxicidade não-seletiva então surge em decorrência da sua penetração em tecidos e órgãos saudáveis (COUVREUR *et al.*, 2002), ocasionando efeitos colaterais que podem ser tão intensos que promovem a descontinuidade do tratamento pelo paciente (BRANNON-PEPPAS E BLANCHETTE, 2004).

O 5-FU interfere na síntese de DNA e RNA, causando morte celular, sendo utilizado para o tratamento de vários tipos de tumores, incluindo adenocarcinoma de mama e cabeça. Este fármaco apresenta baixo índice terapêutico e por essa razão, algumas diferenças inter-pacientes em termos de toxicidade e eficácia ocorrem com base em parâmetros farmacocinéticos individuais. Outro problema em relação ao 5-FU é a sua toxicidade à medula óssea e ao trato gastrointestinal. Com isso, o emprego de nanotecnologia no desenvolvimento de um sistema carreador de 5-FU representa uma estratégia importante.

A pesquisa em nanotecnologia farmacêutica envolve o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para o aprimoramento de fármacos consagrados clinicamente. Uma estratégia promissora é a associação de agentes antineoplásicos e sistemas nanoestruturados para minimizar os efeitos colaterais, limitações e as inconveniências do tratamento de câncer (FERRARI, 2005; YIH & WEI, 2005). Entre os sistemas de liberação de fármacos, as nanopartículas poliméricas são consideradas excelentes carreadores de fármacos, protegendo as moléculas do fármaco contra degradação em meio fisiológico, liberando controladamente as moléculas do fármaco no sítio de ação, reduzindo os efeitos colaterais decorrentes da ampla distribuição do fármaco no organismo. A associação do fármaco a um sistema transportador altera a sua distribuição, uma vez que este passa a depender das características físico-químicas do carreador e não mais de suas propriedades, promovendo assim aumento da seletividade tecidual do fármaco, contribuindo para melhora na sua eficácia e redução dos seus efeitos colaterais.

A utilização das nanopartículas poliméricas no tratamento do câncer baseia-se no seu efeito de permeabilidade e retenção aumentadas aos tecidos neoplásicos. Esse efeito ocasiona o extravasamento das nanopartículas para o interstício de tumores sólidos liberando doses concentradas do fármaco em locais específicos, e como consequência, reduz a exposição aos tecidos saudáveis, diminuindo a possibilidade de efeitos colaterais (BARRATT, 2003; MOHANRAJ & CHEN, 2006).

Diante destas considerações, entende-se como relevante o desenvolvimento de nanopartículas contendo 5-FU visando melhorar as suas propriedades farmacocinéticas, como biodisponibilidade e tempo de meia-vida.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Câncer

Com o aumento da expectativa de vida da população, o câncer preocupa cada vez mais devido ao seu alto índice e do seu perfil de morbidade e mortalidade. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 10 milhões de novos casos surgem por ano, que geram mais de 6 milhões de óbitos. No Brasil, é a segunda causa de morte por doença (ALMEIDA *et al.*, 2005). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), dados de 2012, cujas estimativas também serão válidas para o ano de 2013, apontam para a ocorrência de mais de 500.000 novos casos de câncer.

Câncer é o termo dado ao conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que por essa característica podem se espalhar para várias regiões do corpo. As neoplasias malignas podem expressar diferentes graus de diferenciação, desde células semelhantes as que lhe deram origem até células imaturas que não permitem identificação de suas células de origem; além disso, possuem capacidade de infiltrar-se em outros tecidos e produzir metástases em órgãos distantes (RUDDON, 1995).

O tratamento depende do tipo e da gravidade da doença. Há três possibilidades para alcançar a estabilização do tumor: técnica cirúrgica, radioterapia e/ou quimioterapia, ou, ainda a combinação dessas técnicas (SANTOS-SILVA, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2005). A intervenção cirúrgica remove os tumores com eficácia quando não há metástases. O tratamento quimioterápico consiste na utilização de fármacos citotóxicos para as células tumorais, porém podendo afetar células normais. Estes fármacos podem ser administrados isoladamente (monoquimioterapia) ou combinados (poliquimioterapia), sendo que a última apresenta resultados mais eficazes,

pois consegue maiores respostas a cada aplicação, diminuindo o risco de resistência aos fármacos e conseguindo atingir as células em diferentes fases do seu ciclo (SOUZA, 2003). A radioterapia é geralmente usada em conjunto com a cirurgia e a quimioterapia, com o objetivo de aumentar a eficácia do tratamento. Utilizada isoladamente, a radioterapia pode diminuir o tamanho do tumor, a recorrência e a formação de metástases. Um terço dos pacientes são curados com cirurgia e radioterapia, porém, aproximadamente em 70% dos casos é necessário o tratamento quimioterápico devido à formação de metástases (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os quimioterápicos antineoplásicos podem ser classificados como agentes alquilantes, antimetabólitos, inibidores de topoisomerases e derivados vegetais como alcalóides da vinca e compostos relacionados (CUNHA & LEHMANN, 2003). Os agentes alquilantes agem por meio da formação de ligações covalentes com o DNA com o objetivo de impedir sua replicação. Os compostos antimetabólitos atuam interferindo na síntese de RNA e DNA ou alteram a síntese das bases púricas e pirimidínicas endógenas uma vez que alguns fármacos desse grupo possuem estruturas químicas parecidas aos precursores endógenos de alguns ácidos nucleicos. Já os alcaloides da vinca afetam a formação dos fusos mitóticos. Os inibidores das topoisomerases atuam inibindo a atividade dessas enzimas, pois impedem o relaxamento do DNA que ocorre durante a replicação e transcrição, causando, conseqüentemente, a quebra do DNA (RANGE, DALE & RITTER, 2007).

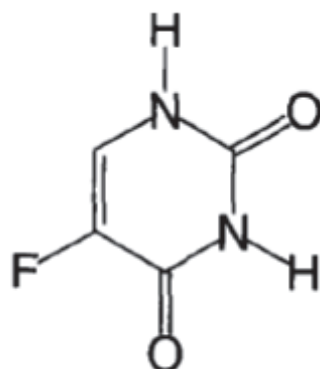
O tratamento antineoplásico, no entanto, não exerce efeito específico sobre o poder invasivo, a perda da diferenciação ou na tendência do tumor sofrer metástases, e sim, desencadeia apoptose das células neoplásicas devido ao bloqueio durante a fase S do ciclo celular, causando lesão do DNA. Porém, esses fármacos irão afetar além dos tecidos neoplásicos todos os tecidos normais que se dividem rapidamente devido ao seu

efeito ser exercido sobre a divisão celular, produzindo os efeitos tóxicos indesejáveis (WORKMAN & KAYE, 2002).

2.2. O 5-Fluorouracil (5-FU)

O 5-FU, cujo nome químico é 5-fluoro-2,4(1H, 3H) pirimidina diona, e fórmula química é $C_4H_3FN_2O$ (Figura 1), é um análogo das pirimidinas, mais especificamente do uracil, apresentando um flúor substituindo o hidrogênio do carbono 6, e por isso utiliza as mesmas rotas metabólicas que o uracil e a timina. É classificado como fármaco antimetabólito utilizado para o tratamento de vários tipos de tumores, como adenocarcinoma de mama, trato gastrintestinal, ovário, cabeça, pescoço (GREM *et al.*, 1999; NOORDHUIS *et al.*, 2004; SEIPHE *et al.*, 2006; RAHMAN *et al.*, 2006) e em tumores de medula espinhal. É utilizado tanto isolado com associado com outros antitumorais.

Figura 1. Estrutura química do 5-FU (COE *et al.*, 1996)



A atividade citotóxica do 5-FU é atribuída a três mecanismos distintos: inibição da enzima timidilato sintase relacionada à síntese de nucleotídeos; incorporação de

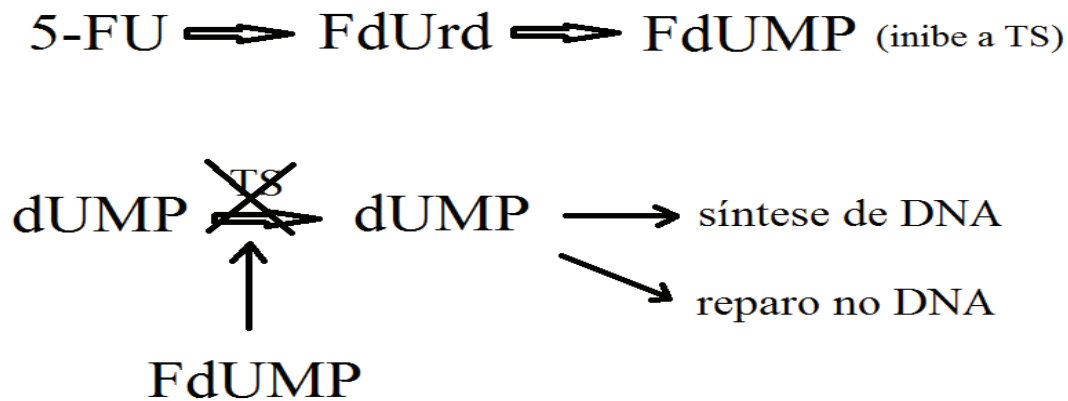
fluorouracil trifosfato (FUTP) no RNA e incorporação de fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) no DNA genômico (NOORDHUIS *et al.*, 2004). Após ser absorvido, aproximadamente 80% é catabolizado pela enzima diidropirimidina desidrogenase à 5-fluorobalanina que é eliminada do organismo (MILANO & ETIENNE, 1994; MO & PATER, 2003; ZHAO *et al.*, 2010). O que não é metabolizado (cerca de 20%) permanece inativo no organismo até alcançar o tecido-alvo, onde é convertido em um de seus metabólitos citotóxicos.

O 5-FU é um pró-fármaco que para se tornar ativo deve ser convertido a nucleotídeo 5-fluoro 2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP) pela ação da enzima timidina quinase. A utilização clínica do 5-FU ocorre no lugar do FdUMP uma vez que o 5-FU é solúvel em água enquanto que o FdUMP não apresenta esta propriedade (ZHAO *et al.*, 2010).

Inicialmente o seu metabólito FdUMP, juntamente com a coenzima 5,10-metilenotetraidrofolato (MTF), forma um complexo ternário covalente com o DNA recém sintetizado pela enzima timidilato-sintetase (TS), inibindo sua atividade, sendo que a TS atua na metilação do monofosfato de desoxiuridina (dUMP) formando timidina monofosfato (dTMP) que, inibe a síntese do DNA (ZHAO *et al.*, 2010). A inibição da enzima TS, altera a síntese de RNA e em maior proporção a síntese do DNA. A incorporação do fluorouracil trifosfato (FUTP) no RNA acarreta a perda de sua função. No entanto, acredita-se que o principal mecanismo de citotoxicidade é a conversão de 5-FU à FdUMP (NOORDHUIS *et al.*, 2004; GRIVICICH *et al.*, 2007). O FdUMP pode se ligar à enzima TS inibindo sua atividade, o que resulta em um desbalanço do *pool* de nucleotídeos, pois a função desta enzima é sintetizar dTMP a partir de dUMP. Isso ocorre porque a inibição da TS leva a diminuição de 2'-deoxitimidina-5'-trifosfato (dTTP) e aumento de 2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP), seguido do aumento da concentração intracelular de uracil, o que resulta na

incorporação de uracil no DNA (NOORDHUIS *et al.*, 2004; GRIVICICH *et al.*, 2007). O desbalanço dos nucleotídeos induz várias enzimas, como endonucleases, o que resulta em dano no DNA seguido por mudanças em proteínas que atuam na via da apoptose, a qual leva a célula à morte (PETERS *et al.*, 2000), através da indução da quebra de uma das hélices da cadeia de DNA. Além disso, fatores como *bcl-2* e *p53* podem atuar na resposta celular ao estresse genotóxico causado por inibição de TS (GREM, 1997; NITA *et al.*, 1998). Essas lesões desencadeiam paradas do ciclo celular, na tentativa de reparar o dano (MEYERS *et al.*, 2005), sendo então as células marcadas para a apoptose. Portanto, o 5-FU atua como potente inibidor da enzima TS, interferindo com isso na síntese de DNA e RNA. Uma vez que RNA e DNA são essenciais para a divisão e crescimento celular, o efeito desse fármaco pode gerar uma deficiência de timina provocando um desequilíbrio no crescimento e morte da célula (MOSBY'S, 2002; Réus, 2006). No DNA além de causar inibição de sua síntese, gera quebras simples nas fitas nascentes de DNA e quebras duplas no DNA parenteral (NOORDHUIS *et al.*, 2004; DE ANGELS *et al.*, 2006). Já pela sua ação no RNA, ocorre diminuição de sua síntese, inibição da poliadenilação de RNA mensageiro e alteração na síntese protéica (NOORDHUIS *et al.*, 2004). A figura 2 representa o principal mecanismo de ação do 5-FU na síntese e reparo do DNA.

Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação do 5-FU na síntese e reparo do DNA.



Diferente de outros fármacos antimetabólitos, o 5-FU gera uma curva dose *versus* resposta linear. Possui a característica de penetrar em todos os tecidos, incluindo os tumorais. Por essa peculiaridade provoca inúmeras reações adversas quando administrado sistematicamente, como anorexia, náusea, efeitos mucocutâneos como estomatites, trombocitopenia e perda de cabelos (RÉUS, 2006).

Após a administração oral, a biodisponibilidade do 5-FU é bastante variável devido à sua absorção inconsistente no trato gastrointestinal e pelo metabolismo de primeira passagem através do fígado. Assim, seu tempo de meia-vida é extremamente curto (6-20 min), e por isso são necessárias altas e frequentes doses para manter concentrações plasmáticas adequadas (entre 0,1 a 1,0 mM), por isso é administrado preferencialmente pela via intravenosa, em doses de 10 a 15 mg/Kg. Outro inconveniente, é que para desempenhar sua função, requer uma série de enzimas fosforilativas para sua ativação. É excretado após duas ou três fases de eliminação, sendo que mais de 80% é metabolizado em dihidrofluorouracil e excretado na urina, o restante é excretado inalterado na urina e pela respiração (MURAD & KATZ, 1996).

Esse composto apresenta-se na forma de pó cristalino branco, inodoro e fotossensível, podendo precipitar em solução à temperatura ambiente e decompõe-se à

282°C. Em relação a solubilidade, um grama de 5-FU é solúvel em 80,0 mL de água, 170,0 mL de etanol e 55,0 mL de metanol, é praticamente insolúvel em clorofórmio, éter e benzeno; a solubilidade em soluções aquosas aumenta à medida em que se eleva o pH da solução (CLARKE, 2004).

A citotoxicidade do 5-FU depende da sua concentração na célula-alvo. Como suas propriedades físico-químicas influenciam nas propriedades biofarmacêuticas, há a necessidade de administração de altas doses para vencer as suas limitações farmacocinéticas. A sua toxicidade não-seletiva surge em decorrência da sua penetração em tecidos e órgãos saudáveis (COUVREUR *et al.*, 2002). A administração de altas doses ocasiona alguns efeitos colaterais que podem ser tão intensos que promovem a descontinuidade do tratamento pelo paciente (BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2004). Uma alternativa para aumentar a seletividade desse fármaco às células neoplásicas e reduzir a sua citotoxicidade nas células sadias é associá-lo a sistemas coloidais nanoestruturados (REJINOLD *et al.*, 2011).

2.3. Sistemas nanoestruturados carreadores de fármacos

A associação de agentes antineoplásicos a sistemas nanoestruturados com o objetivo de reduzir os efeitos colaterais, limitações e as inconveniências do tratamento quimioterápico convencional é uma estratégia importante (FERRARI, 2005; Yih & WEI, 2005, LI *et al.*, 2008, REJINOLD *et al.*, 2011). Diversos trabalhos na literatura relatam que a associação de diversos fármacos antineoplásicos, como actinomicina D, 5-FU, doxorubicina e metotrexato às nanopartículas, gerou aumento significativo na eficiência terapêutica desses fármacos em modelo de tumores experimentais, com baixa toxicidade (GUTERRES *et al.*, 2006).

Os sistemas nanoestruturados carreadores de fármacos incluem as microemulsões, lipossomas, complexos lipídicos, nanoesferas, nanocápsulas, entre outros. Podem ser administrados por diferentes vias, como intravenosa, subcutânea, oral tópica, ocular, pulmonar, nasal transdérmica e intramuscular (PICOS *et al.*, 2000). Essas formas farmacêuticas nanoestruturadas possuem diversas vantagens em comparação aos sistemas convencionais, como distribuição mais uniforme ao longo do trato gastrointestinal, menor variabilidade da biodisponibilidade interindividual (LIN *et al.*, 1991; KAWASHIMA *et al.*, 1993), e a principal delas é a modificação da penetração intracelular (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001). JAIN (2008) estimou que os sistemas nanoestruturados de fármacos utilizam 100 vezes menos quantidade de princípio ativo e que são 100 vezes mais eficientes.

A utilização das nanopartículas no tratamento do câncer baseia-se na sua habilidade em extravasar para o interstício de tumores sólidos liberando doses concentradas de fármacos em locais específicos, pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR, *enhanced permeability and retention*) e, conseqüentemente, reduzindo a exposição aos tecidos saudáveis e diminuindo a possibilidade de efeitos tóxicos (BARRATT, 2003; MOHANRAJ & CHEIN, 2006, DRUMMOND *et al.*, 2010). O efeito EPR é de fundamental importância na distribuição de fármacos pelo organismo, pois o endotélio capilar dos tecidos neoplásicos é bastante desordenado devido à sua exposição aos fatores de crescimento endotelial e de permeabilidade vascular; sendo, por conseqüência, mais permeável às nanoestruturas do que os tecidos saudáveis, com isso permitindo o extravasamento de uma concentração maior de nanopartículas para o interior desses tecidos neoplásicos. Como o EPR é causado por uma redução da drenagem linfática, ocorre acúmulo das nanopartículas no tecido tumoral.

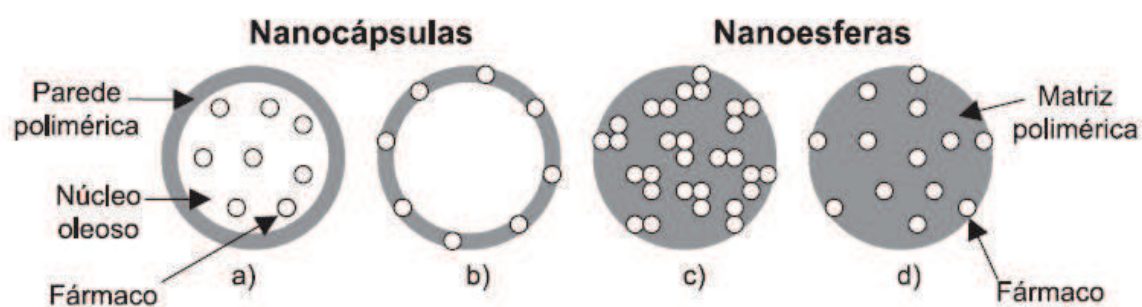
Nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais matriciais ou reservatórios, formados por diferentes materiais, podendo apresentar uma variação de tamanho de 5 a 1000 nm (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998). As nanopartículas poliméricas apresentam propriedades físico-químicas que as tornam importantes sistemas de liberação de fármacos, como tamanho reduzido, grande área superficial e diversas características de carga superficial. Modulando características como sua composição polimérica, tamanho, carga e composição superficial, obtém-se diferentes perfis de liberação do fármaco por elas veiculado, assim como diferenças na absorção e distribuição das partículas *in vivo* (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MAINARDES *et al.*, 2009).

Por sua característica nanométrica, as nanopartículas proporcionam maior capacidade de ultrapassar barreiras biológicas, mantém a integridade do fármaco veiculado nos meios biológicos, podendo ser direcionadas para células e tecidos específicos, além de prolongarem ou ainda retardarem a liberação do fármaco, bem como podem ser administradas por várias vias, como oral, nasal, intra-ocular e parenteral (MOHANRAJ & CHEN, 2006). O uso de nanopartículas como vetores de antitumorais permite a liberação de grande parte da concentração administrada nos tecidos neoplásicos, devido à alteração do perfil de distribuição do sistema que depende das propriedades físico-químicas do carreador e não mais das características do fármaco. Além disso, esses sistemas diminuem a exposição dos tecidos normais aos fármacos antineoplásicos. As nanopartículas possibilitam ainda o controle e/ou prolongamento da liberação do fármaco (CSABA *et al.*, 2006; SCHAFFAZICK *et al.*, 2006), protegem a molécula contra a degradação *in vivo* e durante o armazenamento (VILA *et al.*, 2002) e diminuem a toxicidade do fármaco (GUTERRES *et al.*, 1995; BARAN *et al.*, 2002), aumentando conseqüentemente o conforto do paciente devido a

redução do número de administrações (FONSECA *et al.*, 2002; GREPTE & CIFTCI, 2004).

A denominação nanopartículas poliméricas inclui as nanoesferas e as nanocápsulas, que diferem por suas organizações estruturais e composições. As nanocápsulas são formadas por uma camada polimérica disposta ao redor de um núcleo geralmente oleoso, enquanto as nanoesferas são sistemas matriciais constituídos por polímero (PUISIEUX *et al.*, 1994; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SCHAFFAZICK, 2006). A figura 3 representa as diferenças entre nanocápsulas e nanoesferas.

Figura 3. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.



Fonte: SCHAFFAZICK *et al.*, 2003, p. 726.

2.4. Obtenção de sistemas nanoestruturados

O mecanismo de obtenção das nanopartículas representa um fator crucial que influencia as suas características físico-químicas como tamanho e morfologia, o que em contrapartida, determina o comportamento destas partículas em relação à eficiência de encapsulação, perfil de liberação do fármaco e propriedades farmacocinéticas (ROSCA *et al.*, 2004).

Há diversos métodos de obtenção de nanopartículas poliméricas que são basicamente classificados em duas categorias, a polimerização *in situ* de monômeros dispersos e a precipitação de polímeros pré-formados (COUVREUR *et al.*, 1995), sendo que a escolha da técnica mais adequada depende principalmente da polaridade do mesmo (ZAMBAUX *et al.*, 1998). Entre os métodos descritos na literatura são: emulsificação /evaporação de solvente, emulsificação/difusão de solvente, nanoprecipitação, *salting-out* e polimerização interfacial *in situ*.

A polimerização interfacial *in situ* é muito utilizada por ser um método simples e reprodutível. A técnica baseia-se na injeção de gotas de um monômero insolúvel em água em uma solução aquosa ácida que contenha um tensoativo não-iônico ou um estabilizador (COUVREUR *et al.*, 1982). Após a formação das partículas, as suspensões são submetidas à evaporação para a remoção do solvente orgânico e concentração até volume desejado. Entretanto, essa técnica possui a desvantagem de apresentar resíduos de monômeros na formulação, o que pode resultar em toxicidade ao organismo humano (MONTASSER *et al.*, 2000).

A técnica de nanoprecipitação, também chamada de nanodeposição de polímero pré-formado baseia-se na dissolução do fármaco e do polímero em um solvente orgânico miscível em água e sua subsequente injeção em uma fase aquosa contendo um tensoativo hidrofílico como estabilizante. As nanopartículas são formadas

imediatamente através da difusão do solvente orgânico na água, dando origem a uma suspensão coloidal de nanoesferas, com posterior evaporação do solvente (MONTASSER *et al.*, 2000). Por este método, obtém-se nanoesferas com diâmetro médio de 200 nm (PUISIEUX *et al.*, 1994; MONTASSER *et al.*, 2000). A formação dessas nanopartículas pode ser explicada pela turbulência interfacial que ocorre durante a difusão do solvente resultado da redução da tensão superficial entre as duas fases. A utilização do tensoativo promove a estabilização das pequenas gotas de solvente de tamanho nanométrico até a completa difusão do solvente e a agregação do polímero ocorre com o aumento da polaridade do meio (QUITANAR-GUERREIRO *et al.*, 1998).

O método de emulsificação-difusão consiste na formação de uma emulsão óleo em água (O/A). Para isso, o polímero e o fármaco são solubilizados em um solvente parcialmente solúvel em água, que constitui a fase interna da emulsão. Esta é vertida na fase externa que é uma dispersão aquosa de um tensoativo. A adição subsequente de água ao sistema, provoca a difusão do solvente orgânico na fase externa. Esse método baseia-se na difusão do solvente a partir dos glóbulos, formando regiões de supersaturação, que origina novos glóbulos e agregados de polímero (QUITANAR-GUERRERO *et al.*, 1999).

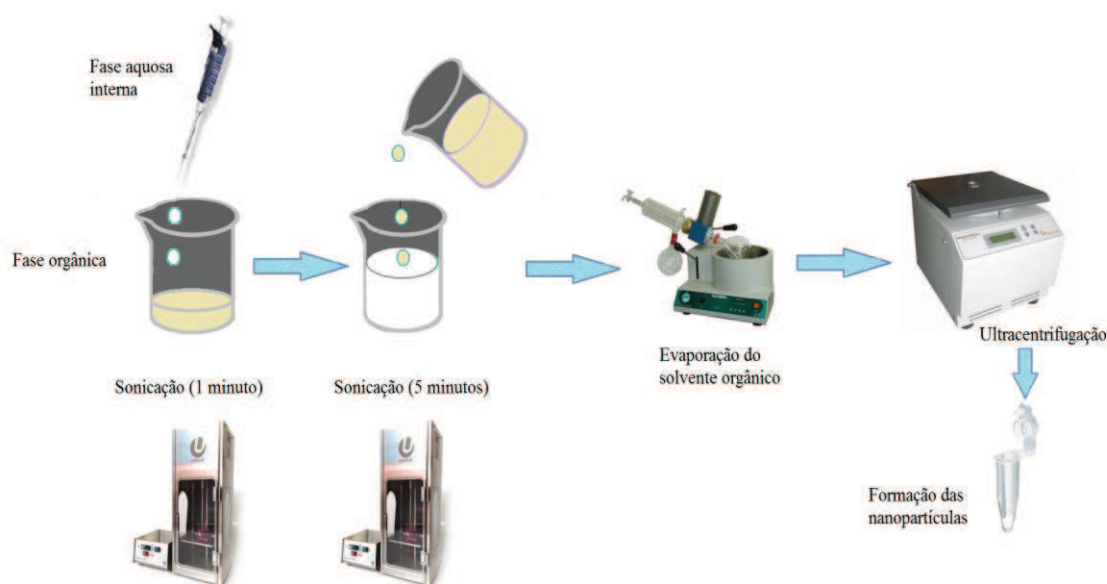
Outro método utilizado para obtenção de nanopartículas é o *salting-out* que também resulta de uma emulsão O/A. No caso de nanoesferas, o polímero e o fármaco são dissolvidos em acetona e após essa mistura é agitada vigorosamente em um gel aquoso contendo o agente *salting-out* formando a emulsão O/A. Essa emulsão formada é diluída em certo volume de água para aumentar a difusão da acetona na fase aquosa, ocorrendo a formação de nanoesferas (ALLÉMANN *et al.*, 1992).

O método de emulsificação-evaporação do solvente envolve a formação de uma emulsão O/A ou A/O. Para a formação da emulsão há a necessidade de uma solução

polimérica e uma fase imiscível que sendo aquosa formará a emulsão O/A, e se for oleosa formará a emulsão A/O.

No caso de nanoencapsulação de fármacos hidrofílicos, o método que se apresenta mais adequado é o da dupla emulsão (YANG *et al.*, 2001), já que a maioria dos métodos utilizados para a elaboração de sistemas nanoparticulados são eficientes para a encapsulação de fármacos lipofílicos, e no caso de moléculas hidrofílicas, resultam em baixa eficiência de encapsulação devido á facilidade de difusão do fármaco da fase aquosa interna para a externa (BALA *et al.*, 2004). Uma representação esquemática dessa técnica está ilustrada na figura 4.

Figura 4. Representação esquemática do método de obtenção de nanopartículas pelo método da dupla emulsão – evaporação do solvente.



Conceitualmente é um método simples consistindo na elaboração de uma emulsão A/O por meio de sonicação de um pequeno volume de água contendo o fármaco e o tensoativo e um solvente orgânico contendo um polímero biodegradável. Posteriormente, esta emulsão que constitui a fase interna da segunda emulsão, é vertida

em uma solução aquosa de tensoativo constituindo a fase externa da dupla emulsão, que também é preparada por sonicação (BLANCO & ALONSO, 1997).

Para a preparação dessas nanopartículas é requerido materiais poliméricos biocompatíveis e biodegradáveis que podem ser de origem natural, tais como albumina, gelatina, colágeno e quitosana, como sintéticos como os polilactídeos, poliglicolídeos e seus copolímeros, os poliácridatos e a policaprolactona. Porém, os polímeros naturais possuem problemas quanto ao grau variável de pureza, alto custo de obtenção (JAIN, 2000) e risco potencial de infecções e imunogenicidade (LEE *et al.*, 2007). Conseqüentemente, uma grande variedade de polímeros sintéticos tem sido desenvolvidos e amplamente utilizados. Dentre esses polímeros, a classe dos poliésteres é particularmente atraente devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. Além disso, alguns membros deste grupo possuem baixa imunogenicidade e podem ser combinados com uma série de drogas e de outras moléculas de interesse terapêutico (MUNDARGI *et al.*, 2008; JAIN *et al.*, 1998).

Dentre os poliésteres, destacam-se os de cadeia aberta formados por uma sucessão de unidades monoméricas de poli (ácido láctico) (PLA) ou de dímeros de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), pois são aprovados pelo FDA para uso humano (JAIN, 2000; THOMAS & BURG, 2004) e após sua administração sofrem hidrólise formando ácido láctico e ácido glicólico que são removidos do organismo pelo ciclo do ácido cítrico (ATHANASIOU *et al.*, 1996), processo que ocorre lentamente e que não afeta as funções fisiológicas das células saudáveis.

Um parâmetro que deve ser levado em consideração na escolha do polímero é o seu peso molecular, que irá influenciar na homogeneidade da amostra. Os polímeros com alto peso molecular geram sistemas com baixa taxa de polidispersidade (ZAMBAUX *et al.*, 1998). A escolha cautelosa do polímero é importante uma vez que

ele influencia a cinética de liberação e estabilidade do fármaco, bem como a compatibilidade com o organismo (ANDERSON & SHIVE, 1997).

O PLA é o polímero de escolha para aplicação na área médica e farmacêutica por ser biodegradável a subprodutos atóxicos para o organismo humano. É obtido através do ácido láctico, tem um alto ponto de fusão (175°C) e alto grau de transparência. Possui isômeros opticamente ativos (D e L) ou uma mistura racêmica dos mesmos. Seu produto de degradação é o ácido láctico gerado a partir do rompimento da porção terminal da cadeia polimérica. Isso o torna interessante, uma vez que nas células o ácido láctico é convertido em piruvato pela lactato desidrogenase presente no coração, músculos e fígado, sendo que sua eliminação via ciclo de Krebs, pelos pulmões e rins, principalmente, na forma de dióxido de carbono e água (BRANNON-PEPPAS, 1995; JAIN, 2000).

As nanopartículas poliméricas após serem administradas pela via intravenosa são reconhecidas como estranhas sendo por consequência extensa e rapidamente removidas da circulação sistêmica pelas células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), representadas principalmente pelas células de Kupffer do fígado e macrófagos da medula óssea e do baço, comprometendo a eficiência dos tratamentos com esses sistemas (SANTANDER-ORTEGA *et al.*, 2007). Para que ocorra essa captura pelas células fagocitárias há a necessidade da adsorção de proteínas plasmáticas sobre a superfície das nanopartículas (opsonização), tais como proteínas C3b do sistema complemento, imunoglobulinas G e M, fibronectina e apolipoproteínas, para que a interação com os receptores Fc, receptores para complemento ou receptores de açúcar/lecitina, situados na superfície dos macrófagos, seja efetuada (GREF *et al.*, 1995; MOGHIMI *et al.*, 2001; MOSQUEIRA *et al.*, 2001).

Segundo SOPPIMATH e colaboradores (2001) o tamanho das partículas e a hidrofobicidade da sua superfície determinam a extensão da opsonização. De maneira

geral, maior e mais rápida será a adsorção das proteínas plasmáticas quanto maior a hidrofobicidade da nanopartícula. Outra característica importante é sua carga superficial, uma vez que quanto mais negativamente carregada for a superfície da nanopartícula, maior será sua eliminação da circulação sanguínea em relação às nanopartículas carregadas positivamente ou às neutras (STOLNIK *et al.*, 1995).

Diversas doenças localizadas em órgãos ricos em células do SMF podem ser tratadas com sucesso através de sistemas nanoestruturados, devido ao o acúmulo das partículas e conseqüentemente do fármaco nesses locais. Porém, em tumores localizados em outros órgãos o tratamento é prejudicado devido ao baixo acúmulo do princípio ativo no sítio de ação causado pelo tempo reduzido desses sistemas na circulação sanguínea (BRIGGER *et al.*, 2002).

Dois técnicas estão sendo utilizadas para alterar a superfície das nanopartículas com o objetivo de evitar o seu reconhecimento e captura pelas células do SMF, as quais são: a) adsorção de tensoativos na superfície das nanoesferas, como poloxamers, e b) revestimento com copolímeros hidrofílicos biodegradáveis. No entanto, alguns critérios são requeridos para que uma nanopartícula apresente comportamento “furtivo”, tais como: o polímero não pode ser facilmente removido pelo fluxo sanguíneo *in vivo*, a barreira imposta pelo polímero deve ser densa o suficiente para prevenir a opsonização e a interação das nanopartículas com potenciais receptores dos macrófagos (MOGHIMI & HUNTER, 2001). O revestimento das nanopartículas com polímeros hidrofílicos como o polietileno glicol (PEG) e o óxido de polietileno (PEO), impedem estericamente a opsonização (ADAMS *et al.*, 2003, ALEXIS *et al.*, 2008). O revestimento das nanopartículas com PEG ou PEO forma uma densa camada desses polímeros com várias conformações intercambiáveis entre si, dependendo de sua concentração e densidade, as quais dificultam a detecção das nanopartículas pelo sistema imunológico, uma vez que os anticorpos têm dificuldade de se modelarem em

torno destas estruturas flexíveis (JEON *et al.*, 1991). Estas nanopartículas denominadas furtivas escapam da captura dos macrófagos, permanecendo por um período prolongado na circulação sistêmica e, desta forma, podem alcançar outros locais onde a liberação do fármaco é desejável (GREF *et al.*, 1995).

Vários trabalhos já descritos na literatura realizaram a nanoencapsulação de 5-FU nesses últimos anos, porém até o momento, nenhum utilizou os polímeros PLA-PEG. LIN e colaboradores (2008) prepararam nanopartículas poliméricas de PLGA-co-metoxi PEG (PLGA-mPEG) contendo 5-FU. Utilizando a quitosana pode-se citar os trabalhos de FU *et al.* (2007) e NAGARWAL *et al.* (2012). ZHANG e colaboradores (2012) desenvolveram e caracterizaram nanopartículas de PLLA-PEG/PEG contendo 5-FU através da técnica do CO₂ supercrítico. E o único trabalho que utilizou PLA foi o desenvolvido por NAGARWAL e colaboradores (2011).

Com o intuito de otimizar o projeto da formulação, a utilização de um planejamento fatorial é uma ferramenta muito eficiente. Esses estudos permitem analisar todos os fatores variados simultaneamente, permitindo ainda a avaliação de cada variável em cada nível e a inter-relação entre eles. Nesse tipo de trabalho, o fator crucial para o sucesso do estudo é a escolha das principais variáveis que poderão afetar a formulação. Outro fator a ser levado em consideração é o número de variáveis selecionadas, pois são estas que irão decidir o número de experimentos que serão realizados (BHAVSAR *et al.*, 2006). Muitos trabalhos estão utilizando essa metodologia para aperfeiçoamento de formulações farmacêuticas. Um exemplo é o trabalho realizado por BHAVSAR e colaboradores (2006), que utilizou essa metodologia para otimizar formulações de nanopartículas em microesferas híbridas de isotiocianato fluorescente para administração oral. FANGUEIRO e colaboradores (2012) utilizaram o delineamento fatorial para aperfeiçoar formulações de

nanopartículas lipídicas-sólidas para carreamento de biomoléculas hidrofílicas, como proteínas e peptídeos.

Assim, neste trabalho utilizou-se o delineamento fatorial para otimizar formulações de nanopartículas contendo 5-FU baseadas em PLA e blends de PLA-PEG. As nanopartículas foram obtidas, caracterizadas e avaliadas *in vitro* quanto à eficácia e *in vivo* em relação à farmacocinética. A utilização de nanoestruturas para a vetorização de fármacos antitumorais pode representar uma alternativa as terapias convencionais, pois pode-se obter redução dos efeitos colaterais do fármaco e aumento da sua eficácia.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

O trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de nanopartículas de PLA e de blendas de PLA-PEG contendo 5-FU utilizando delineamento fatorial para otimizar as formulações. A influência do PEG nas propriedades físico-químicas e biológicas das nanopartículas foi investigada. Avaliou-se a citotoxicidade das formulações em linhagem tumoral bem como a farmacocinética após administração de dose única oral em ratos.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de 5-FU em nanopartículas e em plasma de ratos;
- Desenvolvimento de protocolos de obtenção de nanopartículas poliméricas contendo 5-FU por delineamento fatorial;
- Determinação da eficiência de encapsulação;
- Caracterização físico-química de nanopartículas (morfologia, diâmetro médio e distribuição do tamanho, interações fármaco-polímero);
- Determinação do perfil de liberação do fármaco *in vitro*;
- Determinação da atividade citotóxica sobre linhagens tumorais;
- Avaliação da farmacocinética pré-clínica das nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo 5-FU após administração oral de dose única em ratos.

4. MATERIAIS

4.1. Substâncias e Reagentes

- Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker);
- Água ultrapurificada;
- Álcool polivinílico (PVA) (Sigma Chemical Co.);
- Azul de Trypan(Sigma-Aldrich);
- Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich,);
- Diclorometano (Fmaia);
- D (+) Sacarose P.A. (Vetec Química Fina);
- Estreptomicina (Sigma-Aldrich);
- Etanol 95% (Fmaia);
- 5-Fluorouracil (Sigma Chemical Co.);
- Isopropanol (Fmaia);
- Meio de cultura Iscov's modificado de Dulbecco (Sigma-Aldrich) ;
- Penicilina (Sigma-Aldrich);
- Poli (DL-ácido láctico) (PLA, 85-160 MW) (Sigma Chemical Co.);
- Polietileno glicol (PEG) (Sigma Chemical Co.) (10 KDa);
- Polisorbato 80 (Sigma Chemical Co.);
- Pluronic F-68 (Sigma Chemical Co.);
- Soro fetal bovino (Gibco).

4.2. Equipamentos e acessórios

- Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência – Waters Alliance
 - Detector PDA
 - Coluna fase reversa C18 (25cm X 4mm) tamanho de partícula 5 μ m – Xterra Waters®;
- Aparelho de Infravermelho;
- Autoclave vertical AV Plus – Phoenix;
- Balança analítica – Bel Engineering;
- Banho ultratermostático – Solab;
- Bomba a vácuo – Tecnal;
- Capela de fluxo laminar vertical – Veco;
- Capela para exaustão de gases – Lucadema;
- Centrífuga - Centribio;
- Desruptor de células ultra sônico – Unique;
- Dispersor Ultrasônico - Unique;
- Equipamento para medida do espalhamento dinâmico da luz (Light Scattering) - Brookhaven 90 Plus;
- Estufa de CO₂ - Quimis;
- Evaporador rotatório - Tecnal;
- Lavadora ultrasônica – Unique;
- Leitor de microplacas Spectra Max 190 – Molecular Devices;
- Liofilizador – Terroni;
- Membranas filtrantes (acetato de celulose 0,22 μ m e PTFE 0,45 μ m) - Millipore;
- Microscópio invertido - Bel Photonics;

- Osmose reversa laboratorial – Vexer Indústria e Comércio de Equipamentos LTDA;
- Pipetas monocanal - Labmate;
- Sistema de filtração por membranas;
- Sistema de ultrapurificação de água – MilliQ Gradiente Millipore;
- Sistema para tópicos e transdérmicos baseado em células de Franz – Hanson Res;
- Ultracentrífuga refrigerada – Cientec.

5. METODOLOGIA

5.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para determinação de 5-FU em nanopartículas

O desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE foi realizado com o intuito de padronizar e validar um método analítico para a quantificação de 5-FU presente no sobrenadante obtido através da ultracentrifugação da dispersão de nanopartículas e no meio de liberação utilizado na realização do ensaio de liberação *in vitro*. Foram padronizadas condições cromatográficas tais como: composição da fase móvel, vazão da fase móvel e tipo de eluição.

O desenvolvimento de uma validação tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a determinação quantitativa de fármaco. A validação garante, por meio de estudos experimentais, que o método proposto atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para a validação da metodologia, foram realizados os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limites de quantificação e detecção, e robustez, descritos na Resolução nº 899 de 2003 da ANVISA e nas recomendações do guia *International Conference on Harmonization* (ICH- 2005).

5.1.1. Preparação das soluções padrão e amostra

Uma solução estoque de 10 µg/mL de 5-FU foi preparada em água e subsequentes diluições foram feitas para obter oito soluções padrão (0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; e 10,0 µg/mL). Outra solução estoque de 10 µg/mL de 5-FU foi preparada

em tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,4 e diluições seriadas foram realizadas para obter sete soluções padrão (0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; e 10,0 µg/mL) para o ensaio de liberação *in vitro*. Do mesmo modo, seis soluções padrão foram obtidas por diluições seriadas de uma solução padrão de 5-FU (1,0 µg/mL) em água (50,0, 75,0, 100,0 125,0, 150,0 e 200,0 ng/mL) para determinar os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) deste método. As amostras foram diluídas em água. Os padrões e as amostras foram previamente filtradas em membrana de poro 0,22 µm antes da injeção.

5.1.2. Condições Cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas no modo isocrático. A fase móvel consistiu de uma mistura de acetonitrila e água (10:90, v/v), a qual foi eluída a um fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção de amostra foi de 100 µL e o comprimento de onda de detecção foi de 265 nm. O tempo de corrida do método foi de 4 minutos e todos os experimentos foram realizados a 25°C.

5.2. Parâmetros de Validação

5.2.1. Linearidade

A linearidade foi verificada para as duas curvas analíticas utilizadas: i) quantificação do 5-FU em nanopartículas e ii) quantificação do 5-FU no meio de liberação utilizado no ensaio de liberação *in vitro*.

No primeiro caso, a linearidade do método foi demonstrada através do cálculo da regressão linear de uma curva obtida a partir de um gráfico correlacionando a área do pico do analito *versus* a sua concentração para as oito soluções padrão em água analisadas três vezes (0,1, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g/mL}$), utilizando a metodologia dos quadrados mínimos lineares.

No segundo caso, a linearidade foi determinada através do cálculo da regressão linear de uma curva obtida a partir de um gráfico correlacionando a área do pico do analito *versus* sua concentração para as sete soluções padrão em tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4 (0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$) analisadas em triplicata, utilizando a metodologia dos quadrados mínimos.

5.2.2. Precisão Instrumental

A precisão do equipamento foi verificada a partir de uma solução padrão de 5-FU 1,0 $\mu\text{g/mL}$ analisada 10 vezes em sucessão. Os resultados foram relatados como desvio padrão relativo (DPR).

5.2.3. Precisão

A precisão de um método é a sua capacidade de aproximar entre os resultados dos testes individuais realizados várias vezes de uma mesma amostra nas mesmas condições de análise. Esse ensaio foi realizado através da análise da precisão intra-corrída e inter-corrídas. Para ambas as análises foram utilizados padrões de 5-FU em água nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/mL. A precisão intra-corrída ou repetibilidade foi realizada em um mesmo dia em triplicata, enquanto a precisão inter-corrídas ou intermediária, foi desempenhada em três dias diferentes utilizando-se as amostras já citadas em triplicata.

Os dados obtidos foram submetidos ao cálculo do percentual coeficiente de variação (CV%), seguindo a seguinte equação (Eq. 1):

$$CV\% = DP/CMD \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

onde:

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

5.2.4. Exatidão

A exatidão é a comparação entre o valor de referência e o valor encontrado durante a análise. A exatidão foi avaliada através do cálculo da porcentagem de recuperação das médias das concentrações de 5-FU em três diferentes níveis de concentração (0,1, 1 e 10 µg/mL) em triplicata e determinou-se o DPR. O valor da

concentração média obtida para cada nível foi comparado com o valor teórico, o qual foi considerado como sendo 100%, através da seguinte equação (Eq. 2):

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

5.2.5. Especificidade

É a competência de um método de não permitir que componentes da formulação interfiram na determinação do analito. O principal interferente na amostra é o álcool polivinílico (PVA), que permanece no sobrenadante após a ultracentrifugação das nanopartículas. Assim, foi realizado um ensaio com uma amostra composta somente por PVA a 1%, a fim de verificar o cromatograma desse composto. Os dados foram avaliados pela análise de possíveis picos e seu tempo de retenção, comparando com os resultados com os de amostras contendo 5-FU.

Outro procedimento realizado para verificar a especificidade foi a submissão dos padrões de 5-FU (0,1, 1 e 10 µg/mL) à condições de estresse. Essas condições foram: i) congelamento por 24h; ii) aplicação de luz visível por 24h; iii) a alteração de pH, pela adição de volumes de NaOH e HCl (1M) aos padrões por 1h; e iv) oxidação pela adição de H₂O₂ às amostras por 1h. Os resultados foram avaliados pela observação de picos inesperados e pela porcentagem de recuperação do 5-FU das amostras.

5.2.6. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD e o LQ é a menor quantidade do analito a ser detectada e quantificada pelo método, respectivamente. Para obter-se esses parâmetros, construiu-se uma curva analítica com os seguintes padrões de 5-FU: 50, 75, 100, 125, 150 e 200 ng/mL, sendo a menor concentração próxima ao valor do LQ. Com os valores calculados do desvio padrão médio do intercepto y e do slope da curva, foram calculados os limites, de acordo com as equações 3 e 4:

$$LD = \sigma/b \times 3,3 \quad \text{(Eq. 3)}$$

$$LQ = \sigma/b \times 10 \quad \text{(Eq. 4)}$$

onde:

σ = desvio padrão médio do intercepto y

b = inclinação da curva analítica ou slope

5.2.7. Robustez

A robustez é a capacidade de um método de permanecer constante mediante pequenas alterações nos parâmetros analíticos. A fim de se obter esses resultados, foi realizada alteração na vazão da fase móvel (de 1 mL/min para 0,9 e 1,1 mL/min), a troca da marca da coluna de fase reversa C18 (25cm X 4,6mm) tamanho de partícula 5 μ m – (Xterra Waters por Vertical Chromatography Co.), e a variação da temperatura da coluna (de 25°C para 35°C). Para essas análises foram utilizados os padrões de 5-FU

nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/mL, em triplicata. A avaliação baseou-se na porcentagem de recuperação (Eq. 5) e do DPR:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

5.3. Obtenção das nanopartículas contendo 5-FU

As nanopartículas foram obtidas pela técnica da emulsificação-evaporação do solvente, por meio de uma dupla emulsão água-óleo-água (A/O/A) devido à hidrossolubilidade do fármaco. Inicialmente, 50 mg de PLA ou 50 mg de PLA e 10 mg de PEG 10 kDa foram solubilizados em 2 mL de diclorometano, constituindo a fase orgânica da emulsão. Nesta fase oleosa acrescentou-se solução aquosa de PVA (1% ou 2%) contendo 2 mg de 5-FU. Submeteu-se as fases à emulsificação e redução de tamanho dos glóbulos através de sonicação por aproximadamente 3 min com o objetivo de formar a emulsão água-em-óleo (A/O). Esta primeira emulsão foi vertida em 10 mL de fase aquosa externa composta de PVA a 2% ou Polissorbato 80 a 3% e uma segunda emulsificação foi realizada por 5 min para formar a dupla emulsão A/O/A. Utilizou-se durante todo o processo de emulsificação banho de gelo para evitar o aquecimento provocado pelo processo, evitando dessa maneira, a evaporação antecipada do solvente. A emulsão resultante foi levada ao evaporador rotatório à pressão negativa por 20 min à 37°C para evaporar o solvente orgânico formando uma suspensão de nanopartículas contendo 5-FU.

As nanopartículas foram submetidas à ultracentrifugação a 14.000 rpm à 4°C, com o intuito de separar o fármaco encapsulado do não-encapsulado. Após a primeira

centrifugação foi isolado o sobrenadante para posterior análise por CLAE e foi realizada a lavagem do precipitado resultante com água purificada. Uma segunda centrifugação foi efetuada nas mesmas condições, e o sobrenadante obtido foi adicionado àquele obtido anteriormente. As nanopartículas resultantes foram ressuspensas em 200 µL de solução de sacarose a 5%, congeladas e liofilizadas. O pó obtido foi mantido em dessecador à temperatura ambiente.

As formulações que apresentaram melhor eficiência de encapsulação e menor tamanho de partícula foram consideradas adequadas para os estudos subsequentes.

Uma análise de formulação foi realizada para determinar as melhores condições experimentais para a obtenção das nanopartículas de 5-FU. Para esta determinação um planejamento fatorial do tipo 2^4 foi utilizado, avaliando-se a influência de fatores da formulação (variáveis independentes) sobre a eficiência de encapsulação do 5-FU nas nanopartículas e menor diâmetro de partícula (variáveis dependentes). Os fatores analisados foram:

- A. tipo de polímero;
- B. concentração de PVA na fase aquosa interna;
- C. tensoativo utilizado na fase aquosa externa;
- D. razão de volume entre a fase oleosa e a fase aquosa externa.

Esses fatores foram avaliados em dois níveis, superior (+1) e inferior (-1). As variáveis estão representadas na tabela 1.

Tabela 1. Variáveis independentes avaliadas no planejamento experimental.

<i>Variáveis Independentes</i>	<i>-1</i>	<i>+1</i>
(A) Tipo de polímero	PLA	PLA-PEG
(B) Concentração PVA na fase interna	0,1%	0,2%
(C) Tensoativo na fase externa	PVA 2%	Polissorbato 80 3%
(D) Razão O/A	1:3	1:5

Esse delineamento resultou em 16 experimentos mais a tréplica de cada ensaio, totalizando 48 experimentos. O plano experimental realizado encontra-se demonstrado na tabela 2. As formulações podem ser visualizadas na tabela 3:

Tabela 2: Delineamento fatorial 2^4 empregado para avaliar a influência dos fatores da formulação sobre a eficiência de encapsulação de 5-FU nas nanopartículas e seu diâmetro médio.

<i>Experimento</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	1
3	-1	-1	1	-1
8	-1	-1	1	1
4	-1	1	-1	-1
7	-1	1	-1	1
6	-1	1	1	-1
9	-1	1	1	1
5	1	-1	-1	-1
14	1	-1	-1	1
15	1	-1	1	-1
13	1	1	-1	-1
10	1	-1	1	1
11	1	1	-1	1
12	1	1	1	-1
16	1	1	1	1

n=3

Tabela 3: Formulações de nanopartículas contendo 5-FU utilizando o delineamento fatorial.

Composição	Polímero		PVA fase interna		Tensoativo da fase externa		Razão O/A	
	PLA	PLA-PEG	0,1%	0,2%	PVA 2%	Polissorbatos 80 3%	1:3	1:5
1	X			X	X			X
2	X		X		X			X
3		X		X	X			X
4		X	X		X			X
5	X			X		X		X
6	X		X			X		X
7		X		X		X		X
8		X	X			X		X
9	X			X	X		X	
10	X		X		X		X	
11		X		X	X		X	
12		X	X		X		X	
13	X			X		X	X	
14	X		X			X	X	
15		X		X		X	X	
16		X	X			X	X	

PLA: Poli(ácido láctico)

PLA-PEG: Poli(ácido láctico) e Polietileno glicol

PVA: Álcool polivinílico

5.4. Caracterização físico-química das nanopartículas

5.4.1. Determinação da eficiência de encapsulação

A determinação da concentração de 5-FU associado às nanopartículas foi realizada indiretamente. Por essa técnica, analisou-se o sobrenadante resultante do processo de ultracentrifugação. Este foi adequadamente diluído em água e analisado por CLAE. As determinações foram realizadas em triplicata. A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada a partir da equação 6:

$$EE\% = \frac{\text{quantidade inicial de 5-FU} - \text{quantidade de 5-FU no sobrenadante}}{\text{quantidade inicial de 5-FU}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

5.4.2. Determinação do diâmetro médio, distribuição de tamanho e índice de polidispersão das nanopartículas

Utilizou-se para esse fim a técnica de espectroscopia de correlação de fótons ou *quase-elastic laser light scattering* (Brookhaven 90 Plus). Para as análises, as nanopartículas de 5-FU foram adequadamente dispersas e diluídas em água ultrapurificada, As diluições foram armazenadas em cubetas fechadas. As amostras foram colocadas na câmara de análise de maneira que o feixe de luz atravessasse a dispersão em toda sua extensão. As análises foram feitas com ângulo de espalhamento de 90°, à 25°C e comprimento de onda do laser de 532 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Foram realizadas 3 determinações de diâmetro médio e índice de

polidispersidade para cada amostra, calculando-se a média e os respectivos desvios padrão e coeficientes de variação.

5.5. Espectroscopia na região do infravermelho

A fim de verificar se o processo de nanoencapsulação alterou a estrutura química do fármaco através de possíveis interações fármaco-polímero, foram realizadas análises na região do infravermelho. Foram analisadas amostras de nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo 5-FU, preparadas em pastilhas de KBr (pastilhas com carga de 1% de amostra) Os espectros de infravermelho obtidos foram avaliados frente aos espectros do 5-FU livre, dos polímeros e das respectivas misturas físicas.

5.6. Determinação do perfil de liberação *in vitro* do 5-FU a partir das nanopartículas de PLA e PLA-PEG

O perfil de liberação *in vitro* do 5-FU a partir das nanopartículas foi determinado utilizando o sistema de células de difusão de *Franz*. Esse sistema é caracterizado como uma célula de difusão estática, de dose finita, no qual a amostra é colocada sob uma membrana que permanece em contato direto com o meio receptor, permitindo a permeação de moléculas do meio doador para o meio receptor. As células possuem uma área de difusão de 1,76 cm² e com volume nominal do compartimento receptor de 7,0 mL.

Aliquotas de 30 µL da dispersão de nanopartículas contendo aproximadamente 1,5 mg de 5-FU foram colocadas na área doadora da célula de *Franz*, sob uma membrana de acetato de celulose (0,22 µm).. O meio receptor foi composto por uma

solução tampão fosfato 50 mM e pH 7,4 contendo PVA 1%, para assegurar as condições *sink*, totalizando 7 mL. Os sistemas foram mantidos sob agitação a 400 rpm à 37°C e alíquotas de 1 mL foram coletas em tempos pré-determinados: 0; 0,3; 2; 4; 8; 12; 24; 48; 72, 120; 168; 216, 264 e 312 h. Os volumes coletados foram imediatamente repostos com o mesmo meio de liberação. As amostras foram analisadas por CLAE conforme as condições descritas previamente. As análises foram realizadas em triplicata e as concentrações de 5-FU determinadas utilizando a equação da reta da curva analítica do 5-FU em tampão fosfato pH 7,4. A partir dos resultados calculados, curvas do percentual cumulativo de 5-FU liberado em função do tempo foram plotadas.

A avaliação matemática dos perfis de liberação *in vitro* foi realizado pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo de ordem zero, de primeira ordem e à equação de Korsmeyer-Peppas, segundo a tabela 4.

Tabela 4. Ordem/modelos de cinética de liberação usados para avaliar o perfil de liberação do 5-FU a partir das nanopartículas de PLA e PLA-PEG.

<i>Ordem/Modelo</i>	<i>Equação</i>
Ordem Zero	$Q_t = Q_0 + K_0t$
Primeira Ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1t$
Korsmeyers-Peppas	$ft = at^n$

Q_t é a quantidade de fármaco liberado ao tempo t ; Q_0 é a quantidade inicial de fármaco no tempo zero; K_0 é a constante de liberação de ordem zero; K_1 é a constante de liberação de primeira ordem; t é o tempo do ensaio; ft é fração do fármaco dissolvido no tempo t ; a é a constante que incorpora as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica; e n é o expoente de liberação que indica o mecanismo de liberação.

A análise matemática dos perfis de liberação *in vitro* foi realizada para ampliar as informações sobre o mecanismo de liberação do 5-FU a partir nas nanopartículas.

5.7. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas contendo 5-FU sobre linhagem tumoral

Para os ensaios de citotoxicidade utilizou-se linhagem celular de carcinoma de laringe humana (Hep-2, ATCC-CCL-23). As células foram mantidas em cultura contínua em garrafas plásticas de cultura, com realização de repiques periódicos até atingirem a densidade de confluência. O meio de cultura ISCOV'S foi utilizado para manter a osmolaridade e o pH compatíveis com a viabilidade celular permitindo o crescimento e manutenção das células. Durante todo o experimento foi realizado o controle da temperatura em 37°C e dos níveis de CO₂ da estufa em 5% (Melo *et al.*, 2000). O meio de cultura foi suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Todo o manuseio com as células ocorreu sob fluxo laminar e com material estéril para prevenir contaminação da cultura celular.

O número de células viáveis foi avaliado pelo método da contagem em câmara de Neubauer através do teste de exclusão pelo corante azul de tripan (0,5%). O azul de tripan é um corante que é incorporado seletivamente pelas células mortas nas quais a integridade da membrana celular é danificada. Calculou-se a viabilidade celular em porcentagem (%) através da seguinte equação 7:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{número de células não coradas}}{\text{número total de células}} \times 100 \quad \text{Eq. 7}$$

Para o ensaio de citotoxicidade, volumes de 0,2 mL de uma suspensão com 1x10⁵ células/mL da linhagem HEP-2 foram distribuídos nos 96 poços das microplacas, que em seguida foram incubadas por 24 h à 37°C em estufa com 5% de CO₂ com o

intuito de formar uma monocamada celular. Após esse período, o meio de cultura foi substituído pelas diluições seriadas da solução do fármaco livre e das dispersões de nanopartículas e completou-se os volumes para 0,2 mL com meio ISCOV'S, sendo incubadas por 24, 48 e 72 h. Depois dos períodos pré-determinados, as células foram lavadas com tampão PBS 50 mM, pH 7,4. Houve então o processamento das culturas de acordo com os protocolos específicos para redução do MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio).

Inicialmente foram realizados estudos para determinar o IC_{50} do fármaco livre (concentração que inibe em 50% a viabilidade celular no parâmetro analisado). Para este fim, as células foram tratadas com soluções de 5-FU em meio nutritivo, sendo que em cada poço da placa foram adicionados 5 μ L de solução do fármaco resultando em concentrações finais nos poços de 10, 20, 40 e 80 μ M e 195 μ L de meio de cultura .

No ensaio com as nanopartículas, determinadas concentrações de nanopartículas contendo 5-FU foram dispersas em PBS (50 mM, pH 7,4) para preparar as concentrações-padrão (1, 5, 10, 20, 40 e 80 μ M). Em seguida, em cada poço da placa foi adicionado 5 μ L das concentrações-padrão e 195 μ L de meio ISCOV'S.

A redução do MTT demonstra o correto funcionamento enzimático, principalmente a atividade de desidrogenases. O MTT é um corante amarelo que é reduzido a um composto azul chamado formazan (insolúvel em água) por células que mantêm a integridade mitocondrial. A quantidade de formazan pode ser determinada espectroscopicamente após solubilização em etanol absoluto (DENIZOT & LANG, 1986).

O teste do MTT foi realizado de acordo com a metodologia de DENIZOT & LANG (1986). Seguindo esse método, após os tempos de tratamento o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com tampão PBS pH 7,4, com posterior adição de meio de cultura contendo 1 mg/mL de MTT em cada cavidade. As placas foram

incubadas à 37°C por 4 h. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e 50 µL de etanol foram adicionados em cada cavidade e, para solubilizar completamente os cristais após 5 min adicionou-se 150 µL de uma mistura de álcool isopropílico e de tampão PBS pH 7,4 (1:1). As placas foram agitadas e então as absorbâncias das soluções foram analisadas em 570 e 630 nm em espectrofotômetro de placas.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade após o tratamento das células HEP-2 com o fármaco livre, com as nanopartículas brancas e contendo 5-FU foram analisados e comparados estatisticamente pela ANOVA.

5.8. Ensaio de farmacocinética pré-clínica

5.8.1. Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação de 5-FU em plasma de rato

5.8.1.1 Preparação das soluções padrão de 5-FU e do controle de qualidade

Uma solução estoque de 5-FU e de timina (padrão interno - PI) foi preparada dissolvendo 10 mg de cada composto em 10 mL de água, resultando em uma solução estoque de 1000 µg/mL. Para preparação da curva analítica, sete concentrações foram preparadas através de diluições seriadas da solução estoque obtendo-se as concentrações de 50, 75, 100, 250, 500, 1000 e 2000 ng/mL. A curva analítica foi preparada em plasma branco de ratos machos *Wistar*.

Em cada dia de análise, realizou-se o controle de qualidade através da preparação de amostras nas concentrações de 100 ng/mL (concentração baixa), 500 ng/mL (concentração média) e 2000 ng/mL (concentração alta).

5.8.2. Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas consistiram em: i) fase móvel composta de uma mistura de metanol e água (5:95, v/v), a qual foi eluída no modo isocrático, com fluxo de 1,0 mL/min, ii) detector de fotodiodos (*photodiode array* – PDA) no comprimento de onda de 265 nm, e iii) volume de injeção da amostra de 20 µL.

A fase móvel foi previamente filtrada por membrana de poro 0,45µm e em seguida degaseificada por meio de sonicação por banho por 30 min.

5.8.3. Validação do método bioanalítico

A validação do método bioanalítico foi realizada seguindo as diretrizes do ICH (2005) e da Resolução nº 899 de 2003 da ANVISA.

A linearidade do método foi verificada utilizando a metodologia dos quadrados mínimos através da construção de uma curva analítica contendo sete concentrações de 5-FU em plasma de rato (50, 75, 100, 250, 500, 1000 e 2000 ng/mL) (n=10).

A precisão foi realizado através da análise da precisão intra-corrída e inter-corrídas. Para ambas as análises foram utilizados padrões de 5-FU nas concentrações de 100, 1000 e 2000 ng/mL. A precisão intra-corrída ou repetibilidade foi realizada em um mesmo dia sendo que para tal realizou-se cinco determinações para cada concentração, enquanto a precisão inter-corrídas ou intermediária, foi desempenhada em três dias diferentes utilizando-se as amostras já citadas e também em quintuplicata. Os resultados obtidos foram submetidos ao cálculo do CV%, seguindo a equação 1, já descrita no subítem 5.2.3.

Avaliou-se a exatidão através da análise da amostra de concentração conhecida comparando-se o valor mensurado com o valor teórico. Realizaram-se determinações de três amostras de concentração conhecida, sendo uma baixa (100 ng/mL), uma média (1000 ng/mL) e uma alta (2000 ng/mL), contemplando o intervalo linear da curva analítica. Cada concentração foi analisada cinco vezes. Os resultados foram expressos como percentual de recuperação, de acordo com a Eq. 2, descrita no subitem 5.2.4.

A especificidade do método foi verificada através da comparação do cromatograma de uma amostra (plasma contendo 5-FU) com o cromatograma do plasma branco, objetivando verificar se houve interferência dos componentes do plasma no tempo de retenção do 5-FU.

O LD e LQ do método foram calculados utilizando parâmetros obtidos a partir da curva analítica e aplicando-os nas equações 3 e 4, descritas nos subitem 5.2.6.

A estabilidade do fármaco no plasma foi avaliada após 4 ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando três padrões nas concentrações baixa, média e alta, dentro do intervalo linear da curva (100, 1000 e 2000 ng/mL). Foram realizados testes de curta e longa duração. Para realização do teste de estabilidade de curta duração, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 24 h, sendo então submetidas à análise por CLAE. Para o ensaio de estabilidade de longa duração, utilizou-se amostras armazenadas à -20°C por 46 dias. Para essa finalidade, amostras de plasma contendo 5-FU em três concentrações (100, 1000 e 2000 ng/mL) foram mantidas a -20°C por 46 dias, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas por 24 h e, assim sucessivamente, até completar três ciclos de congelamento e descongelamento. Após o último descongelamento, as amostras foram analisadas por CLAE. Os resultados foram comparados com os obtidos de análise de amostras recém-preparadas.

5.8.4. Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos após administração oral de dose única em ratos

Para realização do estudo de farmacocinética pré-clínica foram utilizados ratos *Wistar* machos (Biotério UNICENTRO) pesando entre 200 e 270 g. Os animais (n=15) foram mantidos separados com livre acesso a água e alimentação, com ciclos de 12 horas claro-escuro. Após os experimentos os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso com Animais (UNICENTRO), parecer n°. 042/2012.

As formulações (nanopartículas de PLA contendo 5-FU, nanopartículas de PLA-PEG contendo 5-FU e solução aquosa de 5-FU) foram ressuspensas em 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 e administradas pela via oral, por meio de gavagem (n=5). As formulações foram administradas na dose de 50 mg/kg de 5-FU. As nanopartículas foram previamente dispersas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4. Amostras de sangue foram coletadas (500 µL), através de uma incisão feita na cauda, em intervalos de tempo pré-determinados (0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10 e 12h), após a administração. As amostras foram acondicionadas em tubos heparinizados e centrifugadas a 3500 rpm por 10 min. O plasma obtido foi acondicionado a -20°C para posterior procedimento.

As amostras de plasma foram desproteinizadas pela adição de 200 µL de acetonitrila. A mistura foi submetida à centrifugação a 3500 rpm por 10 min. Nos sobrenadantes obtidos foram adicionados 100 µL de solução de padrão interno na concentração de 250 ng/mL. As soluções resultantes foram filtradas em membrana de poro 22 µm e analisadas por CLAE.

5.8.4.1. Análise dos dados e estatística

Os parâmetros farmacocinéticos foram estimados utilizando o método de modelo independente. A constante de eliminação (K_e) foi estimada pela análise da regressão linear da porção terminal do log da concentração plasmática *versus* tempo do perfil do 5-FU. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi calculado a partir da fórmula $t_{1/2} = 0,693/K_e$. A concentração plasmática máxima (C_{max}) e o tempo necessário para alcançá-la (T_{max}) foram obtidos a partir da curva de concentração plasmática do 5-FU em função do tempo. A área sob a curva (AUC, ng/mL.h) foi calculada pelo método dos trapezoides e extrapolado o tempo até o infinito por meio da adição da concentração final dividida pela constante de eliminação (C_{final}/K_e). O *clearance* corporal aparente (Cl) foi calculado usando a equação $Cl = dose/AUC$. O volume de distribuição aparente (Vd) foi calculado pela equação $Vd = dose/K_e \cdot AUC$. A análise estatística dos dados foi feita através da análise de variância (ANOVA). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos se $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para determinação de 5-FU em nanopartículas

6.1.1. Condições cromatográficas

Devido à elevada hidrossolubilidade do 5-FU solventes hidrofílicos foram utilizados para reduzir a afinidade do fármaco pela a coluna de fase reversa C18 (25cm X 4,6mm) tamanho de partícula 5 μ m - Waters Alliance e, assim, buscar um curto tempo de retenção.

Inicialmente foi utilizada a metodologia descrita na USP 34 (2010) para análise quantitativa de 5-FU, que descreve a água ultrapura como fase móvel, com fluxo de 1,0 mL/min. Contudo, os picos irregulares foram observados (Figura 5). Isso pode ter ocorrido devido a diferenças instrumentais ou da coluna.

Objetivando encontrar a fase móvel ideal, optou-se por adicionar acetonitrila na fase móvel recomendada pela USP 34 (2010), a fim de melhorar a resolução dos picos cromatográficos de 5-FU. Eluições foram realizadas utilizando acetonitrila e água em várias proporções, no modo isocrático, variando as proporções de acetonitrila:água (partindo de 10:90, v/v a 30:70, v/v). Observou-se a ocorrência de picos irregulares de 5-FU quando as proporções de acetonitrila foram aumentando. Com o aumento da proporção de água na fase móvel, o pico de 5-FU foi tornando-se mais regular e quando foi usada a proporção de acetonitrila:água 10:90 (v/v), foi observado um pico com regular simetria. Nestas condições, o pico de 5-FU foi detectado em aproximadamente

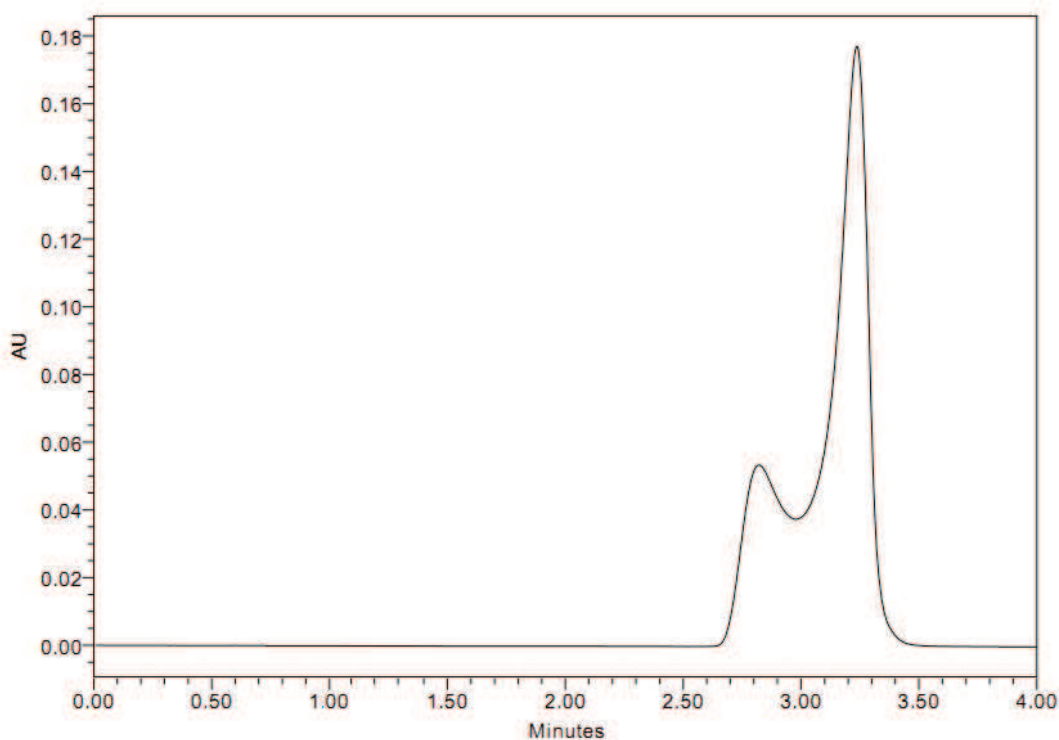
3,5 minutos (Figura 6). A análise foi realizada de acordo com as condições descritas na tabela 5.

Tabela 5. Condições cromatográficas utilizadas na quantificação do 5-FU.

Característica	Condições Cromatográficas
Detecção	UV ($\lambda = 254$ e 265 nm)
Fluxo	1,0 mL/minuto
Fase Móvel	acetonitrila:água (10:90, v/v)
Volume de injeção	100 μ L

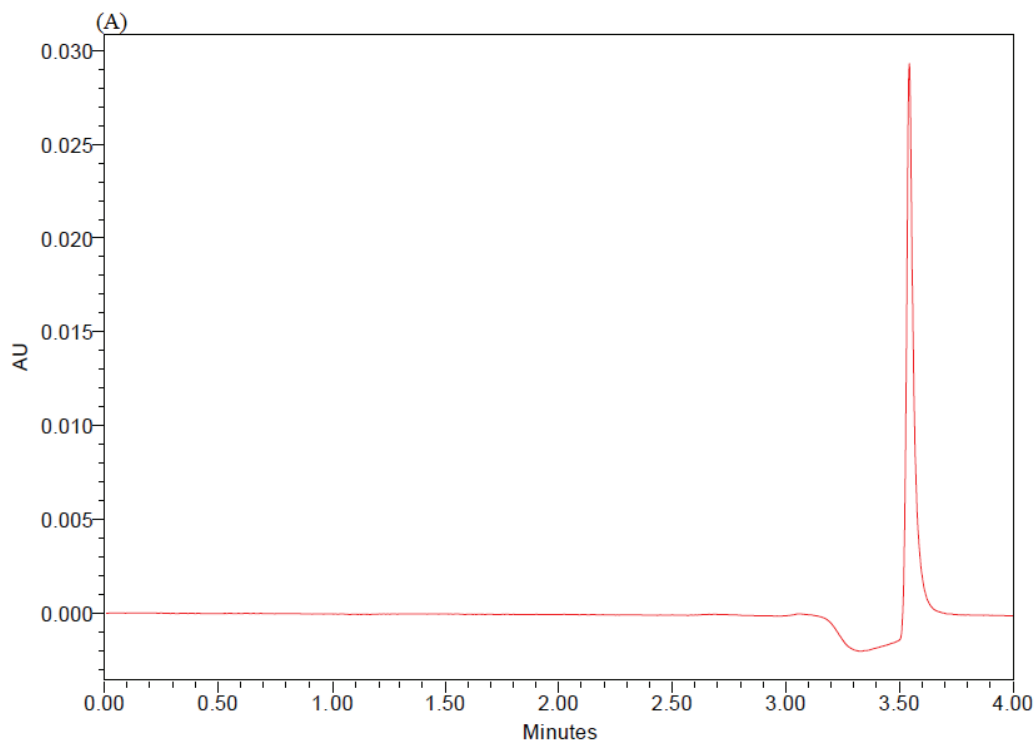
A detecção foi realizada inicialmente em dois comprimentos de onda, 254 nm e 265 nm, porém, observou-se que no comprimento de onda de 265 nm os picos eram mais simétricos, sendo posteriormente esse comprimento de onda utilizado nas análises (Fig. 6). O tempo de corrida determinado foi de 5 minutos, já que o tempo de retenção do 5-FU foi de aproximadamente 3,5 min.

Figura 5. Cromatograma da solução-padrão de 5-FU 1,0 μ g/mL. (Fase móvel: água ultrapura em 265 nm).



A padronização e validação de uma metodologia analítica para quantificação do 5-FU foi desenvolvida uma vez que é necessária em diversas fases do desenvolvimento de uma formulação farmacêutica.

Figura 6. Cromatograma da solução-padrão de 5-FU 0,1 $\mu\text{g/mL}$. (A) Fase móvel: água ultrapura:acetonitrila (10:90,v/v) em 254 nm; (B) Fase móvel: água ultrapura:acetonitrilal (10:90, v/v) em 265 nm.



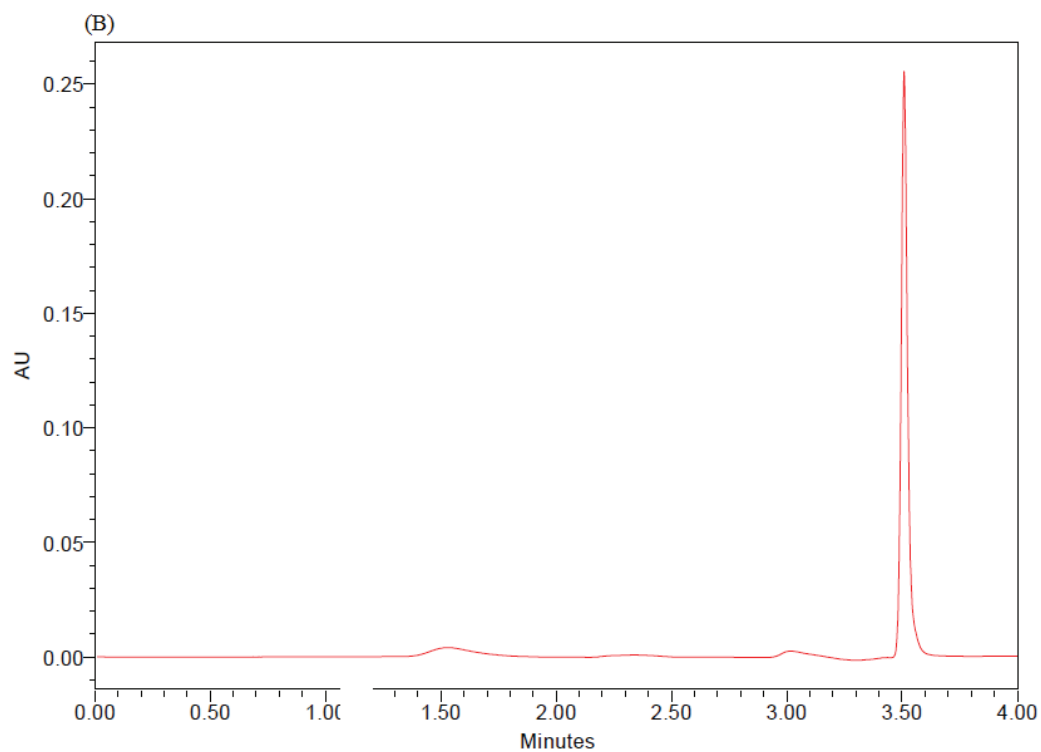
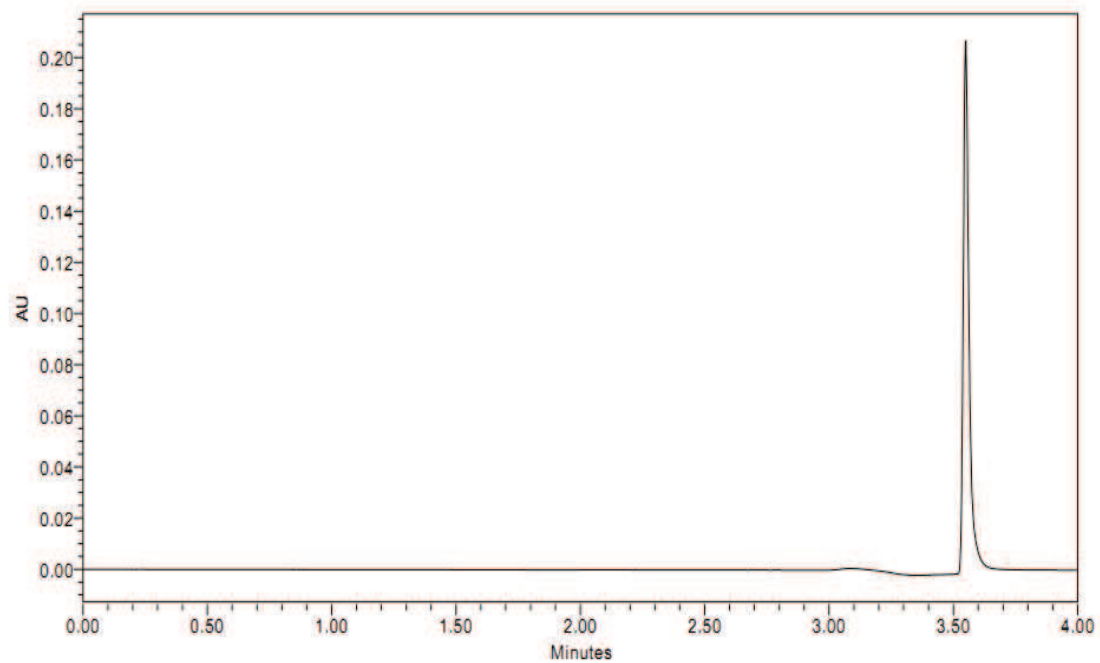


Figura 7. Cromatograma da solução-padrão de 5-FU 1,0 $\mu\text{g/mL}$. (Fase móvel: água 90%: acetonitrila 10% em 265 nm).



6.2. Parâmetros de validação

6.2.1. Especificidade

Para analisar a especificidade do método realizou-se a análise do sinal produzido pelo PVA, principal interferente presente no sobrenadante obtido do processo de separação das nanopartículas do fármaco livre. Uma solução aquosa de PVA 1% foi analisada pelo método de HPLC descrito e comparou-se o cromatograma (Fig. 8) com os obtidos com a solução-padrão de 5-FU (Fig. 7) e da amostra (5-FU presente no sobrenadante) (Fig 9).

Figura 8. Cromatograma da amostra de PVA 1%. (Fase móvel: água 90%: acetonitrila 10% em 265 nm).

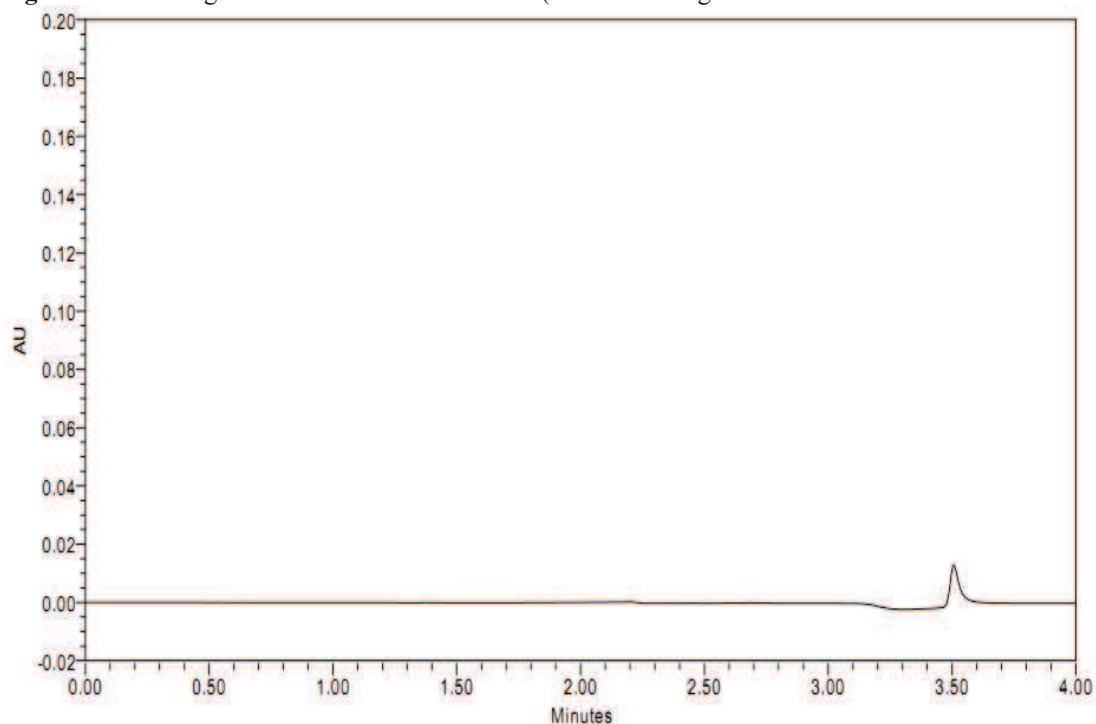
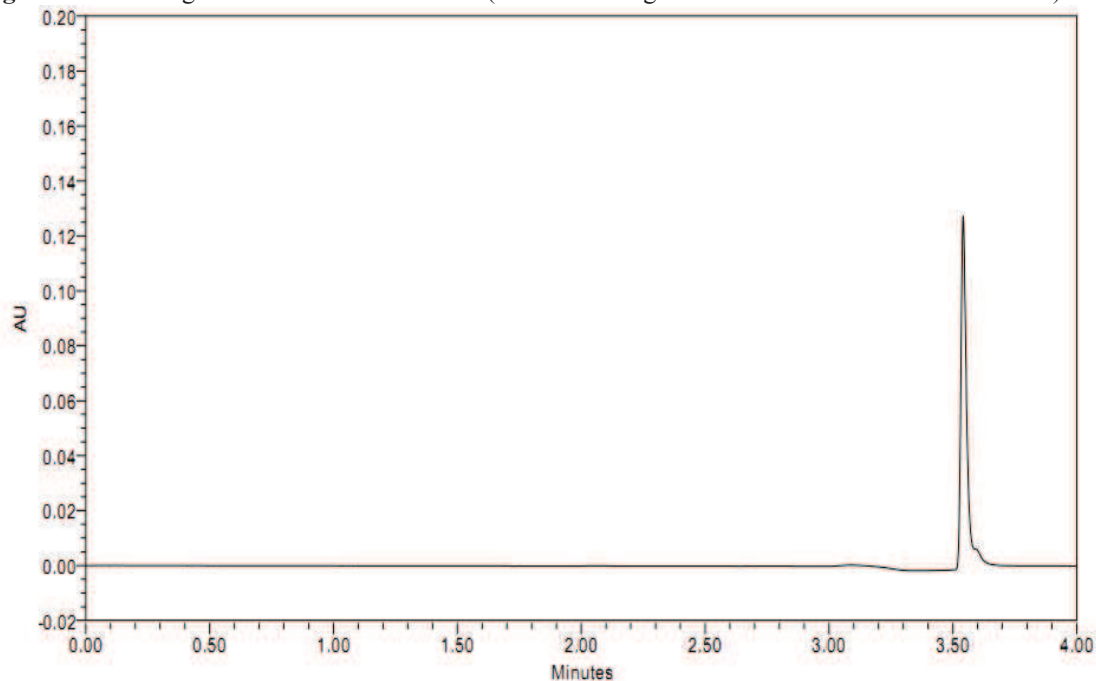


Figura 9. Cromatograma da amostra de 5-FU . (Fase móvel: água 90%: acetonitrila 10% em 265 nm).



Observou-se que o pico da solução aquosa de PVA ocorreu no mesmo tempo de retenção do pico do 5-FU, mas é muito reduzido, não interferindo na determinação quantitativa do 5-FU a partir dos componentes da formulação. Para confirmar isso, analisou-se o 5-FU preparado em uma solução aquosa de PVA 1% e comparou-se com uma solução padrão de 5-FU em água (modo habitual). A porcentagem de recuperação do 5-FU, em solução aquosa de PVA foi 99,89% (n=3), confirmando a especificidade. Outro procedimento realizado foi à submissão dos padrões de 5-FU (0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$) às condições de estresse, a fim de detectar a ocorrência de eventuais picos de interferência a 265 nm resultante da degradação do fármaco. Os resultados encontram-se expressos na tabela 6.

Tabela 6. Resultados para os padrões de 5-FU sob condições de estresse.

Condições de estresse	Recuperação (%) \pm DPR			
	0,1 μ g/mL	1,0 μ g/mL	10,0 μ g/mL	Média
Referência	99,60 \pm 1,80	104,27 \pm 3,82	104,56 \pm 0,73	102,81 \pm 2,12
Luz Visível	104,46 \pm 3,51	107,50 \pm 2,42	103,90 \pm 0,49	105,29 \pm 2,14
Congelamento	103,31 \pm 2,65	105,36 \pm 0,81	103,20 \pm 1,00	103,96 \pm 1,49
pH Básico	0,00 \pm 35,07	10,36 \pm 38,06	2,34 \pm 38,64	4,23 \pm 37,26
pH Ácido	100,47 \pm 0,33	109,06 \pm 3,62	103,13 \pm 1,05	104,22 \pm 1,67
Oxidação	100,47 \pm 0,61	106,23 \pm 1,46	104,60 \pm 0,03	107,10 \pm 0,70

Estes ensaios são considerados ferramentais úteis para estabelecer vias de degradação e a estabilidade intrínseca da molécula, e ajuda a validar o poder do método para o estudo de estabilidade do fármaco (DAS NEVES *et al.*, 2010).

A análise dessas condições demonstrou que nem todas às variáveis testadas interferem na porcentagem de recuperação do fármaco, sendo que a principal interferência foi verificada nas amostras tratadas com NaOH 1M; uma vez que os resultados estão de acordo com as condições estabelecidas pela ANVISA. A menor porcentagem de recuperação foi relativa à mudança do pH da amostra para pH básico, além disso, houve o aparecimento de picos adicionais como pode ser observado na figura 9 e impedimento da detecção do fármaco na menor concentração. Outra condição que apresentou picos adicionais foi o processo de oxidação. As figuras 10 a 14 demonstram os cromatogramas dos padrões de 5-FU após as condições de estresse.

Figura 10. Cromatograma do padrão de 5-FU 1,0 $\mu\text{g/mL}$ tratada com NaOH 1M. (Fase móvel: água 90%: acetonitrila 10% em 265 nm).

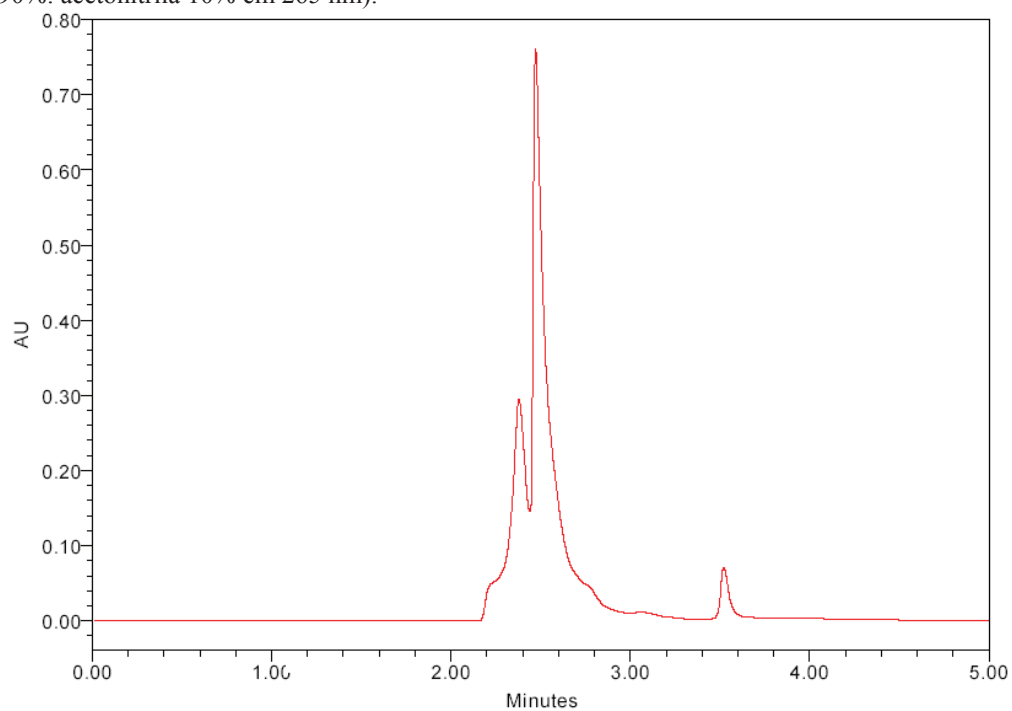


Figura 11. Cromatograma do padrão de 5-FU 0,1 $\mu\text{g/mL}$ após 24 horas de congelamento. (Fase móvel: água 90%: acetonitrila 10% em 265 nm).

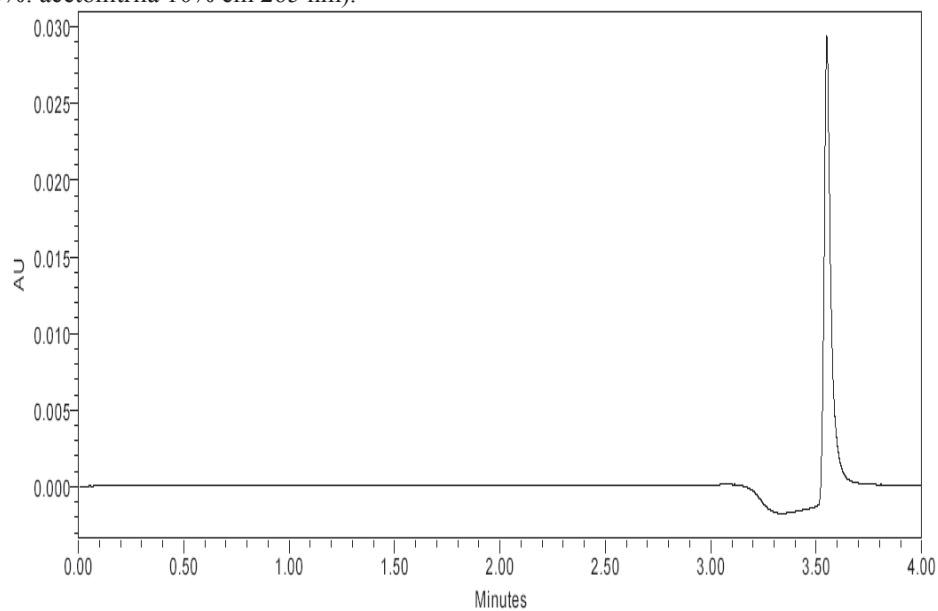


Figura 12. Cromatograma do padrão de 5-FU 0,1 µg/mL tratada com H₂O₂. (Fase móvel: água 90%: acetonitrila 10% em 265 nm).

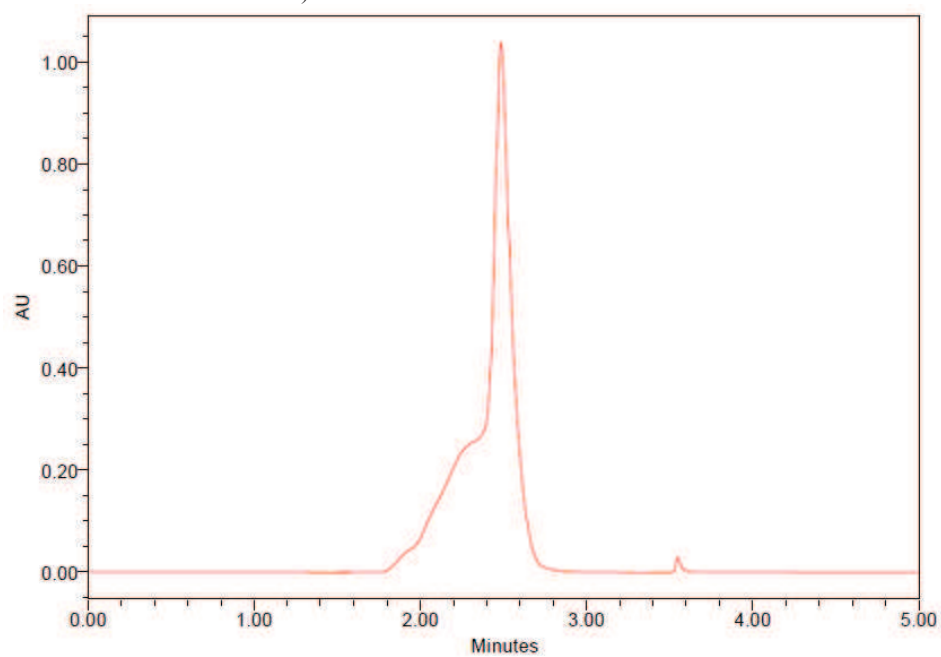


Figura 13. Cromatograma do padrão de 5-FU 0,1 µg/mL tratada com HCl 1M. (Fase móvel: água 90%: acetonitrila 10% em 265 nm).

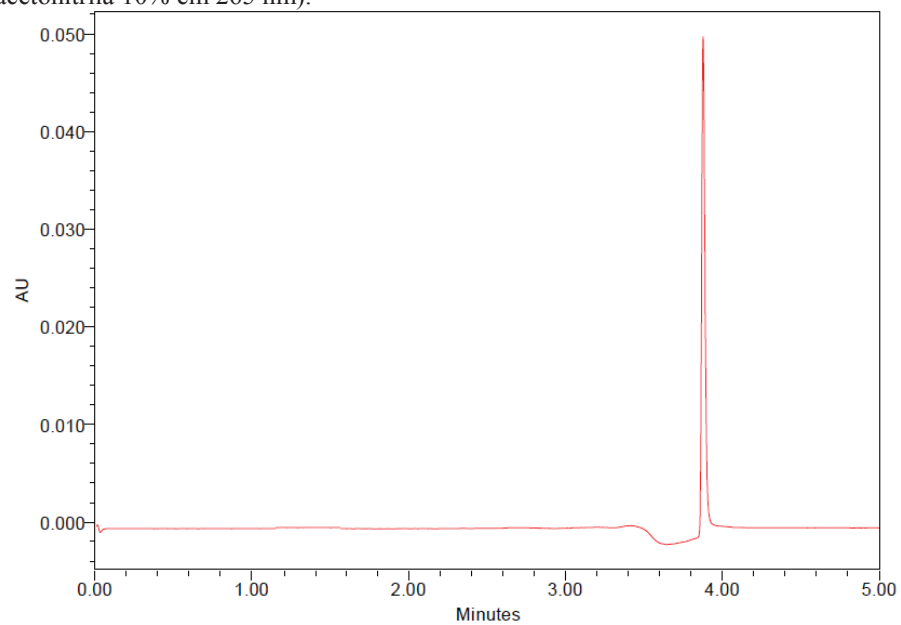
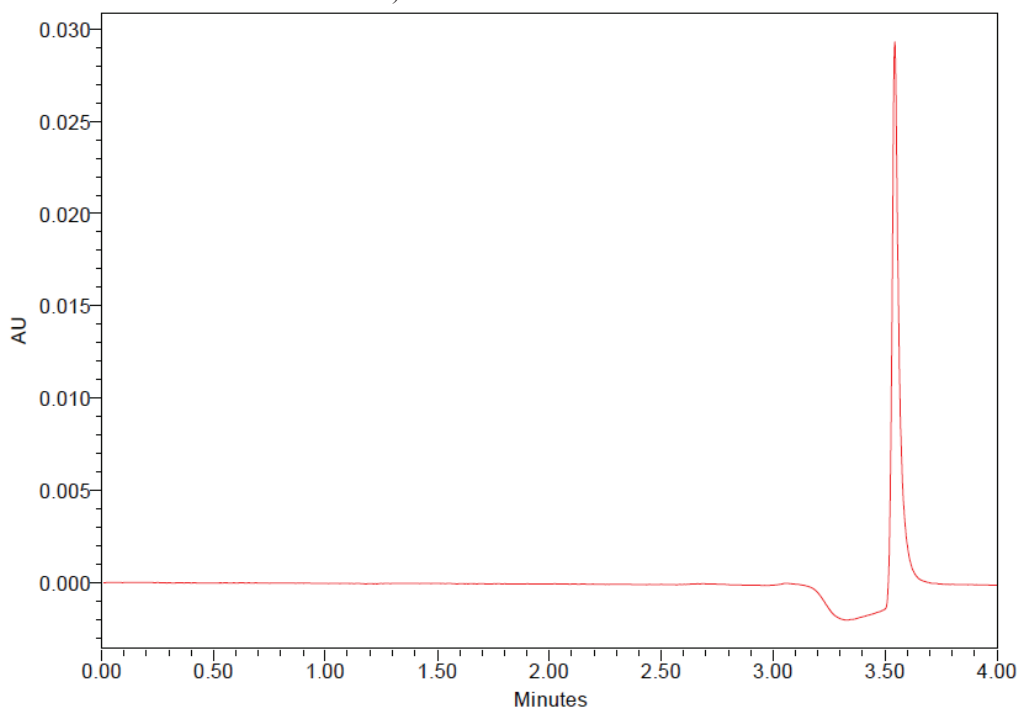


Figura 14. Cromatograma do padrão de 5-FU 0,1 µg/mL após 24 hs de exposição à luz. (Fase móvel: água 90%: acetonitrila 10% em 265 nm).



6.2.2. Linearidade

Para determinação da linearidade oito concentrações de 5-FU em solução aquosa foram analisadas: 0,1, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL. A figura 15 mostra o gráfico da área do pico do 5-FU em função da sua concentração. Observa-se uma completa linearidade, com coeficiente de correlação (r^2) de 0,999.

Análises posteriores foram realizadas utilizando soluções-padrão preparadas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4, meio onde as nanopartículas contendo 5-FU foram avaliadas quanto ao seu perfil de liberação *in vitro*. A curva analítica foi construída na mesma faixa de concentração (0,1 a 10 µg/mL). O resultado equivalente em relação às soluções-padrão anteriores mostrou que a modificação do meio não interferiu nesta técnica. O coeficiente de correlação obtido foi 0,999.

A validade do método foi confirmada por análise de variância, que mostrou que a regressão linear foi significativa e o desvio da linearidade não foi significativo ($p < 0,01$), garantindo confiança no uso das equações das retas obtidas por essas curvas analíticas (Figuras 15 e 16).

Figura 15. Curva analítica do 5-FU em água. (Fase móvel: água 90%: acetonitrila 10% em 265 nm).

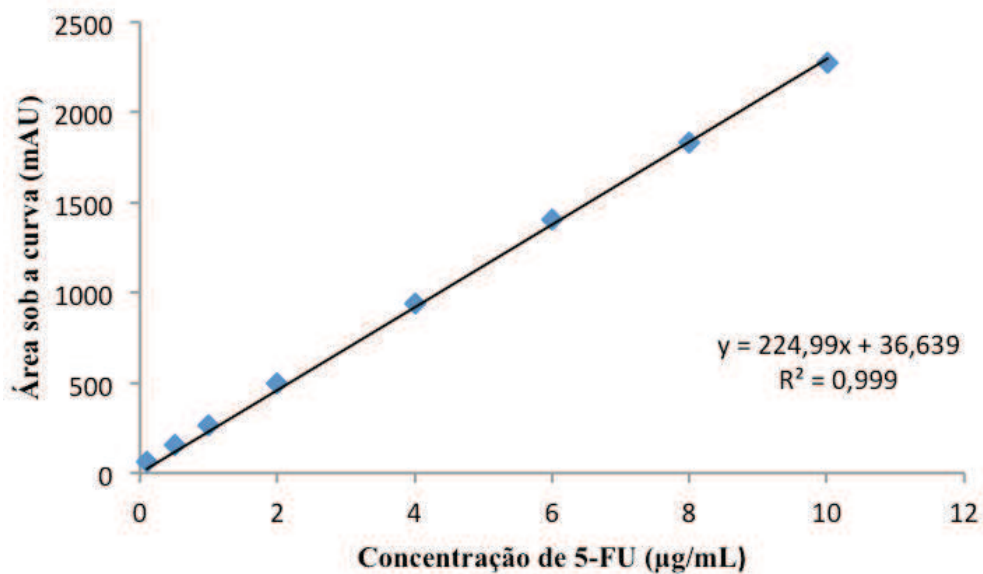
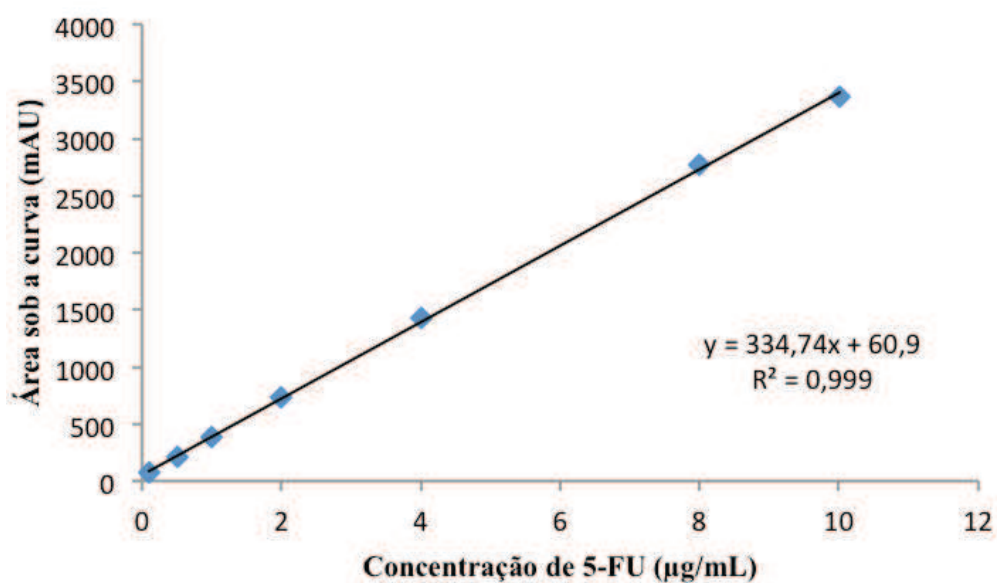


Figura 16. Curva analítica do 5-FU em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4. (Fase móvel: água 90%: acetonitrila 10% em 265 nm).



6.2.3. Exatidão

A exatidão foi calculada pelo método da porcentagem de recuperação e DPR da concentração média do analito em três concentrações diferentes. Os resultados estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Resultados da exatidão para os padrões de 5-FU.

Solução Padrão ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	DPR
0,1	99,55	1,27
1,0	98,58	0,17
10	99,71	1,87

n=3

A ANVISA (2003) preconiza que o DPR máximo seja de 5%, com isso é possível perceber que os resultados mostram concordância entre os valores experimentais e teórico, demonstrando que o método é exato.

6.2.4. Precisão

A precisão é uma medida para os erros relativos do método e é expressa como DPR para a repetibilidade e precisão intermediária. Três concentrações de 5-FU (0,1, 1 e 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$) foram preparadas em triplicada e analisadas em um dia ou três dias diferentes, a fim de avaliar as variações intra-dia e inter-dia, respectivamente. O DPR da resposta foi calculada, em cada caso e são apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Precisões intra e inter-corridas.

Solução Padrão µg/mL	Média da concentração Medida	DP	DPR
Análise intra-corrída (n=3)			
0,1	0,09	0,02	1,87
1,0	0,99	0,01	0,17
10,0	9,97	0,13	1,27
Análise inter-corrídas (n=3)			
Dia 1			
0,1	0,10	0,01	1,92
1,0	0,97	0,03	2,58
10,0	10,37	0,17	1,63
Dia 2			
0,1	0,09	0,00	1,46
1,0	0,95	0,02	2,11
10,0	10,14	0,07	0,70
Dia 3			
0,1	0,10	0,01	1,66
1,0	1,04	0,04	3,51
10,0	10,45	0,07	0,63

n=3

O DPR máximo obtido foi de 3,51%, demonstrando que o método é preciso, pois os valores do coeficiente de variação foram inferiores a 5, limite máximo preconizado pela ANVISA (2003).

6.2.5. Precisão Instrumental

A precisão do instrumento é uma medida dos erros relativos do equipamento e é expressa como DPR para a repetibilidade. Para essa análise, uma concentração de 5-FU de 1,0 µg/mL foi preparada e analisada dez vezes. Os resultados estão mostrados na tabela 9 e indicam a precisão.

Tabela 9. Resultado da precisão instrumental para a concentração padrão de 5-FU.

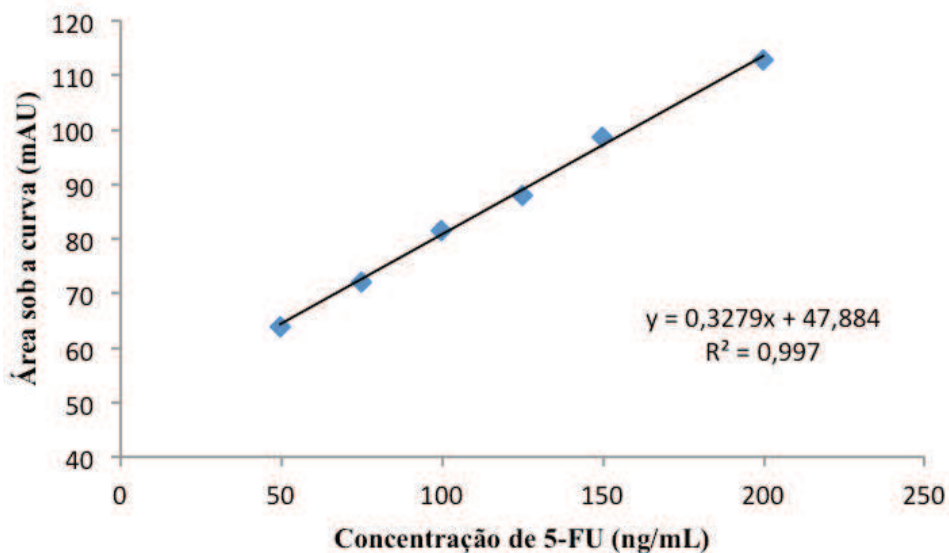
Solução padrão	Recuperação (%)	Coefficiente de Variação (%)
1,0 µg/mL	98,57	0,13

* n=10

6.2.6. Limites de detecção e quantificação

O LD e LQ foi calculado a partir do desvio padrão da resposta e do declive obtido a partir da regressão linear de uma curva de calibração específica (50,0, 75,0, 100,0, 125,0, 150,0 e 200,0 ng/mL), na região da extremidade inferior do intervalo previsto (ICH, 2005) (Fig. 17).

Figura 17. Curva analítica para cálculo dos limites de detecção e quantificação de 5-FU em água. (Fase móvel: água 90%: acetonitrila 10% em 265 nm).



Os valores obtidos para LD e LQ foram 10,86 ng/mL e 32,78 ng/mL, respectivamente .

6.2.7. Faixa de trabalho

A faixa de concentração do método, definido como o intervalo que possui a requerida linearidade, exatidão e precisão, situou-se entre o LQ e 10 µg/mL. Portanto, as amostras que contêm estes níveis de concentração podem ser analisadas pelo método de CLAE proposto.

6.2.8. Robustez

Com o intuito de analisar a robustez do método, algumas variações foram realizadas, e avaliou-se a percentagem de recuperação e o DPR. Os resultados estão demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados de robustez para diferentes concentrações de 5-FU.

Variações	Recuperação (%) ± DPR		
	0,1 µg/mL	1,0 µg/mL	10,0 µg/mL
Fluxo 0,9 mL/min	104,80 ± 3,48	103,53 ± 2,22	99,23 ± 1,76
Fluxo 1,1 mL/min	107,37 ± 3,45	102,40 ± 2,31	100,40 ± 1,05
Coluna Vertical Chromatography	97,33 ± 0,01	105,50 ± 0,07	106,56 ± 0,65
Forno à 35°C	98,43 ± 0,01	105,90 ± 0,04	97,85 ± 0,77

n=3

Esse ensaio foi importante porque demonstrou que pequenas variações nas condições de análise do método não influenciam a análise quantitativa, pois todos os valores encontrados estão de acordo com a legislação vigente.

Um rápido, simples e confiável método analítico por CLAE utilizando detector PDA foi desenvolvido e validado de acordo com as diretrizes da ANVISA e do ICH. O método cumpriu todos os requisitos para ser considerado confiável e viável, que inclui especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e LQ e LD. O procedimento analítico teve um tempo de corrida cromatográfica de apenas 5 minutos, o que permite a análise de um grande número de amostras em um curto período de tempo.

O método proposto pode ser aplicado não apenas para a determinação da eficiência de encapsulação de 5-FU em nanopartículas, mas para os outros ensaios, tais como perfil de liberação *in vitro* do 5-FU e os estudos de estabilidade.

6.3. Obtenção das nanopartículas contendo 5-FU

O método da dupla emulsão-evaporação do solvente (A/O/A) demonstrou ser eficiente para a obtenção de nanopartículas contendo 5-FU. Esse método é particularmente adequado para a encapsulação de moléculas hidrofílicas, como é o caso do 5-FU, no qual este fica retido na fase aquosa interna, enquanto a fase intermediária da emulsão apresenta característica apolar, o que dificulta a migração do fármaco para a fase aquosa externa. Preparou-se nanopartículas, cuja composição polimérica foi o PLA, como também nanopartículas compostas por blendas (misturas físicas) de PLA-PEG, utilizando PEG com peso molecular de 10 kDa.

O PEG é um polímero hidrofílico e bastante biocompatível, e sua adição à formulação foi realizada com o objetivo de verificar a sua influência nos parâmetros físico-químicos e biológicos das nanopartículas.

6.4. Caracterização físico-química das nanopartículas

6.4.1. Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada indiretamente pela leitura do sobrenadante obtido após ultracentrifugação das nanopartículas. Os resultados encontram-se na tabela 11.

Tabela 11. Valores das eficiências de encapsulação do 5-FU nas nanopartículas de PLA e PLA-PEG

Formulações de PLA	Média ± DPR	Formulações de PLA-PEG	Média ± DPR
1	51,23±2,26	3	55,53±9,21
2	28,90±7,05	4	52,92±8,70
5	31,56±8,09	7	24,08±2,99
6	17,05±2,80	8	19,67±1,57
9	53,37±10,34	11	53,76±2,18
10	34,54±14,26	12	38,70±13,10
13	24,53±4,71	15	37,13±3,09
14	19,27±2,43	16	14,82±6,24

n=3

A eficiência de encapsulação do 5-FU nas nanopartículas variou de 14,82 a 55,53%, porém previsível em se tratando da característica hidrofílica do fármaco.

Trabalhos na literatura já demonstraram que no caso de fármacos hidrofílicos, como é o caso do 5-FU, que possui solubilidade em água de 12 g/L, pode ser obtido

uma baixa eficiência de encapsulação devido a difusão do fármaco da fase aquosa interna para a externa da dupla-emulsão (YEH *et al.*, 2000; PEREZ *et al.*, 2001).

6.4.2. Determinação do diâmetro médio, distribuição de tamanho e índice de polidispersão das nanopartículas

A determinação do tamanho de partícula é um parâmetro crucial para avaliar a qualidade da formulação, visto que a estabilidade física das nanopartículas depende do seu tamanho (MÜLLER-GOYMANN, 2004). O tamanho das nanopartículas também é importante nos parâmetros *in vivo*, pois os vasos sanguíneos que permeiam os tecidos tumorais apresentam poros de 300 a 700 nm (LEMBO & CAVALLI, 2010). Para essa finalidade, as suspensões de nanopartículas foram diluídas em água ultrapura, com o intuito de diminuir o movimento Browniano das partículas que é dependente da viscosidade do solvente e do tamanho da partícula. Essa diluição é necessária porque em dispersões concentradas as partículas apresentam movimento Browniano mais lento, levando ao cálculo de um diâmetro maior que o real, gerando um resultado falso. Os resultados do diâmetro médio e do índice de polidispersão encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12. Valores do diâmetro médio, da polidispersidade e distribuição do tamanho.

<i>Formulações</i>	<i>Diâmetro Médio (nm)</i>	<i>Polidispersidade</i>	<i>Distribuição do tamanho (nm)</i>
PLA			
1	293,80±5,43	0,173	195-233 (54%) e 398-476 (46%)
2	306,93±2,14	0,160	248-279 (73%) e 392-451 (27%)
5	350,87±81,73	0,184	264-325 (75%) e 387-438 (25%)
6	331,83±3,73	0,176	282-304 (67%) e 371-413 (33%)
9	342,23±3,85	0,226	247-295 (78%) e 381-402 (22%)
10	459,93±12,11	0,213	283-305 (18%), 386-443 (69%) e 472-502 (13%)
13	464,87±10,78	0,106	321-385 (45%), 438-493 (45%) e 524-568 (10%)
14	327,03±10,26	0,331	232-289 (76%) e 375-397 (24%)
PLA-PEG			
3	282,87±10,06	0,116	171-208 (39%) e 432-525 (61%)
4	305,60±53,87	0,134	269-301 (73%) e 311-342 (27%)
7	348,20±11,11	0,228	231-274 (12%), 298-327 (67%) e 368-403 (21%)
8	310,13±5,56	0,223	241-279 (70%) e 317-375 (30%)
11	307,13±6,11	0,268	248-283 (79%) e 318-337 (21%)
12	320,10±2,37	0,107	246-279 (22%), 311-353 (64%) e 371-394 (14%)
15	333,93±7,58	0,279	253-302 (73%) e 376-391 (27%)
16	497,17±17,37	0,158	304-378 (12%), 417-489 (47%) e 502-543 (41%)

n=3

Considerando-se o tamanho de partícula, as contendo PEG tiveram um ligeiro aumento na dimensão das partículas em comparação com nanopartículas de PLA ($p < 0,05$). A influência dos componentes da formulação no diâmetro média das nanopartículas será discutida na seção sobre o planejamento fatorial.

6.5. Planejamento Fatorial

A realização de um planejamento fatorial foi utilizado para otimizar a formulação de nanopartículas poliméricas contendo 5-FU. Este planejamento permite determinar o efeito de cada variável na formulação através de um número mínimo de ensaios.

Nesse estudo realizou-se um planejamento fatorial 2^4 com o objetivo de analisar a influência de algumas variáveis da formulação na eficiência de encapsulação e no diâmetro médio das nanopartículas. As variáveis independentes estudadas foram: (A) tipo de polímero; (B) concentração de PVA na fase aquosa interna; (C) tensoativo utilizado na fase aquosa externa; (D) razão de volume da fase oleosa e da fase aquosa externa. A eficiência de encapsulação e o tamanho de partícula foram definidos como variáveis-resposta, sendo considerados resultados positivos altos valores de eficiência de encapsulação e baixos valores de diâmetro de partícula. Os dados foram submetidos a uma análise de variância utilizando o software Statistica 7.0, onde foi possível calcular os efeitos de cada variável para a eficiência de encapsulação (Tabela 13) e para o diâmetro das nanopartículas (Tabela 14).

Tabela 13. Análise de variância realizada para o delineamento fatorial 2^4 sobre o teor de 5-FU nas nanopartículas.

<i>Variáveis</i>	<i>S.Q.</i>	<i>Q.M.</i>	<i>F calculado</i>	<i>p-valor</i>
A	3,16	3,16	0,0194 ^{NS}	0,8918
B	295,07	295,07	1,8086 ^{NS}	0,2057
C	1181,47	1181,47	7,2418*	0,0209
D	92,59	92,59	0,5675 ^{NS}	0,4670

(A) Tipo de polímero; (B) concentração de PVA na fase aquosa interna; (C) tensoativo utilizado na fase aquosa externa; (D) razão de volume da fase oleosa e da fase aquosa externa; S.Q.= soma dos quadrados; Q.M.= quadrado médio; F_{tabelado} (graus de liberdade = 15;47/ $\alpha=0,05$) = 1,92; p-valor deve ser menor que 0,05; *Significativo; ^{NS} Não Significativo.

Após analisar os efeitos das variáveis independentes sobre os teores de 5-FU encapsulado nas formulações desenvolvidas, observou-se que as variáveis estudadas individualmente não se mostraram estatisticamente significativas com exceção da variável C (variação de tensoativos utilizados na fase aquosa externa). Como pode ser observado, o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o valor de F_{tabelado} ($F_{15;47} = 1,92$) e o p-valor foi menor que 0,05 para a variável-resposta eficiência de encapsulação, mostrando diferença estatisticamente significativa para um nível de 95% de confiança. Esses resultados demonstram a influência do tipo de tensoativo na fase aquosa externa no teor de 5-FU encapsulado nas nanopartículas. De acordo com os resultados das tabelas 11 e 13, pode-se concluir que a utilização de PVA à 1% na fase aquosa externa aumentou significativamente a eficácia da formulação em encapsular o 5-FU nas nanopartículas.

Tabela 14. Análise de variância realizada para o delineamento fatorial 2^4 sobre o tamanho das nanopartículas de 5-FU.

<i>Variáveis</i>	<i>S.Q.</i>	<i>Q.M.</i>	<i>F calculado</i>	<i>p-valor</i>
A	1858	1858	0,4624 ^{NS}	0,5105
B	268	268	0,0667 ^{NS}	0,8010
C	5285	5285	1,3156 ^{NS}	0,2757
D	5758	5758	1,8225 ^{NS}	0,3732

(A) Tipo de polímero; (B) concentração de PVA na fase aquosa interna; (C) tensoativo utilizado na fase aquosa externa; (D) razão de volume da fase oleosa e da fase aquosa externa; S.Q.= soma dos quadrados; Q.M.= quadrado médio; F_{tabelado} (graus de liberdade = 15;47/ $\alpha=0,05$) = 1,92; p-valor deve ser menor que 0,05; *Significativo; ^{NS} Não Significativo.

Na tabela 14 é possível observar que as variáveis estudadas individualmente não se mostraram estatisticamente significativas para um nível de 95% de confiança, uma vez que os valores de $F_{\text{calculado}}$ para todas as variáveis foram menores que o F_{tabelado} (1,92), e os resultados dos p-valores foram maiores que 0,05. Com isso, pode-se concluir que as variáveis analisadas não influenciaram no diâmetro médio das nanopartículas. .

Continuando o trabalho, foi necessário determinar quais as melhores formulações de nanopartículas de PLA e PLA-PEG. Para isso foram realizados dois experimentos fatoriais 2^3 , uma para as formulações de PLA e outro para as de PLA-PEG. As análises de variância obtidas após aplicação do teste estatístico fatorial das formulações de PLA e de PLA-PEG estão representadas, respectivamente, nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15. Análise de variância realizada para observar a influência das variáveis sobre os valores de teor de 5-FU nas nanopartículas de PLA.

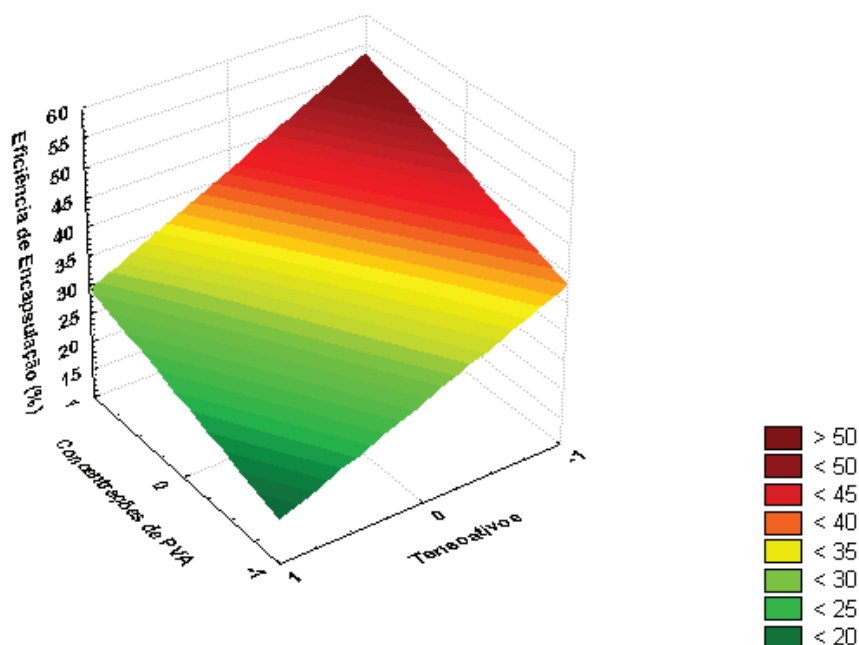
<i>Causa da Variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.Q.</i>	<i>Q.M.</i>	<i>F_{calculado}</i>
[] de PVA da fase interna	1	1702,69	1702,69	31,29*
Tensoativos da fase externa	1	2947,50	2947,50	54,16*
Razão O/A	1	4,46	4,46	0,08 ^{NS}
PVA F.I. <i>versus</i> Tensoativos	1	445,22	445,22	8,18*
PVA F.I. <i>versus</i> Razão O/A	1	137,04	137,04	2,52*
Tensoativos <i>versus</i> Razão O/A	1	0,10	0,10	0,18 ^{NS}
PVA F.I. <i>versus</i> Tensoativos <i>versus</i> Razão O/A	1	19,76	19,76	0,36 ^{NS}
Tratamento	7	5256,77	-	-
Blocos	2	171,04	85,52	1,57 ^{NS}
Resíduo	14	761,91	54,42	-
Total	23	6189,72	-	-

G.L.= Graus de Liberdade; S.Q.= soma dos quadrados; Q.M.= quadrado médio; F_{tabelado} (graus de liberdade = 7;23/ $\alpha=0,05$) = 2,44; *Significativo; ^{NS} Não Significativo.

Como pode ser observado, o valor de F calculado foi maior que o valor de F tabelado ($F_{7;23} = 2,44$) (VIEIRA, 2003) para as variáveis diferença da concentração de PVA da fase interna e os tipos de tensoativos da fase aquosa externa, e também para a interação entre eles, indicando que esses dois fatores afetam significativamente a porcentagem de fármaco encapsulado nas nanopartículas de PLA. Como ocorreu interação entre esse dois fatores, realizou-se o desdobramento dessa interação.

De acordo com os desdobramentos e análise da tabela da eficiência de encapsulação (tabela 11) pode-se concluir que a concentração de PVA a 0,2% na fase aquosa interna teve maior efeito significativo do que na concentração de 0,1%, aumentando o teor de fármaco nas nanopartículas. O PVA na concentração de 0,2% na fase aquosa interna possui efeito significativo ($p < 0,05$) quando na presença do tensoativo polissorbato 80 à 3%, porém essa influência causa baixa eficiência de encapsulação. Outra constatação foi que o PVA a 0,2% na fase aquosa interna teve maior efeito significativo ($p < 0,05$) quando na presença do tensoativo PVA à 1% na fase aquosa externa, sendo que essa influência resulta em aumento da eficiência de encapsulação. Este resultado pode ser melhor representado pelo gráfico de superfície de resposta (Figura 18).

Figura 18. Superfície de resposta em função das variáveis tipo de tensoativos da fase aquosa externa e variação na concentração de PVA na fase interna aquosa das nanopartículas de PLA. Concentrações de PVA na fase interna, -1 (PVA à 0,1%) e 1 (PVA à 0,2%). Tensoativos na fase aquosa externa, -1 (PVA à 1%) e 1 (Polissorbato 80 à 3%).



Observa-se que a superfície de resposta da figura 16 apresenta uma inclinação bastante pronunciada entre as concentrações de PVA na fase aquosa interna e os

tensoativos na fase aquosa externa em direção ao ponto máximo (maior eficiência de encapsulação) quando ocorre interação entre o PVA na fase aquosa interna na concentração de 0,2% e o tensoativo PVA na concentração de 2% na fase aquosa externa.

Tabela 16. Análise de variância realizada para observar a influência das variáveis sobre os valores de teor de 5-FU nas nanopartículas PLA-PEG.

<i>Causa da Variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.Q.</i>	<i>Q.M.</i>	<i>F</i>
[] de PVA da fase interna	1	1061,51	1061,51	25,48*
Tensoativos da fase externa	1	3049,98	3049,98	73,07*
Razão O/A	1	1584,03	1584,03	38,02*
PVA F.I. <i>versus</i> Tensoativos	1	-797,27	-797,27	-19,14 ^{NS}
PVA F.I. <i>versus</i> Razão O/A	1	-979,93	-979,93	-23,52 ^{NS}
Tensoativos <i>versus</i> Razão O/A	1	-533,15	-533,15	-12,80 ^{NS}
PVA F.I. <i>versus</i> Tensoativos <i>versus</i> Razão O/A	1	362,64	362,64	8,70*
Tratamento	7	3741,81	-	-
Blocos	2	210,61	105,31	2,43 ^{NS}
Resíduo	14	583,27	41,66	-
Total	23	4535,69	-	-

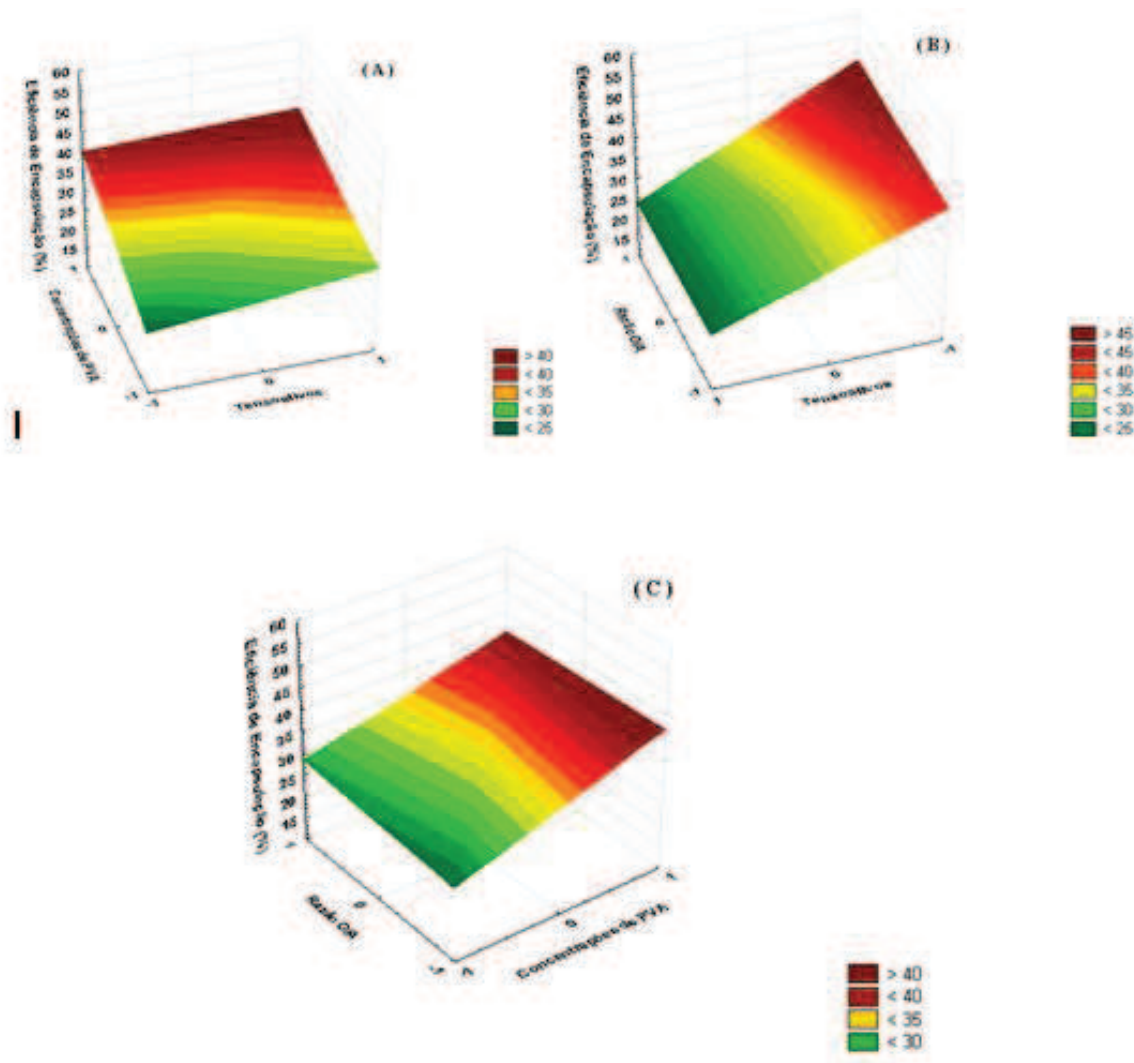
G.L.= Graus de Liberdade; S.Q.= soma dos quadrados; Q.M.= quadrado médio; F_{tabelado} (graus de liberdade = 7;23/ $\alpha=0,05$) = 2,44; *Significativo; ^{NS} Não Significativo.

Através da análise da tabela 16, observa-se que o valor de F calculado foi maior que o valor de F tabelado ($F_{7;23} = 2,44$) (VIEIRA, 2003) para as variáveis diferença da concentração de PVA da fase interna, os tipos de tensoativos da fase aquosa externa, a razão do volume entre as fases orgânica e aquosa externa e também para a interação simultânea entre esses três fatores. Esses resultados sugerem que esses três fatores afetam significativamente a quantidade de 5-FU encapsulado nas nanopartículas de PLA-PEG. Como ocorreu interação entre esse três fatores, realizou-se o desdobramento dessa interação.

De acordo com os desdobramentos e análise da tabela da eficiência de encapsulação (tabela 16) pode-se concluir que a concentração de PVA a 0,2% na fase aquosa interna teve maior efeito significativo do que na concentração de 0,1%,

umentando o teor de fármaco nas nanopartículas. A presença do polissorbato 80 à 3% na fase aquosa externa possui efeito significativo ($p < 0,05$) na concentração de 5-FU encapsulado, porém essa influência causa baixa eficiência de encapsulação. Outro resultado encontrado foi que a presença do PVA à 1% na fase aquosa externa teve efeito significativo ($p < 0,05$), sendo que essa influência resulta em aumento da eficiência de encapsulação. A variação do volume entre as fases orgânica e aquosa externa resultou em diferença no teor de 5-FU encapsulado nas nanopartículas, pois quando aumentou o volume da fase aquosa externa de 6,0 mL para 10,0 mL ocorreu um aumento na eficiência de encapsulação. Outra constatação foi que o PVA à 0,2% na fase aquosa interna teve maior efeito significativo ($p < 0,05$) quando na presença de PVA à 1% na fase aquosa externa, e na razão O/A de 1:5, resultando em um aumento da eficiência de encapsulação. Estes resultados podem ser melhor representados pelos gráficos de superfície de resposta (Figura 19).

Figura 19. Superfície de resposta em função das variáveis (A) tensoativos da fase aquosa externa e concentração de PVA na fase aquosa interna; (B) tensoativos da fase aquosa externa e razão das fases orgânica e aquosa externa; e (C) concentração de PVA na fase aquosa interna e razão das fases orgânica e aquosa externa das nanopartículas de PLA-PEG. Concentrações de PVA na fase interna, -1 (PVA à 0,1%) e 1 (PVA à 0,2%). Tensoativos na fase aquosa externa, -1 (PVA à 1%) e 1 (Polissorbato 80 à 3%). Razão O/A, -1 (2:6) e 1 (2:10).



Observa-se que a superfície de resposta da figura 19 (A) apresenta uma inclinação bastante pronunciada entre as concentrações de PVA na fase aquosa interna e os tensoativos na fase aquosa externa em direção ao ponto máximo, ou seja, maior eficiência de encapsulação, quando ocorre interação entre o PVA na fase aquosa interna na concentração de 0,2% e o PVA na concentração de 1% na fase aquosa externa. Já na

figura 19 (B) observa-se também uma inclinação pronunciada em direção a maior eficiência de encapsulação na interação entre o PVA na concentração de 1% na fase aquosa externa e aumento do volume da fase aquosa externa de 6,0 para 10,0 mL. A figura 19 (C) demonstra que ocorreu também interação entre as concentrações de PVA na fase aquosa interna e a variação entre os volumes O/A, ocorrendo maior eficiência de encapsulação quando ocorreu interação entre a concentração de PVA à 0,2% na fase aquosa interna e com volume da fase aquosa externa de 10,0 mL.

O nível destas interações foi analisado através do teste de Tukey para determinar quais as melhores formulações de PLA e PLA-PEG, baseado no cálculo da diferença mínima significativa (d.m.s) entre duas médias, através da equação 7:

$$\text{d.m.s.} = q \times \sqrt{\text{QMR}/n} \quad (\text{Eq. 7})$$

onde:

QMR, é o número médio do resíduo da análise de variância;

n, é o número de repetições de cada um dos tratamentos;

q, é o valor dado na tabela ao nível de significância estabelecida.

Nestas análises, duas médias são consideradas estatisticamente diferentes quando o valor absoluto da diferença entre elas for igual ou maior que a diferença mínima significativa. Neste caso, o valor de d.m.s. após realização do teste de Tukey para a eficiência de encapsulação, foi de 18,72 para as nanopartículas de PLA e 9,89 para as de PLA-PEG, para um valor de q de 3,49. As diferenças entre as médias das eficiências de encapsulação para cada um dos tratamentos estão demonstradas nas tabelas 17 e 18:

Tabela 17. Diferenças absolutas entre as médias das eficiências de encapsulação das formulações de PLA.

<i>Formulações</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>13</i>	<i>14</i>
1	0,00	32,05*	32,72*	43,92*	7,59	26,45*	36,42*	41,69*
2	32,05*	0,00	-0,67	11,87	24,47*	5,60	4,37	9,63
5	32,72*	0,67	0,00	11,20	25,14*	6,27	3,70	8,96
6	43,92*	11,87	11,20	0,00	36,33*	17,47*	7,50	2,23
9	7,59	24,47*	25,14*	36,33*	0,00	18,87*	28,83*	34,10
10	26,45*	5,60	6,27	17,47	18,87*	0,00	9,97	15,23
13	36,42*	4,37	3,70	7,50	28,83*	9,97	0,00	5,27
14	41,69*	9,63	8,96	2,23	34,10*	15,23	5,27	0,00

*Significativo (d.m.s. = 18,72)

Os resultados do teste de Tukey para as nanopartículas de PLA demonstram que as melhores formulações em relação ao teor de 5-FU incorporado as partículas foram a 1 e a 9 quando o nível de significância de 0,05. Esses resultados foram estabelecidos através da comparação entre as formulações, uma vez que quanto maior o número de diferença significativas de uma formulação em comparação com as demais, melhor esta seria. Como as formulações 1 e 9 tiveram cada uma seis diferenças de médias significativas, as formulações 2, 5, 6 e 13 tiveram duas, e a formulação 14 teve uma, constata-se que os sistemas nanoestruturados 1 e 9 foram as melhores formulações de nanopartículas de PLA.

Tabela 18. Diferenças absolutas entre as médias das eficiências de encapsulação das formulações de PLA-PEG.

<i>Formulações</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	<i>15</i>	<i>16</i>
3	0,00	5,95	29,43*	30,87*	26,44*	16,83*	23,07*	40,04*
4	5,95	0,00	23,49*	24,92*	20,49*	10,89*	17,12*	34,10*
7	29,43*	23,49*	0,00	1,43	2,99	12,60*	6,37	10,61*
8	30,87*	24,92*	1,43	0,00	4,43	14,03*	7,80	9,18
11	26,44*	20,49*	2,99	4,43	0,00	9,61	3,37	13,60*
12	16,83*	10,89*	12,60*	14,03*	9,61	0,00	6,23	23,21*
15	23,07*	17,12*	6,37	7,80	3,37	6,23	0,00	16,98*
16	40,04*	34,10*	10,61*	9,18	13,60*	23,21*	16,98*	0,00

*Significativo (d.m.s. = 9,89)

Em relação às formulações de PLA-PEG, após realizar o teste de Tukey observa-se que as melhores foram a 3, 4 e 16 a um nível de significância de 0,05.

Estabeleceu-se esses resultados através da comparação entre as formulações de PLA-PEG, já que quanto maior o número de diferença significativas de uma formulação em comparação com as demais, melhor esta seria. As formulações 3, 4 e 16 tiveram cada uma seis diferenças de médias significativas, porém a formulação 16 teve diferenças significativas em relação as outras formulações pois sua eficiência de encapsulação foi muito baixa. Já a formulação 7 teve quatro diferenças de médias significativas, as formulações 8, 11 e 15 tiveram três e a formulação 12 teve uma diferença. Assim, constata-se que as nanopartículas 3 e 4 foram os melhores sistemas nanoestruturados de PLA-PEG, em relação à eficiência de encapsulação.

Para determinar as melhores formulações a partir do tamanho de partículas, o valor da d.m.s. para as nanopartículas de PLA foi de 9,41 e de 12,90 para as de PLA-PEG, para um valor de q de 3,49. Os resultados estão apresentados nas tabelas 19 e 20 para as nanopartículas de PLA e PLA-PEG, respectivamente.

Tabela 19. Diferença absoluta média do tamanho de partícula das formulações de PLA.

<i>Formulações</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>13</i>	<i>14</i>
1	0,00	13,13*	57,07*	38,03*	48,43*	166,13*	171,07*	33,23*
2	13,13*	0,00	43,93*	24,90*	35,30*	153,00*	157,93*	20,10*
5	57,07*	43,93*	0,00	19,03*	8,63	109,07*	114,00*	23,83*
6	38,03*	24,90*	19,03*	0,00	10,40*	128,10*	133,03*	4,80
9	48,43*	35,30*	8,63	10,40*	0,00	117,70*	122,63*	15,20*
10	166,13*	153,00*	109,07*	128,10*	117,70*	0,00	4,93	132,90*
13	171,07*	157,93*	114,00*	133,03*	122,63*	4,93	0,00	137,83*
14	33,23*	20,10*	23,83*	4,80	15,20*	132,90*	137,83*	0,00

*Significativo (d.m.s. = 9,41)

De acordo com os resultados apresentados na tabela 19 pode-se concluir que as formulações de PLA que tiveram menores tamanho de partícula foram a 1 e a 2, com 0,05 de nível de significância. Esses resultados foram obtidos através do teste de Tukey, a partir da comparação dos diâmetros médios das formulações de PLA, uma vez que quanto maior o número de diferença significativas de uma formulação em comparação com as demais, esta nanopartícula seria consideração a melhor. Como as

formulações 1 e 2 tiveram cada uma sete diferenças de médias significativas, e as formulações 5, 6, 9, 10, 13 e 14 tiveram seis, constata-se que as formulações 1 e 2 foram os melhores sistemas nanoestruturados de PLA, considerando o diâmetro médio.

Tabela 20. Diferença absoluta média do tamanho de partícula das formulações de PLA-PEG.

<i>Formulações</i>	3	4	7	8	11	12	15	16
3	0,00	22,73*	65,33*	27,27*	24,27*	37,27*	51,07*	214,30*
4	22,73*	0,00	42,60*	4,53	1,53	14,53*	28,33*	191,57*
7	65,33*	42,60*	0,00	38,07*	41,07*	28,07*	14,27*	148,97*
8	27,27*	4,53	38,07*	0,00	3,00	10,00	23,80*	187,03*
11	24,27*	1,53	41,07*	3,00	0,00	13,00*	26,80*	190,03*
12	37,27*	14,53*	28,07*	10,00	13,00*	0,00	13,80*	177,03*
15	51,07*	28,33*	14,27*	23,80*	26,80*	13,80*	0,00	163,23*
16	214,30*	191,57*	148,97*	187,03*	190,03*	177,03*	163,23*	0,00

*Significativo (d.m.s. = 12,90)

Analisando os resultados da tabela 20, observa-se que as formulações 3, 7, 15 e 16 tiveram os menores diâmetros de partícula, a um nível de significância de 0,05. Em relação às formulações de PLA-PEG, após realizar o teste de Tukey e estabelecer as diferenças significativas dos diâmetros médios das nanopartículas, observou-se que as nanopartículas 3, 7, 15 e 16 tiveram cada uma sete diferenças de médias significativas, porém a formulação 16 teve diferenças significativas em relação às outras formulações pois seu diâmetro médio foi alto, a formulação 12 teve seis, as formulações 4 e 11 tiveram cinco, e a formulação 8 teve quatro, concluindo-se que as formulações 3, 7 e 15 foram os melhores sistemas nanoestruturados de PLA-PEG, considerando o diâmetro médio.

A partir da análise dos resultados do delineamento fatorial como um todo, constata-se que a formulação 1 foi a melhor em relação ao polímero PLA tanto na eficiência de encapsulação quanto para o diâmetro de partícula. Essa formulação foi composta de PVA à 0,2% na fase aquosa interna, de PVA à 1% na fase aquosa externa e razão entre as fases orgânica e aquosa externa foi de 1:5. Já para as formulações contendo PLA-PEG, a melhor formulação foi a 3 tanto na eficiência de encapsulação

quanto para o diâmetro de partícula. Essa formulação foi composta de PVA à 0,2% na fase aquosa interna, de PVA à 1% na fase aquosa externa e razão entre as fases orgânica e aquosa externa foi de 1:5.

Esses resultados sugerem que o maior volume da fase aquosa externa afetou o diâmetro médio das nanopartículas, visto que quando se utilizou a razão entre as fases orgânica e aquosa externa de 1:3, observou-se que a dupla emulsão apresentou maior viscosidade do que quando utilizou-se a razão 1:5. Esse aumento da viscosidade dificultou o processo de homogeneização e conseqüentemente pode ter influenciado na eficiência de redução do tamanho dos glóbulos da emulsão.

Observou-se também que com a utilização de PVA 0,2% na fase aquosa interna houve a formação da primeira emulsão (A/O) muito rapidamente em relação à formulação que utilizou o PVA em menor concentração. Certamente no primeiro caso houve a formação de um filme mais denso na interface A/O, facilitando a formação e estabilização da primeira emulsão.

O PVA à 1% gerou melhores resultados na eficiência de encapsulação e no diâmetro médio das nanopartículas, em relação ao polisorbato 80. Considerando o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) dos referidos tensoativos, observamos que ambos são ideais para estabilizarem interfaces O/A, porém o PVA (EHL=18) apresenta-se um pouco mais hidrofílico que o polisorbato 80 (EHL=15), podendo ter contribuído para uma melhor e mais rápida estabilização da emulsão, o que pode ter influenciado na capacidade de encapsular o fármaco bem como na redução do tamanho dos glóbulos da emulsão (NARANG *et al.*, 2007).

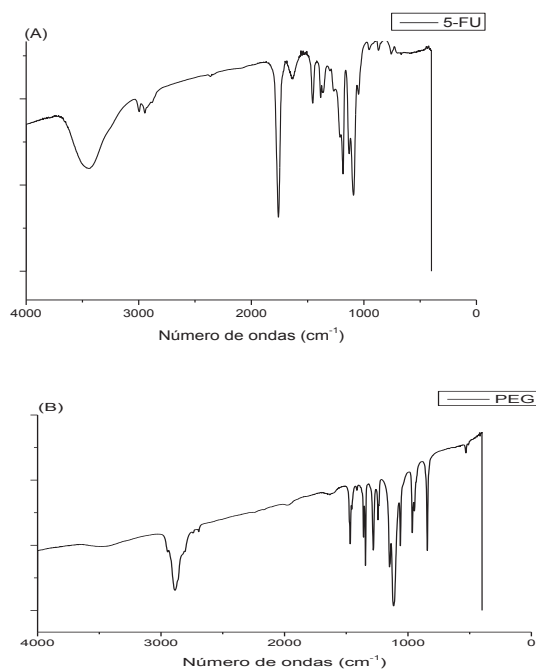
As melhores formulações de PLA (formulação 1) e de PLA-PEG (formulação 3) foram utilizadas nos ensaios subsequentes.

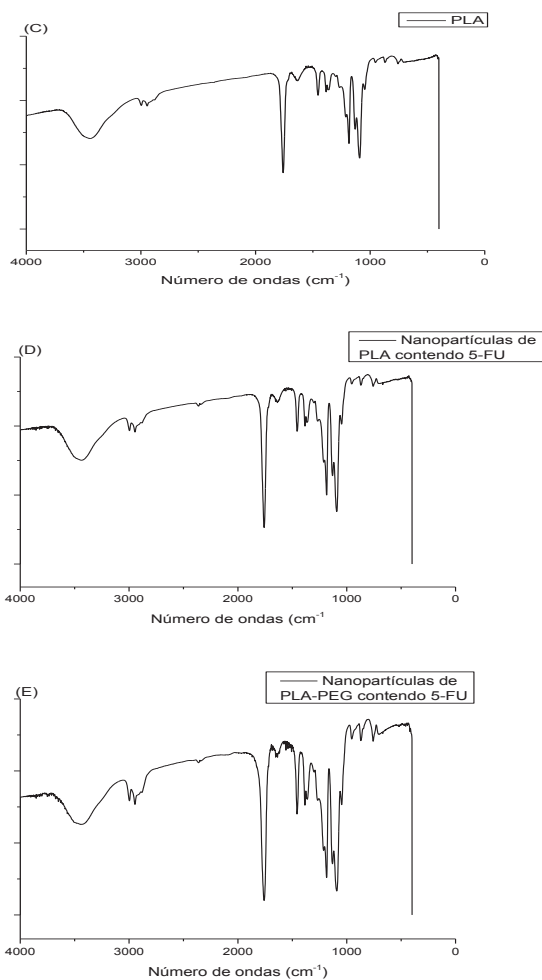
6.6. Espectroscopia na região do infravermelho

Esta análise foi de grande relevância, pois teve como objetivo verificar se após o processo de nanoencapsulação o polímero e o fármaco apresentavam as mesmas características químicas de quando puros.

Realizou-se a varredura na região do infravermelho do fármaco puro, dos polímeros puros (PLA e PEG) e das nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo 5-FU. Na figura 20, são apresentados os espectros dos padrões e das nanopartículas obtidas no infravermelho.

Figura 20. Espectros das amostras no infravermelho: (A) 5-FU; (B) PEG; (C) PLA; (D) Nanopartículas de PLA contendo 5-FU; (E) Nanopartículas de PLA-PEG contendo 5-FU.





Observou-se para o 5-FU, bandas em 1725, 1672 e 1247 cm^{-1} características da imida cíclica, referente a ligações CO-NH-CO, de amida primária e de amina terciária, respectivamente (LIN et al., 2002).

Analisou-se as absorções características do 5-FU, PLA, PEG e das nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo 5-FU. As absorções do PLA são três fortes bandas devidas a vibrações C-CO-O-C, sendo que a banda devida ao estiramento C=O ocorre em aproximadamente 1751 cm^{-1} , a banda relacionada ao estiramento assimétrico de C-O em cerca de 1195 cm^{-1} , e a banda devida ao estiramento simétrico C-O-C em 1110 cm^{-1} .

Em relação ao PEG, observou-se banda larga e intensa característica dos grupos hidroxilas terminais da cadeia do PEG associados por pontes de hidrogênio em 3400 cm^{-1} , e em 1110 cm^{-1} uma banda intensa devido ao estiramento assimétrico C-O-C.

Pode-se concluir, que os espectros das substâncias isoladas apresentaram picos de absorção característicos de estiramentos dos átomos das moléculas em questão conforme a literatura.

Os espectros das nanopartículas de PLA e de PLA-PEG contendo 5-FU mostraram a sobreposição dos mesmos picos de absorção dos compostos isolados. Dessa forma, esses resultados demonstram que o processo de nanoencapsulação não favoreceu nenhuma alteração química que descaracterizasse os reagentes utilizados (polímeros e fármaco).

6.7. Determinação do perfil de liberação *in vitro* do 5-FU a partir das nanopartículas de PLA e PLA-PEG

A avaliação do perfil de liberação ocorreu em condições *sink* através de uma diluição infinita do meio de liberação, que objetiva não ocorrer saturação do fármaco nesse meio, para que a solubilidade do princípio ativo não limite a liberação (WASHINGTON, 1990).

Os resultados do perfil de liberação do 5-FU a partir das nanopartículas de PLA e de PLA-PEG podem ser observados nas figuras 21 e 22, respectivamente.

Figura 21: Perfil de liberação do 5-FU a partir de nanopartículas de PLA em tampão fosfato pH 7,4 contendo PVA 1% (p/v). (A) Perfil de liberação do 5-FU durante 320 h (B) Perfil de liberação do 5-FU durante 24 h. (n=3)

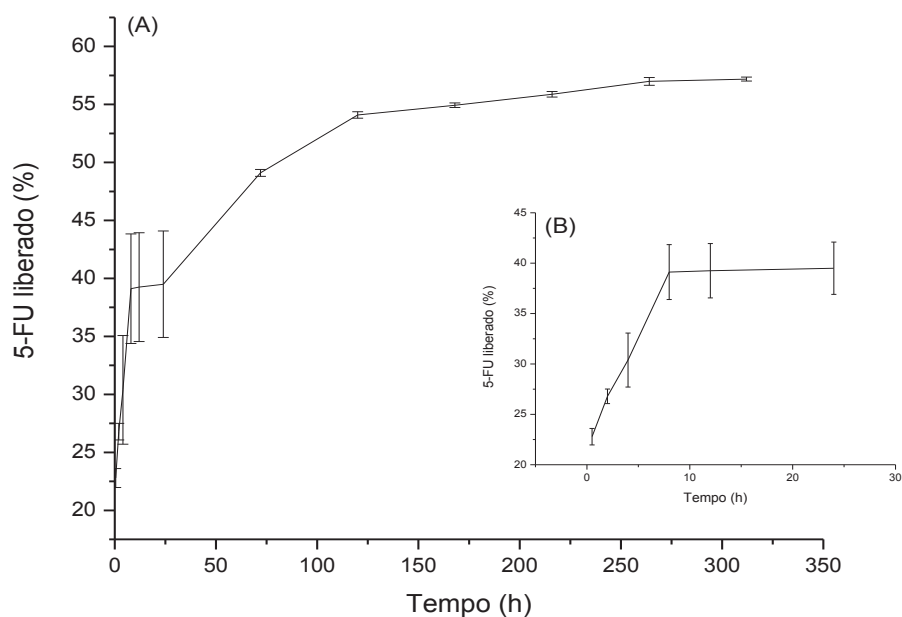
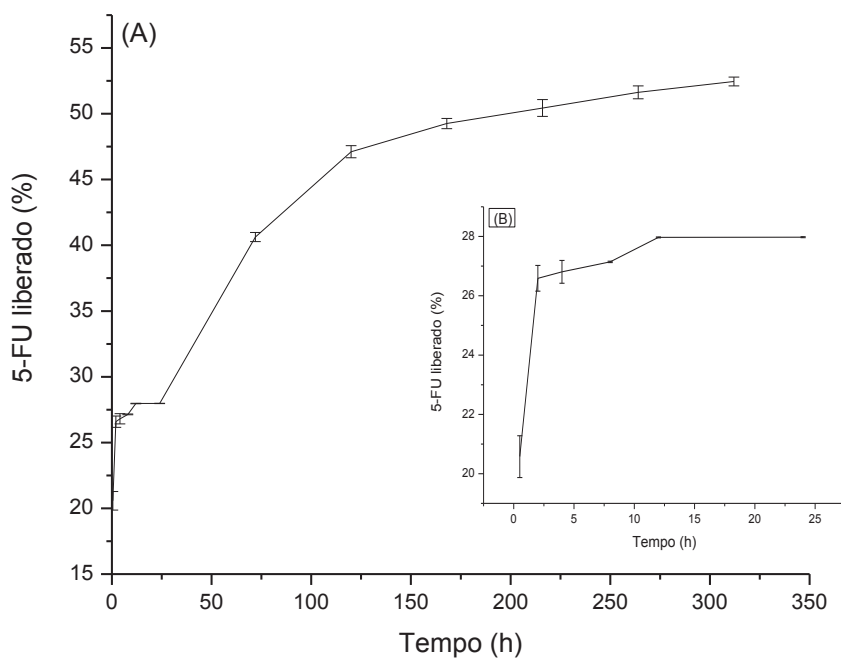


Figura 22: Perfil de liberação do 5-FU a partir de nanopartículas de PLA-PEG em tampão fosfato pH 7,4 contendo PVA 1% (p/v). (A) Perfil de liberação do 5-FU durante 320 h. (B) Perfil de liberação do 5-FU por 24 h. (n=3).



Os resultados indicam que ambas as formulações de nanopartículas foram capazes de prolongar o tempo de liberação do 5-FU. No entanto, as nanopartículas de PLA apresentaram velocidade de liberação mais rápida, provavelmente devido a diferenças na estrutura interna e externa em relação às nanopartículas de PLA-PEG.

Em relação às nanopartículas de PLA, na figura 21 (B) visualiza-se as primeiras 24h de ensaio. Observou-se que as nanopartículas de PLA liberaram aproximadamente 23% de fármaco nos primeiros 30 min e após 24 h a liberação cumulativa alcançou 39,5%. Já na figura 21 (A), que representa o experimento todo, observa-se que até 125 h a concentração de 5-FU foi aumentando no meio receptor, mas após a liberação tornou-se lenta, atingindo aproximadamente 57% de 5-FU liberado após 320 h de ensaio. A figura 22 representa o ensaio do perfil de liberação do 5-FU a partir das nanopartículas de PLA-PEG. Observa-se na figura 22(B) que as nanopartículas de PLA-PEG liberaram cerca de 20% de fármaco em 30 min, atingindo aproximadamente 28% após 24 h. A figura 22 (A) representa todo o experimento e constata-se que após 168h houve liberação de aproximadamente 50% de 5-FU das nanopartículas. Ao final do experimento, 52% do 5-FU foi liberado para o meio receptor. Realizou-se a análise estatística dos perfis de liberação das duas formulações através do teste T de student e observou-se que as diferenças não foram estatisticamente significativas (p -valor = 0,1074), confirmando que as nanopartículas de PLA e PLA-PEG promoveram uma liberação semelhante do fármaco.

Para determinar a cinética de liberação do 5-FU das nanopartículas os resultados foram avaliados através de modelos matemáticos, objetivando determinar as constantes de liberação de ordem zero e de primeira ordem. Também aplicou-se o modelo de Korsmeyer-Peppas a fim de verificar qual/quais mecanismos de liberação do fármaco predominaram durante o experimento. A tabela 21 mostra os resultados dos cálculos das constantes de liberação de ordem zero e de primeira ordem.

Tabela 21. Valores das constantes de liberação para as nanopartículas de PLA e PLA-PEG.

<i>Amostras</i>	<i>Ordem/Modelo</i>	
	Ordem Zero	Primeira Ordem
Nanopartículas de PLA	0,58	0,80
Nanopartículas de PLA-PEG	0,10	0,61

De acordo com os resultados apresentados na tabela 21, as nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo 5-FU apresentaram uma cinética de liberação que se aproximou mais do modelo de primeira ordem (valor mais próximo de 1,0). As formulações que seguem este perfil tem a característica de liberarem o fármaco de forma proporcional à concentração remanescente no seu interior, dessa forma, a quantidade de fármaco liberado diminui com o tempo (MULYE, TURCO, 1995).

Aplicando o modelo de Korsmeyer-Peppas calculou-se o expoente de liberação (n), que é indicativo do mecanismo de liberação. Para as nanopartículas de PLA contendo 5-FU o valor de n foi de 0,58, e para as nanopartículas de PLA-PEG foi obtido valor de n de 0,65.

Para sistemas esféricos, a equação de Korsmeyer-Peppas apresenta três interpretações físico-químicas. Quando n assume um valor inferior a 0,43, demonstra que a liberação do fármaco ocorre por difusão (mecanismo de transporte Fickiano). Já quando n é superior a 0,85, a liberação é controlada por erosão do polímero (mecanismo de transporte não-Fickiano). Valores de n entre 0,43 e 0,85 estão relacionados com o transporte anômalo, no qual ocorre a associação dos mecanismos de difusão e erosão (SIEPMANN, PEPPAS, 2001).

As formulações de nanopartículas de PLA e PLA-PEG mostraram valores de n entre 0,43 e 0,85, indicando que durante o experimento a liberação do 5-FU ocorreu difusão do fármaco através da matriz polimérica associada à erosão do polímero.

A rápida liberação de 5-FU nos primeiros 30 min observada tanto a partir da formulação de PLA como da de PLA-PEG é caracterizada como efeito *burst*, que pode ser ocasionado pela rápida dessorção de fármaco adsorvida ou fracamente ligada à superfície das nanopartículas bem como às condições *sink* nas quais o estudo foi realizado, que favoreceram a solubilidade do 5-FU e sua difusão para o meio de liberação (CAMPOS *et al.*, 2001; SOPPIMATH *et al.*, 2001; UBRICH *et al.*, 2004). Segundo SOPPIMATH e colaboradores (2001) e SCHAFFAZICK *et al.* (2003), a liberação de fármacos a partir de formulações poliméricas nanoestruturadas depende de vários fatores: (A) da dessorção do fármaco da superfície das nanopartículas; (B) da difusão do fármaco a partir da matriz das nanoesferas; (C) da erosão da matriz polimérica; ou (D) da combinação dos processos de difusão e erosão. Verificou-se que o 5-FU associado às nanopartículas de PLA e PLA-PEG apresentou uma fase inicial de liberação rápida, que pode ser relacionada com a quantidade 5-FU adsorvida à superfície das nanoestruturas. Em uma segunda fase, o perfil de liberação tornou-se lento, sendo essa característica relacionada com a difusão do fármaco através da matriz polimérica e a erosão do polímero, como confirmado pelo modelo matemático de Korsmeyer-Peppas.

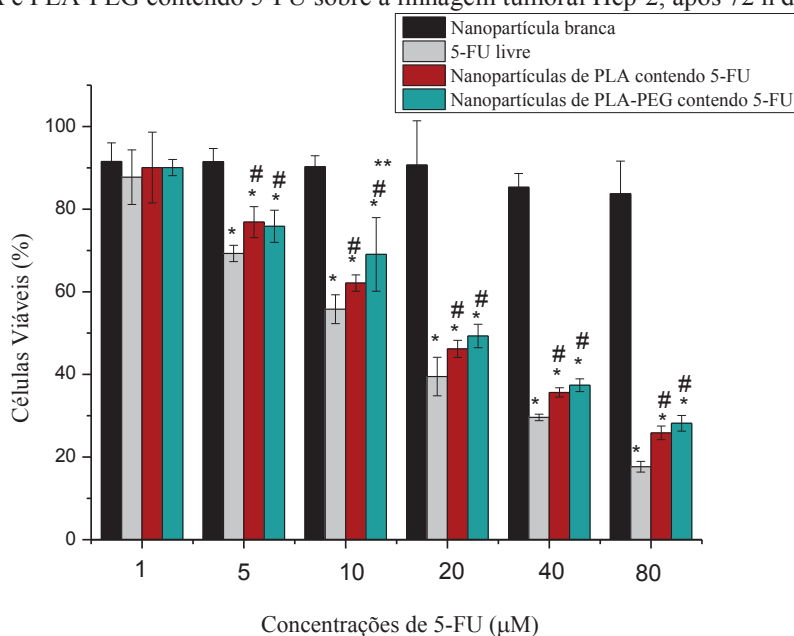
6.8. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas contendo 5-FU sobre linhagem tumoral

A atividade citotóxica do 5-FU livre e encapsulado em nanopartículas de PLA e PLA-PEG foi avaliada nos períodos pré-determinados 24, 48 e 72 h; porém, somente

após 72 h é que tanto o fármaco livre quanto as formulações nanoestruturadas inibiram 50% da viabilidade celular. Esses resultados sugerem que a atividade citotóxica das nanopartículas podem estar relacionadas ao tempo de incubação das células tratadas.

Diversas concentrações foram testadas (1 – 80 μM) em quadruplicata, e os resultados apresentados como percentual de células viáveis (média \pm desvio padrão). Nanopartículas inertes foram também ensaiadas, e as diluições foram realizadas para que as quantidades das partículas fossem as mesmas nos ensaios. Os resultados encontram-se demonstrados na figura 23.

Figura 23. Atividade citotóxica do 5-FU livre, nanopartículas brancas de PLA-PEG e de nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo 5-FU sobre a linhagem tumoral Hep-2, após 72 h de incubação.



* $p < 0,05$ Nanopartículas de PLA e PLA-PEG comparadas com as nanopartículas inertes nas mesmas concentrações; # $p < 0,05$ Nanopartículas de PLA e PLA-PEG comparadas com o 5-FU livre nas mesmas concentrações; ** $p < 0,05$ Nanopartículas de PLA comparadas com as de PLA-PEG nas mesmas concentrações.

Os resultados mostram que tanto o fármaco livre quanto as nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo o 5-FU exibiram efeito citotóxico sobre as células tumorais HEP-2 quando comparado com o grupo controle, em todas as concentrações testadas. Foi realizado um grupo controle apenas com MTT e observou-se que não inibiram a

morte celular. Como pode ser observado, nas concentrações de 5 a 80 μM houve diferença significativa quando comparou-se as nanopartículas de PLA, PLA-PEG e 5-FU com as nanopartículas brancas ; realizando a comparação entre o fármaco livre e as nanopartículas de PLA e PLA-PEG observa-se que houve diferença significativa nas concentrações de 5 a 80 μM , sendo que o fármaco livre reduziu em maior percentual o número de células viáveis; já as nanopartículas de PLA em comparação com as de PLA-PEG, observa-se que para as nanopartículas de PLA exibiram efeito citotóxico significativamente maior ($p < 0,05$) que as nanopartículas de PLA-PEG somente na concentração 10 μM , nas demais concentrações as nanopartículas de PLA e PLA-PEG exibiram efeito citotóxico iguais estatisticamente ($p < 0,05$).

Após essas constatações a concentração que reduziu o número de células em 50% foi determinada, sendo que os IC_{50} estão representados na tabela 22.

Tabela 22. Valores dos IC_{50} das formulações utilizadas no ensaio de citotoxicidade.

Formulações	5-FU Livre	Nanopartículas de PLA contendo 5-FU	Nanopartículas de PLA-PEG contendo 5-FU
IC_{50}	12,60 \pm 3,91 μM	19,16 \pm 2,84 μM	22,20 \pm 4,18 μM

n=6

Realizando a análise estatística através da ANOVA dos resultados do IC_{50} constatou-se que o fármaco livre e as nanopartículas de PLA e PLA-PEG são iguais ($p < 0,05$), portanto, tanto as nanopartículas de PLA quanto as de PLA-PEG demonstraram efeitos citotóxicos.

6.9. Ensaio de farmacocinética pré-clínica

6.9.1. Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação de 5-FU em plasma de rato

6.9.1.1. Condições cromatográficas

Objetivando quantificar o 5-FU em amostras de plasma de rato, um método cromatográfico foi desenvolvido. Inicialmente utilizou-se a metodologia descrita na USP 34 (2010) para o 5-FU, a qual descreve a água ultrapura como fase móvel e vazão de 1,0 mL/min. Porém, observou-se que não ocorreu a separação do pico do 5-FU e do padrão interno timina (Figura 24).

Com o propósito de determinar a fase móvel ideal, inicialmente optou-se por adicionar acetonitrila na fase móvel descrita pela USP 34 (2010). Eluições no modo isocráticas foram realizadas utilizando água e acetonitrila em duas proporções (95:5, v/v e 90:10, v/v). Observou-se que apesar das modificações ainda não foi possível separar os pico do 5-FU e do padrão interno. Deste modo, optou-se por acrescentar metanol na fase móvel descrita pela USP 34 (2010). Após, eluições foram realizadas utilizando água e metanol em várias proporções (de 98:2, v/v a 87:13, v/v). Com a diminuição da proporção de metanol na fase móvel, os espectros do 5-FU e da timina foram sendo separados e quando se utilizou a proporção água:metanol 95:5 (v/v), foi observado total separação dos picos do 5-FU, do padrão interno e os picos apresentaram regular simetria. Nessas condições o 5-FU foi detectado em aproximadamente 5 min (Figura 1) e a timina em 8,2 min (Figura 25).

Figura 24. Cromatograma da solução padrão de 5-FU e timina à 1000 ng/mL em água (Fase móvel: água ultrapura em 265 nm).

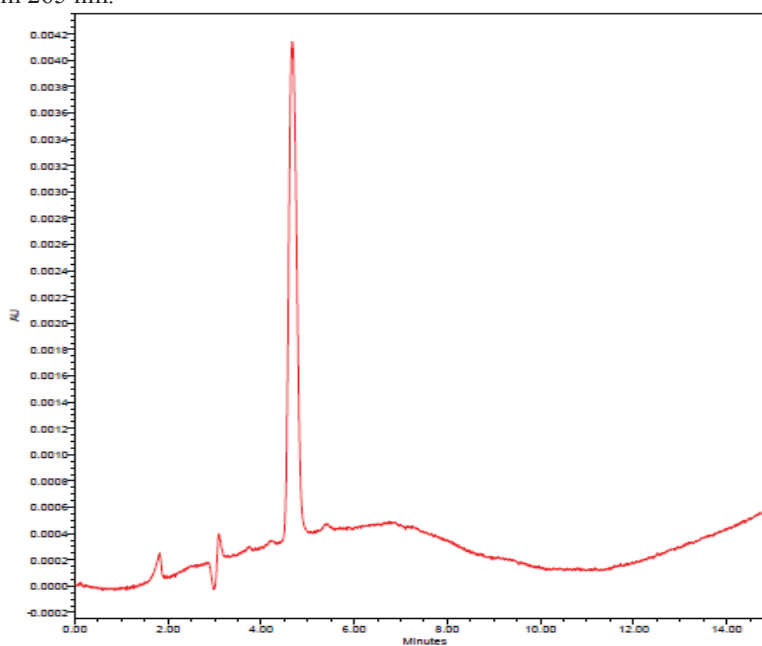
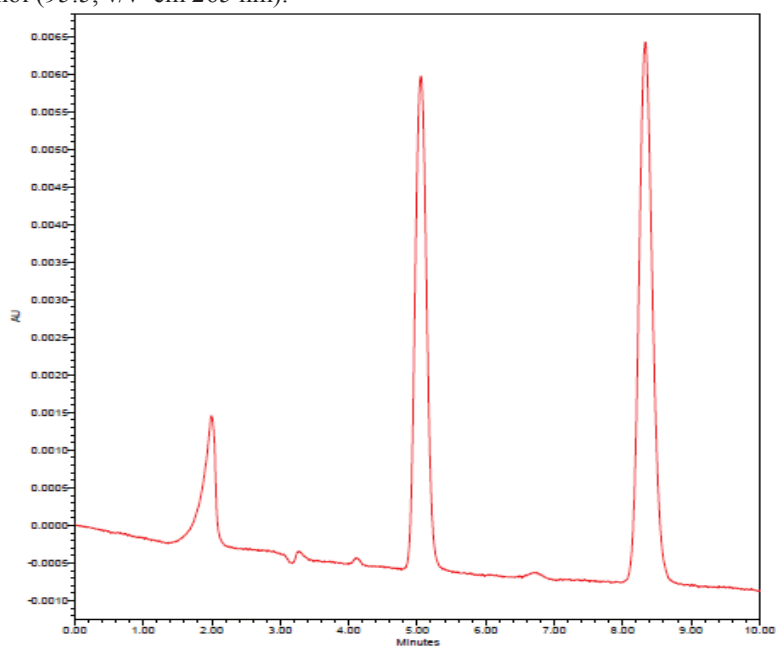


Figura 25. Cromatograma da solução-padrão de 5-FU e timina à 1000 ng/mL em água (Fase móvel: água:metanol (95:5, v/v em 265 nm).

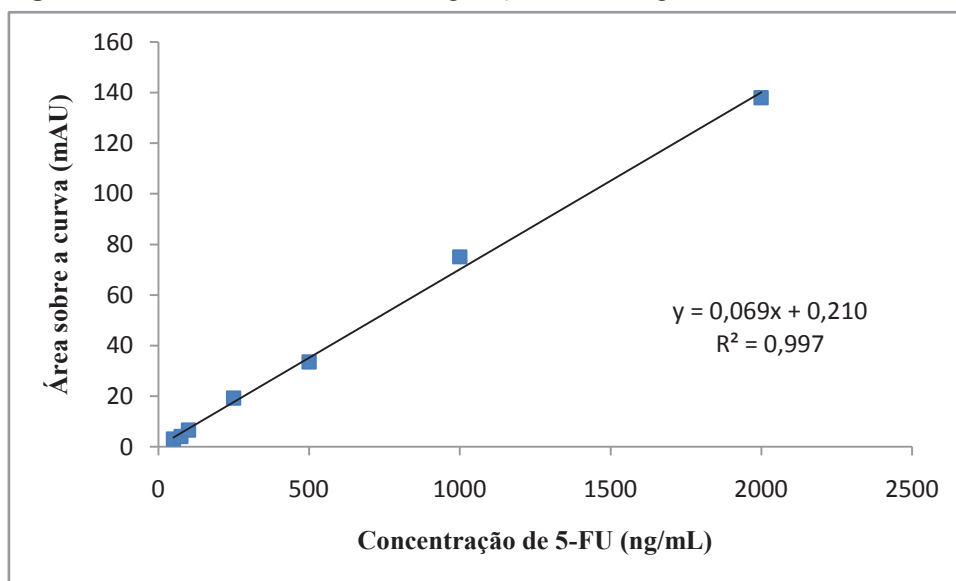


6.9.1.2. Validação do método bioanalítico

Uma metodologia analítica por CLAE foi padronizada e validada com o objetivo de quantificar o 5-FU presente no plasma de ratos. O método bioanalítico foi validado em termos de linearidade, precisão, exatidão, especificidade, limites de detecção e quantificação e estabilidade, segundo as recomendações do ICH (2005) e ANVISA (2003).

Obteve-se uma curva analítica em plasma de rato (fig. 26) com o objetivo de padronizar a quantificação de 5-FU em plasma provindo das amostras do ensaio *in vivo*.

Figura 26. Curva analítica do 5-FU em água. (Fase móvel: água 95%:metanol 5% em 265 nm).



De acordo com a curva analítica pode-se observar linearidade no intervalo de concentração utilizado (50 a 2000 ng/mL), o que indica confiança no uso da equação da reta obtida pela regressão linear dessa curva.

A especificidade foi avaliada através da comparação do cromatograma de uma solução padrão de 5-FU (2000 ng/mL) em plasma (fig. 27) com uma amostra de plasma puro (fig. 28).

Figura 27. Cromatograma da solução-padrão de 5-FU à 2000 ng/mL e de timina 2000 ng/mL (Fase móvel: água ultrapura 95%:metanol 5%, em 265 nm).

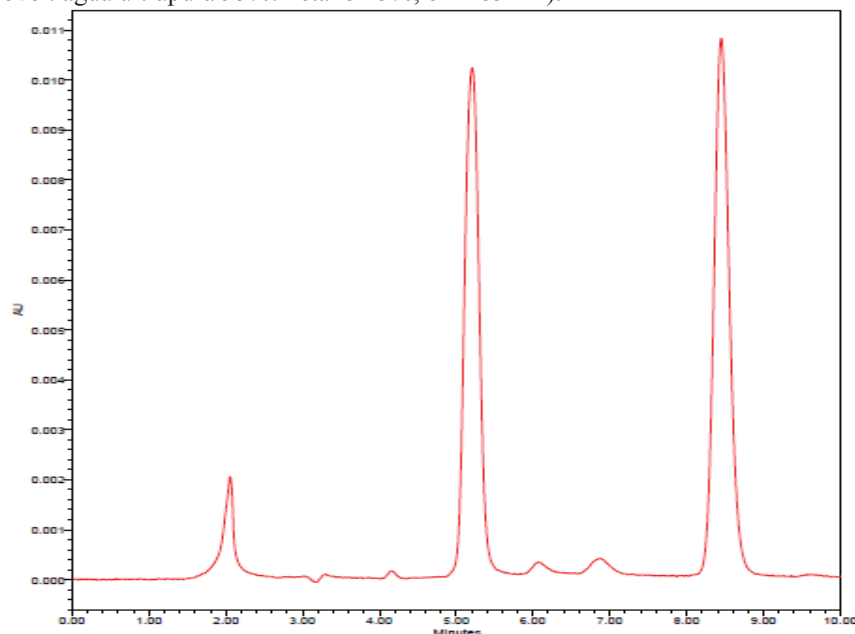
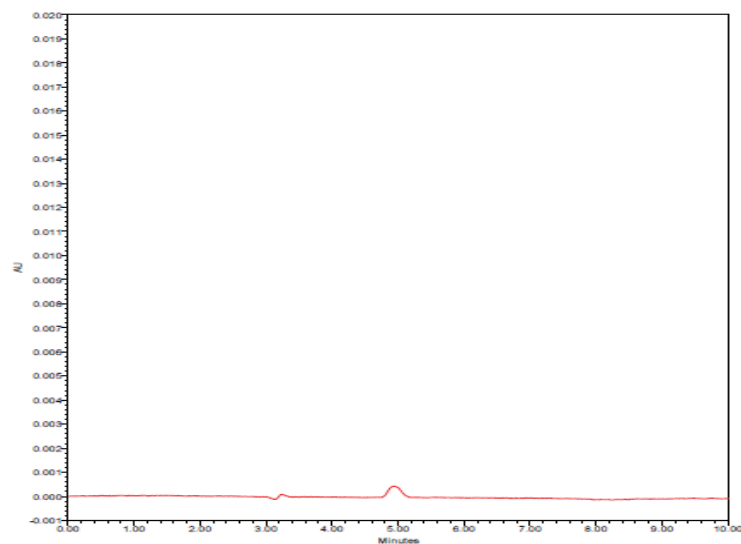


Figura 28. Cromatograma da amostra de plasma puro (Fase móvel: água ultrapura 95%:metanol:5% em 265 nm).



De acordo com os cromatogramas, pode-se observar ausência de interferentes do plasma no tempo de retenção do 5-FU (~5min).

A exatidão foi calculada através da análise de três soluções-padrão, e os resultados estão apresentados na tabela 23.

Tabela 23. Resultados da exatidão para os padrões de 5-FU em plasma.

Solução Padrão (ng/mL)	Recuperação (%)	DPR
100	98,38	1,57
1000	99,14	0,96
2000	99,02	1,08

n=5

A ANVISA preconiza que a porcentagem de recuperação esteja entre 85 a 115%, com isso é possível perceber que os resultados mostram concordância entre os valores experimentais e teórico, demonstrando que o método possui ótima exatidão.

A precisão foi determinada intra-corrída e inter-corrída utilizando-se 3 níveis de concentração dentro do intervalo da curva analítica. Os resultados estão expressos na tabela 24.

Tabela 24. Precisões intra-corrída e inter-corrída do 5-FU em plasma.

Solução Padrão (ng/mL)	Média da Concentração	DPR
Análise intra-corrída (n=5)		
100	99,35	1,32
1000	999,28	1,54
2000	1998,79	1,93
Análise inter-corrída (n=5)		
Dia 1		
100	99,93	0,78
1000	1000,14	0,85
2000	1998,37	1,72
Dia 2		
100	100,08	0,83
1000	1000,73	0,48
2000	1999,48	1,17
Dia 3		
100	99,62	1,32
1000	998,86	1,56
2000	1999,03	1,82

O DPR máximo obtido foi de 1,93%, demonstrando que o método foi preciso, pois os valores foram inferiores a 15%, limite máximo preconizado pela ANVISA.

O LD e LQ foram calculados a partir dos dados da curva analítica, conforme as equações 3 e 4, mencionadas previamente na metodologia. Os valores obtidos foram 18,75 ng/mL para o LD e 37,38 ng/mL para o LQ.

A estabilidade do 5-FU em plasma após ciclos de congelamento e descongelamento foi avaliada através dos ensaios de curta e de longa duração. Os resultados foram comparados com amostras recém-preparadas e estão demonstrados na tabela 25.

Tabela 25. Estabilidade de curta e longa duração de amostras de 5-FU em plasma.

Solução Padrão (ng/mL)	Média das concentrações	DPR
Controle		
100	99,58	1,34
1000	999,32	1,02
2000	1998,84	1,83
Estabilidade de Curta Duração		
100	98,12	2,93
1000	999,01	1,94
2000	1999,25	2,43
Estabilidade de Longa Duração		
100	98,31	3,86
1000	997,93	4,61
2000	1998,48	4,37

n=5

De acordo com os resultados, as amostras foram consideradas estáveis uma vez que o DPR máximo foi de 4,61%, ou seja, obteve-se valores inferiores ao desvio padrão relativo máximo preconizado pela ANVISA que é de 15% quando comparado com as amostras controles.

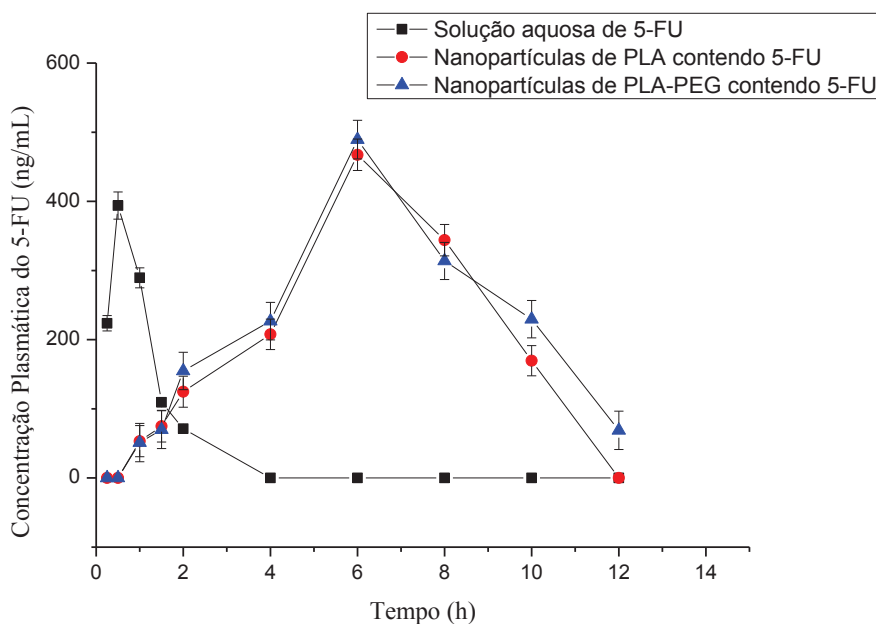
A validação do método de quantificação do 5-FU em plasma por CLAE foi avaliada em termos de linearidade, especificidade, exatidão, precisão, LQ e LD, e estabilidade. O método mostrou-se específico, uma vez que não houve nenhum componente do plasma que pudesse interferir no tempo de retenção do 5-FU. A linearidade foi avaliada através da obtenção de uma curva analítica que pôde ser

seguramente utilizada na quantificação do 5-FU em plasma de ratos no intervalo de concentração utilizado. Os resultados dos cálculos dos LQ e LD do 5-FU em plasma demonstram a sensibilidade do método. A precisão e a exatidão foram avaliadas e geraram resultados que estão de acordo com a resolução vigente. A partir desses parâmetros pode-se afirmar que a metodologia para análise de 5-FU em plasma por CLAE com detecção por PDA, utilizando como fase móvel uma mistura de água:metanol (95:5, v/v) eluída à 1,0 mL/min é segura e apresenta resultados condizentes e verdadeiros, podendo ser aplicada em estudos de farmacocinética pré-clínica.

6.9.2. Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos após administração oral de dose única em ratos

As curvas das concentrações plasmáticas médias do 5-FU *versus* tempo após administração por via oral de 50 mg/Kg de 5-FU em diferentes formulações (solução aquosa de 5-FU, nanopartículas de PLA e nanopartículas de PLA-PEG contendo 5-FU) estão expressas na figura 29.

Figura 29. Curvas da concentração plasmática de 5-FU em função do tempo a partir das diferentes formulações de 5-FU (n=5).



A tabela 26 resume os parâmetros farmacocinéticos relevantes. Após administração oral de uma solução aquosa de 5-FU, o fármaco foi rapidamente absorvido, e uma concentração plasmática máxima de $393,87 \pm 1,14$ ng/mL foi alcançada em 30 min. Após esse tempo, a concentração plasmática do 5-FU decaiu abruptamente, uma vez que o fármaco foi distribuído e rapidamente metabolizado, resultando em uma elevada constante de eliminação (K_e), e um curto tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de $0,57 \pm 0,17$ h .

Tabela 26. Parâmetros farmacocinéticos do 5-FU, após administração oral de dose única de solução aquosa de 5-FU, nanopartículas de PLA e de PLA-PEG contendo 5-FU, em ratos (n=5).

Parâmetros Farmacocinéticos	Formulações		
	Solução de 5-FU	Nanopartículas de PLA contendo 5-FU	Nanopartículas de PLA-PEG contendo 5-FU
Dose (mg/Kg)	50	50	50
AUC _{0-t} (h.ng/mL)	492,13 ± 4,35	2077,12 ± 1,99*	2037,99 ± 3,65*
AUC _{0-inf} (h.ng/mL)	542,96 ± 1,24	2200,53 ± 1,82*	2281,10 ± 2,08*
C _{max} (ng/mL)	393,87 ± 1,14	467,34 ± 0,75*	487,34 ± 1,79*
T _{max} (h)	0,5	6*	6*
T _{1/2} (h)	0,57 ± 0,17	3,46 ± ,014*	3,01 ± 0,19*
K _e (1/h)	1,22 ± 0,18	0,20 ± 0,37*	0,23 ± 0,22*
Vd (L/Kg)	83278,01 ± 184,22	120358,95 ± 216,39*	106669,48 ± 169,22*
Cl (L/h/Kg)	101599,17 ± 235,74	24071,79 ± 347,24*	24533,98 ± 236,83*

Valores apresentados como média±desvio padrão (n=5). AUC: área sob a concentração plasmática *versus* tempo; C_{max}: concentração máxima; T_{max}: tempo para atingir a máxima concentração; K_e: constante de eliminação; t_{1/2}: tempo de meia-vida; Vd: volume de distribuição aparente; Cl: clearance.

*Diferença significativa do 5-FU livre (p<0,05).

Uma liberação sustentada de 5-FU ao longo de 12 h foi observada quando utilizou-se as formulações de nanopartículas. Após 30 min da administração oral das duas formulações de nanopartículas, não foi possível quantificar o 5-FU, porém, após 60 min a concentração plasmática foi de 53,22 ± 2,57 ng/mL para a formulação de PLA, e de 51,29 ± 3,93 ng/mL para as formulações de PLA-PEG. A concentração plasmática de 5-FU atingiu seu máximo de 467,34 ± 0,75 ng/mL e 487,34 ± 1,80 ng/mL (C_{max}) em 6 h (T_{max}) a partir das nanopartículas de PLA e PLA-PEG, respectivamente. Comparando o 5-FU livre com as nanopartículas de PLA e PLA-PEG, o C_{max} aumentou 1,19 e 1,24 vezes, respectivamente. O aumento no C_{max} indica que as nanopartículas foram eficazes no aumento da absorção do fármaco. O T_{max} retardado demonstra uma liberação sustentada do 5-FU a partir das nanopartículas. O clearance do 5-FU proveniente das nanopartículas de PLA e PLA-PEG foi de 4,22 e 4,14 vezes menor do que o fármaco livre, respectivamente. Assim, o t_{1/2} do 5-FU a partir das nanopartículas de PLA foi aumentado em 6 vezes e das nanopartículas de PLA-PEG em 5,2 vezes comparadas com o fármaco livre. Houve diferença significativa na AUC_{0-inf} entre a

solução aquosa de 5-FU e as nanopartículas de PLA e de PLA-PEG ($p < 0,05$). Em comparação com a solução aquosa de 5-FU, as formulações de PLA e PLA-PEG aumentaram a biodisponibilidade do 5-FU em 4,05 e 4,20 vezes, respectivamente. Entre as formulações de nanopartículas não ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$), apresentando assim a mesma biodisponibilidade.

A diferença significativa nos parâmetros farmacocinéticos entre a solução aquosa de 5-FU e as dispersões de nanopartículas de PLA e PLA-PEG, principalmente no que diz respeito à biodisponibilidade e tempo de meia-vida, pode ser explicada pelas propriedades das nanopartículas em meios biológicos de prolongarem a liberação do fármaco e bem como da sua trajetória *in vivo*.

O PEG é frequentemente utilizado para a modificação da superfície das nanopartículas poliméricas porque é biocompatível e é capaz de prolongar o tempo das nanopartículas na corrente sanguínea (TOBÍO *et al.*, 2000; KHALIL *et al.*, 2013). Isso ocorre devido a redução das interações entre as nanopartículas e as enzimas dos fluidos digestivos, havendo conseqüentemente, um aumento do fármaco na corrente sanguínea e no tecido linfático. Embora o PEG seja utilizado para essa finalidade, neste ensaio ele não fez diferença provavelmente porque na forma de blenda as cadeias do PEG poderiam não estar tão expostas na superfície, e sim disperso em toda a matriz polimérica, dessa maneira, não apresentando propriedades estéricas.

O aumento da biodisponibilidade do 5-FU obtido com as nanopartículas demonstra a excelente habilidade dos sistemas nanoestruturados em modular as propriedades físico-químicas do fármaco, resultando em melhores perfis farmacocinéticos. Como os principais problemas farmacocinéticos do 5-FU estão relacionados à sua biodisponibilidade variável devido absorção inconsistente no trato gastrointestinal e o curto tempo de meia-vida, devido ao seu extenso metabolismo, a aplicação da nanotecnologia para aprimorar esses parâmetros é de grande relevância.

É extensamente demonstrado na literatura que mudanças em algumas propriedades físico-químicas das nanopartículas poliméricas, tais como tamanho, permite modular seus parâmetros farmacocinéticos. No desenvolvimento de um sistema coloidal para carreamento de fármacos, o qual permita uma biodistribuição mais ampla e que possam alcançar alvos particulares, é necessário evitar a remoção precoce das nanopartículas da corrente sanguínea pelas células do SMF. Nesse caso, o desenvolvimento de partículas de tamanho bastante reduzido previne a precoce adsorção de opsoninas na superfície das partículas as quais as fazem serem reconhecidas pelas células do SMF (GREF *et al.*, 1994).

Diversos trabalhos na literatura relatam a nanoencapsulação de 5-FU. REJINOLD e colaboradores (2011) desenvolveram nanopartículas de quitosana para transporte de 5-FU e observaram que ocorreu efeito citotóxico das mesmas sobre linhagem tumoral PC3, KB e MCF7. ZANG e colaboradores (2012) desenvolveram um complexo nanoparticulado formado por CS-g-PNIPAM/CMC contendo 5-FU e analisaram seu tamanho e perfil de liberação *in vitro*, constataram um tamanho de partícula de 200 nm e prolongaram o perfil de liberação do fármaco. Porém, nenhum trabalho relatou a utilização dos polímeros PLA e PEG na produção de nanopartículas contendo 5-FU. Como os avanços tecnológicos visam melhorar os perfis farmacocinéticos dos fármacos, é interessante explorar o potencial desses nanocarreadores coloidais para tratamentos quimioterápicos.

Esse trabalho, na realidade, tinha o objetivo de demonstrar que o uso de nanopartículas poliméricas são sistemas capazes de melhorar a biodisponibilidade de fármacos amplamente utilizados em tratamentos onerosos e que acarretam diversos efeitos colaterais aos pacientes, fazendo muitas vezes, desistirem do tratamento.

7. CONCLUSÕES

- Obteve-se nanopartículas poliméricas de PLA e de blendas de PLA com PEG contendo 5-FU com distribuições granulométricas adequadas através do método da emulsificação-evaporação do solvente;
- O desenvolvimento de protocolos de obtenção de nanopartículas poliméricas contendo 5-FU por delineamento fatorial permitiu a otimização das formulações. O PVA 1% na fase aquosa da emulsão bem como sua presença na fase aquosa interna na concentração de 0,2% foram cruciais para reduzir o diâmetro das nanopartículas bem como aumentar sua habilidade em encapsular o 5-FU.
- As metodologia por CLAE-PDA desenvolvidas e validadas para quantificação da 5-FU nas nanopartículas e em plasma de rato mostraram-se específicas, sensíveis, lineares, precisas e exatas.
- A liberação do 5-FU a partir das nanopartículas de PLA e PLA-PEG variou entre 50 e 60% da quantidade total de fármaco presente nas suspensões, após 13 dias de ensaio, indicando que a nanoencapsulação prolongou a liberação do 5-FU livre. A cinética de liberação do 5-FU a partir das nanopartículas foi de primeira ordem, e o mecanismo de liberação calculado pelo modelo Korsmeyer-Peppas foi difusão e a erosão.
- No ensaio de citotoxicidade nas células Hep-2 observou-se que tanto o fármaco livre quando o encapsulado nas duas formulações de nanopartículas apresentaram eficácia semelhante.
- Os parâmetros farmacocinéticos do 5-FU foram melhorados pela nanoencapsulação. A biodisponibilidade, C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$ e volume de distribuição foram significativamente aumentados, enquanto o clearance foram

diminuídos. Entre as formulações de nanopartículas não houve diferença significativa quanto a biodisponibilidade. Comparando-se com a 5-FU livre, as nanopartículas de PLA e de blendas de PLA-PEG aumentaram a biodisponibilidade do 5-FU em 4,05 e 4,20 vezes, respectivamente. O PEG demonstrou não influenciar nos parâmetros físico-químicos e biológicos das nanopartículas. O conjunto dos resultados demonstrou a viabilidade tecnológica da preparação de nanopartículas poliméricas como potenciais carreadoras de 5-FU para administração pela via oral, com potencial aplicação no tratamento de tumores sólidos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA – ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução nº899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: www.anvisa.org.br

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

ALLÉMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 87, p. 247-253, 1992.

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

ALVAREZ-ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R.H.; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p.191-195, 2001.

ANDERSON, J.M.; SHIVE, M.S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, p. 05-24, 1997.

ATHANASIOU, K.A., NIEDERAUER, G.G., AGRAWAL, C.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. **Biomaterials**, 17: 93-102, 1996.

BALA, I., HARIBARAN, KUMAR, R. M. N. V. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. **European Journal of Pharmacology**, v. 39, n. 5, p. 173-191, 2004.

BARAN, E. T.; ÖZER, N.; HAZIRCI, V. *In vivo* half life of nanoencapsulated Lasparinase. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 13, p. 1113-1121, 2002.

BARRATT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. **CMLS Celular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 21-37, 2003.

BERNARD, C.; HARVEY, M.; BRIAND, J.F.; BIRE, R.; KRYS, S.; FONTAINE, J.J. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. **Environmental Toxicology**, v.18, p.176–186, 2003.

BHAVSAR, M. D.; TIWARI, S. B.; AMIJI, M. M. Formulation optimization for the nanoparticles-in-microsphere hybrid oral delivery system using factorial design. **Journal of Controlled Release**, v. 110, p. 422-430, 2006.

BLANCO, M. D., ALONSO, M. J. Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 43, p. 287-294, 1997.

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

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

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1649-1659, 2004.

CAMPOS, A. M., SÁNCHEZ, A., ALONSO, M. J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 159-168, 2001.

CHASTEIGNER, S.; CAVÉ, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-P.; PUISIEUX, F. Freeze-Drying of Itraconazole-Loaded Nanosphere Suspensions: A Feasibility Study. **Drug Development Research**, v. 38, p. 116-124, 1996.

Clarke's Analysis of Drug and Poisons. London: Pharmaceutical Press, 2004.

COE, R. A.; EARL, R. A.; JOHNSON, T. C.; LEE, J. W. Determination of 5-Fluorouracil in human plasma by a simple and sensitive reversed-phase HPLC method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 1733-1741, 1996.

COUVREUR, P.; ROLAND, M.; SPEISER, P. Biodegradable submicromic particles containing a biologically active substance and composition containing them. **U.S. Patente n.4329332**, 1982.

COUVREUR, P.; DUBERNET, C. PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles : current possibilities and future trends. **European Journal of Pharmacy and Biopharmacy**, v. 41, p. 2-13, 1995.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical ReviewsTM in Therapeutic Carrier Systems**, v. 19,n. 2, p. 99-134, 2002.

CSABA, N.; SÁNCHEZ, A.; ALONSO, M. J. PLGA: Poloxamer and PLGA: Poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 164–172, 2006.

CUNHA K. S.; LEHMANN M. Drogas anticancer e seus efeitos genotóxicos. **Genética toxicológica**, p. 424, 2003.

DAS NEVES, J.; SARMENTO, B.; AMIJI, M.M.; BAHIA, M.F. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor dapivirine from polymeric nanoparticles, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 2, p. 167–172, 2010.

DE ANGELIS P. M.; SVENDSRUD D. H.; KRAVIK K. L.; STOKKE T. Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) and 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery. **Molecular Cancer**, v. 5, p. 1-25, 2006.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

FANGUEIRO, F.; ANDREANI, T.; EGEA, M. A.; GARCIA, M. L.; SOUTO, S. B.; SOUTO E. B. Experimental Factorial Design Applied to Mucoadhesive Lipid Nanoparticles via Multiple Emulsion Process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.04.014, 2012.

FELT, O.; BURI, P.; GURNY, R. Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 979-993, 1998.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews**, v. 5, p. 161-171, 2005.

FONSECA, C.; SIMÕES, S.; GASPAR, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. **Journal of Controlled Release**, v. 83, p. 273-286, 2002.

FU, G.; ZHAO, J.; YU, H.; LIU, L.; HE, B. Bovine serum albumin-imprinted polymer gels prepared by graft copolymerization of acrylamide on chitosan. **Reactive and Functional Polymers**, v. 67, p. 442-450, 2007.

GASPARI, P.D.M. **Preparação e caracterização de micro e nanopartículas poliméricas contendo estreptomicina**. Dissertação de Mestrado. UNICAMP, Campinas, 2006.

GRAF, R., DOMB, A., QUELLEC, P., BLUNK, T., MÜLLER, R. H., VERBAVATZ, J. M., LANGER, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.16, p. 215-233, 1995.

GREM, J. L. Mechanisms of action and modulation of Fluorouracil. **Seminar in Radiation Oncology**, v. 7, p. 249-259, 1997.

GREM, J.L., NGUYEN, D., MONAHAN, B.P., KAO, V., GEOFFREY, F.J. Sequence dependent antagonism between fluorouracil and paclitaxel in human breast cancer cells. **Biochemical pharmacology**, v. 58, p. 477-486, 1999.

GRIVICICH I.; REGNER A.; ZANONI C.; CORREA L. P.; HENRIQUES J. A. P.; SCHWARTSMANN G.; ROCHA A. B. Hsp 70 response to 5-fluorouracil treatment in human colon cancer cells lines. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 22, p. 1201-1208, 2007.

GUPTE, A.; CIFTCI, K. Formulation and characterization of paclitaxel, 5-FU and paclitaxel + 5-FU microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 276, p. 93-106, 2004.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRAT, G.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p.57-63, 1995.

GUTERRES, S.; BENVENUTTI, E.; POHLMANN, A. Nanopartículas poliméricas para administração de fármacos. In: DURÁN, N.; MATTOSO, L.; MORAIS, P. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora, p. 161-166, 2006.

HASKELL, R. J.; SHIFFLETT, J. R.; ELZINGA, P. A. Particle size technologies for submicron emulsion. In: Benita, S. **Submicron Emulsions in Drug Targeting and delivery**. [s.l.]: Harwood academic publishers, p. 8-19, 1998.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: **Q2B – validation of Analytical procedures: methodology**, 2005.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que é o câncer?** Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso em: 15 de julho de 2012.

JAIN, R.; SHAH, N.H.; MALICK, A.W. RHODES, C.T. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester)devices: different preparative approaches. **Drug development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 703-727, 1998.

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

JEON, S. I; LEE, J. H. ANDRADE, J. D.; DE GENNES, P. G. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I. Simplified theory. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 142, n.1, p. 149-158, 1991.

JUNG, T., KAMM, W., BREITENBACH, A., HUNGERER, K.D., HUNDT, E.; KISSEL, T. Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft -poly(lactide-co-glycolide): Evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice. **Pharmaceutical Research**, 18: 352-360, 2001.

KHALIL, N.M.; NASCIMENTO, T. C. F.; CASA, D. M.; DALMOLIN, L. F.; MATTOS, A. C.; HOSS, I.; ROMANO, M. A.; MAINARDES, R. M. Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101: p. 353– 360, 2013.

KAUR, A.; JAIN, S.; TIWARY, A. K. Mannan-coated gelatin nanoparticles for sustained and targeted delivery of didanosine: in vitro and in vivo evaluation, **Acta Pharmaceutica**, v. 58, p. 61–74, 2008.

KAWASHIMA, Y.; IWAMOTO, T.; NIWA, T.; TAKEUCHI, H.; HINO, T. Uniform and improved bioavailability of newly developed rapid and sustained release suspensions of ibuprofen microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 89, p. 09-17, 1993.

KIBBE, A.U. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. London: Pharmaceutical Press, 2000.

KREUTER, J. Evaluation of Nanoparticles as Drug-Delivery Systems. I: Preparation Methods. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 58, n. 7, p. 196-208, 1983.

LACHAM, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. K. **The theory and practice of industrial pharmacy**, 3^a ed., Lea & Febiger: Philadelphia, 1986.

LEE, S.H.; ZHANG, Z.; FENG, S.S. Nanoparticles of poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate (PLA-TPGS) copolymers for protein drug delivery. **Biomaterials**, v. 28, p. 2041–2050, 2007.

LEMBO D.; CAVALLI R. Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs. **Antiviral chemistry & chemotherapy**, v. 21: 53:70, 2000.

LI, S.; WANG, A.; JIANG, W.; GUAN, Z. Pharmacokinetic characteristics and anticancer effects of 5-Fluorouracil loaded nanoparticles. **BMC Cancer**, v. 8, p. 1-9, 2008.

LIN, S.; KAO, Y. Tablet formulation study of spray-dried sodium diclofenac enteric-coated microcapsules. **Pharmaceutical research**, v. 8, p. 919-924, 1991.

LIN, H.; REN, H.; WANG, X.; TANG, Q.; TANG, J.; WANG, C. Preparation of 5-Fluorouracil loaded polylactide-co-glycolide-co-methoxy poly(ethylene glycol) (PLGA-mPEG) nanoparticles via high speed shearing. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 24, p. 805-808, 2008.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **S.T.P Pharma Sciences**, v.1, n. 4, p. 221-241, 1991.

MAINARDES, R.M., GREMIÃO, M.P.D., BRUNETTI, I.L., DA FONSECA, L.M., KHALIL, N.M. Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: Influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, p. 257-267, 2009.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 375-399, 2002.

MELO, P.S.; MARIA, S.S.; VIDAL, B.C.; HAUN, M.; DURÁN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, v. 36, p. 539-543, 2000.

MEYERS M.; WAGNER M. W.; MAZUREK A.; SCHMUTTE C.; FISHEL R.; BOOTHMAN D. A. DNA mismatch repair-dependent response to fluoropyrimidine-generated damage. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 5516-5526, 2005.

MILANO, G., ETIENNE, M.C. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) and clinical pharmacology of 5-fluorouracil (review). **Anticancer Research**, v. 14, p. 2295– 2298, 1994.

MO, B.; PATER, A. Apoptosis, 5-fluorouracil sensitivity and expression of apoptotic proteins in a human ectocervical cell carcinogenesis model using different media. **European Journal of Pharmacology**, v. 467, p. 15-22, 2003.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and target- specific nanoparticles: Theory to Practice. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 283-318, 2001.

MOHANRAJ, V.; CHEN, Y. Nanoparticles – a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 561-573, 2006.

MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R.; CHACÓN, M.; BERGES, L.; GUZMÁN, M. Stability of Cyclosporine-Loaded Poly-ε-Caprolactone Nanoparticle. **Journal of Microencapsulation**, v. 14, n. 16, p. 777-787, 1997.

MONTASSER, I.; BRIANÇOM, S.; LIETO, J.; FESSI, H. Méthodes d'obtention et mécanismes de formation de nanoparticules polymériques. **Journal de Pharmacie Belgique**, v. 55, n. 6, p. 155-167, 2000.

MOSBY'S DRUG CONSULT, Mosby, Inc. An Imprint of Elsevier Science St Louis, 2002.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRATT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**, v. 22, p. 2967-2979, 2001.

MULLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical Characterization of Colloid Drug Delivery Systems such as Reserve Micelles, Vesicles, Liquid Crystals and

Nanoparticles for Topical Administration. *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*, v. 58, p. 343-346, 2004.

MULYE, N. V., TURCO, S. J. A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dihydrate matrices. *Drug development and industrial pharmacy*, v.21, p.943-953, 1995.

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. 125, p. 193–209, 2008.

MURAD, A M., KATZ, A. *Oncologia – Bases Clínicas do Tratamento*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1996.

MURAKAMI, H., KAWASHIMA, Y., NIWA, T., HINO, T., TAKEUCHI, H. & KOBAYASHI, M. Influence of the degrees of hydrolyzation and polymerization of poly(vinylalcohol) on the preparation and properties of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 149, p. 43-49, 1997.

NAGARWAL, R.C.; KUMAR, R.; DHANAWAT, M.; PANDIT, J.K. Modified PLA nano in situ gel: A potential ophthalmic drug delivery system. *Coloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 86, p. 28-34, 2011.

NAGARWAL, R.C.; KUMAR, R.; PANDIT, J.K. Chitosan coated sodium alginate-chitosan nanoparticles loaded with 5-Fluorouracil for ocular delivery. In vitro characterization and in vivo study in rabbit eye. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, p. 678-685, 2012.

NITA, M. E.; NAGAWA, H.; TOMINAGA, O.; TSUNO, N.; FUJU, S.; SASAKI, S.; FU, C. G.; TAKENOUE, T.; TSURUO, T.; MUTO, T. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *British Journal of Cancer*, v. 78, p. 986-992, 1998.

NOORDHUIS P.; HOLWERA U.; VAN DER WILT C.L.; VAN GROENINGEN C.J.; SMID K.; MEIJER S.; PINEDO H.M.; PETERS G.J. 5-fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to Thymidilate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, v. 15, p. 1025-1032, 2004.

PEREZ, C., SANCHEZ, A., PUTNAM, D., TING, D., LANGER, R., ALONSO, M. J. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. **Journal of Controlled Release**, v. 75, p. 211-224, 2001.

PETERS, G. J.; VAN DER WILT, C. L.; VAN MOORSEL, C. J.; KROEP, J. R.; BERGMAN, A. M.; ACKLAND, S. P. Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, p. 227-253, 2000.

PICOS, D.R.; CARRIL, M.G.; MANA, D.F.; FUENTE, L. N. Microspheres biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 34, p. 70-77, 2000.

POMBEIRO, A. J. L. **Técnicas e operações unitárias em química laboratorial**, 3ª ed., Colouste Gulbenkian: Lisboa, 1998.

PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; COUARRAZE, G.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J.-P.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; FESSI, H.; VAUTHIER, C.; BENITA, S. Polymeric Micro and Nanoparticles as Drug Carriers. In: Dumitriu, S. (Ed.). **Polymeric biomaterials**, New York: Marcel Dekker, 1994.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 1056-1062, 1998.

QUINTANAR-QUERRERO, D.; FESSI, H.; DOELKER, E.; ALLÉMANN, E. Methods of preparing vesicular nanocapsules. **U.S. Patent W09904766A**, 1999.

RAHMAN Z.; KOHLI K.; KHAR R.K.; ALI M.; CHAROO N.A.; SHAMSHER A.A.A. **Characterization of 5-fluorouracil microspheres for colonic delivery AAPS PharmSciTech**, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

REJINOLD, N.S.; CHENNAZHI, K.P.; NAIR, S.V.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Biodegradable and thermo-sensitive chitosan-g-poly(N-vinylcaprolactam) nanoparticles as a 5-fluorouracil carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 83: p. 776-786, 2011.

RÉUS, M. **Desenvolvimento e avaliação biofarmacêutica de sistemas coloidais como carreadores para a administração ocular do agente antitumoral 5-fluorouracil.** 2006 (Dissertação de Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

ROSCA, I. D.; WATARI, F.; UO, M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 271- 280, 2004.

RUDDON, R. W. **Cancer Biology**. New York: Oxford University Press. 3a ed, 1995.

SAEZ, M.; GUZMÁN, M.; MOLPHERES, J.; ABERTURAS, M. R. Freeze-Drying of Polycaprolactone and Poly (D,L – Lactic – Glycolic) Nanoparticles Induce Minor Particle Size Changes Affecting The Oral Pharmacokinetics of Loaded Drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50; n. 3; p. 379-387, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melatonina.** 2006 (Dissertação de Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova.**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SANTANDER-ORTEGA, M.J.; CSABA, N.; ALONSO, M.J.; ORTEGA-VINUESA, J.L.; BASTOS-GONZÁLEZ, D. Stability and physicochemical characteristics of PLGA, PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanoparticles – a comparative study. **Colloids and Surfaces A**, v. 296, p. 132-140, 2007.

SANTOS-SILVA, M.C. Efeito Citotóxico do Óxido Nítrico e do Taxol sobre Células Linfoblásticas Leucêmicas: Envolvimento do Fator de Transcrição NF-B e Papel da Glutathione. **Tese de doutorado desenvolvida pelo programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina**, defendida em 2002.

SEIPLE L.; JARUGA P.; DIZDAROGLU M.; STIVERS J.T. Linking uracil base excision repair and 5-fluorouracil toxicity in yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 140:151, 2006.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 139-157, 2001.

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

SOUZA, N. V. M. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, p. 308-312, 2004.

STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. Long circulating microparticulate drug carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 195-214, 1995.

THOMAS, C.B.; BURG, K.J.L. **Tissue Engineering Systems. In: Absorbable and Biodegradable Polymers** (eds. WS Shalaby, KJL Burg). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, 2004.

TOBÍO, M.; SÁNCHEZ, A.; VILA, A.; SORIANO, I. I.; EVORA C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO MJ. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 18: p. 315-323, 2000.

UBRICH, N., BOUILLOT, P., PELLERIN, C., HOFFMAN, M., MAINCENT, P. Preparation and characterization of propranolol hydrochloride nanoparticles: a comparative study. **Journal of Controlled Release**. v. 97, p. 291-300, 2004.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP 34: The National formulary: NF 29: by authority of the United States Pharmacopeia Convention prepared by the council of experts and its expert committees. 29.ed. **Rockville: United States Pharmacopeia Convention**, v. 2, p. 2874-2875, 2010.

VIEIRA, S. **Bioestatística: Tópicos Avançados**. Ed. 7ª, Elsevier, Rio de Janeiro, 2003.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; TOBÍO, M.; CALVO, P.; ALONSO M. Design of biodegradable particles for protein delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 78, p. 15-24, 2002

YANG, Y., CHUNG, T., PING, N. Morphology, drug distribution, and *in vitro* release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by

double-emulsion solvent extraction/evaporation method. **Biomaterials**, v. 22, p. 231-241, 2001.

YEH, M. K., TUNG, S. M., LU, D. W., CHEN, J. L., CHIANG, C. H. Formulation factors for preparing ocular biodegradable delivery system of 5-fluorouracil microparticles. **Journal of microencapsulation**, v. 18, n. 4, p. 507-519, 2001.

YIH, T.; WEI, C. Nanomedicine in cancer treatment. **Nanomedicine**, v. 1, p. 191-192, 2005.

ZAMBAUX, M. F., BONNEAUX, F., GREF, R., MAINCENT, P., DELLACHERIE, E., ALONSO, M. J., LABRUDE, P., VIGNERON, C. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. **Journal of Controlled Release**, v. 50, p. 31-40, 1998.

ZAMBAUX, M. F., BONNEAUX, F., GREF, R., DELLACHERIE, E., VIGNERON, C. Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. v. 5, n. 60, p.179-88, 1999.

ZHANG, C.; LI, G.; WANG, Y.; CUI, F.; ZHANG, J.; HUANG, Q. Preparation and characterization of 5-Fluorouracil-loaded PLLA-PEG/PEG nanoparticles by a novel supercritical CO₂ technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, p. 272-281, 2012.

ZHAO, Q.; WANG, J.; ZOU, M. J.; HU, R.; ZHAO, L.; QIANG, L.; RONG, J. J.; YOU, Q. D.; GUO, Q. L. Wogonin potentiates the antitumor effects of low dose 5-fluorouracil against gastric cancer through induction of apoptosis by down-regulation of NF-kappaB and regulation of its metabolism. **Toxicology Letters**, v. 197, p. 201-210, 2010.

WORKMAN, P.; KAYE, S. B. Cancer therapeutics. A *Trends Guide* with eleven reviews on various new potential approaches to the development of anticancer drugs. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, p. 1-73, 2002.

9. Anexo

Comite de ética