

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COMO**  
**CARREADORAS DE ETOPOSIDE**

**THIAGO FRANCES GUIMARÃES**  
Farmacêutico Bioquímico Industrial

ARARAQUARA – SP  
2005

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COMO  
CARREADORAS DE ETOPOSIDE**

**THIAGO FRANCES GUIMARÃES**  
Farmacêutico Bioquímico Industrial

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ARARAQUARA – SP

2005

## **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

G963n      Guimarães, Thiago Frances  
              Nanopartículas de quitosana como carreadoras de etoposide. / Thiago  
Frances Guimarães. – Araraquara, 2005.  
              101 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de  
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Raul Cesar Evangelista

1.Nanopartículas. 2.Quitosana. 3.Etoposide. 4.Tecnologia farmacêutica.  
I.Evangelista, Raul Cesar, orient. III. Título.

**CDD: 615.4**

**CAPES:40300005**

*“Mamma told me when I was young  
Come sit beside me, my only son  
And listen closely to what I say.  
And if you do this  
It will help you some sunny day.  
Take your time... Don't live too fast,  
Troubles will come and they will pass.  
Go find a woman and you'll find love,  
And don't forget son  
There is someone up above  
  
And be a simple kind of man.  
Be something you love and understand.  
Be a simple kind of man.  
Won't you do this for me son,  
If you can?”*

*(“Simple man” - Lynyrd Skynyrd)*

*Aos meus pais, André e Sônia, pelo incentivo e  
pelo amor que ultrapassa o limite da vida  
Aos meus irmãos, Alexandre, Felipe e Rafael,  
pela força e pelo carinho*

*Ao meu avô Sebastião e à minha família  
pela torcida, pela vibração e pelas orações*

*“Vou navegar... Nas águas deste mar  
Navegar... Eu quero me encontrar  
Navegar... não posso mais fugir  
Vou procurar... nas águas mais profundas  
No mar... feliz eu vou seguir  
Só amar... buscar o meu lugar  
Sem dúvidas... sem medo de sonhar”*

*(Canção em Ação de Graças)*

*À Deus  
pela Sua constante presença e proteção.  
“Non nobis Domine, non nobis, sed Nomini Tuo ad Gloriam”  
(Salmo 115:1)*

## AGRADECIMENTOS

À todos vocês que de uma forma direta ou indireta contribuíram para mais essa conquista, pela amizade e incentivo a continuar. Tudo foi importante para que eu pudesse perseverar no caminho. À todos vocês o meu muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista, pela orientação, pela paciência, pelos ensinamentos e pela confiança de que eu poderia realizar um bom trabalho.

À Profa. Dra. Iracilda Zappone Carlos pela orientação para a realização dos ensaios imunológicos.

À Dra. Eneida de Oliveira Guimarães, Farmacêutica da Garantia de Qualidade da Quiral Química do Brasil S/A, pelo fornecimento do fármaco para o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, pela amizade e pelos muitos momentos de esclarecimentos ao longo dessa jornada.

À Marisa pelo auxílio na realização dos testes imunológicos.

À secretaria de pós – graduação, Cláudia, Laura e Sônia pela organização e auxílio.

Aos amigos da biblioteca Moacir, Ana Lúcia, Max, Cristina, Irani, Sônia e Rita pelo auxílio na busca dos fundamentos apresentados e pelo apoio.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, sempre dispostos a providenciar o necessário para o bom andamento do trabalho.

Aos amigos das repúblicas por onde passei, Rodrigo Kitagawa (vovô), João Henrique (cabeça), Frank Ykeda (japão), Uirá Sorbo (vovó), Paulo Mangili (paulão), Arnóbio Silva, Najeh e Omar Khalil, Edson Crusca, Fernando Boldrini, Fernando Souza (Itaú), Fátima Kimie, Rubiana Mainardes e Indri Nogueira pela paciência, pelo convívio e pelas noites mal dormidas e bem vividas. Lembranças do Tanga.

As demais alunas do Prof. Raul, minhas amigas, Lívia e Giselle, pelos momentos de discussão e crescimento individual, sempre com muito carinho e admiração. Também à Kelly Pestana, Maria Carolina e a Sílvia Lumy pelo companheirismo e amizade.

Aos companheiros do laboratório Andréa, Cris, Luigina, Luana, Nelson, Thalita, Tina, Priscila, Beatriz, Vanessa, Cynthia e Chico pelos auxílios nos dias de trabalho e companheirismo.

Aos Irmãos DeMolay e Escoteiros pela compreensão e torcida.

Aos amigos de Juiz de Fora pela alegria dessa conquista, Franklin, Rômulo, Karina, Edilene, Marcos Joel, Leandro, Luciano e Ronaldo.

A todos cujos nomes não foram citados por causa do excesso, mas com certeza não foram esquecidos pelos momentos de alegria.

Obrigado de coração!!!!

## **ABREVIATURAS**

**QS** – Quitosana

**TPP** – Tripolifosfato de sódio

**NP** – Nanopartículas

**ETP** – Etoposide

**GD** – Grau de desacetilação

**NAG** – N-acetil glicosamina

**UV** – Ultravioleta

**IV** - Infravermelho

**CV** - Coeficiente de variação

**Eq.** – Equação

**PLGA** – Ácido poliláctico – co – glicólico

**PEG** – Polietilenoglicol

---

**LISTA DE TABELAS**

Tabela	Página
1. Principais fontes de quitina.....	20
2. Rendimento do procedimento de purificação da QS.....	50
3. Densidade relativa de diferentes dispersões de QS.....	51
4. Valores das viscosidades de diferentes dispersões de QS.....	52
5. Valores de GD de QS purificadas com diferentes soluções de NaOH	56
6. Valores das constantes viscosimétricas ( $K$ e $a$ ), da viscosidade intrínseca ( $[\eta]$ ) e do peso molecular ( $M_w$ ) da QS.....	57
7. Análise espectrofotométrica de ETP na região do UV.....	61
8. Cálculo da precisão do método.....	63
9. Ensaio para determinação dos limites de detecção e de quantificação do método.....	64
10. Resultados do teste de recuperação do ETP em solução de QS.....	65
11. Estudo da formulação das NP de QS. Volumes variados de TPP adicionados a 5 mL de QS.....	67
12. Diâmetro efetivo de NP obtidas com diferentes razões de massa.....	74
13. Efeito da incorporação de ETP no diâmetro efetivo das NP de QS....	75
14. Porcentagem de ETP incorporado nas NP.....	76
15. Valores de $\zeta$ das NP de QS.....	77
16. Solubilidade do ETP em diferentes valores de pH.....	87

---

**LISTA DE FIGURAS**

Figura	Página
1. Estrutura química da quitina (acima) e da QS (abaixo).....	19
2. Estrutura química do tripolifosfato de sódio.....	23
3. Estrutura química do ETP.....	27
4. Determinação da viscosidade intrínseca de QS.....	52
5. Espectros de UV-VIS de primeira derivada da absorvância de soluções de ácido acético e de soluções de NAG em diferentes concentrações. Ácido acético: 1) 0,01 mol/L; 2)0,02 mol/L; 3) 0,03 mol/L. N-acetilglicosamina: a)5 µg/mL; b)10 µg/mL; c)20µg/mL; d)30 µg/mL; e)40 µg/mL. Ponto isosbético das soluções de ácido acético em 203,2 nm.....	54
6. Curva analítica da NAG em ácido acético 0,01mol/L.....	55
7. Espectro da QS purificada no Infravermelho.....	58
8. Espectro de varredura do ETP. Solução 140 µg/mL em ácido acético 0,1 mol/L.....	59
9. Especificidade na absorção de ETP (140 µg/mL) em uma dispersão de QS 0,05% p/V em 284 nm.....	60
10. Curva analítica de ETP em solução de ácido acético 0,1 mol/L. Comprimento de onda 284 nm.....	61
11. Diferentes tipos de materiais obtidos com o estudo de formulação das NP de QS: A) solução; B) NP; C) agregados.....	67
12. Estudo de formação das NP de QS mostrado em função das concentrações finais dos componentes. (□) Solução; (●) Nanopartículas; (Δ) Agregados.....	68
13. Delineamento da região de formação das NP. (A) Agregados; (NP) Nanopartículas; (S) Solução.....	69
14. Fotomicrografias de NP de QS obtidas segundo as seguintes razões de massa QS:TPP: A) 4:1; B) 4:0,8.....	70
15. NP 4:1 QS:TPP preparadas com diferentes tempos de agitação magnética: A) 5 min B) 10 min.....	72
16. NP 4:0,8 QS:TPP preparadas com diferentes tempos de agitação magnética : A) 5 min B) 10 min.....	73

---

17. Espectros de: A) QS; B) TPP; C) ETP; D) Mistura física; E) NP de QS com ETP na região do infravermelho..... **80**
18. Viabilidade de macrófagos peritoneais murinos em presença de NP de QS sem fármaco..... **84**
19. Produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em culturas de macrófagos peritoneais murinos em presença das NP de QS sem fármaco..... **85**
20. Curva analítica de ETP em tampão acetato 0,1M pH 7,4..... **86**
21. Comparação da solubilidade do ETP em solução tampão acetato com diferentes valores de pH. A) pH 4,5 B) pH 7,4..... **87**
22. Ensaio de liberação *in vitro* do ETP em meio tampão acetato pH 7,4.  
● 177,02 µg; ● 80,34 µg..... **89**
-

---

## Sumário

<b>I INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>II OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>III FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	<b>19</b>
1 Quitosana .....	19
2 Tripolifosfato de sódio .....	23
3 Nanopartículas de quitosana .....	25
4 Etoposide .....	26
5 Nanopartículas na oncoterapia .....	29
<b>IV MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
<b>MATERIAIS</b> .....	<b>32</b>
REAGENTES E SOLVENTES .....	32
EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS .....	32
<b>MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA .....	33
1.1 Purificação da quitosana .....	33
1.2 Determinação da densidade relativa da quitosana .....	33
1.3 Determinação da viscosidade intrínseca da quitosana .....	34
1.4 Determinação do grau de desacetilação da quitosana .....	36
1.5 Determinação do peso molecular da quitosana .....	37
1.6 Análise espectroscópica da quitosana na região do infravermelho .....	38
2 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DE ETOPOSIDE. --	39
2.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção .....	39
2.2 Especificidade e seletividade .....	39
2.3 Curva analítica do etoposide .....	39
2.4 Linearidade .....	40
2.5 Precisão .....	40
2.6 Limite de detecção e limite de quantificação .....	40
2.7 Exatidão .....	41
3 PREPARO E ANÁLISE DAS NANOPARTÍCULAS .....	42
3.1 Estudo da formulação das nanopartículas de quitosana .....	42
3.2 Preparo das nanopartículas sem fármaco .....	42
3.2 Preparação das nanopartículas contendo etoposide .....	43
3.3 Determinação da eficiência de encapsulação .....	43
3.4 Análise morfológica das nanopartículas .....	44
3.5 Distribuição granulométrica .....	44
3.6 Determinação do potencial zeta ( $\zeta$ ) .....	46
3.7 Análise das partículas com etoposide por espectroscopia na região do infravermelho. ....	46
3.8 Análise da citotoxicidade das nanopartículas sem fármaco .....	47
3.8 Análise de burst oxidativo .....	47
3.9 Ensaio de solubilidade .....	49
3.10 Ensaio de liberação <i>in vitro</i> .....	49
<b>V RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
1. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA .....	50
1.1 Purificação da quitosana .....	50
1.2 Determinação da densidade relativa da quitosana .....	51
1.3 Determinação da viscosidade intrínseca da quitosana .....	51

---

---

1.4	Determinação do grau de desacetilação da quitosana .....	53
1.5	Determinação do peso molecular da quitosana .....	57
1.6	Análise espectroscópica da quitosana na região do infravermelho.....	58
2	DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE DE ETOPOSIDE POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV. ....	59
2.1	Determinação do comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{max}$ ) .....	59
2.2	Especificidade e seletividade .....	59
2.3	Curva analítica do etoposide.....	60
2.4	Linearidade .....	62
2.5	Precisão .....	63
2.6	Limite de detecção e limite de quantificação.....	63
3.6	Exatidão .....	65
3	PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA.....	66
3.1	Formulação das nanopartículas de quitosana.....	66
3.2	Distribuição granulométrica.....	71
3.3	Determinação da eficiência de encapsulação das nanopartículas.....	75
3.4	Análise morfológica das nanopartículas.....	76
3.5	Potencial zeta ( $\zeta$ ) .....	76
3.6	Análise espectroscópica das nanopartículas contendo etoposide na região do infravermelho .....	78
3.6	Estudo do burst oxidativo e da citotoxicidade celular.....	81
3.7	Ensaio de solubilidade .....	85
3.8	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> .....	88
VI	CONCLUSÕES.....	90
VII	REFERÊNCIAS .....	91

---

## RESUMO

O etoposide (ETP) é o fármaco de escolha para o tratamento de câncer do pulmão e de diversos outros tipos de câncer que acometem o homem na atualidade. Assim como diversos outros medicamentos antineoplásicos, o ETP também apresenta alto índice de citotoxicidade e efeitos adversos indesejáveis, que trazem grande desconforto ao paciente durante o tratamento. Este trabalho teve como objetivo desenvolver nanopartículas (NP) de quitosana (QS) para atuarem como carreadores para o ETP. Foi utilizada QS com grau de desacetilação de 74% e peso molecular de 29 kDa. As NP foram obtidas por geleificação ionotrópica, utilizando tripolifosfato de sódio (TPP) como agente reticulante, e foram caracterizadas quanto à morfologia, granulometria, potencial zeta, citotoxicidade e ativação de macrófagos. O método de análise do ETP foi validado para uma maior segurança dos dados de eficiência de encapsulação e liberação *in vitro*. As NP apresentaram diâmetro concordante com as características do polímero e uma citotoxicidade muito baixa, bem como uma baixa ativação de macrófagos. Cerca de 13% do ETP adicionado foi encapsulado pelas NP e cerca de 60% foi liberado na primeira hora do ensaio de liberação *in vitro*. As NP de QS se mostraram capazes de carrear o ETP, mas incapazes de reter o fármaco por um período maior de tempo. Estudos mais específicos são sugeridos para a avaliação da resposta imune frente ao sistema proposto.

---

## **ABSTRACT**

Etoposide (ETP) is the drug of choice for the treatment of lung cancer and of many other types of cancer that can be found among humans today. As well as others antineoplastics drugs, ETP also presents high cytotoxicity index and undesirable side effects, bringing great discomfort to the patient during the treatment. This work had as objective to develop chitosan (QS) nanoparticles (NP) as ETP carriers. QS with 74% of degree of deacetylation and molecular weight of 29kDa was used. NP have been prepared by an ionic gelation process, using sodium tripolyphosphate (TPP) as crosslinking agent, and they have been characterized in relation to the morphology, granulometry, zeta potential, cytotoxicity and macrophages activation. The analysis method of the ETP was validated in order to assess the efficiency of encapsulation and *in vitro* release data more accurately. NP presented diameter in accordance with the polymer characteristics and a very low cytotoxicity, as well as low macrophages activation. About 13% of the added ETP was encapsulated into the NP and about 60% was released after the first hour during the *in vitro* assay. QS NP have been able to carrier ETP, but unable to retain the drug for a longer period of time. More specific studies are suggested concerning the evaluation of immunological response to the considered system.

---

## **I INTRODUÇÃO**

A constante busca de novos sistemas de liberação modificada de fármacos demonstra a preocupação das grandes indústrias em desenvolver medicamentos com menos efeitos colaterais.

O desenvolvimento desses sistemas a partir de biopolímeros pode tornar o processo mais seguro e econômico. O uso de polímeros naturais como veiculadores de fármacos tem recebido muita atenção no campo farmacêutico devido à segurança, por serem, quase sempre, biocompatíveis. Numerosos sistemas têm sido descritos na literatura, incluindo sistemas micro e nano particulados (MIYAZAKI et al., 1995).

NP podem ser definidas de um modo geral como sendo sistemas coloidais submicrônicos ( $<1\mu\text{m}$ ), mas não necessariamente feitas com polímeros (biodegradáveis ou não). Se obtidas apropriadamente, NP podem agir como transportadores de fármacos capazes de atingir células ou tecidos tumorais, para uma determinada extensão, enquanto protegem o fármaco de uma inativação prematura durante o transporte (BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002). Nanoesferas poliméricas biodegradáveis têm recebido muita atenção na quimioterapia do câncer, para a qual é imperativo ter uma eficiente liberação do fármaco no sítio de ação desejado em função da alta toxicidade, baixa estabilidade e meia-vida biológica curta dos fármacos anti-tumorais (FELT; BURI; GURNY, 1998).

Uma vez conhecidas as propriedades biológicas favoráveis da QS tais como não-toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, ela tem atraído grande atenção no campo farmacêutico e tem sido extensivamente examinada pelo seu potencial de aplicação em sistemas de liberação e transporte de fármacos, incluindo

fármacos antineoplásicos (FELT; BURI; GURNY, 1998; SHU; ZHU, 2000; SABNIS; BLOCK, 2000).

O etoposide é um dos fármacos antineoplásicos mais comumente utilizado na clínica médica desde a década de 70. Sua utilização em uma série de combinações com outros fármacos antineoplásicos ou a utilização de análogos mais solúveis tem apresentado resultados favoráveis no tratamento de vários tipos de tumores sólidos, principalmente câncer de pulmão células pequenas e não – pequenas (BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002).

Como os fármacos de combate ao câncer são geralmente tóxicos, tanto para a célula tumoral quanto para a célula sadia, a eficácia da quimioterapia é normalmente limitada pela importância dos efeitos colaterais (BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002). Pacientes fazendo uso de ETP têm como efeitos adversos náuseas, vômitos, alopecia e mielossupressão (FERNANDES, 2002).

Uma estratégia para aumentar a seletividade dos fármacos antineoplásicos para as células tumorais e diminuir a citotoxicidade para os tecidos saudios pode ser associar fármacos antitumorais à sistemas coloidais nanoparticulados. Essa associação também contribui para vencer os sistemas de resistência celular e não celular desenvolvidos pelas células tumorais (BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002).

Vários estudos têm demonstrado a utilização de NP como promissoras carreadoras de fármacos. A associação do ETP com NP de QS representa mais uma importante contribuição na aplicação dos sistemas de liberação de fármaco em oncologia.

## II Objetivos

Este trabalho teve como objetivo desenvolver NP de QS pelo processo de geleificação ionotrópica e estabelecer uma relação entre QS e TPP na qual se pode seguramente obter tal sistema.

Uma vez obtidas as NP, caracterizá-las quanto à morfologia, granulometria e potencial zeta.

Verificar o efeito das NP de QS sobre a viabilidade celular e a capacidade de ativação de macrófagos.

Proceder um estudo de incorporação de etoposide e avaliar a capacidade de encapsulação desse fármaco pelas NP de QS. Realizar um estudo de liberação *in vitro* para completar a caracterização do sistema.

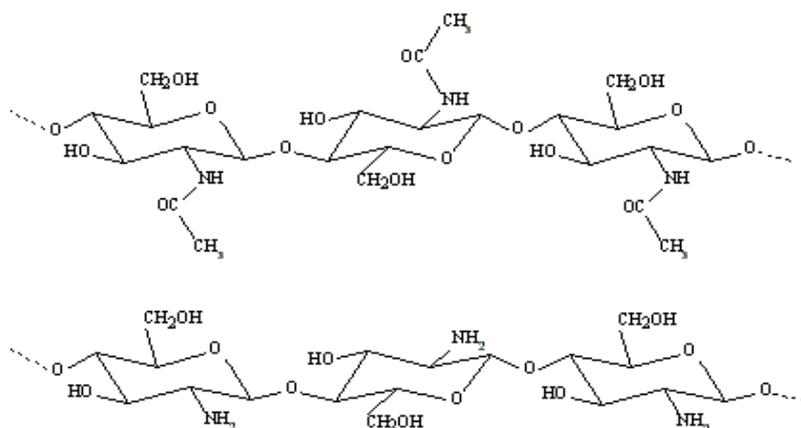
Desenvolver uma metodologia alternativa à cromatografia líquida de alta eficiência, simples e validada, para a análise do ETP.

### III Fundamentos Teóricos

#### 1 Quitosana

A QS é um polissacarídeo compreendendo copolímeros de glucosamina e N-acetilglucosamina e pode ser obtido da desacetilação parcial da quitina (figura 1). A quitina é considerada um derivado da celulose, embora não ocorra em organismos que a produzem. A celulose consiste de unidades  $\beta$ -(1,4)-D-glicopirranose, enquanto a quitina consiste da mesma cadeia, porém o grupo 2-hidróxi é substituído por um grupo acetamido, resultando em unidades  $\beta$ -(1,4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (GLcNAc) (RATHKE; HUDSON, 1994; ILLUM, 1998; AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004).

A quitina é uma poliamida acetilada, biodegradável e atóxica (KARLSEN, 1991). Ela é considerada o principal constituinte do exoesqueleto de crustáceos aquáticos, além de ser um componente do exoesqueleto de insetos e da parede celular de leveduras e fungos. Foi relatado, por exemplo, que cerca de 50-80% da composição orgânica das cascas de crustáceos e da cutícula de insetos consiste de quitina (MUZZARELLI, 1977), enquanto nas leveduras e fungos a quantidade relativa está na faixa de 30 a 60% (PETER, 1995).



**Figura 1:** Estrutura química da quitina (acima) e da QS (abaixo).

Felt e colaboradores, 1998 ilustram através da tabela 1 a quantidade de quitina presente em alguns organismos.

**Tabela 1:** Principais fontes de quitina

Organismo		Conteúdo de quitina (%)
Crustáceos	Caranguejo <sup>a</sup>	72,1
	Camarão <sup>a</sup>	69,1
	Lagosta <sup>a</sup>	69,8
Insetos	Mosca <sup>a</sup>	54,8
	Borboleta <sup>a</sup>	64,0
Fungos	<i>Aspergillus niger</i> <sup>b</sup>	42,0
	<i>Mucor rouxii</i>	44,5

Adaptado de Felt e colaboradores, 1998.

<sup>a</sup> Peso orgânico da casca; <sup>b</sup> Peso seco da parede celular

A QS pode ser encontrada naturalmente na parede celular de alguns fungos, especialmente nas espécies do gênero *Mucor* (PETER, 1995). Porém, a maior fonte disponível de QS é a produção de quitina desacetilada (BRINE, 1984; KNORR, 1984; BORCHARD; JUNGINGER, 2001).

O termo QS é usado para descrever uma série de polímeros com pesos moleculares entre 50 e 2000 kDa e grau de desacetilação entre 40% e 98%. A QS é insolúvel em valores de pH neutros e alcalinos. Comporta-se como um polieletrólito catiônico moderadamente básico ( $pK_a = 6,3$ ) e forma sais com ácidos inorgânicos e orgânicos, tais como ácido glutâmico, ácido clorídrico e ácido acético (PETER, 1995; ILLUM, 1998).

Isto é, definitivamente, uma vantagem em comparação com a celulose, a qual, para exibir propriedades de troca iônica, precisa ser convertida quimicamente em derivados contendo grupamentos químicos apropriados. Além disso, a presença de grupos amino primários na QS oferece maiores possibilidades de modificações, tais como *N*-acilação e *N*-alquilação (RATHKE; HUDSON, 1994; ZHAO et al., 2003)

e complexação com outros polieletrólitos como alginato, pectina, dextrana e outros (GAMZAZADE; NASIBOV, 2002). Devido ao seu caráter catiônico, a QS tem recebido cada vez mais atenção como um componente polimérico em uma grande variedade de complexos. A grande vantagem de se preparar complexos polieletrólíticos a partir de polímeros naturais é não serem tóxicos e serem bioabsorvíveis (ARGÜELLES-MONAL et al., 2000).

A QS é relativamente reativa, quando comparada à quitina, e pode ser produzida sob a forma de pós, fibras, pastas, filmes, etc. A quitina, por sua vez, é quimicamente inerte, limitando sua utilização quando comparada a QS (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004).

A QS tem sido referida como tendo propriedades farmacológicas tais como ação hipocolesterolêmica, propriedades cicatrizantes, atividades antiácidas e anti-ulcerativas, além da sua propriedade catiônica lhe conferir a possibilidade de se ligar fortemente a diversas células, levando ao uso potencial como hemostático e espermicida (ILLUM, 1998; OKAMOTO et al., 2003). Alguns autores relatam ainda efeitos antiinflamatórios e analgésicos (OKAMOTO et al., 2002; MIYATAKE et al., 2003). Senel e McClure (2004), descreveram a utilização de QS em medicina veterinária como cicatrizante, agente antimicrobiano, agente hemostático, agente imunizante tópico e analgésico.

A QS tem sido amplamente examinada pela indústria farmacêutica devido ao seu uso potencial em sistemas de liberação modificada de fármacos. O caráter catiônico do polímero, somado aos seus grupos reativos, dá à QS propriedades únicas para sua utilização em tecnologias de liberação controlada (KARLSEN, 1991; BANERJEE et al., 2003).

Por causa de seu baixo custo de produção, sua biocompatibilidade e sua mínima toxicidade, a QS tornou-se um excipiente muito interessante no desenvolvimento de sistemas para administração de vacinas. Uma vez que a QS forma nano- e micropartículas com relativa facilidade e com alta capacidade de incorporação para vários antígenos, ela é uma candidata promissora para o desenvolvimento de sistemas carreadores na administração oral de vacinas. Estudos *in vivo* têm demonstrado que formulações sólidas e líquidas de vacinas contendo QS são capazes de aumentar a resposta imune local e sistêmica após administração nasal (VAN DER LUBBEN et al., 2001).

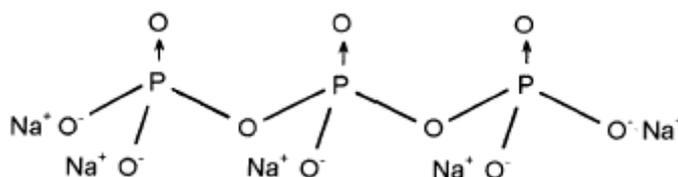
Micropartículas de QS, incluindo não só microcápsulas e microesferas, mas também as chamadas *beads*, podem ser preparadas por diversos métodos, tais como geleificação ionotrópica (BODMEIER; PAERAKATUL, 1989; BODMEIER; OH; PRAMAR, 1989; AYDIN; AKBUGA, 1996; EL-GIBALY, 2002; KO et al., 2002; PAN et al., 2002); extrusão-esferonização (GOSKONDA; UPADRASHTA, 1993), evaporação de solvente (HASSAN; PARISH; GALOO, 1992; LIN; LIN, 1992; AKBUGA; DURMAZ, 1994), emulsão múltipla (PAVANETTO et al., 1995), *spray-drying* (MI et al., 1999; HUANG; YEH; CHIANG, 2002) e coacervação/precipitação (DALY; KNORR, 1988; BERTHOLD; CREMER; KREUTER, 1996; ANGELOVA; HUNKELER, 2002; LUCINDA-SILVA; EVANGELISTA, 2002). Pode ser também empregada para revestimento de micropartículas (TAKAKASHI et al., 1990; MURATA et al., 1993; KAS, 1997). Grânulos de QS podem ser preparados por esferonização (CHANDY; SHARMA, 1993; SÄKKINEN et al., 2002; SANTOS et al., 2002).

## 2 Tripolifosfato de sódio

O Tripolifosfato de sódio (TPP) é um ânion multivalente e atóxico que pode formar gel pela interação iônica entre as cargas positivas dos grupamentos amino da QS e as cargas negativas deste íon. Vem sendo estudado como um agente reticulante alternativo ao glutaraldeído, que é um agente potencialmente antigênico e pode causar irritações nas superfícies de mucosa devido a sua toxicidade (CALVO et al., 1997; SHU; ZHU, 2000; SHU; ZHU, 2001; KO et al, 2002).

O TPP é um poliânion com peso molecular de 367,86. Pó branco, pouco higroscópico, completamente solúvel em água e uma solução 1% (p/V) a 25 °C apresenta um pH em torno de 9,7 (MERCK INDEX, 2001 ).

Algumas de suas aplicações podem ser assim enumeradas: agente seqüestrante e emulsificante em indústrias de pastas e papéis; tratamento de água (usado no abrandamento de água dura removendo íons cálcio e magnésio sem precipitar os respectivos sais); produção de detergentes em pó e produtos de limpeza; dispersão de pigmentos e argilas; fabricação de vidros e tintas; dispersante de óleo em perfurações petrolíferas; agente de floculação e estabilizante do solo (BRAZMO, 2004).



**Figura 2:** Estrutura química do tripolifosfato de sódio

Agentes químicos reticulantes podem induzir toxicidade e outros efeitos indesejáveis. Para contornar estas desvantagens, reticulantes físicos reversíveis por interação eletrostática, os poliânions, têm sido recentemente empregados na formulação e na preparação de sistemas de liberação de fármacos (SHU; ZHU, 2002a).

Comparado aos poliânions, o uso de ânions de baixo peso molecular para reticular a QS tem sido descrito com sendo um método bem mais simples e brando (SHU; ZHU, 2002b).

Desde que Bodmeier, Oh e Prammar (1989), publicaram que um complexo TPP/QS pode ser formado somente gotejando uma solução de QS em uma solução de TPP, muitos pesquisadores têm explorado esse fenômeno como um potencial uso farmacêutico. Entretanto a resistência mecânica dessas partículas é muito baixa e o seu uso farmacêutico ainda é limitado (SHU; ZHU, 2000, AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004).

A estrutura molecular de fosfatos multivalentes influencia fortemente as interações com QS por ligações salinas. O grande número de cargas negativas do TPP resulta na sua grande habilidade de reticular ionicamente a QS. O fator pH tem um papel importante no que se refere ao número de cargas carregadas pela molécula de TPP e de QS (SHU; ZHU, 2002a).

O tratamento da QS com TPP resulta numa diminuição da susceptibilidade de degradação daquela pela quitinase, além de alterar o comportamento de solubilidade do polímero. Portanto, o tratamento com TPP pode ser uma nova e simples ferramenta para encontrar mudanças desejáveis nas propriedades da QS para algumas aplicações específicas (SHARMA; MONDAL; GUPTA, 2002).

### **3 Nanopartículas de quitosana**

O desenvolvimento de NP hidrofílicas como carreadores de fármacos tem representado um importante desafio nos últimos anos. O uso de carreadores coloidais de fármacos preparados com polissacarídeos hidrofílicos como a QS têm crescido como uma alternativa promissora para o transporte de macromoléculas como peptídeos, proteínas e oligonucleotídeos através de superfícies biológicas, bem como fármacos derivados destes (CALVO et al., 1997; PAN et al., 2002; DE CAMPOS; SÁNCHEZ; ALONSO, 2001; VILA et al., 2002; VILA et al., 2004).

Essas NP hidrofílicas têm recebido uma atenção especial para serem administradas pelas vias endovenosa e oral. As pesquisas têm enfatizado a importância do tamanho das partículas e revelado as vantagens destas sobre as microsferas no que concerne transpor barreiras epiteliais. QS é biodegradável e tem propriedades bioadesivas, além de não ser tóxica. Largamente utilizada pela indústria farmacêutica como biomaterial médico e como carreadores de fármaco, esse polissacarídeo foi selecionado para o desenvolvimento de NP devido a sua reconhecida mucoadesividade e capacidade de aumentar a penetração de macromoléculas através de superfícies de mucosa (ILLUM, 1998; XU; DU, 2003).

Como mencionado anteriormente, a natureza catiônica da QS pode ser explorada convenientemente para o desenvolvimento de sistemas particulados para liberação de fármacos. A partir desta complexação com polímeros negativamente carregados, uma interessante propriedade da QS é a sua capacidade de geleificar em contato com poliânions específicos. Este processo de geleificação se deve à formação de ligações cruzadas inter e intramoleculares, mediadas por estes poliânions (JANES; CALVO; ALONSO, 2001). Bodmeier, Oh e Prammar (1989), foram os primeiros a relatar a geleificação ionotrópica da QS com o TPP para a obtenção

de NP. Mais recentemente, Calvo e colaboradores (1997a); de Campos, Sánchez e Alonso (2001); Pan e colaboradores (2002); Vila e colaboradores (2002; 2004), estudaram o aprimoramento do processo baseado no mesmo princípio.

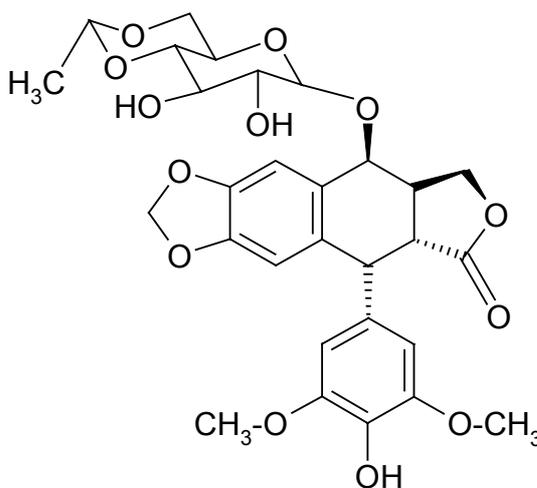
Esta técnica simples envolve a adição de uma fase alcalina contendo TPP (pH = 7 – 9) a uma fase ácida contendo QS (pH = 4 – 6). As NP são formadas imediatamente após a mistura das duas fases pela formação de ligações cruzadas inter e intramoleculares entre os grupamentos fosfato do TPP e os grupamentos amino da QS. Diversos tamanhos de partículas podem ser obtidos variando as concentrações e a razão de volume de ambas as fases. As condições de formação de NP com um tamanho nanométrico específico podem variar significativamente dependendo da pureza, do peso molecular e da acidez do sal de QS empregado. Conseqüentemente os parâmetros de formulação devem ser otimizados para cada tipo de QS empregado (JANES; CALVO; ALONSO, 2001).

#### **4 Etoposide**

A podofilotoxina é extraída da planta *Podophyllum peltatum*, que era utilizada como remédio pelos índios americanos e pelos primeiros colonos daquele país, em função dos seus efeitos eméticos, catárticos e anti-helmínticos. Dois glicosídeos semi-sintéticos da podofilotoxina têm demonstrado uma significativa ação terapêutica em diversas neoplasias humanas (GOODMAN; GILMAN, 1996).

Comumente conhecido por VP-16-203 ou VP-16, o ETP é um derivado semi-sintético da podofilotoxina, utilizado no tratamento de certos tipos de neoplasias. Quimicamente é o 4Ø-dimetilepipodofilotonina 9-[4,6-0-(R)-etilideno-b-D-glucopiranosídeo] e sua fórmula estrutural é mostrada na figura 3 (GOODMAN; GILMAN, 1996).

ETP é muito solúvel em metanol e clorofórmio, levemente solúvel em etanol e pouco solúvel em água (148 – 153 µg/mL). Tem massa molecular de 588 e para aumentar sua solubilidade, comercialmente é formulado com veículos contendo 100 mg de fármaco, 400 mg de polissorbato 80, 3,25 mg de polietilenoglicol 300, 10 mg de ácido cítrico e álcool absoluto em quantidade suficiente para 5 mL. Frascos fechados são estáveis por 24 meses a temperatura ambiente. Sua maior estabilidade é em pH 5 e em soluções mais ácidas se degrada em aglicona. Em soluções alcalinas epimeriza em cis-lactona, também conhecido como picro-ETP. Por conta do seu limite de solubilidade em água, o ETP tem tendência de precipitar em concentrações para administração endovenosa (SHAH; CHEN; CHOW, 1995; HANDE, 1998a; FERNANDES, 2002).



**Figura 3:** Estrutura química do ETP

O ETP é um fármaco antineoplásico de primeira linha no tratamento de câncer pulmão pequenas células e não-pequenas células, tumores de células germinativas, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, leucemia aguda não linfocítica, câncer de ovário, mama e gástrico.

Pacientes que fazem uso desse fármaco apresentam como efeitos agudos náusea e vômito. Alopecia e mielossupressão são apresentados como efeitos tardios do uso (HANDE, 1998b; MILLER; NIELL, 2001; FERNANDES, 2002).

Muitos autores têm publicado sobre o uso eficaz de ETP no tratamento de câncer de pulmão pequenas células (MILLER; NIELL, 2001; ZAFFARONI; DAIDONE, 2002; KARUP; HANNA, 2004; SIMON; ARGIRIS; MURREN, 2004) em concomitância com outros fármacos como cisplatina e carboplatina. O câncer de pulmão é a causa mais comum de morte por câncer que é relatada nos países ocidentais industrializados (SIMON; ARGIRIS; MURREN, 2004; KARUP; HANNA, 2004). O câncer de pulmão é o mais comum de todos os tumores malignos, apresentando um aumento por ano de 2% na sua incidência mundial e 90% dos casos diagnosticados está relacionado ao consumo de derivados do tabaco. No Brasil, o câncer de pulmão foi responsável por 14.715 óbitos no ano de 2000, sendo o tipo de câncer que mais fez vítimas. Segundo as estimativas de incidência de mortalidade por câncer do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de pulmão deverá atingir 25.790 pessoas em 2005, sendo 17.110 homens e 8.680 mulheres (INCA, 2005).

O ETP foi o primeiro fármaco antineoplásico reconhecido como inibidor da topoisomerase II e o efeito citotóxico deste composto é exercido via ativação do sistema apoptótico celular (HANDE, 1998a; BARTLING; LEWENSOHN; ZHIVOSTOVSKY, 2004). Pesquisas com o ETP têm ajudado a entender o mecanismo pelo qual esses fármacos inibem essa enzima.

As DNA topoisomerasas são enzimas nucleares que possibilitam a abertura da fita dupla de DNA e seu rompimento, de modo que a célula possa manipular a

topologia do seu DNA. São essenciais para a replicação e transcrição do DNA, segregação cromossomal e recombinação desse DNA.

O reconhecimento da relação da inibição da topoisomerase II e o efeito antineoplásico resultante têm estimulado o desenvolvimento de novos fármacos (HANDE, 1998a).

O ETP induz um bloqueio do ciclo celular e é mais citotóxico na fase S tardia ou na fase G2 inicial, *in vivo* e *in vitro*, sendo assim um fármaco citotóxico de fase específica. Causa lises na fita dupla de DNA sendo dose dependente. Produz ainda ligações cruzadas de proteínas e aberrações cromossomais. A lise da fita de DNA é provavelmente o efeito inicial das seqüências biossintéticas e cinéticas que levam a citotoxicidade (MILLER; NIELL, 2001).

Essa citotoxicidade é aumentada por cafeína e cloroquina, ambos inibidores do mecanismo de reparo do DNA (FERNANDES, 2002).

Fármacos inibidores da topoisomerase II são os mais efetivos antineoplásicos da atualidade disponíveis para a terapia do câncer. Estes agentes, principalmente doxorubicina e ETP, são componentes da terapia para a cura de linfomas e leucemias adultos e infantis, câncer de pulmão pequenas células e adjuvante no câncer de mama. Infelizmente esses agentes não estão livres de causarem efeitos tóxicos significativos (HANDE, 1998b).

## **5 Nanopartículas na oncoterapia**

Sistemas de liberação poliméricos têm sido utilizados ao longo dos anos para a liberação de fármacos hidrossolúveis e hidro-insolúveis. NP poliméricas têm atraído grande interesse nos últimos anos para administração clínica de fármacos antineoplásicos. As vantagens desse tipo de formulação incluem o aumento da

eficácia antitumoral, redução dos efeitos colaterais sistêmicos, alta capacidade de atravessar diversas barreiras bem como liberação controlada e localizada do fármaco. Entretanto essas vantagens podem ser comprometidas pelo pequeno tempo de residência na corrente sangüínea devido ao reconhecimento e captura pelos macrófagos do sistema monocítico fagocitário (LIGGINS et al., 2000; GUPTE; CIFTCI, 2004, DONG; FENG, 2004).

Diversos estudos têm sido divulgados utilizando fármacos antineoplásicos associados à micro ou NP poliméricas, sempre visando uma liberação modificada ou uma maior concentração do fármaco em tecidos tumorais. NP de PLGA – PEG contendo cisplatina, administradas por via endovenosa em ratos, exibiram uma liberação sustentada do fármaco e um tempo de residência prolongado na corrente sanguínea quando comparadas a uma solução aquosa do fármaco (AVGOUSTAKIS et al., 2002). Huo e colaboradores (2005), mostraram que após 15 minutos da administração de microsferas de PLGA contendo cisplatina por via endovenosa em coelhos, a concentração de fármaco no pulmão desses animais era aproximadamente 150 vezes maior que no grupo controle.

Resultados semelhantes apresentou o paclitaxel também associado a NP de PLGA quando comparados com o TAXOL<sup>®</sup> (DONG; FENG, 2004; STRAUB et al., 2005).

Nanoagregados de QS contendo doxorubicina administrados por via endovenosa suprimiram o crescimento tumoral em modelos animais por mais de 10 dias (SON et al., 2003).

NP lipídicas sólidas contendo ETP administradas por via subcutânea são mais facilmente retidas e endocitadas pelas células tumorais, aumentando o efeito

antitumoral e a regressão do tumor de Dalton em modelo animal (REDDY et al., 2005).

A utilização mais eficaz de fármacos se dá por uma liberação seletiva no sítio de ação a uma taxa controlada, especialmente em se tratando de fármacos com efeitos colaterais tão acentuados (AVGOUSTAKIS et al., 2002).

Os estudos indicam que as NP são um sistema de liberação com grande potencial para ser utilizado para liberação localizada ou liberação sustentada de fármacos. Estudos em liberação de fármacos se tornam mais importantes à medida que fármacos mais potentes e específicos se tornem disponíveis em função do maior conhecimento sobre as doenças que se aplicam. As NP, devido à sua versatilidade para formulação, propriedade de liberação modificada, tamanho sub-celular e biocompatibilidade com tecidos e células, apontam ser um sistema promissor para alcançar esses objetivos (PANYAM; LABHASETWAR, 2003).

## **IV Materiais e métodos**

### **Materiais**

#### **REAGENTES E SOLVENTES.**

- Quitosana - GALENA;
- Ácido clorídrico p.a. – SYNTH;
- Hidróxido de sódio p.a. – SYNTH;
- Ácido acético glacial p.a. – MERCK;
- N-acetil-glicosamina 99% - SIGMA;
- Tripolifosfato de sódio - SYNTH;
- Etoposide – QUIRAL QUÍMICA
- Acetonitrila R – SYNTH
- Peroxidase de raiz forte, tipo II – SIGMA
- Acetato de sódio anidro – REAGEN

#### **EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS**

- Espectrofotômetro UV/VIS – HP Mod. 8530,
- Liofilizador EDWARDS, mod. Modulyo;
- Picnômetro 5 mL – LABORGLASS;
- Viscosímetro de Ostwald;
- Microscópio eletrônico de varredura - JEOL JSM-T330A;
- Equipamento para medida de espalhamento dinâmico de luz – “LIGHT SCATTERING” BROOKHAVEN – fonte de laser He – Ne 10mW, 632 nm - HUGHES; autocorrelator 64 canais;

- Ultracentrífuga BECKMAN – Mod. L80 rotor 80Ti
- Leitor de ELISA automático Multiskan – Mod. Ascent
- Incubadora Shaker Marconi – Mod. MA 420
- PALS Zeta Potential Analyzer - BROOKHAVEN

## **MÉTODOS**

### **1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA**

#### ***1.1 Purificação da quitosana***

Foram pesados exatamente cerca de 2 g de QS e transferidos para um béquer. Adicionou-se 300 mL de uma solução de HCl 0,1 mol/L e deixou-se sob agitação magnética durante 90 min para a completa dispersão da amostra. Filtrou-se a solução sob vácuo e adicionou-se, de uma só vez, 60 mL de solução de NaOH 1 mol/L, sob agitação magnética. A agitação prosseguiu por 30 min. Filtrou-se novamente e a QS precipitada foi lavada com água purificada até que o pH da QS se igualasse ao pH da água. A QS foi então transferida para uma placa de Petri, congelada e posteriormente liofilizada (LUCINDA, 1999, adaptado).

#### ***1.2 Determinação da densidade relativa da quitosana***

A densidade relativa da QS foi determinada por picnometria (VOIGT; BORNSCHEIN, 1982).

Foram preparadas dispersões de QS a 0,03; 0,05; 0,1; 0,13; 0,15; 0,17; 0,2; 0,25; 0,3 g/dL em ácido acético 0,1 mol/L e a densidade foi determinada através da

relação de massa entre volumes iguais da dispersão de QS e água, segundo a equação 1.

$$\rho = m/w \quad (\text{eq. 1})$$

onde:  $\rho$  = densidade da amostra em relação à água

$m$  = massa da amostra (g)

$w$  = massa de água (g)

Todas as amostras foram deixadas em sala climatizada a 20 °C por 24h, incluindo a balança e os picnômetros, para que o equilíbrio térmico fosse estabelecido. Foi também determinada a densidade da solução de ácido acético em relação à água seguindo a mesma metodologia.

### **1.3 Determinação da viscosidade intrínseca da quitosana**

A viscosidade intrínseca da QS foi obtida a partir da regressão linear dos valores de viscosidade reduzida das dispersões de QS *versus* a variação da concentração destas mesmas dispersões (KNAUL et al., 1998).

As viscosidades dinâmicas ou absolutas das dispersões de QS em concentração de 0,03; 0,05; 0,1; 0,13; 0,15; 0,17; 0,2; 0,25; 0,3 g/dL e do ácido acético 0,1 mol/L foram obtidas utilizando-se um viscosímetro capilar de Ostwald e um cronômetro digital para registrar o tempo de escoamento do líquido através do capilar. Todas as amostras foram deixadas em sala climatizada a 20 °C por 24h incluindo o viscosímetro. A viscosidade foi determinada através da equação 2,

utilizando-se a água purificada como líquido de referência e aplicando-se os valores de densidade relativa obtidos como descrito anteriormente.

$$\eta_2 = \frac{t_2 d_2}{t_1 d_1} \eta_1 \quad (\text{eq. 2})$$

onde:  $\eta_2$  = viscosidade da amostra (mPa.s)

$t_2$  = tempo de escoamento da amostra (s)

$d_2$  = densidade relativa da amostra

$\eta_1$  = viscosidade do líquido de referência (mPa.s)

$t_1$  = tempo de escoamento do líquido de referência (s)

$d_1$  = densidade relativa do líquido de referência

A partir desses dados foi possível calcular a viscosidade específica das dispersões de QS pela equação 3:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \quad (\text{eq. 3})$$

onde:  $\eta_{sp}$  = viscosidade específica

$\eta_0$  = viscosidade do solvente puro (mPa.s)

$\eta$  = viscosidade da amostra (mPa.s)

A viscosidade reduzida foi calculada pela razão entre a viscosidade específica da dispersão e a concentração da dispersão, como segue (equação 4):

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad (\text{eq. 4})$$

onde:  $\eta_{red}$  = viscosidade reduzida (dL/g)

$\eta_{sp}$  = viscosidade específica

C = concentração da dispersão de QS (g/dL)

A viscosidade intrínseca ( $[\eta]$ ) da amostra pode ser calculada, seguindo a equação 5:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{C} \quad (\text{eq.5})$$

onde:  $[\eta]$  = viscosidade intrínseca (dL/g)

$\eta_{sp}$  = viscosidade específica

C = concentração da dispersão de QS (g/dL)

#### **1.4 Determinação do grau de desacetilação da quitosana**

O grau de desacetilação (GD) da QS foi determinado pelo método da primeira derivada de absorvância, descrito por Tan e colaboradores (1998). É um método que permite uma análise simples e rápida da QS.

QS e n-acetilglicosamina (NAG) foram dissolvidas em soluções de ácido acético 0,01; 0,02; 0,03 mol/L. Foi realizada a análise dessas soluções de ácido acético em primeira derivada de absorvância, na faixa de 190 a 250 nm, a fim de verificar sua interferência na análise das outras duas substâncias, QS e NAG. Desse modo, determinou-se o comprimento de onda em que se dá o ponto isobéstico do ácido acético, que é o ponto em que espécies iônicas e moleculares do ácido acético absorvem no mesmo comprimento de onda.

Para determinação do GD da amostra de QS foi necessária a obtenção da curva analítica da NAG. Foram preparadas soluções de NAG em ácido acético 0,01 mol/L nas concentrações de 0,005; 0,010; 0,020; 0,030; 0,040 mg/mL, as quais foram analisadas em triplicata. Esses espectros foram sobrepostos aos relativos ao ácido acético e a curva analítica foi traçada pela medida da altura dos picos em relação ao ponto isobéstico do ácido acético em 203,2 nm.

Para a quantificação dos grupos acetil nas amostras de QS, foram preparadas dispersões das amostras de QS a 0,1 mg/mL em ácido acético 0,01 mol/L, procedendo-se a leitura em comprimento de onda de 203,2 nm.

Avaliou-se, também, a influência da concentração de NaOH na determinação do GD. Foram utilizadas soluções de NaOH nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mol/L, seguindo o mesmo procedimento acima descrito.

### **1.5 Determinação do peso molecular da quitosana**

O peso molecular da QS foi determinado pelo método viscosimétrico, a partir da viscosidade intrínseca da dispersão, utilizando a equação de Mark-Houwink (RATHKE; HUDSON, 1994).

$$[\eta] = KM_w^a \quad (\text{eq. 6})$$

onde:  $[\eta]$  = viscosidade intrínseca (dL/g)

$K$  e  $a$  = constantes viscosimétricas de Mark-Houwink

$M_w$  = peso molecular (Da)

As constantes viscosimétricas foram obtidas com a aplicação dos valores de GD nas equações 7 e 8, descritas por Wang e colaboradores (1991), e Lucinda (1999).

$$K = 1,64 \cdot 10^{-30} \cdot GD^{14} \quad (\text{eq. 7})$$

$$a = -1,02 \cdot 10^{-2} + 1,82 \quad (\text{eq. 8})$$

### ***1.6 Análise espectroscópica da quitosana na região do infravermelho.***

As amostras de QS purificada foram compactadas com KBr e as pastilhas foram analisadas no intervalo de 500 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

## **2 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DE ETOPOSIDE.**

### ***2.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção***

A solução de ETP em acetonitrila foi submetida à análise de varredura em espectrofotômetro, numa faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm, para a determinação do comprimento de onda de máxima absorção do ETP.

### ***2.2 Especificidade e seletividade***

Foram determinadas, comparando-se os espectros no UV obtidos da análise da dispersão de QS simples e contendo o fármaco no comprimento de onda de máxima absorção do ETP.

### ***2.3 Curva analítica do etoposide.***

Partindo de uma solução estoque, foram tomadas alíquotas para o preparo de diluições na faixa de concentração entre 20 µg/mL e 160 µg/mL. Todas as porções foram transferidas para balão volumétrico de 5 mL e o volume final foi completado com ácido acético 0,1 mol/L. Para cada diluição foram preparadas três soluções, partindo-se de soluções estoques diferentes. As leituras foram realizadas em 284 nm e os valores médios das leituras de cada concentração foram utilizados para construção do gráfico correspondente e para o cálculo da equação da reta.

### **2.4 Linearidade**

A linearidade foi determinada através do coeficiente de correlação da curva analítica do fármaco ( $r^2$ ), considerando o intervalo entre a menor e a maior concentração estipuladas para a sua construção.

### **2.5 Precisão**

Foi determinada através do ensaio de repetibilidade, analisando-se o coeficiente de variação (CV) das determinações de 3 amostras de concentrações conhecidas sendo uma baixa, uma média e uma alta, avaliando todo o intervalo linear da curva analítica.

### **2.6 Limite de detecção e limite de quantificação**

Foram preparadas três soluções com concentrações próximas ao limite inferior da curva analítica e a partir do desvio padrão dos valores encontrados, pelos respectivos cálculos matemáticos, foi possível determinar os limites de quantificação e de detecção.

O limite de detecção foi calculado através da análise em triplicata de três amostras nas concentrações 15; 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$  e usando a equação 8:

$$LD = 3 \cdot \frac{S}{\alpha} \quad (\text{eq. 8})$$

onde: S = Desvio padrão

$\alpha$  = Inclinação da curva analítica

O limite de quantificação foi calculado através da análise em triplicata de três amostras nas mesmas concentrações, 15; 20 e 30 µg/mL, e usando a equação 9:

$$LD = 10 \cdot \frac{S}{\alpha} \quad (\text{eq. 10})$$

Onde: S = Desvio padrão

$\alpha$  = Inclinação da curva analítica

### **2.7 Exatidão**

Partindo-se de uma solução estoque de ETP 2 mg/mL, foram tomadas alíquotas de 0,05 mL; 0,1 mL e 0,15 mL e adicionados a 2 mL da solução de ácido acético 0,1 mol/L, para o preparo de soluções amostras. As concentrações dessas soluções foram obtidas por espectrofotometria no UV.

A exatidão foi calculada como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida de fármaco adicionada à amostra, ou como a diferença entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. Deve ser verificada a partir de, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, cada uma em triplicata, e pode ser expressa pela equação 10, mostrada a seguir (ANVISA, 2003; ICH, 1996).

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{C}{C_0} \cdot 100 \quad (\text{eq. 11})$$

onde: C = média das concentrações determinadas experimentalmente;

$C_0$  = concentração teórica inicial

### **3 PREPARO E ANÁLISE DAS NANOPARTÍCULAS**

#### ***3.1 Estudo da formulação das nanopartículas de quitosana***

Foram preparadas soluções de QS e de TPP nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0% (p/V). Sob agitação magnética e com o auxílio de uma seringa, foram adicionados 0,5; 1,0; 2,0; 2,5 e 3 mL das soluções de TPP a 5 mL das soluções de QS. Os sistemas formados foram observados a olho nu e classificados como solução, suspensão opalescente e agregados, tendo o cuidado de registrar os volumes e as concentrações de QS e TPP utilizados.

As amostras foram depositadas sobre suporte para microscopia eletrônica de varredura e secas em dessecador, para posterior visualização no microscópio e confirmação da formação das nanopartículas.

#### ***3.2 Preparo das nanopartículas sem fármaco***

As partículas foram obtidas pelo método de geleificação ionotrópica, desenvolvido por Calvo e colaboradores, 1997.

Com o auxílio de uma seringa, foram adicionados 2 mL de uma solução aquosa de TPP 0,2% (p/V) a 4 mL da dispersão de QS 0,5% (p/V) em ácido acético 0,1 mol/L, sob agitação magnética, formando uma suspensão opalescente. A amostra foi transferida para um tubo de centrifugação contendo 0,5 mL de glicose 40% (p/V) e centrifugada a 20000 x g por 30 min. O precipitado obtido foi ressuspenso em 1,0 mL de água purificada.

### **3.2 Preparação das nanopartículas contendo etoposide**

Para a preparação das NP contendo o fármaco, foi adotado o mesmo procedimento.

Preparou-se uma solução 2 mg/mL de ETP em acetonitrila e adicionou-se 0,3 mL desta solução à dispersão de QS. Sob agitação magnética, adicionou-se a solução de TPP, formando uma suspensão opalescente. A amostra foi centrifugada a 20000 x g em leite de glicose por 30 min. O material resultante foi ressuspenso em 1,0 mL de água purificada e o sobrenadante reservado para análise da eficiência de encapsulação.

### **3.3 Determinação da eficiência de encapsulação**

Alíquotas de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mL da solução de ETP em acetonitrila foram adicionadas a 4 mL da dispersão de QS. A quantidade máxima de fármaco encapsulado foi obtida pela diferença da quantidade de ETP adicionado e a quantidade de ETP determinada no sobrenadante das partículas após a centrifugação, ou seja, pelo método indireto. Tomou-se 0,2 mL do sobrenadante, após a ultracentrifugação das partículas a 20000 x g, e transferiu-se para cubeta de quartzo, adicionando-se 1,8 mL da solução de ácido acético 0,1 mol/L. Procedeu-se a leitura em 284 nm em espectrofotômetro.

A eficiência de encapsulação das partículas é dada pela equação 12:

$$EE(\%) = \left( \frac{T_f - F_s}{T_f} \right) \cdot 100 \quad (\text{eq. 12})$$

onde: EE = eficiência de encapsulação

$T_f$  = Total de fármaco adicionado à dispersão de QS

$F_s$  = Quantidade de fármaco determinada no sobrenadante das partículas

### **3.4 Análise morfológica das nanopartículas**

A análise morfológica das NP foi realizada por microscopia eletrônica de varredura. Após o processo de ultracentrifugação e separação do sobrenadante, as partículas sedimentadas foram ressuspensas em 1 mL de água purificada. Uma gota dessa suspensão foi depositada sobre um pedaço de lamínula de vidro ou mica aderido na parte superior de um *stub* de alumínio próprio para utilização no microscópio eletrônico de varredura. Esses conjuntos contendo as amostras foram secos em dessecador e, posteriormente, revestidos com ouro coloidal sob vácuo e analisados. As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se um feixe de elétron de 20 kV.

### **3.5 Distribuição granulométrica**

A determinação do diâmetro das partículas foi realizada após uma diluição 1:10 da amostra em água ultrapurificada. Essa diluição se faz necessária porque em dispersões concentradas as partículas desenvolvem movimento Browniano mais

lento, levando ao cálculo de um diâmetro maior que o real. As preparações e diluições foram mantidas em frascos de cintilação isentos de poeira. O ensaio foi realizado, observando-se um ângulo de espalhamento de 90°, temperatura de 25 °C e comprimento de onda do laser igual a 532 nm. O índice de refração das amostras era 1,33.

O fundamento dessa metodologia consiste em incidir sobre a amostra um feixe de luz laser He-Ne de 10 mW (532 nm) em ângulo de 90°, de maneira que as partículas espalhem a luz incidente. A luz espalhada é captada por uma célula fotomultiplicadora, que transforma essa luz em um sinal que é enviado para um correlator, onde os dados são processados. Esses dados são enviados para um programa aplicativo que realiza os cálculos, fornecendo os valores dos diâmetros médios das partículas, índice de polidispersidade e os respectivos desvios padrão e coeficientes de variabilidade (HASKELL, 1998).

O raio hidrodinâmico das partículas coloidais ( $r_h$ ) pode ser calculado através da equação de Einstein-Stokes, na qual é determinado o coeficiente de difusão das partículas ( $D$ ) através da variação do espalhamento de luz resultante do movimento *Browniano* das partículas.

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta r_h} \quad (\text{eq. 13})$$

Onde: K = constante de Boltzmann

T = temperatura absoluta

$\eta$  = viscosidade do meio

$r_h$  = raio hidrodinâmico

Como o coeficiente de difusão diminui quando o  $r_h$  aumenta, é necessário fazer diluições das amostras, a fim de que a concentração das partículas não interfira na difusão (KREUTER, 1994; HASKELL, 1998).

Foram realizadas 10 determinações de diâmetro e índice de polidispersidade para cada amostra, calculando-se a média e os respectivos desvios padrão e coeficientes de variação.

### ***3.6 Determinação do potencial zeta ( $\zeta$ )***

As NP obtidas foram ressuspensas com solução de KCl 0,001 mol/L, acondicionadas em cubetas de quartzo e submetidas a um campo elétrico produzido pelo Zeta Potential Analyzer (Brookhaven). As amostras foram analisadas em triplicata e foram feitas 10 determinações de  $\zeta$  para cada uma delas, calculando-se os valores médios e os respectivos desvios-padrão.

### ***3.7 Análise das partículas com etoposide por espectroscopia na região do infravermelho.***

A amostra das NP contendo ETP foi compactada com KBr, formando pastilhas. Submeteu-se as pastilhas à análise no intervalo de 500 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Foram realizadas análises de cada componente em separado (ETP, QS e TPP), das misturas físicas e das NP contendo o fármaco.

### **3.8 Análise da citotoxicidade das nanopartículas sem fármaco**

Foi utilizada uma suspensão de células peritoneais, ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Em placas de microtitulação de 96 cavidades, foram adicionados 100  $\mu$ L da suspensão de células do exsudato peritoneal em cada cavidade e 100  $\mu$ L das suspensões de NP de QS sem ETP contendo 200, 100 e 50  $\mu$ g de NP. As placas foram incubadas por 3 h a 37 °C. Após esse período, o conteúdo da placa foi vertido e foram adicionados sobre a cultura celular 100  $\mu$ L de uma solução de brometo de 3 - (4, 5 - dimetiltiazol - 2 - il) - 2 - 5 - difeniltetrazólico (MTT) a 1,0 mg/mL, diluído em tampão PBS. A placa foi incubada por mais 1 h nas mesmas condições anteriores.

Após esse período, o conteúdo da placa foi vertido novamente e 100  $\mu$ L de álcool isopropílico foram adicionados a cada cavidade. Foram utilizados como controle, somente as células e o meio de cultura RPMI - 1640, equivalente a 100% da viabilidade celular.

A leitura foi feita em leitor de ELISA automático a 540 nm e filtro de referência a 620 nm. As amostras foram ensaiadas em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular.

### **3.8 Análise de burst oxidativo**

Células fagocíticas, como os macrófagos e os leucócitos polimorfonucleares, respondem a uma variedade de estímulos na membrana, como, por exemplo, o contato com uma partícula que será fagocitada, com produção e liberação extracelular de oxigênio reativo como agente redutor. Essa seqüência coordenada de reações bioquímicas é conhecida como *burst* oxidativo. A quantificação desses

eventos pode ser usada como um indicador indireto da extensão e eficiência do processo de fagocitose.

O radical superóxido produzido durante o *burst* oxidativo é convertido em peróxido de hidrogênio com o auxílio da enzima superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio produzido foi determinado segundo o método descrito por Pick e Keisari (1980), e adaptado por Pick e Mizel (1981). Suspensões de células peritoneais na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL foram mantidas a 4°C e centrifugadas a 200 x *g* por 10 min. A seguir, as células foram ressuspensas ao volume original em solução de vermelho de fenol contendo 140 mM de NaCl; 10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0; 5,5 mM de dextrose; 0,56 mM de vermelho de fenol e peroxidase de raiz forte, tipo II (0,01 mg/mL). Alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para placas de fundo chato de cultura de tecido contendo 96 orifícios. Foram acrescentados 50 µL da suspensão contendo as NP ou somente solução de vermelho de fenol e incubadas por 1h a 37°C em atmosfera úmida. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 10 µL de NaOH 4N. A absorvância foi determinada em um leitor de Elisa automático com filtro de 620 nm, contra branco constituído de solução de vermelho de fenol e NaOH 4N. Os resultados foram expressos em nmols de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/2x10<sup>5</sup> células peritoneais, a partir de uma curva analítica estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações molares conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão de vermelho de fenol.

### **3.9 Ensaio de solubilidade**

Para o ensaio de solubilidade, 10 mg de ETP, quantidade suficiente para saturar a solução, foram transferidos pra um balão volumétrico de 50 mL completando-se o volume com solução tampão acetato 0,1 M pH 7,4. As soluções foram mantidas sob agitação magnética a temperatura ambiente. As amostras foram filtradas e analisadas por espectroscopia no UV em comprimento de onda de 284 nm, observando intervalos de tempo de 18, 24 e 48 h. As leituras foram feitas em triplicata.

### **3.10 Ensaio de liberação in vitro**

Para a realização do ensaio de liberação *in vitro*, as NP contendo ETP foram preparadas como descritas anteriormente. Após a separação por ultracentrifugação, as NP foram ressuspensas em 3 mL de tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,5 (USP 26).

Os tubos contendo as amostras foram colocados em uma incubadora tipo *shaker*, mantidos a 37 °C e agitados a 50 rpm. As amostras foram coletadas em intervalos de 1 h, perfazendo um período total de ensaio de 8 h. As NP foram separadas por ultracentrifugação a 20000 x g e o sobrenadante analisado por espectrofotometria no UV em 284 nm. As análises foram realizadas em duplicata.

## V RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

#### 1.1 Purificação da quitosana

A técnica utilizada foi adaptada daquela descrita na dissertação de mestrado de Lucinda (1999); e no artigo de Jiang; Chen e Zhong (2003), utilizando-se a liofilização como processo de secagem ao invés do arraste de água com acetona.

A matéria-prima, de grau de pureza prático, se apresentava como um pó fino e após o processo de purificação e liofilização, obteve-se um material de característica esponjosa, quebradiço e de difícil trituração.

A QS, ao contrário da quitina, pode ser facilmente dispersada em soluções ácidas diluídas com pH inferior a 6. Isso possibilita a sua purificação através da dissolução em ácidos diluídos e, após filtração, precipitação com a adição de uma solução alcalina forte. Dessa forma eliminam-se impurezas insolúveis ou que não apresentem o mesmo comportamento de solubilidade em ácidos diluídos, ficando retidas na filtração.

Com esse procedimento, o rendimento médio do produto purificado foi de  $78,92\% \pm 5,78$ , como mostra a Tabela 2.

**Tabela 2:** Rendimento do procedimento de purificação da QS.

QS Impura (g)	QS Purificada (g)	Rendimento (%)
2,0001	1,3832	69,13
2,0003	1,5662	78,30
2,0000	1,6342	81,71
2,0005	1,6424	82,10
2,0003	1,6671	83,34
<i>Rendimento Médio</i>		$78,92 \pm 5,78$

### 1.2 Determinação da densidade relativa da quitosana

A densidade relativa  $d$ , padronizada nas farmacopéias, se relaciona com a massa e, portanto, prefere-se denominá-la massa específica relativa. Define-se pela razão de massas entre volumes iguais da substância em questão e a água destilada, a uma determinada temperatura (VOIGT; BORNSCHEIN, 1982).

Como a densidade é uma constante que depende da temperatura, todas as análises foram realizadas em sala climatizada a 20 °C. A Tabela 3 mostra os resultados encontrados após a realização dos cálculos descritos. A análise foi feita em triplicata.

**Tabela 3:** Densidade relativa de diferentes dispersões de QS.

Solução de QS (g/dL)	Densidade Relativa
0,03	$1,0002 \pm 2,41 \cdot 10^{-4}$
0,05	$1,0006 \pm 1,50 \cdot 10^{-4}$
0,10	$1,0007 \pm 9,46 \cdot 10^{-5}$
0,13	$1,0008 \pm 4,73 \cdot 10^{-5}$
0,15	$1,0009 \pm 1,17 \cdot 10^{-4}$
0,17	$1,0010 \pm 3,56 \cdot 10^{-5}$
0,20	$1,0013 \pm 1,55 \cdot 10^{-5}$
0,25	$1,0014 \pm 4,04 \cdot 10^{-5}$
0,30	$1,0016 \pm 2,02 \cdot 10^{-4}$
Ácido Acético 0,1 mol/L	$1,0010 \pm 3,72 \cdot 10^{-4}$

### 1.3 Determinação da viscosidade intrínseca da quitosana

A viscosidade intrínseca da QS foi obtida a partir da regressão linear dos valores da viscosidade reduzida das soluções de QS em várias concentrações. Foram utilizadas as mesmas soluções para as determinações de Densidade Relativa e Viscosidade Dinâmica. Os valores das viscosidades são mostrados na tabela 4. as análises foram feitas em triplicata.

Tabela 4: Valores das viscosidades de diferentes dispersões de QS

Concentração das soluções de QS (g/dL)	Viscosidade dinâmica (mPa.s)	Viscosidade Específica	Viscosidade Reduzida (dL/g)
0,05	1,52	0,62	12,412 ± 0,3998
0,10	2,11	1,23	12,320 ± 0,139
0,13	2,32	1,46	11,272 ± 0,165
0,15	2,53	1,69	11,274 ± 0,800
0,17	2,80	1,94	11,407 ± 0,216
0,20	2,88	2,06	10,298 ± 0,069
0,25	3,19	2,39	9,564 ± 0,041
0,30	3,66	2,89	9,640 ± 0,186

A figura 4 mostra a regressão linear dos valores de viscosidade reduzida (dL/g) versus a concentração das dispersões poliméricas (g/dL), para a determinação da viscosidade intrínseca da QS.

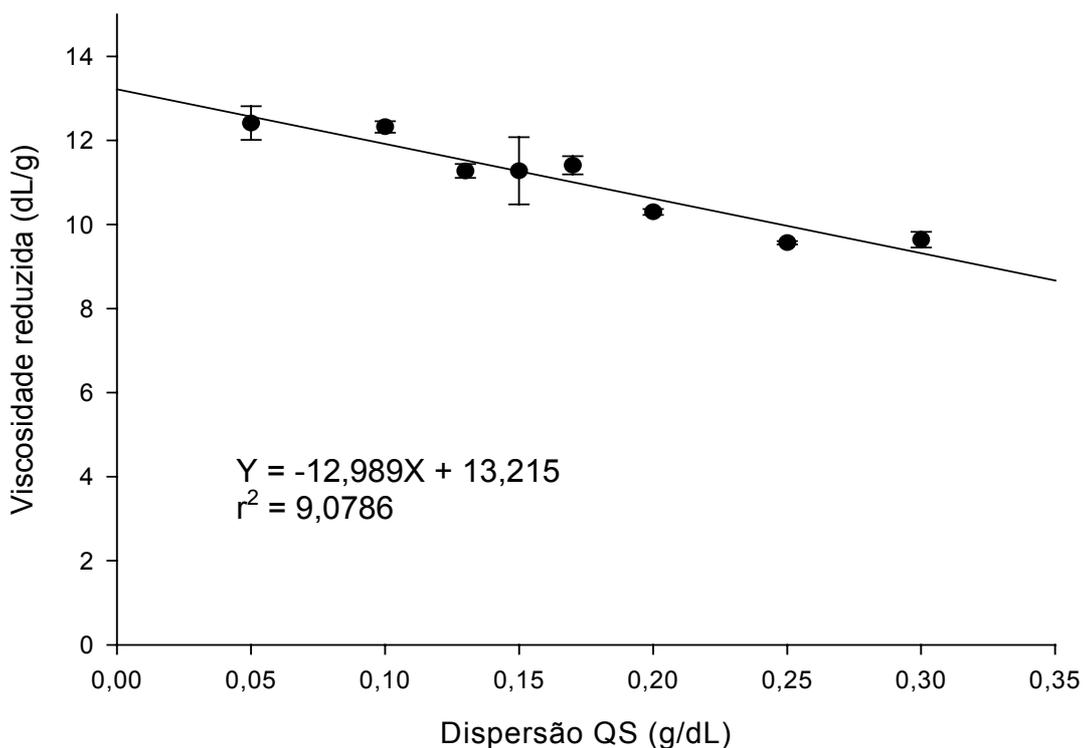


Figura 4: Determinação da viscosidade intrínseca da QS.

Se a concentração tende a zero, como descrito pela equação 5 no capítulo anterior, podemos observar que o gráfico tende para o coeficiente linear da equação obtida através da regressão linear dos valores de viscosidade reduzida. Portanto, a viscosidade intrínseca encontrada para a dispersão de QS foi de 13,215 dL/g.

Chen e Tsaih (1998), demonstraram que à medida que se aumenta a concentração da dispersão de QS, a viscosidade reduzida da mesma também aumenta, isento os fatores temperatura, peso molecular, pH e força iônica das dispersões, avaliados separadamente. Em trabalho anterior (1997), esses mesmos autores avaliaram a influência do peso molecular da QS na determinação da viscosidade e na conformação espacial da molécula na dispersão. A viscosidade intrínseca é o parâmetro mais utilizado nos estudos conformacionais de QS para se determinar o valor do expoente  $a$  na equação de Mark - Houwink (CHEN; TSAIH, 1998).

Como se trata de uma amostra de grau prático, é possível afirmar que existem cadeias de diversos tamanhos na dispersão, apresentando conformações espaciais diferentes devido aos diferentes pesos moleculares dessas cadeias.

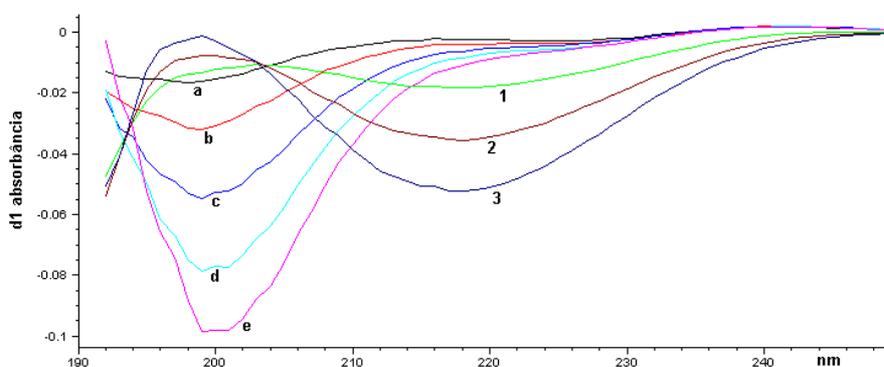
#### ***1.4 Determinação do grau de desacetilação da quitosana***

As características da QS dependem principalmente do GD, da distribuição dos grupos acetil na cadeia, do tamanho da cadeia polimérica e do peso molecular. À medida que o valor de GD do material quitinoso excede 50%, este se torna solúvel em soluções aquosas de ácidos e passa a ser chamado QS (TSAIH; CHEN, 1997). O grau de desacetilação é uma das características mais importantes da QS. Ele determina o conteúdo de grupos amino livres no polissacarídeo, diferenciando a QS

da quitina e influenciando principalmente a sua solubilidade e a sua reatividade com outros polieletrólitos, além das propriedades biológicas da QS (PETER, 1995; JIANG; CHEN; ZHONG, 2003).

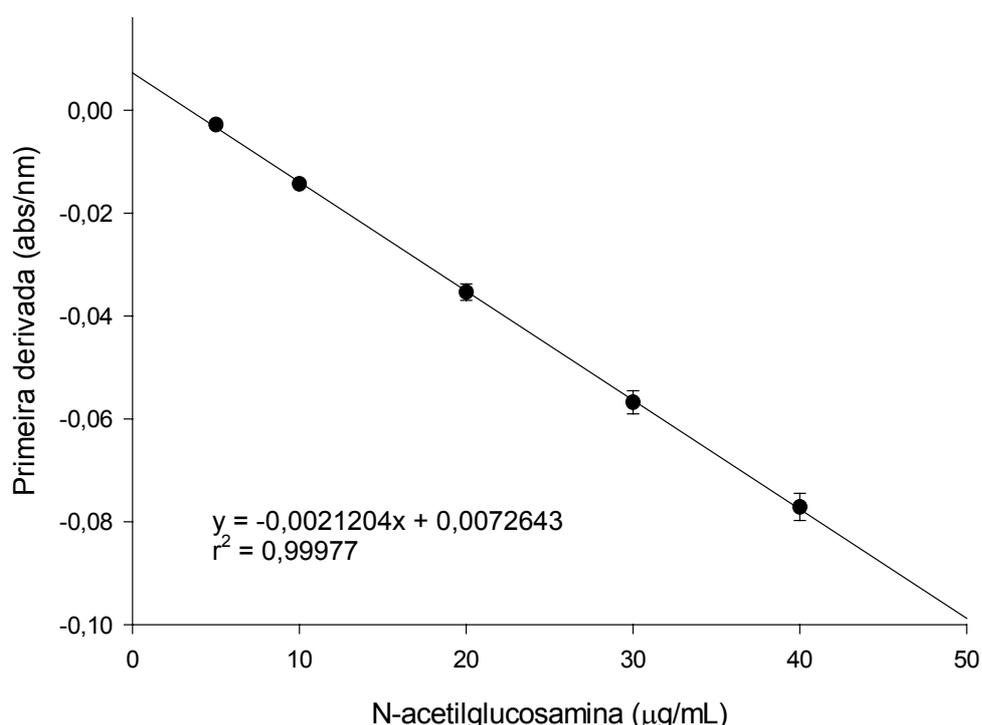
A NAG, monômero que compõe a cadeia de quitina e QS, apresenta absorção máxima no UV em 193 nm (MERCK INDEX, 2001). A presença de ácido acético na solução de NAG altera consideravelmente o comprimento de onda de máxima absorção deste composto.

Analisando as soluções de ácido acético, observou-se a convergência dos espectros de UV-VIS de primeira derivada para um ponto comum em 203,2 nm. Este ponto, conhecido como ponto isobéstico, corresponde ao comprimento de onda de máxima absorção da NAG, tornando a determinação de NAG independente da concentração da solução de ácido acético, como mostra a Figura 5.



**Figura 5:** Espectros de UV-VIS de primeira derivada da absorvância de soluções de ácido acético e de soluções de NAG em diferentes concentrações. Ácido acético: 1) 0,01 mol/L; 2) 0,02 mol/L; 3) 0,03 mol/L. N-acetilglicosamina: a) 5  $\mu\text{g/mL}$ ; b) 10  $\mu\text{g/mL}$ ; c) 20  $\mu\text{g/mL}$ ; d) 30  $\mu\text{g/mL}$ ; e) 40  $\mu\text{g/mL}$ . Ponto isobéstico das soluções de ácido acético em 203,2 nm.

Para determinação do GD da amostra de QS por este método, foi obtida a curva analítica da NAG em solução de ácido acético 0,01 mol/L. Com os valores das diferenças entre a primeira derivada dos espectros das soluções de NAG e o valor do ponto isobéptico em 203,2 nm foi possível traçar a curva analítica da NAG, como é mostrada na figura 6.



**Figura 6:** Curva analítica da NAG em ácido acético 0,01 mol/L.

Amostras de QS foram purificadas com diferentes soluções de NaOH, e então foram preparadas dispersões de QS 0,1 mg/mL em ácido acético 0,01 mol/mL. As leituras em primeira derivada de absorvância foram realizadas no comprimento de onda do ponto isobéptico.

Os valores foram corrigidos em relação ao ponto isobéptico do ácido acético e então aplicados na equação da reta, encontrando-se a concentração de NAG nas

soluções. A Tabela 5 relaciona os valores médios do GD dessas amostras, em triplicata.

**Tabela 5:** Valores de GD de QS purificadas com diferentes soluções de NaOH

<b>Concentração de NaOH mol/L</b>	<b>Grau de desacetilação (%)</b>
<b>0,5</b>	73,99 ± 0,289
<b>1,0</b>	74,08 ± 1,061
<b>2,0</b>	74,69 ± 0,028
<b>3,0</b>	74,75 ± 1,287
<b>4,0</b>	75,51 ± 1,209

Pode-se observar que à medida que se aumenta a concentração da solução de NaOH, o valor do GD também aumenta, apesar da variação ser pequena. Isso mostra que a desacetilação da QS se faz por uma reação de hidrólise alcalina. Essa reação pode ser otimizada com o aumento da concentração de NaOH e elevação da temperatura, bem como o tempo de reação. Foi possível obter QS com GD igual a 90% submetendo uma massa conhecida de QS a uma solução de NaOH 50% p/V e mantendo a 80 °C por 2h, seguindo o modelo proposto por Sabnis e Bloch (2000).

É possível modular o GD em função do tempo de reação entre a QS e o NaOH concentrado a uma temperatura elevada (CHANG et al, 1997; SABNIS; BLOCH, 2000). Conseqüentemente, modula-se a capacidade de complexação do polímero, haja visto que no pH de dissolução (pH < 6) poderá ter mais ou menos grupamentos amino protonados com capacidade de formar ligação com grupamentos químicos de carga oposta (KIANG et al, 2004).

Assim sendo, o GD influencia diretamente no tamanho das partículas a serem obtidas, na faixa de concentração dos eletrólitos envolvidos para a obtenção do sistema nanoparticulado e na incorporação do fármaco que se deseja encapsular.

Para a realização do trabalho, as amostras foram preparadas com NaOH 1,0 mol/L, apresentando um GD igual a  $74,08\% \pm 1,061$ .

### 1.5 Determinação do peso molecular da quitosana

O peso molecular da QS foi determinado pelo método viscosimétrico, a partir da viscosidade intrínseca da solução de QS usando a equação de Mark-Houwink, como pode ser visualizado na Tabela 6 (RATHKE; HUDSON, 1994).

Resultados apresentados por Wang e colaboradores, 1991, mostraram que, com o aumento do grau de desacetilação, o valor de  $a$  diminui enquanto o valor de  $K$  aumenta. Isto pode estar relacionado com a diminuição da formação de pontes de hidrogênio entre grupos amino protonados e os grupos hidroxila do C-6 da molécula (RATHKE; HUDSON, 1994).

**Tabela 6:** Valores das constantes viscosimétricas ( $K$  e  $a$ ), da viscosidade intrínseca ( $[\eta]$ ) e do peso molecular ( $M_w$ ) da QS.

Dados	Valores
$K$	$2,46 \times 10^{-4}$
$a$	1,06
$[\eta]$	13,215 dL/g
$M_w$	29 kDa

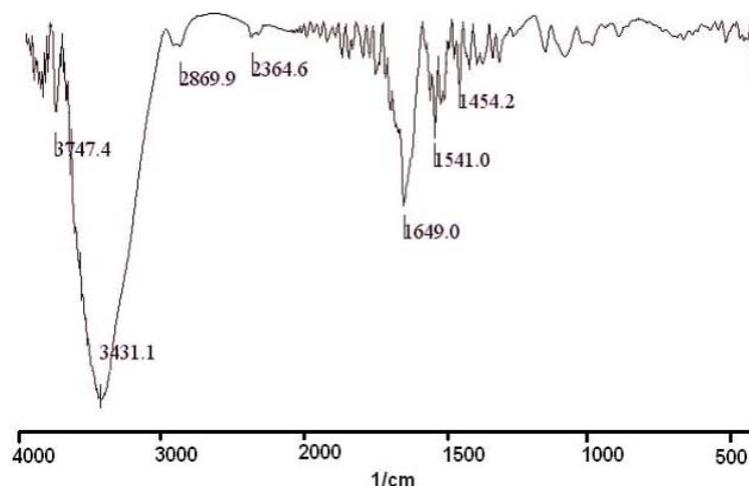
O peso molecular determina o tamanho e a flexibilidade da cadeia das moléculas de QS em solução. A flexibilidade pode ser manipulada utilizando moléculas com diferentes GD, diferentes pH de solução ou força iônica com o intuito de controlar o tamanho do poro, a resistência mecânica ou a permeabilidade da partícula que se deseja obter. O estudo conformacional se faz importante no controle das propriedades reológicas das soluções poliméricas e nas características da partícula a ser obtida (TSAIH; CHEN, 1997).

A amostra apresentou um peso molecular baixo. Valor esse condizente com o valor da viscosidade intrínseca da amostra. Cadeias tão pequenas de polímero podem formar partículas bastante pequenas e com alta resistência mecânica, no entanto com uma baixa eficiência de encapsulação do fármaco.

### **1.6 Análise espectroscópica da quitosana na região do infravermelho**

O espectro de infravermelho da QS apresentou bandas na região de 1650 a 1655  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento do grupo C=O do grupo acetamido e, entre 1560 a 1610  $\text{cm}^{-1}$ , referente à deformação axial do grupo  $\text{NH}_2$  no plano, como ilustrado na Figura 7 (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1979; LORENZO-LAMOSA et al., 1998).

A reação de desacetilação da quitina em solução alcalina sob tratamento drástico, não permite a desacetilação total do polímero, levando a obtenção de um produto parcialmente desacetilado (LI et al., 1992; RATHKE; HUDSON, 1994). A banda em 1649  $\text{cm}^{-1}$  indica a presença de grupos acetamida remanescentes da reação de purificação, confirmando que por esse método não é possível desacetilar o polímero por completo.



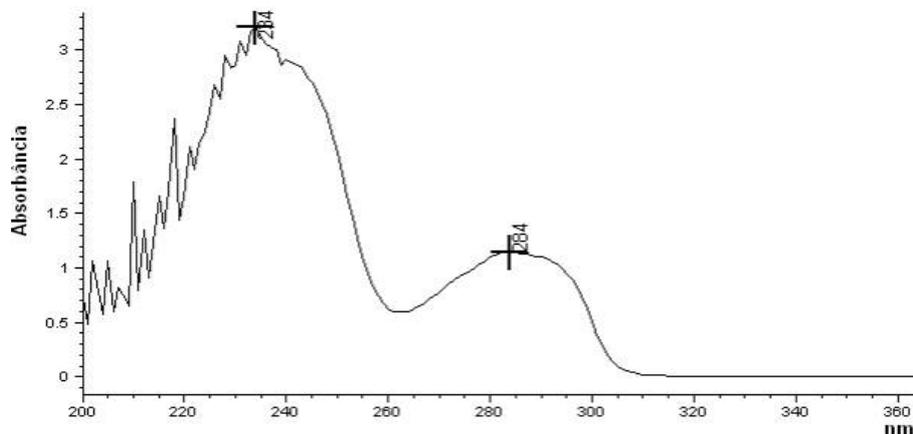
**Figura 7:** Espectro da QS purificada no Infravermelho

## 2 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE DE ETOPOSIDE POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV.

### 2.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{max}$ )

O ETP apresenta absorvidade molar de 4245, com comprimento de onda de máxima absorção em 283 nm em metanol (MERCK INDEX, 2001).

Para iniciar o estudo foi preciso verificar o comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{max}$ ) em que a solução de ETP absorve em solução de ácido acético. Preparou-se uma solução contendo 140  $\mu\text{g/mL}$  em solução de ácido acético 0,1 mol/L, a qual foi submetida à varredura no ultravioleta. Verificou-se que o  $\lambda_{max}$ , nessas condições experimentais, foi 284 nm (figura 8).

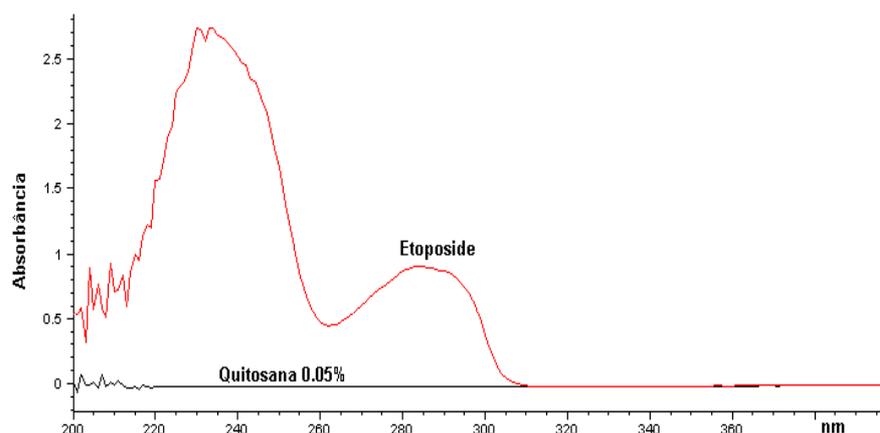


**Figura 8:** Espectro de varredura do ETP. Solução 140  $\mu\text{g/mL}$  em ácido acético 0,1 mol/L.

### 2.2 Especificidade e seletividade

Consiste na capacidade do método em medir exatamente a quantidade de um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas e produtos de degradação (ANVISA, 2003; ICH, 1996).

Numa análise de varredura para se determinar o comprimento de onda de máxima absorção do ETP, pode-se averiguar que a dispersão de QS 0,05% em ácido acético 0,1 mol/L não absorve no mesmo comprimento de onda. Isso demonstra a especificidade do método, ilustrada na figura 9.



**Figura 9:** Especificidade na absorção de ETP (140 µg/mL) em uma dispersão de QS 0,05% p/V em 284 nm.

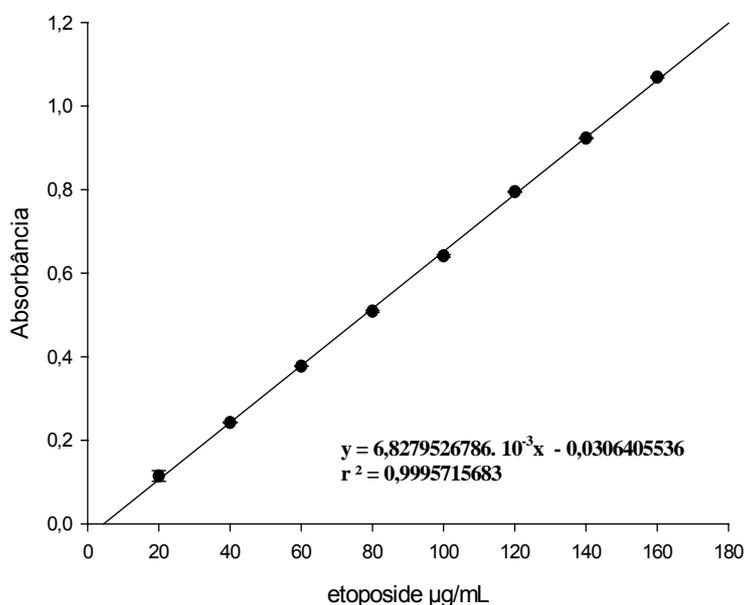
A figura 9 mostra que é perfeitamente possível quantificar o fármaco nesse comprimento de onda já que a QS não interfere na determinação do ETP nesse método.

### ***2.3 Curva analítica do etoposide.***

Com base nas informações do comprimento de onda de máxima absorvância e da especificidade, foi possível construir uma curva analítica de ETP em ácido acético 0,1 mol/L utilizando as seguintes concentrações de fármaco: 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160 µg/mL, fazendo-se as respectivas leituras no comprimento de onda 284 nm. Os valores médios das triplicatas são apresentados na tabela 7 e estão graficamente representados na figura 10.

**Tabela 7:** Análise espectrofotométrica de ETP na região do UV

Concentração de ETP µg/mL	Valores de absorvância
20	$0,1113 \pm 2,99 \times 10^{-4}$
40	$0,2409 \pm 3,03 \times 10^{-3}$
60	$0,3754 \pm 9,52 \times 10^{-4}$
80	$0,5079 \pm 5,34 \times 10^{-4}$
100	$0,6350 \pm 6,19 \times 10^{-4}$
120	$0,7741 \pm 8,68 \times 10^{-4}$
140	$0,9069 \pm 2,73 \times 10^{-3}$
160	$1,0360 \pm 1,32 \times 10^{-3}$

**Figura 10:** Curva analítica de ETP em solução de ácido acético 0,1 mol/L. Comprimento de onda 284 nm.

Como pode ser observado na figura 10, é possível utilizar essa curva analítica para análises quantitativas do fármaco por apresentar uma boa correlação entre concentração e absorvância.

Os compêndios oficiais, como a Farmacopéia Americana, a Farmacopéia Européia e a Britânica indicam a análise desse fármaco pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência. Daí a necessidade de se fazer a avaliação

dos parâmetros referentes à validação, demonstrando assim a viabilidade do método.

Validar um método de análise quantitativa consiste em garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados (ICH, 1996; ANVISA, 2003).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera validadas as metodologias analíticas descritas em farmacopéias ou compêndios oficiais reconhecidos.

O método que apresentar uma avaliação segura dos seguintes parâmetros analíticos: especificidade e seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, também poderá ser considerado validado (ANVISA, 2003).

#### **2.4 Linearidade**

A linearidade é a capacidade do método de demonstrar que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003).

A análise quantitativa do ETP em presença de QS pelo método proposto apresentou uma linearidade na faixa de 20 µg/mL até 160 µg/mL, que foi a faixa de concentração escolhida para a realização do trabalho. A linearidade está expressa pelo coeficiente de correlação da curva analítica:  $r^2 = 0,99957$ .

## 2.5 Precisão

Precisão é a avaliação da proximidade das respostas obtidas quando uma série de medidas for realizada para uma mesma amostra, em idênticas condições de teste. Esta é considerada em três níveis, verificada por no mínimo nove determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações podendo ser uma baixa, uma média e uma alta analisadas em triplicata. O valor máximo aceitável para o coeficiente de variação (CV) é 5% (ANVISA, 2003).

Os resultados da análise de precisão são mostrados na tabela 8.

**Tabela 8:** Cálculo da precisão do método

Amostras	Valores de absorvância para diferentes concentrações de ETP		
	48,78 µg/mL	95,30 µg/mL	139,54 µg/mL
1	0,287	0,627	0,987
2	0,289	0,622	0,981
3	0,289	0,620	0,977
Média	0,289	0,623	0,982
Desvio Padrão	$2,51 \times 10^{-4}$	$3,306 \times 10^{-3}$	$4,936 \times 10^{-3}$
CV%	0,0867	0,531	0,503

Os resultados do teste de precisão mostraram, em todos os níveis de concentração, valor para o CV bem menor que 4%, valor este que é preconizado pelos órgãos oficiais para esse teste (ICH, 1996; ANVISA, 2003).

## 2.6 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, no método de análise empregado sob as condições experimentais estabelecidas. Pode

ser calculado com base no desvio padrão (DP) de respostas de diferentes concentrações próximas ao suposto limite de detecção e na inclinação (IC) da curva analítica (ICH, 1996; ANVISA, 2003).

O limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas. Essa determinação pode ser feita pelo método de cálculo que se baseia no DP da resposta e na inclinação da curva analítica (ICH, 1996; ANVISA, 2003).

Os resultados das leituras são apresentados na tabela 9.

**Tabela 9:** Ensaio para determinação dos limites de detecção e de quantificação do método

<b>Amostras</b>	<b>15 µg/mL</b>	<b>20 µg/mL</b>	<b>30 µg/mL</b>
<b>Valores de Absorvância</b>	6,810 x 10 <sup>-2</sup>	0,133	0,176
	6,886 x 10 <sup>-2</sup>	0,133	0,176
	6,912 x 10 <sup>-2</sup>	0,133	0,176
<b>Media</b>	6,869 x 10 <sup>-2</sup>	0,133	0,176
<b>Desvio padrão</b>	5,28 x 10 <sup>-4</sup>	5,29 x 10 <sup>-5</sup>	1,36 x 10 <sup>-4</sup>

Admitindo como desvio padrão médio o valor  $2,389 \times 10^{-4}$  e levando-se em consideração o coeficiente angular da curva analítica, temos os seguintes valores para os limites de detecção e de quantificação:

$$\text{Limite de detecção} = 0,105 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Limite de quantificação} = 0,350 \mu\text{g/mL}$$

Esses valores denotam a sensibilidade do método e comprovam que se pode trabalhar com segurança dentro da faixa de concentração estabelecida na curva analítica.

### **3.6 Exatidão**

A recuperação ou exatidão de um método pode ser definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ICH, 1996; ANVISA, 2003). Os Compêndios Oficiais e a legislação vigente prevêm que o ensaio de determinação da exatidão deve ser realizado para análise quantitativa de fármacos em matéria prima e em formas farmacêuticas e, também, para impurezas (ICH, 1996; ANVISA, 2003).

A ANVISA estabelece que para a determinação quantitativa do analito em formas farmacêuticas ou matérias primas, os limites percentuais do teor do analito devem estar contidos no intervalo de linearidade compreendido entre 80% e 120% da concentração teórica do teste.

O teste de recuperação, ou exatidão, foi realizado em triplicata e os resultados são mostrados na tabela 10.

**Tabela 10:** Resultados do teste de recuperação do ETP em solução de QS.

<b>Concentração teórica (µg/mL)</b>	<b>Concentração determinada (µg/mL)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>48,78</b>	46,70	95,74 ± 0,4155
<b>95,38</b>	95,98	100,71 ± 0,5589
<b>139,54</b>	148,26	106,25 ± 0,5179

A tabela nos mostra que a análise satisfaz a exigência legal para esse teste, que é uma recuperação de 80 a 120% do teor teórico calculado (ANVISA, 2003).

Com todos esses parâmetros avaliados, pode-se dizer que a metodologia adotada é segura e expressa resultados verdadeiros e condizentes.

### **3 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA**

#### ***3.1 Formulação das nanopartículas de quitosana***

Dado que a QS é um polieletrólito catiônico, o estudo foi baseado na indução da sua geleificação controlando sua interação com o poliânion TPP (CALVO et al., 1997a).

Nesse sentido, é esperado que as ligações intra e intermoleculares formadas entre TPP e os grupamentos amino positivamente carregados da cadeia de QS sejam responsáveis pelo sucesso do processo (CALVO et al., 1997b).

As partículas obtidas por este método possuem uma boa capacidade para veicular proteínas, peptídeos, oligonucleotídeos, plasmídeos e fármacos protéicos (PAN et al., 2002).

Para investigar a formação de NP de QS por geleificação ionotrópica, foi adotado um protocolo similar ao desenvolvido por Calvo e colaboradores (1997a), relatado também por Pan e colaboradores (2002). As suspensões formadas com a adição de TPP à dispersão de QS foram observadas a olho nu e classificadas como suspensão opalescente (região de interesse e com maior probabilidade de formação das partículas), solução (não é possível se observar a formação de precipitado algum) e agregados (região onde se observa a formação de uma grande massa precipitada).

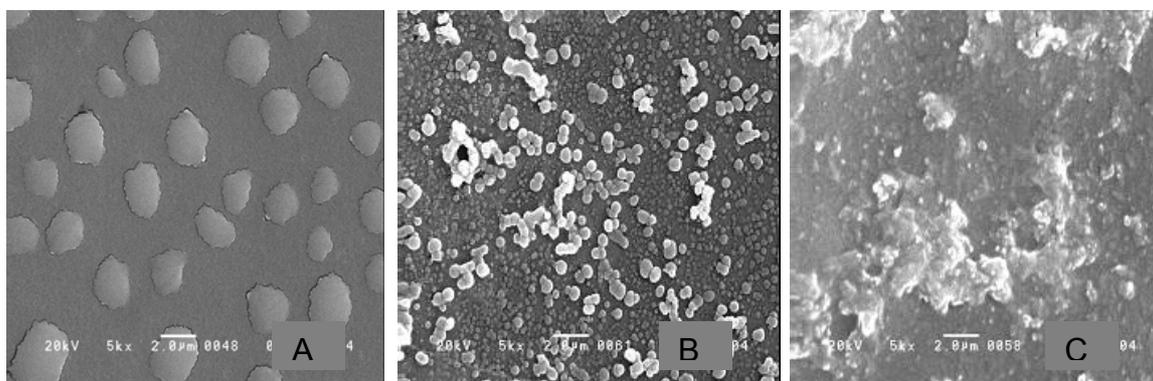
Dessa forma, foi possível determinar uma zona de maior probabilidade de obtenção das NP. As razões de volume e concentração da QS e do TPP que delimitam essa formação são mostradas na Tabela 11.

**Tabela 11:** Estudo da formulação das NP de QS. Volumes (mL) variados de TPP adicionados a 5 mL de QS.

QS	0,1%					0,5%					1,0%				
TPP	0,5	1,0	2,0	2,5	3,0	0,5	1,0	2,0	2,5	3,0	0,5	1,0	2,0	2,5	3,0
0,1%	S	Op	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
0,5%	S	S	Op	Op	Op	Op	Op	A	A	A	Op	A	A	A	A
1,0%	S	S	Op	Op	Op	S	Op	Op	A	A	Op	A	A	A	A

(S) solução; (Op) suspensão opalescente; (A) agregado

Para ilustração das classificações apresentadas na tabela acima, são mostradas na figura 11 as fotomicrografias de cada uma.

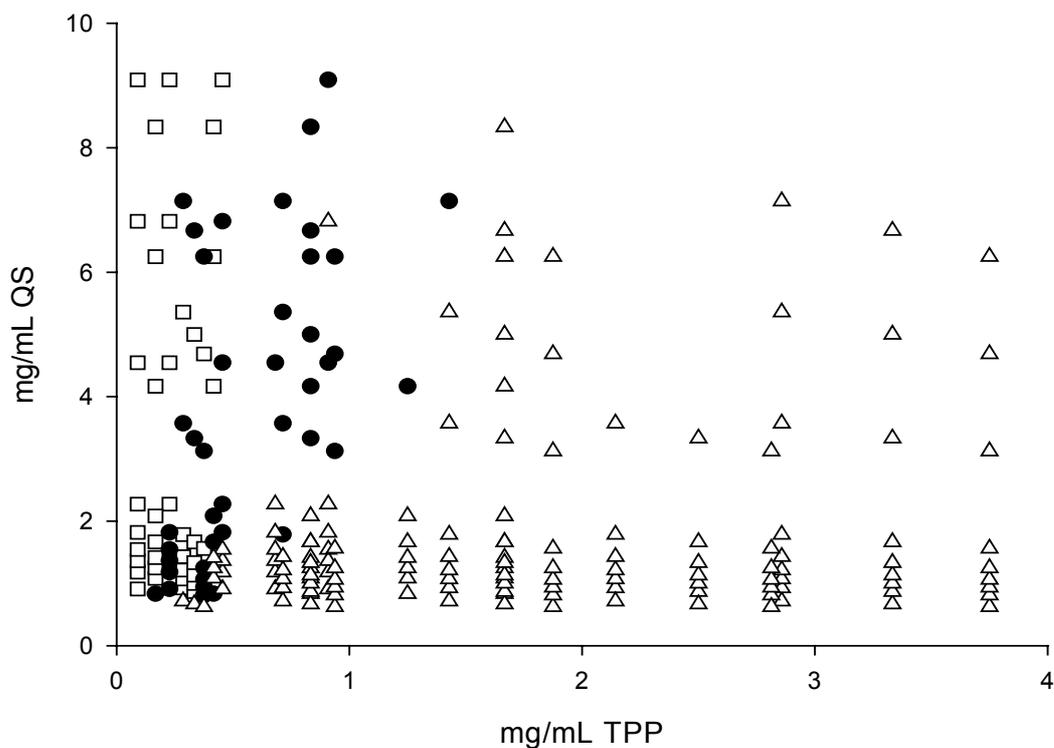


**Figura 11:** Diferentes tipos de materiais obtidos com o estudo de formulação das NP de QS: A) solução; B) NP; C) agregados

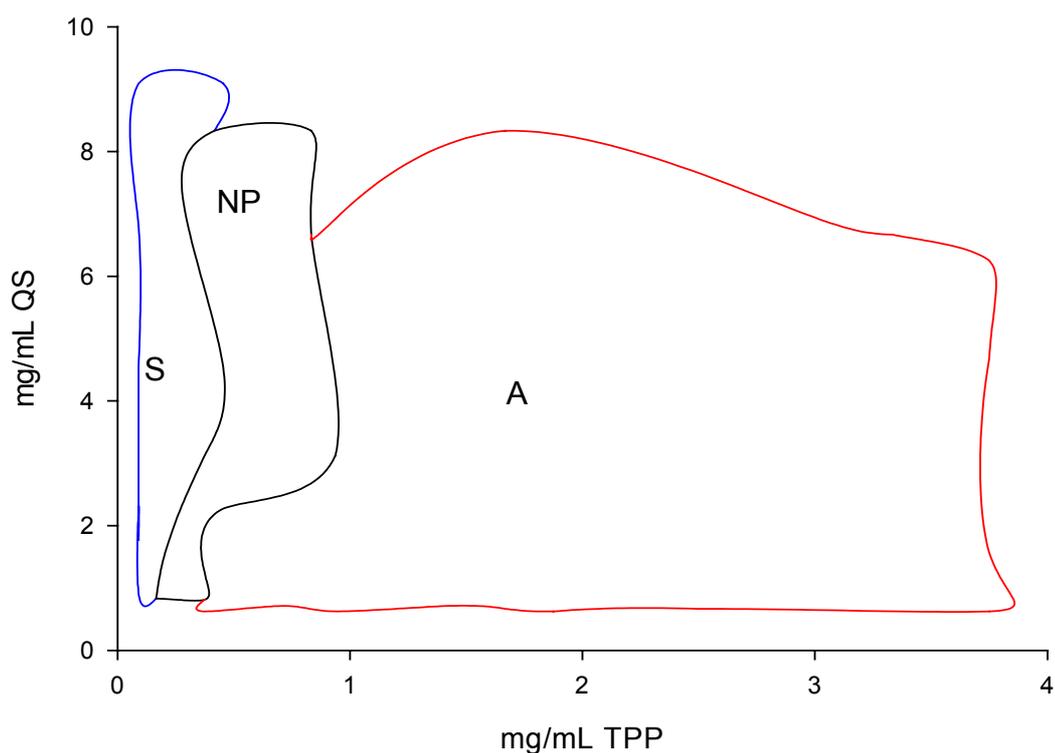
Observa-se na figura 11A, resíduos de material e a não formação das partículas e na figura 11C, a massa disforme característica do material classificado como agregado.

O estudo foi então detalhado para a montagem do diagrama de fases (figura 13), com o intuito de se estabelecer com maior segurança a região de formação das

NP. Os resultados mostrados na figura 12 são mostrados em função da concentração final de cada componente (CALVO et al., 1997a; PAN et al., 2002).



**Figura 12:** Estudo de formação das NP de QS mostrado em função das concentrações finais dos componentes. (□) Solução; (●) Nanopartículas; (Δ) Agregados.

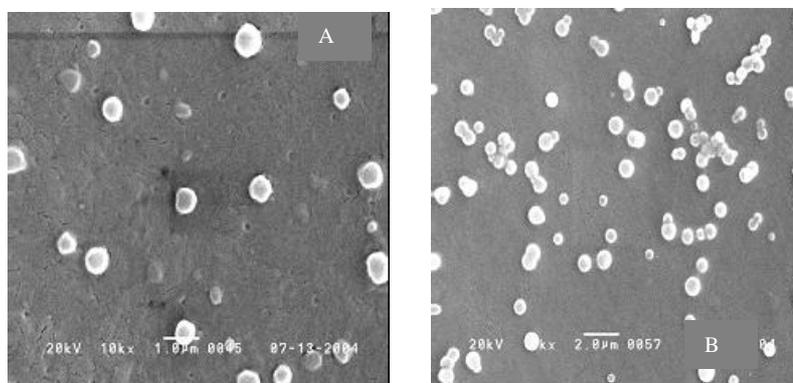


**Figura 13:** Delineamento da região de formação das NP. (A) Agregados; (NP) Nanopartículas; (S) Solução.

Pode-se observar que as condições de formação das NP são extremamente restritas, devendo ser cautelosamente observadas. As partículas são formadas com segurança na proporção de massa QS:TPP entre 4:1 e 5:1 (4:0,8). Janes e colaboradores (2001), publicaram que as NP obtidas por reticulação iônica se formam numa faixa de razão de massa QS:TPP de 3:1 a 6:1. As condições determinantes são a pureza da QS, o grau de desacetilação, as concentrações e os volumes dos reagentes utilizados.

As áreas de transição são regiões onde é possível encontrar mais de uma das caracterizações citadas (PAN et al., 2002), mas não foram delimitadas nesse trabalho. Os resultados sugerem que a concentração final máxima de TPP para a formação de NP seja 1 mg/mL. Acima desse valor pode ocorrer a formação de agregados.

As fotomicrografias das NP obtidas nas proporções 4:1 e 4:0,8 são apresentadas na figura 14.



**Figura 14:** Fotomicrografias de NP de QS obtidas segundo as seguintes razões de massa QS:TPP: A) 4:1; B) 4:0,8

Todo o estudo de obtenção foi desenvolvido utilizando QS 74% GD. Para a formulação das NP utilizando QS com diferente GD, todo o estudo deve ser repetido. Como as condições de formação são bastante restritas, não se pode criar uma regra geral para a formação das NP de QS utilizando TPP, devendo-se sempre conjugar a concentração e o volume destas soluções.

Para a incorporação do fármaco, o ETP foi dissolvido em acetonitrila numa concentração de 2 mg/mL e adicionado à dispersão de QS para em seguida adicionar a solução de TPP sob agitação para a formação das NP. Pela afinidade da acetonitrila com a água, pode ocorrer uma mudança da constante dielétrica da solução do fármaco e este venha a se precipitar formando pequenos cristais que são capturados pelo polímero no momento da reticulação e formação da partícula. De Campos e colaboradores (2001), observaram a formação desses cristais de ordem nanométrica para a incorporação de ciclosporina A em NP de QS obtidas pelo mesmo método.

### **3.2 Distribuição granulométrica**

Para a determinação do diâmetro médio das NP foi realizada uma análise conhecida como espalhamento dinâmico de luz. Essa ferramenta foi utilizada para se avaliar o diâmetro médio efetivo das NP obtidas pelo método em estudo.

Partículas obtidas com as razões de massa QS:TPP 4:1 e 4:0,8 foram avaliadas com diferentes tempos de agitação magnética para estipulação do tempo de agitação que promovesse o menor diâmetro das NP. Kreuter (1994), demonstra que o tempo de agitação aumenta o diâmetro efetivo das partículas em diversos processos de obtenção.

Os resultados são mostrados nas figuras 15 e 16.

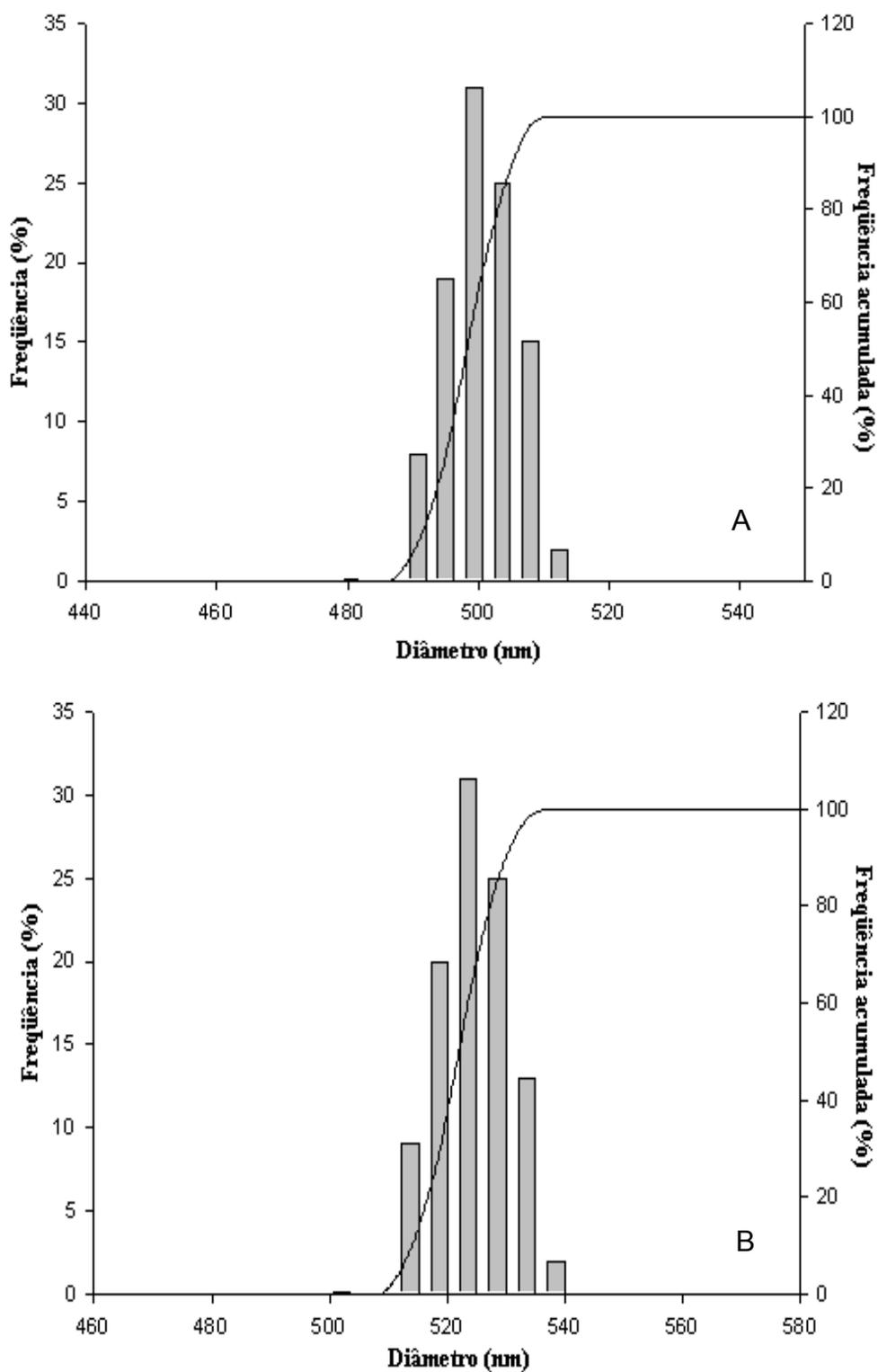
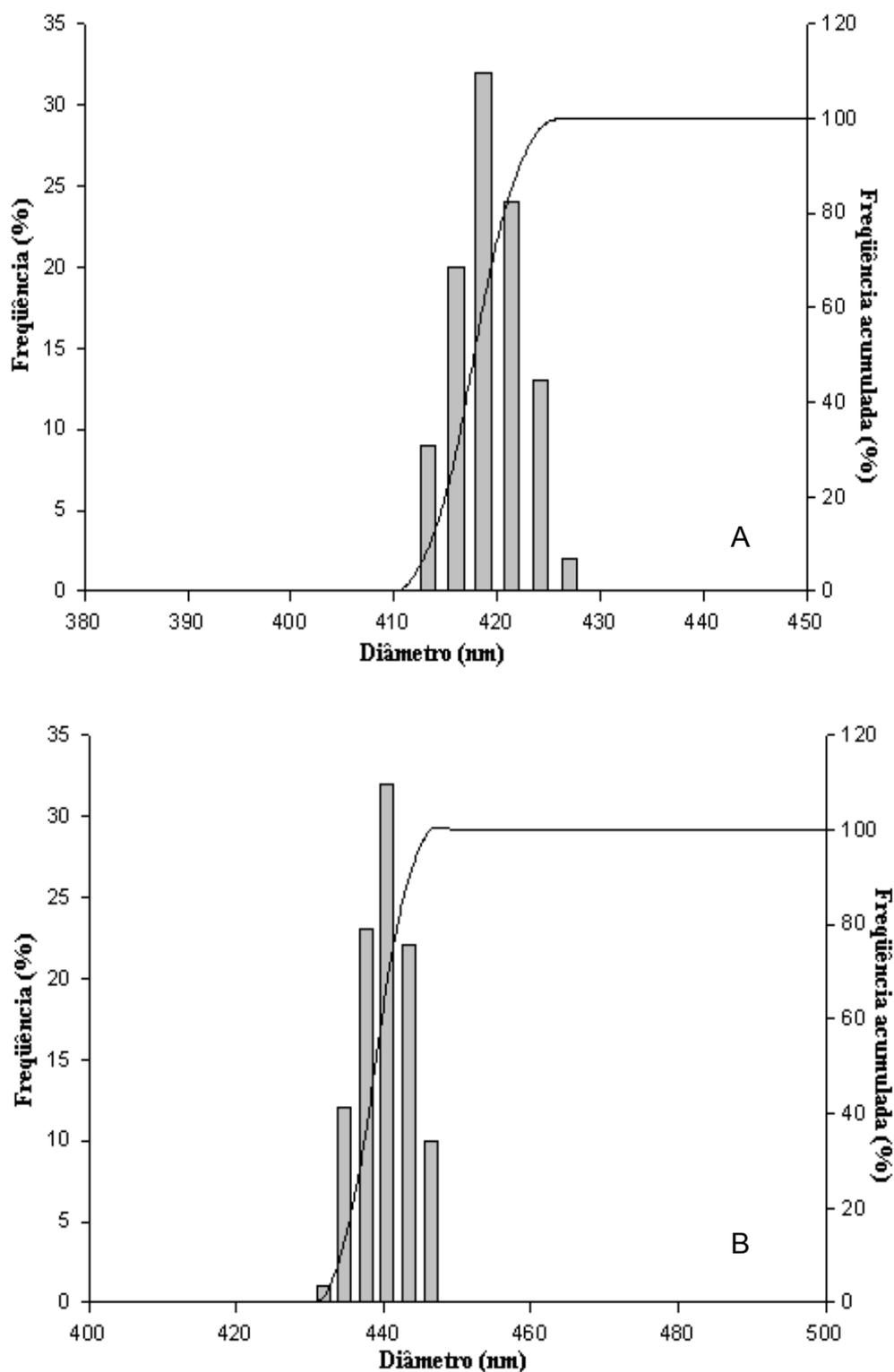


Figura 15: NP 4:1 QS:TPP preparadas com diferentes tempos de agitação magnética: A) 5 min B) 10 min



**Figura 16:** NP 4:0,8 QS:TPP preparadas com diferentes tempos de agitação magnética : A) 5 min B) 10 min

Os resultados mostram que um maior tempo de agitação realmente aumenta o diâmetro médio efetivo das partículas, confirmando a observação de Kreuter (1994). O aumento do tempo de agitação confere uma maior energia cinética fornecida as NP. Isso favorece a aglomeração de partículas e um conseqüente aumento no diâmetro determinado pelo aparelho de *Light Scattering*.

**Tabela 12:** Diâmetro efetivo de NP obtidas com diferentes razões de massa

<b>QS:TPP</b>	<b>4:1</b>		<b>4:0,8</b>	
<b>Tempo de agitação</b>	<b>5 minutos</b>	<b>10 minutos</b>	<b>5 minutos</b>	<b>10 minutos</b>
<b>Diâmetro efetivo</b>	493,9 ± 42,5	522 ± 81,2	418,8 ± 31,2	440,9 ± 39
<b>Índice de polidispersidade</b>	0,296	0,338	0,203	0,232

À medida que se aumenta a concentração da dispersão de QS, aumenta-se o diâmetro efetivo das partículas obtidas (CALVO et al., 1997a,b; DE CAMPOS; SÁNCHEZ; ALONSO, 2001; VILA et al., 2002; PAN et al., 2002; VILA et al., 2004). Entretanto, a concentração da dispersão de QS foi mantida e a quantidade de TPP foi diminuída. Da tabela 12 podemos observar que ocorre uma diminuição do diâmetro efetivo das NP com a diminuição da quantidade de TPP utilizada para a obtenção das NP. Tal parâmetro também foi avaliado por Calvo e colaboradores (1997a), mostrou que o diâmetro das NP é diretamente proporcional tanto a concentração de QS quanto de TPP.

A mesma técnica foi utilizada para se avaliar o efeito da incorporação do ETP no diâmetro das NP de QS. Os resultados são mostrados na Tabela 13.

**Tabela 13:** Efeito da incorporação de ETP no diâmetro efetivo das NP de QS.

NP QS:TPP	Vazias	Índice de polidispersidade	Com Fármaco	Índice de polidispersidade
<b>4:1</b>	559,3 ± 28,7	0,159 ± 0,022	579,1 ± 9,2	0,188 ± 0,017
<b>4:0,8</b>	462,3 ± 12,7	0,266 ± 0,016	533,1 ± 33,1	0,161 ± 0,020

Verifica-se um aumento no diâmetro efetivo das NP devido a incorporação do ETP. Resultado condizente com as referências consultadas. Vila e colaboradores (2002), verificaram o aumento do diâmetro médio das NP após a incorporação de toxina tetânica. Pan e colaboradores (2002), verificaram o mesmo efeito após a incorporação de insulina em NP de QS obtidas por geleificação ionotrópica.

Por fim, pode-se esperar que o fármaco esteja sendo incorporado às partículas.

### **3.3 Determinação da eficiência de encapsulação das nanopartículas**

Alíquotas da solução estoque de ETP foram adicionados à dispersão de QS em quantidades crescentes, antes da adição da solução de TPP, para se determinar o ponto de máxima encapsulação de fármaco.

A diferença entre a quantidade inicial de ETP e a quantidade de ETP livre medida no sobrenadante da suspensão após a ultracentrifugação, nos fornece a quantidade de fármaco retido nas partículas. Foi realizado o estudo obedecendo a razão de massa de 4:0,8 QS:TPP para a formulação das NP devido ao menor diâmetro encontrado na análise granulométrica. Os resultados são apresentados na tabela 14.

Tabela 14: Porcentagem de ETP incorporado nas NP

Volume (mL)	ETP 2mg/mL	ETP 4mg/mL
0,2	7,72% ± 0,576	7,66% ± 0,193
0,3	13,12% ± 0,362	12,67% ± 0,892
0,4	4,75% ± 0,094	6,08% ± 0,336
0,5	4,55% ± 1,126	4,05% ± 1,68

### 3.4 Análise morfológica das nanopartículas

Como pode ser verificado na figura 14, as partículas não se apresentam perfeitamente esféricas, mas com um formato “esferóide”. Esse formato pode influenciar o índice de polidispersidade das amostras na análise granulométrica, mas não interfere na retenção do fármaco. Talvez a natureza do polímero e o seu grau de pureza sejam fatores determinantes para essa forma “quase-esférica”.

### 3.5 Potencial zeta ( $\zeta$ )

As superfícies das partículas em uma suspensão coloidal contêm grupamentos químicos que produzem uma carga de superfície ou simplesmente adsorvem íons que dão carga elétrica à superfície da partícula.

A quantidade de cargas de superfície nas partículas é uma característica importante porque determina algumas propriedades da suspensão como tempo de decantação e redispersabilidade das mesmas.

Existem várias maneiras de medir a carga da partícula, no entanto métodos diferentes não determinam sempre o mesmo valor. Um dos métodos mais eficazes é aplicar um campo elétrico à suspensão e medir a velocidade com que as partículas se movimentam. Esse processo é chamado eletroforese. Quanto maior a carga na superfície, maior a velocidade com que as partículas se deslocam.

A superfície que separa a camada de cargas da camada difusa em torno da partícula marca onde a solução e a partícula se movem em sentidos opostos quando um campo externo é aplicado. É chamada de superfície *shear* ou *slip*. O potencial eletrostático nessa superfície é chamado potencial zeta ( $\zeta$ ) e é esse potencial que está sendo medido quando se mede a velocidade das partículas em um campo elétrico.

A velocidade (em m/s) para uma unidade de campo elétrico (1 Volt por metro) é chamada mobilidade eletroforética, e é representada por  $\mu E$ . Relaciona-se ao  $\zeta$ , e é geralmente utilizado para medir o potencial no ponto entre as duas camadas de cargas.

As amostras para a análise de  $\zeta$  foram ressuspensas com 3 mL de uma solução de KCl  $10^{-3}$  mol/L, após a ultracentrifugação, com o intuito de contrabalancear a camada de contra-íons, deixando assim as cargas da superfície das partículas mais expostas (COLLOIDAL DYNAMICS, 1999).

Os resultados das 10 leituras das triplicatas de cada razão de massa das NP são apresentadas na tabela 15.

**Tabela 15:** Valores de  $\zeta$  das NP de QS.

<b>NP (QS:TPP)</b>	<b>NP vazias</b>	<b>NP com ETP</b>
<b>4:1</b>	+12,84 ± 1,87	+13,00 ± 1,94
<b>4:0,8</b>	+13,32 ± 1,75	+13,37 ± 1,79

Podemos verificar que não houve alteração relevante nos valores do  $\zeta$  das partículas analisadas, o que mostra que o fármaco pode não estar adsorvido na superfície das partículas.

As NP obtidas com a razão 4:0,8 apresentam valores ligeiramente maiores devido à maior mobilidade quando submetidas ao campo elétrico, em função do menor diâmetro (COLLOIDAL DYNAMICS, 1999).

De Campos e colaboradores em 2001, estudando a encapsulação de ciclosporina A para liberação oftálmica observou que o fármaco não fica adsorvido na superfície das NP não alterando assim a carga de superfície. Xu e Du (2003), avaliando os efeitos da estrutura molecular da QS na formulação de NP, verificaram que o GD pode estar diretamente relacionado à carga elétrica da superfície da partícula, de modo que maior o valor de GD, maior o valor de  $\zeta$ . Calvo e colaboradores (1997a), demonstraram que é possível modular a carga elétrica das NP de QS inserindo conjuntamente outros co-polímeros para a obtenção dessas NP.

Os resultados obtidos são concordantes com as observações citadas.

### ***3.6 Análise espectroscópica das nanopartículas contendo etoposide na região do infravermelho***

Para demonstrar a interação do fármaco com as NP de QS, foi realizada a análise em espectroscopia infravermelho e os resultados são mostrados na figura 17.

O TPP apresenta suas bandas características na região de  $1097\text{ cm}^{-1}$  característico dos grupamentos fosfato ( $\text{P} = \text{O}$ ) (Fig 17B).

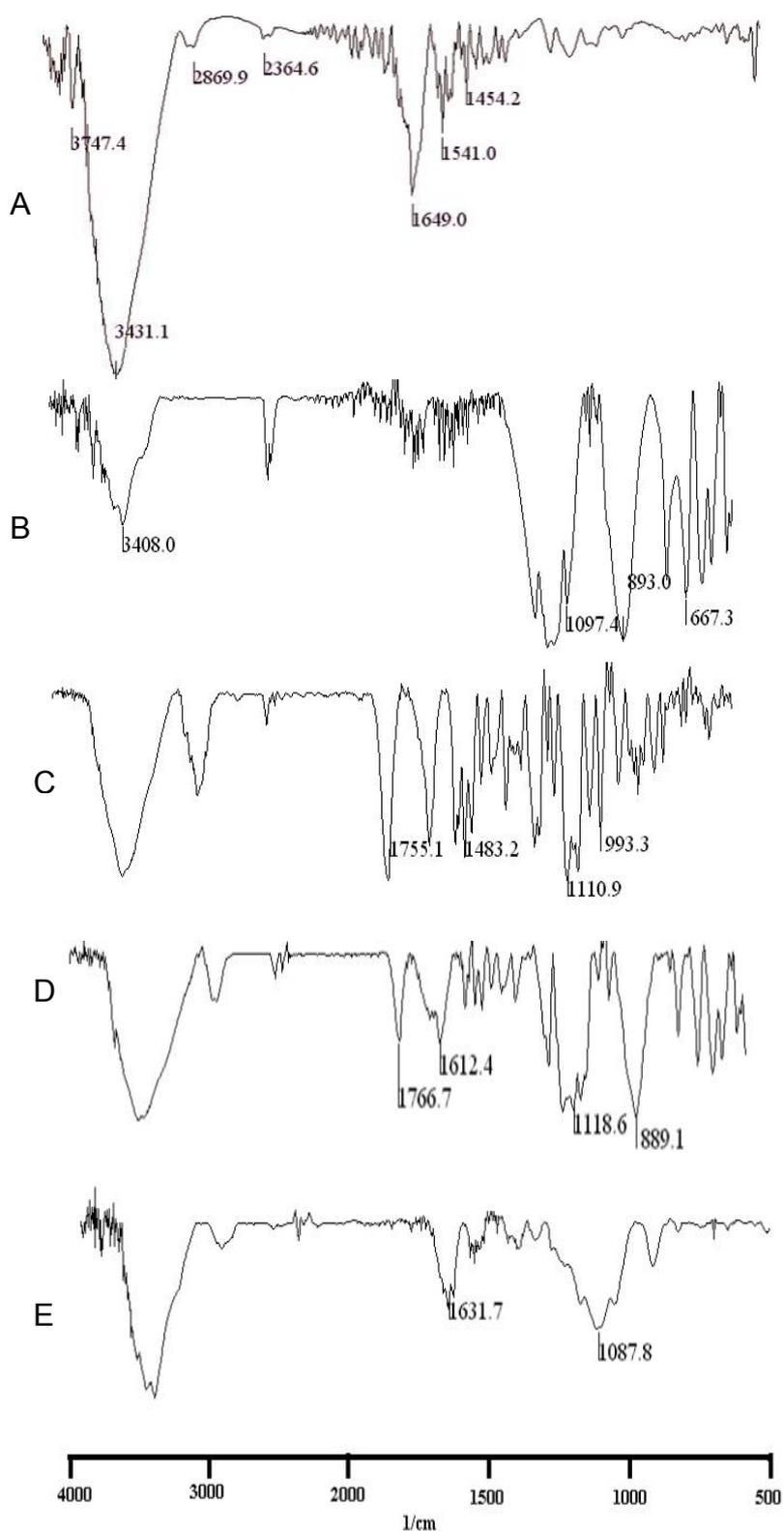
O ETP apresenta 4 picos característicos quando comparados com o composto de referência:  $1755,1\text{ cm}^{-1}$ ; referente à carbonila não-conjugada;  $1483,2\text{ cm}^{-1}$  referentes aos dois anéis benzênicos presentes na estrutura;  $1110,9$  e  $993,3\text{ cm}^{-1}$ , referentes ao glicosídeo ligado à estrutura do fármaco (Fig. 17C).

Pode-se verificar que os picos referentes ao fármaco e ao TPP aparecem na mistura física (Fig.17D), juntamente com os picos característicos da QS.

Quando se observa o espectro das NP (Fig. 17E), o pico que aparece em  $1631,7\text{ cm}^{-1}$  é referente à parte da QS acetilada, a ligação acetamida, que permanece inalterada durante a formação da ligação entre os grupamentos amino da cadeia polimérica e os grupamentos fosfato do ânion.

O pico em  $1087,8\text{ cm}^{-1}$  é referente à porção do grupamento fosfato, evidenciando a reação de reticulação da QS com o TPP e a formação das partículas. A ausência de bandas referente ao fármaco reforça as constatações do potencial zeta e mostram a ausência de fármaco adsorvido na superfície da partícula (Fig 17E). As bandas referentes ao ETP são nítidas no espectro referente à mistura física dos materiais e evidencia assim a encapsulação do fármaco, sem no entanto estar formando uma ligação química entre este e as partículas.

Knul e colaboradores (1999), Xu e Du (2003), observaram que a ligação do TPP com a QS causa um deslocamento do pico referente à vibração do grupo  $\text{NH}_2$  em direção a uma região de menor energia no espectro. Fato que se observa no deslocamento do pico de  $1649\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 17A) para  $1631\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 17E) depois de formadas as NP.



**Figura 17:** Espectros de: A) QS; B) TPP; C) ETP; D) Mistura física; E) NP de QS com ETP na região do infravermelho

Os espectros acima indicam que a encapsulação do ETP ocorre provavelmente por um processo físico. Pode-se observar ainda que o TPP forma ligações apenas com a QS reticulando e formando as NP. Não é evidente nenhum tipo de interação química entre os reagentes e o fármaco. Isso sugere que o processo de liberação do ETP pode ser regulado apenas pela solubilidade no meio de liberação.

### **3.6 Estudo do burst oxidativo e da citotoxicidade celular**

O sistema imunológico é um notável sistema de adaptação para defesa que protege o corpo de agressões externas, microrganismos patogênicos invasores e do câncer. É capaz de gerar um grande número de células e moléculas que podem especifica ou inespecificamente reconhecer e eliminar uma variedade, aparentemente ilimitada, de agentes invasores. Estas células e moléculas agem conjuntamente em uma rede dinâmica primorosamente adaptável cuja complexidade assemelha somente à do sistema nervoso (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

Uma imunidade efetiva não se dá simplesmente pela interação de uma molécula de antígeno com o linfócito contendo seu receptor específico, mas envolve ainda interações celulares que ocorrem após a apresentação do antígeno pelas células fagocitárias. Os macrófagos constituem-se em uma das principais células fagocitárias do sistema imunológico e são as primeiras a serem ativadas para participar de uma resposta imunológica propriamente dita, quando o organismo é confrontado por fatores exógenos, como bactérias, vírus e células cancerígenas. Parte de sua efetividade se deve à produção de óxido nítrico (NO), peróxido de

hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e outros reativos intermediários do nitrogênio (RNI), bem como fagocitose de partículas estranhas (LOPES, 2004).

Toda vez que se deparam com certos estímulos, os macrófagos sofrem um processo conhecido como ativação, caracterizado por um rápido aumento no metabolismo, motilidade e atividade fagocítica. Os macrófagos ativados secretam também mais de cem produtos, dentre eles enzimas, componentes do complemento, fatores de coagulação, espécies reativas de oxigênio, citocinas, etc (LOPES, 2004). São importantes como células inflamatórias, tumorocidas e microbicidas, pois a destruição de muitos parasitas intracelulares e de algumas células tumorais requer a ativação de macrófagos (ROITT et al., 1999).

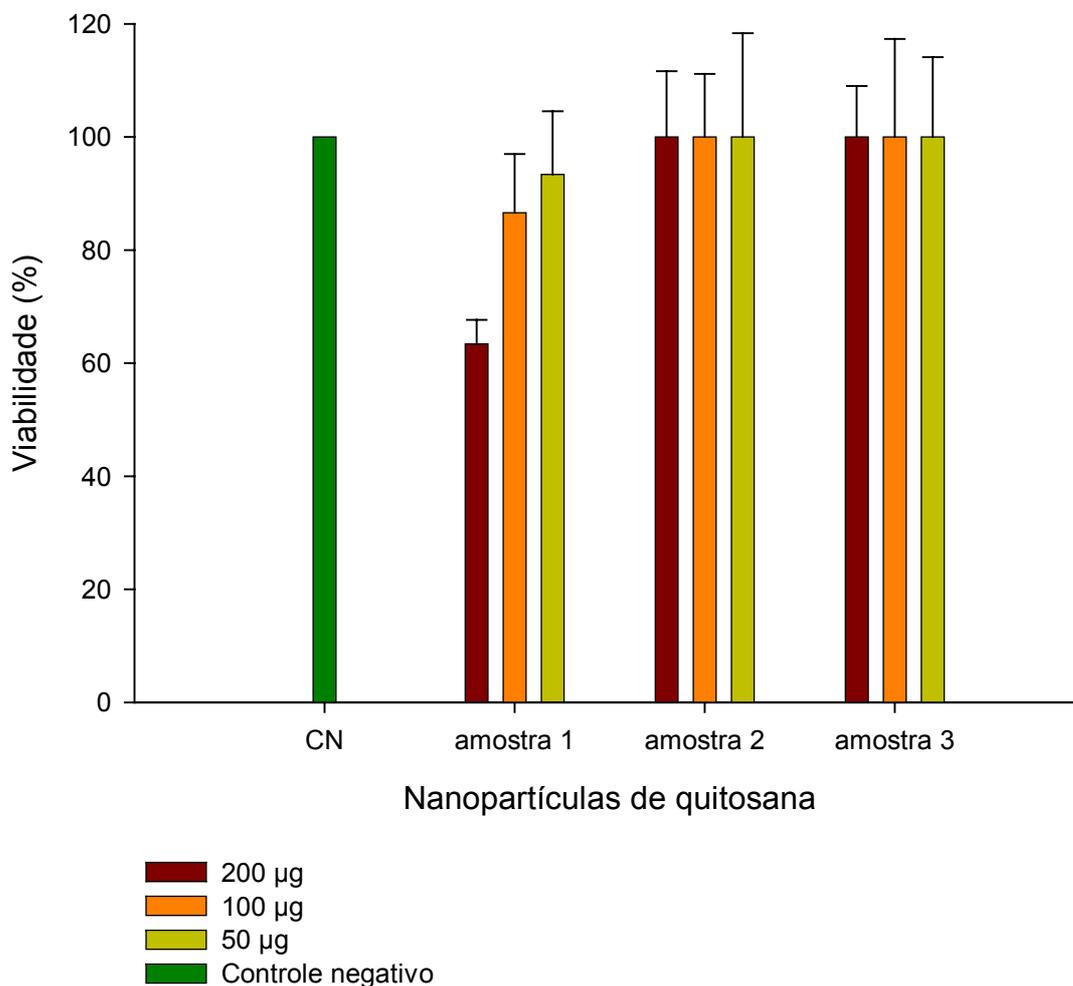
Fagócitos, neutrófilos e macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) durante a fagocitose ou devido à estimulação com vários agentes, através da ativação do complexo NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) oxidase (FORMAN; TORRES, 2001). Os radicais derivados do oxigênio liberados pelos macrófagos são capazes de oxidar membranas celulares e também de formar pontes dissulfeto entre os aminoácidos cisteína de diversas proteínas estruturais, levando à morte bacteriana (MOTTA JÚNIOR, 2004).

A geração fisiológica de ERO está relacionada com diversas respostas fisiológicas desde a ativação transcricional até a proliferação celular e apoptose (FORMAN; TORRES, 2001). Em resposta à ativação de macrófagos por mediadores inflamatórios solúveis específicos, é observada a ocorrência de um aumento de 2 a 20 vezes no consumo de oxigênio e aumento no metabolismo da glicose (DRATH; KARNOUSKY, 1975; BABIOR, 1978; BEUTLER et al., 1985). O consumo transitório de oxigênio é considerado um evento crítico para ação bactericida dos fagócitos. Durante esse período ocorre redução do oxigênio ( $O_2$ ) a ânion superóxido ( $O_2^-$ ). O

$O_2^-$  gerado é convertido a  $H_2O_2$  com a ajuda da enzima superóxido dismutase (SOD) (PICK; KEISARI, 1980; PICK; MIZEL, 1981; ROITT; DELVES, 1997; ROITT et al., 1999). O peróxido de hidrogênio possui uma variedade de papéis no corpo humano. Atua como molécula sinalizadora e um agente citotóxico no sistema de defesa (CLEMENT et al., 1998; ABE, BRADFORD, 1999; HALLIWEL et al., 2000; FORMAN; TORRES, 2001).

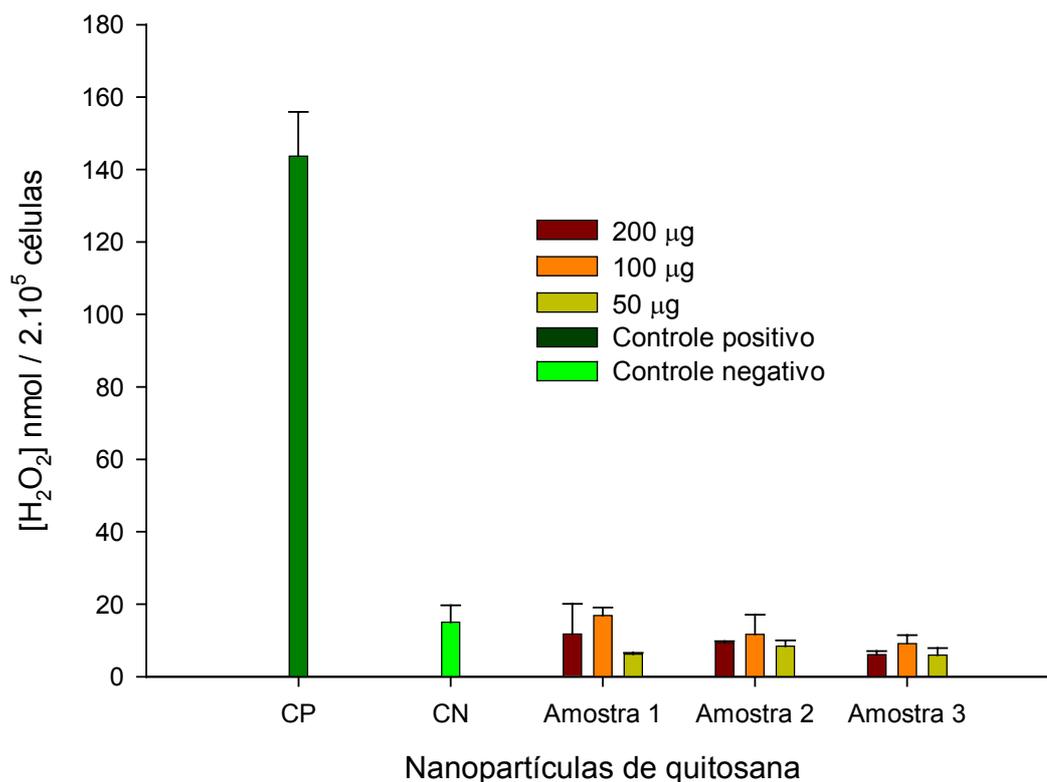
A resposta mediada por células é efetiva em eliminar viroses, fungos, micobactérias, células tumorais e rejeições teciduais (LOPES, 2004). Uma vez que as células são retiradas do seu ambiente natural *in vivo* e entram em contato com substâncias a serem estudadas, a questão da viabilidade é fundamental, principalmente durante o processo de manipulações experimentais, assegurando a capacidade de uma determinada população celular responder a vários estímulos, quaisquer que sejam eles (FRESHNEY, 1994). A análise da viabilidade celular foi baseada na capacidade dos macrófagos de reduzirem o brometo de 3 - (4,5 - dimetiltiazol - 2 - il) - 2 - 5 - difeniltetrazólico (MTT).

Os resultados expressados na figura 18 são referentes à análise de três amostras de NP sem ETP para avaliação da citotoxicidade das NP frente ao sistema monocítico fagocitário.



**Figura 18:** Viabilidade de macrófagos peritoneais murinos em presença de NP de QS sem fármaco.

Observando os resultados, verificamos que a viabilidade celular dos macrófagos frente as NP de QS nas concentrações testadas foram de 100%, com exceção da amostra 1, que para a maior concentração ainda apresentou uma viabilidade de 64%. Esse resultado não inviabiliza a utilização dessa amostra para a análise de  $H_2O_2$ , onde todas as amostras foram testadas. Os resultados são mostrados na figura 19.



**Figura 19:** Produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em culturas de macrófagos peritoneais murinos em presença das NP de QS sem fármaco.

Os resultados mostram que as NP de QS induziram pouco a produção de  $H_2O_2$ , o que significa que as células foram pouco ativadas. Podemos entender que com a pouca ativação dos macrófagos, essas partículas poderiam ficar mais tempo em circulação, já que seriam menos atacadas pelos macrófagos do sistema imunológico. Sugere-se que ensaios mais específicos sejam realizados a fim de esclarecer e comprovar esse escape pelas NP do sistema monocítico fagocitário.

### 3.7 Ensaio de solubilidade

Para se iniciar o ensaio de liberação *in vitro*, foi feito um ensaio de solubilidade para se avaliar a solubilidade do ETP em tampão acetato em diferentes

valores de pH. Shah, Chen e Chow (1989), descrevem a solubilidade do ETP em diferentes soluções tampão e diferentes valores de pH em uma temperatura constante de 37 °C. Para uma solução tampão acetato de sódio / ácido cético 0,1M pH 5, descrevem um valor de solubilidade de  $153,22 \pm 10,18 \mu\text{g/mL}$ ; para água destilada pH 4,5 o valor é de  $147,50 \pm 1,75 \mu\text{g/mL}$  e para tampão fosfato 0,1 M pH 7,4, o valor é  $125,93 \pm 19,41$ .

Imaginando-se uma aplicação endovenosa do fármaco, optou-se por realizar o ensaio de liberação em tampão acetato pH 7,4, observando as condições *sink* para o ensaio. A curva analítica do ETP em tampão acetato pH 7,4 é mostrada na figura 20.

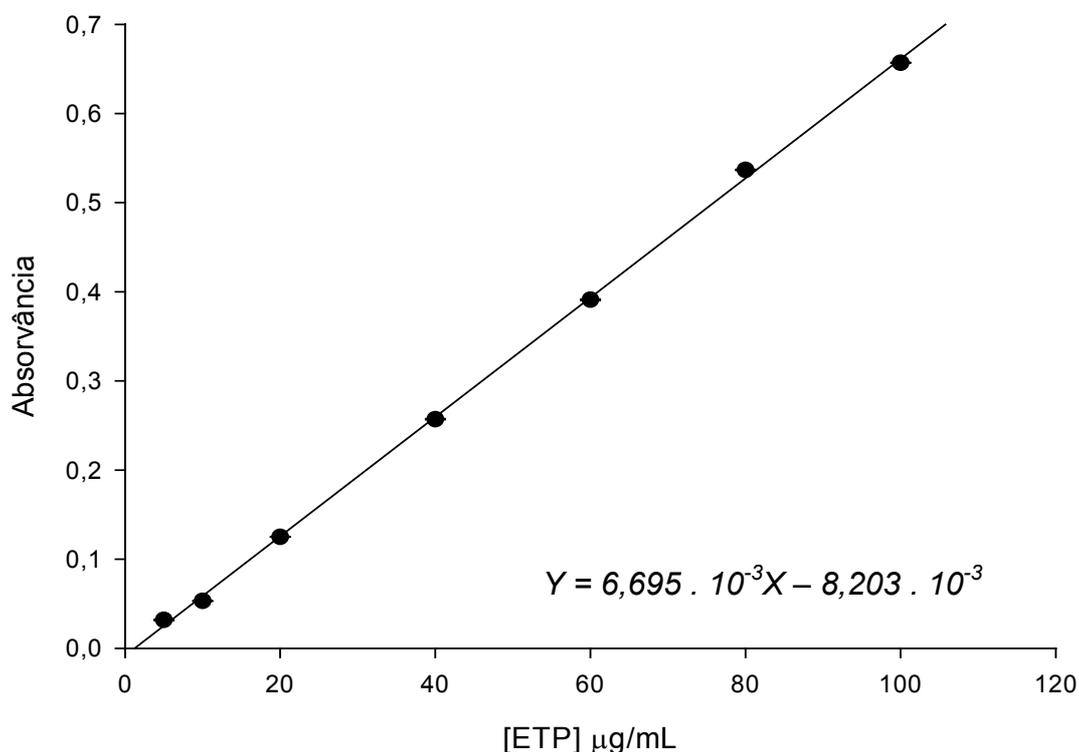
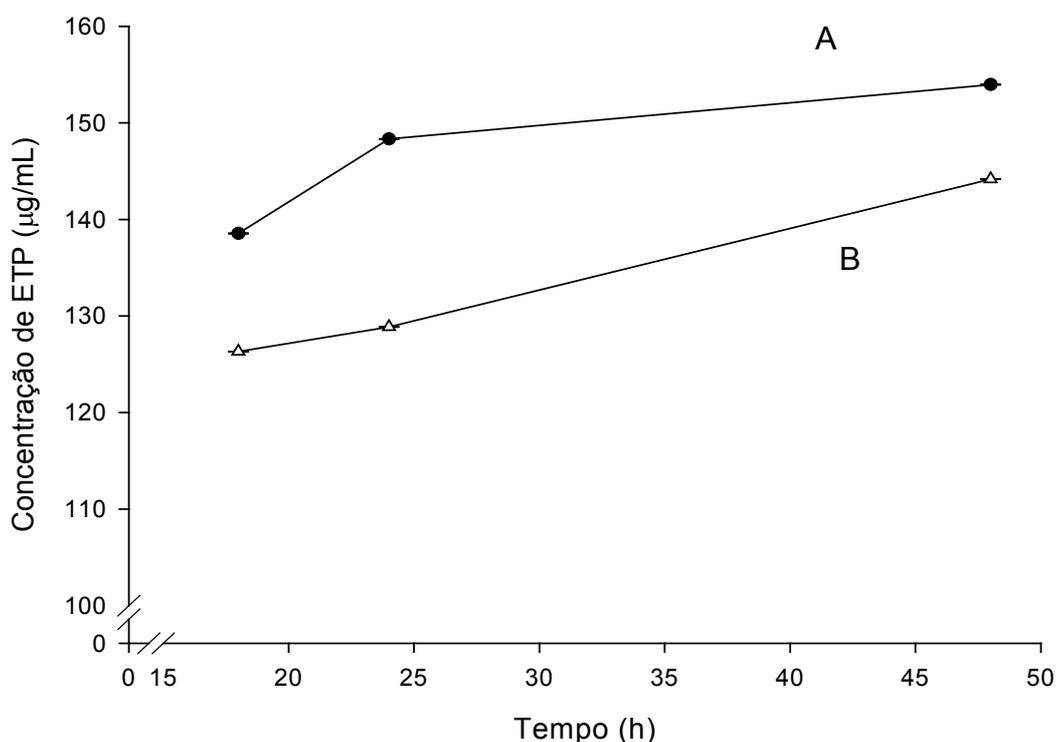


Figura 20: Curva analítica de ETP em tampão acetato 0,1M pH 7,4

A figura 21 mostra o perfil de solubilidade do ETP. Foi realizado em paralelo o mesmo ensaio com uma solução tampão acetato pH 4,5, para se comparar a solubilidade do fármaco nos dois valores de pH.



**Figura 21:** Comparação da solubilidade do ETP em solução tampão acetato com diferentes valores de pH. A) pH 4,5 B) pH 7,4

Os valores médios encontrados para a solubilidade do ETP nas condições descritas são mostrados na tabela 16.

**Tabela 16:** Solubilidade do ETP em diferentes valores de pH

Solução tampão acetato 0,1M	Solubilidade ETP a 25 °C (µg/mL)
pH 4,5	146,95 ± 7,806
pH 7,4	133,12 ± 9,657

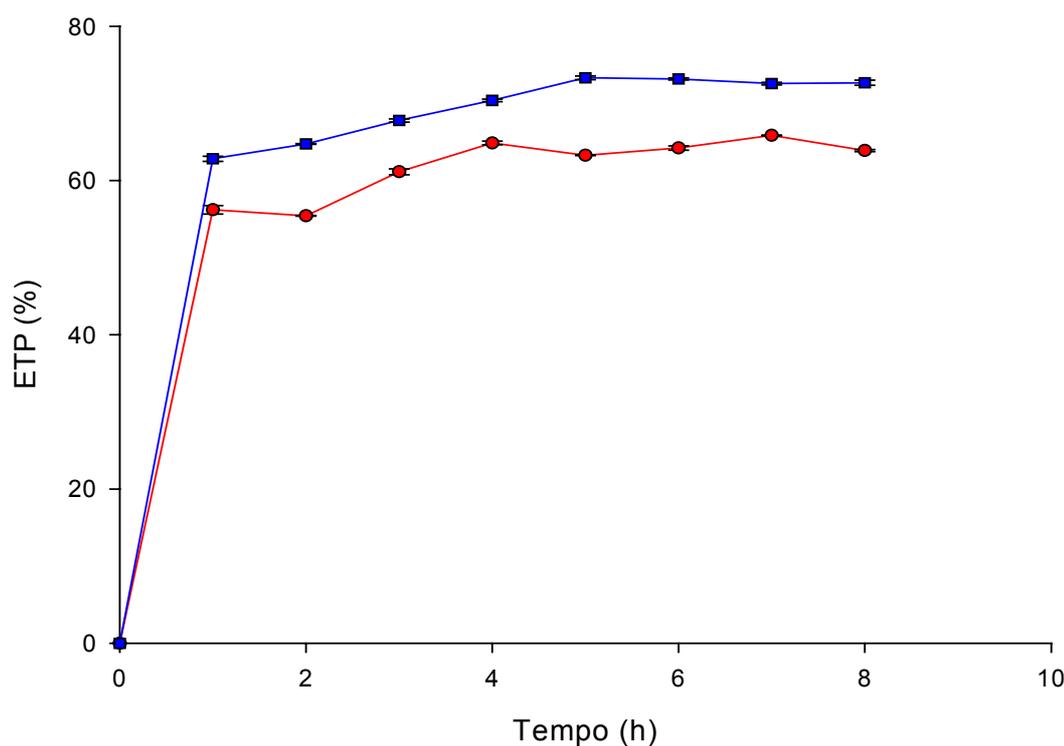
A diferença de solubilidade entre valores de pH entre 2 e 6 são estatisticamente insignificantes. No entanto a solubilidade aparente do ETP diminui consideravelmente em valores de pH acima de 6 além de aumentar a velocidade de degradação do fármaco (SHAH; CHEN; CHOW, 1989).

Isso justifica a necessidade de se obter um carreador que transporte o fármaco pela corrente sangüínea sem que ocorra a precipitação.

### ***3.8 Ensaio de liberação in vitro***

O ensaio foi realizado em triplicata, em pH 7,4 e observou-se duas composições idênticas de partículas com quantidades diferentes de fármaco. Um dos conjuntos apresentou uma quantidade média de ETP encapsulado de 80,34 µg e outro conjunto com uma média de 177,02 µg de fármaco encapsulado. Era obtida uma média de 3,4 mg de NP com fármaco para cada conjunto de amostras.

Os resultados foram obtidos a partir das análises em triplicata e são mostrados na figura 22.



**Figura 22:** Ensaio de liberação *in vitro* do ETP em meio tampão acetato pH 7,4. ● 177,02 µg; ● 80,34 µg

Podemos observar que quase a totalidade do fármaco é liberada para o meio na primeira hora de ensaio. Pode ser devido ao caráter hidrofílico do polímero que permite a penetração do meio no interior da partícula e assim solubiliza o fármaco. Um fator que ajuda esse comportamento inicial é a agitação em vortex para a ressuspensão das NP. Como essa agitação é bem mais intensa que 50 rpm, pode ter contribuído muito para a solubilização inicial do fármaco encapsulado.

Mesmo dobrando a quantidade de ETP na partícula, o perfil de liberação do fármaco não se alterou. NP com menor quantidade de fármaco permitem uma maior penetração do meio e conseqüente solubilização do fármaco, fato que explica a diferença nas curvas de liberação.

## VI Conclusões

O estudo mostrou que a obtenção de NP de QS por geleificação ionotrópica é um processo bastante delicado e que requer uma combinação de concentrações e volumes dos reagentes envolvidos bastante restrita. Os diâmetros das partículas podem variar em função da concentração e das características da QS além da concentração de TPP e da incorporação do fármaco. Essas partículas apresentam uma distribuição granulométrica bastante uniforme e um potencial zeta coerente com os grupamentos livres na cadeia polimérica.

As partículas obtidas se mostraram adequadas quanto a viabilidade celular, já que não apresentaram citotoxicidade em cultura de macrófagos. Apesar de testes de partículas contendo o fármaco não terem sido realizados, o fato da NP vazia manter as características do polímero lhe confere um grande potencial para uso como carreadores de fármacos antineoplásicos.

O método para análise do fármaco se mostrou adequado, de fácil reprodutibilidade e bastante rápido no que concerne a quantificação de ETP.

A forma de incorporação do ETP não apresentou um bom rendimento mas pode-se observar que existe uma quantidade ótima de incorporação por volta de 13%. Entretanto, as NP de QS foram incapazes de reter o fármaco por um longo período de tempo, liberando-o para o meio de dissolução quase que na totalidade na primeira hora do ensaio de liberação *in vitro*.

Outros métodos para a incorporação do fármaco devem ser estudados na tentativa de se aumentar o teor de fármaco no sistema e o tempo de liberação. Entretanto o sistema apresentou bom potencial para uso em oncoterapia, mas outros estudos devem ser realizados a fim de melhor elucidar essa aplicação.

---

## VII REFERÊNCIAS

ABE, J.; BRADFORD, B. C. Fyn and JAK2 mediate ras activation by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* Bethesda, v. 274, n. 30, p. 21003 – 21010, 1999.

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Control. Rel.*, v. 100, p. 5 - 28, 2004.

AKBUGA, J.; DURMAZ, G. Preparation and evaluation of cross-linked chitosan microspheres containing furosemide. *Int. J. Pharm.*, v.111, p.217 - 221, 1994.

ANGELOVA, N.; HUNKELER, D. Permeability and stability of chitosan-based capsules: effect of preparation. *Int. J. Pharm.*, v.242, p.229 - 232, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução – RE nº 889, de 29 de maio de 2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Disponível em: [www.anvisa.org.br](http://www.anvisa.org.br). Acesso em 04 nov 2004.

ARGÜELLES-MONAL, W.; CABRERA, G.; PENICHE, C.; RINAUDO, M. Conductimetric study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and polygalacturonic acid. *Polymer*, v. 41, p. 2373 – 2378, 2000.

AYDIN, Z.; AKBUGA, J. Chitosan beads for delivery of salmon calcitonin: preparation and release characteristics. *Int. J. Pharm.*, v.131, p.101 - 103, 1996.

AVGOUSTAKIS, K.; BELETSI, A.; PANAGI, Z.; KLEPETSANIS, P.; KARYDAS, A. G.; ITHAKISSIOS, D. S. PLGA – mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J. Control. Rel.*, v. 79, p. 123 – 135, 2002.

BABIOR, B. M. Oxygen – dependent microbial killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.* Waltham, v. 298, p. 659 – 668, 1978.

BANERJEE, T.; MITRA, S.; SING, A.K.; SHARMA, R.K.; MAITRA, A. Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, v.243, p.93 - 105, 2002.

BARTLING, B.; LEWENSOHN, R.; ZHIVOSTOVSKY, B. Endogenously released Smac is insufficient to mediate cell death of human lung carcinoma in response to etoposide. *Experimental Cell Res.*, v. 298, p. 83 - 95, 2004.

BERTHOLD, A.; CREMER, K.; KREUTER, J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs. *J. Control. Rel.*, v.39, p.17 - 25, 1996.

BEUTLER, B.; GREENWALD, D.; HULMES, J. D.; CHANG, N.; PAN, Y. C. E.; MATHSON, J.; ULEVITCH, R. and CERAMI, A. Identity of tumor necrosis factor and the macrophage secreted factor cachectin. *Nature*. London, v. 316, p. 552, 1985.

BODMEIER, R.; OH, K.; PRAMAR, Y. Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v.15, p.1475 - 1494, 1989a.

BODMEIER, R.; PAERATAKUL, O. Spherical agglomerates of water-insoluble drugs. *J. Pharm. Sci.*, v.78, p. 964 - 967, 1989b.

BORCHARD, G.; JUNGINGER, H.E. Modern drug delivery applications of chitosan. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.52, p.103, 2001.

BRITISH PHARMACOPOEIA. 2001. ed. v. I. London: The Stationery Office, 2001.

BRAZMO – INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA. Tripolifosfato de sódio. Disponível em:[http://www.brazmo.com.br/html/detail\\_alt.asp?name=TRIPOLIFOSFATO+DE+S%D3DIO&cat=Produtos](http://www.brazmo.com.br/html/detail_alt.asp?name=TRIPOLIFOSFATO+DE+S%D3DIO&cat=Produtos). Acesso em 26 jun 2004.

BRINE, C.J. In: ZIKAKIS, J.P. (Ed.). *Chitin, chitosan and related enzymes*. New York: Academic Press, 1984.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 54, p. 631 – 651, 2002.

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

CALVO, P.; SÁNCHEZ, A.; MARTÍNEZ, J.; LÓPEZ, M. I.; CALONGE, M.; PASTOR, J. C.; ALONSO, M. J. Polyester nanocapsules as new topical ocular delivery systems for cyclosporin. *Pharm. Res.*, v.132, p.311 - 315, 1996.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Novel hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Pol. Sci.*, v. 63, p.125 - 132, 1997a.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm. Res.*, v.14, p.1431 - 1436, 1997b.

CHANDY, T.; SHARMA, C.P. Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin. *Biomaterials*, v.14, p.939 - 944, 1993.

CHANG, K. L. B.; TASI, G.; LEE, J.; FU, W-R. Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohyd. Res.*, v. 303, p. 327 – 332, 1997.

CHEN, R.H.; TSAIH, M. L. Effect of temperature the intrinsic viscosity and conformation of chitosans in dilute HCl solution. *Int. J. Biolog. Macromol.*, v. 23, p. 135 - 141, 1998.

CLEMENT, M.; PONTON, A.; PERVAIZ, S. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *Fabs. Lett.*, Amsterdam, v. 440, p. 13 – 18, 1998.

COLLOIDAL DYNAMICS – Leaders in colloid measurement. Disponível em: [www.colloidal-dynamics.com](http://www.colloidal-dynamics.com). Acesso em: 25 jul 2004.

COUVREUR, P.; COURRAGE, G.; DEVINAGUET, J-P.; PUISIEUX, F. Nanoparticles: Preparation and Characterization. In: Microencapsulation: Methods and Industrial Applications. New York, *Marcel Dekker*. 1996. p.183 - 184.

COUVREUR, P.; FATAL, E.; ANDREMONT, A. Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections. *Pharm.Res.*, v.8, p.1078-1086, 1991.

CUI, Z.; MUMPER, R. J. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. *J.Control.Rel.*, v. 75, p. 409 - 419, 2001.

DALY, M.M.; KNORR, D. Chitosan-alginate complex coacervate capsules: effects of calcium chloride, plasticizers, and polyelectrolytes on mechanical stability. *Biotechnol. Prog.*, v.4, p.76 - 81, 1988.

DONBROW, M. Introduction and overview, In: DONBROW, M. Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy. *Boca Raton: CRC*, 1992. p1 - 16.

DONG, Y.; FENG, S-S. Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, v. 25, 2843 – 2849, 2004.

DRATH, D. B.; KARNOUSKY, M. L. Superoxide production by phagocytic leukocytes. *J. Exp. Med.* New York, v. 141, p. 257 – 261, 1975.

ERBARCER, P.; ZOU, S.; BETTINGER, T.; STEFAN, A-M.; REMY, J-S. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: Biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm. Res.*, v. 15, p.1332 - 1339, 1998

EL-GIBALY, I. Oral delayed-release system based on Zn-pectinate gel (ZPG) microparticles as an alternative carrier to calcium pectinate beads for colonic drug delivery. *Int. J. Pharm.*, v.232, p.199 - 211, 2002.

FELT, O.; BURI, P.; GURNY, R. Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev. Ind.Pharm.*, v.24, p.979 - 993, 1998.

FERNANDES, D. C. *Estabilidade e citotoxicidade do quimioterápico etoposide incorporado a uma emulsão lipídica rica em colesterol*. São Paulo, 2002. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

FENG, S.-S.; HUANG, G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol®) from nanospheres of biodegradable polymers. *J.Control.Rel.*, v.71, p.53 - 69, 2001.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. *Mol. Aspects Med.*, Elmsford, v. 22, p. 189 – 216, 2001.

FRESHNEY, R. I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Wiley – Liss, 1994. 486p.

GAMZAZADE, A.I.; NASIBOV, S.M. Formation properties of polyelectrolyte complexes of chitosan hydrochloride and sodium dextran sulfate. *Carbohydr. Polym.*, v.50, p.339 - 343, 2002.

GILMAN, A.; GOODMAN, L. S.; HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E. *GOODMAN & GILMAN's The pharmacological basis of therapeutics*. 9th ed. New York: The McGraw Hill, 1996.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBOURNE, B. A. W H. *Kuby Immunology*. 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2000. 670p.

GOSKONDA, S.R.; UPADRASHTA, S.M. Avicel RC-591/chitosan beads by extrusion-spheronization technology. *Drug Develop. Ind. Pharm.*, v.19, p.915 - 927, 1993.

GÖRNER, T.; GREF, R.; MICHENOT, D.; SOMMER, F.; TRAN, M.N.; DELLACHERIE, E. Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix. *J.Control. Rel.*, v.57, p.259 - 268, 1999.

GUPTA, A.; CIFTCI, K. Formulation and characterization of paclitaxel, 5-FU and paclitaxel + 5-FU microspheres. *Int. J. Pharm.*, v. 276, p. 93 – 106, 2004.

HALLIWEL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. *Fabs. Lett.*, Amsterdam, v. 486, p. 10 – 13, 2000.

HANDE, K. R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur. J. Cancer*, v. 34, p. 1514 - 1521, 1998a.

HANDE, K. R. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1400, p. 173 - 184, 1998b.

HASKELL, R. J. Characterization of submicron system via optical methods. *J. Pharm. Sci.*, v. 87, p. 125 – 129, 1998.

HASSAN, E.E.; PARISH, R.C.; GALLOO, J.M. Optimized formulation of magnetic chitosan microspheres containing the anticancer agent, oxantrazole. *Pharm. Res.*, v.9, p.390 - 397, 1992.

HUANG, Y.C.; YEH, M.K.; CHIANG, C.H. Formulation factors in preparing BTM-chitosan microspheres by spray drying method. *Int. J. Pharm.*, v.242, p.239 - 242, 2002.

HENRISKSEN, I.; GREEN, K.L.; SMART, J. D.; SMISTAD, G.; KARLSEN, J. Bioadhesion of hydrated chitosans: an in vitro and in vivo study. *Int.J.Pharm.*, v. 145, p. 231 - 240, 1996.

HUO, D.; DENG, S.; LI, L.; JI, J. Studies on the poly(lactide-co-glycolic) acid microspheres of cisplatin for lung – targeting. *Int. J. Pharm.*, v. 289, p. 63 – 67, 2005.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Validation of analytical procedures: methodology*. 1996, p. 1 – 8.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm.Res.*, v.15, p.1326 - 1331, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Câncer de pulmão Disponível em: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=340](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=340). Acesso em 1 jul 2005.

JANES, K. A.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Polyssaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv. Drug Del. Rev.*, v.47, p.83 - 97, 2001.

JIANG, X.; CHEN, L.; ZHONG, W. A new linear potentiometric titration for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydr. Pol.*, v. 54, p. 457 – 463, 2003.

KAWASHIMA, Y. Nanoparticulate systems for improved drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, v.47, p.1 - 2, 2001.

KARLSEN, J. Excipient properties of chitosan. *Manuf. Chem.*, June, p.18 - 19, 1991.

KARUP, A.; HANNA, N. H. Treatment of small cell lung cancer. *Critical Rev. Oncol. Hematol.*, v. 52, p. 117 - 126, 2004.

KAS, H.S. Chitosan: properties; preparations and applications to microparticulate systems. *J. Microencapsul.*, v.14, p.689 - 711, 1997

KIANG, T.; WEN, J.; LIM, H. W.; LEONG, K. W. The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials*, v. 25, p. 5293 – 5301, 2004.

KNAUL, J.Z.; KASAAI, M.R.; BUI V. T.; CREBER, K.A.M. Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. *Can.J.Chem.*, v.76, p. 1699 - 1706, 1998.

KNORR, D. Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.*, Jan., p.85 - 97, 1984.

KO, J.A.; PARK, H.J.; HWANG, S.J.; PARK, J.B.; LEE, J.S. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.*, v.249, p.165 - 174, 2002.

KREUTER, J. *Colloidal drug delivery systems*. Nova York: Marcel Dekker, 1994.

LABHASETWAR, V.; SONG, C.; LEVY, R. J. Nanoparticle drug delivery system for restenosis. *Adv. Drug Del. Rev.*, v.24, p.63 - 85, 1997.

LI, Q.; DUNN, E.T.; GRANDMAISON, E.W.; GOOSEN, M.F.A. Applications and properties of chitosan. *J.Bioact.Compact.Polym.*, v.7, p.370 - 397, 1992.

LIGGINS, R. T.; D'AMOURS, S.; DEMETRICK, J. S.; MACHAN, L.S., BURT, H. M. Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres for the prevention of intraperitoneal carcinomatosis after a surgical repair and tumor spill. *Biomaterials*, v.21, p. 1959 – 1969, 2000.

LIN, S.; LIN, P. Effect of acid type, acetic acid and sodium carboxymethyl cellulose concentrations on the formation, micromeritic, dissolution and floating properties of theophylline chitosan. *Chem. Pharm. Bull.*, v.40, p.2491 - 2497, 1992.

LOPES, F. C. M. *Avaliação da atividade in vitro de Alchornea spp. quanto à produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral -  $\alpha$  por macrófagos murinos*. Dissertação (mestrado em análises clínicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2004.

LORENZO-LAMOSA, M.L.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *J. Control. Rel.*, v.52, p.109 - 118, 1998.

LUCINDA, R.M. *Preparação e Caracterização de micropartículas de quitosana-alginato*. Araraquara, 1999. 154p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 1999.

LUCINDA-SILVA, R.M.; EVANGELISTA, R.C. Microspheres of alginate-chitosan containing isoniazid. *J. Microencapsul.*, v.19, p.15, p.1 - 8, 2002.

MAINARDES, R. M. *Preparação e caracterização de nanopartículas de ácido poli (D,L-lático-co-glicólico) contendo praziquantel*. Araraquara, 2004. 129p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2004.

MU, L.; FENG, S. S. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol ®). *J.Control.Rel.*, v.80, p.129 - 144, 2002.

MI, F.; WONG, T.; SHYU, S.; CHANG, S. Chitosan microspheres modification of polymeric chem-physical properties of spray-dried microspheres to control the release of antibiotic drug. *J. Appl. Polym. Sci.*, v.71, p.747 - 759, 1999.

MILLER, A.A.; NIELL, H. B. Phase I and pharmacologic study of sequential topotecan, carboplatin and etoposide. *Lung Cancer*, v. 33, p. 241 - 248, 2001.

MIYATAKE, K.; OKAMOTO, Y.; SHIGEMASA, Y.; TOKURA, S.; MINAMI, S. Anti-inflammatory effect of chemically modified chitin. *Carbohydr. Pol.*, v.53, p. 417 - 423, 2003.

MIYAZAKI, S.; NAKAYAMA, A.; ODA, M.; TAKADA, M.; ATTWOOD, D. Drug release from oral mucosal adhesive tablets of chitosan and sodium alginate. *Int.J.Pharm.*, v.118, p. 257 - 263, 1995.

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

MOTTA JÚNIOR, C. M. Células do sistema imune. Disponível em: <http://ioh.medstudents.com.br/imuno2.htm>. Acesso em 17 dez. 2004.

MURATA, Y.; MAEDA, T.; MIYAMOTO, E.; KAWASHIMA, S. Preparation of chitosan-reinforced alginate gel beads - effects of chitosan on gel matrix erosion, *Int. J. Pharm.*, v.96, p.139 - 145, 1993.

MUZZARELLI, R.A.A. *Chitin*. Toronto: Pergamon of Canada, 1977.

OKAMOTO, Y.; KAWAKAMI, K.; MIYATAKE, K.; MORIMOTO, M.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydr. Pol.*, v. 49, p. 249 - 252, 2002.

OKAMOTO, Y.; YANO, R.; MIYATAKE, K.; TOMOHIRO, I.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydr. Pol.*, v. 53, p. 337 - 342, 2003.

PAN, Y.; LI, Y.J.; ZHAO, H.Y.; ZHENG, J.M.; XU, H.; WEI, G.; HAO, J.S.; CUI, F. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm*, v.249, p.139 - 147, 2002.

PAVANETTO, F.; GENTA, I.; CONTI, B.; MODENA, T.; PERUGINI, P. Multiple emulsion O/W/O as preparations method for hydrophobic drug loaded chitosan microspheres. *Proc.10<sup>th</sup>. Int. Symp. Microencap.* Austin - USA, 49, 1995.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Del. Rev.*, v. 55, p. 329 - 347, 2003.

PETER, M.G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *J.M.S. Pure Appl. Chem.*, v.A32, p.629 - 640, 1995.

PHARES, R. E.; SPERANDIO, G. J. Preparation of a phase diagram for coacervation. *J. Pharm. Sci.*, v. 53, p. 518 – 521, 1964.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for measurement of hydrogen peroxide by cell in culture. *J. Immunol. Methods*. Amsterdam, v. 38, p. 61 – 70, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. J. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods*. Amsterdam, v. 46, p. 211 – 226, 1981.

QUINTANAR-GUERREIRO, D.; ALLÉMAN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification – diffusion technique. *Pharm. Res.*, v.15, p.1056 - 1062, 1998.

RATHKE, T.D.; HUDSON, S.M. Review of chitin and chitosan as fiber and film formers, *J.M.S. - Rev. Macromol. Chem. Phys.*, v.C34, n.3, p.375 - 437, 1994.

REDDY, L. H.; SHARMA, R. K.; CHUTTANI, K.; MISHRA, A. K.; MURTHY, R. S. R. Influence of administration route on tumor uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice. *J. Control. Rel.*, v. 105, p. 185 – 198, 2005.

ROITT, I.; DELVES, P.T. Roitt's essential immunology. 9<sup>th</sup> ed. London: Balckwell Science, 1997. 476p.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. 5<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, 1999. 423p.

SABNIS, S.; BLOCK, L. H. Chitosan as an enablin excipient for drug delivery systems I. Molecular modifications. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 27, p. 181 – 186, 2000.

SÄKKINEN, M.; SEPPALA, U.; HEINANEN, P.; MARVOLA, M. In vitro evaluation of microcrystalline chitosan (MCCh) as gel-forming excipient in matrix granules. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.54, p.33 - 40, 2002.

SANTOS, H.; VEIGA, F.; PINA, M.; PODCZECK, F.; SOUZA, J. Physical properties of chitosan pellets produced by extrusion/spheronisation: influence of formulation variables. *Int. J. Pharm.*, v.246, p.153 – 169, 2002.

SENEL, S.; McCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv. Durg Deliv. Rev.*, v. 56, p. 1467 - 1480, 2004.

SHARMA, A.; MONDAL, K.; GUPTA, M.N. Some studies on characterization of three phase pationed chitosan. *Carbohydr. Pol.*, v. 52, p. 433 - 438, 2002.

SHIKATA, F.; TOKUMITSU, H.; ICHIKAWA, H.; FUKUMORI, Y. In vitro cellular accumulation of gadolinium incorporated into chitosan nanoparticles designed for neutron-capture therapy of cancer. *Eur. J.Pharm. Biopharm.*, v.53, p. 57 - 63, 2002.

SILVEIRA, A.M.; PONCHEL, G.; PUISIEUX, F.; DUCHÊNE, D. Combined poly(isobutylcyanoacrylate) and cyclodextrins nanoparticles for enhancing the encapsulation of lipophilic drugs. *Pharm.Res.*, v.15, p.1051 – 1055, 1998.

SHAH, J.C.; CHEN, J.R.; CHOW, D. Preformulation study of etoposide: Identification of physicochemical characteristics responsible for the low and erratic oral bioavailability of etoposide. *Pharm. Res.*, v. 6, p. 408 – 412, 1989.

SHAH, J.C.; CHEN, J.R.; CHOW, D. Preformulation study of etoposide: II. Increased solubility and dissolution rate by solid-solid dispersions. *Int. J. Pharm.*, v. 113, p. 103 - 111, 1995.

SHU, X. Z.; ZHU, K. J. A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery. *Int. J. Pharm.*, v. 201, p. 51 - 58, 2000.

SHU, X. Z.; ZHU, K. J. The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 54, p. 235 - 243, 2002a.

SHU, X. Z.; ZHU, K. J. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. *Int. J. Pharm.*, v. 233, p. 217 - 225, 2002b.

SILVERSTEIN, R.; BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 3<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Guanabara, 1979.

SIMON, M.; ARGIRIS, A.; MURREN, J. R. Progress in the therapy of small cell lung cancer. *Critical Rev. Oncol. Hematol.*, v.49, p. 119 - 133, 2004.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J.Control. Rel.*, v.170, p.1 - 20, 2001.

SON, Y. J.; JANG, J-S.; CHO, Y. W.; CHUNG, H.; PARK, R-W.; KWON, I. C.; KIM, I-S.; PARK, J. Y.; SEO, S. B.; PARK, C. R.; JEONG, S. Y. Biodistribution and anti-tumor efficacy of doxorubicin loaded glycol-chitosan nanoaggregates by EPR effect. *J. Control. Rel.*, v. 91, p. 135 – 145, 2003.

STRAUB, J. A.; CHIKERING, D. E.; LOVELY, J. C.; ZHANG, H.; SHAH, B.; WAUD, W. R.; BERNSTEIN, H. Intravenous hydrophobic drug delivery: a porous particle formulation of paclitaxel (AI-850). *Pharm. Res.*, v. 22, p. 347 – 355, 2005.

TAKAHASHI, T.; TAKAYAMA, K.; MACHIDA, Y.; NAGAI, T. Characteristics of polyion complexes of chitosan with sodium alginate and sodium polyacrylate, *Int. J. Pharm.*, v.61, p.35 - 41, 1990.

TAN, S.C; KHOR, E.; TAN, T.K.; WONG, S.M. The degree of deacetylation of chitosan advocating the first derivate UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta*, v. 45, p. 713 - 719, 1998.

THANOO, B.C.; SUNNY, S. C.; JAYAKRISHNAN. Cross-linked chitosan microspheres: Preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals. *J.Pharm.Pharmacol.*, v. 44, p.283 - 286, 1992.

THE MERCK INDEX AN ENCYCLOPEDIA OF CHEMICALS, DRUG AND BIOLOGICALS, 13<sup>a</sup> ed. Publicada por Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc. Whitehouse – Station, NJ, 2001.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 26 th ed. Ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2003. 457 p.

TORRADO, S.; PRADA, P.; DE LA TORRE, P. M.; TORRADO, S. Chitosan-poly(acrylic) acid polyionic complex: in vivo study to demonstrate prolonged gastric retention. *Biomaterials*, v.25, p.917-923, 2004.

TSAIH, M. L.; CHEN, R.H. Effect of molecular weigth and urea on the conformation of chitosan molecules in dilute solutions. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 20, p. 233-240, 1997.

VALERO, J.; EGEA, M. A.; ESPINA, M.; GAMISANS, F.; GARCIA, M, L. Effect of polymerization coadjuvants on nanocapsules elaboration and triancinolone entrapment. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v.22, p.167-173, 1996.

VAN DER LUBBEN, I. M.; VERHOEF, J.C.; VAN AELST, A. C.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E. Chitosan microparticle for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches. *Biomaterials*, v.22, p. 687-694, 2001.

VAN DER LUBBEN, I.M.; VERHOEF, J.C.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H.E. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.52, p.139-144, 2001.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; JANES, K.; BEHRENS, I.; KISSEL, T.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.57, p.123-131, 2004.

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

VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M. *Tratado de tecnologia Farmacêutica*, 3 ed. Zaragoza: Acribia, 1982. 769p.

WANG, W.; BO, S.; LI, S.; QIN, W. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosan with different degrees of deacetylation. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 13, p. 281-285, 1991.

XU, Y.; DU, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, v. 250, p. 215-226, 2003.

ZAFFARONI, N.; DAIDONE, M.G. Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic intervention. *Drug Resist. Updates*, v. 5, p. 65-72, 2002.

ZHAO, L.; MITOMO, H.; NAGASAWA, N.; YOSHI, F.; KUME, T. Radiation synthesis and characteristic of the hydrogels based on carboxymethylated chitin derivatives. *Carbohydr. Pol.*, v.51, p.169-175, 2003.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)