



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS COMO SISTEMA  
VETORIZADO PARA ENTREGA TÓPICA DE COMPOSTOS ATIVOS:  
EXPERIMENTOS E MODELAGEM MATEMÁTICA**

**RODRIGO SCOPEL**

ENGENHEIRO QUÍMICO

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**TESE PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA E  
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

**Porto Alegre**

**Março, 2017**



## ATA Nº 59

Aos vinte e nove dias do mês de março do ano de dois mil e dezessete, no Prédio 30, do Campus Universitário da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, realizou-se a 59ª sessão de defesa de tese do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais. O candidato Rodrigo Scopel Silva apresentou a tese, "SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS COMO SISTEMA VETORIZADO PARA ENTREGA TÓPICA DE COMPOSTOS ATIVOS: EXPERIMENTOS E MODELAGEM MATEMÁTICA", orientado pelo Prof. Dr. Rubem Mário Figueiró Vargas e co-orientado pelo Prof. Dr. Eduardo Cassel, para obtenção de grau de Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais. A comissão esteve constituída pelos professores, Dr. Rubem Mário Figueiró Vargas, que a presidiu, Dr. Marco Túllio Menna Barreto de Vilhena, Instituto de Matemática - Departamento de Matemática Pura e Aplicada, da UFRGS, Dra. Silvia Stanisçuaski Guterres, DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE MEDICAMENTOS, da UFRGS e Dra. Nara Regina de Souza Basso, do PGETEMA/FENG, da PUCRS. A comissão aprovou o candidato neste requisito parcial e último para obtenção do grau de Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais, desde que as correções sugeridas pela banca examinadora sejam efetuadas no prazo de sessenta dias. Nada mais havendo a constar, eu, Rubem Mário Figueiró Vargas, na qualidade de presidente da comissão examinadora, lavrei a presente ata que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão de Avaliação.

*Rubem Mário F. Vargas*

**DR. RUBEM MÁRIO FIGUEIRÓ VARGAS - ORIENTADOR**

*Eduardo Cassel*

**DR. EDUARDO CASSEL - CO-ORIENTADOR**

### BANCA EXAMINADORA

*Marco Túllio de Vilhena*

**DR. MARCO TÚLLIO MENNA BARRETO DE VILHENA - INSTITUTO DE MATEMÁTICA -  
DEPARTAMENTO DE MATEMÁTICA PURA E APLICADA - UFRGS**

*mm*

**DRA. SILVIA STANISÇUASKI GUTERRES - DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO E  
CONTROLE DE MEDICAMENTOS - UFRGS**

*Nara Regina de Souza Basso*

**DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - DO PGETEMA/FENG - PUCRS**

*“The power of imagination makes us  
infinite”*

*(John Muir)*

## **DEDICATÓRIA**

Dedicado à minha família.

## AGRADECIMENTOS

À toda equipe do Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) por, nesses 9 anos de convivência, terem propiciado tantos momentos importantes para o meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigado Guilherma Evaldt Rossa, Rafael Nolibos Almeida, Alexandre Timm do Espírito Santo, Ana Luisa Fianco, Prof. Aline Lucas, Gustavo Franceschini, José Jacques Garcez, Paulo Gandolfi e Cícero Bedinot. Agradeço ao Prof. Eduardo Cassel pelas inúmeras conversas de incentivo e por acreditar em mim nestes 9 anos de LOPE. À Prof. Silvia Guterres, Fernanda Morrone e Angélica Capellari pela colaboração na etapa experimental deste trabalho.

Agradeço, especialmente, ao meu orientador Rubem Vargas que, além de auxiliar a pavimentar o caminho do meu título de doutor, se tornou um amigo que vou levar para a vida toda.

Ao Manuel A. Falcão por ter compartilhado comigo a experiência de estudar na *University of California Los Angeles* e por ter dividido inúmeras aventuras pelos Estados Unidos.

Agradeço também à minha orientadora no exterior Prof. Andrea Kasko e aos meus colegas de laboratório na UCLA Sammy Norris, Stephanie Deshayes, Stephanie Delgado, Darice Wong, Walter Liau, Brianna Qiu, Samantha Anderson e Changying Xue.

À CAPES, pelas bolsas de estudo no Brasil e no exterior.

Finalmente, aos meus pais, Jorge Luiz da Silva e Deborah Maria Scopel Silva, ao meu irmão Rafael Scopel Silva e a minha querida namorada Fernanda Cassel.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>DEDICATÓRIA</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>SUMÁRIO</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....  | <b>12</b> |
| <b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....  | <b>14</b> |
| <b>RESUMO</b> .....   | <b>16</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>17</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>18</b> |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>2.1. Objetivos Específicos</b> .....                                       | <b>21</b> |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | <b>23</b> |
| <b>3.1. Epiderme e Derme</b> .....  | <b>23</b> |
| 3.1.1. Células de Langerhans .....  | 25        |
| 3.1.2. Melanócitos .....  | 26        |
| <b>3.3. Sistema de Entrega de Fármacos Tópico ou Transdérmico</b> .....       | <b>28</b> |
| 3.3.1. Nanopartículas Para Entrega Tópica e/ou Transdérmica .....             | 30        |
| <b>3.4. Matrizes e Tipos de Mecanismos</b> .....                              | <b>33</b> |
| <b>3.5. Nanopartículas poliméricas (NPs)</b> .....                            | <b>35</b> |
| 3.5.1. Produção de Nanopartículas Poliméricas .....                           | 35        |
| 3.5.2. Nanopartículas Híbridas Lipídio-Polímero (NPHs) .....                  | 37        |
| <b>3.6. Síntese de Peptídeos</b> .....  | <b>39</b> |
| <b>3.7. Modelagem Matemática de Mecanismos de Liberação de Fármacos</b> ..... | <b>40</b> |
| <b>3.8. Modelos Empíricos e Semi-Empíricos</b> .....                          | <b>41</b> |
| <b>3.9. Modelos Teóricos</b> .....  | <b>42</b> |
| 3.9.1. Mecanismos controlados pelo intumescimento .....                       | 43        |
| 3.9.2. Mecanismos controlados pela degradação e erosão .....                  | 44        |
| 3.9.3. Mecanismos controlados pela difusão .....                              | 45        |
| <b>3.10. Modelagem Matemática da Entrega Tópica e/ou Transdérmica</b> .....   | <b>54</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 3.10.1. Modelos de Estado Estacionário .....   | 57         |
| 3.10.2. Modelos Transientes.....   | 58         |
| 3.10.3. Modelos Baseados na Estrutura e Modelos Complexos .....  | 58         |
| 3.10.4. Parâmetros associados ao transporte através da pele.....   | 61         |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>  | <b>64</b>  |
| <b>4.1. Materiais .....</b>  | <b>65</b>  |
| <b>4.2. Produção de Nanopartículas de PLGA (NPs) .....</b>   | <b>66</b>  |
| <b>4.3. Produção de Nanopartículas Híbridas Lipídio-Polímero (NPHs).....</b>                                       | <b>68</b>  |
| 4.3.1. Quantificação de Lipídios na Superfície das NPHs .....  | 70         |
| <b>4.4. Síntese de Peptídeo .....</b>  | <b>72</b>  |
| <b>4.5. Conjugação do Peptídeo RGD no Fosfolipídio DSPE-PEG-Mal.....</b>   | <b>76</b>  |
| <b>4.6. Ensaio de Liberação .....</b>  | <b>77</b>  |
| <b>4.7. Cultura de Células .....</b>   | <b>80</b>  |
| <b>4.8. Avaliação da Viabilidade Celular .....</b>   | <b>80</b>  |
| <b>4.9. Avaliação da Internalização Celular por Microscopia Invertida de<br/>Fluorescência .....</b>               | <b>82</b>  |
| <b>4.10. Estatística .....</b>   | <b>82</b>  |
| <b>4.11. Modelagem Matemática .....</b>  | <b>82</b>  |
| 4.11.1. Modelagem Matemática da Liberação de Fármacos a Partir de<br>Nanopartículas Poliméricas.....               | 82         |
| 4.11.2. Proposta de Modelo Matemático da Permeação de Sistemas de<br>Liberação de Fármacos.....                    | 84         |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>  | <b>86</b>  |
| <b>5.1. Síntese de Nanopartículas, Nanopartículas Híbridas e Nanopartículas<br/>Híbridas Funcionalizadas .....</b> | <b>86</b>  |
| 5.1.1. Otimização do Recobrimento das Partículas.....  | 88         |
| <b>5.2. Síntese de Peptídeo .....</b>  | <b>93</b>  |
| <b>5.3. Conjugação do Peptídeo RGD no Fosfolipídio DSPE-PEG-Mal.....</b>   | <b>94</b>  |
| <b>5.4. Ensaio de Liberação .....</b>  | <b>95</b>  |
| <b>5.5. Efeito das NPs, NPH e NPH-F Sobre a Viabilidade Celular .....</b>  | <b>97</b>  |
| <b>5.6. Avaliação da Internalização Celular .....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>5.7. Modelagem matemática .....</b>   | <b>102</b> |
| 5.7.1. Modelagem Matemática da Liberação de Ativos a Partir de Nanopartículas<br>Poliméricas.....                  | 102        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>6. CONCLUSÕES .....</b>                      | <b>110</b> |
| <b>7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b> | <b>113</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>      | <b>114</b> |



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 3.1. Esquema da estrutura da epiderme. (Adaptado de Cichorek et al., 2013)   | 24 |
| Figura 3.2. Apresentação esquemática das rotas de permeação (Adaptado de Couto et al., 2014).   | 29 |
| Figura 3.3. <i>Poli</i> (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) - PLGA.  | 32 |
| Figura 3.4. Sistemas controlados pela difusão. ◆ representam fármacos no estado sólido e • fármacos solubilizados no polímero.  | 45 |
| Figura 3.5. Diagrama hipotético para o modelo de Higuchi (1963).  | 48 |
| Figura 3.6. Diagrama hipotético para o modelo de Roseman e Higuchi (1970).  | 52 |
| Figura 3.7. Resumo esquemático dos efeitos durante a penetração de substâncias e suas localizações (Adaptado de Naegel et al., 2013).   | 56 |
| Figura 3.8. Representação das escalas utilizadas nos modelos matemáticos de permeação cutânea (Adaptado de Naegel et al., 2013).  | 57 |
| Figura 3.9. (A) Esquema ilustrativo das possíveis origens de ligações lenta/ equilíbrio na <i>Stratum corneum</i> e (B) diagrama do modelo de equilíbrio lento (Adaptado de Roberts et al., 2009).  | 60 |
| Figura 4.1. Nanopartículas Poliméricas (NP) – Nanopartículas Híbridas Lipídio-Polímero (NPH) – Nanopartículas Híbridas Lipídio-Polímero Funcionalizadas (NPH-F). DSPE – fosfatidiletanolamina; HSPC - fosfatidilcolina de soja completamente hidrogenada; Col – Colesterol. | 64 |
| Figura 4.2. Método de emulsificação/ evaporação do solvente.  | 67 |
| Figura 4.3. Método de hidratação suave.   | 69 |
| Figura 4.4. Curva padrão de absorção dos complexos de HSPC/AF ( $\lambda = 471 \text{ nm}$ )  | 71 |
| Figura 4.5. Conjugação do primeiro peptídeo na superfície da resina 2-clorotritil.  | 73 |
| Figura 4.6. Rota de síntese do peptídeo CKPSDGRG.   | 74 |
| Figura 4.7. Formação do complexo piperidina-carbamato.  | 75 |
| Figura 4.8. Clivagem do peptídeo da superfície da resina 2-clorotritil.   | 75 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 4.9. Síntese do composto DSPE-PEG-RGD.....  | 76 |
| Figura 4.10. Representação esquemática de um experimento de permeação utilizando célula de Franz (Adaptado de Todo et al., 2013).....  | 78 |
| Figura 4.11. Curva de calibração da concentração de fluoresceína em PBS (pH 7,4) no espectrofluorímetro.....   | 79 |
| Figura 4.12. Curva de calibração da concentração de fluoresceína em PBS (pH 7,4) no espectrofotômetro. ....  | 80 |
| Figura 4.13. Curva de calibração da concentração de temozolomida em acetonitrila no espectrofotômetro. ....  | 81 |
| Figura 5.1. Imagens de MEV-FEG das NPs de PLGA sintetizadas obtidas em 70.000 x, 120.000 x e 300.000 x, respectivamente.....   | 87 |
| Figura 5.2. Espectros H-RMN das nanopartículas produzidas com (de cima para baixo) 1:1, 1:10, 1:20 e 1:25 razão mássica lipídio:NPs de PLGA.....   | 90 |
| Figura 5.3. Taxa de recobrimento total das NPs a partir de diferentes razões de lipídio:NPs. ....  | 91 |
| Figura 5.4. Imagens de MEV-FEG das NPH (esquerda) e NPH-F <sub>VD3</sub> (direita) sintetizadas com o protocolo otimizado. As imagens inferiores foram preparadas pelo método onde as nanopartículas são dispersas em água deionizada na concentração de 100 µg/mL. ....   | 92 |
| Figura 5.5. MALDI-TOF do peptídeo sintetizado antes da purificação. ....   | 93 |
| Figura 5.6. MALDI-TOF do peptídeo sintetizado após a purificação. ....   | 94 |
| Figura 5.7. MALDI-TOF mostrando o deslocamento dos picos quando a molécula DSPE-PEG-MAL é conjugada ao peptídeo RGD.....   | 95 |
| Figura 5.8. Liberação de fluoresceína em PBS (pH 7,4; 32.0°C) para as diferentes amostras.....   | 96 |
| Figura 5.9. Avaliação da viabilidade celular das células B16 após o tratamento com as formulações NP, NPH e NPH-F. As células foram mantidas em condições ideais de cultivo por 24 horas sob tratamento. Após este período o protocolo de viabilidade celular foi realizado conforme descrito na metodologia. Cada coluna representa a média ± erro padrão e o grau de significância é expresso pelo asterisco (*) indicando um p<0,05. Os resultados são expressos como percentual em relação ao controle não tratado. Os experimentos foram realizados três vezes em triplicata..... | 98 |

- Figura 5.11. Avaliação da internalização das nanopartículas por microscopia de fluorescência. Após o tratamento com as diferentes formulações de nanopartículas (NP, NPH e NPH-F) nas concentrações de 10 e 100 µg/mL, as células foram mantidas em condições ideais de cultivo por 3h e então a intensidade de fluorescência foi avaliada com o auxílio de um microscópio invertido. As imagens foram obtidas a partir de uma objetiva com aumento de 40x..... 100
- Figura 5.13. Perfil de liberação de sulfametizol a partir de micropartículas de PHB (dados experimentais de Brophy e Deasy (1987)) e comparação dos modelos aplicados..... 102
- Figura 5.14. Aplicação do modelo analítico de Baker-Lonsdale para os dados experimentais da liberação de fluoresceína para o meio PBS (pH 7,4/ 32°C). ..... 104
- Figura 5.15. Aplicação do modelo analítico de Peppas (1985) para os dados experimentais da liberação de fluoresceína para o meio PBS (pH 7,4/ 32°C). ..... 105
- Figura 5.16. Aplicação do modelo analítico de Roseman e Higuchi para os dados experimentais da liberação de fluoresceína para o meio PBS (pH 7,4/ 32°C). ..... 107
- Figura 5.17. Aplicação do modelo analítico de Peppas-Roseman-Higuchi para os dados experimentais da liberação de fluoresceína para o meio PBS (pH 7,4/ 32°C). ..... 108

## LISTA DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 3.1. Valores do expoente $n$ para a equação de Peppas (1985) e o mecanismo de liberação para diferentes geometrias (Adaptado de Siepmann e Siepmann, 2008)..... | 42  |
| Tabela 4.1. Equivalências utilizadas para a produção de NPHs (1:1, 1:10, 1:20 e 1:25 (m/m) lipídio/NPs).....   | 70  |
| Tabela 4.2. Equivalências utilizadas para a conjugação do primeiro aminoácido na resina 2-clorotritil. ....  | 73  |
| Tabela 4.3. Equivalências utilizadas para a síntese do peptídeo RGD. ....  | 74  |
| Tabela 5.1. Caracterização das NPs e NPHs (1:1 razão mássica lipídio/NPs). ....  | 88  |
| Tabela 5.2. Caracterização das NPs híbridas (1:1, 1:10, 1:20 e 1:25 razão mássica lipídio/NPs).....  | 89  |
| Tabela 5.3. Quantificação de lipídios na superfície das NPs híbridas (1:1, 1:10, 1:20 e 1:25 razão mássica lipídio/NPs).....   | 89  |
| Tabela 5.4. Caracterização das NPs, NPHs e NPHs-F preparadas na condição ótima (1:25 lipídios:NPs). ....   | 91  |
| Tabela 5.5. Caracterização das NPs, NPHs e NPHs-F preparadas na condição ótima (1:25 lipídios:NPs). ....   | 96  |
| Tabela 5.6. Eficiência de encapsulação (EE) e Eficiência de incorporação da temozolomida (DL) para NPs, NPH e NPH-F. ....  | 97  |
| Tabela 5.7. Valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para os métodos de solução utilizados para a equação de Baker-Lonsdale. ....                                | 103 |
| Tabela 5.8. Parâmetros obtidos a partir da modelagem dos dados experimentais utilizando a solução analítica da equação de Baker-Lonsdale. ....                         | 103 |
| Tabela 5.9. Valor dos parâmetros obtidos a partir da modelagem dos dados experimentais utilizando equação de Peppas (1985). ....                                       | 104 |
| Tabela 5.10. Valor dos parâmetros obtidos a partir da modelagem dos dados experimentais utilizando a equação analítica de Roseman e Higuchi. .                         | 107 |
| Tabela 5.11. Valor dos parâmetros obtidos a partir da modelagem dos dados experimentais utilizando equação Peppas-Roseman-Higuchi. ....                                | 108 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                    |  |
|--------------------|--|
| A/O                | Emulsão água em óleo   |
| A/O/A              | Emulsão água em óleo em água                                       |
| CH <sub>3</sub> CN | Acetonitrila   |
| CHCL <sub>3</sub>  | Clorofórmio  |
| COL                | Colesterol   |
| DCM                | Diclorometano  |
| DIEA               | Diisopropiletillamina  |
| DL                 | Eficiência de incorporação do fármaco                              |
| DLS                | Espalhamento de luz dinâmico                                       |
| DMEM               | Dulbecco's Modified Eagle's médium                                 |
| DMF                | Dimetilformamida   |
| DMSO               | Dimetilsulfóxido   |
| DSPE-PEG           | Fosfatidiletanolamina-metoxipolietilenoglicol                      |
| DSPE-PEG-mal       | Fosfatidiletanolamina-metoxipolietilenoglicol-maleamida            |
| EE                 | Eficiência de encapsulação   |
| EGF                | <i>Epidermal growth factor</i>                                     |
| EMA                | <i>European Medicines Agency</i>                                   |
| EtAc               | Acetato de etila   |
| FDA                | <i>Food and Drug Administration</i>                                |
| Fmoc-Arg(Pbf)-OH   | Aminoácido arginina protegido pelos grupamentos Pbf e Fmoc         |
| Fmoc-Asp(OtBu)-OH  | Aminoácido ácido aspártico protegido pelos grupamentos OtBu e Fmoc |
| Fmoc-Cys(Trt)-OH   | Aminoácido cisteína protegido pelos grupamentos OtBu e Fmoc        |
| Fmoc-Gly-OH        | Aminoácido glicina protegido pelo grupamento Fmoc                  |
| Fmoc-Lys(Boc)-OH   | Aminoácido lisina protegido pelos grupamentos Boc e Fmoc           |
| Fmoc-Pro-OH        | Aminoácido prolina protegido pelo grupamento Fmoc                  |
| Fmoc-Ser(tBu)-OH   | Aminoácido serina protegido pelos grupamentos tBu e Fmoc           |

|                     |   |
|---------------------|---|
| H-RMN               | Ressonância Magnética Nuclear   |
| HBTU                | 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato                   |
| HEPES               | Tampão orgânico composto por N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) |
| HOBt                | Hidroxibenzotriazol   |
| HPMC                | Hidroxipropilmetilcelulose  |
| HSPC                | Fosfatadilcolina de soja completamente hidrogenada                                    |
| MALDI-TOF           | <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i>                     |
| MeOH                | Metanol   |
| MEV                 | Microscopia Eletrônica de Varredura   |
| MPEG-b-(PLA-co-PAE) | Polietilenoglicol-metil éter-b-(poli ácido láctico-co-poli( $\beta$ -amino ésteres)   |
| NP <sub>s</sub>     | Nanopartículas Poliméricas  |
| NPH                 | Nanopartículas Poliméricas Híbridas Lipídio-Polímero                                  |
| NPH-F               | Nanopartículas Poliméricas Híbridas Lipídio-Polímero Funcionalizadas                  |
| NR7                 | Peptídeo que se liga ao receptor EGF  |
| PBS                 | Tampão fosfato-salino   |
| PCL                 | Policaprolactona  |
| PEG                 | Polietilenoglicol   |
| PGA                 | Ácido poliglicólico   |
| PLA                 | Ácido polilático  |
| PLGA                | Poli(ácido láctico-co ácido glicólico)  |
| PVA                 | Álcool polivinílico   |
| RFU                 | Unidades de Fluorescência Relativa (do inglês: Relative Fluorescence Units)           |
| RGD                 | Peptídeo composto pelos aminoácidos Arginina-Glicina-Ácido Aspartico                  |
| SC                  | <i>Stratum corneum</i>  |
| TFA                 | Ácido trifluoroacético  |
| TIS                 | Triisopropilsilano  |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|               |  |                    |
|---------------|--|--------------------|
| $\rho_{PLGA}$ | Densidade do PLGA                                    | mg/cm <sup>3</sup> |
| $C_S'$        | Concentração de fármaco na matriz em $a = 0$         | mg/cm <sup>3</sup> |
| $C_a'$        | Concentração na fase aquosa                          | mg/cm <sup>3</sup> |
| $a'$          | Raio na posição $'$                                  | cm                 |
| $a_0$         | Raio do sistema                                      | cm                 |
| $C_0$         | Concentração inicial na matriz                       | mg/cm <sup>3</sup> |
| $C_B$         | Concentração de substâncias em $h_a$                 | mg/cm <sup>3</sup> |
| $C_S$         | Solubilidade de fármaco na matriz                    | mg/cm <sup>3</sup> |
| $D_a$         | Coefficiente de difusão na fase aquosa               | cm <sup>2</sup> /s |
| $D_e$         | Coefficiente de difusão efetiva                      | cm <sup>2</sup> /s |
| $h_a$         | Espessura da camada difusiva                         | m                  |
| $M_{NPs}$     | Massa de nanopartículas analisada                    | mg                 |
| $M_\infty$    | Massa total de substância no interior da matriz      | mg                 |
| $M_L$         | Massa de lipídios utilizada na preparação das NPH    | mg                 |
| $M_t$         | Massa acumulada no tempo $t$                         | mg                 |
| $MW_L$        | Massa molar dos lipídios                             | mg                 |
| $N_A$         | Número de Avogrado                                   | mol <sup>-1</sup>  |
| $Q'$          | Taxa de difusão a partir da superfície da esfera     | mg                 |
| $R^2$         | Coefficiente de determinação                         |                    |
| $S_i$         | Área superficial de uma única NP                     | cm <sup>2</sup>    |
| $S_L$         | Área da parte polar das moléculas de HSPC e DSPE-PEG | cm <sup>2</sup>    |
| $V_1$         | Número de mols de lipídios por mg de NPH             |                    |
| $V_2$         | Número de lipídios por NPH                           |                    |
| $V_3$         | Taxa de recobrimento das NPH                         | %                  |
| $V_{NPs}$     | Volume individual de cada NP                         | cm <sup>3</sup>    |
| $a$           | Raio   | cm                 |
| $a$           | Coefficiente da Eq. 4.18                             |                    |
| $A$           | Concentração da substância no interior da matriz     | mg/cm <sup>3</sup> |
| $B$           | Parâmetro da Eq. 3.3                                 |                    |

|     |   |                         |
|-----|---|-------------------------|
| $C$ | Concentração  | $\text{mg}/\text{cm}^3$ |
| $c$ | Coeficiente da Eq. 4.18   |                         |
| $d$ | Coeficiente da Eq. 4.18   |                         |
| $D$ | Coeficiente de difusão do fármaco na matriz                                 | $\text{cm}^2/\text{s}$  |
| $k$ | Constante da Eq. 3.3  |                         |
| $K$ | Coeficiente de partição   |                         |
| $n$ | Ordem da cinética da liberação  |                         |
| $p$ | Parâmetro da fórmula de Vieta definido por $\frac{3ac-b^2}{3a^2}$           |                         |
| $q$ | Parâmetro da fórmula de Vieta definido por $\frac{2b^3-9abc+27a^2d}{27a^3}$ |                         |
| $Q$ | Quantidade total de fármaco liberado por unidade de área da matriz          | $\text{mg}/\text{cm}^2$ |
| $t$ | Tempo   | s                       |
| $V$ | Volume  | $\text{cm}^3$           |
| $y$ | $\frac{a'}{a_0}$  |                         |



## RESUMO

SCOPEL, Rodrigo. **Síntese de Nanopartículas Híbridas como Sistema Vetorizado para Entrega Tópica de Compostos Ativos: Experimentos e Modelagem Matemática.** Porto Alegre. 2017. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

A pele é uma rota de entrega atrativa para a aplicação de fármacos que minimiza efeitos adversos devido à baixa exposição sistêmica quando comparada a outras vias de aplicação. Estes compostos podem permear a camada pelas rotas intercelular, intracelular e transapêndice resultando em uma entrega tópica e/ou transdérmica. A entrega de compostos através de sistemas baseados na nanotecnologia pode revolucionar o tratamento de diversas doenças e disfunções onde, entre estes sistemas de liberação, lipossomas e nanopartículas poliméricas biocompatíveis, são as tecnologias que apresentam maior crescimento. A partir disso, torna-se ideal a pesquisa de mecanismos que contemplem as vantagens mecânicas das nanopartículas poliméricas com as características biomiméticas dos lipossomas. O objetivo deste trabalho é estudar a síntese e comportamento frente à aplicação tópica de nanopartículas híbridas compostas por um núcleo de PLGA e revestidas com uma mistura de fosfolípidios (HSPC:COL:DSPE-PEG) funcionalizada com moléculas ligantes. Inicialmente, propõe-se a conjugação de vitamina D na superfície das nanopartículas híbridas com o objetivo de direcionar as mesmas para receptores específicos de vitamina D (VDR) presentes em melanócitos e células de melanoma. Em sequência, a síntese do peptídeo RGD é realizada verificando a aplicabilidade da metodologia para um futuro direcionamento a receptores mais específicos presentes nestas células. Visando um maior entendimento sobre o comportamento de liberação de fármacos a partir destas nanopartículas, testes *in vitro* de liberação são conduzidos. Além disso, é sugerida uma solução analítica explícita do modelo matemático de liberação proposto por Baker-Lonsdale com o objetivo de obter informações referentes ao fenômeno de transporte controlador do processo de liberação de fármacos. Por fim, propõe-se um modelo matemático de permeação cutânea com condições de contorno adequadas para estes nanocarreadores.

Palavras-Chaves: Nanopartículas Híbridas; Sistemas de Entrega de Fármacos; Liberação Controlada; Modelagem Matemática

## ABSTRACT

SCOPEL, Rodrigo. **Synthesis of Hybrid Nanoparticles as a Topical Targeted Drug Delivery System: Experiments and Mathematical Modeling**. Porto Alegre. 2017. PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.

Human skin is an attractive option for applying active compounds that minimize adverse effects due to low systemic exposure when compared with other routes of administration. These compounds can permeate the skin layer by the intercellular, intracellular and follicular routes resulting in a topical and/or transdermal delivery. The delivery of active compounds via nanotechnology-based systems may revolutionize the treatment of several disorders including the ones related with the skin. Among these systems, liposomes, and biocompatible and bioabsorbable polymeric nanoparticles, are the technologies with the greatest growth in the field. Therefore, it is ideal to look for mechanisms that couple the mechanical advantages of polymeric nanoparticles with the biomimetic characteristics of liposomes. The aim of this work is to study the synthesis and behavior of hybrid nanoparticles comprising a polymeric core (PLGA) coated by a mixture of lipids (HSPC:CHOL:DSPE-PEG) functionalized to ligand molecules. Initially, it is proposed the conjugation of vitamin D on the surface of the hybrid nanoparticles to target them for specific receptors (VDR) present on melanocytes and melanoma cells. Subsequently, the synthesis of a RGD peptide is carried out aiming to verify the possibility of applying the same methodology for targeting more specific receptors of these cells. Seeking a greater understanding about how the drug is released from these nanoparticles, *in vitro* experiments of drug release are conducted. In addition, an explicit analytical solution of the mathematical model proposed by Baker-Lonsdale is proposed in order to obtain information regarding the transport phenomena that controls the drug release. Finally, it is proposed a skin permeation mathematical model with boundary conditions adapted for the target nanoparticles.

Keywords: Hybrid nanoparticles; Drug Delivery Systems; Controlled Release; Mathematical Modeling

## 1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e apresenta como principais funções a proteção contra agentes externos, manutenção da temperatura corporal e funções sensoriais. Além disso, a pele oferece uma rota alternativa indolor para a administração de substâncias (Tran, 2013). Devido às vantagens como evitar o metabolismo de primeira passagem, providenciar uma liberação prolongada e controlada, concentrar os fármacos no sítio de ação e prevenir efeitos adversos, os sistemas de entrega de aplicação tópica aumentam significativamente a adesão dos pacientes ao tratamento que são submetidos (Rancan et al., 2012).

Os sistemas de entrega de fármacos tiveram sua origem em meados dos anos 1960 quando Judah Folkman, na universidade de Harvard, durante um experimento circulando sangue de coelho em tubos de silicone percebeu que, se a tubulação tivesse sido previamente exposta a gases anestésicos, fazia com que os animais dormissem. Com isso ele propôs o primeiro mecanismo de entrega controlada de ordem zero, ou seja, de taxa constante. Posteriormente, o pesquisador propôs a introdução de fármacos onde, se a espessura da matriz polimérica fosse modificada, resultaria em uma mudança na taxa de liberação. A partir deste trabalho foi iniciada a era “macro” deste tipo de sistemas de entrega, incluindo os *patches* para aplicação cutânea criados por Folkmann em 1971. O desenvolvimento de polímeros biodegradáveis destinados à aplicação em suturas (1960-1970) foi o que despertou o interesse dos pesquisadores para a formulação de micropartículas poliméricas destinadas à entrega de ativos (era “micro”) atingindo aplicação clínica em meados dos anos 1980. No final dos anos 1970, o conceito de conjugados polímero-fármaco se tornou popular ao redor do mundo originando um grande número de patentes, publicações e, o mais importante, diversos novos tratamentos para diferentes enfermidades (Hoffman, 2008).

Os primeiros sistemas de entrega para aplicação dermatológica e cosmética foram os lipossomas seguidos de nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados e, nos últimos anos, carreadores poliméricos tem ganhado atenção para aplicação tópica (Rancan et al., 2014). Em consequência do avanço na área dos materiais nanoestruturados para a aplicação em sistemas de entrega de fármacos, nanopartículas com diferentes morfologias e composições têm sido desenvolvidas para otimizar ainda mais sua ação farmacêutica. Nanopartículas híbridas poliméricas revestidas com uma camada de fosfolipídios são um exemplo deste tipo de sistemas onde as mesmas têm como objetivo combinar as vantagens de lipossomas com as vantagens das nanopartículas poliméricas (Desai et al., 2013). Além disso, a superfície das mesmas pode ser funcionalizada, ou seja, conjugada à uma molécula que irá direcionar ativamente essas partículas para alvos específicos no corpo (Ex: células tumorais).

Segundo Peppas e Narasimhan (2014), nos últimos 50 anos a modelagem matemática de processos de difusão e liberação de sistemas de entrega de substâncias têm sido utilizadas para o *design* de um amplo número de mecanismos. Os modelos variam de simples, empíricos, fenomenológicos, probabilísticos até moleculares em estado estacionário e transiente. Uma lacuna que ainda existe entre a teoria e os dados experimentais na área é a necessidade de parâmetros mais exatos e precisos relacionados à transferência de massa, termodinâmica e também às interações biológicas.

Neste trabalho, é realizado o desenvolvimento de um sistema híbrido de entrega de fármacos, composto por uma nanopartícula polimérica revestida com uma camada de fosfolipídios e polietilenoglicol (PEG) para aplicação cutânea visando a entrega tópica e/ou transdérmica. Com o objetivo de direcionar este mecanismo para células de melanoma (ou melanócitos), a superfície do mesmo é funcionalizada com ligantes específicos onde, neste trabalho, são avaliados dois: vitamina D3 e o peptídeo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico). A camada de fosfolipídios associadas ao polímero PEG tem como objetivo diminuir o reconhecimento das nanopartículas por células do sistema imune (ex: células de Langerhans) impedindo com que as mesmas reduzam ou alterem a permeação dos

sistemas de liberação de fármacos. Além disso, os fluoróforos fluoresceína e *Nile Red* foram encapsulados nos nanocarreadores visando avaliar a liberação e internalização celular, respectivamente. Estudos pré-clínicos demonstraram que várias linhagens celulares de melanoma expressam o receptor de vitamina D (VDR) (Pettijohn et al. 2014; Mason et al., 1988). Hosoi et al. (1985) relata que células de melanoma de murinos (B16) estão entre estas linhas celulares. Por isso, com o objetivo de avaliar a ação farmacológica das nanopartículas aqui desenvolvidas, o fármaco temozolomida foi encapsulado e as mesmas submetidas a testes de citotoxicidade com células de melanoma (B16). Por fim, em conjunto com a produção de nanopartículas de diferentes características, realizou-se um estudo matemático onde é proposta uma solução analítica em forma explícita do modelo clássico de Baker-Lonsdale (1974) visando descrever os fenômenos envolvidos na etapa de liberação de substâncias a partir destes sistemas. De posse da validação, simulação e estimação de parâmetros do modelo, tem-se como objetivo o fornecimento de dados para a otimização do *design* dos sistemas de entrega de fármaco aqui fabricados. Além disso, espera-se que o modelo seja de fácil aplicação contribuindo assim para a diversa comunidade científica envolvida na área de sistemas de entrega de fármacos.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo a produção de nanopartículas híbridas compostas de um núcleo polimérico de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) revestido com uma camada lipídica composta por fosfatidilcolina de soja completamente hidrogenada (HSPC), colesterol (COL) e diestearoil fosfatidiletanolamina-metoxipolietilenoglicol (DSPE-PEG) conjugada aos ligantes vitamina D3 para vetorização a receptores nucleares de vitamina D (presentes em melanócitos e células de melanoma) ou conjugadas ao peptídeo RGD para vetorização ativa a receptores da família das integrinas, igualmente presentes em melanomas. Além disso, são conduzidos ensaios de citotoxicidade e internalização celular em células de melanoma (B16). Por fim, são realizados testes de liberação associados à modelagem matemática visando uma maior compreensão dos fenômenos físico-químicos envolvidos na liberação de substâncias a partir dessas partículas após sua aplicação.

### 2.1. Objetivos Específicos

Para atingir o objetivo geral desta tese, as seguintes ações são realizadas:

- produção de nanopartículas de PLGA;
- revestimento das nanopartículas com a mistura de fosfolípidos HSPC, colesterol e DSPE-PEG;
- otimização da proporção lipídio:nanopartículas (m/m) utilizada na preparação das nanopartículas híbridas;

- produção de nanopartículas híbridas a partir da condição ótima;
- produção de nanopartículas híbridas funcionalizadas com vitamina D;
- síntese do peptídeo RGD;
- conjugação do peptídeo RGD no fosfolipídio DSPE-PEG;
- produção de nanopartículas híbridas funcionalizadas com o peptídeo RGD;
- produção de nanopartículas, nanopartículas híbridas e nanopartículas híbridas funcionalizadas com vitamina D encapsulando os fluoróforos fluoresceína e *Nile Red*;
- produção de nanopartículas, nanopartículas híbridas e nanopartículas híbridas funcionalizadas com vitamina D encapsulando o fármaco temozolomida;
- caracterização dos nanocarreadores (tamanho, Pdl, potencial zeta e morfologia);
- ensaios de liberação *in vitro* das nanopartículas encapsuladas com o fluoróforo fluoresceína;
- avaliação da citotoxicidade em células de melanoma B16 utilizando o protocolo MTT;
- avaliação da internalização celular por microscopia de fluorescência;
- modelagem matemática da liberação de compostos ativos a partir das nanopartículas.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Epiderme e Derme

A pele, maior órgão do corpo humano, tem como função proteger o mesmo de estresses vindos do meio externo além de atuar como um escudo térmico e à prova d'água. Além disso, a pele, constituída pela derme, epiderme e anexos cutâneos (folículos pilossebáceos, folículos pilosos, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas apócrinas e unhas), produz peptídeos antimicrobianos que previnem infecções, bem como, hormônios, neuropeptídeos e citocinas que apresentam ação tanto local como sistêmica. A epiderme (Figura 3.1) é formada por um conjunto de quatro camadas: camada córnea (*Stratum corneum*), camada granulosa (*Stratum granulosum*), camada espinhosa (*Stratum spinosum*) e camada basal (*Stratum basale*). Este tecido epitelial estratificado queratinizado é composto por um sistema queratinócito, sistema melânico, células de Langerhans, células de Merkel e células dendríticas (Gilaberte et al., 2016; Powell, 2006). Cada uma destas camadas apresenta uma determinada peculiaridade e serão discutidas a seguir.

- *Stratum basale*: A camada basal é a camada mais profunda da pele e participa diretamente na junção dermoepidérmica (aonde a derme e a epiderme se unem). Nesta camada, cones interpapilares penetram a derme e papilas dérmicas se projetam na epiderme. Formada por, geralmente, uma célula de espessura, a camada basal é composta por 90-95% de queratinócitos justapostos e de 5-10% de melanócitos (Venus et al., 2011).
- *Stratum spinosum*: As células de morfologia colunar, citoplasma basófilo com núcleo grande e oval da camada basal se deslocam em direção à superfície formando uma camada de células poliédricas



conectadas por desmossomos responsáveis pela junção entre as células. Estas, sob a luz do microscópio, lembram espinhos conferindo o nome da camada. Além disso, é na camada espinhosa que se localizam as células de Langerhans (Powell, 2006; Venus et al., 2011).

- *Stratum granulosum*: Esta é a camada mais superficial aonde existem células vivas. Ao deixar a camada espinhosa, os queratinócitos se tornam parte da camada granular composta por duas a três células repletas de grânulos basofílicos. Os grânulos são lisossomos que contêm enzimas hidrolíticas que destroem o núcleo e outras organelas, resultando na morte celular e surgimento da camada córnea (Gilberte et al., 2016).
- *Stratum corneum* (SC): A camada córnea é o limite entre o indivíduo e o meio ambiente. Esta camada é composta por células mortas, sem núcleo e organelas citoplasmáticas, nominadas corneócitos, forma uma eficiente barreira à grande parte de organismos, substâncias químicas e fluidos. Esta barreira também é responsável pela proteção da perda de fluidos do corpo. A impermeabilidade da SC ocorre, pois os corneócitos estão dispostos em uma rede, ligados por proteínas (Ex: involucrina) e, além disso, os espaços intercelulares são preenchidos com uma matriz rica em lipídios que são distribuídos de forma laminar fornecendo uma barreira robusta e à prova d'água (Gilberte et al., 2016).

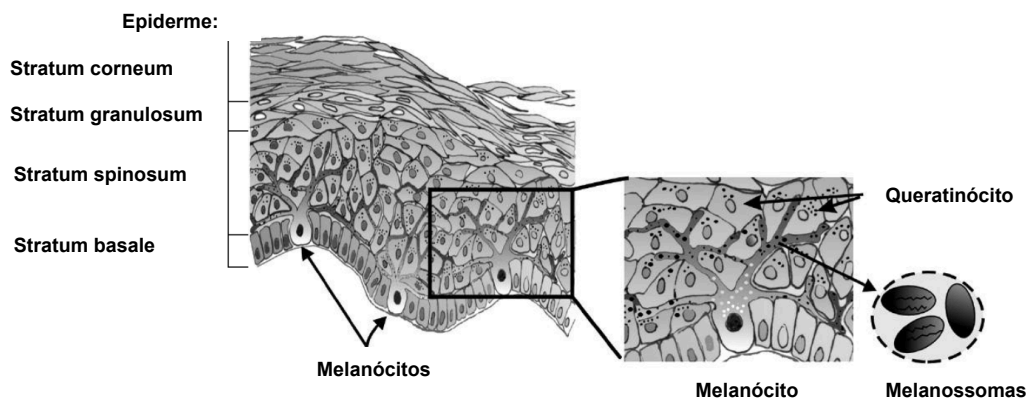


Figura 3.1. Esquema da estrutura da epiderme. (Adaptado de Cichorek et al., 2013)

A derme é um tecido conjuntivo e se localiza logo abaixo da epiderme fornecendo a resistência e resiliência da pele. A mesma é composta por fibroblastos e colágeno, substâncias fundamentais (polissacarídeos e proteínas) e fibras. Fornecendo suporte estrutural e nutricional para a epiderme, a interação entre os dois tecidos colabora no reparo da pele e na formação da junção dermoepidérmica (Powell, 2006).

### 3.1.1. Células de Langerhans

Conforme citado anteriormente, o *Stratum corneum* é caracterizado por ser a barreira física de maior importância na pele. Além desta proteção, a epiderme conta com um sistema de defesa por funções imunes onde as células de Langerhans são responsáveis pelo reconhecimento, internalização e processamento de antígenos exógenos. Estas células dendríticas derivadas da medula óssea correspondem a 3-5% das células epidérmicas (Rancan et al., 2012, Engelke et al., 2015 e Kolonics et al., 2013).

Rancan et al. (2012) estudaram os efeitos da utilização de partículas de sílica com diferentes tamanhos e funcionalização da superfície para aplicação tópica. Os autores concluíram que células de Langerhans internalizaram as partículas mais eficientemente que queratinócitos onde o mecanismo de internalização depende do tamanho destas partículas. Este fato pode ser explicado, pois células dendríticas, como células de Langerhans, são passíveis de internalizar patógenos no *range* de micrometros por meios de fagocitose, enquanto que queratinócitos internalizam por meio de endocitose, limitando o tamanho da matéria a 200 nm. Os autores também funcionalizaram estas partículas com ligantes de carga positiva para avaliar a influência da carga superficial na internalização celular. Ao analisar os resultados, os mesmos verificaram que a carga superficial positiva aumenta as interações eletrostáticas com a membrana celular favorecendo, assim, a internalização destas partículas.

### 3.1.2. Melanócitos

Os melanócitos são células dendríticas diferenciadas terminais, ou seja, elas não se dividem em situações normais (Powell, 2006). Residentes da camada basal da epiderme, os melanócitos são responsáveis pela fotoproteção e termoregulação através da produção de melanina (Cichorek et al., 2013; Uong e Zon, 2010). A melanina é exportada dos melanócitos em grânulos para queratinócitos adjacentes fornecendo a pigmentação e determinando a coloração da pele (Cichorek et al. 2013; Yamaguchi e Hearing, 2014). Os melanócitos estão relacionados a diversas doenças, entre elas o melanoma sendo, portanto, um importante alvo do ponto de vista farmacológico (Rosenkrans et al., 2013) e, assim como, as células de Langerhans e queratinócitos, os melanócitos apresentam em sua superfície receptores específicos como de melanocortina e de vitamina D. A descoberta da presença desses receptores desperta o interesse da síntese e vetorização de moléculas e/ou partículas conjugadas a ligantes que possam interagir com esses receptores visando tornar a entrega de ativos o mais específica possível (Shariari et al., 2010).

### 3.2. Sistemas de Entrega de Compostos Ativos

A tecnologia de entrega controlada de fármacos tem como principal objetivo o desenvolvimento de sistemas que mantenham a biodisponibilidade do fármaco no sítio afetado a partir de uma taxa controlada (Sackett e Narasimhan, 2011). Ao realizar a liberação de maneira controlada durante longos períodos, ocorre uma diminuição dos efeitos colaterais causados por concentrações extremas, além de aumentar a adesão dos pacientes em relação aos tratamentos tradicionais (Versypt et al., 2013; Kale e Garg, 2012).

A evolução desta tecnologia se deve, primeiramente, aos avanços na química polimérica que tem resultado em polímeros capazes de apresentarem respostas a diferentes agentes atuantes do meio, por exemplo, pH e temperatura (Kale e Garg, 2012). Outro fator que contribui para o crescimento da área é a capacidade de disponibilizar de forma controlada ingredientes farmacêuticos ativos potentes, complexos e pouco solúveis (Kimber et al., 2013; Zuleger e Lippold, 2001).

Segundo Wolinsky et al. (2012), existem dois principais grupos de sistemas de entrega de fármacos:

i) **Sistêmicos:** Nestes sistemas, veículos produzidos a partir de nanomateriais como nanopartículas poliméricas, lipossomas e dendrímetros são administrados via intravenosa. Em alguns casos, estes veículos podem ser sensíveis a determinadas condições do meio (ex: pH ou temperatura) e, a partir destes “gatilhos”, ocorre a liberação do composto localizado no seu interior. Segundo Patel et al. (2012), estas partículas devem ser estáveis no sangue, evitar a remoção imediata e apresentar tempo de circulação prolongado.

ii) **Locais:** Neste tipo de mecanismo, a matriz polimérica contendo o fármaco é introduzida no sítio afetado ou próxima a ele. Estes sistemas podem ser aplicados cirurgicamente (ex: tratamento de tumores) ou topicamente (ex: regeneração do tecido epitelial). Com o objetivo de evitar reações de corpo estranho, estes sistemas são normalmente compostos de polímeros biocompatíveis (Patel et al., 2012) e, se na forma de partículas, cargas superficiais neutras ou negativas são preferíveis, pois apresentam menor adsorção a proteínas séricas resultando em maiores tempos de circulação (Blanco et al., 2015).

Diferentes mecanismos têm sido combinados para atingir determinado perfil de liberação. Algumas alterações que podem ser citadas são: a modificação da composição do mecanismo, o número de compostos ativos e, como já citado acima, o uso de compostos sensíveis ao ambiente (Nauman et al., 2010). Ao incorporar fármacos em matrizes poliméricas a taxa de entrega pode ser controlada através da difusão do fármaco, intumescimento e erosão da matriz. O fenômeno controlador do processo de liberação dependerá de qual matriz polimérica está sendo utilizada (Kaunisto et al., 2010).

A partir disto, é possível destacar os sistemas de liberação de fármacos a seguir:

- lentes de contato (González-Chomón et al., 2012; Braga et al., 2011);

- patches de nicotina (Prausnitz e Langer, 2008);
- *Gliadel Wafer* (Brem e Langer, 1996);
- hidrogéis fotodegradáveis (Griffin e Kasko, 2012);

É importante destacar que todos os parâmetros relacionados com o fenômeno físico da entrega do fármaco (ex: morfologia do polímero, morfologia do fármaco e disposição do fármaco no polímero) são fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, visto que, para se obter uma modelagem efetiva é necessária uma boa representação matemática do fenômeno físico envolvido no processo.

### 3.3. Sistema de Entrega de Fármacos Tópico ou Transdérmico

Substâncias aplicadas na superfície da pele com objetivo estético e terapêutico têm sido utilizadas por milhares de anos e, na era moderna, uma variedade de formulações tópicas tem sido desenvolvida. O primeiro mecanismo transdermal de entrega sistêmica de fármacos foi aprovado em 1979 nos EUA e consistia de um *patch* de escopolamina com o objetivo de tratar a cinetose. O grande impacto na área aconteceu uma década depois com o lançamento de *patches* de nicotina (Prausnitz e Langer, 2008). O mercado farmacêutico de sistemas de entrega transdérmica é pequeno comparado ao restante da indústria, contabilizando 17 produtos transdérmicos no mercado estimados, em dezembro de 2015, no valor de US\$32 bilhões de dólares (Watkinson et al., 2015).

Segundo Tran et al. (2013), a pele, o maior órgão do corpo humano, oferece uma interface indolor e compatível para a administração de fármacos e, quando comparada com outros métodos de administração, a entrega tópica ou transdérmica reduz efeitos adversos e evita o metabolismo de primeira passagem hepático diminuindo a carga colocada no trato digestivo e de fígado. Além disso, este é um método não invasivo que pode ser administrado pelo próprio paciente, e se acumula no sítio de ação potencializando o efeito dos compostos ativos aplicados (Rancan et al., 2012; Tomoda et al., 2012; Prausnitz e Langer, 2010). Apesar das diversas

vantagens apresentadas na entrega tópica, princípios ativos são limitados a três características: baixo peso molecular (<500 Da), alta lipofilicidade e baixa dose requerida (Tran et al., 2013). Estas limitações são conferidas pela fisiologia da pele. Apesar de ser normalmente  $\leq 2$  mm de espessura, a mesma contribui em torno de 4% do peso corporal e é de  $10^2$ - $10^4$  vezes menos impermeável que um vaso capilar. O *Stratum Corneum*, apesar de representar 5-20  $\mu\text{m}$  do órgão, é a barreira primária à difusão de moléculas (Cevc et al., 2010).

Substâncias aplicadas topicamente apresentam basicamente três rotas de penetração (Figura 3.2): transcelular, intercelular e transfolicular. Na rota transcelular, a difusão de compostos ocorre através de ambos os queratinócitos e as bicamadas lipídicas. A difusão intercelular ocorre somente através das bicamadas lipídicas. A difusão pode também ocorrer nos apêndices da pele sendo ressaltados os folículos capilares (Bathe et al., 2015; Tomoda et al., 2012; Tran et al., 2013; Rancan et al., 2012).

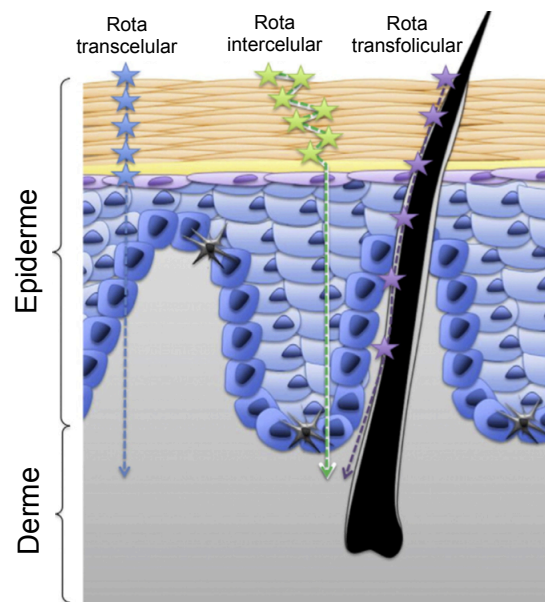


Figura 3.2. Apresentação esquemática das rotas de permeação (Adaptado de Couto et al., 2014).

Com o objetivo de contornar os desafios e aumentar a penetração de moléculas na pele, diferentes estratégias têm sido desenvolvidas e podem ser separadas em três grandes grupos. O primeiro grupo se baseia no desenvolvimento

de compostos que alteram a estrutura ou extraem os lipídios da *Stratum Corneum* ou derivados que apresentem solubilidade alterada. A segunda estratégia utiliza uma força externa como ultrassom, correntes elétricas (iontoforese) e microagulhamento para aumentar a permeação de compostos. Por fim, o terceiro grupo se baseia no desenvolvimento de veículos de tamanho reduzido (ex: nanopartículas, lipossomas, microesferas) capazes de entregar o fármaco nas camadas mais profundas da pele (Tran et al., 2013).

Existe uma demanda por um maior entendimento do paradeiro dos sistemas carreadores após a aplicação tópica dos mesmos. Como citado anteriormente, os carreadores podem apresentar interações com moléculas ou células da pele sendo de interesse saber a exata localização dos penetrantes para um *design* inteligente de partículas que sejam vetorizadas a células que contenham receptores específicos aumentando, assim, a ação em um determinado alvo farmacológico (Rancan et al., 2012).

### 3.3.1. Nanopartículas Para Entrega Tópica e/ou Transdérmica

A nanotecnologia oferece uma gama de possibilidades para a melhora da entrega, biodisponibilidade e vetorização de fármacos e cosméticos na pele. A capacidade biomimética em conjunto com a alta área superficial e possibilidade de modular as propriedades das nanopartículas, aumentaram o interesse na sua aplicação biomédica em imagem, diagnóstico e terapia (Dianzani, 2014).

Estes mecanismos de entrega transdérmicos devem ser minimamente invasivos reduzindo a dor e perigos de infecção. Além disso, os efeitos toxicológicos devem ser avaliados para que uma maior implementação desta tecnologia seja aplicada (Papakostas et al., 2011 e Cevc et al., 2010).

A entrega de fármacos por meios de nanopartículas podem revolucionar o tratamento de diversas doenças da pele (Papakostas et al., 2011) apresentando as seguintes vantagens (Zhang et al., 2013):

- aumento de estabilidade do composto ativo;

- diminuição de efeitos adversos (ex: irritação);
- entrega do fármaco diretamente no sítio de ação, minimizando a exposição sistêmica;
- liberação prolongada, fornecendo um nível constante de fármaco no tecido.

Os primeiros tipos de sistema de liberação de tamanho reduzido investigados e comercializados para aplicação dermatológica e cosmética foram os lipossomas. Posteriormente, foi iniciada a pesquisa em nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados mais estáveis e com melhor perfil de penetração (Rancan et al., 2012). Além destas, podem ser destacados dendrímeros, nanopartículas poliméricas (Zhang et al., 2010a) e mais recentemente cubossomas, niossomas, nanocristais e fulerenos (Lohani et al., 2014).

Em geral, os nanocarreadores mais estudados para a entrega tópica são as nanopartículas lipídicas sólidas e as nanopartículas poliméricas (Dianzani et al., 2014). Os polímeros biodegradáveis oferecem vantagem sobre os sistemas lipídicos podendo ser estocados durante mais tempo, fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos podem ser encapsulados ou adsorvidos, podem ter sua superfície funcionalizada e suas propriedades físico-químicas podem ser ajustadas (Rancan et al., 2012).

O PLGA (Figura 3.3) é um dos polímeros biodegradáveis sintéticos mais atrativos devido ao seu perfil seguro, mais utilizado, e mais comercializado para a entrega controlada de agentes terapêuticos sendo aprovado pelos órgãos americano *Food and Drug Administration* (FDA) e europeu *European Medicines Agency* (EMA) (Crucho e Barros, 2015). Os compostos presentes nessas matrizes são liberados seguindo uma cinética Fickiana devido à difusão pela matriz polimérica, podendo ser ativada em resposta a um estímulo externo ou por degradação química (Dinarvand et al., 2011).



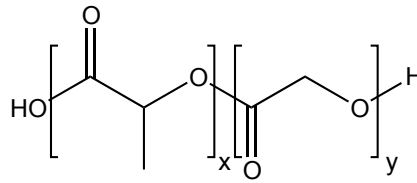


Figura 3.3. *Poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico)* - PLGA.

A funcionalização da superfície de nanocarreadores tem ganhado cada vez mais atenção. Através da modificação da superfície dessas partículas e introdução de ligantes específicos, por exemplo, anticorpos monoclonais e proteínas, uma vetorização ativa pode ser feita para determinada população de células visando alvos (receptores) específicos. A rota transfolicular se torna importante para estes mecanismos, onde uma grande quantidade de células de Langerhans, células dendríticas e melanócitos são encontradas (Papakostas et al., 2011; Zhang et al., 2010b). Além da introdução de moléculas ligantes, a carga superficial é um parâmetro de grande interesse pois influencia tanto na penetração quanto no reconhecimento e internalização pelas células visadas. Blanco et al. (2015) citam que partículas carregadas neutra ou negativamente apresentam maior tempo de circulação e, em contrapartida, partículas carregadas positivamente são internalizadas mais facilmente por células tumorais. Então, para uma entrega efetiva de nanopartículas a um determinado tumor, se administradas por via intravenosa, o ideal seria que as mesmas tivessem carregadas negativamente e assim que chegasse no sítio, onde está localizado o tumor, modificassem sua carga superficial.

Exemplos de aplicação de nanocarreadores para a entrega transdérmica podem ser encontrados na literatura com uma grande variedade de matrizes, compostos ativos e tecnologias. Alguns exemplos considerados relevantes são citados a seguir.

Nogi et al. (2012) encapsulou três derivados de vitamina em nanoesferas de PLGA (Vitamina A, C e E) com o objetivo de permear a epiderme liberando gradativamente derivados de vitamina durante 48 h por hidrólise causada pela umidade da pele. As nanoesferas obtidas apresentaram tamanho médio de 200 nm e permearam não só os poros da pele (200-300 nm), mas também o *Stratum corneum* nos experimentos de permeabilidade cutânea. Tomoda et al. (2012)

sintetizaram nanopartículas de PLGA de 150 nm carregadas com estradiol para estudar o efeito em conjunto com o método da iontoforese na permeabilidade desses mecanismos através da pele de murinos. Os autores concluíram que a penetração das nanopartículas de PLGA-estradiol foi aumentada devido à interação da iontoforese com a carga superficial negativa das nanopartículas. Wang et al. (2015) desenvolveram uma formulação de PLGA-PEG-NR7 carregadas com um ativo anticâncer. NR7 é um peptídeo que se liga ao receptor EGF (*epidermal growth factor*), o que é bastante presente em cânceres epiteliais. Os autores concluíram que o mecanismo apresentou uma rápida internalização e efeito citotóxico aumentado em carcinoma de células escamosas oral.

### 3.4. Matrizes e Tipos de Mecanismos

Os sistemas de liberação envolvendo matrizes poliméricas são produzidos a partir de polímeros biodegradáveis onde a autocatálise apresenta um importante papel na taxa de degradação e no caminho erosivo do polímero. Ao predizer o comportamento dos fenômenos de transporte envolvidos na aplicação destes sistemas ficam facilitadas as escolhas de materiais apropriados, condições, dimensões e geometria (Sackett C.K. e Narasimhan, 2011).

Abaixo é possível observar as classes mais comuns de polímeros bioerosíveis (Sackett e Narasimhan, 2011; Wolinsky et al., 2012; Versypt et al., 2013):

- a) Poliésteres: São polímeros *bulk*-erosivos com degradação catalisada (hidrólise ácida) pelos monômeros produtos da degradação. Os poliésteres mais comuns são o ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA) e a policaprolactona (PCL). Devido ao baixo custo e a atoxicidade, a PCL tem atraído grande atenção de pesquisadores. Além disso, a PCL não sofre degradação ácida e seus produtos da degradação podem ser solubilizados por fluidos corporais e removidos por fagocitose (Liu et al., 2012). O PLA é outro polímero que atrai muitos pesquisadores tendo como seu fator de uso limitante a baixa hidrofiliabilidade. Dependendo do objetivo de seu uso torna-se necessária a introdução de um outro polímero com

característica hidrofílica em sua cadeia. Um dos copolímeros muito utilizados nesta situação é o poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) (Jin et al., 2012).

- b) Poli(orto ésteres): Estes polímeros foram desenvolvidos pela *ALZA Corporation* especificamente para aplicação na entrega de fármacos. São semelhantes aos poliésteres, se degradando, também, a partir da hidrólise por catálise ácida a partir de sua superfície. Esta classe de polímeros varia sua nomenclatura dependendo da rota de síntese utilizada variando de POE-I até POE-IV. Entre os poli(orto ésteres), o POE IV é o considerado de maior potencial apresentando perfis de liberação controlada para uma grande variedade de fármacos e uma rota de síntese passível de aumento de escala (Nair e Laurencin, 2007).
- c) Polianidridos: Os polianidridos podem ser considerados, dentre os polímeros que sofrem erosão a partir da superfície, os mais investigados na literatura. As primeiras aplicações deste tipo de polímeros na área de sistemas de entrega de fármacos foi por Brem e Langer (1996) onde o dispositivo Gliadel® foi desenvolvido para o tratamento de gliomas. Este sistema de liberação apresenta o formato de um *wafer* composto pelo polianidrido poli(carboxifenoxi-propano/ ácido sebático) e o fármaco carmustina (Nair e Laurencin, 2007).

Outro tipo de partículas de tamanho reduzido que tem sido estudada é o de micelas e lipossomas, que apresentam estrutura de núcleo/casca onde o interior é suscetível à incorporação de ativos lipofílicos e o revestimento externo apresenta uma interface estável entre o interior da partícula e o meio de liberação (Zhang et al., 2012).

Com o objetivo de suprir as desvantagens das nanopartículas poliméricas e dos lipossomas, recentemente estão sendo desenvolvidos diferentes trabalhos envolvendo os dois sistemas, ou seja, um núcleo polimérico revestido com uma camada lipídica. Estes sistemas híbridos apresentam versatilidade na sua aplicação, por exemplo, Chen et al.(2013) desenvolveram um sistema aplicando polímeros

sensíveis ao pH e temperatura em conjunto com o fármaco doxorubicina. Ao aplicar este tipo de sistema, os autores se aproveitam do microambiente ácido do tumor para liberar o fármaco e a liberação pode ser ainda auxiliada por um tratamento térmico não invasivo.

Devido à alta capacidade de introdução de substâncias ativas, facilidade de administração, toxicidade sistêmica reduzida e maior eficácia terapêutica, os sistemas de entrega controlada envolvendo lipossomas e nanopartículas poliméricas estão entre os sistemas mais promissores para o desenvolvimento de novos produtos (Liu et al., 2012; Yang et al., 2013; Lesoin et al., 2011; Mandal et al., 2013).

### **3.5. Nanopartículas poliméricas (NPs)**

Segundo Mandal et al. (2013), quando comparadas com os excipientes farmacêuticos comuns, as nanopartículas poliméricas apresentam como vantagem o tamanho reduzido, capacidade de penetração nos tecidos, grande variedade de métodos de preparação, disponibilidade de vários polímeros, facilidade na modificação dos perfis de liberação e introdução de fármacos. Entre as suas limitações estão a dificuldade de encapsulação para fármacos hidrofílicos, citotoxicidade e degradação.

#### **3.5.1. Produção de Nanopartículas Poliméricas**

A produção de nanopartículas poliméricas é normalmente realizada por métodos tradicionais utilizando solventes orgânicos. Estes métodos são amplamente apresentados na literatura e são descritos a seguir (Makadia e Siegel, 2011; Souto et al., 2012).

- Emulsificação/evaporação do solvente:

Este é o método mais utilizado para a preparação de partículas poliméricas sólidas. Uma solução é preparada dissolvendo o polímero em um solvente volátil imiscível em água, por exemplo, diclorometano. Esta mistura é posteriormente emulsificada em uma solução aquosa contendo um tensoativo (ex: álcool polivinílico)

em uma temperatura apropriada e exposta a uma forte fonte de agitação como, por exemplo, um sonicador ou homogeneizador. A fase orgânica é evaporada resultando em uma dispersão de nanopartículas que são coletadas por ultracentrifugação, lavadas e liofilizadas para estocagem.

Se o fármaco em questão for hidrofílico, a emulsão dupla deve ser aplicada. Este método é bastante similar ao de emulsão simples, porém uma solução aquosa contendo o fármaco é emulsificada com a fase orgânica contendo o polímero. Posteriormente a emulsão água em óleo (A/O) é emulsificada novamente com outra solução aquosa contendo o emulsificante. Esta nova emulsão, água em óleo em água (A/O/A), é submetida aos mesmos passos de evaporação do solvente, centrifugação e liofilização.

- Emulsificação-Difusão do solvente (Emulsificação/deslocamento do solvente):

Esta técnica necessita que o solvente utilizado para preparar a emulsão seja parcialmente solúvel em água (ex: álcool benzílico ou acetato de etila). A solução polimérica é adicionada a uma solução aquosa contendo o emulsificante e agitada. Uma vez formada, a emulsão é diluída em uma grande quantidade de água possibilitando com que a fase orgânica que, estava nas gotas, difunda no sentido da solução levando a uma dispersão de nanopartículas.

- *Salting-out*:

O método *salting-out* é bastante similar ao de emulsificação/difusão do solvente, entretanto, são utilizados sais (eletrólitos ou não eletrólitos) na fase externa (solução aquosa) contendo um tensoativo. Além disso, é necessário realizar uma separação do excesso de eletrólitos por ultracentrifugação ou ultrafiltração.

- Nanoprecipitação:

Este é um procedimento de etapa única que consiste em dissolver o polímero, fármaco e surfactante lipofílico em um solvente semipolar solúvel em água. Esta solução é, então, injetada em uma solução aquosa contendo o estabilizante sob

agitação. As nanopartículas são formadas instantaneamente pela difusão rápida do solvente que é, posteriormente, removido sob pressão reduzida.

### 3.5.2. Nanopartículas Híbridas Lipídio-Polímero (NPHs)

Com o objetivo de suprir as limitações das nanopartículas poliméricas apresentadas anteriormente, diversos autores têm direcionado seu foco de estudo para o desenvolvimento de um sistema que seja capaz de combinar as vantagens das mesmas com a alta biocompatibilidade, perfil farmacocinético favorável, alta eficiência de entrega e facilidade de modificação da superfície dos sistemas lipídicos (Zhao et al., 2012). Esses mecanismos híbridos se aproveitam das vantagens mecânicas das nanopartículas de polímeros biodegradáveis e das vantagens biomiméticas dos lipossomas.

Do ponto de vista estrutural, estas partículas híbridas consistem de um núcleo polimérico revestido com uma camada lipídica. Esta morfologia híbrida disponibiliza vantagens como o controle sobre o tamanho das partículas e perfil de liberação, funcionalidade da superfície, alta capacidade de introdução de fármacos hidrossolúveis e/ou lipossolúveis e boa estabilidade (Mandal et al., 2013).

Mandal et al. (2013) publicaram um trabalho de revisão que aborda os diferentes métodos utilizados para a preparação destas estruturas. Segundo os autores, existem duas categorias de preparação, o método simples e o método composto. No método composto, o núcleo polimérico e a camada de lipídios são preparados separadamente utilizando processos independentes onde, na primeira etapa, são preparados os núcleos poliméricos utilizando as metodologias apresentadas anteriormente. Posteriormente, a combinação de lipídios que estará presente na camada externa dos núcleos poliméricos é dissolvida, utilizando um solvente orgânico específico para a mistura lipídica, em um balão volumétrico e o solvente evaporado para que ocorra a formação de um filme fino nas paredes da vidraria. Por fim, este filme lipídico é hidratado com uma solução contendo as nanopartículas poliméricas e a camada lipídica ao redor destas partículas é formada pela auto-organização dos lipídios ali presentes. Nestes métodos a incorporação de compostos ativos é ocasionada pela adsorção e pode ser controlada, assim como o

tamanho de partícula. Além disso, a quantidade de lipídios necessária para cobrir efetivamente as partículas pode ser calculada baseada no tamanho do núcleo polimérico e tamanho da cadeia dos fosfolipídios (Yang et al., 2013). No método de uma única etapa, a formação das nanopartículas poliméricas contendo o fármaco é sincronizada com a formação das micelas ou lipossomas e normalmente apresenta uma maior eficiência de incorporação do composto ativo.

Vários fatores afetam as propriedades finais dos mecanismos como o tipo de polímeros/lipídios, pH, carga superficial das vesículas lipídicas e temperatura de incubação. Mandal et al. (2013) também discutem que uma das razões para a baixa capacidade de encapsulação do fármaco nas partículas é o excesso da presença de lipídios. Ao estarem em excesso, eles podem formar micelas ou lipossomas contendo o fármaco no seu interior, porém sem o núcleo polimérico. Este fato pode levar à perda de agentes terapêuticos, normalmente de alto valor agregado, na etapa de purificação. Para evitar tal problema, a quantidade necessária de lipídios deve ser otimizada. Outros parâmetros que devem ser estudados, pois influenciam na eficiência de incorporação do fármaco (DL) e eficiência de encapsulação (EE), são a solubilidade do composto ativo, interação de cargas entre lipídio-fármaco e pH.

Uma das principais áreas de desenvolvimento destes sistemas é a quimioterapia com o objetivo de tentar combater a resistência a múltiplos fármacos. Liu et al. (2012) utilizaram o método de dupla emulsão A/O/A para a preparação de microesferas híbridas com núcleo de policaprolactona para a entrega controlada de flurbiprofeno. Ao estudar as propriedades das partículas formadas foi possível observar que a concentração de policaprolactona e surfactante e a quantidade de lipídios podem afetar o diâmetro, morfologia da superfície e eficiência de encapsulação. Como já citado anteriormente, a superfície externa das NPHs pode ser modificada para que sejam direcionadas a um determinado sítio de ação no organismo. Um exemplo de aplicação deste tipo de mecanismo foi desenvolvido por Zhao et al. (2012) onde nanopartículas híbridas, compostas de um núcleo de PLGA, foram funcionalizadas com ácido fólico visando à liberação de paclitaxel em células de câncer cervical. As nanopartículas preparadas foram administradas via intravenosa e os resultados comparados com o medicamento, já existente, Taxol<sup>®</sup>. Os autores concluíram que o sistema híbrido desenvolvido funcionalizado com ácido

fólico levou à regressão do tamanho do tumor e foi observado um aumento da sobrevivência de murinos quando comparados com o medicamento na forma livre.

### 3.6. Síntese de Peptídeos

A estrutura de peptídeos e proteínas foi inicialmente proposta por Emil Fisher e Franz Hofmeister no ano de 1902, onde os pesquisadores sugeriram que os aminoácidos estavam conjugados por uma ligação de amida CO-NH, nomeando-a, assim, de ligação peptídica. Apesar destas estruturas terem sido descobertas no início do século passado, somente 50 anos depois ocorreu uma evolução maior na área e pesquisadores começaram a propor métodos para a caracterização e síntese destas estruturas. O autor du Vigneaud (1953) elucidou e publicou a síntese do primeiro hormônio peptídeo (oxitocina) e, por isso, foi condecorado com o Prêmio Nobel de Química em 1955. Inicialmente estas técnicas, também conhecidas como síntese de peptídeos em solução (LPPS), eram bastante complexas principalmente em relação ao isolamento, caracterização e purificação de intermediários em cada uma das etapas da síntese podendo levar, para peptídeos de cadeia pequena, dias ou até meses de produção e, para peptídeos longos de meses a anos de produção sendo, assim, inviáveis do ponto de vista industrial. Em 1963 Merrifield (Merrifield, 1963) apresentou o método de síntese em fase sólida de peptídeos (SPPS) reduzindo a escala de tempo da síntese de peptídeo para de dias até semanas (no máximo). Este método, em conjunto com o advento do HPLC no fim dos anos 1960 (Horváth e Lipsky, 1969) e a introdução da estratégia de proteção dos aminoácidos utilizando o grupamento Fmoc (Atherton et al., 1978) foi o que revolucionou a indústria farmacêutica possibilitando a produção de peptídeos em larga escala para o mercado (Verlander, 2007).

O conceito da síntese em fase sólida de peptídeos se baseia em conjugar covalentemente o aminoácido carboxiterminal da cadeia peptídica em sítios reativos presentes em um suporte (resina insolúvel). Posteriormente, os aminoácidos subsequentes são conjugados um a um resultando, finalmente, no peptídeo desejado ligado covalentemente ao suporte polimérico. Estes aminoácidos apresentam, além do grupamento Fmoc, outros grupos de proteção (ex: Pbf, OtBu, tBu, Boc e Trt) e, por isso, ao final do processo de síntese do peptídeo, estas



moléculas de proteção e a resina são clivadas e o peptídeo resultante é purificado e caracterizado. Por ser uma síntese sistemática, existem diversos equipamentos (sintetizadores de peptídeos) que automatizam a etapa posterior a conjugação do primeiro aminoácido aumentando, assim, a agilidade e facilidade da obtenção destes compostos (Stawikowski e Fields, 2002). O protocolo mais detalhado para a síntese do peptídeo utilizado neste trabalho (RGD) está descrita no Capítulo 4.4.

### **3.7. Modelagem Matemática de Mecanismos de Liberação de Fármacos**

A modelagem matemática da liberação de fármacos a partir de sistemas nanoestruturados está sendo cada vez mais empregada para otimizar o projeto de novos mecanismos de entrega. Modelos matemáticos podem reduzir o número de experimentos necessários para testar diferentes condições e geometrias dos mecanismos de entrega. Além disso, estes modelos visam aprofundar o entendimento dos fenômenos físicos e químicos relacionados, além de facilitar o desenvolvimento de novos produtos com características pré-estabelecidas (Versypt et al., 2013). O entendimento real dos fenômenos envolvidos é, não só de interesse acadêmico, mas um pré-requisito para aperfeiçoar a segurança dos tratamentos farmacêuticos (Siepmann e Siepmann, 2008).

Um dos desafios da modelagem matemática nesta área é a incorporação de modelos teóricos da entrega de fármacos em conjunto com modelos quantitativos do transporte dos mesmos dentro do corpo humano. Este tipo de equacionamento, quando completamente compreendido, poderá auxiliar o desenvolvimento de formulações customizadas para cada paciente. Siepmann e Siepmann (2008) relatam que os fenômenos envolvidos na liberação dos fármacos não devem ser tratados como uma “caixa preta”, onde os resultados são embasados somente em testes experimentais. Para se obter uma melhor eficiência, ou seja, os fármacos serem liberados dentro da janela terapêutica, os fenômenos controladores do processo de liberação devem ser elucidados.

A entrega de fármacos a partir de polímeros biodegradáveis pode ser categorizada com base nos fenômenos envolvidos nos mecanismos de entrega. Estes fenômenos podem ser sistemas controlados pela difusão, pelo intumescimento

polimérico, sistemas controlados pela erosão ou a combinação entre eles. Degradação e erosão são dois termos de grande importância quando se estuda polímeros biodegradáveis. O termo degradação se refere ao processo em que ligações das cadeias poliméricas são hidrolisadas formando oligômeros e monômeros. O termo erosão está associado à perda de massa ocasionada pela degradação química onde ocorre a difusão de oligômeros e monômeros, solúveis em água, para fora da matriz polimérica (Versypt et al., 2013; Sackett e Narasimhan, 2011; Chen et al., 2011).

A partir destas considerações é possível separar a modelagem matemática em três grandes grupos: modelos empíricos ou semi-empíricos, teóricos e probabilísticos. Os próximos subitens referem-se aos modelos teóricos e empíricos, os quais serão foco deste trabalho.

### 3.8. Modelos Empíricos e Semi-Empíricos

O tratamento matemático deste tipo de equacionamento é puramente descritivo e não é embasado nos fenômenos reais envolvidos. Deve-se ter cuidado ao realizar a análise quantitativa dos parâmetros obtidos, pois são aplicados normalmente para um caso específico.

O equacionamento de Peppas (1985) é um dos equacionamentos semi-empíricos mais utilizados para representar uma grande diversidade de situações. A equação de Peppas (1985) está descrita abaixo (Eq. 3.1):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (3.1)$$

onde  $M_t$  é a massa acumulada em um determinado tempo,  $M_\infty$  é a massa no tempo infinito,  $t$  é o tempo,  $k$  é uma constante que incorpora efeitos estruturais e geométricos e  $n$  a ordem da cinética de entrega. Siepmann e Siepmann (2008) apresentam valores para o valor de  $n$  relacionando a geometria do sistema com o mecanismo de liberação, apresentados na Tabela 3.1:

Tabela 3.1. Valores do expoente  $n$  para a equação de Peppas (1985) e o mecanismo de liberação para diferentes geometrias (Adaptado de Siepmann e Siepmann, 2008).

| <i>Expoente <math>n</math></i> |                   |                   | <i>Mecanismo de Liberação</i> |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------|
| <i>Filme Fino</i>              | <i>Cilindro</i>   | <i>Esfera</i>     |                               |
| 0,5                            | 0,45              | 0,43              | Difusão Fickiana              |
| $0,5 < n < 1,0$                | $0,45 < n < 0,89$ | $0,43 < n < 0,85$ | Transporte Anômalo            |
| 1,0                            | 0,89              | 0,85              | Intumescimento polimérico     |

Pela simplicidade, facilidade e ampla aplicação do modelo, a seguir são apresentadas algumas situações em que o mesmo foi utilizado.

Zhang et al. (2012) utilizaram micelas de um copolímero formado por polietilenoglicol-metil éter-b-(poli ácido láctico-co-poli( $\beta$ -amino ésteres) (MPEG-b-(PLA-co-PAE)) com diferentes razões de PLA/PAE com o objetivo de produzir um mecanismo sensível ao pH. Para estudar a cinética de liberação, o fármaco doxorubicina, foi incorporado no interior das micelas e o comportamento de liberação estudado pela equação semi-empírica de Peppas (1985). Após realizar a modelagem dos dados experimentais, os autores obtiveram valores de  $n$  menores que 0,43, indicando que o mecanismo de liberação é uma combinação entre a difusão do fármaco e erosão das micelas. Moura et al. (2013) investigaram a liberação de cisplatina de hidrogéis de quitosana termosensíveis aplicando o equacionamento de Peppas (1985). Os autores concluem que o valor de  $n$  depende do tipo da composição dos hidrogéis fabricados. Macocinschi et al. (2013) modelaram a taxa de entrega do fármaco ketoprofeno a partir de filmes de poli(éter-uretano) utilizando o equacionamento de Peppas (1985). Ao analisar os seus resultados, foi possível confirmar que, pelo valor de  $n$  (0,83), tanto o intumescimento quanto a difusão são fenômenos que influenciam na liberação do fármaco a partir das matrizes poliméricas.

### 3.9. Modelos Teóricos

Modelos matemáticos teóricos de sistemas de entrega são baseados em equações que descrevem o fenômeno mais próximo da situação real. Constantemente equações diferenciais estão envolvidas e, para possibilitar a

solução destas, é necessário o conhecimento das condições de contorno e condições iniciais. Entre os aspectos que devem ser considerados no desenvolvimento dos modelos teóricos estão: a quantidade de fenômenos levados em conta, os dados calculados sempre devem ser comparados com experimentais e, principalmente, não existe uma teoria matemática geral que possa ser aplicada para todos os tipos de mecanismos de entrega (Siepmann e Siepmann, 2008). A seguir são apresentadas as principais classes de modelos teóricos que abordam diferentes fenômenos físicos para a representação dos mecanismos de entrega envolvidos na liberação de fármacos para um meio receptor.

### 3.9.1. Mecanismos controlados pelo intumescimento

O fenômeno de intumescimento pode ser dividido em três etapas: a) umedecimento do polímero causando a diminuição da temperatura de transição da fase vítrea; b) a matriz polimérica forma uma fase gel e a difusão de mais água no interior da matriz ocasiona um aumento de volume; c) cadeias poliméricas são solubilizadas no meio de liberação. Estas etapas ocorrem simultaneamente formando duas condições de contorno nomeadas frente de intumescimento (entre a fase não solubilizada e a fase gel) e a frente de erosão (entre a fase gel e a solução) (Kimber et al., 2012).

Uma importante aplicação da dissolução polimérica está na indústria farmacêutica onde polímeros hidrofílicos são utilizados para a entrega controlada de agentes terapêuticos via oral (Kaunisto et al., 2010). Na prática, por exemplo, para a entrega controlada via oral, normalmente mais de um processo ocorre simultaneamente com o intumescimento do polímero, se fazendo necessário a introdução de diferentes abordagens matemáticas. A seguir estão descritos alguns equacionamentos.

Borgquist et al. (2006) estudaram o comportamento de metilparabeno (pouco solúvel em água) e um ativo solúvel (saligenina) em comprimidos de óxido de polietileno. No trabalho, os autores apresentaram um modelo para representar a entrega a partir do intumescimento e dissolução de comprimidos cilíndricos. O comprimido é discretizado em volumes finitos e é considerado que o transporte do

fármaco ocorre somente na fase solvente. Lamberti et al. (2011) sugeriram o uso de dois balanços diferenciais, um para a fase de intumescimento (que ocasiona o aumento do tamanho da matriz) e outro para a fase de erosão (que diminui o tamanho da matriz) para estudar a entrega controlada de teofilina a partir de comprimidos cilíndricos de hidroxipropilmetilcelulose. Os autores utilizaram o método dos elementos finitos para solucionar o sistema de equações.

Kale e Garg (2012) calcularam o coeficiente de difusão do sistema fármaco paclitaxel/ policaprolactona por um equacionamento preditivo (teoria do volume livre) e o aplicaram na solução analítica da segunda lei de Fick da difusão. Kimber et al. (2012) apresentaram um novo método combinando o método dos elementos finitos com a transferência de massa Fickiana para simular o intumescimento e dissolução de comprimidos de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) sem a presença de fármacos. Dando continuidade ao estudo, os autores publicaram um trabalho onde o objetivo foi, a partir da simulação, verificar a influência de variáveis como o formato do comprimido, as propriedades do polímero e espessura do revestimento e diferentes condições de contorno na taxa de entrega do fármaco nicotinamida incorporado em uma matriz de HPMC (Kimber et al., 2013).

### 3.9.2. Mecanismos controlados pela degradação e erosão

Polímeros bioerosíveis constituem uma classe de biomateriais capazes de gerar produtos degradados biocompatíveis a partir da quebra de sua cadeia principal via hidrólise. Estes polímeros são amplamente estudados para aplicações em sistemas de entrega de fármacos, pois eles apresentam como vantagem a degradação ao longo do tempo. Considerando o aspecto cirúrgico, o paciente é exposto a somente uma intervenção, visto que o mecanismo irá se degradar e posteriormente será liberado pelo organismo (Sackett e Narasimhan, 2011).

Segundo Langer e Peppas (1983), dois tipos de erosão podem ocorrer:

a) superficial (heterogênea), onde a quebra das ligações das cadeias poliméricas ocorre mais rápido que a penetração da água no sistema, neste tipo de erosão o mecanismo de difusão passa a controlar o processo (Nauman et al., 2010);

b) bulk (homogênea), onde a penetração da água no sistema ocorre mais rápido que a quebra das ligações das cadeias poliméricas ocasionando a degradação em todo sistema. Ao analisar este tipo de fenômeno, Chen et al. (2011) desenvolveram um modelo matemático que combina hidrólise e a autocatálise controlada pela difusão para simular a degradação e erosão de polímeros biodegradáveis *bulk-erosivos*. A reação de hidrólise foi modelada a partir de um sistema estocástico considerando o efeito autocatalítico dos polímeros com esta tendência (ex: PLA *poli(ácido lático)*) e PGA (*poli(ácido glicólico)*)).

### 3.9.3. Mecanismos controlados pela difusão

Segundo Siepmann e Siepmann (2008), ao analisar os mecanismos onde o fenômeno controlador é a difusão, é possível ressaltar duas situações (Figura 3.4): sistemas do tipo reservatório e sistemas monolíticos. Entre as duas, pode-se utilizar o fármaco acima ou abaixo da faixa de saturação no polímero. A abordagem matemática de cada uma das situações está descrita abaixo:

Nos sistemas do tipo reservatório com concentração inicial abaixo do limite de solubilidade (I), se a membrana não dissolver ou intumescer, se ocorrer a condição de mistura perfeita durante o período de entrega e se a permeabilidade do composto ativo através da membrana se manter constante, o equacionamento resulta em cinética de primeira ordem. Se o mesmo sistema for utilizado, porém com concentração acima do limite de solubilidade (II), um equacionamento de cinética de ordem zero é obtido (Siepmann e Siepmann, 2008).

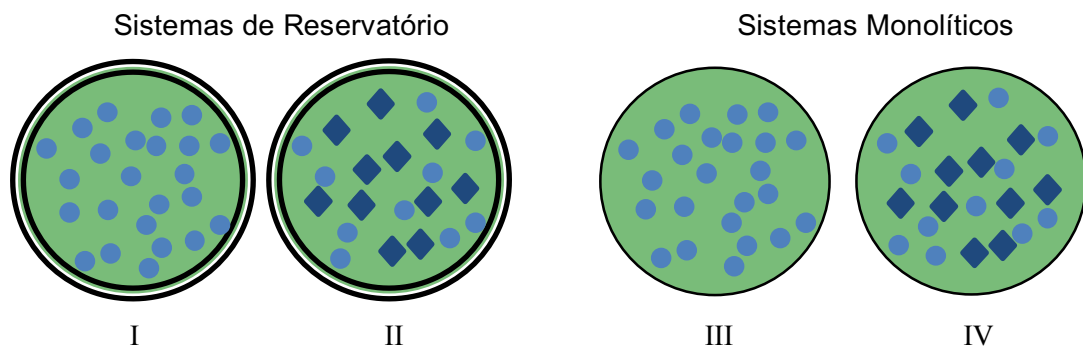


Figura 3.4. Sistemas controlados pela difusão. ◆ representam fármacos no estado sólido e ● fármacos solubilizados no polímero.

No caso de sistemas monolíticos (sem membrana externa), a geometria afeta significativamente a cinética de entrega. Igualmente aos sistemas do tipo reservatório, os sistemas monolíticos podem conter o fármaco abaixo do limite de solubilidade (III - soluções monolíticas) no polímero ou acima do limite de solubilidade onde cristais e droga solubilizada coexistem (IV - dispersões monolíticas) (Siepmann e Siepmann, 2008).

Como citado acima, a entrega de fármacos a partir dos mecanismos monolíticos depende fortemente da geometria. Um exemplo de grande importância na literatura é o equacionamento pioneiro de Takeru Higuchi. O modelo de Higuchi (1961) assume que a quantidade de fármaco inicialmente presente na matriz é substancialmente maior que a solubilidade do fármaco e que a taxa de dissolução é instantânea. No modelo, também é assumido que o fármaco está igualmente disposto na matriz. A partir destas condições, o autor divide a matriz em duas regiões. A primeira região assume que todo fármaco está dissolvido e existe um gradiente de concentrações. A segunda região assume que fármacos dissolvidos e sólidos coexistem garantindo o excesso à condição de saturação. A equação de Higuchi (1961) pode ser observada na Eq. 3.2:

$$Q = [D(2C_0 - C_s)C_s t]^{1/2} \quad (3.2)$$

onde  $Q$  é a quantidade total de fármaco liberado por unidade de área da matriz ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ),  $D$  é o coeficiente de difusão do fármaco na matriz ( $\text{cm}^2/\text{h}$ ),  $C_0$  é a concentração inicial de composto ativo na matriz ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ),  $C_s$  é a solubilidade do fármaco na matriz polimérica ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) e  $t$  é o tempo de liberação (h).

Segundo Kale e Garg (2012), o desenvolvimento de modelos capazes de predizerem o coeficiente de difusão e solubilidade de fármacos em polímeros é de grande interesse no campo de sistemas de entrega controlada, logo, é possível notar uma grande quantidade de trabalhos utilizando o equacionamento da segunda lei de Fick onde tais parâmetros aparecem de forma explícita.

Nauman et al. (2010) modelaram a liberação como uma difusão Fickiana unidimensional a partir de uma solução analítica da mesma. A função objetivo utilizada pelo autor no processo de estimação de parâmetros é a maximização da disponibilidade do agente terapêutico durante o tempo de vida do mecanismo. Krenzlin et al. (2012) estudaram a liberação de dexametasona de matrizes cilíndricas de silicone a partir de uma solução analítica da segunda lei de Fick. Inicialmente, os autores introduziram o fármaco em placas do polímero e realizaram testes de liberação. A etapa subsequente foi a aplicação da equação da difusão para placas onde foi possível estimar o coeficiente difusivo aparente do sistema. Com o objetivo de simular as melhores condições de implantes de característica cilíndrica, o autor aplicou o equacionamento analítico para a geometria desejada.

Siepmann et al. (2013) descreveram quantitativamente a entrega de lactose a partir de comprimidos de HPMC (hidroxipropilmetilcelulose) por três equacionamentos. O primeiro é um modelo numérico considerando a difusão do fármaco, que está supersaturado no polímero, nas direções axial e radial de um cilindro. O segundo modelo é embasado na solução analítica da segunda lei de Fick considerando um cilindro com transferência nas direções axial e radial. Por fim, o autor utiliza um modelo aproximado à solução analítica concluindo que é possível obter erros baixos ao utilizar modelos mais simples e adequados ao fenômeno envolvido.

Para o PLGA, polímero utilizado neste trabalho, a erosão e o intumescimento para um curto prazo de tempo são praticamente negligenciáveis (Poletto et al., 2007) e, por isso, considera-se que o principal mecanismo de liberação é a difusão das substâncias através do núcleo polimérico. A partir disso, a cinética de liberação dependerá se as substâncias estão dispersas ou dissolvidas na matriz. Para ambos os casos, a equação de Baker-Lonsdale (1974) (Equação 3.3) pode ser utilizada aplicando diferentes aproximações dependendo das características do meio em que se está trabalhando. Um exemplo de aplicação pode ser observado no trabalho de Poletto et al. (2007) onde os autores aplicam o método dos mínimos quadrados para resolver a equação após a linearização da mesma. A partir disso os autores obtiveram informações referentes ao coeficiente de difusão envolvido confirmando,



assim, sua hipótese de que os mecanismos eram sistemas monolíticos controlados pela difusão.

$$\frac{3}{2} \left[ 1 - \left( 1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{\frac{2}{3}} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = \frac{3DC_s}{r_0^2 C_0} t \quad (3.3)$$

A equação de Baker-Lonsdale parte dos mesmos princípios propostos por Higuchi (1963). O problema em questão (Figura 3.5) considera que: a) as variações das quantidades liberadas ocorrem lentamente, o que permite o uso do modelo pseudo-estacionário para descrever a transferência de massa; b) a concentração da substância no interior da matriz é muito maior que sua solubilidade na matriz ( $C_0 \gg C_s$ ) c) os coeficientes de difusão são constantes; d) a difusão é o fenômeno controlador do processo; e) o processo difusivo ocorre através da matriz polimérica e não pelos seus poros ou canais na matriz. Para estes sistemas monolíticos e esféricos, o balanço de massa pode ser feito a partir do fluxo de fármacos deixando a matriz polimérica que, neste caso, são consideradas esferas concêntricas, e o fluxo de fármacos ingressando no meio de liberação.

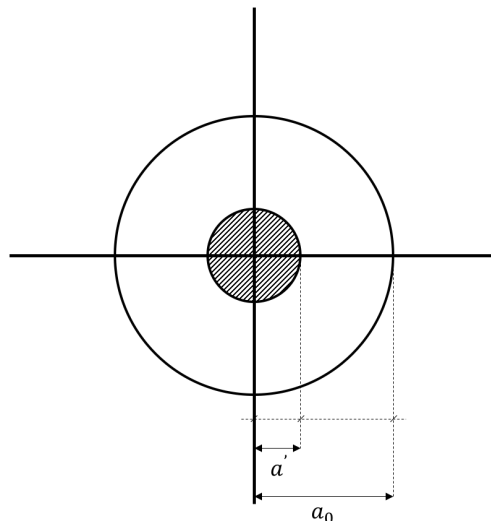


Figura 3.5. Diagrama hipotético para o modelo de Higuchi (1963).

Para facilitar o entendimento do modelo analítico proposto neste trabalho, a dedução dos modelos de Higuchi e Baker-Lonsdale são apresentadas a seguir.

Conforme a Eq. 3.4, o modelo de Higuchi assume que a concentração na região entre  $a'$  (raio da parte que ainda não foi extraída) e  $a_0$  (raio da esfera) é uma função de  $a$  (raio de qualquer região que está sendo considerada) fixado pela Lei de Fick.

$$\frac{SdQ}{dt} = -4\pi a^2 D \frac{dC}{da} \quad (3.4)$$

sendo  $S$  a área em que ocorre a difusão no intervalo  $a' \leq a \leq a_0$  e  $D$  o coeficiente de difusão. Integrando a Eq. 3.4 de  $a$  até  $a_0$  resulta em (Eq. 3.5):

$$\left(\frac{SdQ}{dt}\right)_t \left(\frac{1}{a} - \frac{1}{a_0}\right) = 4\pi a^2 D C_a \quad (3.5)$$

onde  $C_a$  é a concentração em  $a$ . A relação entre  $C_a$  e a concentração em  $a'$  ( $C_s$ ) é descrita pela Eq. 3.6.

$$\left(\frac{SdQ}{dt}\right)_t = \frac{4\pi D C_a}{\left(\frac{1}{a} - \frac{1}{a_0}\right)} = \frac{4\pi D C_s}{\left(\frac{1}{a'} - \frac{1}{a_0}\right)} \quad (3.6)$$

Como  $C_a = C_s$  em  $a = a'$  e  $C_a = 0$  em  $a = a_0$ , a relação entre o raio ( $a$ ) e a concentração na região  $a' \leq a \leq a_0$  é definida como:

$$C_a = C_s \frac{a'(a_0 - a)}{a(a_0 - a')} \quad (3.7)$$

No tempo  $t$ , o conteúdo total de fármaco contido no interior das partículas é igual a:

$$\frac{4}{3} a'^3 \pi C_0 + \int_{a'}^{a_0} 4\pi a^3 C_a da \quad (3.8)$$

Introduzindo a Eq. 7 na Eq. 8 e integrando de  $a'$  até  $a_0$  obtém-se (Eq. 9):

$$4\pi \left[ \frac{a'^3}{3} C_0 + \frac{C_s}{6} a' (a_0^2 + a' a_0 - 2a'^2) \right] \quad (3.9)$$

A mudança na concentração residual de fármacos correspondente a uma modificação  $-da'$  pode ser descrita por:

$$4\pi \left[ C_0 a'^2 + \frac{C_s}{6} (a_0^2 + 2a' a_0 - 6a'^2) \right] (-da') \quad (3.10)$$

As Eqs. 3.10 e 3.6 devem ser iguais, porém com sinal oposto ao fluxo total durante o período envolvido.

$$\frac{4\pi D C_s}{\left(\frac{1}{a'} - \frac{1}{a_0}\right)} dt = 4\pi \left[ C_0 a'^2 + \frac{C_s}{6} (a_0^2 + 2a' a_0 - 6a'^2) \right] da' \quad (3.11)$$

Integrando a Eq. 3.11 de  $a_0$  até  $a'$  resulta em:

$$C_0 (a_0^3 + 2a'^3 - 3a_0 a'^2) + C_s \left( 4a_0 a'^2 + a_0^3 \ln \frac{a_0}{a'} - a_0^3 - a_0^2 a' - 3a'^3 \right) = 6D C_s a_0 t \quad (3.12)$$

Para  $C_s \ll C_0$  a Eq. 12 é reduzida para:

$$a_0^3 - 3a_0 a'^2 + 2a'^3 \approx \frac{6D C_s a_0}{C_0} t \quad (3.13)$$

A solução final proposta por Higuchi é apresentada de forma adimensional em termos de  $\frac{a'}{a_0}$  conforme Eq. 3.14.

$$\left(\frac{a'}{a_0}\right)^3 - \frac{3}{2} \left(\frac{a'}{a_0}\right)^2 + \frac{1}{2} = \frac{3D C_s}{C_0 a_0^2} t \quad (3.14)$$

A forma final da equação de Baker-Lonsdale (Eq. 3.3) é obtida pela correlação entre a razão  $\frac{a'}{a_0}$  e a massa de substância liberada pela massa liberada no tempo infinito  $\frac{M_t}{M_\infty}$  conforme a Eq. 3.15 e 3.16:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{C_0(V_0 - V)}{C_0V_0} = 1 - \left(\frac{a'}{a_0}\right)^3 \quad (3.15)$$

$$\frac{a'}{a_0} = \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right)^{\frac{1}{3}} \quad (3.16)$$

Apesar de chegar no mesmo equacionamento apresentado por Higuchi (1970), Baker-Lonsdale partem da equação diferencial que descreve o problema conforme Eq. 3.17.

$$\frac{d M_t/M_\infty}{dt} = \frac{3C_s D}{a_0^2 C_0} \left( \frac{[1 - M_t/M_\infty]^{1/3}}{1 - [1 - M_t/M_\infty]^{1/3}} \right) \quad (3.17)$$

Visando aprimorar o modelo apresentado por Higuchi, Roseman e Higuchi (1970) estudaram a modelagem matemática da liberação de substâncias a partir de dispersões monolíticas para as geometrias planar e cilíndrica, porém adicionando uma possível resistência contida no meio de liberação. A seguir, este modelo é expandido para a geometria esférica (Figura 3.6) visando uma melhor compreensão dos fenômenos físicos envolvidos no processo de liberação de substâncias para o meio de liberação, quando considerada uma resistência na fase fluida.

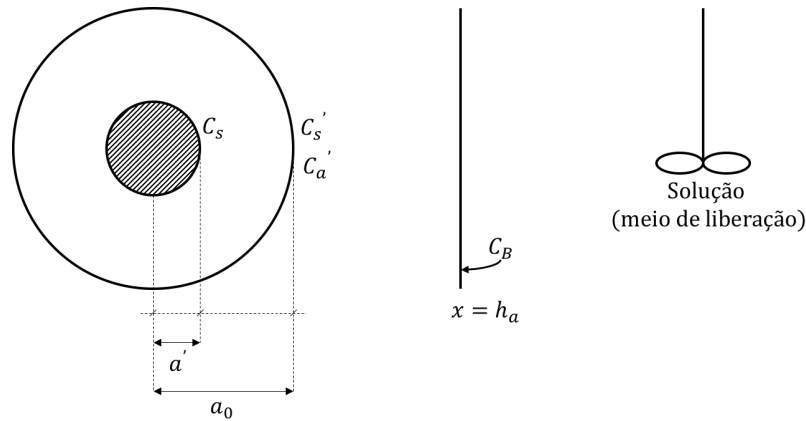


Figura 3.6. Diagrama hipotético para o modelo de Roseman e Higuchi (1970).

Para modelo de Roseman e Higuchi, as condições de contorno são apresentadas abaixo:

$$\begin{aligned} a = a' & \rightarrow C = C_s \\ a = a_0 & \rightarrow C = C_s' \end{aligned}$$

onde  $C_s$  é a solubilidade do fármaco na matriz,  $C_s'$  é a concentração de fármaco na matriz em  $a = 0$ ,  $a$  é o raio variável da esfera e  $h_a$  a espessura da camada difusiva. Para esferas concêntricas a taxa de difusão através da camada difusiva pode ser descrita pela Eq. 3.18:

$$\frac{dQ'}{dt} = \frac{-4\pi a_0 a' D_e}{a' - a_0} (C_s - C_s') \quad (3.18)$$

No lado da fase aquosa considera-se diluição infinita, ou seja, a concentração de substâncias em  $h_a$  ( $C_B$ ) é igual a zero. A partir disto, a taxa difusiva para o lado do meio receptor pode ser descrita pela Eq. 3.19:

$$\frac{dQ'}{dt} = \frac{-4\pi a_0^2 D_a}{h_a} C_a' \quad (3.19)$$

sendo  $D_e$  o coeficiente de difusão efetiva,  $D_a$  o coeficiente de difusão na fase aquosa,  $C_a'$  a concentração na fase aquosa. Em estado estacionário  $C_a$  e  $C_s$  podem ser relacionados pelo coeficiente de partição  $K$  (Eq. 3.20).

$$K = \frac{C_a}{C_s} = \frac{C_a'}{C_s'} \quad (3.20)$$

Resolvendo para  $C_s'$  e considerando o tempo constante:

$$\left(\frac{dQ'}{dt}\right)_t = \frac{-4\pi a_0 a' D_e}{a' - a_0} \left(C_s - \frac{C_a'}{K}\right) = \frac{-4\pi a_0^2 D_a}{h_a} C_a' \quad (3.21)$$

ou seja,

$$C_a' = -\frac{a' D_e C_s h_a K}{D_a K a_0^2 - D_a K a_0 a' - D_e a' h_a} \quad (3.22)$$

substituindo a Eq. 3.21 na Eq. 3.22 resulta em:

$$\frac{dQ'}{dt} = \frac{-4\pi a_0 a' D_e}{a' - a_0} \left(C_s + \frac{a' D_e C_s h_a}{D_a K a_0^2 - D_a K a_0 a' - D_e a' h_a}\right) \quad (3.23)$$

como a concentração da substância no interior da matriz ( $C_0$ ) é muito maior que sua solubilidade na matriz ( $C_0 \gg C_s$ ), a taxa de difusão a partir da superfície da esfera é descrita pela Eq. 3.24:

$$\frac{dQ'}{dt} = -4\pi a'^2 C_0 \frac{da'}{dt} \quad (3.24)$$

igualando as Eqs. 3.23 e 3.24 obtém-se:

$$-4\pi a'^2 C_0 da' = \frac{-4\pi a_0 a' D_e}{a' - a_0} \left(C_s + \frac{a' D_e C_s h_a}{D_a K a_0^2 - D_a K a_0 a' - D_e a' h_a}\right) dt \quad (3.25)$$

após simplificar a Eq. 3.25, integrar analiticamente o lado esquerdo da equação em relação à coordenada radial nos limites de  $a_0$  até  $a'$  e o lado direito com relação ao tempo, nos limites de 0 até  $t$ , obtém-se:

$$-a_0^3 + 3a_0a'^2 - 2a'^3 + \frac{2a_0^2D_e h_a}{D_a K} - \frac{2D_e a'^3 h_a}{D_a K a_0} = -\frac{6C_s D_e a_0}{C_0} t \quad (3.26)$$

Neste trabalho, a metodologia apresentada por Roseman e Higuchi (1970) para as geometrias planar e cilíndrica, considerando a existência de resistência na fase fluida ( $h_a$ ), foi aplicada para a geometria esférica. A solução final para este equacionamento está apresentada na Eq. 3.26. É importante ressaltar que, no caso de  $h_a = 0$ , ou seja, se a resistência na fase fluida for desconsiderada, o modelo apresentado por Roseman e Higuchi pode ser simplificado. Após esta simplificação, chega-se na forma final da equação proposta por Higuchi (1963) para a geometria esférica, ou seja, no modelo de Baker-Lonsdale antes de ser transposta da variável radial para a representação em termos de massa (Eq. 3.14).

### 3.10. Modelagem Matemática da Entrega Tópica e/ou Transdérmica

A modelagem matemática da permeação transdérmica é essencial para a otimização e desenvolvimento de produtos a partir de um melhor entendimento dos fundamentos físicos envolvidos nos processos de biotransporte (De Monte, 2014; Anissimov, 2013).

Os modelos preditivos de entrega tópica e transdérmica tiveram sua fundamentação entre 1940 e 1970 onde foi reconhecido que a partição e a solubilidade são fatores importantes que determinam a penetração na pele. Na década de 1960, Higuchi (1960) derivou modelos matemáticos que descrevem a absorção percutânea reconhecendo que os transportes na pele podem ser descritos pela primeira lei de Fick como um processo passivo de difusão no veículo e séries de camadas de membrana (Mitragori et al., 2011). Por consequência de um importante crescimento das ferramentas computacionais (algoritmos, softwares e hardware) nos últimos 15 anos, métodos *in silico* se tornaram muito atraentes para modelar e simular processos biológicos, químicos e físicos. A partir disto, torna-se possível a substituição ou redução de experimentos providenciando alternativas econômicas ao transladar testes *in vitro* para *in vivo* (Naegel et al., 2013; Anissimov et al., 2013; Couto et al., 2014).

Um dos fatores mais importantes para a modelagem preditiva de sistemas de entrega tópicos é a rota pela qual as moléculas e/ou partículas penetrarão a camada cutânea. Estas rotas, como citado anteriormente, podem ser classificadas da seguinte maneira (Couto et al., 2014; Schneider et al., 2009):

- a) intercelular: ocupando os espaços intercelulares entre queratinócitos;
- b) transcelular: através dos queratinócitos;
- c) transapêndice: através dos folículos capilares.

Segundo Jepps et al. (2013), a importância relativa dessas rotas tem se tornado recentemente um renovado foco de pesquisa tanto experimental quanto pelo ponto de vista teórico. Dados experimentais antigos indicavam que o trajeto intercelular era o mais importante e dominante para a permeação no *Stratum corneum*. Recentes avanços na microscopia mostram que a rota transcelular é, também, de considerável importância. A preferência da rota de transporte por difusão passiva irá depender das propriedades da substância que está sendo colocada em contato com a pele ou do carreador através do qual está sendo veiculada.

Naegel et al. (2013) publicaram um *review* sobre modelos matemáticos aplicados à penetração cutânea. Neste *review*, os autores dividem os processos que influenciam o transporte em difusão molecular, partição, mudança de fases, metabolismo, ligação (adsorção) e absorção, conforme Figura 3.7.



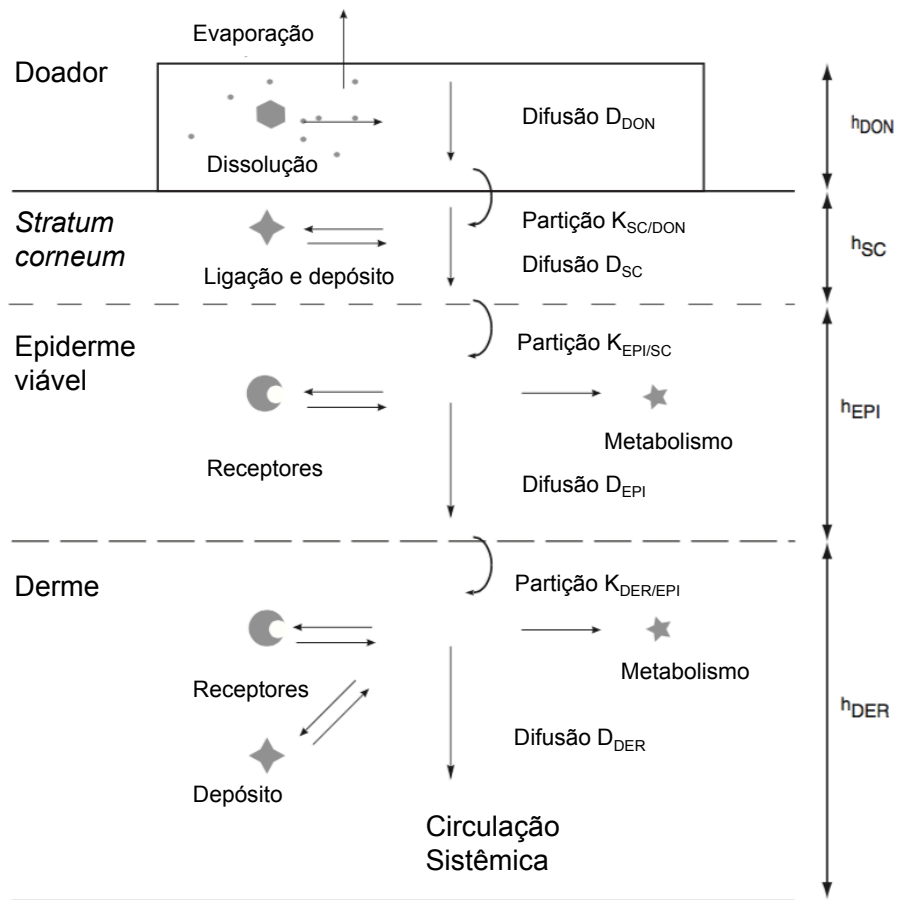


Figura 3.7. Resumo esquemático dos efeitos durante a penetração de substâncias e suas localizações (Adaptado de Naegel et al., 2013).

A modelagem matemática que contempla os processos influentes no transporte é dividida em quatro grupos dependendo do tipo de informação que é requerida. Na Figura 3.8, o código L1 está relacionado com processos no nível molecular (1-10 nm), como, por exemplo, bicamadas lipídicas. L2 é referente a processos no nível sub-celular (0.1  $\mu\text{m}$ ) ou no nível celular (1-10  $\mu\text{m}$ ). L3 se vincula a processos no nível membrana (0.1-1 mm), como, por exemplo, quantidade penetrada com dependência da profundidade em experimentos realizados em células de difusão. Por fim, o código L4 relaciona processos no nível compartimento. Um exemplo destes é a quantidade penetrada em células de difusão por compartimento (1 cm) ou no corpo (1 m).

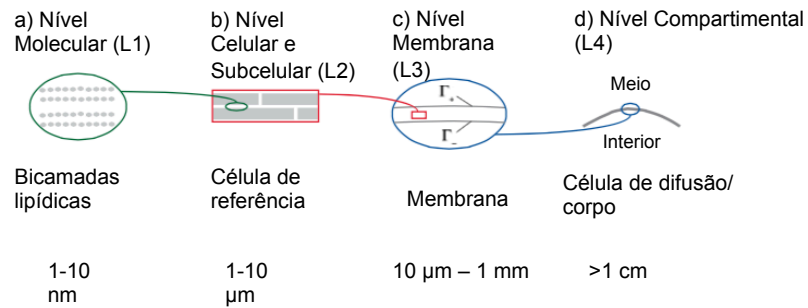


Figura 3.8. Representação das escalas utilizadas nos modelos matemáticos de permeação cutânea (Adaptado de Naegel et al., 2013).

Os modelos macroscópicos focam nas escalas L3 e L4 e normalmente descrevem o veículo e a pele como uma sequência de membranas homogêneas (veículo/ *Stratum corneum*/ sistema de entrega) onde a difusão ocorre por uma única rota ou combinação de rotas independentes. Os parâmetros envolvidos no processo como coeficiente de difusão e coeficiente de partição são representados por seus valores médios no tecido. Os modelos microscópicos geralmente incorporam a estrutura do *Stratum corneum* na descrição dos modelos e dão origem a modelos do tipo tijolo e cimento que apresentam grande importância para a área de modelagem matemática de processos de permeação de moléculas na pele.

### 3.10.1. Modelos de Estado Estacionário

A equação fundamental, que descreve o transporte na pele em condições de estado estacionário quando uma membrana da pele é exposta a um soluto, é a primeira Lei de Fick. As considerações fundamentais deste equacionamento são que a principal barreira cutânea, o *Stratum corneum*, se comporta como uma membrana pseudo-homogênea e que suas propriedades não variam com o tempo ou posição. Além disso, a primeira Lei de Fick utiliza conceitos de difusão sem o auxílio de agentes externos para descrever a entrega através da pele (Couto et al., 2014; Schneider et al., 2009).

O equacionamento mais comum, considerando o estado estacionário, é frequentemente apresentado em termos de fluxo ( $J_{ss}$ ) conforme Equação 3.27 (Mitragori et al., 2011).

$$J_{ss} = \frac{Q}{A t} = D \frac{\Delta C_s}{h} \quad (3.27)$$

Sendo  $Q$  a quantidade de soluto atravessando uma membrana de pele de área  $A$  em um tempo  $t$ ,  $D$  é o coeficiente de difusão da membrana da pele e  $\Delta C_s$  é a diferença de concentração através da membrana de espessura  $h$ .

### 3.10.2. Modelos Transientes

Um dos mais simples modelos transientes aplicados no transporte pela *Stratum corneum* é formulado a partir da 2ª Lei de Fick tornando possível a predição do gradiente de concentração determinado pela difusão como função do tempo (Couto et al., 2014). Na sua forma mais simples a equação pode ser descrita como (Eq. 3.28):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (3.28)$$

Este tipo de equacionamento é muito aplicado, pois em grande parte das vezes se equipara a modelos mais sofisticados com leves modificações nos parâmetros de partição e atraso no início do processo de liberação (Jepps et al., 2013).

### 3.10.3. Modelos Baseados na Estrutura e Modelos Complexos

A heterogeneidade da estrutura do *Stratum corneum* e a provável presença dos fenômenos de ligação podem afetar a simulação baseada somente em modelos cuja difusão é o principal fenômeno envolvido. Para levar em conta os efeitos de heterogeneidade, Chandrasekaran et al. (1978) começaram os primeiros esforços considerando a pele como um arranjo de tijolos e cimento. Posteriormente, foram desenvolvidos modelos que associam a cinética de penetração com a capacidade dos permeantes se ligarem ou se acumularem no interior do *Stratum corneum* (Roberts et al., 2002). No trabalho de Roberts et al. (2002), foi assumida uma ligação

instantânea, isto é, o equilíbrio entre os estados ligados e não ligados é rápida comparada ao tempo de difusão.

É importante ressaltar que grande parte desses modelos considera somente a barreira mais importante na penetração, o *Stratum corneum*. Entretanto, existe na literatura uma grande variedade de modelos que visam à modelagem de situações específicas como o transporte nas camadas inferiores ao *Stratum corneum* (epiderme viável) e o transporte convectivo associado com o sistema circulatório ou tecidos mais profundos (Anissimov et al., 2013). Um exemplo desta aplicação é citado por Jepps et al. (2013) onde os efeitos de barreira da epiderme viável podem ser incorporados nos modelos de permeação, tratando a mesma como uma camada homogênea não agitada imediatamente abaixo da *Stratum corneum*. Então, a *Stratum corneum* e a epiderme viável formam duas barreiras em série e a permeabilidade total pode ser calculada pela seguinte expressão (Eq. 3.29):

$$\frac{1}{K_{p_{epi}}} = \frac{1}{K_{p_{SC}}} + \frac{1}{K_{p_{VE}}} \quad (3.29)$$

sendo  $K_{p_{epi}}$ ,  $K_{p_{SC}}$  e  $K_{p_{VE}}$  as permeabilidades da epiderme, *Stratum corneum* e epiderme viável, respectivamente.

A Figura 3.9A mostra as principais origens de ligação no interior da *Stratum corneum* e a Figura 3.9B apresenta, de uma maneira simplificada, como estas possíveis interações no interior da *Stratum corneum* podem ser agrupadas para a formação de um modelo mais simplificado.

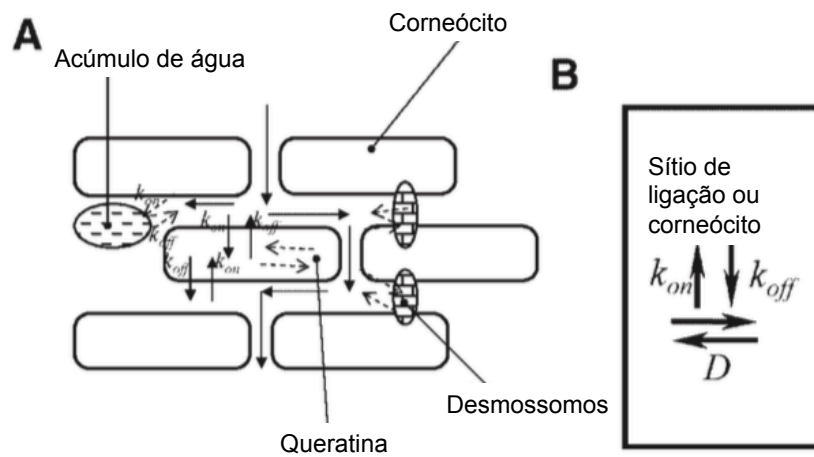


Figura 3.9. (A) Esquema ilustrativo das possíveis origens de ligações lenta/ equilíbrio na *Stratum corneum* e (B) diagrama do modelo de equilíbrio lento (Adaptado de Roberts et al., 2009).

A partir destas considerações, Anissimov e Roberts (2009) apresentaram um modelo (Eqs 3.30 e 3.31) que faz uma aproximação da complexidade do transporte através do *Stratum corneum*. Os autores introduzem um termo de fonte à equação diferencial parcial da difusão que leva em conta duas situações. A primeira é relacionada às moléculas no “estado ligado”, ou seja, aquelas que interagem com alguma estrutura do *Stratum corneum* ficando, conseqüentemente, imóveis ou sua difusão é tão lenta que pode ser negligenciada (ex: interação com fibras de queratina no interior do corneócito). A segunda situação é que as moléculas levadas em consideração estão no “estado não ligado”, isto é, as moléculas conseguem difundir através da camada córnea.

$$\frac{\partial C_u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_u}{\partial x^2} - k_{on} C_u + k_{off} C_b \quad (3.30)$$

$$\frac{\partial C_b}{\partial t} = k_{on} C_u - k_{off} C_b \quad (3.31)$$

sendo  $t$  o tempo,  $x$  a espessura do *Stratum corneum*. Além disto, as concentrações no “estado ligado” e “estado não ligado” são dadas por  $C_b$  e  $C_u$ , respectivamente. Para levar em conta a possibilidade de ligação ou desligamento das moléculas que se ligaram no processo de permeação, as constantes  $k_{off}$  e  $k_{on}$

são introduzidas no modelo, sendo os sub-índices *off* relacionado ao desligamento e *on* à ligação.  $D$  é o coeficiente de difusão do soluto no estado não ligado.

Nos estudos de permeação, inicialmente não existe soluto presente na membrana sendo, portanto, a condição inicial (Eq. 3.32) descrita por:

$$C_u(x, 0) = 0; \quad C_b(x, 0) = 0; \quad (3.32)$$

No seu trabalho, Anissimov e Roberts (2009) apresentam a condição de contorno considerando um coeficiente de partição efetivo ( $K_{eff}$ ) das frações no “estado ligado” e no “estado não ligado” com a solução doadora. Além disso, os autores introduzem um termo adimensional ( $f_u$ ) relacionado com as constantes de “ligação” e “desligamento” conforme Eq. 3.33. A condição de contorno é dada pela Eq. 3.34:

$$f_u = \left(1 + \frac{k_{on}}{k_{off}}\right)^{-1} \quad (3.33)$$

$$C_u(0, t) = K_{eff} f_u C_0; \quad C_u(h, t) = 0; \quad (3.34)$$

onde  $C_0$  é a concentração inicial de soluto na solução doadora.

#### 3.10.4. Parâmetros associados ao transporte através da pele

Uma das principais dificuldades na modelagem da penetração de moléculas é a obtenção de parâmetros chave que definem a permeabilidade cutânea como: coeficientes de difusão, partição e caminho difusivo. O grande desafio está associado com o número elevado de parâmetros associados a modelagens mais avançadas que, por consequência, dificilmente são encontrados na literatura (Mitragori et al., 2011; Couto et al., 2014).

a) Coeficiente de Partição ( $k_p$ ) - Segundo De Monte et al. (2014) a partição é utilizada para descrever o comportamento de um composto adicionado a uma mistura binária. Quando um soluto é adicionado a um sistema formado por um único composto ele irá se distribuir em uma concentração uniforme ao longo de todo sistema. Entretanto, se o mesmo soluto for adicionado a um sistema contendo dois componentes o mesmo irá se distribuir preferencialmente em um dos solventes. Ao considerar, por exemplo, um soluto lipofílico, que se difunde em um compartimento contendo A e B, e o composto A for lipofílico e B hidrofílico, o soluto irá preferir o meio ocupado pelo material lipofílico A. Então, em um sistema estacionário, a seção contendo o composto A estará com uma maior concentração de soluto sendo representada pela Equação 3.35:

$$k_{AB} = \frac{C_A}{C_B} \quad (3.35)$$

Ao levar em consideração a pele, dois fatores impactam a partição do soluto nas bicamadas lipídicas. Um fator químico que leva em consideração o fato que o meio das bicamadas lipídicas é mais hidrofóbico que o meio aquoso em seu redor. O segundo fator é físico que leva em conta o fato que as cadeias lipídicas nas bicamadas são bastante organizadas, reduzindo o coeficiente de partição devido ao baixo volume livre (Mitragori et al., 2011).

Na literatura, existem afirmações de que é razoável assumir que o coeficiente de partição de um soluto a partir de água para lipídios do *Stratum corneum* é comparável ao mesmo em um solvente isotrópico (ex: octanol) que mimetiza razoavelmente o meio dos lipídios do *Stratum corneum* (De monte et al., 2014).

b) Coeficiente de Difusão - De acordo com as equações apresentadas anteriormente, a difusão é o principal fenômeno envolvido na permeação via transdérmica. O coeficiente de difusão é, geralmente, obtido a partir da modelagem matemática de experimentos em células de difusão. Segundo Mitragori et al. (2011) diferentes modelos podem ser aplicados para obter esta informação em conjunto com dados medidos experimentalmente em estado estacionário. O modelo de Potts-Guy captura a propriedade mais essencial da difusividade no *Stratum corneum*. Esta

propriedade é o decréscimo da penetração de acordo com o aumento da massa molecular do permeante. Outros exemplos são os modelos de Johson-Blankstein-Langer e Wang-Kasting-Nitsche que levam em conta a anisotropia associada à morfologia da pele com e sem permeação dos corneócitos.

c) Caminho difusivo (Tortuosidade) - O caminho difusivo é um parâmetro que depende das propriedades do material que está penetrando a barreira cutânea, isto é, se os lipídios oferecem resistência à rota primária pela qual os permeantes entram no tecido, então a geometria do *Stratum corneum* e o detalhamento dos corneócitos e dos lipídios fazem uma grande diferença nos cálculos (Mitragori et al., 2011).

Em resumo, experimentos clássicos de laboratório descrevem apenas alguns parâmetros e resultam em informações desconstruídas sobre o processo como um todo. Modelos matemáticos são capazes de integrar todos esses diferentes parâmetros (Naegel et al., 2013).

Diferentes métodos matemáticos são utilizados para resolver os modelos propostos dependendo da escala e complexidade. Entre os métodos utilizados estão a transformada de Laplace (Crank, 1975), diferenças finitas, elementos finitos, volume finito e métodos que representam a difusão no seu nível molecular ou mesoescala como *random walk* e *lattice Boltzmann method*, respectivamente (De Monte et al., 2014; Anissimov et al., 2013; Frasch et al., 2013; Frasch et al., 2002).

Segundo Frasch et al. (2013) é de extrema importância que modelos realísticos futuros incluam o transporte anisotrópico oferecendo um conhecimento fenomenológico consistente. Além disso, a literatura contém pouca informação referente à modelagem matemática de nanopartículas na pele sendo um importante foco de pesquisa tanto para o acesso de informações referentes à permeabilidade quanto de possível risco de toxicidade (Schneider et al., 2009). Além disso, a aplicação de coeficientes de permeabilidade estimados a partir da modelagem matemática é aceita por agências de segurança como FDA e EMA para o acesso do risco de penetração de determinados solutos (Mitragori et al., 2011).



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Conforme os objetivos apresentados anteriormente, os métodos para a produção de nanopartículas poliméricas (NP), nanopartículas híbridas lipídio-polímero (NPH) e nanopartículas híbridas lipídio-polímero funcionalizadas (NPH-F) (Figura 4.1) serão apresentados a seguir em conjunto com a caracterização e modelagem matemática do perfil de liberação das mesmas.

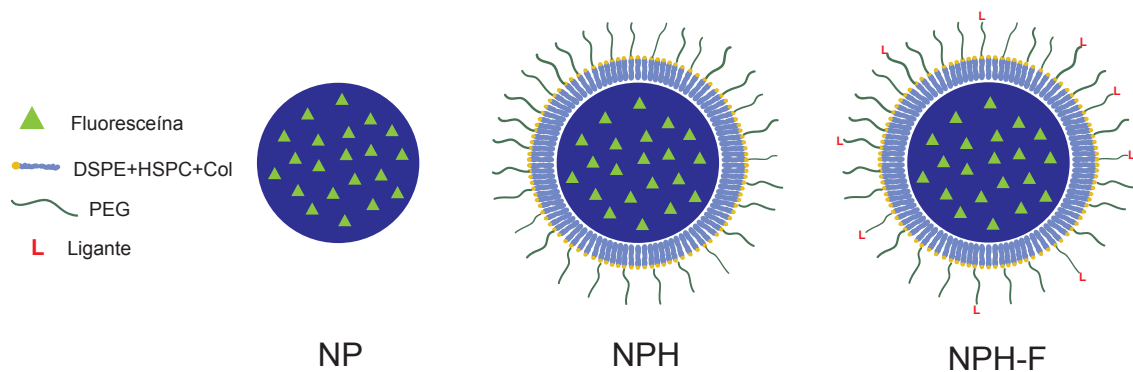


Figura 4.1. Nanopartículas Poliméricas (NP) – Nanopartículas Híbridas Lipídio-Polímero (NPH) – Nanopartículas Híbridas Lipídio-Polímero Funcionalizadas (NPH-F). DSPE – fosfatidiletanolamina; HSPC - fosfatidilcolina de soja completamente hidrogenada; Col – Colesterol.

A execução dos experimentos deste trabalho foi realizada em duas localizações diferentes.

A primeira etapa foi realizada na *University of California Los Angeles (UCLA)*, no laboratório da Prof<sup>a</sup>. Andrea Kasko, onde a metodologia existente na literatura foi adaptada às matérias primas utilizadas neste trabalho e as nanopartículas de diferentes características foram preparadas e caracterizadas. Primeiramente, as NPs, NPH e NPH-F foram produzidas sem nenhum ativo farmacêutico incorporado no núcleo de PLGA. Além disso, visando uma vetorização ativa para células que

apresentam receptores da família das integrinas ( $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$ ,  $\alpha v \beta 1$ ), altamente presentes em células endoteliais associadas com a neovasculatura de melanomas (Li e Tao, 2016), o peptídeo RGD foi sintetizado e conjugado covalentemente na cadeia dos fosfolipídios (DSPE-PEG) que compõem a camada externa das NPH-F.

A segunda etapa do trabalho foi realizada na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) onde sintetizou-se nanopartículas encapsulando diferentes substâncias no seu interior (fluoresceína, Nile Red e temozolomida) com o objetivo de avaliar a utilização deste tipo de sistema de entrega de fármacos para moléculas com diferentes propriedades físico-químicas. Nesta etapa foram realizados, também, testes de liberação no Laboratório de Cosmetologia e Nanotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e citotoxicidade *in vitro* das NPs, NPH e NPH-F. Com relação à modelagem matemática, foi proposta uma solução analítica em forma explícita do modelo de liberação de fármacos proposto por Baker-Lonsdale (1974).

#### 4.1. Materiais

Os materiais utilizados neste trabalho foram adquiridos de diferentes fontes. O polímero poli(ácido láctico-co ácido glicólico) (PLGA - 50:50 100 kDa) foi cedido pela empresa PURAC (Alemanha). As substâncias acetato de etila (EtAc) e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridas da Merck (Alemanha). Álcool polivinílico (PVA), fluoresceína, trealose, temozolomida, colesterol (COL), HEPES, cloreto de ferro (III) hexahidratado e amônio tiocianato foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (Alemanha). Para a preparação das nanopartículas híbridas, os fosfolipídios fosfatidilcolina de soja completamente hidrogenada (HSPC), fosfatidiletanolamina-metoxipolietilenoglicol (DSPE-PEG) e fosfatidiletanolamina-metoxipolietilenoglicol-maleamida (DSPE-PEG-mal) foram comprados da empresa NOF (Estados Unidos). O fosfolipídio funcionalizado com vitamina D fosfatidiletanolamina-N-[colecalciferol(polietilenoglicol)-2000] (DSPE-PEG-VD) foi adquirido da empresa Nanosoft Polymers (Estados Unidos). Para a síntese do peptídeo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), os aminoácidos protegidos Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH e

Fmoc-Cys(Trt)-OH e o reagente (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato) (HBTU) foram adquiridos da Anaspec Inc. Os demais itens foram obtidos de diferentes fornecedores, sendo eles: clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) (Fisher), Dulbecco's Modified Eagle's médium (DMEM) (Cell Gro), hidroxibenzotriazol (HOBt) (Advanced Chemtech), fenol (Amresco), piperidina (Spectrum), 2-clorotritil (Aapptec) e acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) (BDH), diclorometano (DCM) e ácido trifluoroacético (TFA) (EMD Millipore), éter dietílico (Macron), dimetilformamida (DMF), tioanisol e triisopropilsilano (TIS) (Acros Organics).

#### 4.2. Produção de Nanopartículas de PLGA (NPs)

A produção das nanopartículas foi realizada através do método de emulsificação evaporação do solvente (Figura 4.2). Para cada amostra, 50 mg de PLGA foram pesados e dissolvidos por 72 h em 750  $\mu\text{L}$  de EtAc e 250  $\mu\text{L}$  de DMSO em um tubo de centrifuga de 15 mL. Para as amostras contendo fluoresceína, *Nile Red* ou temozolomida, os 250  $\mu\text{L}$  de DMSO foram substituídos por 250  $\mu\text{L}$  de uma solução *Stock* fluoresceína/ DMSO (10 mg/mL), *Nile Red*/ DMSO (2 mg/mL), ou temozolomida/ DMSO (10 mg/mL), respectivamente. Duas soluções aquosas de PVA (0.3% e 3.0% m/v) foram preparadas e 25 mL da solução 0.3% m/v foram transferidos para um *Becker* de 50 mL e agitadas (250 rpm) e 2 mL da solução 3,0% m/v de PVA foram adicionados a um tubo de centrífuga de 15 mL. Para a preparação da emulsão, o tubo de centrifuga contendo a solução de PVA foi mantido na posição vertical e, sob forte agitação por *vortex*, a solução polimérica foi adicionada gota a gota utilizando uma pipeta Pasteur. Após todo o volume da solução PLGA/EtAc/DMSO ser adicionada ao tubo de centrífuga, o mesmo foi mantido sob *vortex* por adicionais 30 segundos. O tubo de centrífuga, agora contendo a emulsão, foi colocado em contato com gelo e imediatamente transferido para um ultrasonicador por 30 segundos (amplitude de 60% e 8W). Este processo (*vortex* + sonicador) foi repetido três vezes. Por fim, a emulsão foi transferida para o *Becker* contendo a solução de PVA 0.3% m/v e a evaporação do solvente e enrijecimento das NPs ocorreu durante 12 horas.

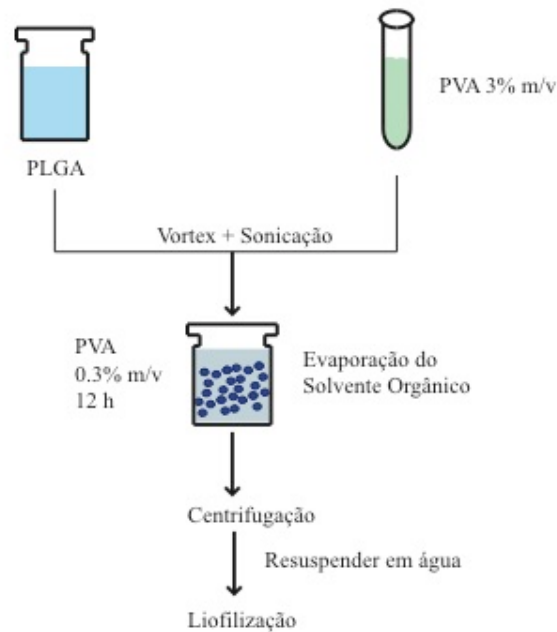


Figura 4.2. Método de emulsificação/ evaporação do solvente.

Após a evaporação de todo o solvente, a dispersão de nanopartículas foi transferida para um tubo de centrífuga *Oak Ridge* (volume nominal de 50 mL) e centrifugada em um rotor de ângulo fixo por 60 minutos a 25.000 rcf. O supernadante foi descartado com cuidado para não perturbar o *pellet* formado. Este processo de lavagem foi repetido três vezes e, por fim, as NPs foram ressuspensas em uma solução de trealose (crioprotetor) 1:2 (m/m) trealose:polímero, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 72 horas.

As NPs foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG), espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta. As análises de microscopia foram realizadas no equipamento (Fei<sup>®</sup> Inspect F50) localizado no Laboratório Central de Microscopia e Microanálises da PUCRS. As imagens foram obtidas a partir de dois métodos de preparação das amostras. O primeiro foi simplesmente aplicando a amostra diretamente em uma fita de carbono, e o segundo aplicando uma gota de solução aquosa de NPs (100 µg/mL) diretamente no topo da fita. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao equipamento de *gold sputtering* por 80 segundos. Para a visualização de partículas, foi utilizada uma distância de 7-8 mm, força do raio de 20 kV e magnificação de 70.000-300.000 x. A determinação do diâmetro hidrodinâmico, realizada por DLS,

bem como as análises de potencial zeta, foram realizadas no equipamento ZetaSizer<sup>®</sup> Nanoseries (Malvern, Inglaterra) a partir de soluções de NPs na concentração de 100 µg/mL.

#### 4.3. Produção de Nanopartículas Híbridas Lipídio-Polímero (NPHs)

As NPHs foram produzidas pelo método de hidratação suave (Figura 4.3) (Liang et al., 2008; Wang et al., 2010; Zhao et al., 2012; Wang et al., 2012). O método consiste na formação de um filme fino lipídico em um balão volumétrico seguido pela hidratação desta camada por uma dispersão de NPs. Neste trabalho, a composição de lipídios utilizadas para a formulação das partículas foi baseada no trabalho proposto por Pastorino et al. (2003). No seu trabalho, foi desenvolvida uma estratégia vetorizada para o tratamento de tumores a partir de lipossomas funcionalizadas com um peptídeo compostos por HSPC:COL:DSPE-PEG<sub>2000</sub>:DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Peptídeo na razão molar 2:1:0,08:0,02.

Neste trabalho, para fins comparativos, foram produzidas NPHs com e sem a presença do ligante. Basicamente, uma mistura de lipídios HSPC:COL:DSPE-PEG<sub>2000</sub> na razão molar 2:1:0,01 foi dissolvida em 5 mL de CHCl<sub>3</sub>. Subsequentemente, a mistura foi evaporada utilizando um rotavapor com o objetivo de formar um filme fino na parede de um balão volumétrico de 50 mL. 5 mL da dispersão contendo NPs de PLGA (6 mg/mL) foram adicionados ao filme a uma taxa de (1 mL / min) sob baixa agitação e sonicados por 10 minutos. As NPHs foram deixadas se auto-organizar por 30 minutos com agitação baixa e contínua. Posteriormente, as partículas híbridas foram liofilizadas por 48 horas.

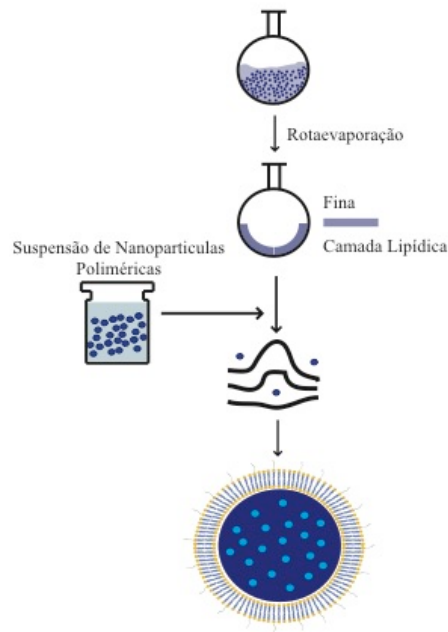


Figura 4.3. Método de hidratação suave.

As NPs híbridas contendo a molécula ligante (NPH-F) foram preparadas utilizando o mesmo protocolo porém, a mistura lipídica foi substituída por HSPC:COL:DSPE-PEG<sub>2000</sub>:DSPE-PEG<sub>2000</sub>-RGD ou HSPC:COL:DSPE-PEG<sub>2000</sub>:DSPE-PEG<sub>2000</sub>-VD3 na razão molar 2:1:0,08:0,02.

Com o objetivo de otimizar a proporção entre lipídios e nanopartículas na preparação, as nanopartículas híbridas foram produzidas com diferentes razões m/m sendo elas: 1:1, 1:10, 1:20 e 1:25 razão mássica de nanopartículas e mistura de lipídios. A Tabela 4.1 apresenta as quantidades necessárias de cada lipídio para as razões em questão.

Após a síntese das NPHs, as mesmas foram submetidas aos mesmos métodos de caracterização realizados para as NPs. Também foi realizada a quantificação do percentual de superfície das partículas que foi coberta utilizando diferentes proporções de fosfolipídios conforme metodologia descrita no subíndice 4.3.1.

Tabela 4.1. Equivalências utilizadas para a produção de NPHs (1:1, 1:10, 1:20 e 1:25 (m/m) lipídio/NPs).

| <i>Razão mássica (Lipídio: NPs PLGA)</i> |          | <i>Razão molar</i> | <i>g/mol</i> | <i>mg</i> | <i>mmol</i> |
|--|----------|--------------------|--------------|-----------|-------------|
| 1:1                                      | HSPC     | 2                  | 785          | 20,8      | 0,02650     |
|  | COL      | 1                  | 386,65       | 5,1       | 0,01320     |
|  | DSPE-PEG | 0,1                | 2993         | 4,1       | 0,00140     |
| 1:10                                     | HSPC     | 2                  | 785          | 1,92      | 0,00240     |
|  | COL      | 1                  | 386,65       | 0,52      | 0,00130     |
|  | DSPE-PEG | 0,1                | 2993         | 0,40      | 0,00010     |
| 1:20                                     | HSPC     | 2                  | 785          | 1,06      | 0,00130     |
|  | COL      | 1                  | 386,65       | 0,27      | 0,00070     |
|  | DSPE-PEG | 0,1                | 2993         | 0,20      | 0,00007     |
| 1:25                                     | HSPC     | 2                  | 785          | 0,700     | 0,00090     |
|  | COL      | 1                  | 386,65       | 0,200     | 0,00040     |
|  | DSPE-PEG | 0,1                | 2993         | 0,100     | 0,00004     |

#### 4.3.1. Quantificação de Lipídios na Superfície das NPHs

O método de quantificação de lipídios na superfície das NPHs, sugerido por Yang et al. (2013), é baseado em duas análises. Primeiramente colorimétrica, onde são quantificados a formação de complexos de fosfolipídios e ferrotiocianato de amônio (Stewart, 1980). Posteriormente é realizada uma análise por H-RMN visando obter informações referentes à quantidade de DSPE-PEG presente na superfície das partículas a partir da análise da absorção de prótons das unidades de lactato (5,19 ppm), glicolato (4,91 ppm) e óxido de etileno (3,51 ppm).

Na prática o método foi aplicado dissolvendo 2 mg de NPHs produzidas com diferentes razões polímero/ lipídio (1:1, 1:10, 1:20, 1:25) em clorofórmio. A solução resultante foi misturada com 2 mL de uma solução de ferrotiocianato de amônio e posteriormente agitada por *vortex* (60 s) para a formação do complexo. Após, a mistura resultante foi centrifugada em baixa velocidade e a absorção dos complexos de HSPC/AF medidos no comprimento de onda 471 nm. A quantidade de lipídios foi calculada utilizando a curva padrão (Figura 4.4) de uma solução de fosfolipídios contendo a mesma composição do revestimento.

A solução padrão de ferrotiocianato de amônio foi preparada conforme o artigo original de Stewart (1980), dissolvendo 27,03 g de cloreto de ferro(III) hexahidratado e 30,4 g de amônio tiocianato em 1 L de água deionizada.

Posteriormente, uma mistura 2:1:1 (razão molar) de HSPC, colesterol e DSPE-PEG<sub>2000</sub> foi dissolvida em 100 mL de CHCl<sub>3</sub>. Volumes entre 0,1 e 1,0 mL desta solução foram pipetados e adicionados a 2 mL da solução de amônio ferrocianato em um tubo de centrifuga e a quantidade suficiente de CHCl<sub>3</sub> foi adicionada para fazer com que o volume final de CHCl<sub>3</sub> chegasse a 2 mL. O sistema foi agitado em *vortex* por 1 minuto e a fase contendo clorofórmio foi removida utilizando uma pipeta *Pasteur* e adicionada a uma cubeta para análise da absorbância via UV/Vis ( $\lambda = 471$  nm).

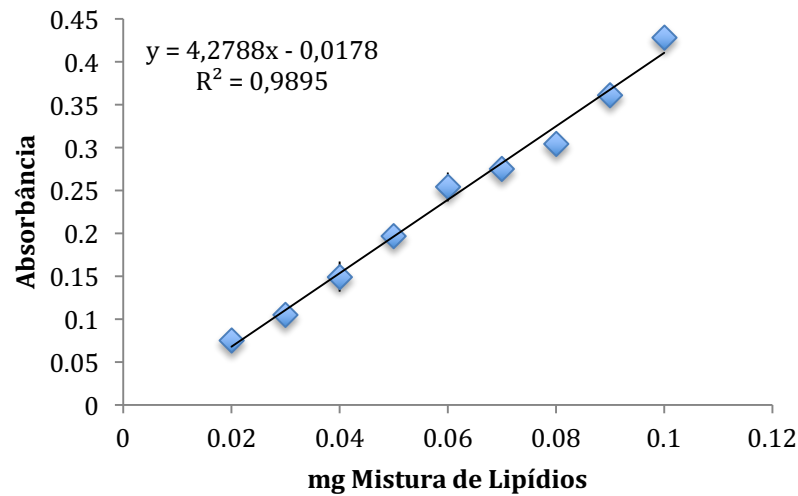


Figura 4.4. Curva padrão de absorção dos complexos de HSPC/AF ( $\lambda = 471$  nm).

A partir dos valores obtidos, a quantidade de lipídios por miligrama de NPs, o número de lipídios por NPs e a taxa de recobrimento das NPs pode ser calculado pelas Eqs. 4.1, 4.2 e 4.3, respectivamente.

$$V_1 = \frac{M_L / M_{WL}}{M_{NPs}} \quad (4.1)$$

$$V_2 = V_1 N_A V_{NPs} \rho_{PLGA} \quad (4.2)$$

$$V_3 = \frac{V_2 S_L}{S_i} \times 100\% \quad (4.3)$$



Sendo  $V_1$  o número de mols de lipídios por mg de NPH,  $V_2$  o número de lipídios por NPH e  $V_3$  a taxa de recobrimento das NPH.  $M_L$  é a massa de lipídios utilizada na preparação das NPH,  $M_{NPs}$  é a massa de nanopartículas analisada,  $M_{WL}$  é a massa molar dos lipídios,  $V_{NPs}$  é o volume individual de cada NP,  $\rho_{PLGA}$  é a densidade do PLGA e  $N_A$  é o número de Avogrado.  $S_i$  é a área superficial de uma única NP e  $S_L$  é a área da parte polar das moléculas de HSPC e DSPE-PEG que, segundo Yang et al. (2013), são dadas por  $0,694 \text{ nm}^2$  e  $1,240 \text{ nm}^2$ , respectivamente.

#### 4.4. Síntese de Peptídeo

Com o objetivo de produzir NPs capazes de realizar uma vetorização ativa para a família de receptores das integrinas, mais especificamente ( $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$ ,  $\alpha v \beta 1$ ), o peptídeo RGD (H-Cys-Lys-Pro-Ser-Asp-Gly-Arg-Gly-OH – CKPSDGRG) foi sintetizado e conjugado à cadeia do DSPE-PEG<sub>2000</sub> utilizando *click chemistry*. O peptídeo foi sintetizado em fase sólida utilizando o método *Fastmoc* em conjunto com o sintetizador de peptídeo automatizado (Applied Biosystems 433A), permitindo o monitoramento direto da condutividade da desproteção dos grupos Fmoc (Deshayes et al., 2011; Schmidt et al., 2014).

A síntese foi iniciada conjugando o primeiro aminoácido (Fmoc-Gly-OH) na superfície da resina 2-clorotritil (Figura 4.5). Para isso, 1 g da resina foi colocado em um balão volumétrico de 50 mL e disperso em 10 mL de DCM ( $10 \text{ mL/g}_{\text{resina}}$ ). 4 eq. de DIEA foram adicionados seguidos da adição de 1,2 eq. de Fmoc-Gly-OH. A reação foi conduzida por 4 horas em temperatura ambiente sob atmosfera inerte (Ar). Posteriormente, a resina foi transferida para uma vidraria específica para síntese de peptídeos (*peptide vessel*) acoplada a um filtro de polietileno e lavada com uma solução de DCM/MeOH/DIEA (17:2:1;  $3 \times 20 \text{ mL}$ ), DCM ( $3 \times 20 \text{ mL}$ ), DMF ( $2 \times 20 \text{ mL}$ ), e DCM ( $2 \times 20 \text{ mL}$ ). Os materiais utilizados na síntese estão descritos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Equivalências utilizadas para a conjugação do primeiro aminoácido na resina 2-clorotritil.

| Nome                           |  | M (g/mol) | N eq. | n (mmol) |
|--------------------------------|--|-----------|-------|----------|
| Resina 2-clorotritil           | Rendimento de ligação ~ 0,89<br>mmol/g |           | 1     |          |
| Fmoc-Gly-OH                    |  | 297,3     | 1,2   | 1,07     |
| Diisopropiletilamina<br>(DIEA) |  | 129,24    | 4     | 3,56     |

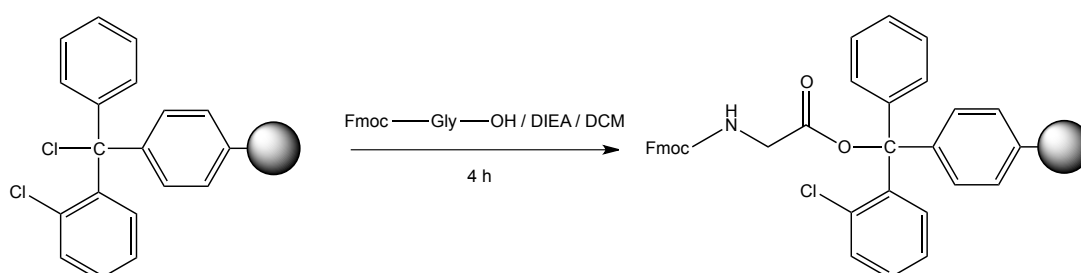


Figura 4.5. Conjugação do primeiro peptídeo na superfície da resina 2-clorotritil.

O rendimento de ligação foi determinado pela identificação do complexo de N-(9-fluorenilmetil) piperidina por microscopia UV/Vis ( $\lambda=201$  nm). 5,6 mg da resina foram dispersos em 0,5 mL de uma solução 20% de piperidina (em DMF) e agitada por 8 minutos. Após, 49,5 mL de DMF foram adicionados e agitados por 7 minutos. A solução “branco” foi preparada com 0,5 mL da solução 20% de piperidina e 50 mL de DMF. O cálculo de rendimento de ligação é feito pela Equação 4.4:

$$\text{Rendimento de ligação} = \frac{Abs \times V \text{ (mL)}}{7800 \times m \text{ (g)}} \quad (4.4)$$

onde *Abs* é a absorbância do complexo N-(9-fluorenilmetil) piperidina e *V* o volume da solução contendo a resina; *m* é a massa de resina dispersa na solução.

A partir do rendimento de ligação e peso da resina, foi possível estimar que 0,582 mmol de aminoácidos foram conjugados na superfície da resina. Os aminoácidos subsequentes, protegidos pelo grupo Fmoc, foram conjugados utilizando o protocolo “dupla ligação condicional” em uma escala 0,2 mmol no sintetizador automático de peptídeos conforme Figura 4.6.

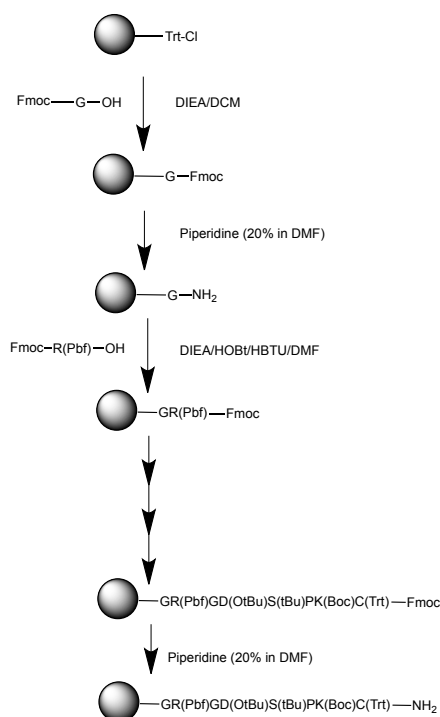


Figura 4.6. Rota de síntese do peptídeo CKPSDGRG.

Para a síntese no equipamento, o sintetizador de peptídeos foi carregado com 430 mg da resina-Gly e os cartuchos contendo os aminoácidos protegidos posicionados para a síntese conforme indicado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Equivalências utilizadas para a síntese do peptídeo RGD.

| <b>Nome</b>                 | <b>M (g/mol)</b> | <b>N eq.</b> | <b>n (mmol)</b> |
|-----------------------------|------------------|--------------|-----------------|
| Fmoc-Gly-OH                 | 297,30           | 1            | 0,25            |
| Fmoc-Arg(Pbf)-OH            | 648,80           | 4            | 1               |
| Fmoc-Asp(OtBu)-OH           | 411,50           | 4            | 1               |
| Fmoc-Ser(tBu)-OH            | 383,40           | 4            | 1               |
| Fmoc-Pro-OH                 | 337,40           | 4            | 1               |
| Fmoc-Lys(Boc)-OH            | 468,50           | 4            | 1               |
| Fmoc-Cys(Trt)-OH            | 585,71           | 4            | 1               |
| Diisopropiletilamina (DIEA) | 129,24           | 4            | 1               |
| HBTU                        | 379,25           | 4            | 1               |
| Hidroxibenzotriazol (HOBt)  | 153,15           | 10           | 2,5             |

Os grupos Fmoc foram clivados da estrutura peptídeo-resina utilizando uma solução de piperidina e os aminoácidos subsequentes foram ativados com uma mistura de HBTU/HOBt/DIEA e ligados ao terminal N do complexo peptídeo-resina.

A síntese foi executada por 12 horas utilizando a formação do complexo piperidina-carbamato para confirmação da reação (Figura 4.7).

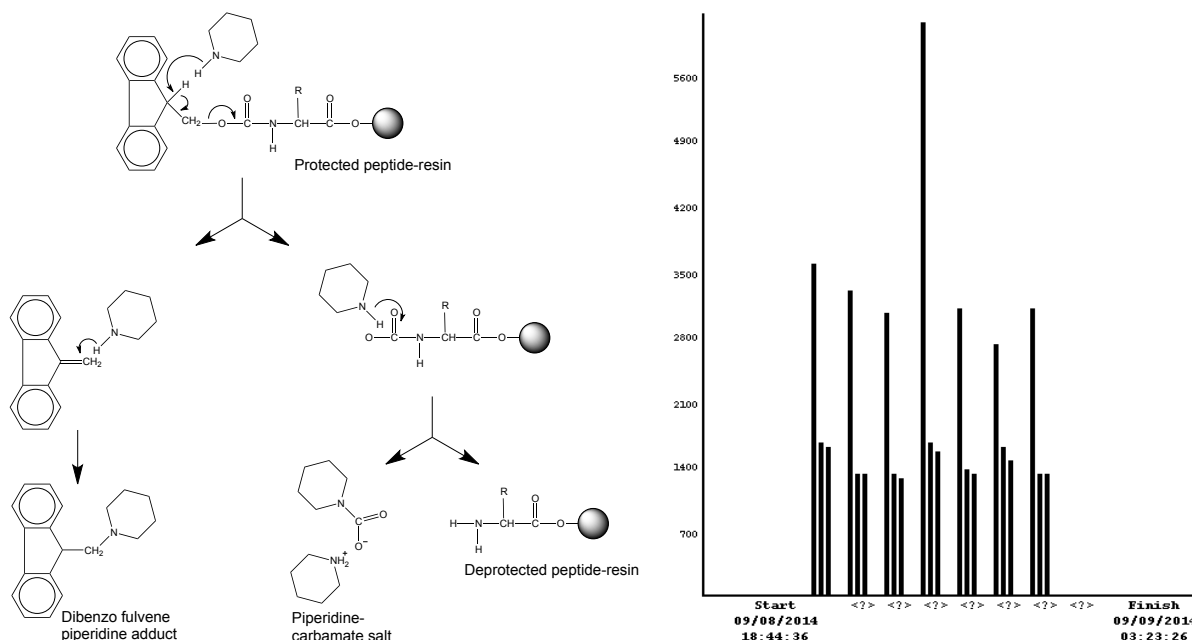


Figura 4.7. Formação do complexo piperidina-carbamato.

O rendimento de ligação foi realizado mais uma vez utilizando o mesmo método descrito anteriormente resultando em um valor de 0,252 mmol/g. A resina contendo o peptídeo foi colocada no *peptide vessel* e solubilizada com DMF por 1 min. Com o objetivo de clivar o grupo Fmoc, 20 mL de uma solução 20% piperidina/DMF foram adicionados e a mistura borbulhada com Ar durante 30 minutos. Posteriormente foram realizadas lavagens com DMF (3 × 20 mL) e DCM (3 × 20 mL). Para clivar o peptídeo da resina e desproteger os grupos de proteção (Boc, Pbf, Trt, OtBu, tBu), 90 mg da resina foram colocados em um balão volumétrico de 50 mL e dispersos em uma mistura composta por TFA (10 mL), H<sub>2</sub>O (0,5 mL), tioanisol (0,5 mL), fenol (0,75 g), TIS (0,25 mL) por 3 horas (Figura 4.8).

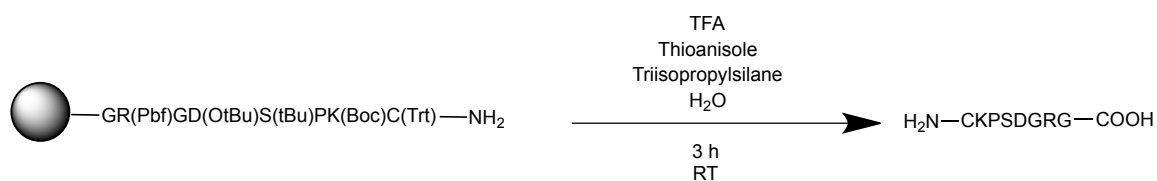


Figura 4.8. Clivagem do peptídeo da superfície da resina 2-clorotritil.

Após, a mistura foi filtrada em filtro sinterizado para remover os grãos de resina e lavada com 1 mL de TFA e 20 mL de DCM. O filtrado contendo o peptídeo desprotegido, foi então concentrado até 2 mL e precipitado com a adição de 50 mL de dietil éter gelado. Por fim, o produto foi isolado por filtração e liofilizado por 48 horas resultando em um rendimento total de 138,3 mg.

A purificação do peptídeo foi realizada por RP-HPLC preparativo (JASCO system) a 17 mL/min em uma coluna Waters C18 (250 × 22 mm, 5 mm) utilizando gradiente de A [H<sub>2</sub>O] e B [CH<sub>3</sub>CN]: 0% de B por 5 min, 0%→100% por 20 min, 100% por 5 min; detecção em 214 nm. A purificação foi finalizada evaporando a CH<sub>3</sub>CN em pressão reduzida e a solução aquosa liofilizada gerando um sólido branco (78 mg). Por fim, a autenticidade do peptídeo foi verificada por espectrometria de massas pelo método de ionização por dessorção a laser assistida por matriz, cuja sigla em inglês é MALDI (do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), seguida pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, sigla TOF (do inglês *Time of Flight*). O equipamento utilizado para estas análises foi o Voyager-DE-STR (Applied Biosystems) localizado no departamento de química e bioquímica da Universidade da Califórnia em Los Angeles.

#### 4.5. Conjugação do Peptídeo RGD no Fosfolipídio DSPE-PEG-Mal

Após confirmada a autenticidade do peptídeo RGD (Resultados 5.2), foi continuado o processo de síntese do fosfolipídio ligado à molécula que tem como objetivo tornar a NPs vetorizadas. Para isso, foi utilizado o método de “*click chemistry*” (Hermanson, 2013) onde a molécula DSPE-PEG contendo o grupo funcional maleamida reage com o grupamento tiol presente no aminoácido cisteína (Cys) do peptídeo, conforme Figura 4.9. O método de síntese do composto DSPE-PEG-RGD foi o mesmo utilizado no trabalho apresentado por Chen et al. (2011).

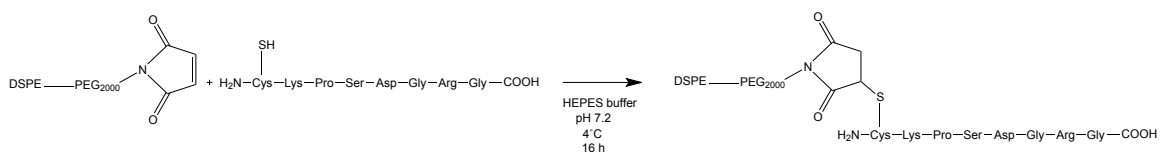


Figura 4.9. Síntese do composto DSPE-PEG-RGD.

A reação foi conduzida dissolvendo DSPE-PEG-Mal e RGD em uma solução tampão (25 mM HEPES, pH 7,4). Posteriormente, foram misturadas, com agitação leve, a solução de DSPE-PEG-Mal (2 mM) com um volume igual de uma solução 4 mM do peptídeo RGD durante 16 horas a 4 °C. Para a conclusão da síntese o composto DSPE-PEG-RGD foi purificado, por diálise ( $MW_{\text{cutoff}} = 1 \text{ kDa}$ ; 72 horas) para remover qualquer molécula de RGD que não tenha reagido, liofilizado e estocado. A confirmação da conjugação do peptídeo RGD com o fosfolípido DSPE-PEG-Mal também foi confirmada via espectrometria de massas MALDI-TOF.

#### 4.6. Ensaio de Liberação

A obtenção de informações referentes à liberação de ativos a partir de nanopartículas pode ser realizada utilizando uma molécula modelo (Ex: fluoresceína) em conjunto com sacos de diálise imersos em uma solução tampão que representa o meio (Mukerjee e Vishwanatha, 2009). Segundo Contri et al. (2011), entre as células de difusão, a de Franz é o tipo mais comum utilizado para obter informações referentes à permeação cutânea de substâncias, principalmente pelo seu baixo custo. Além disso, ao substituir a pele por uma membrana de diálise, o equipamento pode ser utilizado como uma alternativa ao experimento de diálise tradicional onde o saco de diálise é imerso no meio de liberação em um Becker. Nesta metodologia, a membrana é colocada entre os compartimentos (A e B) de difusão da célula (Figura 4.10), a amostra colocada no compartimento A e o sistema mantido com agitação constante. Para realizar a análise da massa de substância liberada para o meio receptor, alíquotas são retiradas e analisadas em intervalos de tempo predeterminados. A taxa de difusão das substâncias ativas é, então, determinada a partir de um método analítico apropriado ao composto em análise (Ex: HPLC, espectrofotometria ou espectrofluorimetria).

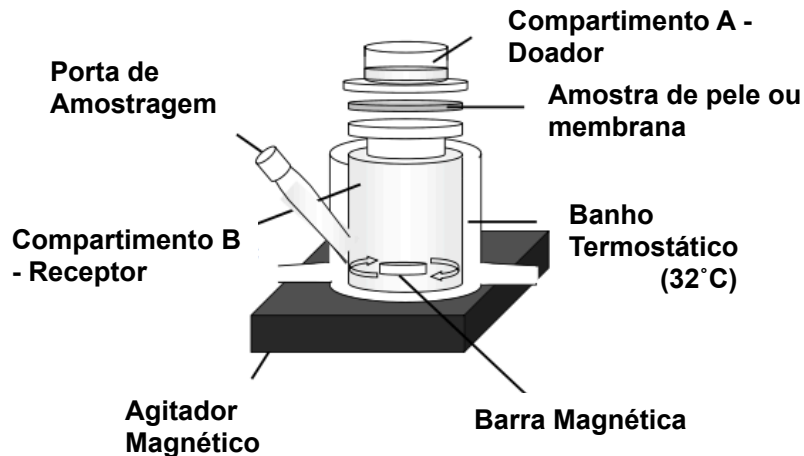


Figura 4.10. Representação esquemática de um experimento de permeação utilizando célula de Franz (Adaptado de Todo et al., 2013).

Neste trabalho, os ensaios de liberação de ativos a partir de NPs, NPHs e NPHs-F contendo fluoresceína foram realizados em triplicata utilizando o método de diálise por 6 dias. Para cada experimento 5 mg de cada uma das amostras foi dispersa em 1 mL do meio de liberação (PBS, pH 7,4) e colocada em contato com as membranas de diálise ( $M_w \text{ cutoff} = 14.000 \text{ Da}$ ) no compartimento doador das células de Franz. O compartimento receptor, onde foram colocados 7 mL do meio de liberação, foi mantido sob agitação constante e temperatura de 32 °C. Em intervalos pré-determinados (0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas), uma alíquota de 1 mL foi retirada do meio receptor e o mesmo volume de PBS adicionado para manter a condição de diluição infinita. A análise das amostras retiradas em diferentes tempos foi realizada por espectrofluorimetria em um leitor de placas (Molecular Devices – SpectraMax M2e). A curva de calibração utilizada para a quantificação de fluoresceína em PBS (pH 7,4) no leitor de placas é apresentada na Figura 4.11.

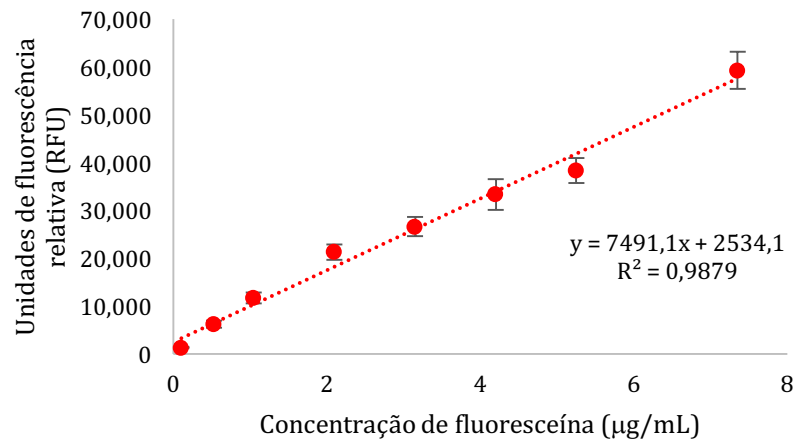


Figura 4.11. Curva de calibração da concentração de fluoresceína em PBS (pH 7,4) no espectrofluorímetro.

Para a obtenção da eficiência de encapsulação (EE) e eficiência de incorporação do fármaco (DL) utilizou-se a metodologia apresentada por Hara et al. (2012) e os seus valores podem ser calculados conforme as Eqs. 4.5 e 4.6. Para a realização da mesma, 2 mg de nanopartículas carregadas com fluoresceína foram dissolvidos em 1 mL de acetonitrila e adicionados à 10 mL de PBS com o objetivo de separar o PLGA da substância em análise. Posteriormente, o PLGA foi filtrado através de um filtro de celulose (tamanho do poro: 0,2 µm) e a solução analisada por espectrofotômetro (UV/Vis) em comprimento de onda fixo ( $\lambda = 490$  nm). A concentração de fluoresceína presente nas nanopartículas analisada foi, então, calculada a partir de uma curva de calibração previamente realizada no espectrofotômetro (Figura 4.12).

$$EE = \frac{\text{massa de fármaco nas nanopartículas}}{\text{massa de fármaco utilizada}} \times 100\% \quad (4.5)$$

$$DL = \frac{\text{massa de fármaco nas nanopartículas}}{\text{massa de nanopartículas}} \times 100\% \quad (4.6)$$



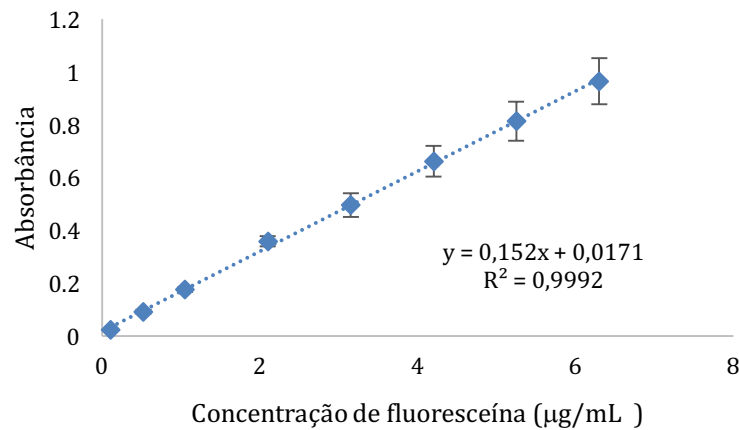


Figura 4.12. Curva de calibração da concentração de fluoresceína em PBS (pH 7,4) no espectrofotômetro.

#### 4.7. Cultura de Células

Para os ensaios de viabilidade celular e microscopia, foi utilizada a linhagem celular B16, representativa de melanoma de camundongo, adquirida do banco de células americano denominado ATCC (American Type Culture Collection). As células foram cultivadas em meio Dulbeco's Modified Eagle Medium (Meio de Eagle modificado por Dulbecos - DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina (100 U/mL) e fungizona. Adicionalmente, as culturas foram mantidas em uma estufa para cultura celular com temperatura regulada a 37°C, umidade do ar a 95% e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.8. Avaliação da Viabilidade Celular

A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito por Gehring et al, 2007. Brevemente,  $6,5 \times 10^3$  células foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas em condições ideais de cultivo até atingirem 70% de confluência. Após este período as células foram tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas (10, 50, 100 e 500 µg/mL) previamente filtradas (filtro 0,45 µm) em suas diferentes formulações NP, NPH e NPH-F. As células foram mantidas 24 h sob tratamento e após foram submetidas a análise da viabilidade celular. Para tanto, primeiramente as células foram lavadas com PBS e incubadas com uma solução de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) a 5 mg/mL diluído em

DMEM 10% de SFB. Os cristais de Formazam, produto da reação de óxido-redução mitocondrial das células viáveis, foram dissolvidos por 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO), e a intensidade de coloração foi determinada pelo equipamento SpectraMax M2e – Molecular Devices, em absorvância de 570 nm. A absorvância foi linearmente proporcional ao número de células vivas com a mitocôndria ativa. Os resultados foram expressos como percentual em relação ao controle sem tratamento.

Para a avaliação específica das nanopartículas contendo temozolomida (TMZ), as células foram tratadas com as mesmas em suas diferentes formulações, NP, NPH e NPH-F, na concentração de 2 mg/mL, contendo 10  $\mu\text{M}$  de TMZ. Como controle de tratamento, as células foram tratadas com TMZ em solução, também a 10  $\mu\text{M}$  e com DMSO 1% como controle do veículo.

Com o objetivo de obter a eficiência de encapsulação (EE) de TMZ nos nanocarreadores, a metodologia proposta por Zhang e Gao (2007) foi aplicada. Para esta metodologia, 2 mg de NPs, NPH e NPH-F foram pesados e dissolvidos, por sonicação, em 3 mL de acetonitrila. A massa de fármaco encapsulada foi então analisada por UV/Vis no comprimento de onda  $\lambda = 327$  nm. A curva de calibração de temozolomida em acetonitrila pode ser observada na Figura 4.13.

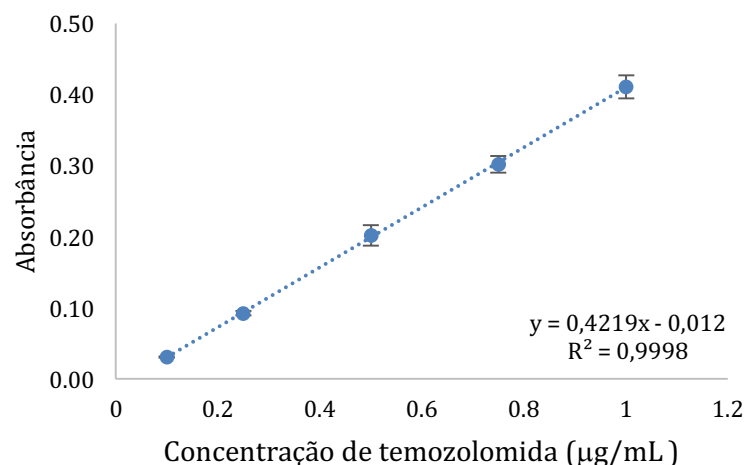


Figura 4.13. Curva de calibração da concentração de temozolomida em acetonitrila no espectrofotômetro.

#### **4.9. Avaliação da Internalização Celular por Microscopia Invertida de Fluorescência**

A fim de avaliar a capacidade de internalização dos nanocarreadores, as células foram tratadas com as diferentes formulações contendo em seu interior um marcador fluorescente determinado como *Nile red*. Desta maneira,  $2,0 \times 10^4$  células foram semeadas em placas de 24 poços e após 24 horas de incubação em condições ideais de cultivo, promoveu-se o tratamento das mesmas com NP, NPH e NPH-F nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , todas elas contendo NR em seu interior. As células foram mantidas 3 h sob tratamento. Na sequência o meio de cultivo foi removido, as células foram lavadas três vezes com PBS e submetidas à análise de microscopia invertida de fluorescência com o uso de um microscópio Olympus IX71.

#### **4.10. Estatística**

Para a avaliação dos resultados utilizou-se o teste estatístico Anova de uma via (One Way ANOVA) seguido pelo teste de *post hoc* Tukey. Os resultados foram expressos como média e erro padrão. O programa GraphPad Prism 5.0® foi utilizado para avaliação dos resultados e também para a geração dos gráficos.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

#### **4.11. Modelagem Matemática**

##### **4.11.1. Modelagem Matemática da Liberação de Fármacos a Partir de Nanopartículas Poliméricas**

Neste trabalho foi buscada uma solução analítica explícita para a, amplamente aplicada na literatura, equação de Baker-Lonsdale como uma alternativa à linearização ou qualquer tipo de aproximação associada à difusão das substâncias através do mecanismo durante a liberação para o meio. Para isso, a Eq. (3.14) foi escrita conforme a Eq. 4.7:

$$y^3 - \frac{3}{2}y^2 - Bt + \frac{1}{2} = 0 \quad (4.7)$$

onde  $y = \frac{a'}{a_0}$  e o parâmetro  $B$  é descrito por  $B = \frac{3C_s D_e}{a_0^2 C_0}$ . Para resolver a Eq. 4.7 utilizou-se a fórmula de Vieta (Eq. 4.8), que realiza a solução da equação cúbica por relações trigonométricas (Cooke, 2008).

$$y = \frac{2\sqrt{-p}}{\sqrt{3}} \cos \left( \frac{1}{3} \arccos \left( \frac{3\sqrt{3}q}{2p\sqrt{-p}} \right) \right) - \frac{b}{3a} \quad (4.8)$$

sendo  $p = \frac{3ac-b^2}{3a^2}$  e  $q = \frac{2b^3-9abc+27a^2d}{27a^3}$ . Para este método, as três raízes da equação cúbica são descritas pela adição de  $2\pi$  para a segunda raiz e  $4\pi$  para a terceira raiz no interior da função cosseno. A partir disto, entre as raízes obtidas, a raiz da solução matemática que apresenta significado físico para o problema em questão é descrito pela Eq. 4.9. As outras duas raízes são descartadas pois, para este modelo, a primeira (quando não somado nada no interior da função cosseno) resulta em um valor maior que um, e a segunda raiz (ao somar  $2\pi$  no interior da função cosseno) resulta em um valor negativo não representando nenhum significado físico para o problema em análise.

$$y = \cos \left( \frac{1}{3} (\arccos (12Bt - 1) + 4\pi) \right) + \frac{1}{2} \quad (4.9)$$

Utilizando a transformação de variável apresentada na Eq. 3.16, é possível chegar no equacionamento analítico final, onde o termo  $\frac{M_t}{M_\infty}$  aparece de forma independente do restante da equação (Eq. 4.10).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[ \frac{1}{2} + \cos \left( \frac{1}{3} (\arccos (12Bt - 1) + 4\pi) \right) \right]^3 \quad (4.10)$$

#### 4.11.2. Proposta de Modelo Matemático da Permeação de Sistemas de Liberação de Fármacos

A modelagem matemática da entrega tópica ou transdérmica é um procedimento complexo devido às características geométricas da pele e sua possível interação com as moléculas que a estão penetrando. Tais interações podem ser, por exemplo, entre queratina presente nos corneócitos e receptores específicos. As NPH-F, principal foco deste trabalho, apresentam como objetivo se acumularem em células de melanoma ou melanócitos e, por isto, é proposto a utilização do modelo apresentado por Anissimov e Roberts (2009) com uma alteração na condição de contorno. Para facilitar a visualização desta modificação, as equações diferenciais do modelo de Anissimov e Roberts (2009) são apresentadas novamente a seguir:

$$\frac{\partial C_u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_u}{\partial x^2} - k_{on} C_u + k_{off} C_b \quad (3.19)$$

$$\frac{\partial C_b}{\partial t} = k_{on} C_u - k_{off} C_b \quad (3.20)$$

O modelo de Anissimov e Roberts (2009) apresenta uma condição de contorno fixa, ou seja, a concentração de substâncias em contato com a superfície da pele é constante (Eq. 3.23). Para o caso de aplicação na pele das nanopartículas produzidas neste trabalho, existirá uma concentração finita de nanocarreadores que, na medida que permeiam a pele, a sua concentração na superfície é reduzida. Esta relação pode ser obtida ao realizar o balanço de massa na camada mais superficial da pele conforme Eq. 4.11 (Mikhailov e Ozisik, 1984).

$$V \frac{\partial C_0}{\partial t} = -AD \frac{\partial C_u}{\partial x} \quad (4.11)$$

Sendo  $V$  o volume de solução contendo as nanopartículas e  $A$  a área desta solução em contato com a pele. Além disso, considera-se uma condição de equilíbrio na camada superficial, onde é possível relacionar a concentração na solução em

contato com a pele com a concentração de soluto no estado não ligado através do coeficiente de partição  $K$  ( $C_0 = \frac{C_u}{K}$ ). A partir disto, as condições de contorno podem ser descritas pela Eq. 4.12.

$$\frac{V}{AK} \frac{\partial C_u}{\partial t} = -D \frac{\partial C_u}{\partial x} \quad \text{em } x = 0 \quad (4.12)$$

$$C_u(h, t) = 0 \quad \text{em } x = h$$

A condição inicial do modelo permanece a mesma sugerida por Anissimov e Roberts (2009) (Eq. 3.22) visto que, no momento inicial, a concentração de fármacos na pele é nula.

$$C_u(x, 0) = 0; \quad C_b(x, 0) = 0; \quad (3.22)$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Síntese de Nanopartículas, Nanopartículas Híbridas e Nanopartículas Híbridas Funcionalizadas

As nanopartículas (NPs) de PLGA foram preparadas pelo método de simples emulsificação/ evaporação do solvente. Esta metodologia é encontrada amplamente na literatura para a produção de NPs poliméricas para diferentes aplicações com pequenas alterações nos solventes utilizados (Verderio et al., 2013; Mccall e Sirianni, 2013; Fonte et al., 2012; Wang et al., 2011). Neste trabalho, a metodologia proposta por Verderio et al. (2013) foi aplicada modificando o tempo de dissolução do PLGA (72 h), velocidade de rotação da ultracentrífuga (25.000 rcf) e composição da mistura de solventes (EtAc:DMSO – 0,75:0,25 v/v) devido à massa molar mais elevada do PLGA utilizado (100 kDa). A partir da metodologia ótima definida e dos resultados obtidos da síntese de nanopartículas de PLGA, foi possível constatar que as mesmas foram produzidas com propriedades (tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão) adequados para a aplicação em sistemas de liberação de fármacos (Tabela 5.1). Entre estas propriedades destaca-se o baixo índice de polidispersão ( $<0,1$ ) confirmando a homogeneidade da distribuição de tamanhos das amostras. Imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) podem ser analisadas na Figura 5.1.

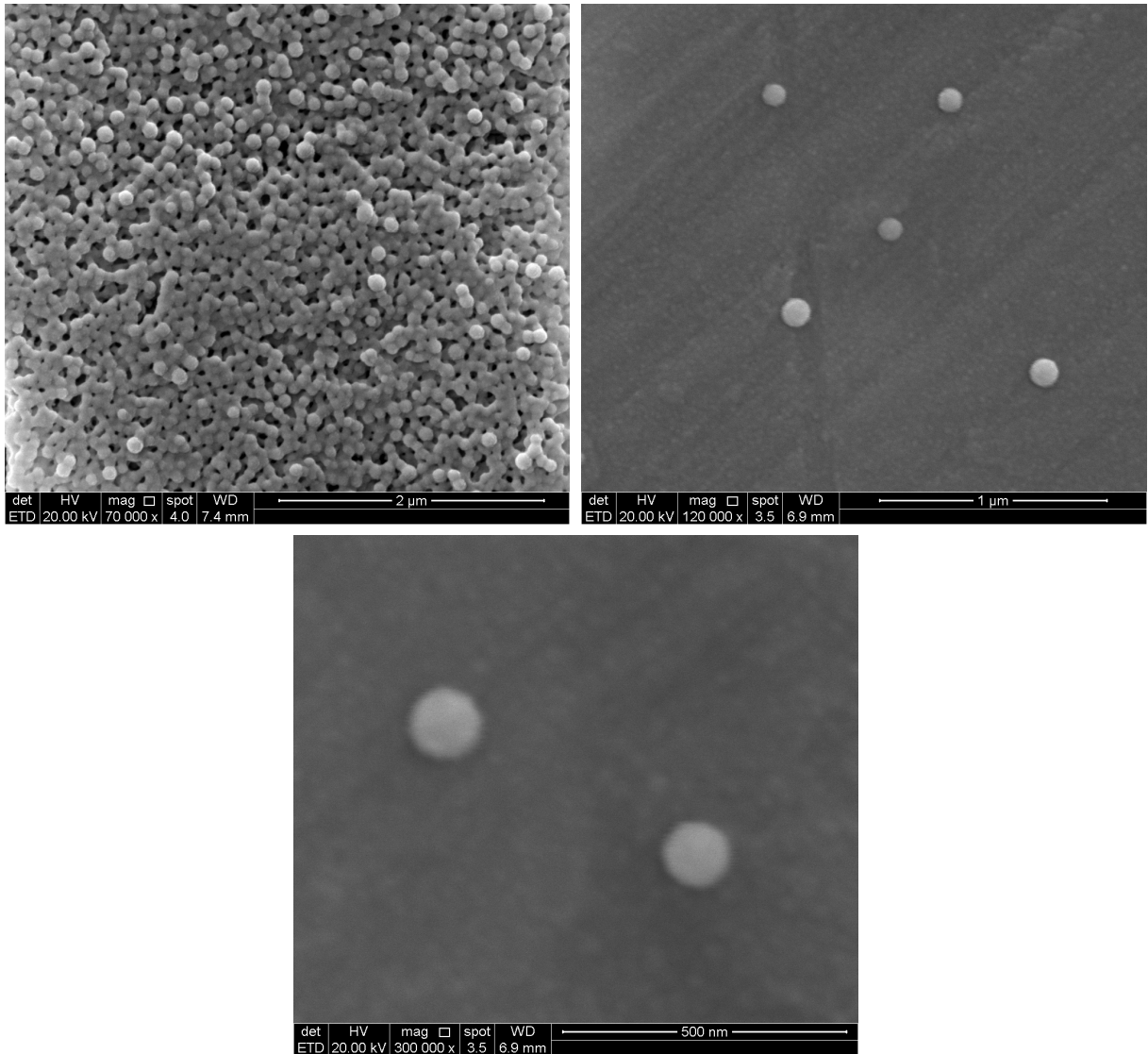


Figura 5.1. Imagens de MEV-FEG das NPs de PLGA sintetizadas obtidas em 70.000 x, 120.000 x e 300.000 x, respectivamente.

A partir das imagens obtidas no MEV é possível verificar a morfologia esférica das NPs bem como confirmar o dado de tamanho obtido via DLS. A primeira imagem da Figura 5.1 foi obtida a partir do método mais simples de preparação da amostra, onde a mesma foi somente aplicada sobre a fita de carbono. As outras imagens foram obtidas a partir da preparação de uma solução de NPs e por isso as mesmas se apresentam mais isoladas.

Com o objetivo de facilitar a comparação e análise entre os diferentes sistemas sintetizados, os resultados da caracterização dos mesmos foram compilados nesta etapa do subcapítulo. Conforme citado na metodologia, a síntese



de NPHs foi iniciada utilizando uma razão lipídios/NPs de 1:1 m/m e os resultados referentes a sua caracterização podem ser analisados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Caracterização das NPs e NPHs (1:1 razão mássica lipídio/NPs).

|          | <b>Tamanho (nm)</b> | <b>Pdl</b>    | <b>Potencial Zeta (mV)</b> |
|----------|---------------------|---------------|----------------------------|
| PLGA NPs | 133,6 ± 0,3         | 0,058 ± 0,012 | -14,30 ± 0,70              |
| NPHs     | 256,8 ± 38,4        | 0,286 ± 0,100 | -13,59 ± 3,15              |

Em concordância com o esperado, um aumento no tamanho das nanopartículas ocorre ao introduzir uma camada lipídica na superfície das mesmas. Com relação ao índice de polidispersão, foi possível verificar um aumento importante das NPs para as NPs híbridas. Este fato pode estar relacionado com excesso de fosfolipídios resultando na formação de micelas sem núcleo polimérico de diferentes tamanhos na etapa de síntese dessas partículas, levando a uma dificuldade na etapa de fabricação devido a possível formação de *clusters* ao utilizar a razão mássica 1:1 (lipídios:NPs). O potencial zeta não apresentou um aumento significativo no seu valor após a introdução da camada lipídica.

### 5.1.1. Otimização do Recobrimento das Partículas

Com o objetivo de evitar a formação de micelas sem núcleo polimérico e o uso excessivo de lipídios para realizar a cobertura das NPH, decidiu-se quantificar a taxa de cobertura da camada lipídica nas partículas e otimizar a razão mássica (lipídio:NPs) utilizadas na preparação das amostras. Para isso, novas misturas de lipídios foram preparadas e submetidas à preparação de NPHs utilizando diferentes razões mássicas (1:10, 1:20 e 1:25).

As NPHs foram caracterizadas pelo mesmo método descrito anteriormente para as NPs e os resultados obtidos podem ser analisados na Tabela 5.2, onde pode ser observado que ocorre uma redução no tamanho das partículas reduzindo a quantidade de lipídios introduzidos no método de preparação. Apesar do valor do índice de polidispersão não apresentar uma diferença importante, o método de preparação foi realizado com maior facilidade, sem a formação de *clusters* resultando partículas de maior uniformidade. Com relação ao potencial zeta, não foi

observada uma mudança significativa do seu valor ao reduzir a razão mássica lipídio:NPs.

Tabela 5.2. Caracterização das NPs híbridas (1:1, 1:10, 1:20 e 1:25 razão mássica lipídio/NPs).

| <b>Razão (m/m) lipídio:NPs</b> | <b>Tamanho (nm)</b> | <b>Pdl</b>   | <b>Potencial Zeta (mV)</b> |
|--------------------------------|---------------------|--------------|----------------------------|
| 1:1                            | 256,77 ± 38,40      | 0,286 ± 0,10 | -13,59 ± 3,15              |
| 1:10                           | 209,80 ± 0,001      | 0,190 ± 0,19 | -15,00 ± 1,56              |
| 1:20                           | 189,30 ± 2,690      | 0,222 ± 0,08 | -11,40 ± 2,19              |
| 1:25                           | 163,20 ± 8,230      | 0,183 ± 0,01 | -14,00 ± 1,30              |

Os cálculos de taxa de recobrimento das NPHs podem ser realizados a partir do método colorimétrico apresentado por Stewart (1980) em conjunto com a análise em H-RMN, conforme apresentado na metodologia. Os resultados das análises por H-RMN podem ser observados na Figura 5.2, onde os espectros fornecem o valor da absorção de prótons das unidades de lactato, glicolato e óxido de etileno e, fazendo a razão entre esses picos se torna possível a quantificação do percentual de DSPE-PEG na amostra. Analisando os resultados é possível verificar que os valores obtidos foram de 1,93:1, 6,92:1, 10,9:1 e 12,7:1 para as razões mássicas de 1:1, 1:10, 1:20 e 1:25. Os valores obtidos para cada composto referente à densidade de lipídios na superfície, moléculas por NP e taxa de recobrimento estão apresentados na Tabela 5.3 para as razões mássicas 1:1, 1:10, 1:20 e 1:25.

Tabela 5.3. Quantificação de lipídios na superfície das NPs híbridas (1:1, 1:10, 1:20 e 1:25 razão mássica lipídio/NPs).

| <b>Lipídios:NPs (m/m)</b> | <b>HSPC</b>  |  |                             | <b>DSPE-PEG</b>  |  |                             |
|---------------------------|--|--|-----------------------------|--|--|-----------------------------|
|                           | <b>Densidade na superfície (nmol mg<sup>-1</sup> NP)</b> | <b>Moléculas por NP (10<sup>4</sup>)</b> | <b>Taxa de recobrimento</b> | <b>Densidade na superfície (nmol mg<sup>-1</sup> NP)</b> | <b>Moléculas por NP (10<sup>4</sup>)</b> | <b>Taxa de recobrimento</b> |
| 1:1                       | 544,8 ± 15,0   | 554,1 ± 15,2                             | 1394% ± 38                  | 172,9  | 175,8                                    | 791%                        |
| 1:10                      | 106,1 ± 3,1  | 50,2 ± 1,4                               | 210% ± 6                    | 48,3   | 22,9                                     | 171%                        |
| 1:20                      | 62,7 ± 3,5   | 16,4 ± 0,9                               | 102% ± 6                    | 30,6   | 8,0                                      | 89%                         |
| 1:25                      | 24,4 ± 1,6   | 3,8 ± 0,3                                | 33% ± 2                     | 26,2   | 4,1                                      | 64%                         |

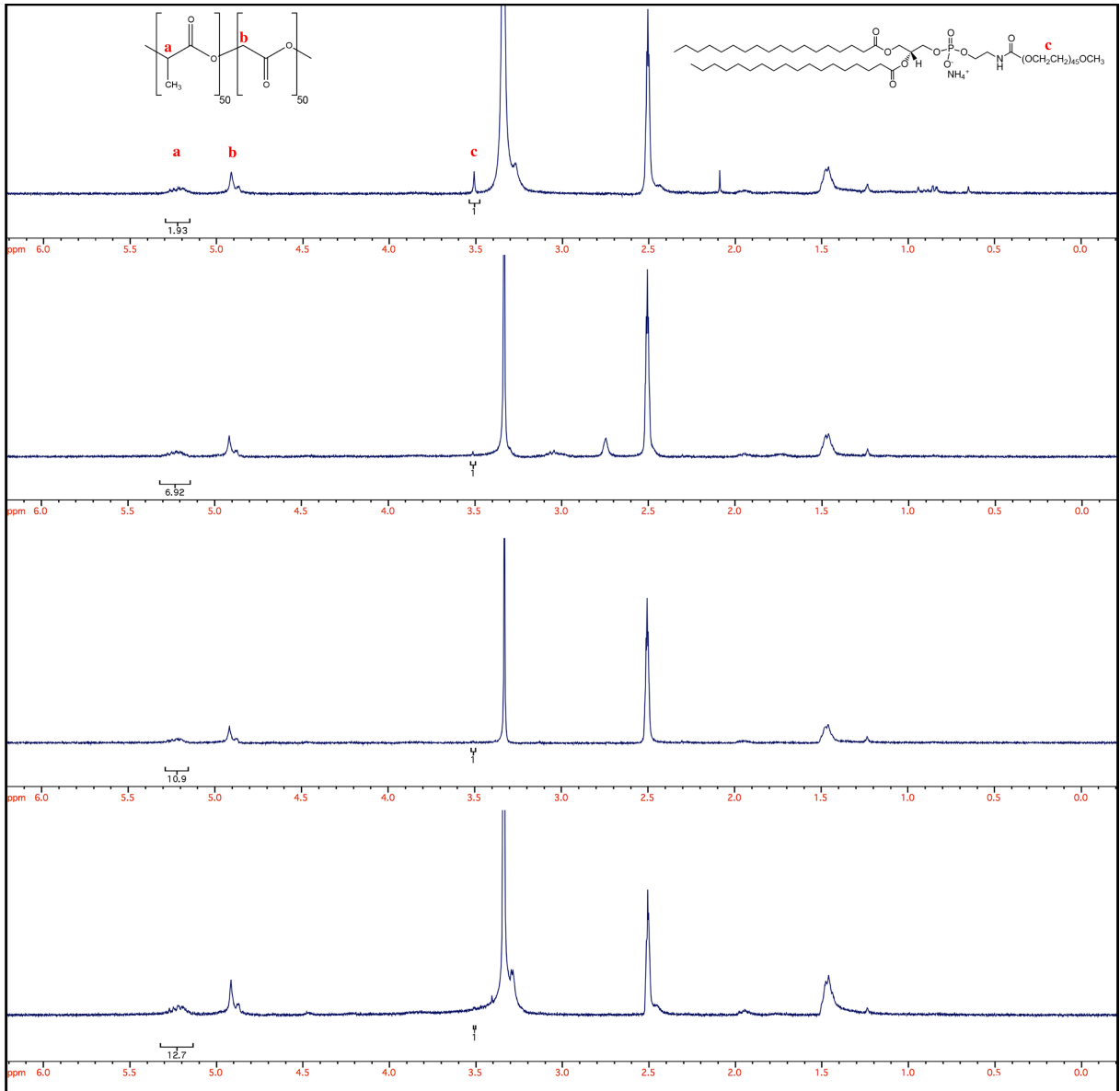


Figura 5.2. Espectros H-RMN das nanopartículas produzidas com (de cima para baixo) 1:1, 1:10, 1:20 e 1:25 razão mássica lipídio:NPs de PLGA.

A taxa de recobrimento total é dada pela soma entre as taxas de recobrimento parcial de HSPC e DSPE-PEG. O valor total para cada uma das razões mássicas utilizadas na preparação das NPHs é descrito na Figura 5.3.

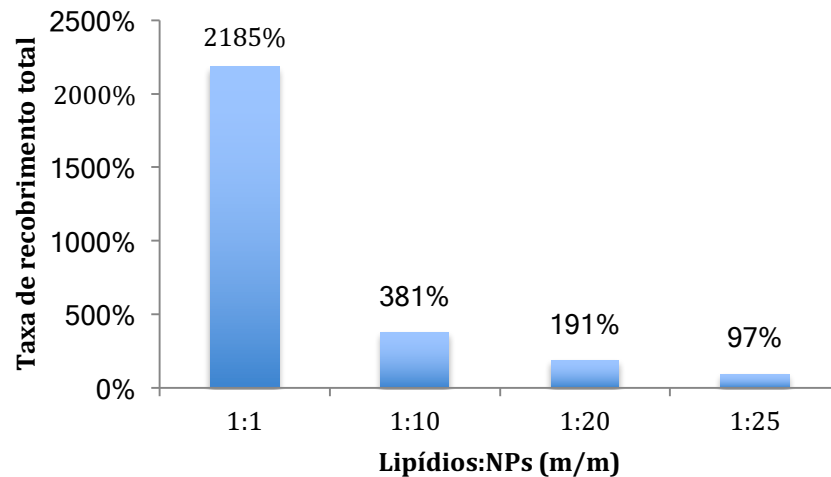


Figura 5.3. Taxa de recobrimento total das NPs a partir de diferentes razões de lipídio:NPs.

Conforme apresentado na Figura 5.3, é possível observar que na razão mássica de 1:25 foi obtido um recobrimento das NPs de 97% e, por isso, proposto que esta é a condição ótima para a produção das NPHs e NPHs-F. Esta condição esta próxima aos trabalhos apresentados por Desai et al. (2013), onde os autores utilizaram uma proporção de 1:15 e Zhang et al. (2008) onde a proporção variando de 10-20% foram consideradas ótimas. É importante ressaltar que ambos autores citados utilizaram polímeros diferentes deste trabalho e o método de preparação das NPH foi o de nanoprecipitação. Os autores que realizaram a preparação das NPH em duas etapas (Wang et al., 2010; Wang et al., 2012; Zhao et al., 2012) utilizam a proporção de 1:1, porém não citam qual o percentual de área coberta pela camada de fosfolipídios. A partir destes resultados, foram fabricadas NPHs e NPHs-F na razão mássica ótima lipídios:NPs e os resultados obtidos a partir da caracterização das mesmas está descrito na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Caracterização das NPs, NPHs e NPHs-F preparadas na condição ótima (1:25 lipídios:NPs).

|                       | <b>Tamanho (nm)</b> | <b>Pdl</b>    | <b>Potencial Zeta (mV)</b> |
|-----------------------|---------------------|---------------|----------------------------|
| PLGA NPs              | 133,6 ± 0,3         | 0,058 ± 0,012 | -14,3 ± 0,7                |
| NPHs                  | 163,2 ± 6,7         | 0,184 ± 0,011 | -14,0 ± 1,1                |
| NPHs-F <sub>VD3</sub> | 175,4 ± 6,5         | 0,199 ± 0,011 | -13,9 ± 0,1                |
| NPHs-F <sub>RGD</sub> | 188,9 ± 0,3         | 0,131 ± 0,006 | -13,4 ± 3,4                |

Analisando os resultados obtidos a partir da síntese das NPH e NPH-F utilizando a condição ótima descrita anteriormente, é possível verificar que ocorre

um aumento no tamanho das nanopartículas de acordo com a introdução da camada de fosfolipídios. Ao introduzir os ligantes, o tamanho das NPHs volta a aumentar de acordo com o tamanho da molécula que está sendo conjugada, ou seja, como o peptídeo RGD é maior que a molécula de vitamina D (819 Da *versus* 385 Da) sua contribuição para o acréscimo no tamanho das NPHs é mais importante.

A Figura 5.4 apresenta as imagens obtidas por MEV-FEG das amostras NPH e NPH-F<sub>VD</sub>. As imagens das NPH-F<sub>RGD</sub> não foram obtidas devido a falta de material sintetizado no momento de disponibilidade do microscópio eletrônico.

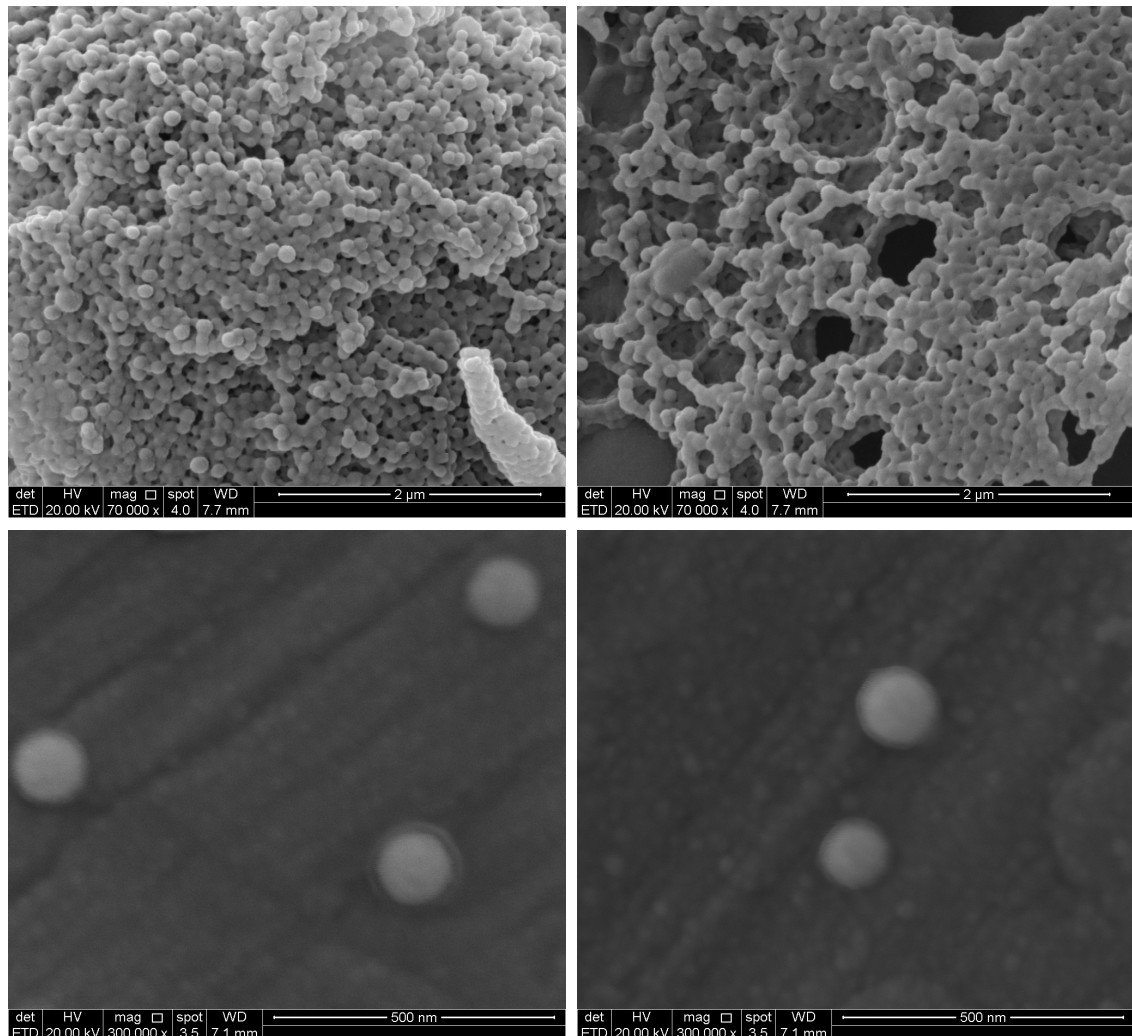


Figura 5.4. Imagens de MEV-FEG das NPH (esquerda) e NPH-F<sub>VD3</sub> (direita) sintetizadas com o protocolo otimizado. As imagens inferiores foram preparadas pelo método onde as nanopartículas são dispersas em água deionizada na concentração de 100 μg/mL.

## 5.2. Síntese de Peptídeo

O produto obtido a partir da síntese em fase sólida do peptídeo RGD foi analisado por MALDI-TOF onde a massa molecular teórica do peptídeo H-Cys-Lys-Pro-Ser-Asp-Gly-Arg-Gly-OH é  $M_w=818,9$  Da. A Figura 5.5 mostra o espectrograma do MALDI-TOF obtido na análise mostrando que a síntese foi completa, porém com algumas impurezas.

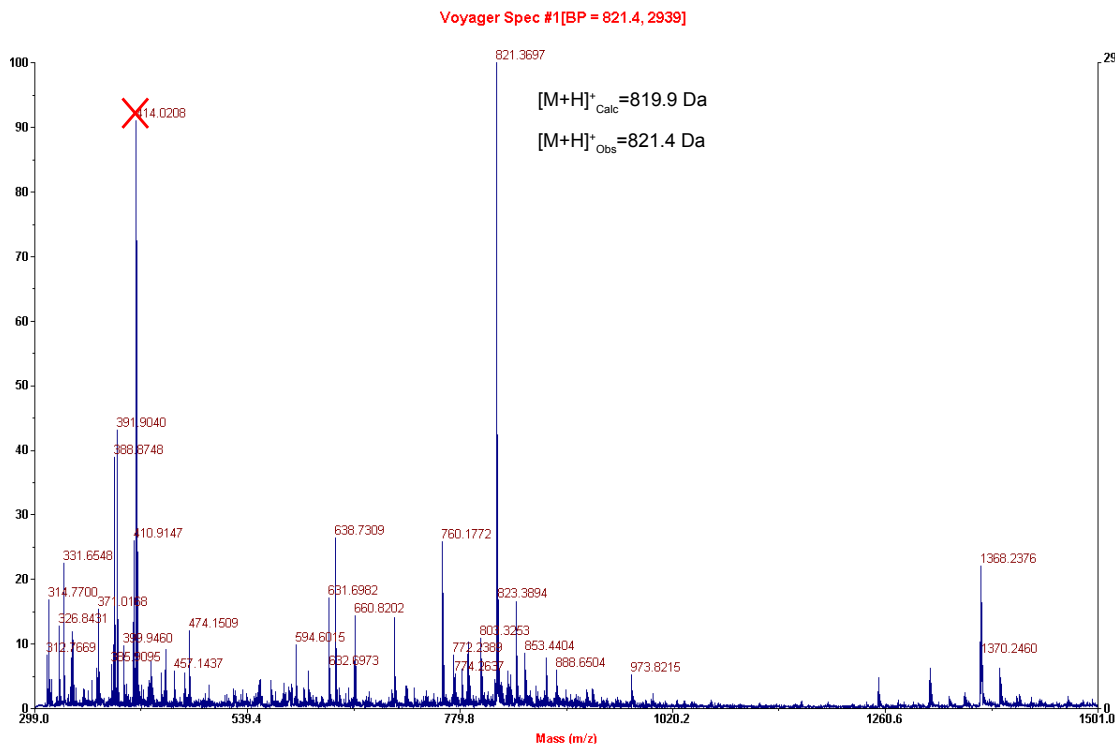


Figura 5.5. MALDI-TOF do peptídeo sintetizado antes da purificação.

Com o objetivo de remover as impurezas do produto, foi realizada uma purificação em membranas de diálise ( $M_w$  cutoff = 1kDa), conforme citado na Seção 4.4. É possível notar que no gráfico anterior a purificação, a massa molar encontrada foi de 821,4 Da pois não foi utilizada uma solução *standard* para calibração do equipamento. A Figura 5.6 apresenta o espectrograma MALDI-TOF para o produto após a purificação. É importante ressaltar que o equipamento fornece dois valores. O primeiro é o resultado observado mais um próton de hidrogênio ( $[M+H]^+=820,1$ ) e o segundo é o resultado observado acrescido de um próton de sódio ( $[M+Na]^+=842,1$ ). Por consequência, os valores devem ser decrescidos de 1 Da para o caso do hidrogênio e 23 Da para o caso do sódio, resultando na massa esperada

do produto em questão. Ao comparar o valor obtido a partir da análise do equipamento com o valor da massa calculada para o peptídeo (818,9 Da) é possível notar uma diferença de 0,2 Da. Este fato está associado ao limite de detecção do equipamento.

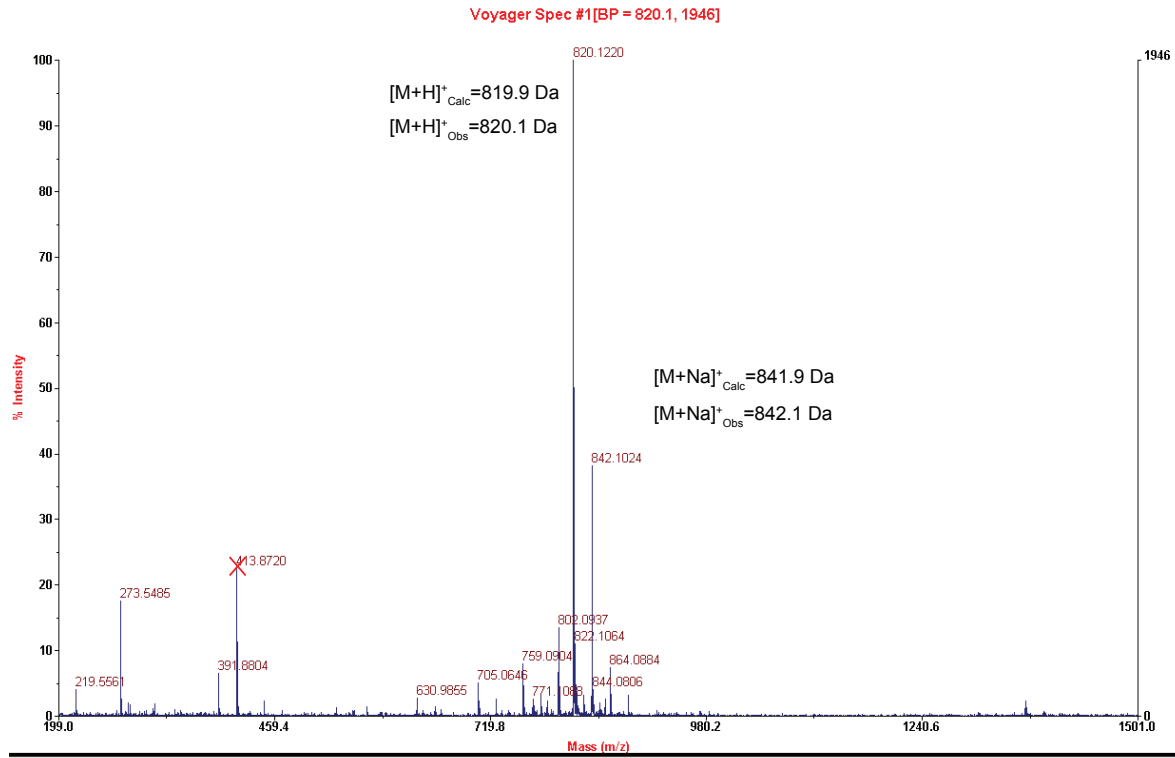


Figura 5.6. MALDI-TOF do peptídeo sintetizado após a purificação.

### 5.3. Conjugação do Peptídeo RGD no Fosfolipídio DSPE-PEG-Mal

Após a síntese do peptídeo, a molécula foi conjugada no final da cadeia do fosfolipídio DSPE-PEG<sub>2000</sub>, utilizando a reação de adição de Michael para conjugar o grupamento maleimida e o grupamento tiol presente no aminoácido cisteína.

Assim como na síntese do peptídeo, a espectrometria de massas MALDI-TOF foi utilizada seguindo o mesmo procedimento de análise proposto por Chen et al. (2011). Os resultados podem ser observados na Figura 5.7, onde constam o composto DSPE-PEG<sub>2000</sub>-MAL antes da reação (A) e após a reação de adição (B). Conforme pode ser observado, a síntese é confirmada pelo deslocamento dos picos para a direita indicando um aumento de massa molar do DSPE-PEG<sub>2000</sub>-MAL ( $Mw_{\text{teórica}} = 2926 \text{ Da}$ ) para DSPE-PEG<sub>2000</sub>-RGD ( $Mw_{\text{teórica}} = 3745 \text{ Da}$ ).

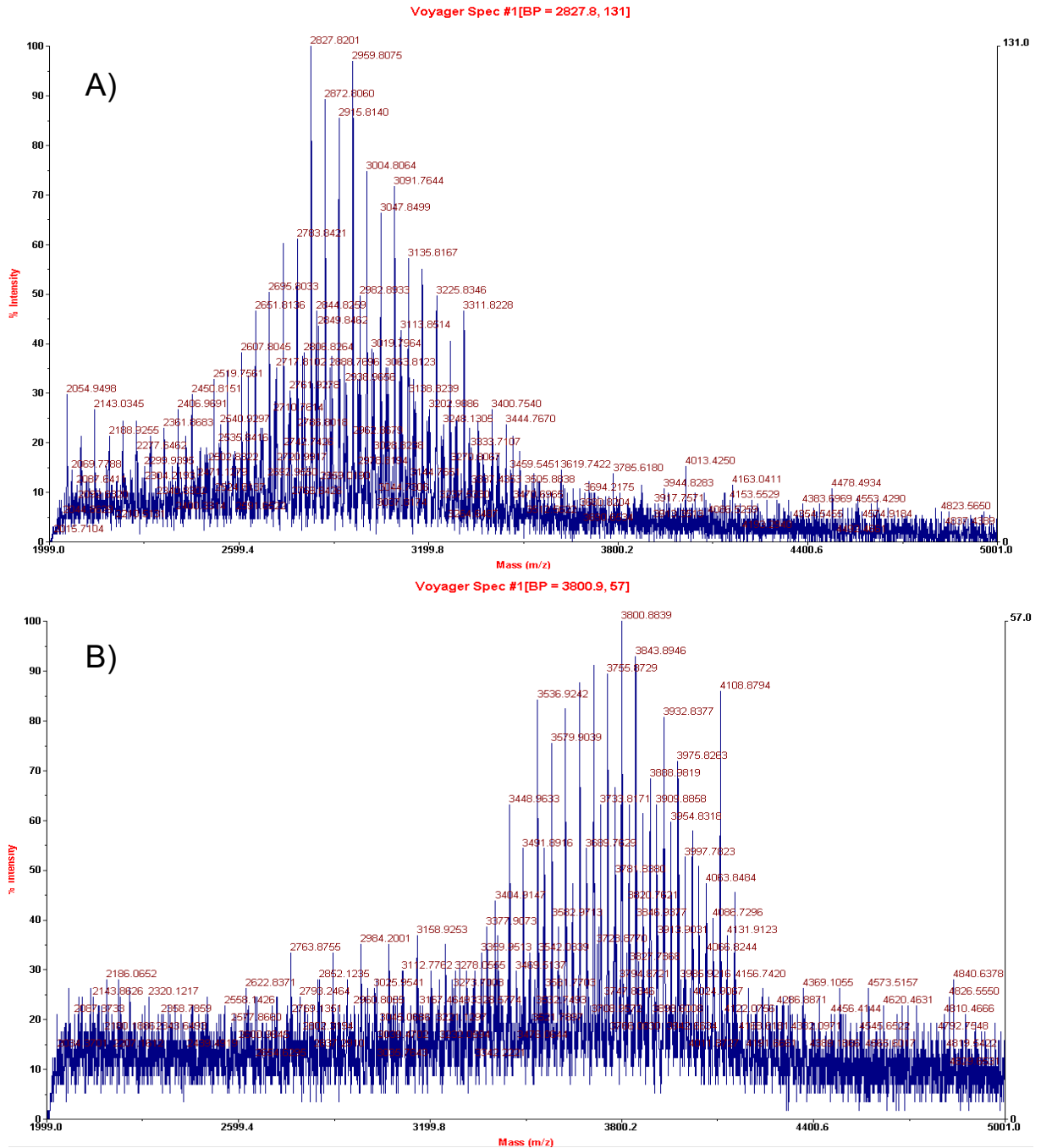


Figura 5.7. MALDI-TOF mostrando o deslocamento dos picos quando a molécula DSPE-PEG-MAL é conjugada ao peptídeo RGD.

#### 5.4. Ensaios de Liberação

Com o objetivo de realizar estudos de cinética de liberação, NPs, NPHs e NPHs-F contendo fluoresceína foram fabricadas e os estudos de liberação conduzidos durante 6 dias. As quantidades de fluoróforo contida no interior dos nanocarreadores foi quantificada e estão apresentadas na Tabela 5.5.



Tabela 5.5. Caracterização das NPs, NPHs e NPHs-F preparadas na condição ótima (1:25 lipídios:NPs).

|                       | <b>Tamanho (nm)</b> | <b>Pdl</b>  | <b>Potencial Zeta (mV)</b> | <b>DL (%)</b> | <b>EE (%)</b> |
|-----------------------|---------------------|-------------|----------------------------|---------------|---------------|
| PLGA NPs              | 170,33±5,10         | 0,209±0,006 | -15,47±0,37                | 2,72±0,09     | 54,30±1,90    |
| NPHs                  | 184,97±4,45         | 0,236±0,012 | -18,30±0,10                | 3,06±0,08     | 61,20±1,70    |
| NPHs-F <sub>VD3</sub> | 230,10±4,14         | 0,232±0,011 | -19,20±0,20                | 3,22±0,49     | 64,40±9,70    |

Os testes de liberação *in vitro* mostram características de uma liberação prolongada das nanopartículas onde, nas primeiras 24 horas, foi observado uma liberação de 75, 62 e 57% do conteúdo das NPs, NPH e NPH-F, respectivamente, para o meio de liberação. Para o período subsequente de 5 dias, uma liberação mais lenta foi observada onde o total liberado para as NPs foi de 88%, para as NPH de 75% e para as NPH-F uma quantidade máxima de 68%. A Figura 5.8 mostra a quantidade acumulada de fluoresceína liberada para cada uma das situações. O comportamento de liberação obtido foi similar aos trabalhos apresentados por Zhao et al. (2012) onde o percentual total liberado para as NPs foi o maior seguido pelas NPH e NPH-F. Possivelmente, o motivo pelo qual isto ocorre é o fato de que, ao introduzir uma camada lipídica, ocorre um aumento da resistência da substância encapsulada de difundir para o meio de liberação e o mesmo acontece ao adicionar a molécula ligante na superfície das NPH-F.

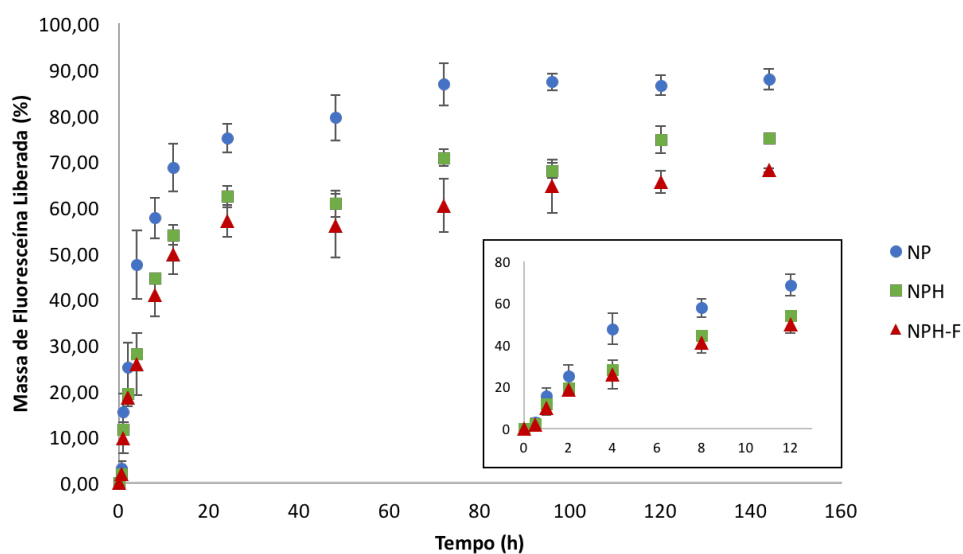


Figura 5.8. Liberação de fluoresceína em PBS (pH 7,4; 32.0°C) para as diferentes amostras.

### 5.5. Efeito das NPs, NPH e NPH-F Sobre a Viabilidade Celular

Com o objetivo de testar as nanopartículas aqui desenvolvidas para uma aplicação prática, o fármaco temozolomida foi encapsulado nas NPs, NPH e NPH-F e sua citotoxicidade foi avaliada. As propriedades obtidas para estes sistemas foram avaliadas e estão apresentadas na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Eficiência de encapsulação (EE) e Eficiência de incorporação da temozolomida (DL) para NPs, NPH e NPH-F.

|                       | <i>Tamanho (nm)</i> | <i>Pdl</i>  | <i>Potencial Zeta (mV)</i> | <i>DL (%)</i> | <i>EE (%)</i> |
|-----------------------|---------------------|-------------|----------------------------|---------------|---------------|
| PLGA NPs              | 187,6±3,6           | 0,214±0,015 | -18,20±0,20                | 0,07±0,010    | 1,4±0,20      |
| NPHs                  | 242,3±7,1           | 0,256±0,012 | -23,83±0,40                | 0,11±0,007    | 2,3±0,15      |
| NPHs-F <sub>VD3</sub> | 229,0±4,0           | 0,241±0,011 | -24,80±0,50                | 0,11±0,007    | 2,2±0,13      |

Os resultados mostram que a EE e a DL das nanopartículas com o fármaco temozolomida são baixas. De acordo com Zhang et al. (2010) e Zhang e Gao (2007) a incorporação de temozolomida em micropartículas de PLGA aumenta a citotoxicidade em células de gliomas C6 e a EE varia de 62-84%. Entretanto, são observados resultados contraditórios ao avaliar artigos que realizam a encapsulação de temozolomida em nanopartículas pelo mesmo método de preparação utilizado neste trabalho. No trabalho publicado por Jain et al. (2014) os autores sintetizaram nanopartículas de PLGA encapsulando o fármaco temozolomida e obtiveram ação citotóxica em células C6 de gliomas. As nanopartículas produzidas apresentaram tamanho entre 150-160 nm e potencial zeta de -20,5±0,069 mV. Em contrapartida, Lee e Ooi (2016) produziram nanopartículas de PLGA-PEG funcionalizadas com ácido fólico obtendo nanopartículas em que a EE e a DL são similares ao do trabalho aqui desenvolvido. Além disso, os autores concluem que os métodos de emulsão/evaporação do solvente e o método de nanoprecipitação não são ideais para a síntese de nanopartículas encapsulando temozolomida pelo motivo de que o fármaco difunde para a fase aquosa sendo perdido durante o processo de lavagem das mesmas. Acredita-se que este é o mesmo motivo pelo qual as NPS, NPH e NPH-VD sintetizadas neste trabalho apresentaram baixas EE e DL.

A fim de demonstrar o efeito das nanopartículas sobre a viabilidade celular, as diferentes formulações (NP, NPH e NPH-F), foram administradas como tratamento sobre a linhagem de melanoma B16 e o experimento de MTT foi realizado após 24h. Com base nos resultados apresentados na Figura 5.9, podemos observar que dentre todas as concentrações utilizadas, apenas a formulação NPH-F a 50  $\mu\text{g/mL}$ , apresentou efeito significativo aumentando a viabilidade celular, após 24 horas de tratamento. De forma não significativa, observamos que a concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ , para as formulações NPH e NPH-F, demonstrou reduzir a viabilidade celular, após o mesmo período de tratamento.

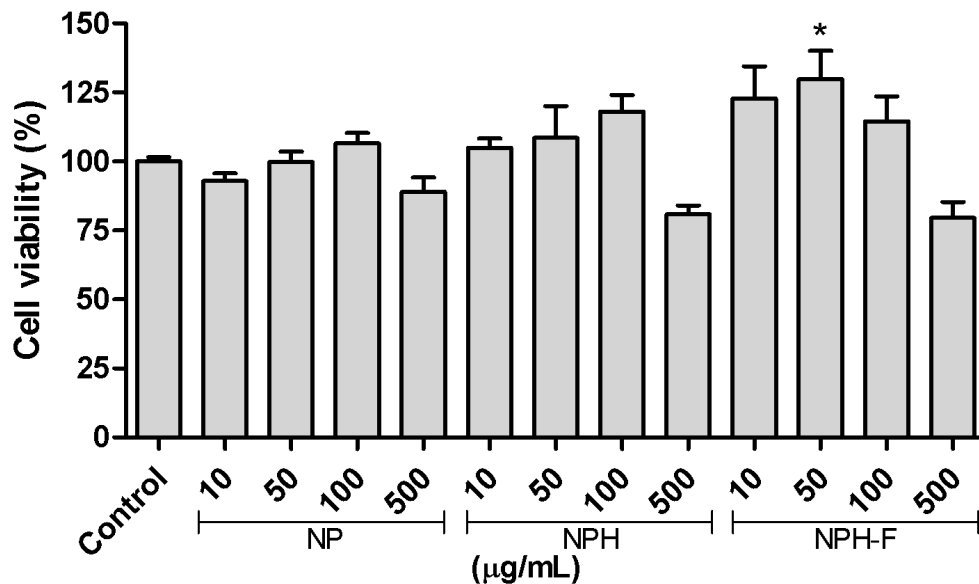


Figura 5.9. Avaliação da viabilidade celular das células B16 após o tratamento com as formulações NP, NPH e NPH-F. As células foram mantidas em condições ideais de cultivo por 24 horas sob tratamento. Após este período o protocolo de viabilidade celular foi realizado conforme descrito na metodologia. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão e o grau de significância é expresso pelo asterisco (\*) indicando um  $p < 0,05$ . Os resultados são expressos como percentual em relação ao controle não tratado. Os experimentos foram realizados três vezes em triplicata.

Adicionalmente, o tratamento das células de melanoma B16 com as diferentes formulações de nanopartículas (2  $\text{mg/mL}$ ) contendo TMZ 10  $\mu\text{M}$ , apresentaram significativa redução da viabilidade celular, tanto para as formulações “brancas”, quanto para aquelas contendo o quimioterápico (Figura 5.10). Entretanto, acredita-se que esta redução esteja atribuída a alta concentração de

nanocarreadores utilizados para atingir a dose de 10  $\mu\text{M}$  e não ao fármaco propriamente dito.

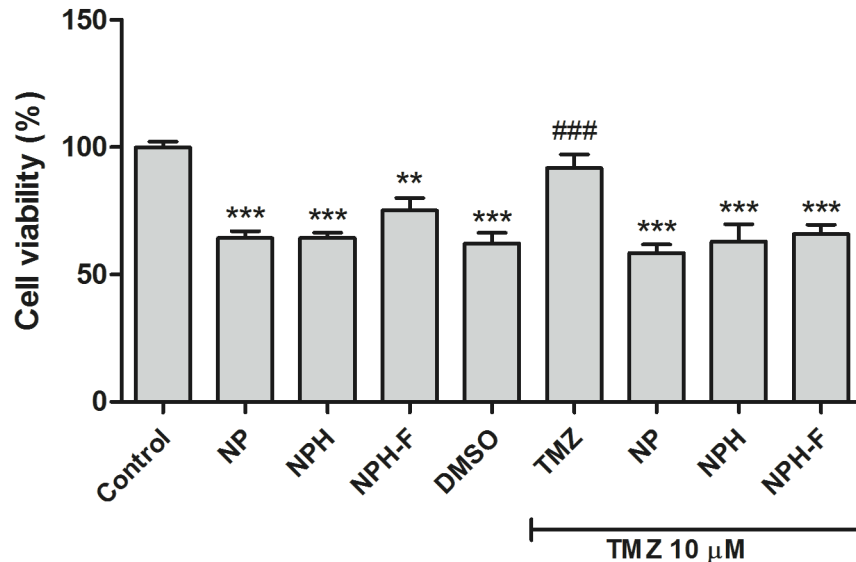


Figura 5.10. Avaliação da viabilidade celular das células B16 após o tratamento com as formulações NP, NPH e NPH-F na concentração de 2 mg/mL e também destas formulações contendo TMZ a 10  $\mu\text{M}$ . As células foram mantidas em condições ideais de cultivo por 24 horas sob tratamento. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão e o grau de significância é expresso como: (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$  indicando diferença significativa em relação ao controle e (###)  $p < 0,001$ , indicando diferença em relação ao controle do veículo, DMSO. Os experimentos foram realizados três vezes em triplicata.

## 5.6. Avaliação da Internalização Celular

Ao avaliar as culturas celulares após o tratamento com as diferentes formulações por microscopia de fluorescência (Figura 5.11), foi possível observar que já com 3 h de tratamento ocorre a internalização das mesmas. Mesmo de forma qualitativa, é possível distinguir que há uma diferença na distribuição celular das nanopartículas de acordo com sua formulação específica onde, as NP e as NPH aparecem localizadas mais próximas à membrana das células com menor distribuição citoplasmática. Já as NPH-F, apresentam uma localização citoplasmática e perinuclear.

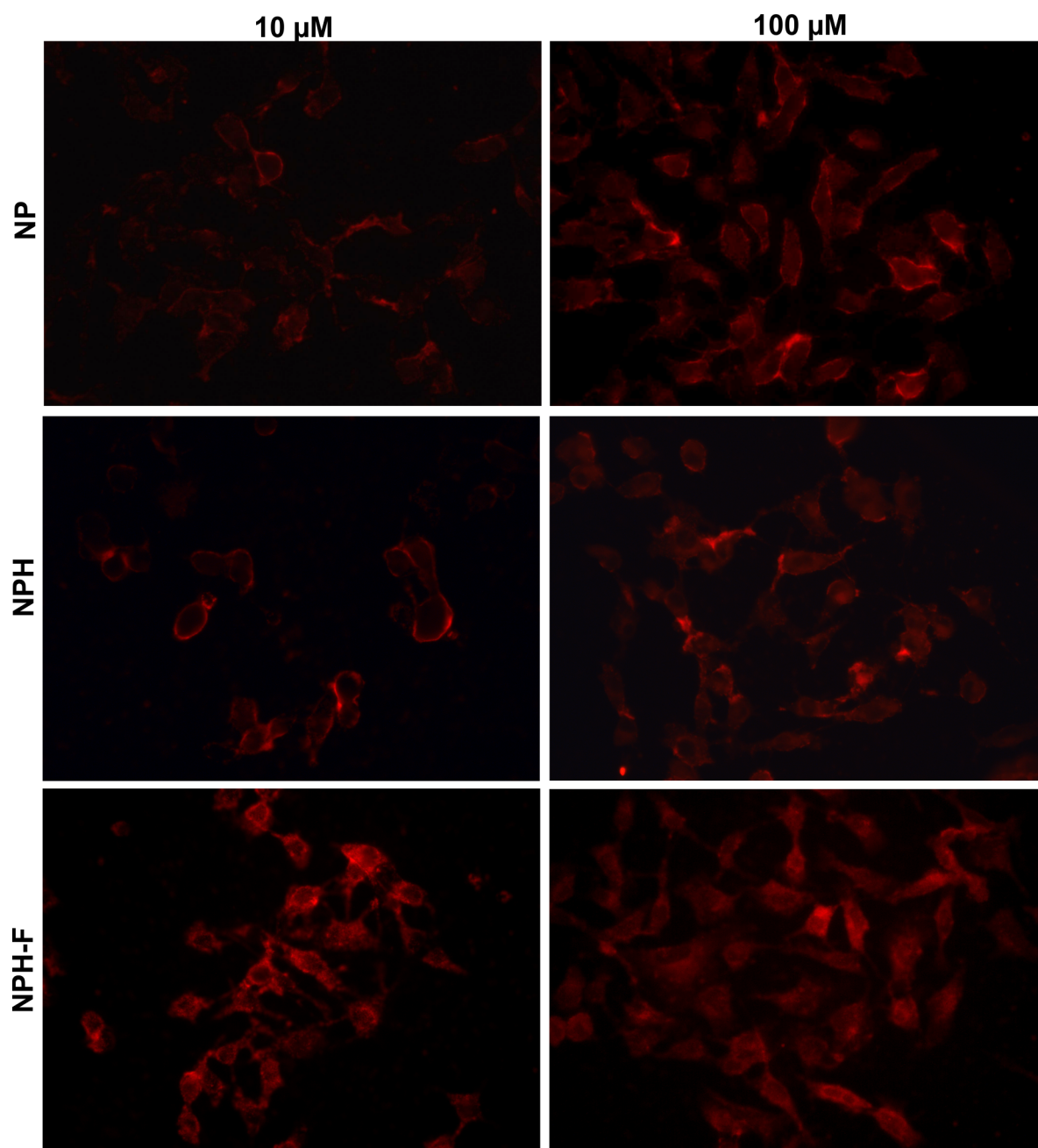


Figura 5.11. Avaliação da internalização das nanopartículas por microscopia de fluorescência. Após o tratamento com as diferentes formulações de nanopartículas (NP, NPH e NPH-F) nas concentrações de 10 e 100 µg/mL, as células foram mantidas em condições ideais de cultivo por 3h e então a intensidade de fluorescência foi avaliada com o auxílio de um microscópio invertido. As imagens foram obtidas a partir de uma objetiva com aumento de 40x.

Para facilitar a visualização da proximidade das NPH-F ao núcleo das células de melanoma B16, a Figura 5.12 apresenta os resultados para a microscopia de campo aberto, de fluorescência e a composição das duas imagens utilizando um aumento maior (400x). A partir desta imagem é possível confirmar o direcionamento

das nanopartículas para os receptores de vitamina D presentes no núcleo destas células.

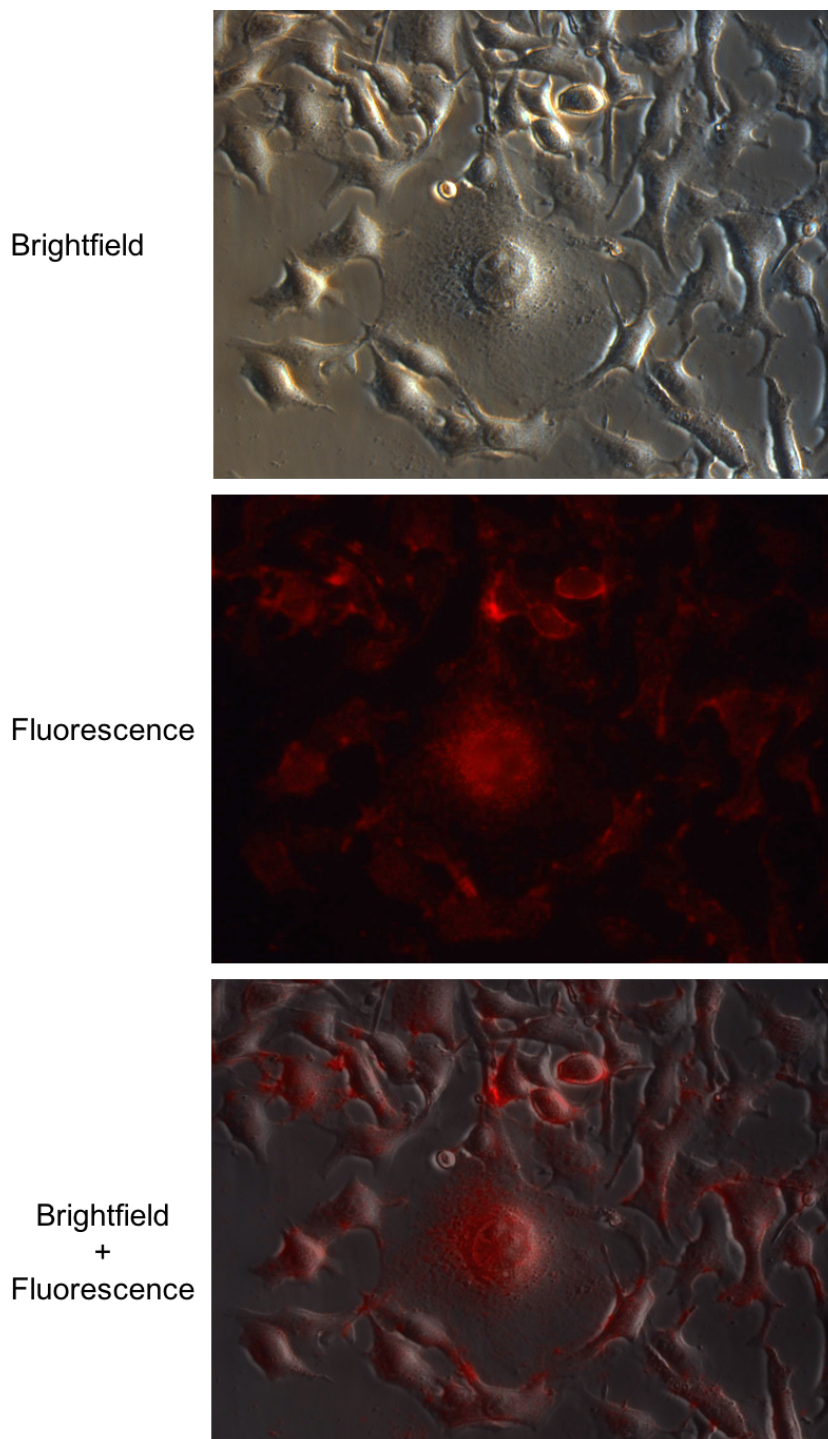


Figura 5.12. Avaliação da internalização das nanopartículas por microscopia de fluorescência. Após o tratamento com NPH-F na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , as células foram mantidas em condições ideais de cultivo por 3h e então a intensidade de fluorescência foi avaliada com o auxílio de um microscópio invertido. As imagens foram obtidas a partir de uma objetiva com aumento de 400x.

## 5.7. Modelagem matemática

### 5.7.1. Modelagem Matemática da Liberação de Ativos a Partir de Nanopartículas Poliméricas

Visando realizar a modelagem da liberação das NPs de diferentes características, desenvolvidas neste trabalho, o modelo de Baker-Lonsdale foi escolhido devido a sua grande aceitação no campo da modelagem matemática da liberação de compostos a partir de matrizes com característica esférica. Para a validação e comparação da solução analítica do modelo matemático, os dados experimentais da liberação de sulfametizol a partir de micropartículas (1590  $\mu\text{m}$ ) de PHB de Brophy e Deasy (1987) foram utilizados. As curvas utilizando a solução explícita do modelo de Baker-Lonsdale e o método de Newton-Raphson para a solução do modelo de Baker-Lonsdale estão apresentadas em conjunto na Figura 5.13.

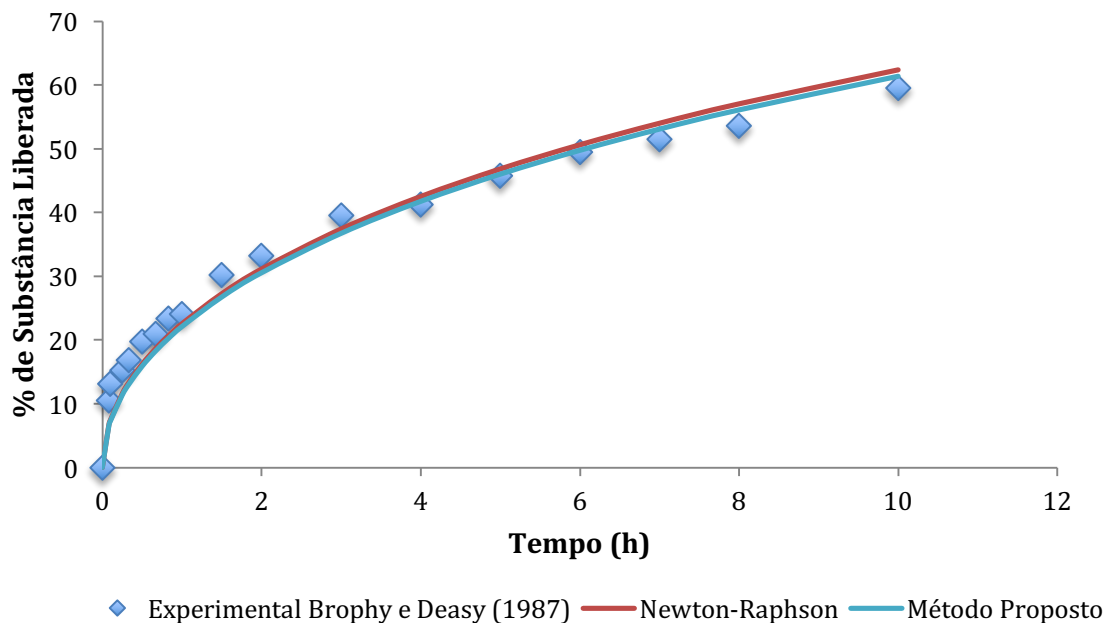


Figura 5.13. Perfil de liberação de sulfametizol a partir de micropartículas de PHB (dados experimentais de Brophy e Deasy (1987)) e comparação dos modelos aplicados.

Conforme Tabela 5.7, ao analisar os dados  $(M_{calc} - M_{exp})^2$  em conjunto com os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para cada uma das soluções, é possível

observar que o modelo proposto apresenta o comportamento da curva similar ao da solução utilizando o método de Newton-Raphson. Entretanto, o modelo aqui proposto é uma solução analítica explícita e não precisa das diversas iterações para obter uma solução desejada. Em conclusão, para uma aplicação geral da equação de Baker-Lonsdale, a solução analítica em forma explícita apresentada neste trabalho (Eq. 4.20) se mostra adequada e promissora para a geração de parâmetros de boa aplicabilidade.

Tabela 5.7. Valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para os métodos de solução utilizados para a equação de Baker-Lonsdale.

| <i>Newton-Raphson</i> | <i>Proposto</i> |
|-----------------------|-----------------|
| 0,992                 | 0,992           |

Os dados experimentais da liberação de fluoresceína das NPs, NPH e NPH-F foram submetidos ao tratamento matemático utilizando a solução analítica do modelo de Baker-Lonsdale e os parâmetros estimados para cada uma das nanopartículas. A Tabela 5.8 apresenta os valores destes parâmetros para cada um dos nanocarreadores analisados.

Tabela 5.8. Parâmetros obtidos a partir da modelagem dos dados experimentais utilizando a solução analítica da equação de Baker-Lonsdale.

|       | <i>B</i> | <i>R</i> <sup>2</sup> |
|-------|----------|-----------------------|
| NPs   | 0,00116  | 0,8827                |
| NPH   | 0,00063  | 0,8836                |
| NPH-F | 0,00046  | 0,8641                |

A Figura 5.14 apresenta o comportamento do modelo de Baker-Lonsdale frente aos dados experimentais da liberação.



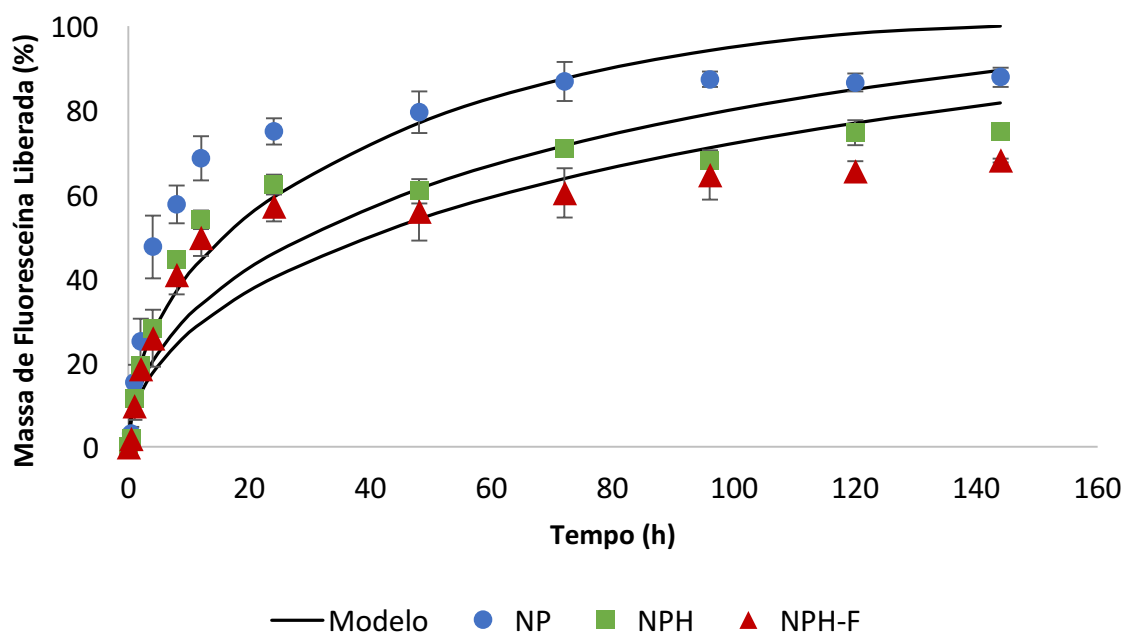


Figura 5.14. Aplicação do modelo analítico de Baker-Lonsdale para os dados experimentais da liberação de fluoresceína para o meio PBS (pH 7,4/ 32°C).

A partir destes resultados é possível afirmar que o modelo não se comportou de maneira ideal para os tipos de mecanismos aqui produzidos. Conforme citado na revisão bibliográfica, o modelo semi-empírico proposto por Peppas (1985) fornece informações indicativas sobre o tipo de fenômeno de transporte que está controlando a liberação da substância encapsulada para o meio. Portanto, para verificar o possível motivo da divergência entre os dados experimentais e os dados obtidos a partir da modelagem matemática utilizando o modelo de Baker-Lonsdale, o modelo de Peppas (1985) foi igualmente aplicado e seus parâmetros estimados. A Tabela 5.9 apresenta os valores para a constante  $k$ , que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo em análise e o expoente  $n$  que indica o tipo de fenômeno físico associado a liberação. A curva de liberação seguindo o modelo de Peppas é apresentada na Figura 5.15.

Tabela 5.9. Valor dos parâmetros obtidos a partir da modelagem dos dados experimentais utilizando equação de Peppas (1985).

|       | $k$    | $n$  | $R^2$  |
|-------|--------|------|--------|
| NPs   | 0,2884 | 0,25 | 0,8970 |
| NPH   | 0,2079 | 0,27 | 0,9163 |
| NPH-F | 0,1917 | 0,27 | 0,9118 |

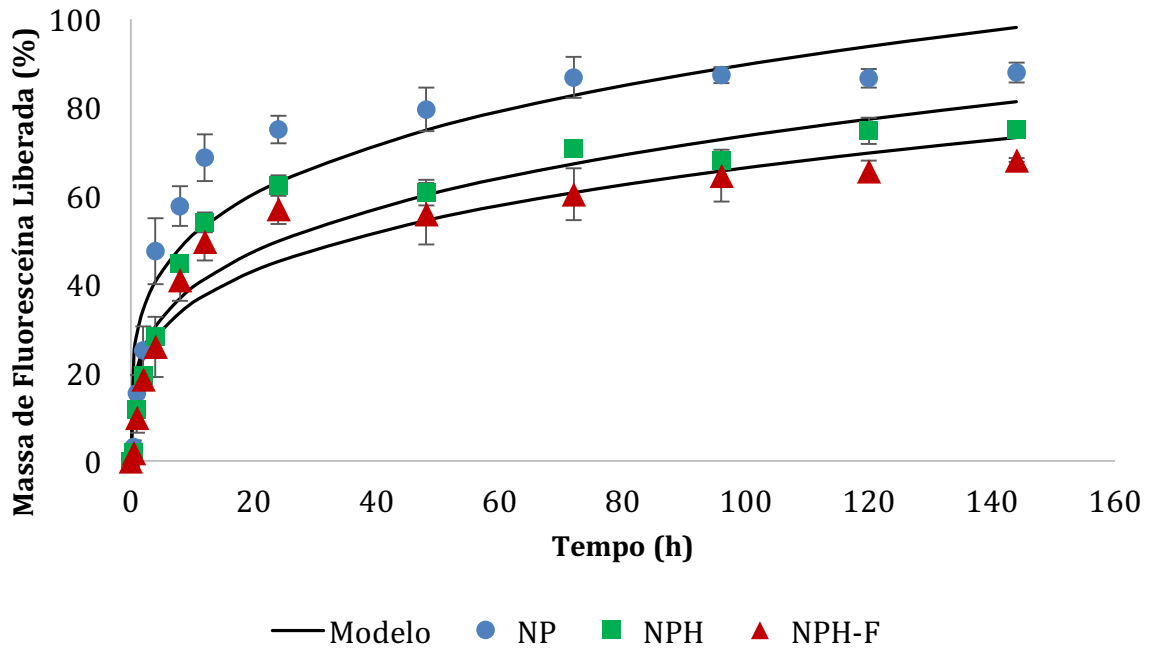


Figura 5.15. Aplicação do modelo analítico de Peppas (1985) para os dados experimentais da liberação de fluoresceína para o meio PBS (pH 7,4/ 32°C).

Segundo Peppas (1987), para a geometria esférica, o mecanismo de difusão é caracterizado pelo valor de  $n$  igual à 0,43 divergindo assim dos resultados apresentados na Tabela 5.9. Este comportamento é observado no trabalho apresentado por Venkatesh et al. (2015) onde os autores estudaram a liberação do antirretroviral nelfinavir a partir de nanopartículas de PLGA. Este transporte anômalo caracterizado pelos valores de  $n$  diferentes de 0,43 estão provavelmente associados a outros mecanismos de liberação como o intumescimento e a erosão da matriz polimérica. Além disso, o tamanho das partículas é inversamente proporcional à taxa de dissolução das substâncias encapsuladas nas mesmas e possivelmente, por estas razões, a liberação de fluoresceína das partículas produzidas neste trabalho ocorre por um mecanismo não-Fickiano (transporte anômalo) ou a difusão está ocorrendo simultaneamente em conjunto com outros mecanismos de liberação.

Como observado pela aplicação da solução analítica do modelo de Baker-Lonsdale e do modelo de Peppas, a difusão não é o único fenômeno de transporte ocorrendo na liberação de substâncias a partir destas partículas. Por isso, visando uma maior adequação do modelo matemático aos dados experimentais, propõe-se a utilização da mesma metodologia de solução aplicada para o modelo de Baker-

Lonsdale para o de Roseman e Higuchi (1970) (Eq. 3.26), ou seja, considerando uma resistência à transferência de massa na fase fluida ( $h_a$ ).

$$-a_0^3 + 3a_0a'^2 - 2a'^3 + \frac{2a_0^2D_e h_a}{D_a K} - \frac{2D_e a'^3 h_a}{D_a K a_0} = -\frac{6C_S D_e a_0}{C_0} t \quad (3.26)$$

Realizando a substituição de variáveis  $y = \frac{a'}{a_0}$  se obtém a equação cúbica apresentada a seguir:

$$1 - 3y^2 + 2y^3 + B_2 y^3 = B_2 + Bt \quad (5.1)$$

onde  $B_2 = \frac{2D_e h_a}{D_a K a_0}$ . Rearranjando a Eq. 5.1:

$$(2 + B_2) y^3 - 3y^2 + 1 - B_2 - Bt = 0 \quad (5.2)$$

A forma final do equacionamento considerando a resistência na fase fluida é descrita pela Eq. 5.3

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[ 2 \sqrt{\frac{1}{(2 + B_2)^2}} \cos \left( \frac{1}{3} \arccos \left( \frac{1}{2} \frac{BB_2^2 t + 4BB_2 t + B_2^3 + 4Bt + 3B_2^2 - 2}{\sqrt{\frac{1}{(2 + B_2)^2}} (2 + B_2)} \right) + \frac{4}{3} \pi \right) + \frac{1}{2 + B_2} \right]^3 \quad (5.3)$$

Com o objetivo de testar a aplicabilidade desta equação para os dados experimentais aqui obtidos, a Eq. 5.3 foi implementada no software MATLAB 2014a e os parâmetros  $B$  e  $B_2$  estimados. O comportamento da curva obtida pode ser observado pela Figura 5.16.

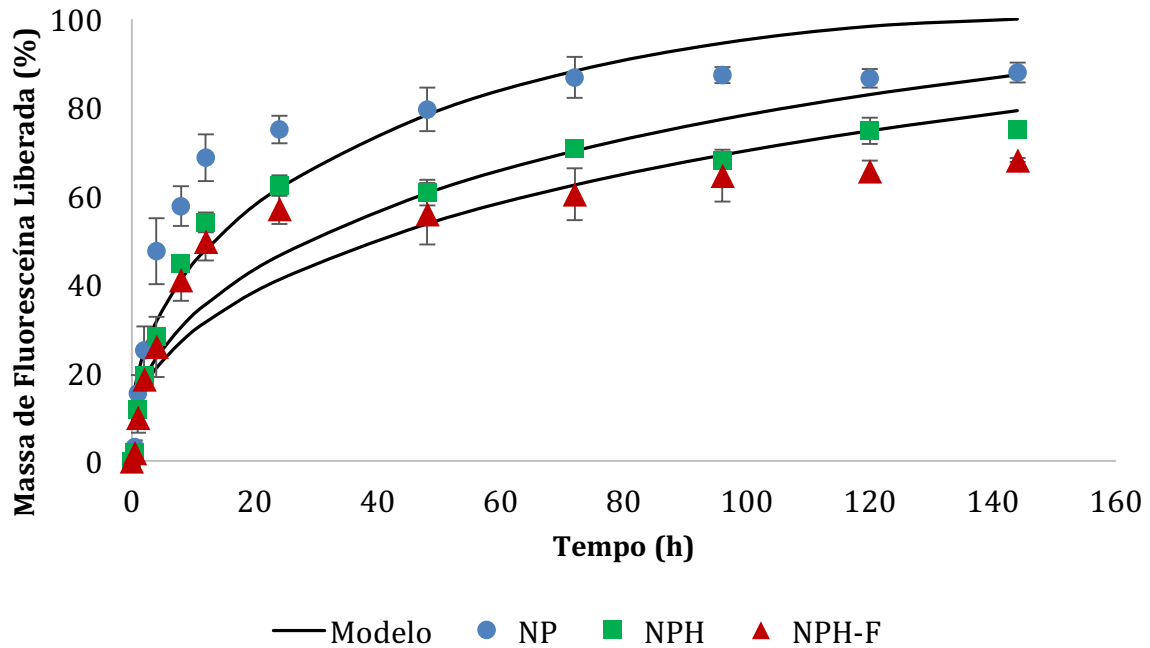


Figura 5.16. Aplicação do modelo analítico de Roseman e Higuchi para os dados experimentais da liberação de fluoresceína para o meio PBS (pH 7,4/ 32°C).

Analisando a Figura 5.16 em conjunto com os coeficientes de determinação apresentados na Tabela 5.10, é possível observar que, mesmo introduzindo o termo de resistência na fase fluida, o modelo de Roseman e Higuchi, igualmente ao modelo de Baker-Lonsdale, não representa adequadamente os dados experimentais de liberação aqui obtidos.

Tabela 5.10. Valor dos parâmetros obtidos a partir da modelagem dos dados experimentais utilizando a equação analítica de Roseman e Higuchi.

|       | $B$    | $B_2$  | $R^2$  |
|-------|--------|--------|--------|
| NPs   | 0,0067 | 0,0394 | 0,8709 |
| NPH   | 0,0033 | 0,0315 | 0,8676 |
| NPH-F | 0,0023 | 0,0337 | 0,8438 |

Visando ainda uma melhor explicação dos mecanismos de transporte associados à liberação de fármacos propõe-se a combinação dos modelos de Peppas e Roseman e Higuchi. A partir disto, a aproximação para os tempos menores da liberação é dada pelo modelo de Peppas que, na literatura, é sugerido para representar os 60% de massa liberada iniciais da curva buscando a explicação do fenômeno físico predominante envolvido na liberação. O modelo de Roseman e Higuchi é utilizado para os tempos maiores onde as substâncias localizadas na parte

mais interna das partículas difundem para o meio de liberação. A Figura 5.17 apresenta o comportamento da curva de liberação utilizando o modelo combinado Peppas-Roseman-Higuchi.

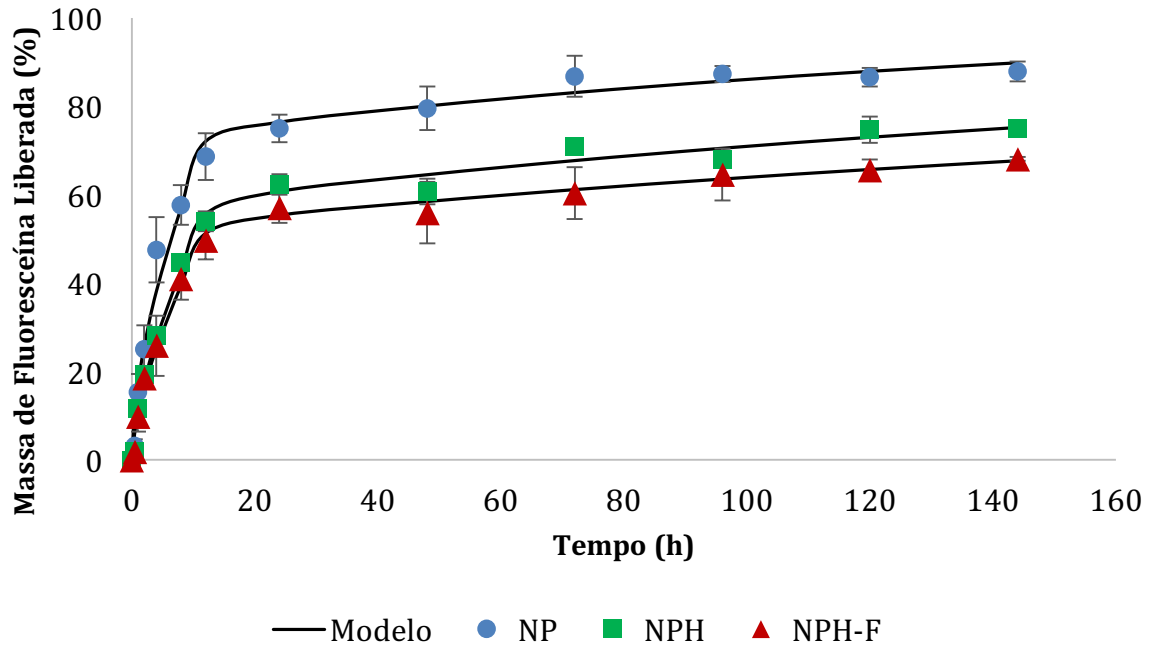


Figura 5.17. Aplicação do modelo analítico de Peppas-Roseman-Higuchi para os dados experimentais da liberação de fluoresceína para o meio PBS (pH 7,4/ 32°C).

Ao analisar a Figura 5.17 e os valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), apresentado na Tabela 5.11, é possível notar uma boa concordância com os dados experimentais. Além disso, o valor de  $n$  (Tabela 5.11) obtido para liberação das diferentes nanopartículas confirma que, o transporte que ocorre no início do processo é anômalo, provavelmente ocasionado por uma concentração maior de fármaco na superfície das nanopartículas.

Tabela 5.11. Valor dos parâmetros obtidos a partir da modelagem dos dados experimentais utilizando equação Peppas-Roseman-Higuchi.

|       | $k$    | $n$    | $B$    | $B_2$  | $R^2$  |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| NPs   | 0,1715 | 0,5780 | 0,0014 | 0,3825 | 0,9858 |
| NPH   | 0,1123 | 0,6441 | 0,0008 | 0,2587 | 0,9926 |
| NPH-F | 0,1030 | 0,6456 | 0,0005 | 0,2303 | 0,9945 |

Em conclusão, foi possível observar que os modelos matemáticos testados individualmente para o caso da liberação do fluoróforo fluoresceína das nanopartículas produzidas neste trabalho não foram adequados. Entretanto, ao utilizar uma combinação do modelo matemático de Peppas em conjunto com o modelo de Roseman e Higuchi foram obtidos parâmetros que servem de indicativo para descrever os mecanismos envolvidos na liberação da substância para o meio.

Além disso, a solução analítica explícita da equação de Baker-Lonsdale provoca um importante avanço na área da modelagem matemática da liberação de compostos, principalmente de sistemas controlados pela difusão. Embora o modelo não ter sido adequado para o caso específico dos nanocarreadores fabricados nesta tese, o modelo de Baker-Lonsdale é amplamente aplicado e, pelo fato de não ser necessário utilizar nenhum artifício matemático como linearização ou método numérico para a solução do modelo, a solução analítica explícita torna a equação consideravelmente mais simples e direta.

## 6. CONCLUSÕES

Visando obter a quantidade ótima de lipídios na superfície das nanopartículas, os métodos colorimétrico e análise por H-RMN foram utilizados e as partículas produzidas em diferentes proporções de lipídio: NPs de PLGA. A área total do recobrimento das nanopartículas foi analisada e a condição ótima obtida foi de 1:25 (m/m) razão mássica. Com esta proporção se obtiveram partículas de  $163,2 \pm 8,23$  nm, potencial zeta igual a  $-14,0 \pm 1,3$  mV e índice de polidispersão de  $0,183 \pm 0,01$ . Com estes resultados é garantido que as NPHs disponham de 97% de sua área superficial coberta pela camada de fosfolipídios aumentando, assim, seu efeito furtivo. A partir disto, o desenvolvimento de NPHs contendo diferentes fármacos encapsulados é facilitado de posse do conhecimento das condições ótimas aqui obtidas.

As nanopartículas produzidas neste trabalho foram funcionalizadas com duas moléculas. A primeira foi uma molécula de vitamina D3 conjugada ao fosfolipídio DSPE-PEG. Posteriormente, o peptídeo RGD foi sintetizado e conjugado ao grupamento maleimida presente no fosfolipídio DSPE-PEG-Mal. A síntese do peptídeo foi realizada pelo método Fastmoc e confirmada por MALDI-TOF. O produto final DSPE-PEG-RGD foi produzido por *click chemistry* pela ligação espontânea entre o grupamento tiol presente em uma cisteína do peptídeo e o grupamento maleimida localizado no final da cadeia do PEG. Assim como o peptídeo, a confirmação de síntese do DSPE-PEG-RGD foi obtida por MALDI-TOF. De posse do fosfolipídio associado ao peptídeo, nanopartículas híbridas vetorizadas foram produzidas e apresentaram características similares a trabalhos publicados na literatura (Yang et al., 2013) com uma pequena alteração na razão ótima de lipídios: NPs de PLGA a ser utilizada. Posteriormente, a partir de testes de internalização celular em células de melanoma B16 realizados com as NPH-F funcionalizadas com vitamina D e o marcador *Nile Red*, foi confirmado que as mesmas se concentram na

região perinuclear das células. A partir dos dados obtidos dos testes de citotoxicidade, conclui-se que as NPs, NPH e NPH-F apresentam citotoxicidade a partir da concentração de 500 µg/mL. Estes fatos confirmam que as NPH-F são boas candidatas para a aplicação em tratamentos mais específicos que visem o direcionamento de agentes terapêuticos encapsulados para células que contenham receptores nucleares de vitamina D.

Com o objetivo de testar a ação farmacológica dos nanocarreadores aqui desenvolvidos foi proposto encapsular o fármaco temozolomida, entretanto, os mesmos não apresentaram características ideais de EE e DL. Quando as NP, NPH e NPH-F foram testadas em células de melanoma, foi observado a inexistência de atividade citotóxica devida a baixa encapsulação do fármaco. Quando aplicados na dose de 10 µM de temozolomida a ação citotóxica foi observada, porém, se relaciona com a alta concentração de nanocarreadores (2 mg/mL) e não com o fármaco propriamente dito.

Os ensaios de liberação foram conduzidos com o objetivo de acessar o perfil de liberação dos mecanismos fabricados e, posteriormente, realizar a modelagem matemática dos mesmos visando à obtenção de parâmetros físico-químicos envolvidos na etapa de liberação. De posse destes parâmetros se torna possível a predição do comportamento destes mecanismos possibilitando a otimização do *design* dos mesmos. Ao conduzir os testes com o fluoróforo fluoresceína, foi observada uma liberação prolongada de em torno de 75%, 62% e 57% durante as primeiras 24 h para as NPs, NPH e NPH-F, respectivamente, seguidas de uma liberação mais lenta para o restante do ensaio de liberação. Estes resultados indicam que os carreadores aqui desenvolvidos podem ser utilizados como sistemas de entrega controlada para substâncias que contenham propriedades físico-químicas semelhantes às da fluoresceína.

A predição de propriedades físico-químicas dos mecanismos de entrega, bem como a simulação e obtenção de parâmetros associados à permeação de nanopartículas (NPs, NPHs e NPHs-F) na pele são de grande interesse tanto do ponto de vista de ação farmacológica quanto de toxicidade. Neste trabalho, foi apresentada uma solução analítica explícita do modelo apresentado por Baker-



Lonsdale e a mesma validada com dados experimentais apresentados previamente na literatura sem nenhum tipo de linearização. A partir disto, concluiu-se que o modelo gerado apresentou resultados similares a solução quando utilizado o método de Newton-Raphson se tornando um excelente candidato para aplicação simples e direta do mesmo. Para representar a liberação de substância a partir de carreadores que apresentam um *burst* inicial seguidos pelo transporte controlado pela difusão, um modelo combinado de Peppas-Roseman-Higuchi foi proposto e mostrou-se adequado para as nanopartículas aqui desenvolvidas. A partir deste modelo é possível obter mais informações referentes aos mecanismos de liberação que estão ocorrendo durante a liberação. Para o modelo de permeação, foi proposta uma modificação da condição de contorno do modelo proposto por Anissimov e Roberts (2009) onde a concentração de nanopartículas na superfície varia temporalmente. Para verificar a aplicabilidade da proposta aqui realizada, testes de permeação em pele serão conduzidas nas etapas próximas a este trabalho.

## 7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

As propostas de trabalhos futuros estão descritas abaixo:

- ensaios de permeação cutânea das NPs, NPHs e NPHs-F em célula de Franz utilizando pele suína;
- microscopia confocal das amostras de pele submetidas aos experimentos de permeação cutânea;
- aplicação da proposta de modelo matemático que leva em consideração os fenômenos envolvidos no processo de permeação cutânea utilizando como base imagens obtidas por microscopia confocal e dados de concentração nas diferentes camadas obtidas por *tape stripping* e análise via HPLC;
- encapsulação de um fármaco alternativo à temozolomida ou modificação do método de preparação das nanopartículas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANISSIMOV, Y. G.; Jepps, O. G.; Dancik, Y.; Roberts, M. S. Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 169-190, 2013.

ATHERTON, E.; Fox, H.; Harkiss, D.; Logan, C. J.; Sheppard, R. C.; Williams, B. J. A mild procedure for solid phase peptide synthesis: use of fluorenylmethoxycarbonylamino-acids. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 13, p. 537-539, 1978.

BAKER, R.W.; Lonsdale, H. K. Controlled release: mechanisms and release. **Controlled Release of Biologically Active Agents**. Tanquary, A.C. and Lacey, R.E., Plenum Press, New York, p. 15-71, 1974.

BATHE, R.S.; Kapoor, R. Transdermal Drug Delivery System: formulation, development and evaluation-An overview. **International Journal of Biomedical and Advance Research**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2015.

BLANCO, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 941-951, 2015.

BORGQUIST, P.; Körner, A.; Piculell, L.; Larsson, A.; Axelsson, A. A model for the drug release from a polymer matrix tablet—effects of swelling and dissolution. **Journal of controlled release**, v. 113, n. 3, p. 216-225, 2006.

BRAGA, M.E.; Costa, V.P.; Pereira, M.J.; Fiadeiro, P.T.; Gomes, A.P.A.; Duarte, C.M.; de Sousa, H.C. Effects of operational conditions on the supercritical solvent impregnation of acetazolamide in Balafilcon A commercial contact lenses. **International journal of pharmaceutics**, v. 420, n. 2, p. 231-243, 2011.

BREM, H.; Langer, R. Polymer-based drug delivery to the brain. **Science and Medicine**, v. 3, p. 52-61, 1996.

BROPHY, M.R.; Deasy, P.B. Application of the Higuchi model for drug release from dispersed matrices to particles of general shape. **International journal of pharmaceutics**, v. 37, n. 1, p. 41-47, 1987.

BUSHMAN, J.; Vaughan, A.; Sheihet, L.; Zhang, Z.; Costache, M.; Kohn, J. Functionalized nanospheres for targeted delivery of paclitaxel. **Journal of Controlled Release**, v. 171, n. 3, p. 315-321, 2013.

CEVC, G.; Vierl, U. Nanotechnology and the transdermal route: a state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 3, p. 277-299, 2010.

CHANDRASEKARAN, S. K.; Bayne, W.; Shaw, J.E. Pharmacokinetics of drug permeation through human skin. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 67, n. 10, p. 1370-1374, 1978.

CHEN, C.W.; Lu, D.W.; Yeh, M.K.; Shiau, C.Y.; Chiang, C.H. Novel RGD-lipid conjugate-modified liposomes for enhancing siRNA delivery in human retinal pigment epithelial cells. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 2567-80, 2011.

CHEN, C.; Kim, T.H.; Wu, W.; Huang, C.; Wei, H.; Mount, C.W. Tian, Y.; Jang, S.; Pun, S. H.; Jen, A. K. pH-dependent, thermosensitive polymeric nanocarriers for drug delivery to solid tumors. **Biomaterials**, v. 34, n. 18, p. 4501-4509, 2013.

CHEN, Y.; Zhou, S.; Li, Q. Mathematical modeling of degradation for bulk-erosive polymers: applications in tissue engineering scaffolds and drug delivery systems. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 3, p. 1140-1149, 2011.

CICHOREK, M.; Wachulska, M.; Stasiewicz, A.; Tymińska, A. Skin melanocytes: biology and development. **Postepy dermatologii i alergologii**, v. 30, n. 1, p. 30, 2013.

CONTRI, R.; Fiel, L. A.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Beck, R. C. Transport of substances and nanoparticles across the skin and in vitro models to evaluate skin permeation and/or penetration. In: **Nanocosmetics and Nanomedicines**. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 3-35.

COOKE, R.L. **Classical algebra: its nature, origins, and uses**. John Wiley & Sons, 2008.

COUTO, A.; Couto, A.; Fernandes, R.; Cordeiro, M.N.S.; Reis, S.S.; Ribeiro, R.T.; Pessoa, A.M. Dermic diffusion and stratum corneum: A state of the art review of mathematical models. **Journal of Controlled Release**, v. 177, p. 74–83, 2014.

CRANK, John. **The Mathematics of Diffusion: 2d Ed**. Clarendon Press, 1975.

CRUCHO, C.I.; Barros, M.T. Formulation of functionalized PLGA polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. **Polymer**, v. 68, p. 41-46, 2015.

DE MONTE, F.; Pontrelli, G.; Becker, S. M. **Transdermal Drug Delivery and Percutaneous Absorption**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015.

DESAI, P.R.; Marepally, S.; Patel, A. R.; Voshavar, C.; Chaudhuri, A.; Singh, M. Topical delivery of anti-TNF $\alpha$  siRNA and capsaicin via novel lipid-polymer hybrid nanoparticles efficiently inhibits skin inflammation in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 1, p. 51-63, 2013.

DESHAYES, S.; Maurizot, V.; Clochard, M.; Baudin, C.; Berthelot, T.; Esnouf, S.; Lairez, D.; Moenner, M.; Déléris, G. "Click" conjugation of peptide on the surface of polymeric nanoparticles for targeting tumor angiogenesis. **Pharmaceutical research**, v. 28, n. 7, p. 1631-1642, 2011.

DIANZANI, C.; Zara, G.P.; Maina, G.; Pettazzoni, P.; Pizzimenti, S.; Rossi, F.; Gigliotti, C.L.; Ciamporcerro, E.S.; Daga, M.; Barrera, G. Drug delivery nanoparticles in skin cancers. **BioMed research international**, 2014.

DINARVAND, R. et al. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. **International Journal of Nanomedicine**, p. 877, 2011.

ENGELKE, L.; Winter, G.; Hook, S.; Engert, J. Recent insights into cutaneous immunization: How to vaccinate via the skin. **Vaccine**, v. 33, n. 37, p. 4663-4674, 2015.

FONTE, P.; Soares, S.; Costa, A.; Andrade, J. C.; Seabra, V.; Reis, S.; Sarmiento, B. Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying. **Biomatter**, v. 2, n. 4, p. 329-339, 2012.

FRASCH, H.F. A random walk model of skin permeation. **Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis**, v. 22, n. 2, p. 265-76, 2002.

FRASCH, H.F.; Barbero, A.M. Application of numerical methods for diffusion-based modeling of skin permeation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 208-220, 2013.

GEHRING, M.P.; Pereira, T.C.B.; Zanin, R.F. P2X7 receptor activation leads to increased cell death in a radiosensitive human glioma cell line. **Purinergic signalling**, v. 8, n. 4, p. 729-739, 2012.

GILABERTE, Y.; Prieto-Torres, L.; Pastushenko, I; Juarranz, A. Anatomy and Function of the Skin. **Nanoscience in Dermatology**, 2016.

GONZÁLEZ-CHOMÓN, C.; Braga, M.E.; de Sousa, H.C.; Concheiro, A.; Alvarez-Lorenzo, C. Antifouling foldable acrylic IOLs loaded with norfloxacin by aqueous soaking and by supercritical carbon dioxide technology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 2, p. 383-391, 2012.

GRIFFIN, D.R.; Kasko, A.M. Photoselective delivery of model therapeutics from hydrogels. **ACS macro letters**, v. 1, n. 11, p. 1330-1334, 2012.

HARA, K.; Tsujimoto, H.; Huang, C.C.; Kawashima, Y.; Ando, R.; Kusuoka, O.; Tamura, K.; Tsutsumi, M. Ultrastructural and Immunohistochemical Studies on Uptake and Distribution of FITC-Conjugated PLGA Nanoparticles Administered Intratracheally in Rats. **Journal of toxicologic pathology**, v. 25, n. 1, p. 19-26, 2012.

HERMANSON, G.T. **Bioconjugate techniques**. Academic press, 2013.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 50, n. 10, p. 874-875, 1961.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963.

HOFFMAN, A.S. The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 3, p. 153-163, 2008.

HORVATH, C.; Lipsky, S.R. Column design in high pressure liquid chromatography. 1969.

HOSOI, J.; Abe, E.; Suda, T.; Kuroki, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by  $1\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. **Cancer Research**, v. 45, n. 4, p. 1474-1478, 1985.

JAIN, D.S.; Jain, D.S.; Athawale, R.B.; Bajaj, A.N.; Shrikhande, S.S.; Goel, P.N.; Nikam, Y.; Gude, R.P. Unraveling the cytotoxic potential of Temozolomide loaded into PLGA nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 1, p. 18, 2014.

JEPPS, O.G.; Dancik, Y.; Anissimov, Y.G.; Roberts, M.S. Modeling the human skin barrier - Towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 152–168, 2013.

JIN, H.; Li, S.; Hu, D.; Zhao, Y. Preparation of PLA-PEG nanoparticles by the solution enhanced dispersion with enhanced mass transfer using ultrasound in supercritical CO<sub>2</sub>. **Powder technology**, v. 227, p. 17-23, 2012.

KALE, S.P.; GARG, S. Prediction of the mutual diffusion coefficient for controlled drug delivery devices. **Computers & Chemical Engineering**, v. 39, p. 186-198, 2012.

KAUNISTO, E.; Abrahmsen-Alami, S.; Borgquist, P.; Larsson, A.; Nilsson, B.; Axelsson, A. A mechanistic modelling approach to polymer dissolution using magnetic resonance microimaging. **Journal of controlled release**, v. 147, n. 2, p. 232-241, 2010.

KIMBER, J.A.; Kazarian, S.G.; Štěpánek, F. DEM simulation of drug release from structurally heterogeneous swelling tablets. **Powder technology**, v. 248, p. 68-76, 2013.

KIMBER, J.A.; Kazarian, S.G.; Štěpánek, F. Modelling of pharmaceutical tablet swelling and dissolution using discrete element method. **Chemical engineering science**, v. 69, n. 1, p. 394-403, 2012.



KOLONICS, A.; Csicsovszki, Z.; Lorincz, O.; Toke, E.; Stoitzner, P.; Romani, N.; Malissen, B.; Lisziewicz, J.; Szipocs, R. Characterization of nanoparticle uptake by epidermal Langerhans cells in eGFP-langerin knock-in mice by multiphoton laser scanning microscopy in vivo. In: **Optical Molecular Probes, Imaging and Drug Delivery**. Optical Society of America, 2013. p. MTh1C. 4.

KRENZLIN, S.; Krenzlin, S.; Vincent, C.; Munzke, L.; Gnansia, D.; Siepmann, J.; Siepmann, F. Predictability of drug release from cochlear implants. **Journal of controlled release**, v. 159, n. 1, p. 60-68, 2012.

LAMBERTI, G.; Galdi, I.; Barba, A.A. Controlled release from hydrogel-based solid matrices. A model accounting for water up-take, swelling and erosion. **International journal of pharmaceutics**, v. 407, n. 1, p. 78-86, 2011.

LANGER, R.; Peppas, N. Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: a review. **Journal of Macromolecular Science-Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 23, n. 1, p. 61-126, 1983.

LEE, C.Y.; Ooi, I.H. Preparation of Temozolomide-Loaded Nanoparticles for Glioblastoma Multiforme Targeting—Ideal Versus Reality. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 3, p. 54, 2016.

LESOIN, L.; Crampon, C.; Boutin, O.; Badens, E. Preparation of liposomes using the supercritical anti-solvent (SAS) process and comparison with a conventional method. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 57, n. 2, p. 162-174, 2011.

LI, J.; Zhang, Y.; Tao, J. Targeted Nanoparticles for Drug Delivery to Melanoma: From Bench to Bedside. **Nanoscience in Dermatology**, p. 203, 2016.

LIANG, X.F.; Wang, H.J.; Luo, H.; Tian, H.; Zhang, B.B.; Hao, L.J.; Teng, J.I.; Chang, J. Characterization of novel multifunctional cationic polymeric liposomes formed from octadecyl quaternized carboxymethyl chitosan/cholesterol and drug encapsulation. **Langmuir**, v. 24, n. 14, p. 7147–7153, 2008.

LIU, M.; Chen, L.; Zhao, Y.; Gan, L.; Zhu, D.; Xiong, W.; Lv, Y.; Xu, Z.; Hao, Z.; Chen, L. Preparation, characterization and properties of liposome-loaded polycaprolactone microspheres as a drug delivery system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 395, p. 131-136, 2012.

LOHANI, A.; Verma, A.; Joshi, H.; Yadav, N.; Karki, N. Nanotechnology-based cosmeceuticals. **ISRN dermatology**, v. 2014, p. 843687, 2014.

MACOCINSCHI, D.; Filip, D.; Vlad, S.; Oprea, A.M.; Gafitanu, C.A. Characterization of a poly (ether urethane)-based controlled release membrane system for delivery of ketoprofen. **Applied Surface Science**, v. 259, p. 416-423, 2012.

MAKADIA, H.K.; Siegel, S.J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1377-1397, 2011.

MANDAL, B.; Bhattacharjee, H.; Mittal, N.; Sah, H.; Balabathula, P.; Thoma, L.A.; Wood, G.C. Core–shell-type lipid–polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, n. 4, p. 474-491, 2013.

MASON, R.S.; Pryke, A. M.; Ranson, M.; Thomas, H. E.; Posen, S. Human melanoma cells: functional modulation by calciotropic hormones. **Journal of investigative dermatology**, v. 90, n. 6, p. 834-840, 1988.

MCCALL, R.L.; Sirianni, R.W. PLGA nanoparticles formed by single-or ZHANGdouble-emulsion with vitamin E-TPGS. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 82, p. e51015-e51015, 2013.

MERRIFIELD, R.B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.

MIKHAILOV, M.K.; Ozisik, M.N. Unified analysis and solutions of heat and mass diffusion. 1984.

MITRAGOTRI, S.; Anissimov, Y.G.; Bunge, A.L.; Frasch, H.F.; Guy, R.H.; Hadgraft, J.; Kasting, G.B.; Lane, M.E.; Roberts, M.S. Mathematical models of skin permeability: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 115–129, 2011.

MOURA, M.J.; Gil, M.H.; Figueiredo, M.M. Delivery of cisplatin from thermosensitive co-cross-linked chitosan hydrogels. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 9, p. 2504-2510, 2013.

MUKERJEE, A.; Vishwanatha, J.K. Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy. **Anticancer research**, v. 29, n. 10, p. 3867-3875, 2009.

NAEGEL, A.; Heisig, M.; Wittum, G. Detailed modeling of skin penetration-An overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 191–207, 2013.

NAIR, L.S.; Laurencin, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in polymer science**, v. 32, n. 8, p. 762-798, 2007.

NAUMAN, E.B.; Patel, K.; Karande, P. On the design and optimization of diffusion-controlled, planar delivery devices. **Chemical Engineering Science**, v. 65, n. 2, p. 923-930, 2010.

NOGI, K.; Naito, M.; Yokoyama, T. **Nanoparticle technology handbook**. Elsevier, 2012.

PAPAKOSTAS, D.; Rancan, F.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Nanoparticles in dermatology. **Archives of dermatological research**, v. 303, n. 8, p. 533-550, 2011.

PASTORINO, F.; Brignole, C.; Marimpietri, D.; Cilli, M.; Gambini, C.; Ribatti, D.; Longhi, R.; Allen, T.M.; Corti, A.; Ponzoni, M. Vascular Damage and Anti-angiogenic Effects of Tumor Vessel-Targeted. **Cancer research**, v. 63, n. 21, p. 7400-7409, 2003.

PATEL, T.; Zhou, J.; Piepmeier, J. M.; Saltzman, W.M. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, n. 7, p. 701-705, 2012.

PEPPAS, N.A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 60, n. 4, p. 110, 1985.

PEPPAS, N.A.; Narasimhan, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 75-81, 2014.

PETTIJOHN, E.; Martone, B.; Rademaker, A.; Kuzel, T. A Phase I Study of High-Dose Calcitriol in Combination with Temozolomide for Patients with Metastatic Melanoma. **Journal of personalized medicine**, v. 4, n. 4, p. 448-458, 2014.

POLETTO, F.S.; Jäger, E.; Ré, M.I.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R. Rate-modulating PHBV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, n. 1-2, p. 70-80, 2007.

POWELL, J. Skin physiology. **Surgery (Oxford)**, v. 24, n. 1, p. 1-4, 2006.

PRAUSNITZ, M.R.; Langer, R. Transdermal drug delivery. **Handb Exp Pharmacol**, v. 26, n. 197, p. 399–410, 2010.

RANCAN, F. Interaction of Nanoparticles with Skin: Accumulation on Skin Surface and Drug Delivery or Translocation and. p. 15–16, 2012.

RANCAN, F.; Gao, Q.; Graf, C.; Troppens, S.; Hadam, S.; Hackbarth, S.; Kembuan, C.; Blume-Peytavi, U.; Rühl, E.; Lademann, J.; Vogt, A. Skin penetration and cellular uptake of amorphous silica nanoparticles with variable size, surface functionalization, and colloidal stability. **ACS nano**, v. 6, n. 8, p. 6829-6842, 2012.

RANCAN, F.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, v. 7, p. 23-34, 2014.

ROBERTS, M.S.; Cross, S.E.; Pellett, M.A. Skin transport. **Drugs and the pharmaceutical sciences**, v. 119, p. 89-196, 2002.

ROSEMAN, T.J.; Higuchi, W.I. Release of medroxyprogesterone acetate from a silicone polymer. **J Pharm Sci**, v. 59, n. 3, p. 353-7, 1970.

ROSENKRANZ, A.A.; Slastnikova, T. A.; Durymanov, M.O.; Sobolev, A.S. Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 11, p. 1228-1237, 2013.

SACKETT, C.K.; Narasimhan, B. Mathematical modeling of polymer erosion: consequences for drug delivery. **International journal of pharmaceuticals**, v. 418, n. 1, p. 104-114, 2011.

SCHMIDT, N.W.; Deshayes, S.; Hawker, S.; Blacker, A.; Kasko, A. M.; Wong, G.C. Engineering persister-specific antibiotics with synergistic antimicrobial functions. **ACS nano**, v. 8, n. 9, p. 8786-8793, 2014.

SCHNEIDER, M.; Stracke, F.; Hansen, S.; Schaefer, U.F. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. **Dermato-endocrinology**, v. 1, n. 4, p. 197–206, 2009.

SHAHRIARI, M.; Kerr, P.E.; Slade, K.; Grant-Kels, J.E. Vitamin D and the skin. **Clinics in dermatology**, v. 28, n. 6, p. 663-668, 2010.

SIEPMANN, J.; Karrout, Y.; Gehrke, M.; Penz, F. K.; Siepman, F. Predicting drug release from HPMC/lactose tablets. **International journal of pharmaceutics**, v. 441, n. 1, p. 826-834, 2013.

SIEPMANN, J.; Siepman, F. Mathematical modeling of drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 364, n. 2, p. 328-343, 2008.

SOUTO, E.B.; Severino, P.; Santana, M.H.A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados—Parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

STAWIKOWSKI, M.; Fields, G.B. Introduction to peptide synthesis. **Current protocols in protein science**, p. 18.1. 1-18.1. 13, 2012.

STEWART, J.C.M. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. **Analytical Biochemistry**, v. 104, n. 1, p. 10–14, 1980.

TODO, H.; Oshizaka, T.; Kadhum, W.R.; Sugibayashi, K. Mathematical model to predict skin concentration after topical application of drugs. **Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 634–651, 2013.

TOMODA, K.; Watanabe, A.; Suzuki, K.; Inagi, T.; Terada, H.; Makino, K. Enhanced transdermal permeability of estradiol using combination of PLGA nanoparticles system and iontophoresis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 97, p. 84–89, 2012.

TRAN, T.T. Cutaneous drug delivery: an update. In: **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. Nature Publishing Group, 2013. p. S67-S69.

UONG, A.; Zon, L.I. Melanocytes in development and cancer. **Journal of cellular physiology**, v. 222, n. 1, p. 38-41, 2010.

VENKATESH, D.N; Baskaran, M.; Karri, V.V.S.R.; Mannemala, S.S.; Radhakrishna, K.; Goti, S. Fabrication and in vivo evaluation of Nelfinavir loaded PLGA nanoparticles for enhancing oral bioavailability and therapeutic effect. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 6, p. 667-674, 2015.

VENUS, M.; Waterman, J.; McNab, I. Basic physiology of the skin. **Surgery (Oxford)**, v. 29, n. 10, p. 471-474, 2011.

VERDERIO, P.; Bonetti, P.; Colombo, M.; Pandolfi, L.; Prosperi, D. Intracellular drug release from curcumin-loaded PLGA nanoparticles induces G2 / M block in breast cancer cells. **Breast**, 2013.

VERLANDER, M. Industrial applications of solid-phase peptide synthesis—a status report. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 13, n. 1-2, p. 75-82, 2007.

VERSYPT, A.N.F.; Pack, D.W.; Braatz, R.D. Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres—a review. **Journal of Controlled Release**, v. 165, n. 1, p. 29-37, 2013.

VIGNEAUD, V.D.; Ressler, C.; Swan, C.J.M.; Roberts, C.W.; Katsoyannis, P.G.; Gordon, S. The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 75, n. 19, p. 4879-4880, 1953.

WANG, H.; Wang, S.; Liao, Z.; Zhao, P.; Su, W.; Niu, R.; Chang, J. Folate-targeting magnetic core-shell nanocarriers for selective drug release and imaging. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1-2, p. 342–349, 2012.

WANG, H.; Zhao, P.; Su, W.; Wang, S.; Liao, Z.; Niu, R.; Chang, J. PLGA/polymeric liposome for targeted drug and gene co-delivery. **Biomaterials**, v. 31, n. 33, p. 8741-8748, 2010.

WANG, Z.Q.; Liu, K.; Huo, Z.; Li, X.; Wang, M.; Liu, P.; Pang, B; Wang, S. A cell-targeted chemotherapeutic nanomedicine strategy for oral squamous cell carcinoma therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, n. 1, p. 63, 2015.

WATKINSON, A. C.; Kearney, M.C.; Quinn, H.L.; Courtenay, A.J.; Donnelly, R.F. Future of the transdermal drug delivery market–have we barely touched the surface?. **Expert opinion on drug delivery**, v.1 13, n. 4, p.523-532, 2016.

WOLINSKY, J.B.; Colson, Y.L.; Grinstaff, M.W. Local drug delivery strategies for cancer treatment: gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. **Journal of controlled release**, v. 159, n. 1, p. 14-26, 2012.

YAMAGUCHI, Y.; Hearing, V.J. Melanocytes and their diseases. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 5, p. a017046, 2014.

YANG, Y.; Pan, D.; Luo, K.; Li, L.; Gu, Z. Biodegradable and amphiphilic block copolymer–doxorubicin conjugate as polymeric nanoscale drug delivery vehicle for breast cancer therapy. **Biomaterials**, v. 34, n. 33, p. 8430-8443, 2013.

YANG, Z.; Luo, X.; Zhang, X.; Liu, J.; Jiang, Q. Targeted delivery of 10-hydroxycamptothecin to human breast cancers by cyclic RGD-modified lipid-polymer hybrid nanoparticles. **Biomedical materials (Bristol, England)**, v. 8, n. 2, p. 025012, 2013.



ZHANG, C.Y.; Yang, Y.Q.; Huang, T.X.; Zhao, B.; Guo, X.D.; Wang, J.F.; Zhang, L.J. Self-assembled pH-responsive MPEG-b-(PLA-co-PAE) block copolymer micelles for anticancer drug delivery. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 6273-6283, 2012.

ZHANG, H.; Gao, S. Temozolomide/PLGA microparticles and antitumor activity against glioma C6 cancer cells in vitro. **International journal of pharmaceutics**, v. 329, n. 1, p. 122-128, 2007.

ZHANG, L.; Pornpattananankul, D.; Hu, C.M.; Huang, C.M. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 6, p. 585–594, 2010a.

ZHANG, L.; Chan, J.M.; Gu, F.X.; Rhee, J.; Wang, A.Z.; Radovic-Moreno, A. F.; Alexis, F.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. Self-assembled lipid– polymer hybrid nanoparticles: a robust drug delivery platform. **ACS nano**, v. 2, n. 8, p. 1696-1702, 2008.

ZHANG, Y.F.; Wang, J.C.; Bian, D.Y.; Zhang, X.; Zhang, Q. Targeted delivery of RGD-modified liposomes encapsulating both combretastatin A-4 and doxorubicin for tumor therapy: in vitro and in vivo studies. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 74, n. 3, p. 467-473, 2010b.

ZHANG, Z.; Tsai, P.C.; Ramezanli, T.; Michniak-Kohn, B.B. Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 5, n. 3, p. 205-218, 2013.

ZHAO, P.; Wang, H.; Yu, M.; Liao, Z.; Wang, X.; Zhang, F.; Ji, W.; Wu, B.; Han, J.; Zhang, H.; Wang, H.; Chang, J.; Niu, R. Paclitaxel loaded folic acid targeted nanoparticles of mixed lipid-shell and polymer-core: in vitro and in vivo evaluation. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 81, n. 2, p. 248-256, 2012.

ZULEGER, S.; Lippold, B.C. Polymer particle erosion controlling drug release. I. Factors influencing drug release and characterization of the release mechanism. **International journal of pharmaceutics**, v. 217, n. 1, p. 139-152, 2001.